

Определение функциональной значимости варианта с.423-6A>G в гене APC у пациента с клиническими признаками семейного аденоматоза толстой кишки

Цуканов А.С., Поспехова Н.И., Шубин В.П., Кузьминов А.М.,
Сачков И.Ю., Кашников В.Н., Фролов С.А., Шелыгин Ю.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр колопроктологии им. А.Н. Рыжих»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, ул. Салаяма Адиля, д.2,
123423, тел. +7(499) 642-54-40, факс. +7(499) 199-04-09, e-mail: info@gnck.ru

До 1% всех случаев колоректального рака возникает на фоне семейного аденоматоза толстой кишки. Этот наследственный синдром в большинстве случаев обусловлен герминальными мутациями в гене APC. Около 85% унаследованных мутаций являются небольшими делециями/инсерциями и нонсенс-мутациями, оставшиеся 15% — большие делеции, миссенс-мутации и мутации сайта сплайсинга. Однако далеко не для всех миссенс-мутаций и интронных вариантов в гене APC определена функциональная значимость. В работе проведено выяснение патогенного значения ранее не описанного варианта с.423-6A>G в гене APC у пациента с клиническими признаками классической формы семейного аденоматоза толстой кишки. Нами выполнен анализ мутационных изменений на уровне мРНК, который выявил изменения транскрипта, обусловленные нарушением процесса сплайсинга. Полученные данные однозначно указывают на то, что вариант с.423-6A>G в гене APC является патогенной мутацией.

Ключевые слова: ген APC, колоректальный рак, семейный аденоматоз толстой кишки

Введение

Колоректальный рак в 1% случаев обусловлен семейным аденоматозом толстой кишки (САТК). В настоящий момент для данного наследственного синдрома описаны классическая (более 100 аденоматозных колоректальных полипов) и ослабленная (менее 100 полипов) формы, однако ряд авторов отдельно выделяет тяжелую форму, характеризующуюся развитием тысяч полипов и ранним возрастом манифестации заболевания [6]. В 65–70% случаев у больных, имеющих более 100 аденоматозных полипов, обнаруживаются наследственные мутации в гене APC в гетерозиготном состоянии [2]. Мутации при классической форме в основном находятся в участке со 157 по 1249 или с 1465 по 1595 кодоны; при тяжелой форме — в центральном регионе гена (кодоны 1250–1464) [9]. Для ослабленной формы характерны мутации, расположенные, как правило, по краям гена (до 157 или после 1595 кодонов), а частота их встречаемости составляет 10–30% [6, 9]. Однако не все найденные мутации располагаются в регионах гена, характерных для развития определенной формы САТК [1]. В большинстве случаев патогенными наследственными мутациями в гене APC являются небольшие вставки/делеции, приводящие к сдвигу рамки считывания, а также нонсенс-мутации — суммарно до 85%. Оставшиеся 15% приходится на большие делеции, миссенс-мутации, а также мутации сайта сплайсинга, в результате которых в большинстве случаев происходят делеции соседних экзонов [3, 7]. Тем не менее, вопрос о патогенном зна-

чении найденных наследственных вариантов в гене APC не всегда может быть решен однозначно. Так, в работе с наибольшим количеством исследованных больных (1591 чел.) было обнаружено 446 генетических вариантов, из которых 411 (92%) авторы отнесли к патогенным, еще 20 — к вероятно патогенным, а оставшиеся 15 — к вариантам неясного значения. Эти 35 генетических изменений в основном были представлены интронными вариантами или миссенс-мутациями [7]. В международной базе данных InSiGHT (www.insight-group.org) немалая доля аналогичных вариантов также не имеет однозначной трактовки по поводу функционального значения, так как экспериментальные исследования, проводимые для установления их патогенности единичны [3, 4, 10].

В отделе лабораторной генетики ФГБУ «ГНЦ Колопроктологии им. А.Н. Рыжих» Минздрава России предпринято исследование функциональной значимости ранее не описанного варианта с.423-6A>G в гене APC у пациента с клиническими признаками классической формы САТК. Результаты проведенного исследования посвящена данная статья.

