

Genetika tumorigenézy nádorov kolorekta (možnosti testovania a screeningovej predikcie dedičnej formy ochorenia – Lynchovho syndrómu)

Genetics of Colorectal Tumorigenesis (Possibilities of Testing and Screening Prediction of Hereditary Form of Colorectal Cancer – Lynch Syndrome)

Mlkvá I.

Oddelenie klinickej genetiky, Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UN Bratislava, Slovenská republika

Súhrn

Kolorektálny karcinóm je v súčasnosti jedným z najčastejších nádorových ochorení vyskytujúcich sa v rozvinutých krajinách. Pochopenie molekulárnych princípov jeho vzniku patrí opäťovne v poslednom čase medzi priority v oblasti onkogenetického výskumu. Kolorektálny karcinóm je zároveň aj vhodným modelom pre štúdium kancerogenézy z dôvodu dobrej dostupnosti prekancerózných lézií a tiež z dôvodu existencie viacerých jasne popísaných hereditárnych foriem ako familiárna adenomatózna polypóza a Lynchov syndróm. Klasický model kolorektálnej tumorigenézy, popísaný Fearonom a Vogelsteinom, predstavuje tradičnú cestu vývoja kolorektálneho karcinómu zo sekvencie adenóm-karcinóm. Tento model bol postavený na dôkladnej analýze mutácií v jednotlivých morfológických štádiách kancerogenézy, ktorých progresívna akumulácia vedie k malígnej transformácii kolonického epitelu. V posledných rokoch bol však prijatý aj alternatívny model vývoja kolorektálneho karcinómu zo seratovaných prekursorov. Táto cesta vývoja, nazývaná aj seratovaná cesta, priniesla nový pohľad na kolorektálnu tumorigenézu. V súčasnosti sa predpokladajú minimálne tri molekulárne cesty kolorektálnej tumorigenézy: 1. cesta chromozómovej instability reprezentovaná dedičnou formou familiárnej adenomatóznej polypózy; 2. mutátorová cesta s mismach repair fenotypom reprezentovaná dedičnou formou Lynchovho syndrómu, ale aj častou sporadických kolorektálnych karcinomov; a 3. hypermetylačná seratovaná cesta charakterizovaná vysokou frekvenciou hypermetylácie CpG ostrovčekov promótorových oblastí určitých génov (CIMP+).

Kľúčové slová

kolorektálny karcinóm – kolorektálna tumorigenéza – Lynchov syndróm – mikrosatelitová instabilita – hypermetylačný fenotyp

Autorka deklaruje, že v súvislosti s predmetom studie nemá žádné komerční zájmy.

The author declares she has no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



MUDr. Iveta Mlkvá
Oddelenie klinickej genetiky
Ústav lekárskej biológie, genetiky
a klinickej genetiky
LF UK a UN Bratislava
Americké nám. 3
811 08 Bratislava
Slovenská republika
e-mail: iveta.mlkva@gmail.com

Obdržané/Submitted: 14. 7. 2016

Prijaté/Accepted: 8. 9. 2016

<http://dx.doi.org/10.14735/amko2016555>

Summary

Colorectal cancer is currently one of the most frequent cancers in developed countries. Understanding the molecular principles of its pathogenesis has recently come into focus of many oncogenetic studies. Colorectal cancer also represents an ideal model for the study of molecular basis of cancerogenesis owing to the wide availability of its precursor lesions and the existence of several notorious genetic predispositions such as familial adenomatous polyposis and Lynch syndrome. The classical model of colorectal tumorigenesis, described by Fearon and Vogelstein, suggested the idea of a conventional progression from adenoma to carcinoma. It was based on a careful analysis of mutations occurring within particular stages of carcinogenesis with regards to their stepwise accumulations leading to neoplastic transformation of the colonic epithelium. Recently, new evidence has pointed to an alternative model of colorectal tumorigenesis introducing the concept of serrated precursors. This alternative pathway, known as the serrated pathway, has provided a new perspective on colorectal cancer development. Nowadays, three molecular pathways leading to colorectal tumorigenesis are recognized: 1. the chromosomal instability pathway typified by familial adenomatous polyposis; 2. the mutator pathway characterized by inactivation of DNA mismatch repair genes such as in Lynch syndrome or a number of sporadic colorectal cancers; 3. the hypermethylation serrated neoplasia pathway characterized by excessive methylation of some CpG islands in the promoter region of certain genes (positive CpG islands methylator phenotype) (CIMP+).

