



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Tıp.Derg.
2019; 33 (2): 77 - 81
http://www.fusabil.org

Semih DALKILIÇ^{1,a}
Senel Sencer TEKTAŞ^{1,b}
Lutfiye DALKILIÇ^{1,c}
Abdurrahman ŞAHİN^{1,d}
Nurettin TUNÇ^{2,e}
Mehmet YALNIZ^{2,f}
İbrahim Halil BAHCECIOĞLU^{2,g}

¹ Fırat Üniversitesi,
Fen Fakültesi,
Biyoloji Bölümü,
Elazığ, TÜRKİYE

² Fırat Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Dahili Tıp Bilimleri Bölümü
Gastroenteroloji Bilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

^a ORCID: 0000-0002-6892-247X

^b ORCID: 0000-0001-5482-1494

^c ORCID: 0000-0002-6791-3811

^d ORCID: 0000-0001-5477-9492

^e ORCID: 0000-0002-9723-4510

^f ORCID: 0000-0001-7776-4154

^g ORCID: 0000-0001-9705-8281

Elazığ Bölgesinde Attenuated Familial Adenomatöz Poliposis coli (AFAP) Olgularında APC Gen Mutasyonlarının Araştırılması^{*,**}

Amaç: Kolorektal kanserlerin (KRK) %1'i ailesel özellik göstermekte ve bunlar familial adenomatöz poliposis (FAP) sendromu olarak adlandırılmaktadır. FAP gelişiminden sorumlu mutasyonlar sıklık sırasına göre APC, MUTYH ve POLD1 ile POLE genlerinde görülür. Yapılan bu çalışmada, kolonoskopik işlemlerde 10 veya üzeri polip (10 polip ile 100 polip arası) saptanan ve ailesinde poliposis coli veya KRK öyküsü olan hastaları attenuated FAP olarak sınıflandırarak, bu hastalarda FAP patogenezinde en etkili gen olan APC genindeki olası mutasyonların etkisinin araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Hastalardan 2 mL, (EDTA'lı Hemogram tüpüne) kan örneği alındı. İzole edilen DNA örneklerinde APC geninin AFP ile ilgili mutasyon ve polimorfizimleri en çok sıklıkta bulunduğu belirlenen 1,2,3,4,5,9. eksonları ve 15. eksonun 3' son kısmında 1000 baz çiftlik kısmı dideksinükleotid (Sanger) yöntemi ile sekanslanarak genetik varyasyonlar açısından değerlendirildi.

Bulgular: Çalışmaya 21'i (%70) erkek ve 9'u (%30) kadın toplam 30 hasta alındı. Hastaların yaş ortalaması 43.8±13.0 yıldır. Çalışmaya katılan hastaların ailelerinde en erken polip görülme yaşı 20, en erken KRK gelişim yaşı ise 40 olarak bulundu. Çalışmaya katılanların 18'inde (%60) ailede KRK öyküsü mevcuttu. Çalışmaya katılan 30 bireyin DNA örneklerinde, çalışılan APC geninin mutasyonlarının hiç birisine rastlanmadı.

Sonuç: Attenuated FAP hastalarımızda APC gen mutasyonları saptanmadı. Bu hastalarda, attenuated FAP sendromuna yol açan diğer genler olan MUTYH geni ile POLD1 ve POLE genleri çalışılarak, FAP sendromuna neden olan genin saptanması gerekmektedir ve bu noktada ileri çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar Kelimeler: Attenuated familial adenomatöz poliposis, APC geni, gen analizi

Investigation of APC Gene Mutations in Attenuated Familial Adenomatous Polyposis Coli Cases in Elazığ Region

Objective: Colorectal cancers (CRCs) are represent familial characteristics at a rate of 1% and are called familial adenomatous polyposis (FAP) syndrome. Mutations responsible for FAP development in order of frequency are seen in the APC gene, MUTYH gene, and POLD1 and POLE genes. We investigated our patients for possible mutations in the APC gene.

Materials and Methods: From the isolated DNA samples, 1st, 2nd, 3rd, 4th, 5th, 9th exons and 1000 bp on the 3' end of the 15th exon of APC, which were determined to have the highest frequency of mutations and polymorphisms that are related to AFP were sequenced by dideoxynucleotide Sanger method and evaluated for genetic variations.