Материалы и методы

Материалом для генетического исследования послужил образец крови 42-летнего пациента мужского пола с клиническим диагнозом *семейный аденоматоз толстой кишки, классическая форма. Рак дистальной трети сиг-*

мовидной кишки *pT3N0M0*, с нарушением кишечной проходимости. Были исследованы образцы крови трех его кровных родственников. В качестве контролей использовались образцы крови двух здоровых человек. ДНК из крови выделяли с использованием набора ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА («ДНК-технология», Россия), согласно протоколу производителя; тотальную РНК — с помощью набора PureLink RNA Mini Kit (Ambion, США) по протоколу производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили, используя набор ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega) по протоколу производителя. Все 15 кодирующих экзонов гена *APC* с примыкающими частями интронов (50—100 п.н.) амплифицировали методом полимеразной цепной реакции с использованием 32 пар праймеров (кодирующий экзон 9 был разбит на 2, а последний — на 17 фрагментов). Изменения первичной структуры амплифицированных фрагментов выявляли методом конформационно-чувствительного электрофореза. Фрагменты ДНК с электрофоретически обнаруженными вариантами секвенировали по двум комплементарным цепям на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 (8 capillaries) (Life Technologies, США). Амплифицированные фрагменты кДНК анализировались методом электрофореза и секвенирования на приборе ABI PRISM 3500.

Результаты и обсуждение

У пациента клинически была установлена классическая форма САТК, так как количество полипов существенно превышало 100 и развился колоректальный рак (*pT3N0M0*) [8].

При молекулярно-генетическом исследовании у него в первую очередь был изучен участок гена *APC* со 178 по 1600 кодон. Однако мутаций в этом регионе обнаружено не было. При дальнейшем анализе гена *APC* был найден вариант с.423-6A>G (рис. 1). В базе данных InSiGHT (www.insight-group.org) такого варианта не встретилось, таким образом, он описывается нами впервые. Этот вариант находится в интронной области в 6 нуклеотидах от кодирующего экзона 4 и для выяснения его патогенной значимости были проведены дальнейшие исследования.

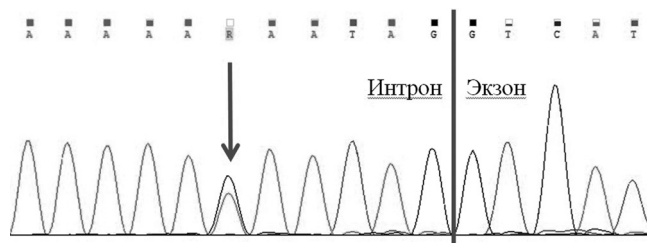


Рис. 1. Секвенс фрагмента гена *APC* у пациента. Стрелкой указан вариант с.423-6A>G.

В первую очередь, были проверены данные о функциональном значении наследственных вариантов в гене *APC*, расположенных в последовательности ДНК наиболее близко от изучаемого. Так, в базе данных InSiGHT описаны два варианта, которые локализовались в одном нуклеотиде от варианта с.423-6A>G: с.423-5A>G и с.423-7A>G. Для варианта с.423-5A>G в 2004 г. в работе S. Aretz с соавторами было показано патогенное значение [3]. При этом авторы работы предположили, что данная мутация приводит к формированию новой более короткой сплайс-формы мРНК, возникающей в результате делеции экзона 4. Тем не менее, получить сиквенс короткого фрагмента кДНК им не удалось. Интересным является тот факт, что у пациента с этой мутацией клинически была установлена ослабленная форма заболевания [3]. Вариант с.423-7A>G был найден в 2010 г., однако авторы не стали выяснять его патогенной значимости, а также не указали форму заболевания у носителя этого варианта [5]. Таким образом, на основании данных литературы вариант с.423-6A>G не может быть отнесен нами к патогенным или незначимым.