Key words

colorectal cancer – colorectal tumorigenesis – Lynch syndrome – microsatellite instability – hypermethylation phenotype

Úvod

Kolorektálny karcinóm (colorectal carcinoma – CRC) je jedným z najčastejšie sa vyskytujúcich onkologických ochorení so stále vysokou mortalitou. Incidencia tohto ochorenia má vzostupný charakter predovšetkým v rozvinutých krajinách, pričom krajiny strednej Európy sa už tradične držia na špici [1]. Mortalita na CRC sa vďaka včasnej diagnostike a zlepšujúcej sa liečbe znižuje, stále však dosahuje 8 % zo všetkých úmrtí na nádorové ochorenia. V oblasti rektosigmy sa vyskytuje 43 % diagnostikovaných CRC, zvyšok (57 %) v oblasti vyšších častí hrubého čreva [2]. Známe rizikové faktory pre vznik CRC sú jednak environmentálne a jednak genetické. Z pohľadu ich vzájomného zastúpenia rozlišujeme tri formy výskytu nádorov kolorekta:

- *Sporadická forma*, pri ktorej nezaznamenávame familiárny výskyt, predstavuje 70 % všetkých CRC. Najčastejšie sa vyskytuje vo veku nad 50 rokov a predovšetkým stravovacie zvyklosti a environmentálne faktory zohrávajú úlohu v etiológii ochorenia.
- *Hereditárna forma*, predstavuje 5–7 % CRC s jednoznačnou genetickou predispozíciou ako etiologickým faktorom. Táto skupina sa ďalej rozlišuje na formy polypózne a nepolypózne podľa toho, či polypy kolorekta sú alebo nie sú základným prejavom ochorenia. U väčšiny hereditárnych foriem (hereditárnych syndrémov) dnes poznáme kauzálne mutácie zodpovedných génov a vieme ich rutínne testovať.

• *Familiárna forma*, je treťou a zatiaľ najmenej objasnenou skupinou CRC. Predstavuje asi 25 % všetkých prípadov. V rodinách pacientov s týmto typom CRC zaznamenávame familiárny výskyt, ktorý však nezodpovedá obrazu ani jedného z hereditárnych syndrémov. Členovia takýchto rodín majú zvýšené riziko výskytu CRC, ktoré však nedosahuje riziko pri hereditárnej forme. V multifaktoriálnej etiológii ochorenia sa uvažuje o účasti viacerých zatiaľ menej prebádaných génov menšieho účinku, prípadne menej závažných variantov známych génov.

Vysoká úroveň poznatkov o molekulárnej podstate vzniku CRC sa stala základom aj pre pochopenie tumorigenézy iných solídnych nádorov. Špecifická germinatívna mutácia je zodpovedná za vznik hereditárnej formy CRC, kým akumulácia za sebou idúcich somatických mutácií je predpokladaným podkladom väčšiny sporadických prípadov ochorenia.

Molekulárna patogenéza CRC

CRC je výsledkom progresívnej akumulácie genetických a epigenetických alterácií, ktoré vedú k transformácii kolonického epitelu na adenokarcinóm. Špecifické genetické zmeny vedúce k tomuto procesu môžu byť jednak vrodené (germinatívne mutácie) alebo častejšie získané (somatické mutácie). Takéto mutácie môžu prinášať selektívne rastové zvýhodnenie určitých buniek, ktoré

vedie k ich preferenčnej proliferácii. Hovoríme o klonálnej evolúcii nádorových buniek. Monoklonálna teória kolorektálnej kancerogenézy, prvýkrát popísaná v roku 1990 Fearonom a Vogelsteinom, je dnes považovaná za základný predpoklad vývoja aj iných solídnych nádorov. Podľa tohto modelu rastové zvýhodnenie, ktoré určitá bunka získava, umožňuje jej klonálnu expanziu voči ostatným susediacim bunkám. Z tejto monoklonálnej populácie buniek musí byť určitá bunka zvýhodnená ďalšou náhodnou mutáciou vedúcou k ďalšej vlne klonálnej expanzie. Takéto progresívne nahromadenie kritického počtu získaných mutácií vedie potom v konečnom dôsledku k bunkovej dezorganizácii a event. aj schopnosti invazívneho rastu a metastázovania. Nádorové tkanivo má teda monoklonálne zloženie buniek, na rozdiel od normálneho kolonického epitelu, ktorý má vždy polyklonálny pôvod.

Kolorektálna tumorigenéza je teda vždy viacstupňovým procesom a má svoje morfológické a aj molekulárne úrovne [3].

Sekvencia adenóm-karcinóm (klasická cesta)

Sliznica kolorekta vďaka svojej dobrej dostupnosti predstavuje ideálne tkanivo na výskum nádorovej patogenézy. Už dlhý čas je známe, že CRC sa u človeka vyvíja z prekancerózneho prekursora, ktorým je vo väčšine prípadov adenóm (adenomatózny polyp). Prolife-

rácia a diferenciácia kolonocytov z kmeňových buniek nastáva výlučne v glandulárnych kryptách kolonického epitelu a je ohraničená na dolnú tretinu krypt. Pri jej dysregulácii proliferatívna aktivita migruje smerom nahor, čo vedie spočiatku k tvorbe mikroadenómov a neskôr aj k tvorbe makroskopicky evidentných adenómov. Takto vzniknuté aberantné bunkové línie strácajú schopnosť podriaďiť sa normálnemu procesu dozrievania a apoptózy. To napokon vedie k fokálnemu rastu dysplastického mukózy v ložiskách aberantných krypt a následnému vývoju invazívneho adenokarcinómu. Celý tento proces prechodu normálnej mukózy na adenóm a neskôr karcinóm je postupný a trvá väčšinou približne 5–10 rokov [4].