Results: A total of 30 patients, 21 males (70%) and 9 females (30%) were included in the study. The mean age of the patients was 43.8 ± 13.0 years. The earliest polyp development age was 20 and early CRC development age was 40 in the families of the patients participated this study. In addition eighteen of the participants (60%) had a history of CRC in their family. No mutation was observed on the studied APC exons in DNA samples obtained from 30 individuals.

Conclusion: APC gene mutations were not detected in our patients. In these patients, other genes that may cause attenuated FAP syndrome, the MUTYH gene, and the POLD1 and POLE genes, should be further studied in order to determine the gene or genes that causes the FAP syndrome. Thus, further investigations are required.

Key words: Attenuated familial adenomatous polyposis, APC gene, gene analysis

Giriş

Dünyada her yıl 700.000 kişi kolorektal kanser (KRK) nedeniyle hayatını kaybetmektedir. KRK dünyada en sık görülen 4. kanser tipi olup (akciğer, karaciğer ve mide kanserinden sonra), kanser ilişkili ölümlerde 2. sırada yer almaktadır (1).

* V. Uluslararası Matematik - Mühendislik ve Fen ve Sağlık Bilimleri Kongresi (EJONS), 22-25 Kasım 2018, Gaziantep/ TÜRKİYE.

** Bu proje Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından TF.17.34 kodu ile desteklenmiştir.

Geliş Tarihi : 23.02.2019
Kabul Tarihi : 02.07.2019

Yazışma Adresi Correspondence

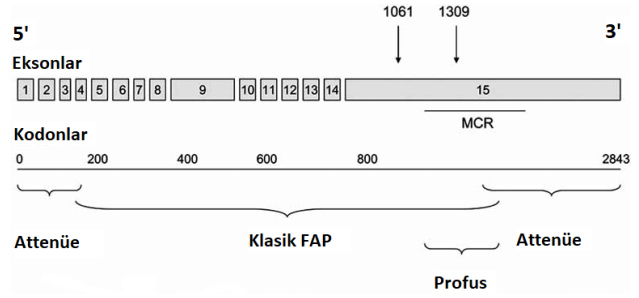
Semih DALKILIÇ
Fırat Üniversitesi,
Fen Fakültesi,
Biyoloji Bölümü,
Elazığ - TÜRKİYE

sdalkilic@firat.edu.tr

Türkiye’de Sağlık Bakanlığı’nın 2007-2008 yıllarında on iki ildeki kanser kayıt merkezi verilerine göre, KRK görölme sıklığı açısından tüm kanserler içinde %7.8 ile kadınlarda üçüncü ve %7.5 ile erkeklerde dördüncü sırada yer almaktadır. Kolorektal kanserlerin yaklaşık %5’i üreme hücrelerinde meydana gelen mutasyonlar (germline mutasyonlar) sonucu olmaktadır (2). Bir kişinin ömür boyu KRK’e yakalanma olasılığı %4.3’tür. Hastaların %90’ından fazlası 50 yaş üzerindedir ve %75’inde yaş haricinde bilinen diğer risk faktörleri yoktur (3). Hastaların %75’i sporadik olarak ortaya çıkarken %15-20’sinde aile hikayesi, %5’inde herediter non-polipozis koli (HNPKK), %1’inde familial adenomatöz polipozis (FAP) ve %1’inde iltihabi barsak hastalığı zemininde KRK geliş (4).

Familial adenomatöz polipozis, tüm KRK’lerin %1’inden azını teşkil etmekte olup 1/6850–1/31250 canlı doğumda bir görölür. FAP hastalarında yaşam boyu KRK gelişme olasılığı %100 olup ortalama KRK yaşı 39’dur (5-6). Kolorektal hastalık yanında diğer organ ve sistem malignitelerinin de eşlik edebildiği multisistemik bir hastalık olarak kabul edilmektedir (7). Familial adenomatöz polipozis, en çok 5q21 ve 5q22 kromozomlarındaki APC geni, takiben MUTYH geni ve POLD1 ve POLE genlerindeki germline mutasyonlar sonucu oluşmaktadır ve 4. dekatta tüm kolon boyunca yüzlerce, hatta binlerce küçük adenomatöz polip gelişimi ile karakterizedir (5). FAP hastalarının bir kısmı, klasik FAP kliniğinden farklı klinik özellikler göstermektedir ve “attenuated FAP” olarak isimlendirilmektedir. Attenuated FAP fenotipi gösteren hastalarda, 100’den az sayıda, rektumun nispeten korunduğu ve sağ kolon ağırlıklı polipler görölür. Attenuated FAP hastalarında polip oluşum ve KRK gelişimi daha ileri yaşlarda ortaya çıkmaktadır (8).