Второй возможностью выяснения патогенного значения могут быть анализ семейного анамнеза заболевания и поиск этого наследственного варианта у кровных родственников пациента. Стоит отметить, что отец пробанда погиб в результате несчастного случая в возрасте около 30 лет, а данными о кровных родственниках по его линии больной не располагает. Соответственно был исследован ген *APC* у клинически здоровой матери пробанда, которой на этот момент исполнилось 62 года. Если бы этот вариант был обнаружен у нее, мы с высокой долей вероятности отнесли бы его к незначимым, так как пенетрантность мутантного аллеля в гене *APC* составляет 100%. В результате проведенной ДНК-диагностики этого варианта у матери найдено не было. Таким образом, высока вероятность передачи этого варианта от отца, однако известно, что в 30% случаев мутации в гене *APC* могут возникать *de novo* (т.е. оба родителя здоровы и не имеют наследственных мутаций). Итак, согласно полученным в результате этого исследования данным мы лишь можем утверждать, что вариант с.423-6A>G не встретился у одного здорового родителя, однако данных, подтверждающих его патогенное значение, по-прежнему нет.

Одним из способов анализа функционального значения интронных вариантов является использование программ предсказания сайтов сплайсинга. С помощью одной из таких программ NetGene2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2>) мы продолжили исследование значения варианта с.423-6A>G. В последовательности ДНК с вариантом с.423-6G программа с равной вероятностью (0,17) предсказала появление как нормального акцепторного сайта сплайсинга, так и нового сайта, расположенного за 5 нуклеотидов до нормального (рис. 2Б). При этом для нуклеотидной последовательности с вариантом с.423-6A программа не пока-

зала вероятности появления нормального акцепторного сайта сплайсинга (рис. 2А).

Таким образом, результаты, полученные *in silico*, не позволяют с уверенностью предполагать появления новой более длинной сплайс-формы мРНК.

Наконец, наиболее достоверным методом, позволяющим выяснить функциональное значение интронного варианта является исследование кДНК. Нами были подобраны праймеры, комплементарные экзонам 3 и 5 гена *APC* с целью выяснения возможных изменений в экзоне 4. Из лимфоцитов свежей (повторно взятой) периферической крови пациента была выделена тотальная РНК и проведена реакция обратной транскрипции с последующей амплификацией фрагмента гена *APC* с использованием новых праймеров. Продукты амплификации исследовали методом электрофореза и секве-

нирования. В результате проведенного исследования выяснилось, что половина ампликонов пациента, полученных с кДНК, представлена фрагментами на 5 нуклеотидов длиннее, чем нормальные (рис. 3). Соответственно, имеет место образование новой более длинной сплайс-формы мРНК. При дальнейшем анализе новой последовательности мы выяснили, что образующийся сдвиг рамки считывания приводит к появлению преждевременного стоп-кодона через 30 кодонов после замены. При этом должна изменяться аминокислотная последовательность белка с потерей большей его части. Таким образом, полученные нами данные однозначно указывают на то, что вариант с.423-6А>G приводит к появлению нового акцепторного сайта сплайсинга, соответственно являясь патогенной мутацией.

