

## Rodzinna polipowatość gruczolakowata jelita grubego

Andrzej Pławski<sup>1</sup>, Marta Podralska<sup>1</sup>, Piotr Krokowicz<sup>4</sup>, Jacek Paszkowski<sup>2</sup>, Jan Lubiński<sup>3</sup>, Ryszard Słomski<sup>1,5</sup>,

<sup>1</sup> Instytut Genetyki Człowieka PAN, Poznań, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań, tel. (061) 8233011. mail: andp@man.poznan.pl

<sup>2</sup> Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej, Gastroenterologii i Endokrynologii, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań, tel. (061) 8691275.

<sup>3</sup> Zakład Genetyki i Patomorfologii, Pomorska Akademia Medyczna w Szczecinie, ul. Połabska 4, 70-115 Szczecin, tel. (091) 4661532.

<sup>4</sup> Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej i Endokrynologicznej Uniwersytet Medyczny w Poznaniu ul. Szwajcarska 3 tel. (061) 873-94-14

<sup>5</sup> Katedra Biochemii i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wołyńska 35, 60-637 Poznań, tel. (061) 8487202.

### Streszczenie

Rodzinna polipowatość jelita (FAP) jest dobrze poznanym zespołem predyspozycji do występowania choroby nowotworowej, dziedzicznym w sposób autosomalno-dominujący ze skłonnością do występowania dużej liczby polipów w okrężnicy i odbytnicy. Pierwszymi objawami FAP są biegunka i krew w stolcu. Wraz z rozwojem choroby nowotworowej występuje utrata masy ciała i osłabienie. FAP występuje z częstością 1 na 10000 nowourodzonych. Czas wystąpienia polipów i ich liczba są w przypadku tej choroby zróżnicowane. Klasyczna forma FAP charakteryzuje się w występowaniem więcej niż 100 polipów, które pojawiają się w drugiej dekadzie życia. Średni wiek występowania polipów to 15 lat. Najmłodszy odnotowany chory miał 3 lata. Polipy charakteryzują się dużym potencjałem rozwoju w kierunku guza złośliwego. Rozwój nowotworu złośliwego może następować od późnego dzieciństwa do 70 roku życia. Łagodna forma polipowatości rodzinnej charakteryzują się łagodniejszym przebiegiem niż klasyczny FAP. Występowanie FAP jest związane z mutacjami w genie supresorowym nowotworów *APC*, który został opisany w 1991. Gen *APC* jest zlokalizowany na chromosomie 5q21 i jest bierze udział w kontroli proliferacji komórek. Forma recesywna FAP jest spowodowana przez homozygotyczne mutacje w genie *MUTYH*. Gen *MUTYH* jest zaangażowany w naprawę oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Polipowatość związana z *MUTYH* (MAP) jest skłonnością do występowania polipów jelita, ale liczba polipów jest niższa niż w klasycznym FAP. Wysokie ryzyko wystąpienia choroby nowotworowej w tych chorobach sprawia, że należą one do ważnych zagadnień

medycznych. W Polsce badania molekularne genu APC wykonywane są od ponad dziesięciu lat. W Instytucie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu utworzono Bank DNA dla polskich pacjentów FAP. W Banku DNA zgromadzono próbki DNA od ponad pięciuset rodzin z FAP.

## Summary

Familial adenomatous polyposis (FAP) is a well-known predisposition to occurrence of a large number of polyps in colon and rectum. FAF is inherited in an autosomal dominant manner. First symptoms of FAP are diarrhea and blood in stool. Weight lost and weaknesses occur after development of advanced tumor. The incidence of FAP disorder is one per 10,000 newborns. There is a high heterogeneity with regard to the number and time of occurrence of polyps. The classical form of FAP is characterized by the occurrence of more than 100 polyps, which appear in the second decade of life. The average time of occurrence of polyps is 15 years. The earliest symptoms of polyposis were observed in a three-year-old child. The polyps are characterized by large potential for development towards malignant tumor. Turning into malignancy can occur from the late childhood to the 70s. Attenuated adenomatous polyposis coli cases are characterized by benign course of disease as opposed to the classical FAP. The occurrence of FAP is associated with mutations in the *APC* tumor suppressor gene, which has been described in 1991. The *APC* gene is tumor suppressor gene localized on chromosome 5q21 involved in cell proliferation control. The recessive form of FAP is caused by mutation in the *MUTYH* gene occurred in homozygotic state. The *MUTYH* gene is involved in a repairing of the oxidative DNA damage. *MUTYH* associated polyposis (MAP) is predisposition to occurrence polyps of colon but the number of polyps is lower in comparison to classical FAP. The high risk of cancer observed in those syndromes make them important medical issues. The molecular studies of polyposis of colon are performed in Poland for over ten years. In Institute of Human Genetics in Poznań the DNA Bank for Polish FAP patients was established. In DNA Bank the DNA samples from over five hundreds FAP families were collected so far.

## Wstęp

Rodzinna polipowatość gruczolakowata (FAP, ang. *familial adenomatous polyposis*) stanowi około 1% wszystkich raków jelita grubego [1]. *De novo* choroba występuje z częstością 1 na 8000-10000 urodzeń[2]. Wiek występowania objawów u chorych jest dość zróżnicowany, obserwuje się również różnice w wieku występowania objawów u rodzeństwa. Jednak można przyjąć, że wystąpienie raka jelita grubego w młodym wieku powinno być sygnałem do przeprowadzenia wywiadu rodzinnego, który pozwala na określenie, czy w rodzinie występuje wysoka dziedziczna predyspozycja [3]. Występowanie pojedynczego przypadku choroby nie wyklucza wysokiej dziedzicznej predyspozycji, ponieważ chory może być pierwszym nosicielem mutacji.

Objawy FAP występują wcześniej, niż w HNPCC i pojawiają się w drugiej dekadzie życia, choć obserwuje się przypadki występowania choroby nawet w wieku 5 lat w naszej grupie najmłodszy chory w chwili zdiagnozowania polipów miał 3 lata [4]. Podłożem genetycznym występowania polipów gruczolakowatych jest występowanie mutacji w genach *APC* w przypadku FAP i *MUTYH* w przypadku recesywnej formy polipowatości jelita.

Geny supresorowe nowotworów zaangażowane są w kontrolę proliferacji komórek. Produkty białkowe genów supresorowych biorą udział w kontroli cyklu komórkowego jako jego inhibitory, są także składnikami układu kontaktowego hamowania wzrostu. Geny supresorowe odpowiedzialne są utrzymywaniu liczby komórek na stałym poziomie. Zaburzenia tych mechanizmów prowadzą do zwiększenia częstości podziałów komórkowych, jak również wzrostu liczby błędów powstających podczas podziału. Prowadzi to do gromadzenia zmian w materiale genetycznym i wyselekcjonowania nieśmiertelnego klonu o bardzo częstych podziałach komórkowych, zdolnego zasiedlać inne tkanki.

W przypadku genów supresorowych fenotyp mutacji jest maskowany przez prawidłowy allel genu. W inicjacji procesu nowotworowego występują dwie niezależne mutacje w obrębie locus genu supresorowego [5]. W przypadku nosicielstwa zmutowanego allelu genu *APC* ryzyko wystąpienia drugiej mutacji, a tym samym inicjacji choroby nowotworowej, jest bardzo wysokie.