APC geni FAP gelişimine yol açan gen, bir tümör baskılayıcı gen dir ve her iki allelde inaktive olması durumunda adenom oluşumu başlar. Allellerden birisi genetik olarak mutant olup diğer allelin somatik olaylar sonucu hasar görmesi sonucu APC inaktivasyonu ortaya çıkar. APC geni 15 eksondan oluşan bir gen olup, mutasyonların tüm eksonlarda görölmesine karşın, çoğunluğu 15. eksonun 5’ ucundaki ‘mutation cluster region’ bölgesinden kaynaklanır. APC genindeki mutasyonun lokalizasyonu, kolon polip sayısı veya desmoid tümör ve CHRPE mevcudiyetleri ile ilişkili olabilmektedir (9). Attenuated FAP fenotip gelişen hastalarda yapılan çalışmalarda 5’ ucunda ekson 15, ekson 9 ve 3 ucunda, özellikle ekson 3 ve ekson 4’deki mutasyonlardan kaynaklandığı gözlenmiştir (10). APC geninde germline mutasyonlar yanında somatik mutasyonlar da görülebilmekte ve sporadik KRK gelişimine neden olabilmektedir. APC geninde kolonik ve ekstra kolonik manifestasyonların ortaya çıktığı mutasyonlar Şekil 1’de verilmiştir.



Şekil 1. Attenué ve Klasik FAP olgularında APC geninde tespit edilen mutasyonların eksonlar üzerindeki dağılımı. Brosens LAA'dan modifiye edilmiştir (19).

Amerikan Gastroenteroloji Derneği, 10'dan fazla kolon adenomatöz polipi olanların, ailesinde bir veya daha fazla sayıda adenomatöz polipozis sendromu olan birey bulunanların ve FAP sendromunda gözlenen ekstrakolonik malignitesi olan bireylerin (duodenal/ampüller adenom, desmoid tümör, tiroid kanseri, epidermoid kist, osteom ve CHRPE) ailesel polipozis sendromları açısından genetik taramasını önermektedir (11). İndeks vaka dışındaki diğer aile bireylerinin taranması ve genetik yönden değerlendirilmesi ile kanser gelişimi ve kanser ilişkili mortalitenin önüne geçmek mümkündür (7-12). Kliniğimizde yapılan kolonoskopik işlemler ve hasta takiplerinde ailesel polipozis sendromuna bağlı gelişen KRK vakaları sık görölmemektedir. Türkiye’de FAP sıklığı ve analizi ile ilgili yeterince veri mevcut değildir.

Çalışmada, yapılan kolonoskopik işlemlerde 10 üzeri polip saptanarak polipozis koli tanısı alan ve aile öyküsü de olan hastalar ve FAP nedeniyle operasyon geçirmiş olan hastalarda, FAP patogeneğinde etkili olan APC geninin attenuated FAP gelişiminden sorumlu eksonlarındaki mutasyonların araştırması hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem

Çalışmaya Eylül 2017 ve Haziran 2018 tarihleri arasında Gastroenteroloji Endoskopi ünitesinde yapılan kolonoskopi bulgularına göre 10 üzeri polip saptanan ve ailesinde kolorektal karsinom öyküsü olan ve attenuated polipozis koli tanısı alanlar veya FAP nedeniyle subtotal kolektomi yapılan hastalardan kalan kolon dokusunun taraması için başvuran 30 birey dahil edildi. Çalışmaya katılan bireylerden 1 tüp (2 mL, EDTA'lı Hemogram tüpüne) kan örneği alındı ve çalışma yapılcaya kadar -20°C’de muhafaza edildi.

