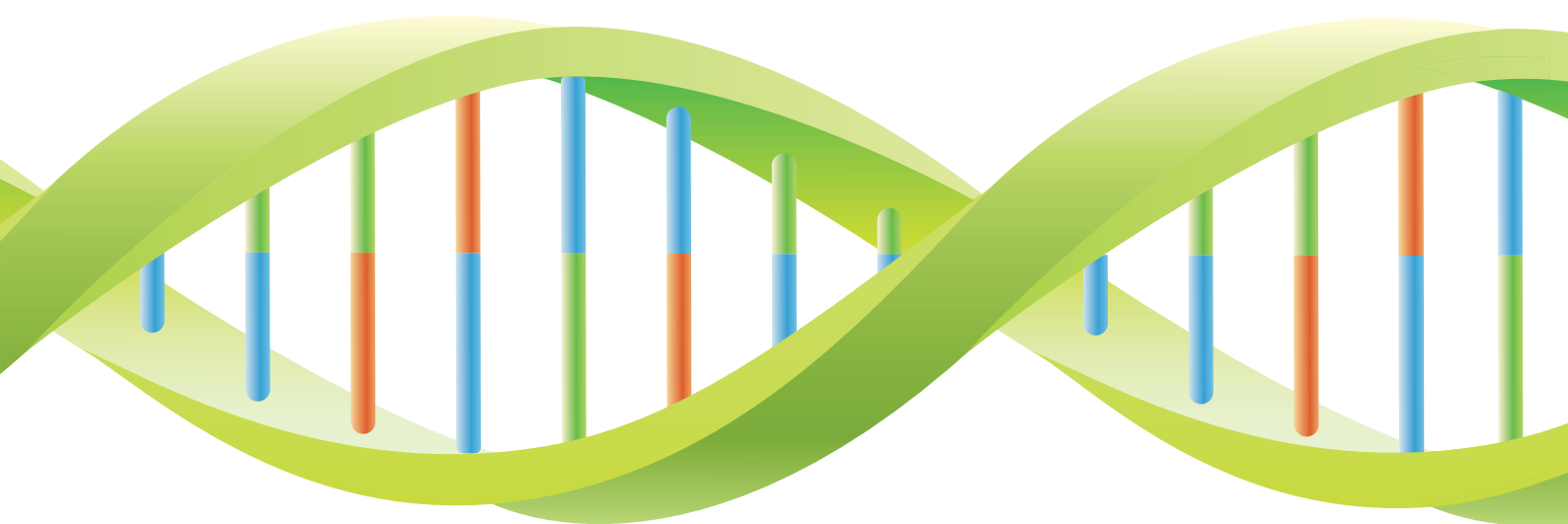


GENETISK FÖRKLARING TILL TUMÖRSJUKDOM UPPTÄCKT



I en ny avhandling har gener med sjukdomsorsakande variationer identifierats. Genom att vi har hittat den genetiska förklaringen till kolorectal cancer kan vi erbjuda presymtomatisk testning och familjemedlemmar som är mutationsbärare ett kontrollprogram. Screening med genpanelen används idag inom rutindiagnostiken för denna patientgrupp och möjliggör en förbättrad diagnostik. **Anna Rohlin**, doktorand vid Sahlgrenska akademien, Göteborgs universitet redogör här för avhandlingen.

Vår forskning på avdelningen för klinisk genetik och patologi vid Sahlgrenska universitetssjukhuset leds av Margareta Nordling, sjukhusgenetiker och docent. Vi har ett nära samarbete med det svenska polyposregistret vid Karolinska sjukhuset och de cancertgenetiska mottagningarna i landet.

Kolorectal cancer (tjock- och ändtarmscancer) är en av de vanligaste cancerformerna, med en miljon nya fall i världen och ca 4000 nya fall i Sverige varje år. Det är också en cancerform som till stor del beror på ärftliga faktorer, ca 20-30%. Personer med ärftlig cancer får i regel sin cancer tidigare och

löper större risk att drabbas av fler än en tumör, än personer med sporadisk (icke ärftlig) cancer.

Utifrån ett kliniskt behov, har vi alltsedan gener för ärftlig kolorectal cancer blev kända, analyserat patienter för förekomst av sjukdomsorsakande mutationer. Parallellt bedriver vi ett forsknings- och utvecklingsarbete i syfte att förbättra möjligheterna till diagnos och behandling för dessa patienter.