Sekvenca hyperplasticky seratovaný polyp-karcinóm (alternatívna cesta)

Predpoklad, že takmer všetky CRC sa vyvíjajú z benígnych adenomatóznych prekursorov, bol platný dlhé roky. Avšak nedávne dôkazy čoraz viac podporujú existenciu alternatívnej cesty kolorektálnej kancerogenézy cestou seratovaných polypov. Seratované lézie predstavujú heterogénnu skupinu polypov širokého morfológického spektra od hyperplastických polypov, cez sesilné seratované polypy/adenómy až po tradičné seratované adenómy a zmiešané polypy. Typickým histologickým znakom všetkých z nich je zubkovitá štruktúra hypermaturovaného epitelu kolonických krypt. Dlho sa verilo, že sú to benígne lézie bez výraznejšieho malígneho potenciálu. Avšak koncom 90. rokov 20. storočia bolo na molekulárnej úrovni preukázané, že niektoré z týchto lézií môžu viesť alternatívnou cestou k vývoju CRC, ktorá existuje popri tradičnej ceste adenóm-karcinóm. Tento mechanizmus malígne transformácie bol popísaný u pacienta so seratovanou polypózou (mnohopočetným výskytom seratovaných polypov) a stal sa známy ako alternatívna seratovaná cesta kolorektálnej kancerogenézy.

Molekulárne cesty kolorektálnej kancerogenézy

V súčasnosti sa predpokladá, že existujú prinajmenšom tri molekulárne cesty

vedúce, každá iným mechanizmom, k vzniku CRC: 1. supresorová cesta alebo cesta chromozómovej instability (CIN), 2. mutátorová cesta alebo cesta mikrosatelitovej instability (MSI) a 3. epigenetická hypermetylačná cesta (CIMP+).

1. Supresorová cesta – chromozómová instabilita

Touto cestou sa vyvíja približne 60–85 % CRC z prekursora adenomatózneho polypu. Trvanie kancerogenézy sa odhaduje na 7–10 rokov. Podľa akceptovaného modelu kolorektálnej kancerogenézy postaveného Fearonom a Vogelsteinom korelujú za sebou idúce špecifické genetické zmeny s konkrétnym morfológickým nálezom [3].

Tento lineárny model vývoja sa z pohľadu nových poznatkov stal síce viac komplexný, ale je stále uznávaný. Každý krok morfológickej zmeny od normálnej sliznice smerom k invazívnemu karcinómu zahŕňa špecifické a dobre definované genetické alterácie. Tieto alterácie sa týkajú jednak onkogénov a jednak tumor supresorových génov. Nádorové tkanivo je pri tejto molekulárnej ceste charakteristické prítomnosťou veľkého počtu chromozómových abnormalít (CIN) vrátane delécií, inercií a straty heterozygoty. Podľa charakteru úvodnej genetickej zmeny môžu byť tieto tumory buď hereditárne, ak sa jedná o germinatívnu mutáciu, typickým reprezentantom je familiárna adenomatózna polypóza (FAP), alebo sporadické pri nahromadení somatických mutácií.

Onkogény

Onkogény sú homológy normálnych génov bunky, ktoré sa podieľajú na kontrole jej rastu a na regulácii bunkového cyklu. Mutácie onkogénov vedú k ich aktivácii, výsledkom čoho je nekontrolovaná bunková proliferácia. Medzi onkogény podieľajúce sa na kancerogenéze sporadických CRC patria onkogény *RAS*, *SRC*, *C-MYC* a *C-ERBB-2*. Najdôležitejší z nich je *K-RAS*, mutácia ktorého je prítomná asi u 50 % sporadických CRC a 50 % adenómov väčších ako 1 cm.

K-RAS kóduje rodinu malých proteínov (homológov G proteínov), ktoré sa podieľajú na prenose extracelulárnych rastových signálov smerom do jadra

bunky. Táto genetická alterácia je zaznamenaná počas neskoršej progresie adenómov a zohráva úlohu aj v procese nádorovej invázie a metastázovania. Klinický význam detekcií *RAS* mutácií u CRC má svoje opodstatnenie pri stanovení účinnosti cielenej biologickej liečby a *RAS* je aj jedným z perspektívnych DNA markerov diagnostiky včasného CRC zo stolice pacienta [5].