Tablo 1. Sekans reaksiyonlarında kullanılan primerler

Ekson	Primer Dizisi (5'→3')	Amplikon Boyu
1	F 5'-AACCTTATAGGTCCAAGGGTAG-3'	234 bç
	R 5'-ACCTCAAGTTTACAAGAGGGAA-3'	
2	F 5'-AAATACAGAATCATGTCTTGAAGT-3'	212 bç
	R 5'-ACACCTAAAGATGACAATTTGAG-3'	
3	F 5'-GACCCAAGTGGACTTTTCAGG-3'	423 bç
	R 5'-ACAATAAACTGGAGTACACAAGG-3'	
4	F 5'-GAGAAGTTTGCAATAACCACTGATG-3'	309 bç
	R 5'-TTATCCTGAATTTAATGGATTACCT-3'	
5	F 5'-AACCTCACTCTAACTGGACCAA-3'	497 bç
	R 5'-AACAGAGCTGTAATTCATTTTATTCC-3'	
9	F 5'-AGTCGTAATTTTGTTCCTAACTC-3'	447 bç
	R 5'-TTTGAAACATGCACTACGAT-3'	
15A	F 5'-CTTCTCCCACTAGGTCCAG-3'	577 bç
	R 5'-ACAGTCCTCAATTCTCACCCA-3'	
15B	F 5'-TTTATCAAATGGCACCTGCT-3'	577 bç
	R 5'-TGTCACAAGGTAAGACCCAG-3'	

DNA Eldesi: Alınan kan örneklerinden PureLink Genomik DNA Kit ile DNA yıkama, DNA binding ve DNA elüsyonu yöntemleri kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı. İzolasyon sürecinde üreticinin tavsiye ettiği prosedürler uygulandı. İzole edilen DNA'nın saflığı, kalitesi ve konsantrasyonu NanoDrop UV spektrometre ile 230 nm, 260 nm ve 280 nm dalga boylarında ölçüm yapılarak belirlendi.

Sekans PCR Reaksiyonları: Bu çalışmada APC geninin AFP ile ilgili mutasyon ve polimorfizimleri en çok bulundurduğu belirlenen 1, 2, 3, 4, 5, 9. eksonları ve 15. eksonun 3' son kısmında 1000 baz çiftliklik kısmı sekanslandı. 1. ekson 153 bp, 2. ekson 85 bp, 3. ekson 202 bp, 4. ekson 109 bp, 5. ekson 114 bp, 9. ekson 379 bp ve 15. ekson 1000 bp'lik 3' son kısmı Sanger dideoksi zincir sonlanması tekniği ile sekanslandı. Bu eksonlar, uygun primerler ile amplifiye edilerek agaroz jel elektroforez tekniği uygulandıktan sonra UV ışık altında görüntülenerek doğrulandı. PCR reaksiyonu sonrası uygun amplikonların sekansları yapıldı. Sekans PCR'ında her bir eksonun amplifikasyonunda kullanılan primer çiftleri Tablo 1'de verilmiştir.

Ekson 1, Ekson 4, Ekson 5, Ekson 15A ve Ekson 15B için kullanılan PCR şartları aşağıdaki gibi optimize edilmiştir. PCR reaksiyonu, son hacim 25 µL olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. 2.5 µL 10X Taq DNA Polimeraz tamponu, 0.5 µL dNTP karışımı, 0.5 µL 10 pmol/ µL ters ve düz primerler, 0.125 µL Dream Taq DNA polimeraz, 18 µL deiyonize su ve 3 µL kalıp DNA ile PCR reaksiyonu hazırlanmıştır. Daha sonra Thermal cyclerde şu program ile amplifikasyon yapılmıştır. 94°C de 5 dk enzim aktivasyonu yapıp, 35 döngü olarak 94°C 30 sn, 55 °C 30 sn ve 72 °C 40 sn uygulanmıştır. Son olarak 72 °C 5 dak inkübe edilmiştir.