### **Historia badań genu *APC***

FAP została zidentyfikowana jako dziedziczny zespół chorobowy już w latach 20-tych dwudziestego wieku. W 1972 r. został opisany zespół Gardnera, który jest postacią FAP charakteryzującą się nie tylko obecnością setek czy tysięcy polipów w jelicie, lecz także kostniaków oraz przebarwień siatkówki (CHRPE, ang. *congenital hypertrophy of the retinal pigment epithelium*). Występowanie FAP zaczęto wiązać z regionem q21-q22 chromosomu 5 na podstawie obserwacji dużej delecji wykrytej w badaniach cytogenetycznych oraz wyników badań sprzężeń markerów RFLP pacjenta z zespołem Gardnera i zaawansowanym rozwojem polipów w jelicie grubym [6]. Pod koniec lat osiemdziesiątych badania sprzężeń ukierunkowały poszukiwania genu na region obejmujący oddalone od siebie o 150 kbp geny *APC* i *MCC*. W 1991 r. u chorych z FAP przebadano trzy geny: *DP1*, *SRP19* i *DP2.5* znajdujące się w regionie, który uległ delecji. U czterech niespokrewnionych chorych z FAP zaobserwowano 4 mutacje w genie *DP2.5* (obecnie gen *APC*) prowadzące do powstania kodonu Stop, z których jedna była przekazana potomstwu [1]. W następnym roku przebadano 79 chorych z FAP i zaobserwowano mutacje w genie *APC* u 67% chorych. W 92% były to mutacje prowadzące do skrócenia produktu białkowego genu *APC*[7].

W naszym kraju Bank DNA chorych, z FAP został utworzony w 1997 roku w Instytucie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu z inicjatywy A. Pławskiego i R. Słomskiego. W ramach prac badawczych dotyczących genetycznych uwarunkowań zespołów podatności do rozwoju chorób nowotworowych związanych z obecnością polipów w układzie pokarmowym w IGCz PAN w Poznaniu zgromadzono znaczący materiał w postaci próbek DNA oraz olbrzymie doświadczenie wynikające z 15 letnich prac badawczych nad polipowatościami jelit.

### **Budowa genu *APC* i funkcja białka *APC***

Gen *APC* (ang. *adenomatous polyposis coli*) położony jest na chromosomie 5 w regionie q21 i składa się z 21 eksonów [9]. Charakterystyczną cechą genu *APC* jest występowanie dużego eksonu 15, który obejmuje ponad 70% sekwencji kodującej. Ekspresja genu obserwowana jest we wszystkich tkankach. Produktem transkrypcji jest mRNA o długości 8538 nukleotydów [1, 10]. Pierwsze eksony genu mogą tworzyć tkankowo specyficzne alternatywne transkrypty [11], np. w mózgu występuje produkt genu *APC*, dla którego kodon Start położony jest w eksonie BS (ang. *brain specific*). Wyeliminowanie kodonu 1, który koduje domenę super spirali, o której wiadomo, że służy do homo- lub heterodimeryzacji, wpływa na funkcjonalność produktu białkowego [9]. Alternatywne składanie początkowych eksonów genu może być związane z występowaniem łagodnej formy polipowatości - AAPC (ang. *attenuated adenomatous polyposis coli*) [12]. Podobny efekt zaobserwowano w jednej z dwóch rodzin z mutacjami na końcu 3' eksonu 9, gdzie w jednym przypadku wykazano modyfikujący efekt alternatywnego składania, prowadzący do łagodnej formy FAP. W związku z tym uważa się, że rodzaj, położenie mutacji jak również efekt alternatywnego składania wpływają na przebieg choroby.

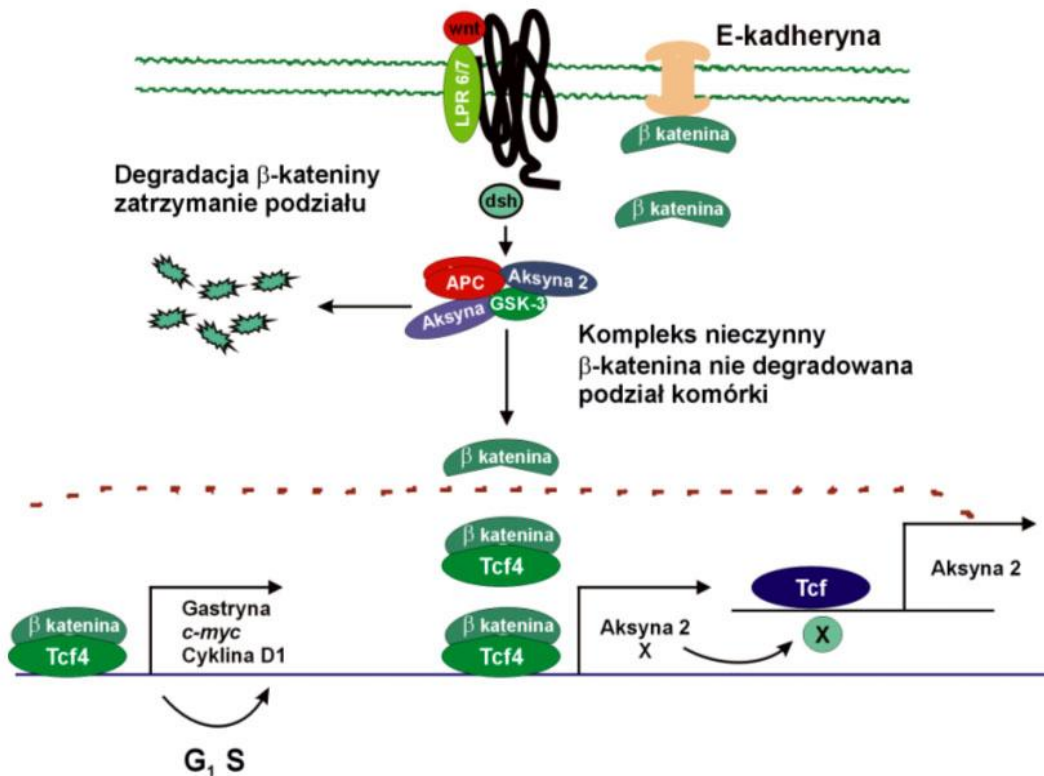
Bardzo ciekawa jest obserwacja międzygenowego składania, w wyniku którego z genu *APC* zostaje usunięty ekson 14 i obejmujący prawie 70% genu ekson 15, a pozostały fragment łączy się z końcem 3' genu *SRP1*. Wycięcie eksonu 14 lub 15 prowadzi do powstania dwóch izoform produktu różniących się zdolnością wiązania mikrotubul i  $\beta$ -kateniny, jak również sekwencją regionu 3' nie podlegającego translacji, co może wpływać na stabilność mRNA oraz na funkcje produktu [13]. Alternatywne składanie genu jest w tym przypadku związane z regulacją aktywności białka *APC* i nasuwa przypuszczenie, że pełni ono wiele różnych funkcji w komórce zwłaszcza, że w alternatywnym składaniu bierze udział ponad 75% eksonów.

Pełnej długości białko *APC* składa się z 2843 aminokwasów i występuje w cytoplazmie oraz w jądrze komórkowym [1, 10]. Dotychczas poznano kilka białek wchodzących w interakcję z białkiem *APC*. Należą do nich białko DLG, białko mikrotubul, GSK $\beta$ -3,  $\beta$ -katenina,  $\gamma$ -katenina, p34, Tid56, białko Auxin. Interakcje z wieloma białkami oznaczają, że białko *APC* bierze udział w regulacji wielu procesów w komórce, obejmujących podział, migrację, adhezję i różnicowanie komórek (ang. *cell fate determination*) [1]. W białku *APC* wyodrębniono kilka funkcjonalnych domen. Domena zasadowa obejmuje aminokwasy 2200-2400 [1].