Tumor supresorové gény

Na rozdiel od onkogénov tumor supresorové gény majú za normálnych podmienok inhibičnú funkciu v regulácii bunkového cyklu. Pri poruche ich funkcie dochádza k narušeniu ich supresorovej a apoptotickej činnosti, čím nastáva strata kontroly replikácie a proliferácie bunky. Na bunkovej úrovni tumor supresorové gény fungujú ako recesívne gény, tzn. strata funkcie proteínu nastáva len pri vyradení oboch kópií génu bodovou mutáciou, deléciou alebo prestavbou. Tento mechanizmus dvojkrokového vyradenia funkcie supresorových génov bol prvýkrát popísaný Knudsonom u *RB1* génu spôsobujúceho detský retinoblastóm. Knudsonova teória objasnila, prečo sa ten istý nádor môže vyskytovať ako vo forme hereditárnej (prvým zásahom je germinatívna mutácia zdedená alebo vzniknutá *de novo*) tak aj vo forme sporadickej (prvým zásahom je somatická mutácia v jedinej bunke), a vysvetlila aj klinické rozdiely medzi uvedenými formami. Prvým dôkazom účasti tumor supresorových génov v kancerogenéze CRC boli štúdie popisujúce stratu heterozygoty (LOH) dlhých alebo krátkych ramien špecifických chromozómov u veľkého počtu tumorov kolorekta. Neskôr boli na týchto lokusoch identifikované konkrétne gény, a to na lokuse 5q gén *APC*, na lokuse 17p gén *TP53* a na lokuse 18q gény *SMAD4*, *SMAD2* a *DCC*.

Pravdepodobne najkritickejšim génom účinkujúcim už v skorých štádiách kolorektálnej kancerogenézy je *APC* tumor supresorový gén. Somatické mutácie jeho oboch alel sú prítomné u 80 % sporadických CRC a ako samostatná germinatívna mutácia je zodpovedný za FAP, dominantne dedičný hereditárny syndróm vyznačujúci sa tvorbou

stoviek až tisícov kolorektálnych polypov. Strata druhej APC alely, zaznamenaná už u malých adenomatóznych polypov s dysplastickými ložiskami, poukazuje na veľmi včasný zásah v kolorektálnej kancerogenéze. Funkcia proteínového produktu APC génu nie je zatiaľ presne objasnená. Vie sa však, že CRC vykazujúce normálny stav APC génu majú mutácie β -katenínu, čo je proteín zainteresovaný na tej istej signalizačnej kaskáde ako APC proteín, označovanej ako Wnt signalizačná cesta. V súčasnosti sa uvažuje, že práve aktivácia Wnt cesty, ktorá zohráva ontogenetickú úlohu v embryonálnom vývoji a obnove črevného epitelu, môže byť spúšťačom kancerogenézy [6].

Ďalším z tumor supresorových génov, ktorého inaktiváciu nachádzame u 75 % CRC, je gén *TP53*. Ide o najčastejšie mutovaný gén zaznamenaný u ľudských nádorových ochorení. V kolorektálnej kancerogenéze je strata funkcie *TP53* génu relatívne neskorý zásah. Čím je ochorenie v pokročilejšom štádiu, tým je frekvencia zistených mutácií *TP53* vyššia. Supresorový gén *TP53* je nazývaný aj „strážcom genómu“, jeho proteínový produkt kontroluje funkciu najmenej 20 ďalších génov podieľajúcich sa na proliferácii, diferenciácii a procese apoptózy bunky. Germinatívna mutácia tohto génu spôsobuje Li-Fraumeni syndróm, závažnú dominantne dedičnú predispozíciu pre vznik rôznych onkologických ochorení, ktoré sa manifestujú už v nezvyčajne mladom veku. Niektoré štúdie poukazujú, že mutácie *p53* zistené u CRC znamenajú jeho celkovo horšiu prognózu [7].

Chromozóm 18q a supresorové gény *DCC*, *SMAD4* a *SMAD2* – strata expície týchto génov je častým javom hlavne v pokročilejších štádiách adenómov a znamená horšiu prognózu CRC. *SMAD4* gén kóduje proteín, ktorý je súčasťou TGF- β (transforming growth factor- β) signalizačnej cesty kontrolujúcej okrem iného aj rast a diferenciáciu buniek. Germinatívna mutácia *SMAD4* génu je asociovaná s juvenilným polypóznym syndrómom (JPS), hereditárnou predispozíciou k tvorbe mnohopočetných juvenilných polypov a zvýšeným rizikom vývoja CRC.

2. Mutátorová cesta – mikrosatelitová instabilita

Mutátorová cesta, nazývaná tiež MSI cesta, je ďalším molekulárnym mechanizmom vývoja invazívneho CRC z adenomatózneho polypu a pravdepodobne aj zo serotovaného adenómu. Týmto spôsobom sa vyvíja hereditárna forma CRC asociovaná s Lynchovým syndrómom a tiež asi 15 % sporadických CRC. Kľúčovým momentom pri tomto procese kancerogenézy je chybná funkcia DNA mismatch repair (MMR) enzýmu, ktorá je výsledkom vyradenia obidvoch alel jedného z mutátorových génov.