Det finns ett behov av att bedöma vilka individer som har ökad risk att drabbas av kolorectal cancer och att upptäcka sjukdomen i ett tidigt skede. Då cancer till stora delar är en sjukdom orsakad av genetiska förändringar finns det idag



”Genom att vi har hittat den genetiska förklaringen till tumörsjukdomen kan vi erbjuda presymtomatisk testning och ett kontrollprogram för familjemedlemmar som är mutationsbärare.”

ökade möjligheter att erbjuda personbaserad vård som utgår från genetisk analys.

Kartläggningen av den mänskliga arvsmassan ledde till en stark utveckling avseende metoder och tekniker för dessa ändamål. Vi kan idag, i större utsträckning, erbjuda känsligare och snabbare genetiska analyser i syfte att förbättra behandlingen för varje patient. Identifierade nya gener kan även an-

vändas som prognostiska markörer. Vår forskning är nära knuten till det arbete som utförs kliniskt inom cancertgenetiken på avdelningen och uppsättningen av nya metoder och identifiering av gener inom forskningen kan snabbt börja användas inom rutindiagnostiken.

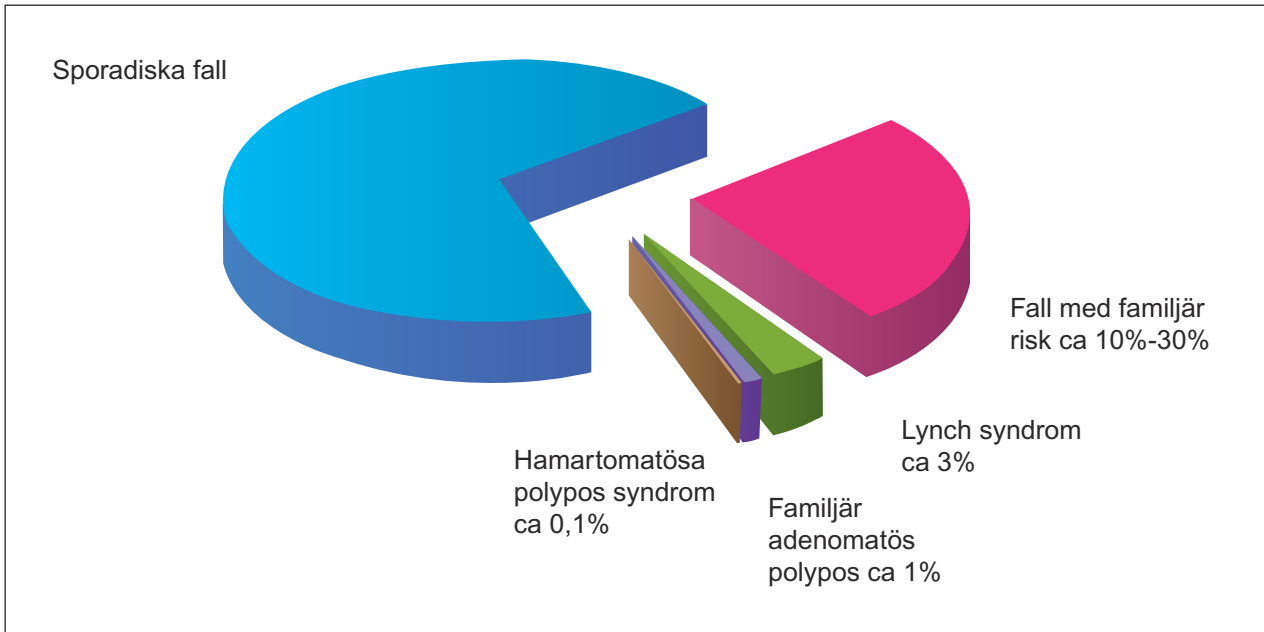
SYFTET ÄR ATT HITTA NYA MUTATIONER

Avhandlingen består av sex delar och har syftat till att identifiera nya patogena genetiska variationer (mutationer) och mekanismer hos patienter med en ärftlig belastning för kolorektal cancer. Detta för att i förebyggande syfte erbjuda familjemedlemmar presymtomatisk testning så att man i ett tidigt skede kan förebygga sjukdomen och på sikt bidra till nya behandlingsstrategier, även för de patienter som drabbas av sporadisk kolorektalcancer.