Fragment N-końcowy białka, między aminokwasami 1-171, zaangażowany jest w oligomeryzację. W białku APC występują dwa miejsca wiązania  $\beta$ -kateniny - we fragmencie obejmującym trzy 15-nukleotydowe powtórzenia między aminokwasami 1020-1169 i w regionie 20 aminokwasowych powtórzeń między aminokwasami 1324-2075. Wiązanie z mikrotubulami, występujące podczas zwiększonej ekspresji genu, odbywa się za pomocą fragmentu obejmującego aminokwasy 2130-2483. Aminokwasy 2560-2843 są miejscem wiązania z białkiem EB1, a aminokwasy 2771-2843 wiążą się z białkiem DLG [1]. Nie wyodrębniono regionu związanego z procesem apoptozy, zaobserwowano jednak, że ekspresja prawidłowego białka APC w komórkach linii nowotworowej jelita prowadzi do wystąpienia tego zjawiska. W komórkach śluzówki jelita grubego produkt genu *APC* o masie 300 kDa uczestniczy w kontaktowym hamowaniu wzrostu komórek.

Białko APC oddziałuje także z  $\gamma$ -kateniną i  $\beta$ -kateniną. Obydwa białka wiążą się z białkiem adhezyjnym E-kadheryną. Fearon (1997) zaproponował schemat, w którym białko APC bierze udział w transdukcji sygnału i przez degradację  $\beta$ -kateniny wpływa na aktywność czynnika transkrypcji Tcf4 (ang. *T-cell transcription factor 4*) (Ryc.1) [14]. Białkiem regulującym tworzenie kompleksu białka APC z  $\beta$ -kateniną jest kinaza białkowa ZW3/GSK3 $\beta$ . Fosforylacja białka APC aktywuje wiązanie  $\beta$ -kateniny. Aktywność kinazy GSK3 $\beta$  jest regulowana poprzez białko dsh, wchodzące w interakcje z produktem genu *WNT1*. Białko APC związane z kinazą ZW3/GSK3 $\beta$  posiada zdolność hamowania transkrypcji indukowanej przez  $\beta$ -kateninę. W przypadku utraty funkcji produktu genu *APC* następuje aktywacja czynnika transkrypcji Tcf4 (*TCF7L2*). Komórka jest pobudzona do proliferacji w wyniku aktywacji transkrypcji genu *c-MYC* przez Tcf4 [15]. Produkt genu *c-MYC* występuje w jądrze komórkowym i posiada zdolność wiązania z DNA, aktywuje gen wzrostu - dekarboksylazę ornityny (*ODC1*) i gen *CDC25A*, ponadto jest inhibitorem genu *GAS1*. Wykazano również, że aktywowany kompleks  $\beta$ -katenina-Tcf4 indukuje ekspresję Tcf1 [16]. W komórkach śluzówki jelita grubego gen *APC* działa jako negatywny regulator cyklu komórkowego przez regulację poziomu  $\beta$ -kateniny sygnał proliferacji pochodzący od transmembranowego białka E-kadheryny. W przypadku utraty funkcjonalności tego genu w tkance zostaje zaburzona równowaga między podziałami i śmiercią komórek.

Ryc. 1. Rola białka APC w regulacji cyklu komórkowego



## Mutacje genu *APC*

Od 1991 roku, kiedy wykryto związek mutacji genu *APC* z FAP nastąpił rozwój badań molekularnych. W okresie minionych 17 lat zaobserwować można rozwój technik a co za tym idzie zwiększenie się liczby doniesień dotyczących spektrum mutacji w coraz to nowych krajach czy grupach etnicznych. Badania prowadzone przez szereg lat z użyciem takich technik jak analiza polimorfizmu konformacji jednoniciowych fragmentów DNA (SSCP), analiza heterodupleksów (HD) czy metoda rozdziału w gradiencie czynnika denaturującego (DGGE) oraz sekwencjonowania DNA pozwoliły na stworzenie komputerowych baz danych. Obecnie najlepiej zorganizowaną bazą mutacji genu *APC* jest baza Institute of Medical Genetics w Cardiff <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>. Jest najbardziej aktualną bazą mutacji dla większości opisanych genów [17]. W bazie danych dla genu *APC* zgromadzono dane o 858 typach mutacji. Największy odsetek mutacji genu *APC* stanowią małe delecje, których opisano 356 i w większości prowadzą do zmiany ramki odczytu i skrócenia produktu białkowego genu. Rzadziej występowały duże delecje (54), mutacje w miejscach składania genu (49), małe delecje połączone z insercjami (17), duże insercje (7), kompleksowe rearanżacje (6) a w sekwencjach regulatorowych stwierdzono 3 mutacje. 235 mutacji to substytucje prowadzące do zamiany aminokwasu lub prowadzące do powstania kodonu Stop w miejscu występowania mutacji. Małych insercji opisano dotychczas

131. W przypadku substytucji, które stanowią 30% mutacji, kodon Stop powstaje w miejscu mutacji, a w przypadku delekcji lub insercji stanowiących 68% mutacji powstaje w jej pobliżu w wyniku zmiany ramki odczytu. W genie występuje region o podwyższonej częstości występowania mutacji MCR (ang. *mutation cluster region*), który obejmuje kodony 1055-1309. W regionie tym występuje 23% wszystkich mutacji germinalnych. Ponadto wśród mutacji germinalnych zaobserwowano podwyższoną częstość trzech mutacji: delekcji 5 pz w kodonie 1309 (10%), delekcji 5 pz w kodonie 1061 oraz delekcji 4 pz w kodonie 1064[18]. Większość mutacji występuje w regionie 5' eksonu 15 genu *APC*. Charakterystyczną cechą FAP jest utrata heterozygotyczności (LOH, ang. *loss of heterozygosity*) w genie *APC* powstająca w wyniku mutacji somatycznej w drugim allelu genu *APC*. Rozkład częstości tych mutacji jest różny od mutacji germinalnych. Do 60% mutacji somatycznych znajduje się we fragmencie, który obejmuje 8% genu między kodonami 1286 i 1513. Mutacje somatyczne występują w dwóch gorących miejscach (ang. *hot spots*) w kodonie 1309 i kodonie 1450. Mutacje w genie *APC* występują również w przypadkach raków jelita grubego niezwiązanych z polipowatością. W przypadkach tych nowotworów występują pojedyncze guzy, ponieważ musi dojść do mutacji w jednym z alleli genu *APC*, a następnie utraty heterozygotyczności w wyniku mutacji somatycznych. W przypadku zespołu Lynch (HNPCC) proces ten jest przyspieszany przez dziedziczne mutacje w genach naprawy DNA [19]. Według najnowszych badań, dla inicjacji nowotworu jelita grubego niezwiązanego z FAP nie musi wystąpić LOH w locus *APC*. W połowie sporadycznych nowotworów, w których nie zaobserwowano zmian w *APC*, powstanie nowotworu związane jest z heterozygotycznymi mutacjami w genie  $\beta$ -kateniny (*CTNNB1*). Mutacje występują w miejscu fosforylacji  $\beta$ -kateniny przez kinazę GSK3 $\beta$  i powodują wyłączenie regulacyjnej funkcji genu *APC*, co prowadzi do kumulacji  $\beta$ -kateniny, a tym samym ekspresji genu *MYC* i rozwoju nowotworu jelita grubego [20].  $\beta$ -katenina znajduje się za genem *APC* (ang. *downstream*) w szlaku kontaktowego hamowania wzrostu i w przypadku mutacji w tym genie proces nowotworowy przebiega niezależnie od stanu genu *APC*.

