

Možnosti genetickej diagnostiky nádorových a zápalových ochorení čriev na Slovensku

B. Desatová¹, M. Bátovský¹, I. Mlíková²

¹ Klinika gastroenterológie Lekárskej fakulty SZU a UN Bratislava, Slovenská republika, prednosta doc. MUDr. Marian Bátovský, CSc., mim. prof. SZU

² Oddelenie klinickej genetiky Ústavu lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky Lekárskej fakulty UK a UN Bratislava, Slovenská republika, prednosta doc. MUDr. Daniel Böhmer, PhD.

Súhrn: V posledných rokoch sa záujem gastroenterológov sústredil na hľadanie vplyvu genetických faktorov na etiológiu nešpecifických črevných zápalov a kolorektálneho karcinómu. Gén NOD2/CARD15 je stále najprebádanejším z doteraz známych génov a jeho mutáciami sa dá vysvetliť asi 20 % genetickej predispozície na Crohnovu chorobu. Z neskôr identifikovaných génov má v etiológii Crohnovej choroby perspektívne postavenie aj gén IL23R, ATG16L1 a ďalšie. V prípade dedičného kolorektálneho karcinómu dokážeme pomocou genetickej diagnostiky vyselektovať rizikové skupiny pacientov vyžadujúcich intenzívnejšie sledovanie a tým zachytiť včasné, liečiteľné štádiá nádorového rastu. Z praktického hľadiska nemá genetická diagnostika črevných zápalov a nádorov zatiaľ screeningový význam a má len nízky prognostický význam. Je potešiteľné, že slovenské genetické pracoviská sa touto diagnostikou zaoberajú a v súlade s modernými trendmi sa naďalej snažia rozširovať jej diapazón.

Kľúčové slová: nešpecifické črevné zápal – genetická analýza – NOD2/CARD15 – dedičný kolorektálny karcinóm

Possibilities of genetic diagnostics of intestine tumour and inflammatory diseases in Slovakia

Summary: In recent years, gastroenterologists focused their interest on finding the genetic background of inflammatory bowel disease and colon cancer. NOD2/CARD15 gene is still the most investigated gene of all known genes and its mutations can explain approximately 20% of genetic predisposition to Crohn's disease. From later identified genes that play an important role in the etiology of Crohn's disease, the IL23R and ATG16L1 genes have a perspective place. In the case of hereditary colorectal cancer, we can select by the help of genetic diagnostics, the group of patients with high risk of colon cancer, which requires more intensive monitoring. The aim is to find out the colon cancer in the early, treatable stage. In practical terms, genetic diagnostics of inflammatory bowel disease and colon cancer has no screening and only poor prognostic importance. It is pleasant, that the Slovak genetic workplaces are interested in this issue and in accordance with modern trends they try to expand its diapason.

Key words: inflammatory bowel disease – genetic analyses – NOD2/CARD15 – hereditary colorectal cancer

Genetická diagnostika kolorektálneho karcinómu

Asi 1/3 kolorektálnych karcinómov sa vyskytuje v kontexte pozitívnej rodinnej anamnézy, ale iba 3–4 % z nich sú charakterizované účasťou mutácie jedného dominantného génu [1]. Napr. FAP je podmienená zárodočnou mutáciou génu APC, ktorý kóduje základný regulačný proteín rastu epiteliálnych črevných buniek. V súčasnosti sú definované mnohé z týchto génových porúch, ak nie všetky. Vyznačujú sa veľkou penetranciou a podmieňujú vznik hereditárneho kolorektálneho karcinómu. Pokiaľ sa vyskytujú aj v sporadických karcinómoch, vystupujú skôr ako neidentifikované recesívne formy zvyšujúce riziko vzniku karcinómu ko-

lorekta. Tieto mutácie sa zjednodušene dajú nazvať „veľkými“ a sú typické pre tzv. chromozómovú instabilitu.