Ekson 2, Ekson 3, Ekson 9 için TouchDown PCR uygulanmıştır. PCR şartları aşağıdaki gibi optimize

edilmiştir. PCR reaksiyonu 25 µL son hacimde gerçekleştirilmiştir. 2.5 µL 10X Taq DNA Polimeraz tamponu, 0.5 µL dNTP karışımı, 0.5 µL 10 pmol/ µL ters ve düz primerler, 0.25 µL Dream Taq DNA polimeraz, 18 µL deiyonize su ve 3 µL kalıp DNA ile PCR reaksiyonu hazırlanmıştır. Daha sonra PCR Programı (TouchDown) şu şekilde yapılmıştır. 94 °C 2 dk, 3 döngü, 94 °C 30 sn, 60 °C 40 sn, 72 °C 30 sn, 3 döngü, 94 °C 30 sn, 58 °C 40 sn, 72 °C 30 sn, 25 döngü, 94 °C 30 sn, 55 °C 40 sn, 72 °C 30 sn olarak uygulanmıştır.

PCR Pürüfikasyonu: PCR ile istenilen bölgelerin amplifikasyonu yapıldıktan sonra elde edilen PCR ürünleri sekan öncesi pürüfiye edilmiştir. Pürüfikasyon işlemi ExoSAP-it PCR Product Clean up kit (Thermo Fisher) ile üreticinin talimatları doğrultusunda yapılmıştır. Pürüfikasyon işlemi sonrasında saflaştırılmış PCR ürünleri Applied Biosystem ABI 3130 Sekan cihazında sekanslanmıştır. Sekans sonuçları Thermo Fisher Variant Analysis Software ile analiz edilmiştir. Referans dizi olarak APC-201 ENST00000257430.8 kullanılmıştır.

Bulgular

Çalışmaya 21'i (%70) erkek ve 9'u (%30) kadın toplam 30 hasta alındı. Hastaların yaş ortalaması 43.8±13.0 yıldır. (24-78). Hastaların 12'si (%40) Bingöl ili Genç ilçesi, 6'sı (%20) Bingöl ili Solhan ilçesi, 3'ü (%10) Elazığ ili Palu ilçesi, 2'si (%6) Bingöl ili merkez, 2'si (%6) Elazığ ili merkez, 2'si (%6) Tunceli ili, 1'i (%3) Van ili Erciş ilçesi ve 1 tanesi (%3) Bingöl ili Genç ilçesi kökenliydi. Çalışmaya katılan hastaların ailelerinde en erken polip görülme yaşı 20, en erken KRK gelişim yaşı 40 olarak bulundu. Çalışmaya katılanların 18'inde (%60) ailede KRK öyküsü mevcuttu. Polip yaygınlığı açısından değerlendirildiğinde, hastaların 17'sinde (%57) kolonda

10 ile 100 arası polip, 13'ünde (%43) 100'ün üzerinde polip olduğu görüldü.

APC gen mutasyonu çalışılan olguların hiçbirisinde 1,2,3,4,5,9. eksonları ile 15. eksonun 3' son kısmında mutasyon saptanmadı.

Tartışma

Bu çalışmada, kolonoskopisinde 10 üzeri polip saptanan ve ailesinde KRK öyküsü olması nedeniyle FAP tanısı alan hastalar ile FAP nedeniyle subtotal kolektomi yapılan hastalarda attenuated FAP açısından APC geninin 1,2,3,4,5,9. eksonları ve 15. eksonun 3' son kısmında 1000 bp'lik kısmı PCR reaksiyonu ile değerlendirildi ve hastaların hiçbirisinde bahsi geçen eksonlarda mutasyon saptanmadı. Bulgularımız, attenuated FAP hastalarımızda polip gelişiminden sorumlu olabilecek diğer genler olan MUTYH veya DNA polimeraz genlerindeki mutasyonların mevcut klinik duruma yol açtığını düşündürmektedir (13,14).

Olgular değerlendirildiğinde birbirine komşu iki yerleşim yeri olan Bingöl ili Genç ilçesi ile Elazığ ili Palu ilçesi ve Bingöl ili Solhan ilçesinde kümelenmeler olduğu görülmektedir. Bu durum, nispeten kapalı olan toplumlarda, komşu yerleşim merkezlerinden yapılan evlilikler ile akraba evliliklerinin sık görülmesi sonucu genetik kökenli hastalıklara daha sık rastlanması nedeniyle olabilir. Ayrıca, çoğunluğu 10 ile 100 arası polip saptanan bu hasta grubunda ortalama tanı yaşı 43 olup 24 ile 78 yaş aralığında görüldüğü saptanmıştır. Erken tanı alan olguların, APC geninde attenuated FAP gelişiminde sorumlu mutasyonlardan ziyade, klasik FAP oluşumundan sorumlu mutasyonlardan kaynaklanabileceği veya daha öncede bahsedilen MUTYH veya DNA polimeraz genlerindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkmış olabileceği düşünülmüştür (15). Çalışmamızda tüm APC geninin taranamaması önemli bir kısıtlılıktır.