Podjęto próbę określenia związku między położeniem mutacji terminujących translację a obrazem klinicznym choroby i wystąpieniem objawów pozajelitowych. Zaobserwowano, że wystąpienie kodonu Stop przed kodonem 157 powoduje zmniejszenie liczby polipów i łagodny przebieg choroby. Klasyczny przebieg polipowatości z licznymi polipami ma miejsce w przypadku wystąpienia sygnału Stop między kodonami 169 a 1600. Mutacje występujące między kodonami 1403 i 1587 prowadzą do nasilenia objawów pozajelitowych. Występowanie włókniakowatości naciekowej związane jest z mutacjami w regionie między kodonami 1445 a 1578. Mutacje w końcu 3' genu *APC* dają zróżnicowany obraz przebiegu choroby zarówno pod względem liczby polipów, jak również występowania objawów pozajelitowych.

### **Progresja zmian morfologicznych i genetycznych w rodzinnej polipowatości gruczolakowatej**

Dziedziczenie zmutowanego allelu genu *APC* nie wywołuje obrazu klinicznego choroby. Pojawienie się objawów klinicznych związane jest z sekwencją dalszych zdarzeń w komórce. Zarówno w przypadku FAP jak i HNPCC komórki charakteryzują się bardzo wysokim ryzykiem wystąpienia utraty heterozygotyczności w locus genu *APC*. W czasie rozwoju nowotworu zachodzą zmiany w obrębie genów supresorowych, onkogenów i genów naprawy DNA. Delecje obserwuje się w regionach występowania genów hamujących proliferację, położonych na chromosomach 5q (*APC*, *MCC*), 17p (*TP53*) i 18q (*DCC*) oraz obserwuje się mutacje punktowe w obrębie protoonkogenu *K-ras*. W przypadku FAP ryzyko utraty heterozygotyczności jest bardzo wysokie, ponieważ jeden z alleli dziedziczony jest w formie zmutowanej. Ryzyko inicjacji nowotworu jest również wysokie w wyniku dziedziczenia mutacji. Mimo różnych przyczyn pierwszym etapem inicjacji choroby nowotworowej jest utrata heterozygotyczności w locus *APC*, prowadząca do zwiększenia proliferacji komórek w wyniku aktywacji transkrypcji protoonkogenu *c-MYC*. Częste podziały komórek prowadzą do wyselekcjonowania klonu z uszkodzonym genem *MCC*, co powoduje dysplazję i w dalszym etapie powstanie gruczolaka stopnia pierwszego. Wzrost tempa podziałów komórek powoduje dalsze gromadzenie błędów genetycznych i w wyniku tego następuje aktywacja protoonkogenu *K-ras* i delecja *DCC* (ang. *deleted in colorectal cancer*). Kolejnym etapem rozwoju nowotworu jest utrata funkcjonalności produktu genu *TP53*, co prowadzi do powstania gruczolakoraka, a dalsze gromadzenie błędów do powstania nowotworu inwazyjnego. Różnica w podłożu molekularnym FAP i HNPCC sprawia, że pojedyncze guzy w HNPCC rozwijają się szybciej do formy inwazyjnej niż w przypadku FAP.

### **Budowa i lokalizacja genu *MUTYH***

Gen *MUTYH* (*MutY*, *e.coli*, *Homolog*) jest homologiem bakteryjnego genu *mutY* zaangażowanego w systemie naprawy oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Gen *MUTYH* jest często potocznie nazywany *hMYH* lub *MYH* jednak te nazwy są uważane za nieprawidłowe. *MUTYH* u człowieka został opisany w 1996r. Gen obejmuje 7100 pz na chromosomie 1 w regionie p34.3-p32.1 i składa się z 16 eksonów. Żaden z 15 intronów genu *MYH* nie przekracza 200 pz. Gen koduje 535 aminokwasowe białko w 41% identyczne z białkiem *mutY* z *E.coli* [21]. Najczęściej występują dwie substytucje Y165C i G382D, obserwowane u 80 % chorych z mutacjami obu alleli genu [22-24]

### **Fenotyp mutacji w genie *APC***

Rodzinna polipowatość gruczolakowata (FAP) (MIM 175100)

Rodzinna polipowatość jelita grubego, FAP (ang. *familial adenomatous polyposis*) jest dziedziczną autosomalnie-dominująco predyspozycją do występowania licznych polipów w jelicie grubym. Objawy w



postaci licznych (setki lub tysiące) polipów w śluzówce jelita grubego pojawiają się pod koniec drugiej dekady życia. Średni wiek występowania polipów to 15 lat [25]. Polipy charakteryzują się wysokim potencjałem do rozwoju w kierunku nowotworu złośliwego. Ryzyko wystąpienia nowotworu u chorych z FAP jest praktycznie 100%. Wystąpienie nowotworu złośliwego może nastąpić od późnego dzieciństwa do 70 lat. Najwcześniejsze wystąpienie objawów polipowatości zaobserwowano w wieku 5 lat [26]. Pierwszymi objawami wystąpienia polipów są biegunki i krew w stolcu a w dalszej kolejności spadek masy ciała i ogólne osłabienie. Choroba występuje z częstością 1/10000 nowourodzonych [25]. Klasyczna forma polipowatości jelita charakteryzuje się występowaniem powyżej 100 polipów, które pojawiają się najczęściej w drugiej dekadzie życia jako polipy gruczolakowatą i mogą współwystępować z limfoidalnymi [27]. Najczęściej występują polipy cewkowe o średnicy nawet do kilku centymetrów. Obserwuje się także występowanie polipów cewkowo-kosmkowych i kosmkowych [28]. Polipy jelita mogą również występować jako płaskie polipy tabularne [29]. W klasycznej formie polipowatości wyróżniono fenotyp z ciężkim przebiegiem (ang. *severe FAP*), gdzie liczebność polipów sięga powyżej tysiąca [30]. Ciężki przebieg FAP charakteryzuje się wcześniejszym wiekiem występowania nowotworu w jelicie, średnio 34 lata oraz większą częstością występowania objawów pozajelitowych.

U chorych z FAP obserwuje się występowanie objawów pozajelitowych w różnym zakresie. Należą do nich:

- Przebarwienie barwnikowe siatkówki dna oka - CHRPE, związane jest z położeniem mutacji w genie *APC*. CHRPE występuje u ponad połowy nosicieli mutacji w genie *APC* [31]. Przebarwienie siatkówki nie występuje, jeżeli produkt zmutowanego genu jest mniejszy niż 50 kDa, a ekson 9 uważany jest za graniczny między mutacjami niepowodującymi i powodującymi przebarwienie. W kierunku 3' genu *APC* granicą występowania przebarwienia jest kodon 1387. [31]. Długość produktu genu *APC* ma wpływ na obraz przebarwienia. Produkty białkowe genu o długości poniżej 1014 aminokwasów przedstawiają obraz małego okrągłego przebarwienia (ang. *small round pigmented*) lub dużego okrągłego przebarwienia (ang. *large round pigmented*). Produkty białkowe powyżej 1014 aminokwasów powodują wzrost występowania pozostałych dwóch typów zmian w siatkówce dna oka tj. owalnego przebarwienia okrążonego aureolą (ang. *oval pigmented with a surrounding halo*) i dużego okrągłego odbarwienia (ang. *large round de-pigmented*) [32]. Kodon 1014 jest miejscem wiązania dwóch białek cytoplazmatycznych  $\alpha$  i  $\beta$ -kateniny, są one istotne dla białka czynnego w adhezji komórek E-kadheryny. Produkty dłuższe od 1014 aminokwasów mogą wiązać się z tymi białkami, co może wpływać na zmianę fenotypu przebarwienia [Westbrook (1994)].
- Zmiany w uzębieniu najczęściej polegające na występowaniu dodatkowych zębów a także kostniaków i zmianach w zębach
- Polipy w wyższych odcinkach przewodu pokarmowego. Polipy dwunastnicy oraz polipy żołądka, które mogą być polipami dna żołądka i gruczolakami [33, 34]. Polipy żołądka występują u około 50%

chorych z FAP i nie wykazują wysokiego potencjału do nowotworzenia. Gruczolaki obserwowane u 6% przypadków ulegają nowotworzeniu jeszcze rzadziej niż polipy dna żołądka [35]. Polipy dwunastnicy obserwuje się u 33% do 44% chorych z FAP [34, 36-38]. Opisano jednak grupę, w której częstość występowania polipów dwunastnicy sięgała 80% [38]. Polipy zlokalizowane są najczęściej w części zstępującej dwunastnicy. U części chorych obserwuje się również większe polipy w okolicy brodawki większej dwunastnicy.