Chromozómová instabilita (CIN)

CIN je najčastejšia forma génomovej instability pri kolorektálnej karcinogéneze. Je prítomná u pacientov s familiárnou adenomatóznou polypózou a v 85 % sporadických kolorektálnych karcinómov a zahŕňa v sebe aktiváciu protoonkogénov (K-ras) a inaktiváciu tumor supresorových génov (APC, DCC, p53) [2]. K-ras protoonkogén je lokalizovaný na chromozóme 12p a je aktivovaný najčastejšie bodovými mutáciami na kodóne 12, 13 alebo 61, čo vedie k nekontrolovateľnej bunkovej proliferácii a malígnej transformácii.

Mutácia génu K-ras je prítomná asi v 50 % kolorektálnych karcinómov a adenómov väčších ako 1 cm, sama však vznik kolorektálneho karcinómu nespôsobí [2]. Mutácie K-ras génu je možné vyšetriť v UN L. Pasteura v Košiciach a v laboratóriách Cytopathos v Bratislave. Asi u 50 % pacientov s kolorektálnym karcinómom je prítomná mutácia génu p53 lokalizovanom na chromozóme 17p. Gén p53 sa za fyziologických podmienok podieľa na zastavení bunkového cyklu vo fáze G1 pri poškodení DNA a v prípade, ak nie je možná oprava DNA, navodzuje apoptózu bunky. DCC gén lokalizovaný na 18q21.2 je rovnako tumor supresorový gén. Stratou, čiže redukciou jeho expresie dochádza k nekontrolovateľ-

nému prežívaniu buniek [3]. Vrodená heterozygotnosť APC génu (Adenomatous Polyposis Coli gén) je podkladom familiárnej adenomatóznej polypózy (FAP), autozomálne dominantne dedičného ochorenia, ktoré sa klinicky prejaví až po získanej strate heterozygotnosti APC génu. Pri FAP vystieľajú sliznicu hrubého čreva stovky až tisíce adenómov, manifestuje sa už v 2.–3. decéniu, je to stopercentná prekanceróza a jej podiel na kolorektálnom karcinóme v populácii je menej ako 1% [4]. Mechanizmus účinku je v hromadení sa voľného β -katenínu v jadre bunky, kde ovplyvňuje expresiu onkogénov. Na mutácie APC génu by mali byť testovaní pacienti spĺňajúci klinickú definíciu FAP, pacienti s kolonoskopicky diagnostikovanými viac ako 10 a menej ako 100 polypmi hrubého čreva, bez rodinnej anamnézy FAP [2]. Genetická analýza APC génu je na Slovensku k dispozícii, vyšetruje sa na Oddelení lekárskej genetiky v NOÚ Klenova v Bratislave a rovnako aj v laboratóriu Cytopathos v Bratislave. U pacientov s klasickým fenotypom FAP, ale bez záchytu mutácie APC génu, a u pacientov s atenuovanou formou FAP je možné vyšetrovať mutácie génu MYH. MYH gén patrí k reparačnému systému DNA a pri jeho poškodení dochádza k nahromadeniu mutácií najmä v géne APC [5].

Mikrosatelitová instabilita (MSI)

MSI je výsledkom mutácie génov zodpovedných za opravu DNA (DNA mismatch repair family), v 90% bývajú postihnuté gény hMLH1 a hMSH2, menej často hMSH6 a hPMS2. Vrodené mutácie týchto génov bývajú prítomné u 50% pacientov s Lynchovým syndrómom (hereditary non-polyposis colorectal cancer – HNPCC) a znaky mikrosatelitovej instability sú prítomné aj u asi 15% sporadických kolorektálnych karcinómov. Sporadické MSI tumory majú navyše často prítomnú BRAF V600E mutáciu, ktorá sa u pacientov s Lynchovým syndrómom ne-

vyskytuje [6]. V ostatných rokoch bolo v tzv. genome-wide association studies (GWAS) odhalených a metaanalýzami potvrdených viacero týchto „malých“ genetických porúch, ktoré sú označované ako jednotlivé nukleotidové polymorfizmy (SNAPs). Možno oprávnené predpokladať, že sa vyskytujú pravidelne a s extrémne nízkou pravdepodobnosťou náhodného výskytu a ich prítomnosť zvyšuje riziko vzniku kolorektálneho karcinómu o 10–30% [1]. Na Slovensku je možné vyšetriť mutácie génov hMLH1 a hMSH2 na Oddelení lekárskej genetiky v NOÚ Klenova a vyšetrenie by mal podstúpiť každý pacient s diagnostikovaným kolorektálnym karcinómom do 40. roku života [4].