Mutátorové gény

Základnou funkciou mutátorových (MMR) génov je oprava porúch vznikajúcich pri replikácii DNA a tým zaistovanie integrity genetickej informácie bunky. Normálna MMR funkcia si vyžaduje koordinovanú súčinnosť viacerých rôznych génových produktov MMR génov. V súčasnosti je známych už minimálne sedem takýchto génov: *MSH2*, *MLH1*, *PMS1* a *PMS2*, *MSH6*, *MLH3* a *MSH3*. [8]. Funkcia nie všetkých z nich je však plne jasná. Germinatívna mutácia MMR génu je kauzálnou mutáciou zisťovanou u väčšiny rodín s Lynchovým syndrómom. U sporadických foriem CRC s chýbajúcou expresiou MMR génov však nenachádzame mutácie inkriminovaných génov. Namiesto toho vykazujú tieto nádory epigenetické zmeny, ktoré vedú ku génovému silencingu. Dôsledkom chybnej funkcie mutátorových génov je hromadenie mutácií v genóme bunky, biologickým markerom čoho je fenomén MSI. Mikrosatelity sú krátke repetitívne DNA sekvencie opakujúce sa v genóme bunky desiatky až stovkykrát, ktoré pri chybnej MMR funkcii vykazujú zmeny počtu oproti zdravému tkanivu. Ak najmenej 30 % mikrosatelitových lokusov vykazuje zmenu, tumor je hodnotený ako MSI-H, teda má vysoký stupeň MSI [9]. V praxi sa štandardne vyšetruje panel piatich mikrosatelitových lokusov, tumor sa považuje za MSI-H, ak aspoň dva z nich vykazujú instabilitu. V prípade, že MSI je zistená v menej ako dvoch sledovaných markeroch, tumor je označený ako MSI-L (tumor s nízkou MSI) alebo MSS (mikrosatelitovo stabilný) [10].

MSI-H a MSI-L fenotyp CRC

Na rozdiel od MSS CRC, MSI tumory majú svoje charakteristické klinicko-patologické znaky. Vyskytujú sa častejšie v proximálnych úsekoch hrubého čreva, bývajú slabo diferencované, mávajú mucinóznym charakter, medulárny rast a nachádzame u nich lymfocytárnu infiltráciu. Adenómy bývajú makroskopicky väčšie, plochšie a rýchlejšie progredujú do štádia karcinómu (2–3 roky). Napriek týmto zdanlivo nepriaznivým histologickým ukazovateľom ich prognóza je celkovo lepšia. Svedčí to o inom biologickom základe uvedených tumorov. Význam MSI-L fenotypu CRC nie je zatiaľ celkom jasný. Hoci sa tento fenotyp nespája jednoznačne s poruchou MMR funkcie, pravdepodobne ide o nie náhodný úkaz, ktorý má svoju biologickú podstatu. Uvažuje sa o epigenetickom ovplyvnení funkcie *MGMT* génu, zohrávajúceho úlohu pri alternatívnej serotovanej ceste kolorektálnej tumorigenézy [11].

Genetika Lynchovho syndrómu

Lynchov syndróm, nazývaný aj hereditárny nepolypózný kolorektálny karcinóm (hereditary non-polyposis colorectal cancer – HNPCC), je najčastejšie sa vyskytujúcou dedičnou príčinou vzniku nádoru hrubého čreva. Tvorí asi 2–3 % zo všetkých diagnostikovaných prípadov CRC. Ide o autozómovo dedičné ochorenie predisponujúce aj k vzniku iných druhov nádorov, hlavne karcinómu endometria. Genetickým podkladom vzniku Lynchovho syndrómu je germinatívna mutácia niektorého z MMR génov, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, alebo strata expície *MSH2* v dôsledku delécie *EPCAM* génu. K inaktivácii génu vedie vyradenie aj druhej alely buď somatickou mutáciou, stratou heterozygoty alebo epigenetickým silencingom hypermetyláciou promotora génu. Medzi identifikovanými mutáciami sú u pacientov s Lynchovým syndrómom najčastejšie zastúpené mutácie *MLH1* (32 %) a *MSH2* (39 %), menej často mutácie *MSH6* (15 %) a *PMS2* (14 %) [12]. Základnou funkciou DNA MMR systému je oprava drobných porúch vznikajúcich pri chybnom párovaní báz pri replikácii DNA. Aby mohol tento systém účinne fun-

govať, vyžaduje si koordinovanú činnosť rôznych MMR génových produktov. Známe sú viaceré heterodimérové proteínové komplexy DNA MMR systému: MutS- α (MSH2/MSH6), MutS- β (MSH2/MSH3), MutL- α (MLH1/PMS2), MutL- β (MLH1/PMS1) a MutL- γ (MLH1/MLH3). Porucha ich funkcie vedie k instabilite celého genómu a hromadeniu mutácií, a to aj v génoch priamo zainteresovaných na procese kancerogenézy.