- Włókniakowatość naciekowa obserwowana jest u około 10% chorych z FAP a jej pojawienie następuje częściej po zabiegu chirurgicznym [39]. U pacjentów z FAP obserwuje się wzrost częstości występowania włókniakowatości naciekowej w stosunku do populacji ogólnej. Obserwuje się także modyfikujący efekt płci. Choroba ta występuje rzadziej u mężczyzn z FAP niż u kobiet w stosunku 1:3 [39, 40].
- Nowotwór tarczycy obserwowany jest w 94% przypadków u kobiet [41-43].
- Nowotwory centralnego układu nerwowego. Występują z niską częstością, ok. 1% i są to glejaki. Występowanie tych nowotworów z objawami FAP w jelicie określano jako formę drugą zespołu nowotwór mózgu polipowatość jelita znanego jako zespół Turcot'a (MIM#276300) [44-46]. Występowanie nowotworu mózgu w przypadkach FAP wiąże się raczej z występowaniem locus modyfikującego przebieg choroby niż z określonym spektrum mutacji w genie *APC*. Tym bardziej, że w przypadkach sporadycznych glejaków czy rdzeniaków mózgu nie obserwowano mutacji w genie *APC* [46, 47].
- Wątrobiaki zarodkowe są rzadkimi nowotworami występującymi u dzieci. Zaobserwowano wzrost ryzyka występowania tych nowotworów u nosicieli mutacji w genie *APC*, ale jest on niski i nie przekracza 1% [30, 48, 49].

## **Zespół Gardnera**

Zespół Gardnera jest formą FAP z licznymi objawami pozajelitowymi w formie CHRPE, torbieli gruczolów łojowych skóry, kostniaków i włókniakowatości naciekowej, ze zmianami w uzębieniu polegającymi na zmianach liczby zębów oraz występowaniu długich i zaostzonych korzeni zębowych[50]. Występowanie CHRPE związane jest z położeniem mutacji w genie *APC*[32]. Przebarwienie siatkówki nie występuje, jeżeli produkt zmutowanego genu jest mniejszy niż 50 kDa, a ekson 9 uważany jest za graniczny między mutacjami nie powodującymi, a powodującymi przebarwienie. W regionie 3' genu *APC* granicą występowania przebarwienia jest kodon 1387[51]. Długość produktu ma wpływ na obraz przebarwienia. Produkty białkowe genu o długości poniżej 1014 aminokwasów przedstawiają obraz małego okrągłego przebarwienia (ang. *small round pigmented*) lub dużego okrągłego przebarwienia (ang. *large round pigmented*). Produkty białkowe powyżej 1014 aminokwasów powodują wzrost występowania pozostałych dwóch typów zmian w siatkówce

dna oka tj. owalnego przebarwienia okrążonego aureolą (ang. *oval pigmented with a surrounding halo*) i dużego okrągłego odbarwienia (ang. *large round de-pigmented*). Kodon 1014 jest miejscem wiązania dwóch białek cytoplazmatycznych  $\alpha$  i  $\beta$ -kateniny; są one istotne dla białka czynnego w adhezji komórek E-kadheryny. Produkty dłuższe od 1014 aminokwasów mogą wiązać się z tymi białkami, co może wpływać na zmianę fenotypu przebarwienia [32]. Przebarwienie barwnikowe siatkówki jest stosowane jako marker nosicielstwa zmutowanego allelu, ale rozwój technik biologii molekularnej, jak i występowanie tylko u części rodzin ograniczyły jego znaczenie. W najnowszej literaturze przeglądowej odnotowuje się zanik stosowanego terminu zespół Gardnera, takiej jednostki chorobowej nie ma już również w bazie MIM. Do niedawna była oznaczona numerem (MIM 175100.0006). W FAP wyróżnia się formę klasyczną i łagodną. Poza tym w formie klasycznej wyróżniono ostry przebieg z bardzo licznymi objawami pozajelitowymi. [30, 52].

#### Łagodna forma rodzinnej polipowatości gruczolakowatej jelita grubego (AAPC)

Łagodna forma rodzinnej polipowatości jelita grubego AAPC (ang. *attenuated adenomatous polyposis coli*) charakteryzuje się występowaniem małej liczby polipów od kilku do stu. Z objawów pozajelitowych rzadko obserwuje się występowanie polipów dna żołądka[51]. Występowanie tej formy rodzinnej polipowatości jelita związane jest z występowaniem mutacji na końcu 5' genu *APC*. Przyjmuje się, że kodon 159 jest granicą między mutacjami powodującymi AAPC a FAP, jednak ustalenie jednoznacznej granicy jest trudne, ponieważ ta forma choroby wystąpiła również w przypadkach, gdy mutacja prowadziła do powstania kodonu Stop w eksonie 9 genu *APC*[51].

#### Fenotyp mutacji genu *MUTYH*

##### Polipowatość recesywna (MIM 608456) MAP (ang. *MUTYH associated polyposis*)

Polipowatość recesywna jest autosomalną recesywną predyspozycją do występowania licznych polipów w jelicie grubym, których liczebność jest niższa niż w przypadku FAP nie przekracza 100 [53]. Wzrost ryzyka wystąpienia nowotworu u nosicieli mutacji obu alleli genu *MUTYH* jest 93 razy wyższe niż populacji ogólnej i nowotwór jelita występuje w prawie zawsze przed 60 rokiem życia[54]. Zaobserwowano również, że mutacje obu alleli genu *MUTYH* podnoszą ryzyko występowania nowotworu endometrium, co przy niewielkiej liczbie polipów lub ich braku, może upodabniać fenotyp do dziedzicznego nowotworu jelita bez polipowatości (HNPCC) [55]. Różnice w zakresie występowania objawów choroby obserwuje się także u krewnych nosicieli tych samych mutacji[56].