STK11

Mutácie génu STK11 sú prítomné u pacientov s Peutz-Jeghersovým syndrómom (PJS). Ide o autózomálne dedičné ochorenie charakteristické prítomnosťou početných polypov v tráviacej trubici. Väčšinou ide o hamartómy, ale v hrubom čreve sa vyskytujú aj adenómy a po 30. roku života sú v 50% príčinou smrti u pacientov s PJS práve zhubné nádory, predovšetkým kolorektálny karcinóm.

Mutácie génu STK11 sa v súčasnosti vyšetrujú na oddelení lekárskej genetiky v NOÚ Klenova v Bratislave.

Génové polymorfizmy u IBD

Nešpecifické črevné zápaly (IBD) sú považované za heterogénne a polygénové choroby. Na ich etiológiu a klinikom priebehu sa podieľa kombinácia genetických, imunitných a environmentálnych faktorov. Svedčí pre to aj výskyt IBD v rodinách a u monozygotných dvojčiat. Asi 5–20% pacientov s IBD má pozitívnu rodinnú anamnézu IBD, rodinný výskyt je viac vyznačený u pacientov s Crohnovou chorobou (CD) [7]. Zo štúdií dvojčiat vyplýva vyššia konkordancia ochorenia u monozygotných dvojčiat v porovnaní s dizygotnými (CD 35% vs 7% a UC 11% vs 3%) [8]. V posledných rokoch neustále

narastá záujem najmä o genetickú predispozíciu vzniku IBD. Je známe, že mutácie určitých génov sú spoločné pre pacientov s ulceróznou kolitídou (UC) aj Crohnovou chorobou (IL23R), iné sú špecifické pre jednotlivé ochorenia (MC – NOD2/CARD15) [7].

Na rozdiel od génových mutácií zistených pri FAP alebo Lynchovom syndróme sa pri IBD nevyskytujú jednotlivé gény, ktoré by predstavovali extrémne vysoké riziko vzniku nešpecifického črevného zápalu. Na jednej strane sa síce podarilo identifikovať veľké množstvo polymorfizmov spojených s IBD, avšak súčasne bolo zistené, že mnoho ich nositeľov v skutočnosti nikdy neochorelo na IBD. Genetické faktory hrajú závažnejšiu úlohu pri vzniku MC ako UC. Dosiaľ bolo odhalených vyše 40 lokusov korešpondujúcich s IBD (z nich vyše 30 s MC) a ich zoznam zrejme ešte časom porastie [1]. Všetky zistené mutácie sú však teoreticky zodpovedné iba za asi 20% dedičných foriem MC [9]. Prvým a dodnes najsilnejším genetickým spojením medzi chronickým zápalom a IBD bolo objavenie mutácii génu NOD2/CARD15.

NOD2/CARD15

V roku 1996 identifikoval prvýkrát Jean-Pierre Hugot, francúzsky pediatrický gastroenterológ, oblasť IBD1 na chromozóme 16 [10]. Súvis medzi genetikou a Crohnovou chorobou objasnil až objav génu NOD2/CARD15 v roku 2001 [2]. NOD2/CARD15 je členom rodiny intracelulárnych NOD-like receptorov, ktoré rozoznávajú určité bakteriálne komponenty. Tri najčastejšie génové polymorfizmy Arg702Trp, Gly908Arg a posunová mutácia Leu1007fsinsC [11] interferujú s rozpoznávaním muramyldipeptidu (MDP), produktom degradácie peptidoglykánú steny grampozitívnych aj gramnegatívnych baktérií [10] a súčasne s inhibíciou Th1 lymfocytmi sprostredkovanej zápalovej odpovede [11]. NOD2/CARD15 sa vyskytuje v epiteliálnych bunkách tenkého aj hrubého