Genom att använda ett flertal kompletterande tekniker, framför allt så kallad massiv parallell sekvensering (MPS) även kallad ”Next Generation Sequencing” (NGS), har vi kunnat identifiera mutationer.

5-6% av ärftlig kolorektal cancer kan delas in i syndrom med mutationer i kända gener. Den vanligaste typen är Lynch

••• kolorectal cancer



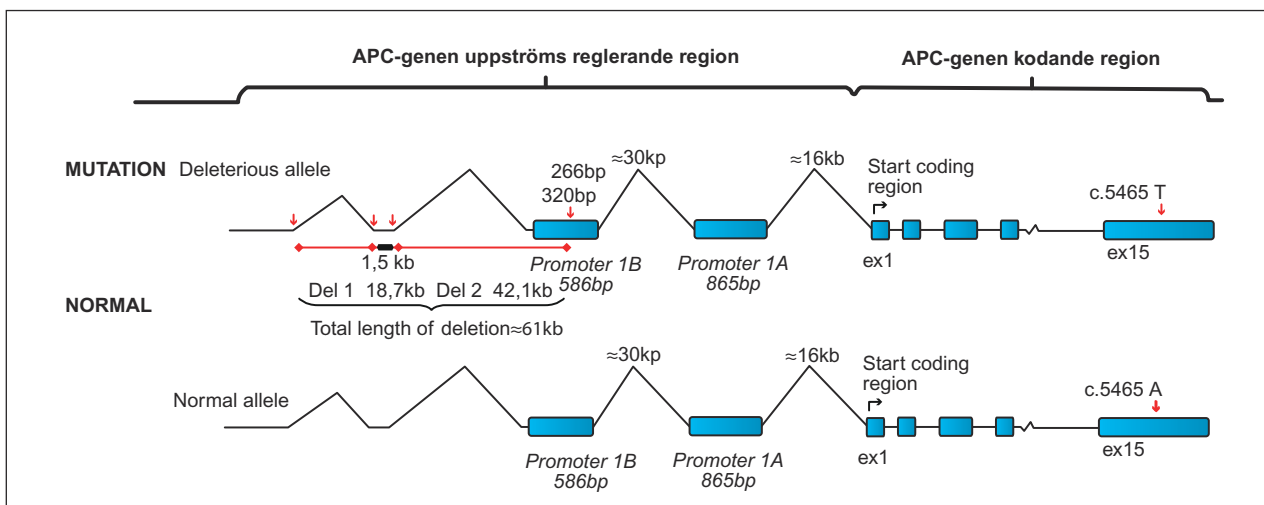
Figur 1 Fördelning av kolorektal cancer familjära syndrom och sporadiska fall.

syndrom som omfattar upp till 3% och utgör ca 50% av kolorektal cancer syndromet HNPCC (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). Lynch syndrom definieras av mikrosatellit instabila (MSI) tumörer och konstitutionella mutationer i mis-match repair generna MLH1, MSH2, MSH6 och PMS2¹. Den näst vanligaste är familjär adenomatös polypos (FAP) som utgör ca 1%. FAP karaktäriseras av hundra till tusentals adenomatösa polyper i tidig ålder främst i tjock och ändtarm. FAP orsakas främst av mutationer i APC-genen. Andra förekommande syndrom utgörs av hamartomatösa polypos syndrom omfattande Juvenil polypos, Peutz Jehgers syndrom och Cowden syndrom där gener med mutation är identifierade (Figur1). Cirka 50%-60% av patienter med Juvenil polypos har mutationer i BMPR1A och SMAD4. I andra mer ovanliga syndrom som ärftligt mixed polypos syndrom (HMPS)

och syndrom med till exempel sågtandade polyper (serrated polypos) är det mer oklart vilka genetiska förändringar som predisponerar. Det finns dock gener med mutationer identifierade i enstaka familjer. I den klassiska formen av FAP med 100 - 1000-tals adenomatösa polyper i tjock och ändtarm, hittas nästan alla mutationer i APC-genen. I den mildare formen av FAP däremot, så kallad attenuerad FAP(AFAP) med färre än 100 adenom, hittas endast ca 30% av mutationerna i APC-genen. Det finns alltså en stor andel av ärftlig cancer där den sjukdomsorsakande mutationen inte har kunnat identifieras ännu².