##### Zespół Turcota (MIM 276300)

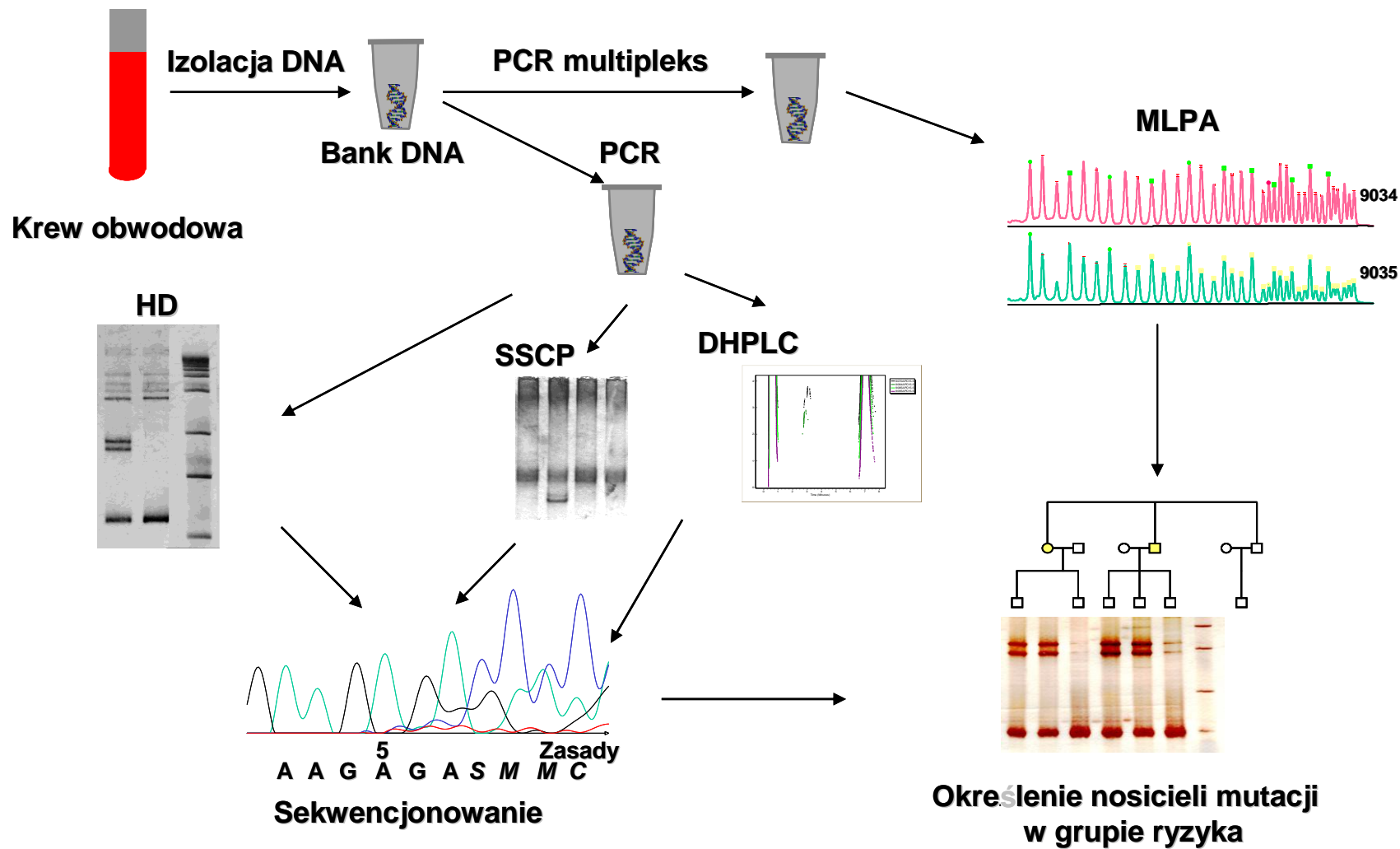
Zespół Turcota obejmuje współwystępowanie nowotworów układu pokarmowego i nowotworów złośliwych centralnego układu nerwowego. W 1991 roku wyróżniono dwie formy choroby, dziedziczną autosomalnie dominującą formę z występowaniem rdzeniaka (meduloblastoma) w młodym wieku i objawów jelitowych FAP oraz formę dziedziczną autosomalnie recesywnie z występowaniem glejaka wielopostaciowego (glioblastoma) u starszych pacjentów i cechami HNPCC w jelicie grubym[57]. W zespole Turcota zaobserwowano, że u chorych z mutacją w genie *APC* w 79% wystąpił rdzeniak, a u chorych z cechami jelitowymi wskazującymi na mutacje w genach naprawy DNA, glejak. Mutacje zidentyfikowane w genie *APC* wykazują heterogenny charakter. Nie wyodrębniono szczególnego regionu w genie *APC* związanego z występowaniem zespołu Turcota.

### Diagnostyka molekularna FAP

Materiałem do badań jest DNA wyizolowany z komórek krwi obwodowej. Poszukiwanie mutacji wykonuje się z zastosowaniem metod przesiewowych, takich jak: analiza heterodupleksów, analiza polimorfizmu konformacji jednoniciowych DNA, a następnie wykonuje się analizę sekwencji. Po wykryciu mutacji w genie *APC* przeprowadza się analizę dziedziczenia zmutowanego allelu genu *APC* u wszystkich osób w badanej rodzinie (Ryc. 2). W przypadku, gdy nie wykryto mutacji można zastosować analizę typu pośredniego, badając współdziedziczenie markerów sprzężonych [58]. Do badania dziedziczenia zmutowanego allelu stosuje się markery położone blisko badanego genu. Wskazane jest stosowanie kilku markerów flankujących gen dla uniknięcia błędu wynikającego z wystąpienia *crossing-over* między markerem a genem. Rodzinna polipowatość jelita grubego jest badana w naszym kraju od ponad 10 lat w Instytucie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu. Utworzony Bank DNA Polskich chorych z polipowatością rodzinną zawiera materiał od 400 rodzin. Wyniki prac na zgromadzonym materiale prezentowano w specjalistycznych czasopismach[43, 59-63]. Problem diagnostyczny stanowi około 50% rodzin z FAP bez zidentyfikowanej mutacji w genie *APC*. Ostatnie doniesienia wskazują na nowe kierunki badań w tym zakresie. Naukowcom z Holandii udało się zidentyfikować miRNA regulujące ekspresję genu *APC*. Określono sekwencje docelowe dla miRNA oraz lokalizację 3 genów kodujących. Gen kodujący miR-135a-1 znajduje się pierwszym intronie genu stabiliny 1, gen *STAB1* (3q21), a gen kodujący miR-135a-2 w intronie 5 genu *RMST* kodującego transkrypt związany z rabdomyosarcoma (12q23) [64]. Gen kodujący miR135b zlokalizowany jest na chromosomie 1q32,1 w intronie 1 genu *LEMD1*. Sekwencje prekursorów miR-135a i miR-135b znajdują się w basie sekwencji. Prekursory miRNA składają się z sekwencji 92, 102 i 99 nukleotydowych i znajdują się odpowiednio na chromosomie 3 miR135a-1, chromosomie 12 miR-135a-2 i chromosomie 1 miR-135b. Eksperymentalnie wykazano, że w układzie *in vitro* miRNA; miR135a i miR135b oddziałują z 3'UTR transkryptu genu *APC* i wpływają na poziom mRNA, przez co mogą regulować poziom aktywności szlaku kontroli proliferacji *Wnt*. Zaobserwowano również, że

wzrost ilości miR-135a i miR-135b wywołuje spadek ilości mRNA genu *APC* w guzach nowotworowych jelita [64]. Badanie tych sekwencji może poszerzyć naszą wiedzę na temat genetycznego podłoża choroby, jak i wzbogacić diagnostykę choroby.

Ryc. 1. Diagnostyka molekularna FAP



## Profilaktyka FAP

Określenie nosicieli mutacji wiąże się z zastosowaniem u nich odpowiedniej profilaktyki. Obecnie, wobec osób obciążonych ryzykiem wystąpienia choroby stosuje się sigmoidoskopię wykonywaną, co 12 miesięcy począwszy od okresu dojrzewania. Pozwala to na wykrycie objawów na długo przed rozwinięciem się nowotworu inwazyjnego. Po pojawieniu się polipów jedynym sposobem uniknięcia wystąpienia nowotworu inwazyjnego jest operacyjne usunięcie całego jelita grubego. Profilaktyczna kolektomia wykonana w odpowiednim czasie i w odpowiedni sposób pozwala na wydłużenie życia chorych z FAP średnio z 45 do 60 lat.