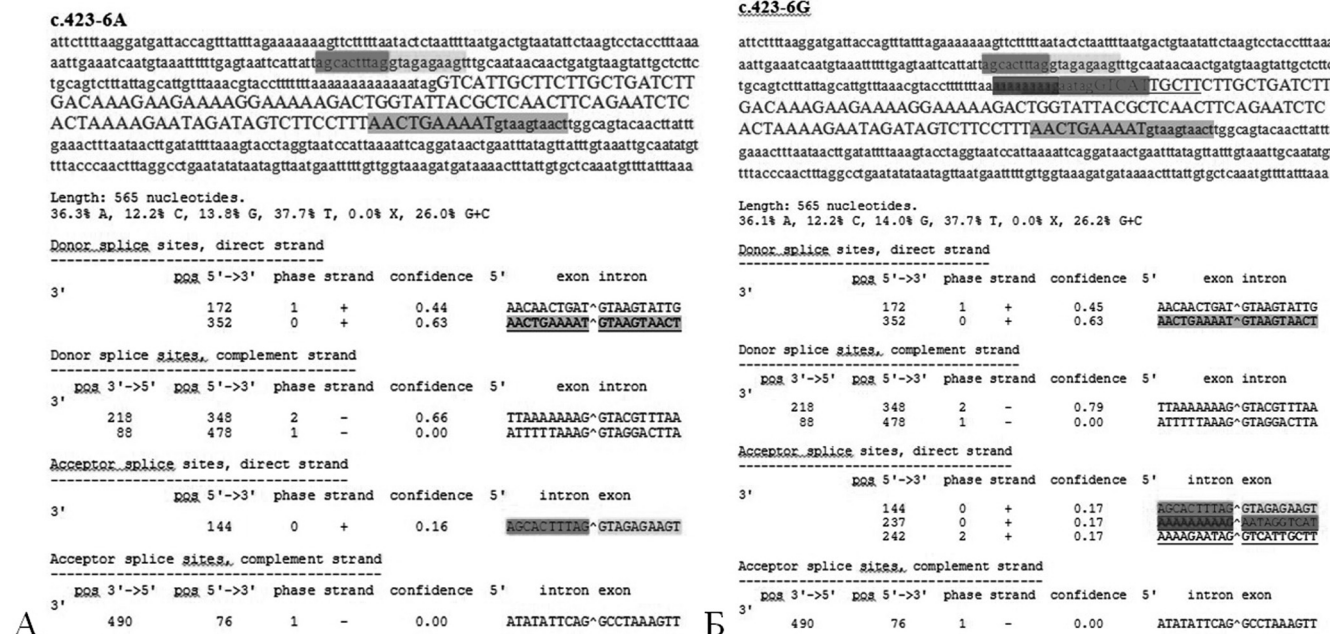


Рис. 2. Анализ возможных последствий варианта с.423-6А>G в гене *APC* с помощью программы предсказания сайтов сплайсинга NetGene2: А — фрагмент предсказания для варианта с.423-6А; Б — фрагмент предсказания для варианта с.423-6Г.

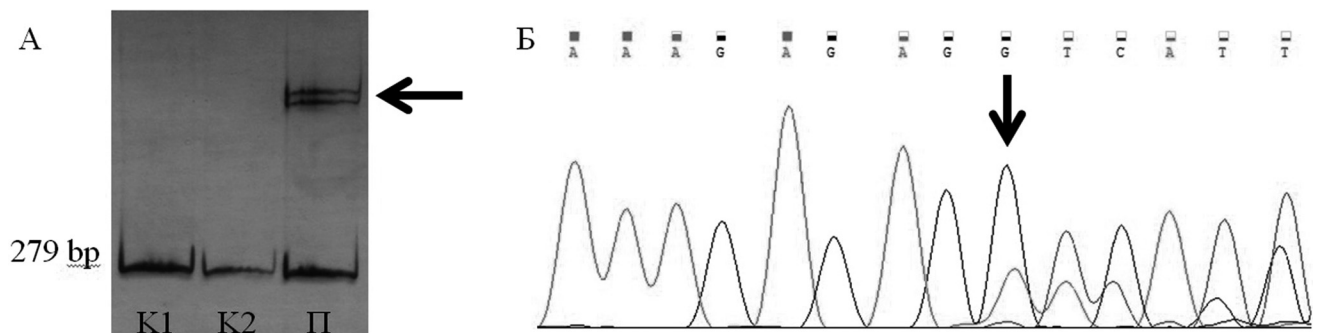


Рис. 3. Анализ последствий варианта с.423-6А>G в гене *APC*.

А — электрофореграмма результата амплификации фрагмента кДНК: K1, K2 — контрольные образцы без варианта с.423-6А>G, П — образец пациента; стрелкой указаны гетеродуплексы; Б — результат автоматического секвенирования фрагмента кДНК пациента; стрелкой указано начало вставки 5 нуклеотидов.