čreva, monocytoch, makrofágoch, T- a B-lymfocytoch, v Panethových a dendritických bunkách [2]. Mutácie génu NOD2/CARD15 sa dávajú do súvislosti so vznikom Crohnovej choroby v nižšom veku, predovšetkým s ileocekálnou lokalizáciou a sklonom k stenotizujúcej forme. Pritom je zaujímavé, že alterovaná génová expresia NOD2 sa našla i v resekovanom ileu CD pacientov, ktorí nemali túto mutáciu zistenú pred operáciou [12]. V štúdií z roku 2007 bola na Slovensku potvrdená asociácia mutácií NOD2/CARD15 s nižším vekom manifestácie CD [13]. V európskej štúdií dosiahol priemerný výskyt mutácií génu NOD2/CARD15 u pacientov s MC 23,9%, avšak až 80% homozygotov s mutáciou tohto génu nemá MC [2]. Na Slovensku sa v súčasnosti mutácie génu NOD2/CARD15 rutinne nevyšetrujú.

Bola pozorovaná silná asociácia medzi HLA-DRB1*0103 a kolonickou formou MC a ešte výraznejšie s ťažkou extenzívnou formou UC u pacientov bielej rasy, avšak nízka frekvencia výskytu tejto alely bráni využívať ju ako prediktora progresie ochorenia v bežnej klinickej praxi [10].

IL23R, IL12B

Mutácie v géne pre receptor interleukínu IL23 lokalizovanom na chromozóme 1p31 sú asociované s predispozíciou vzniku MC aj UC. IL23R je protektívny gén, ktorého expresia sa pri IBD výrazne znižuje. Zriedkavá heterozygotná mutácia Arg381Gln ochranný efekt voči vzniku IBD ešte zvyšuje [7,13]. IL23 a IL12 dráhy zodpovedajú za diferenciáciu T buniek na Th1 a najmä na Th17 lymfocyty, ktoré spolupôsobia pri orgánovo špecifickom zápalovom procese. Bakteriálne peptidoglykány sú schopné indukovať produkciu IL23 prostredníctvom antigén prezentujúcich buniek a tým vyvolať zápalovú odpoveď [14]. Súčasťou štruktúry IL12 aj IL23 je podjednotka p40. V literatúre sú prvé zmienky o anti-p40 liečbe, ktorá by blokovala IL12 aj IL23 a tým by bola efektívna

v liečbe MC. Vo vývoji sú aj špecifické anti-IL23 protilátky [8].

ATG16L1

Mutácia Ala197Thr, rs2241880, autophagy-related 16-like 1 génu (ATG16L1) lokalizovaného na chromozóme 2q37.1 je asociovaná so vznikom MC. ATG16L1 gén je súčasťou autofagozómnej dráhy zodpovednej za elimináciu mikroorganizmov [7] a je exprimovaný v epiteliálnych bunkách čreva, v lymfocytoch a makrofágoch. Vyššie riziko vzniku MC pri mutácii tohto génu súvisí so zmenenou schopnosťou autofagocytózy eliminovať mikróby v bunkách imunitného systému čreva [8]. Detekcia génových polymorfizmov IL23R a ATG16L1 má v súčasnosti len experimentálny charakter, zatiaľ bez klinického významu, a rovnako ako ani ďalšie gény asociované s IBD, a to MDR1, PTGER4, SLC22A4, SLC22A5, IRGM a ďalšie, sa v súčasnosti na Slovensku nevyšetrujú [13].

Ďalšie genetické zmeny pri IBD

Genetické štúdie UC a ich metanalýza potvrdzujú, že mutácie ďalších IL23 génov (IL12B, JAK2 a STAT3) tvoria molekulárne-biologický podklad vzniku IBD. Klinické skúšky s monoklonálnymi protilátkami proti podjednotke IL-12/23 označovanej ako p40 priniesli zatiaľ sľubné predbežné závery. Relatívne novozistený gén SAA1 (sérový amyloid A1) by perspektívne mohol zohrať atraktívnu úlohu markera aktivity CD a keďže je indukovaný TNF α , aj úlohu prediktora odpovede na biologickú liečbu [15]. Podobne mutácie génu TL1A boli asociované s refraktérnymi formami UC [16].