Attenuated FAP, ailesel polipozis sendromlarının farklı bir fenotipik versiyonudur. Yapılan çalışmalarda bu farklı fenotipin moleküler mekanizması anlaşılma çalışılmaktadır. Bu tür olgularda altta yatan genetik mekanizmanın APC geninde bulunan polimorfizm veya mutasyonlardan kaynaklandığı düşünülse de son yapılan çalışmalarda APC geninde bir varyasyon taşımayan ancak MUTYH geninde tespit edilen yeni varyasyonların bu fenotipin ortaya çıkmasında rol oynadığı belirlenmiştir.

Rouleau ve ark. (16) yayınladıkları bir olgu sunumunda, 45 yaşında bir hastada yapılan kolonoskopi sonrasında kolonda 25 polip tespit

etmişlerdir. Bu hastaya AFAP teşhisi konmuş ve moleküler analizler yapılmıştır. İlk etapta APC geninde sekans analizi yapılmış ancak bir varyasyon tespit edilmemiştir. Daha sonra MUTYH geni kantitatif PCR high resolution melting ile analiz edilmiş ve 13. Eksonda bir germline mutasyonun varlığı saptanmıştır. (ekson 13, c.1145G>A (p.Gly382Asp)).

Morak ve ark. (17) yaptıkları çalışmada, APC mutasyonu negatif olan ve klasik, attenuated ve atipik FAP teşhisi alan 215 bireyde, MUTYH gen mutasyonlarını incelemişlerdir. Çalışma sonucunda MUTYH genindeki biallelik mutasyon insidansı %15, monoallelik mutasyon insidansını %3.7 olarak belirlemişlerdir. Bu çalışmada 6 yeni biallelik MUTYH mutasyonu ve 2 yeni monoallelik MUTYH mutasyonu tespit etmişlerdir. 33 adet MUTYH-ilişkili polipozis koli olgusundan (MAP), %57'sinin attenuated FAP, %10'unun klasik FAP ve %18'ini ise atipik FAP olduğunu belirtmişlerdir. Sonuç olarak, MUTYH genindeki mutasyonların hastalığın ortaya çıkmasında diğer genlerle sinerjistik bir etki gösterdiği hipotezini ortaya atmışlardır.

Bir diğer çalışmada Felipe ve ark. (18) klinik olarak iyi karakterize edilmiş 107 adet FAP benzeri fenotip gösteren hastayı incelemişlerdir. Bu hastalarda APC ve MUTYH mutasyon taraması yapılmıştır. Sonuç olarak, FAP hastalarında APC mutasyon oranı %81, MUTYH mutasyon oranı ise %7 olarak tespit edilmiştir. Attenuated FAP hastalarında ise APC mutasyon oranı %30, MUTYH mutasyon görülme oranı ise %40 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre attenuated FAP hastalarında APC geninden ziyade MUTYH gen mutasyonları daha sık görülmektedir.

Yapılan bu çalışmada kolonoskopi verilerine göre attenuated FAP teşhisi almış hastalarda ilk etapta APC gen mutasyonlarını değerlendirdik. Yaptığımız bu çalışmada en önemli kısıtlayıcı etken tüm APC eksonlarının sekansının yapılamamış olmasıdır. Mutasyon görülme sıklığı en yüksek olan eksonlar analiz edilmiştir.

Sonuç olarak, attenuated FAP düşünülen hastalarımızda attenuated FAP gelişiminden sorumlu APC mutasyonuna rastlanmamıştır. Literatürden de görüleceği üzere çalıştığımız AFAP hasta grubunda APC mutasyonlarından ziyade bu fenotipin ortaya çıkmasında MUTYH genindeki mutasyonların etkili olması daha muhtemel görülmektedir. Bundan sonraki süreçte bu hasta grubunda MUTYH, POLE ve POLD1 genlerinin mutasyonlar açısından değerlendirilmesi düşünülmektedir.