В дальнейшем был произведен поиск мутации c.423-6A>G в гене *APC* у обеих дочерей пробанда. Ни у одной из них этой мутации обнаружено не было, что позволило исключить их из «группы риска» и не проводить им пожизненный клинический мониторинг.

Интересным является тот факт, что, несмотря на то, что мутация находится в регионе гена до кодона 157, у пациента развились классическая форма аденоматозного полипоза и колоректальный рак в возрасте 42 лет. Полученные нами данные говорят о необходимости тщательной оценки результатов молекулярно-генетического исследования с обязательным учетом данных клинического обследования.

Список литературы

1. Цуканов А.С., Шубин В.П., Поспехова Н.И. и др. Наследственные раки желудочно-кишечного тракта // Практическая онкология. — 2014. — Т. 15, № 3. — С. 126—133.
2. Шельгин Ю.А., Кашников В.Н., Фролов С.А. и др. Молекулярно-генетическое исследование наследственной предрасположенности к разным формам полипоза толстой кишки // Колопроктология. — 2013. — № 1 (43). — С. 9—14.
3. 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. — Vol. 24, № 5. — P. 370—380.
4. Charames G., Cheng H., Gilpin C. et al. A novel aberrant splice site mutation in the APC gene // J. Med. Genet. — 2002. — Vol. 39, № 10. — P. 754—757.
5. Han S., Ryu J., Kim Y. et al. Mutation analysis of the APC gene in unrelated Korean patients with FAP: four novel mutations with unusual phenotype // Fam. Cancer. — 2011. — Vol. 10, № 1. — P. 21—26.
6. Kastrinos F., Syngal S. Inherited Colorectal Cancer Syndromes // Cancer J. — 2011. — Vol. 17, № 6. — P. 405—415.
7. Kerr S., Thomas C., Thibodeau S. et al. APC germline mutations in individuals being evaluated for familial adenomatous polyposis: a review of the Mayo Clinic experience with 1591 consecutive tests // J. Mol. Diagn. — 2013. — Vol. 15. — P. 31—43.
8. Lal G., Gallinger S. Familial adenomatous polyposis // Seminars in Surgical Oncology. — 2000. — Vol. 18. — P. 314—323.
9. Nieuwenhuis M., Vasen F. Correlations between mutation site in APC and phenotype of familial adenomatous polyposis (FAP): A review of the literature // Crit. Rev. Oncol. Hematol. — 2007. — Vol. 61. — P. 153—161.
10. Wallis Y., Morton D., McKeown C., Macdonald F. Molecular analysis of the APC gene in 205 families: extended genotype-phenotype correlations in FAP and evidence for the role of APC amino acid changes in colorectal cancer predisposition // J. Med. Genet. — 1999. — Vol. 36, №1. — P. 14—20.

Investigation of the functional significance of variant c.423-6A>G in the *APC* gene in a patient with familial adenomatous polyposis

Tsukanov A.S., Pospekhova N.I., Shubin V.P., Kuzminov A.M., Sachkov I.Yu., Kashnikov V.N., Frolov S.A., Shelygin Ju.A.

Ministry of Health / State Scientific Center of Coloproctology, Moscow, Russian Federation, str. Salam Adil 2, 123423, ph. +7(499) 642-54-40, fax +7(499) 199-04-09, e-mail: info@gnck.ru

Up to 1% of all colorectal cancers appear as a result of familial adenomatous polyposis. This hereditary syndrome in most cases is driven by *APC* gene germline mutations. Around 85% of mutations are small deletions/insertions and nonsense mutations, while other 15% are large deletions, missense and splice site mutations. Meanwhile, functional significance of some of missense mutations and intronic variants of *APC* gene is not described. We determined pathogenic significance of a previously not described c.423-6A>G variant of *APC* gene in a patient with familial adenomatous polyposis. We analyzed mutation changes on mRNA level revealing changes of transcript as a result of disturbed splicing process. Data strongly suggests that c.423-6A>G variant of *APC* gene is a pathogenic mutation.

Key words: *APC* gene, colorectal cancer, familial adenomatous polyposis