Nález MSI je síce typický pre Lynchov syndróm, avšak nie je špecifický. Uvádza sa, že 15 % sporadických CRC vykazuje tiež vysoký stupeň MSI. Tieto nádory sa vyvíjajú odchylnou epigenetickou cestou hypermetylácie promotora *MLH1* génu, nazývanou aj CIMP (CpG island methylator phenotype) a sú sprevádzané mutáciami *BRAF* génu. Nádory tohto typu vyvíjajú rovnaký MSI fenotyp, nespájajú sa však s Lynchovým syndrómom a bývajú označované aj ako Lynch-like CRC.

Epigenetický silencing *MSH2* génu môže spôsobovať aj veľká delícia 3' konca susediaceho *EPCAM* génu. Nosiči takejto germinatívnej mutácie majú dedičnú formu hypermetylácie promotora *MSH2* génu s rôznym fenotypovým dopadom. Ide o samostatnú skupinu Lynchovho syndrómu s rizikom hlavne pre vznik kolorektálnych nádorov [13].

Lynchov syndróm býva často nerozpoznaný, hlavne jeho viac atenuované formy spájajúce sa s mutáciami *MSH6* a *PMS2* génov. Na identifikáciu rizikových jedincov sú s rôznou senzitivitou a špecifitou využívané známe Amsterdamské kritériá, Bethesda kritériá a rôzne predikčné modely zvažujúce jednak familiárny výskyt a jednak individuálne klinické a histologické znaky. Na rozdiel od selektívnych stratégií existujú aj názory presadzujúce potrebu zavedenia univerzálneho screeningu všetkých CRC na MSI.

Screening a možnosti reflexného testovania Lynchovho syndrómu

Keďže sekvenčná analýza germinatívnych mutácií MMR génov je pracná a finančne náročná, vyšetrenie sa optimálne začína screeningom nádorového tkaniva.

Mikrosatelitová instabilita

MSI je hlavným molekulárnym markerom Lynchovho syndrómu a jej vyšetrenie je prvým krokom testovania rizikových jedincov. Prítomnosť MSI-H v tumorovom tkanive svedčí o chybnnej funkcii MMR génu. Screening MSI je vysoko senzitívny pre Lynchov syndróm. Viac ako 90 % CRC vykazuje u Lynchovho syndrómu vysokú hladinu MSI. V súčasnosti v laboratóriách štandardne využívané panely zachytávajúce viac dinukleotidové ako mononukleotidové repetície však nemusia v plnej miere zachytiť MSI u poruchy funkcie *MSH6* a *PMS2* génov, ktoré môžu prejavovať aj nižší stupeň MSI [14,15]. MSI-H status však nie je ako samostatný screeningový ukazovateľ dostatočný na detekciu Lynchovho syndrómu. U sporadických CRC s MSI-H ide o hypermetyláciu promotora *MLH1* génu, ktorá vedie k strate *MLH1* funkcie a následne k MSI. Rozlíšenie sporadických a s Lynchovým syndrómom asociovaných MSI-H tumorov nám umožňuje jednak meranie stavu metylácie *MLH1* génu v nádorovom tkanive alebo jednoduchšou formou je genetická analýza *BRAF* onkogénu. Mutácia *BRAF* génu je veľmi zriedkavá u Lynchovho syndrómu, ale častá (40–87 %) u sporadickej formy. Jej identifikácia u CRC prakticky vylučuje Lynchov syndróm, jej neprítomnosť však nemá dostatočnú špecifitu na jeho potvrdenie. Zistenie prítomnosti hypermetylácie *MLH1* má obdobnú senzitivitu, špecifita je však o niečo vyššia.

Imunohistochemické vyšetrenie

Imunohistochemické vyšetrenie (IHC), realizované najčastejšie na patologickom oddelení, umožňuje detekovať stratu expresie niektorého z DNA reparačných proteínov v jadrách nádorových buniek. IHC génových produktov MMR génov môže byť využívaná v screeningovom protokole samostatne alebo spolu s vyšetrením MSI, ideálna je ich kombinácia vzhľadom na ich rozdielnú výpovednú hodnotu. Keďže MMR systém tvoria heterodiméry, strata expresie hlavného (obligátneho) proteínu (MLH1 alebo MLH2) je sprevádzaná sekundárnou degradáciou druhého proteínu v komplexe (*PMS2* alebo *MSH6*). IHC vyšetrenie pomocou protilátok proti

MMR proteínom umožňuje identifikáciu defektného proteínu, pričom výsledky IHC analýzy môžu byť využité v mutačnej analýze relevantného génu.