W zabiegu operacyjnym usuwa się całe jelito grube wytwarzając z jelita cienkiego zbiornik J (ang. *J pouch*). Obserwuje się dużą adaptację śluzówki jelita cienkiego tak, że morfologicznie upodobnia się ona do śluzówki jelita grubego. Zabieg chirurgiczny, będący obecnie jedyną możliwością przedłużenia życia osób chorych, mimo skuteczności, powoduje poważne okaleczenie, zwłaszcza przy zaawansowanym rozwoju choroby, gdy usuwa się odbył. Wobec tego bardzo duże nadzieje wiąże się z badaniem wpływu składu pożywienia i niesteroidowych leków przeciwzapalnych wpływających na obniżenie liczby występowania polipów. Badając zawartość skrobi w żywności i zachorowania na nowotwory jelita grubego stwierdzono odwrotną korelację między ilością skrobi w diecie, a częstością występowania nowotworu jelita grubego. Badania prowadzi się na modelach zwierzęcych. Opracowano kilka modeli mysich, do których należą myszy pozbawione funkcjonalnego genu (ang. *knock-out*)  $APC^{\Delta 716}$ [65]. Myszy te są heterozygotami mutacji w genie *APC* w kodonie 716, co daje klasyczny obraz polipów występujących od 3 tygodnia życia. Homozygoty mutacji są prenatalnie letalne. Podawanie pokarmu o wysokiej zawartości skrobi i niskiej zawartości tłuszczu nie wpłynęło na częstość wystąpienia choroby, lecz zmniejszyło o 64% liczebność polipów a także rozmiar polipów u osobników chorych. Obniżenie liczebności wystąpienia polipów powodowane jest także przez niesterydowe leki przeciwzapalne. W badaniach stosuje się aspirynę, Piroxicam i Sulindac, które powodują obniżenie liczebności polipów w jelicie grubym u myszy ze zmutowanym genem *APC* od 40 do 60% [66].

Podjęmowane są również próby zastosowania terapii genowej w leczeniu FAP. Warunkowanie choroby mutacją w jednym genie znacznie ułatwia podjęcie prób naprawy błędu. Do linii komórek śluzówki jelita grubego SW480 ze zmutowanym genem *APC* wprowadzono cały funkcjonalny gen *APC* z zastosowaniem liposomów jako wektora. Wydajność tego systemu jest niska i gen nie ulega integracji z genomem komórki docelowej, jednak liposomy są dużo bezpieczniejsze od wektorów retrowirusowych. Transfer genu *APC* pozwolił uzyskać ekspresję prawidłowego genu *APC* w komórkach SW480 po 72 godzinach, która była obserwowana przez okres tygodnia na poziomie zapewniającym biologiczny efekt.

Choroby nowotworowe jelita grubego są dobrze poznane, konieczne jest jednak poznanie wszystkich czynników wpływających na inicjację i rozwój nowotworu oraz interakcje między nimi. Badanie mutacji

występujących w czasie rozwoju choroby nowotworowej pozwoli na wybranie najskuteczniejszego sposobu profilaktyki lub minimalizowanie skutków choroby. Największe nadzieje wiąże się ze stosowaniem terapii genowej. W tym przypadku, aby całkowicie wyeliminować przyczynę choroby należałoby przeprowadzić korektę genu w większości komórek organizmu (dla uniknięcia licznych objawów pozajelitowych). Mimo poznania mutacji powodującej chorobę, dla kompleksowej korekcji znanego błędu musi dokonać się przełom w technologii transferu genów.

## Piśmiennictwo

1. Groden, J., et al., *Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene*. Cell, 1991. **66**(3): p. 589-600.
2. Bisgaard, M.L., et al., *Familial adenomatous polyposis (FAP): frequency, penetrance, and mutation rate*. Hum Mutat, 1994. **3**(2): p. 121-5.
3. Lynch, H.T. and T.C. Smyrk, *Identifying Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*. N Engl J Med, 1998. **338**: p. 1537-1538.
4. Distante, S., et al., *Familial adenomatous polyposis in a 5 year old child: a clinical, pathological, and molecular genetic study*. J Med Genet, 1996. **33**(2): p. 157-60.
5. Knudson, A.J.R., *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma*. Proc Nat Acad Sci, 1971. **68**: p. 820-823.
6. Herrera, L., et al., *Gardner syndrome in a man with an interstitial deletion of 5q*. Am J Med Genet, 1986. **25**(3): p. 473-6.
7. Miyoshi, Y., et al., *Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene*. Hum Mol Genet, 1992. **1**(4): p. 229-33.
8. Rubinfeld, B., et al., *Association of the APC gene product with beta-catenin*. Science, 1993. **262**(5140): p. 1731-4.
9. Santoro, I.M. and J. Groden, *Alternative splicing of the APC gene and its association with terminal differentiation*. Cancer Res, 1997. **57**(3): p. 488-94.
10. Kinzler, K.W., et al., *Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21*. Science, 1991. **253**(5020): p. 661-5.
11. Lambert, S. and W.G. Ballhausen, *Identification of an alternative 5' untranslated region of the adenomatous polyposis coli gene*. Hum Genet, 1993. **90**(6): p. 650-2.
12. Samowitz, W.S., et al., *Alternatively spliced adenomatous polyposis coli (APC) gene transcripts that delete exons mutated in attenuated APC*. Cancer Res, 1995. **55**(17): p. 3732-4.
13. Sulekova, Z., J. Reina-Sanchez, and W.G. Ballhausen, *Multiple APC messenger RNA isoforms encoding exon 15 short open reading frames are expressed in the context of a novel exon 10A-derived sequence*. Int J Cancer, 1995. **63**(3): p. 435-41.
14. Fearon, E.R., *Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer*. Science, 1997. **278**(5340): p. 1043-50.
15. He, T.C., et al., *Identification of c-MYC as a target of the APC pathway*. Science, 1998. **281**(5382): p. 1509-12.
16. Roose, J., et al., *Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1*. Science, 1999. **285**(5435): p. 1923-6.
17. Stenson, P.D., et al., *Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update*. Hum Mutat, 2003. **21**(6): p. 577-81.