Kaynaklar

1. Brody H. Colorectal cancer. Nature 2015; Vol. 521. Issue 7551. Supplement Nature Outlook.
2. Rustgi AK. The genetics of hereditary colon cancer. Genes Dev 2007; 21: 2525-2538.
3. Huiying MA., Lodewijk AAB., Offerhaus GJA., Giardiello FM., De leng WJW., and Montgomery EA. Pathology and genetics of hereditary colorectal cancer. Pathology 2018; 50: 49-59.
4. Johns LE, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. Am J Gastroenterol 2001; 96:2992-3003.

5. Bisgaard ML, Fenger K, Bulow S, Niebuhr E, Mohr J: Familial adenomatous polyposis (FAP): frequency, penetrance, and mutation rate. *Hum Mutat* 1994; 3:121-125.
6. Scheuner MT, McNeel TS, Freedman AN: Population prevalence of familial cancer and common hereditary cancer syndromes. The 2005 California Health Interview Survey. *Genet Med* 2010; 12(11):726-735.
7. Lucci-Cordisco E, Risio M, Venesio T, Genuardi M: The growing complexity of the intestinal polyposis syndromes. *Am J Med Genet A* 2013; 161A(11):2777-2787.
8. Burt RW, Leppert MF, Slattery ML, Samowitz WS, Spirio LN, Kerber RA. *et al*: Genetic testing and phenotype in a large kindred with attenuated familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 2004; 127(2):444-451.
9. Nieuwenhuis MH, Vasen HF: 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):153-161.
10. Ibrahim A, Barnes DR, Dunlop J, Barrowdale D, Antoniou AC, Berg JN: Attenuated familial adenomatous polyposis manifests as autosomal dominant late-onset colorectal cancer. *Eur J Hum Genet* 2014; 22(11):1330-1333.
11. Syngal S, Brand RE, Church JM, Giardiello FM, Hampel HL, Burt RW, American College of G: ACG clinical guideline: Genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes. *Am J Gastroenterol* 2015; 110(2):223-262.
12. Jaspersion KW: Genetic testing by cancer site: colon (polyposis syndromes). *Cancer J* 2012; 18(4):328-333.
13. Palles, C., Cazier, JB., Howarth, KM., Domingo, E., Angela M. Jones, AM. *et al*. Germline mutations in the proof-reading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas. *Nat Genet* 2013; 45(2): 136–144.
14. Torrezan GT, da Silva FC, Santos EM, Krepschi AC, Achatz MI, Aguiar S Jr. *et al*. Mutational spectrum of the APC and MUTYH genes and genotype-phenotype correlations in Brazilian FAP, AFAP, and MAP patients. *Orphanet J Rare Dis*. 2013; 5: 8:54.
15. de Leon MP, Urso ED, Pucciarelli S, Agostini M, Nitti D, Roncucci L. *et al*. Clinical and molecular features of attenuated adenomatous polyposis in northern Italy. *Tech Coloproctol*. 2013; Feb; 17(1):79-87.
16. Rouleau E, Zattara H, Lefol C, Noguchi T, Briaux A, Buecher B. *et al*. First large rearrangement in the MUTYH gene and attenuated familial adenomatous polyposis syndrome. *Clin Genet* 2011; 80: 301–303.
17. Morak M, Laner A, Bacher U, Keiling C, Holinski-Feder E: MUTYH-associated polyposis – variability of the clinical phenotype in patients with biallelic and monoallelic MUTYH mutations and report on novel mutations. *Clin Genet* 2010; 78: 353–363.
18. Felipe B, Baltazar C, Albuquerque C, Fragoso S, Lage P, Vitoriano I. *et al*. APC or MUTYH mutations account for the majority of clinically well-characterized families with FAP and AFAP phenotype and patients with more than 30 adenomas. *Clin Genet* 2009. 76: 242–255.
19. Brosens LAA, van Hattem WA, Jansen M, de Leng WJ, Giardiello FM. *et al*. Gastrointestinal Polyposis Syndromes. *Current Molecular Medicine*. 2007. 7: 29-46.