Strata IHC expresie MLH1 a/alebo aj *PMS2* poukazuje na tumor s MSI fenotypom. Na rozlíšenie, či ide o kauzálnu mutáciu *MLH1* alebo častejšiu sporadickú formu CRC, slúži vyšetrenie mutácie V600E *BRAF* génu alebo prítomnosti hypermetylácie *MLH1* promotora v nádorovom tkanive. V prípade negatívneho výsledku *BRAF* sa pokračuje v testovaní na zárodočnú mutáciu *MLH1*. Pri strate nukleárnej expresie *MSH2* a/alebo aj *MSH6* v nádorových bunkách je Lynchov syndróm vysoko pravdepodobný a odporúča sa pokračovať genetickým testovaním na zárodočné mutácie *MSH2* a ďalej na *MSH6*. Chýbajúca expresia *MSH2* proteínu môže byť spôsobená aj už spomínanou veľkou deléciou *EPCAM* génu. V týchto prípadoch (20–25 %) kauzálnu mutáciu *MSH2* nenachádzame, fenotypovým dopadom je však Lynchov syndróm. Pri izolovanej strate nukleárnej expresie *MSH6* sa testujú zárodočné mutácie génu *MSH6* a v ďalšom slede *MSH2* génu a pri izolovanej strate expresie *PMS2* sa testujú zárodočné mutácie *PMS2* a v ďalšom slede *MLH1* [14,15]. IHC vyšetrenie má práve u génov *MSH6* a *PMS2* svoj význam vzhľadom na možnosť, že MSI sa v screeningu u nich nemusí zachytiť. Screeningové vyšetrenie MSI a IHC je možné aj na adenomatóznych polypoch, pokiaľ nie je k dispozícii tkanivo zo zhubného nádoru. Treba však rátať s ich menšou výťažnosťou. Senzitivita vyšetrení sa zvyšuje u veľkých adenómov (> 1 cm) a adenómov s vysokým stupňom dysplázie.

Na definitívne potvrdenie diagnózy Lynchovho syndrómu je potrebná identifikácia kauzálnej mutácie MMR génu. Testovanie germinatívnych mutácií MMR génov je indikované v týchto prípadoch:

- pacienti s MSI-H nádorom po MSI/IHC screeningu,
- ak nie je možné screeningové testovanie nádorového tkaniva a je silné podozrenie na Lynchov syndróm (závažná rodinná a/alebo osobná anamnéza),
- prediktívne testovanie pokrvných príbuzných nositeľa známej mutácie MMR génu (schéma 1).