18. Mandl, M., et al., *Frequency of common and novel inactivating APC mutations in 202 families with familial adenomatous polyposis*. Hum Mol Genet, 1994. **3**(1): p. 181-4.
19. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. **61**(5): p. 759-67.
20. Morin, P.J., *beta-catenin signaling and cancer*. Bioessays, 1999. **21**(12): p. 1021-30.
21. Slupska, M.M., et al., *Cloning and sequencing a human homolog (hMYH) of the Escherichia coli mutY gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage*. J Bacteriol, 1996. **178**(13): p. 3885-92.
22. Sieber, O.M., et al., *Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH*. N Engl J Med, 2003. **348**(9): p. 791-9.
23. Al-Tassan, N., et al., *Inherited variants in MYH are unlikely to contribute to the risk of lung carcinoma*. Hum Genet, 2003.
24. Jones, S., et al., *Biallelic germline mutations in MYH predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G:C-->T:A mutations*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(23): p. 2961-7.
25. Cruz-Correa, M. and F.M. Giardiello, *Familial adenomatous polyposis*. Gastrointest Endosc, 2003. **58**(6): p. 885-94.
26. Krush, A.J., et al., *Hepatoblastoma, pigmented ocular fundus lesions and jaw lesions in Gardner syndrome*. Am J Med Genet, 1988. **29**(2): p. 323-32.
27. Giardiello, F.M., et al., *Primary chemoprevention of familial adenomatous polyposis with sulindac*. N Engl J Med, 2002. **346**(14): p. 1054-9.
28. Giardiello, F.M., et al., *Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis*. N Engl J Med, 1993. **328**(18): p. 1313-6.
29. Cohen, M., et al., *Colonic and duodenal flat adenomas in children with classical familial adenomatous polyposis*. Int J Surg Pathol, 2006. **14**(2): p. 133-40.
30. Cetta, F. and A. Dharmo, *Inherited multitumoral syndromes including colorectal carcinoma*. Surg Oncol, 2007. **16 Suppl 1**: p. S17-23.
31. Caspari, R., et al., *Predictive diagnosis in familial adenomatous polyposis: evaluation of molecular genetic and ophthalmologic methods*. Z Gastroenterol, 1993. **31**(11): p. 646-52.
32. Wallis, Y.L., et al., *Genotype-phenotype correlation between position of constitutional APC gene mutation and CHRPE expression in familial adenomatous polyposis*. Hum Genet, 1994. **94**(5): p. 543-8.
33. Jagelman, D.G., *Familial Polyposis coli: the clinical spectrum*. Prog Clin Biol Res, 1988. **279**: p. 169-75.
34. Domizio, P., et al., *Upper gastrointestinal pathology in familial adenomatous polyposis: results from a prospective study of 102 patients*. J Clin Pathol, 1990. **43**(9): p. 738-43.
35. Kashiwagi, H., et al., *Development of duodenal cancer in a patient with familial adenomatous polyposis*. J Gastroenterol, 2000. **35**(11): p. 856-60.
36. Zwick, A., et al., *Gastric adenocarcinoma and dysplasia in fundic gland polyps of a patient with attenuated adenomatous polyposis coli*. Gastroenterology, 1997. **113**(2): p. 659-63.
37. Sarre, R.G., et al., *Gastric and duodenal polyps in familial adenomatous polyposis: a prospective study of the nature and prevalence of upper gastrointestinal polyps*. Gut, 1987. **28**(3): p. 306-14.
38. Heiskanen, I., I. Kellokumpu, and H. Jarvinen, *Management of duodenal adenomas in 98 patients with familial adenomatous polyposis*. Endoscopy, 1999. **31**(6): p. 412-6.
39. Jones, I.T., et al., *Desmoid tumors in familial polyposis coli*. Ann Surg, 1986. **204**(1): p. 94-7.
40. Klemmer, S., L. Pascoe, and J. DeCosse, *Occurrence of desmoids in patients with familial adenomatous polyposis of the colon*. Am J Med Genet, 1987. **28**(2): p. 385-92.
41. Camiel, M.R., et al., *Thyroid carcinoma with Gardner's syndrome*. N Engl J Med, 1968. **279**(6): p. 326.
42. Bell, B. and E.L. Mazzaferri, *Familial adenomatous polyposis (Gardner's syndrome) and thyroid carcinoma. A case report and review of the literature*. Dig Dis Sci, 1993. **38**(1): p. 185-90.
43. Brozek, I., et al., *Thyroid cancer in two siblings with FAP syndrome and APC mutation*. Int J Colorectal Dis, 2008. **23**(3): p. 331-2.

44. Itoh, H. and K. Ohsato, *Turcot syndrome and its characteristic colonic manifestations*. Dis Colon Rectum, 1985. **28**(6): p. 399-402.
45. Itoh, H., et al., *Turcot's syndrome and its mode of inheritance*. Gut, 1979. **20**(5): p. 414-9.
46. Paraf, F., S. Jothy, and E.G. Van Meir, *Brain tumor-polyposis syndrome: two genetic diseases?* J Clin Oncol, 1997. **15**(7): p. 2744-58.
47. Van Meir, E.G., "*Turcot's syndrome*": *phenotype of brain tumors, survival and mode of inheritance*. Int J Cancer, 1998. **75**(1): p. 162-4.
48. Giardiello, F.M., et al., *Hepatoblastoma and APC gene mutation in familial adenomatous polyposis*. Gut, 1996. **39**(96): p. 867-9.
49. Gruner, B.A., et al., *Hepatocellular carcinoma in children associated with Gardner syndrome or familial adenomatous polyposis*. J Pediatr Hematol Oncol, 1998. **20**(3): p. 274-8.
50. Bishop, D.T. and H.J. Thomas, *The genetics of colorectal cancer*. Cancer Surv, 1990. **9**(4): p. 585-604.
51. Soravia, C., et al., *Genotype-phenotype correlations in attenuated adenomatous polyposis coli*. Am J Hum Genet, 1998. **62**(6): p. 1290-301.
52. Nieuwenhuis, M.H. and H.F. Vasen, *Correlations between mutation site in APC and phenotype of familial adenomatous polyposis (FAP): a review of the literature*. Crit Rev Oncol Hematol, 2007. **61**(2): p. 153-61.
53. Sampson, J.R., et al., *Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MYH*. Lancet, 2003. **362**(9377): p. 39-41.
54. Farrington, S.M., et al., *Germline susceptibility to colorectal cancer due to base-excision repair gene defects*. Am J Hum Genet, 2005. **77**(1): p. 112-9.
55. Barnetson, R.A., et al., *Germline mutation prevalence in the base excision repair gene, MYH, in patients with endometrial cancer*. Clin Genet, 2007. **72**(6): p. 551-5.
56. Nielsen, M., et al., *Germline mutations in APC and MUTYH are responsible for the majority of families with attenuated familial adenomatous polyposis*. Clin Genet, 2007. **71**(5): p. 427-33.
57. Mastronardi, L., et al., *Association between neuroepithelial tumor and multiple intestinal polyposis (Turcot's syndrome): report of a case and critical analysis of the literature*. Neurosurgery, 1991. **28**(3): p. 449-52.
58. Plawski, A. and R. Slomski, *Geny Supresorowe Nowotworów*. Postępy biologii komórki, 1998. **25**(sup.10): p. 251-264.
59. Plawski, A., et al., *The AAPC case, with an early onset of colorectal cancer*. Int J Colorectal Dis, 2007. **22**(4): p. 449-51.
60. Skrzypczak, M., et al., *The MYH gene status in Polish FAP patients without the APC gene mutations*. Hereditary Cancer in Clinical Practice, 2006. **4**: p. 43-47.
61. Kubinska, I., et al., *Using of molecular sreening in children with familial polyposis background - own experience*. Polish Journal of Environmental Studies, 2006. **15**(5b): p. 98-101.
62. Plawski, A., et al., *Novel germline mutations in the adenomatous polyposis coli gene in Polish families with familial adenomatous polyposis*. J Med Genet, 2004. **41**(1): p. e11.
63. Plawski, A. and R. Slomski, *The APC gene mutations causing FAP in Polish patients*. Journal of Applied Genetics, 2008. **49**(4): p. 407-414.
64. Nagel, R., et al., *Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer*. Cancer Res, 2008. **68**(14): p. 5795-802.
65. Oshima, M., et al., *Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2)*. Cell, 1996. **87**(5): p. 803-9.
66. Chiu, C.H., M.F. McEntee, and J. Whelan, *Sulindac causes rapid regression of preexisting tumors in Min/+ mice independent of prostaglandin biosynthesis*. Cancer Res, 1997. **57**(19): p. 4267-73.