KOMPLEXA MUTATIONER

I den första och andra studien kartlade vi mutationsspektrat hos polypospatienter utgående från det unika familjematerial



Figur 2 Överst i bilden visar mutationen som utgörs av en tvådelad deletion på ca 61Kb och omfattande ca halva promoter 1B av APC genen. Underst visas den kvarvarande normala genvarianten då denna mutation konstitutionellt förekommer i heterozygot form.

som har samlats in i det Svenska Polyposregistret. Genom att använda ett flertal kompletterande tekniker, kunde vi upptäcka mutationer i APC-genen i hela 100 % av familjer med klassisk FAP vilket internationellt sett är mycket högt³. I en av familjerna, vilken utgör den största FAP-familjen i Sverige (cirka 150 personer, varav 59 med verifierad FAP) hittades ett lågt uttryck av genen, men den faktiska mutationen bakom detta kunde inte identifieras initialt.

Slutligen identifierades den sjukdomsorsakande mutationen med SNP array tekniken, en teknik som ger möjlighet att hitta större mutationer som utgörs av en avsaknad eller tillkomst (kopietalsförändringar) av hela gener, genregioner över hela arvsmassan. Vi kunde då konstatera ett bortfall av en del av promotorregionen (deletion) i APC-genen på ca 61 Kb (Figur 2). Deletionen ledde till det lägre uttrycket och konstaterades vara den sjukdomsorsakande mutationen i denna familj.

Vi studerade även i detalj de olika transcripten uttryckta från APC promotorerna och kunde dra slutsatser att den hittills ej lika kända promotern 1B tycks ha en större betydelse än man tidigare trott⁴. I många familjer med FAP har man tidigare sett det lägre uttrycket av APC-genen, men inte kunnat hitta den orsakande mutationen till detta. Vår studie var den första där man hittat den orsakande mutationen och ytterligare studier har nyligen påvisat likande mutation i promotorregionen hos patienter med FAP⁵.

REVOLUTIONERANDE METOD

Kartläggningen av det mänskliga genomet och introduktionen av Next Generation Sequencing (NGS), har revolutionerat utvecklingen under de senaste åren. Denna teknik gör det möjligt att idag sekvensera alla kodande genregioner, till och med arvsmassan, snabbt och till en låg kostnad. Metoden ger

oss betydligt större möjligheter än tidigare att identifiera gener med sjukdomsorsakande mutationer.

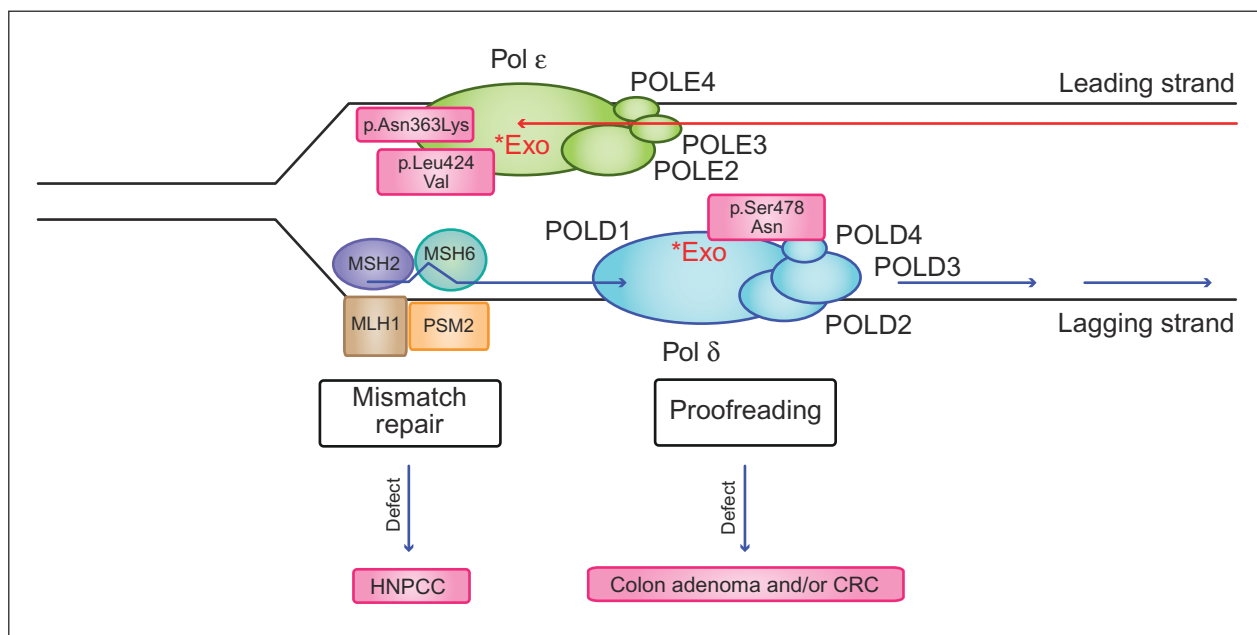
Under 2008 började vi använda oss av den nya sekvenstekniken och i de följande tre studierna kunde vi använda den på olika sätt. Vi använde den till att detektera lågfrekventa variationer (sk mosaik mutationer). NGS-tekniken möjliggör sekvensering av de enskilda DNA molekylerna. Detta möjliggör detektion av lågfrekventa variationer med betydligt högre känslighet än med tidigare tekniker, då man räknar antalet molekyler med mutation⁶. I APC genen förekommer mosaikmutationer i upp till 10-15%, framför allt hos patienter med AFAP. NGS-tekniken möjliggör en högre mutationsdetektionsnivå i denna grupp.