Záver

Chronický zápal a karcinóm tvoria komplex choroby procesov, ktoré sú výsledkom interakcie non-mendelovských genetických zmien s environmentálnymi vplyvmi. Všeobecne možno povedať, že sú známe niektoré

dominantné gény, ktorých mutácie podmieňujú vznik karcinómu, ale zatiaľ sa nevie o dominantnej genetickej príčine IBD. Na poli prevencie vzniku kolorektálneho karcinómu, resp. zachytu včasných štádií je snaha vyselektovať rizikové skupiny pacientov, u ktorých je realizácia genetického vyšetrenia nevyhnutná a prínosná, sú to najmä pacienti s FAP a Lynchovým syndrómom. Gény NOD2/CARD15, IL23R a ďalšie, napriek ich doteraz veľkému klinickému využitiu, sú veľkým prínosom v oblasti odhaľovania etiológie IBD. Na Slovensku máme genetické laboratóriá, ktoré spoľahlivo vyšetrujú mutácie mnohých génov, najmä APC, MMR génov, K-ras a STK11 v súvislosti s kolorektálnym karcinómom. S požiadavkou na ich vyšetrenie je potrebné obrátiť sa na niektorý článok zo siete 12 genetických ambulancií na Slovensku, ktoré po vyhodnotení indikácie genetického vyšetrenia zrealizujú odber biologického materiálu, ktorý pošlú na genetické vyšetrenie na centralizované pracovisko.

Literatúra

1. Boland CR. Chronic inflammation, colorectal cancer and gene polymorphisms. *Dig Dis* 2010; 28: 590-595.
2. Bátorvský M. Genetická diagnostika nešpecifických črevných zápalov a kolorektálneho karcinómu – aktuálny prehľad. *Lek Obz* 2008; 56: 119-123.
3. Akkiprik M, Ataizi-Celikel C, Düsünceli F et al. Clinical Significance of p53, K-ras and DCC Gene Alterations in the Stage I-II Colorectal Cancers. *J Gastrointest Liver Dis* 2007; 16: 11-17.
4. Bátorvský M. Genetické puzzle v diagnostike kolorektálneho karcinómu. *Gastroenterol prax* 2008; 7: 82-84.
5. Bolocan A, Ion D, Stoian RV et al. Map syndrome (MYH Associated Polyposis) colorectal cancer, etiopathological connections. *J Med Life* 2011; 4: 109-111.
6. Pritchard CC, Grady WM. Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut* 2011; 60: 116-129.
7. Cho JH. Inflammatory bowel disease: Genetic and epidemiologic considerations. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 338-347.
8. Zhang H, Massey D, Tremelling M et al. Genetics of inflammatory bowel disease: clues to pathogenesis. *Br Med Bull* 2008; 87: 17-30.
9. Fritz T, Niederreiter L, Tilg H et al. Controversy over NOD2, inflammation and defensins. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 26: 1996-1998.

10. Limbergen JV, Russell RK, Nimmo ER et al. The Genetics of Inflammatory Bowel Disease. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 2820–2831.

11. Bátovský M. Novinky v etiopatogenéze a v genetickej diagnostike nešpecifických črevných zápalov. *Gastroenterol prax* 2008; 7: 59–61.

12. Hamm CM, Reimers MA, McCullough CK et al. NOD2 status and human ileal gene expression. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16: 1649–1657.

13. Bátovský M, Desatová B, Páv I et al. Génový polymorfizmus NOD2/CARD15 významne vplýva na skorší vznik Crohnovej choroby v po-

pulácii slovenských pacientov. *Čes Slov Gastroent Hepatol* 2009; 63: 208–215.

14. Begum NA, Ishii K, Kurita-Taniguchi M et al. *Mycobacterium bovis* BCG cell wall-specific differentially expressed genes identified by differential display and cDNA subtraction in human macrophages. *Infect Immun* 2004; 72: 937–948.

15. Noble CL, Abbas AR, Lees CW et al. Characterization of intestinal gene expression profiles in Crohn's disease by genome-wide microarray analysis. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16: 1717–1728.

16. Haritunians T, Taylor KD, Targan SR. Genetic predictors of medically refractory ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16: 1830–1840.

MUDr. Barbora Desatová, PhD.

www.fnspsba.sk

e-mail: batovsky@pe.unb.sk

Doručeno do redakcie: 9. 6. 2011

Přijato po recenzii: 24. 6. 2013

www.eonkologie.cz