NGS tekniken gör det också möjligt att hitta flertalet typer av variationer från SNP, små deletioner och insertioner av ett fåtal baser till större deletioner, insertioner, translokationer och kopietalsförändringar i genomet och kan därmed på sikt ersätta ett flertal av befintliga tekniker.

I studie fyra till sex har vi använt oss av så kallad riktad NGS då man väljer ut en panel av gener. I vår studie utgjordes detta av 19 st gener förknippade med ärftlig kolorektal cancer och helixom-sekvensering då alla genomets ca 23 000 gener sekvenseras samtidigt med NGS tekniken.

IDENTIFIERING AV NYA GENER MED MUTATIONER

I studie fyra och fem identifierade vi sjukdomsorsakande mutationer med hel exomsekvensering i POLE och GREM1. Human POLE utgör den katalytiska subenheten av polymeras epsilon (ε) enzym komplex. Pol ε ansvarar för DNA syntesen under DNA replikationen. POLE utgör exonukleas domänen av enzymet, vilken är väsentlig för fideliteten av polymeraset genom att ta bort felinsatta baser under DNA replikationen.



Figur 3 Ärftliga DNA replikations defekter leder till PPAP syndrom och defekter i mis-match repair proteinerna till HNPCC och Lynch syndrom. Exonukleas domänen som är central i polymerasets förmåga att reparera felinsatta baser visas med några mutationer som har identifierats. I vår studie identifierade vi mutationen p.Asn363 Lys. (Reprinted and modified by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Genetics], [9] © (2014).

••• kolorectal cancer

I studie fem identifierade vi en variation i exonukleas domänen. Denna variation, benämnd p.Asn363Lys, interagerar direkt med det enkelsträngade DNA:t och har med stor sannolikhet en dramatisk effekt på förmågan att ta bort felinsatta baser. Variationen är inte känd sedan tidigare, men en variation i samma domän identifierades nyligen i en stor brittisk studie i en kolorektal cancer familj med polyper utan ytterligare tumörer⁷. Vår familj bedömdes initialt vara en Lynchfamilj, men inga mutationer i de kända generna kunde identifieras. Fenotypen utgjordes av ett brett tumorspektrum inklusive äggstockscancer, livmodercancer, hjärntumör, cancer i bukspottkörtel och kolorectal cancer⁸. Mutationer i polymeras gener (främst POLE och POLD1) har nyligen gett upphov till definitionen av ett nytt polypos syndrom "Polymerase Proofreading Associated Polypos" (PPAP) (Figur 3).

I ytterligare en familj (studie fyra) initialt diagnostiserad med AFAP, men där även polyper av varierade histologi kunde konstateras, identifierade vi en mutation i den regulatoriska delen av GREM1 genen. GREM1 verkar som en antagonist i BMP signaleringsvägen och påverkar indirekt WNT signaleringen som är central i tumörinitieringen via APC mutationer. En liknande mutation identifierades också av samma brittiska grupp i en familj med hereditär mixed polypos syndrom (HMPS)⁹.

I den avslutande studien utgick vi från en panel av 19 gener förknippade med ärftlig kolorektal cancer. Materialet utgjordes av patienter där vi initialt hade screenat för mutation i någon av de kända generna förknippade med FAP eller Lynch syndrom i enlighet med den frågeställningen och bedömningen som hade gjorts i början. I studien tittade vi på alla typer av varianter från enskilda baser till kopietals förändringar av dessa gener. Vi kunde identifiera mutationer i framförallt i BMPR1A och SMAD4, gener som är kända orsakande juvenil polypos. Slutsatser från denna studie var att en bredare testning av kända gener för ärftlig kolorectal cancer-syndrom behövs för att identifiera den sjukdomsorsakande mutationen, då komplexiteten och överlappningen mellan de olika kolorectal cancersyndromen är stor.

I avhandlingen har vi identifierat gener med sjukdomsorsakande variationer både i kända och nya gener. Genom att vi har hittat den genetiska förklaringen till tumorsjukdomen kan vi erbjuda presymptomatisk testning och ett kontrollprogram för familjemedlemmar som är mutationsbärare. Screening med genpanelen används idag inom rutindiagnostiken för denna patientgrupp och möjliggör därmed en förbättrad diagnostik.

REFERENSER

1. Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch JF, et al. (2009) Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin Genet* 76: 1-18.

2. Jaspersion KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW (2010) Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology* 138: 2044-2058.

3. Kanter-Smoler G, Fritzell K, Rohlin A, Engwall Y, Hallberg B, et al. (2008) Clinical characterization and the mutation spectrum in Swedish adenomatous polyposis families. *BMC Med* 6: 10.

4. Rohlin A, Engwall Y, Fritzell K, Goransson K, Bergsten A, et al. (2011) Inactivation of promoter 1B of APC causes partial gene silencing: evidence for a significant role of the promoter in regulation and causative of familial adenomatous polyposis. *Oncogene* 30: 4977-4989.

5. Pavicic W, Nieminen TT, Gylling A, Pursiheimo JP, Laiho A, et al. (2014) Promoter-specific alterations of APC are a rare cause for mutation-negative familial adenomatous polyposis. *Genes Chromosomes Cancer* 53: 857-864.

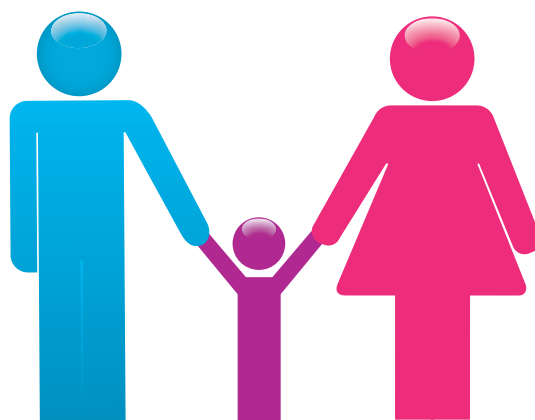
6. Rohlin A, Wernersson J, Engwall Y, Wiklund L, Bjork J, et al. (2009) Parallel sequencing used in detection of mosaic mutations: comparison with four diagnostic DNA screening techniques. *Hum Mutat* 30: 1012-1020.

7. Palles C, Cazier JB, Howarth KM, Domingo E, Jones AM, et al. (2013) Germline mutations affecting the proofreading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas. *Nat Genet* 45: 136-144.

8. Rohlin A, Zagoras T, Nilsson S, Lundstam U, Wahlstrom J, et al. (2014) A mutation in POLE predisposing to a multi-tumour phenotype. *Int J Oncol* 45: 77-81.

9. Seshagiri S (2013) The burden of faulty proofreading in colon cancer. *Nat Genet* 45: 121-122.

10. Jaeger E, Leedham S, Lewis A, Segditsas S, Becker M, et al. (2012) Hereditary mixed polyposis syndrome is caused by a 40-kb upstream duplication that leads to increased and ectopic expression of the BMP antagonist GREM1. *Nat Genet* 44: 699-703.



ANNA ROHLIN, DOKTORAND VID SAHLGRENSKA AKADEMIN, GÖTEBORGS UNIVERSITET, ANNA.ROHLIN@VGREGION.SE