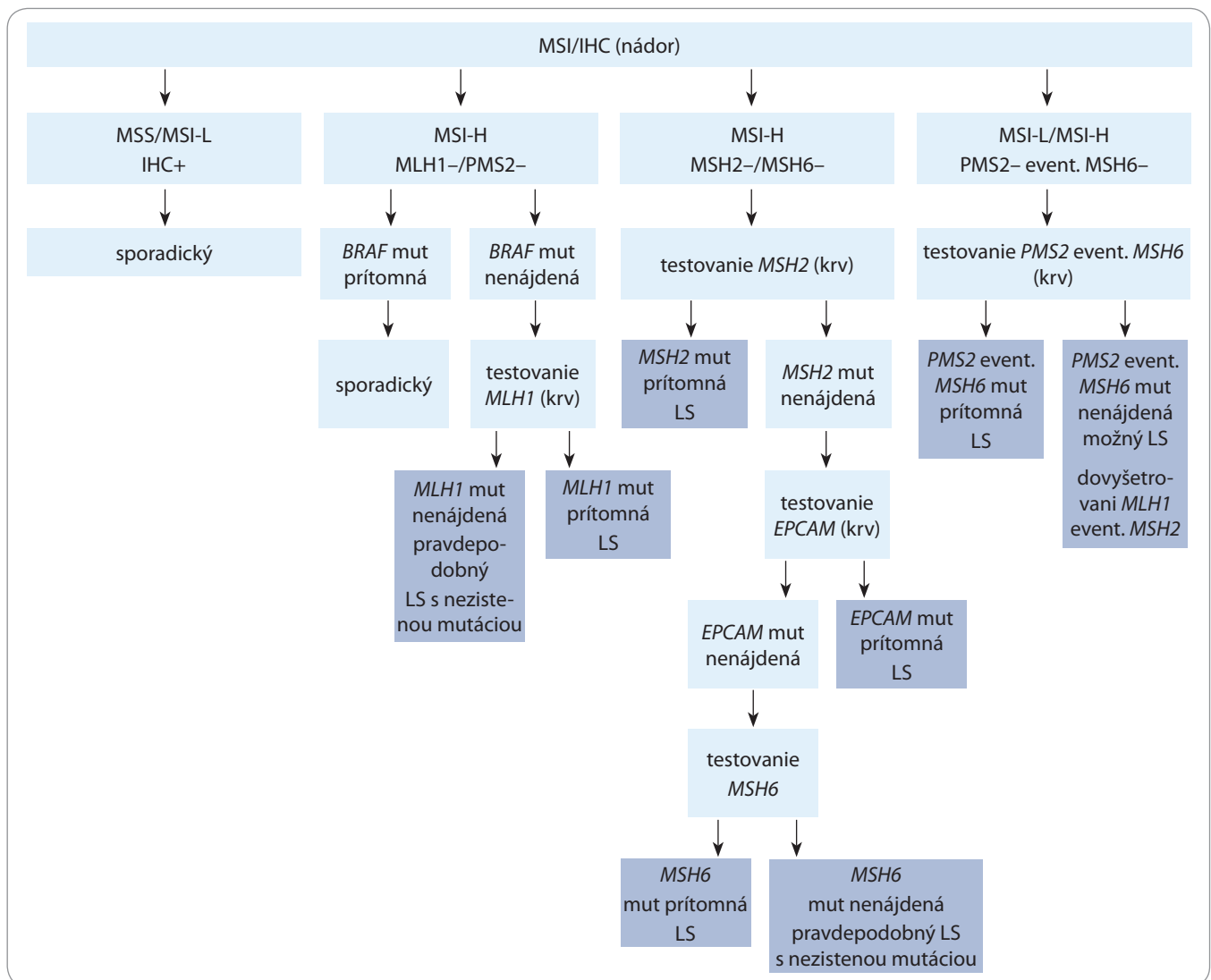


Schéma 1. Algoritmus testovania Lynchovho syndrómu.

LS – Lynchov syndróm, MSS – mikrosatelitová stabilita, MSI – mikrosatelitová instabilita, MSI-L – nízka MSI, MSI-H – vysoká MSI, IHC – imunohistochemické vyšetrenie, MLH1–, PMS2–, MSH2–, MSH6– – strata expresie nukleárneho proteínu génu, mut – patologická mutácia

3. Hypermetylačný fenotyp (CIMP+) – seratovaná alebo alternatívna cesta

Nové snahy o histologickú klasifikáciu hyperplastických/seratovaných polypov a nedávne objavenie alternatívnej seratovanej cesty kolorektálnej tumorigenézy výrazne zmenili pohľad na tieto lézie a rozbehli výskum v danej oblasti. Donedávna sa predpokladalo, že absolútna väčšina CRC vzniká z konvenčného adenómu tradičnou cestou naštartovanou iniciálnou mutáciou APC génu. Ukazuje sa však, že do 30 % zhubných nádorov kolorekta vzniká alternatívnou cestou. Proces tumorigenézy sa v tomto prípade vyvíja na podklade

epigenetickej alterácie (DNA hypermetylácia promótoru), čo môže viesť k poruche génovej expresie určitých génov. Hypermetylácia postihuje najčastejšie CpG dinukleotidy, nazývané aj CpG ostrovčeky, promótorovej oblasti určitých citlivých génov. Tento typ tumorov sa označuje ako CIMP+ (CpG island methylator phenotype) a najčastejšie býva sprevádzaný iniciálnou mutáciou *BRAF* onkogénu. Tumory vznikajúce takýmto mechanizmom môžu vykazovať MSI, ak sa epigenetický silencing týka MMR génu (*MLH1* génu) alebo sú bez MSI (napr. u génov *P16*, *MGMT* alebo *IGFBP7*). Najlepšie preskúmaným je silencing *MLH1* génu, ktorý

vedie k sporadickým CRC s MSI-H fenotypom. Iničiálna mutácia *BRAF* onkogénu podnecuje vývoj seratovaných lézií, ktorými sú najčastejšie mikrovizikulárne hyperplastické polypy alebo sesilné seratované polypy. Predovšetkým veľké polypy s pravostrannou lokalizáciou bývajú *BRAF* pozitívne, kým menšie polypy s prevažne s ľavostrannou lokalizáciou môžu byť asociované aj s *K-RAS* mutáciou. CRC vykazujúce CIMP+ majú prítomnosť *BRAF* alebo *K-RAS* mutácie zistenú v 90 % [16].

Seratovaný polypózny syndróm

Seratovaný polypózny syndróm (SPS), známy aj ako hyperplastický polypózny

syndróm, je zriedkavá klinická jednotka charakterizovaná tvorbou mnohopočetných seratovaných polypov a zvýšeným rizikom vzniku CRC. Tak ako FAP slúžila ako model na identifikáciu klasickej cesty kolorektálnej tumorigenézy zo sekvencie adenóm-karcinóm, SPS je vhodným ochorením na výskum klinických, patologických a molekulárnych prejavov alternatívnej cesty vývoja. Klinicky predstavuje heterogénnu skupinu fenotypov, vznikajúcich s najväčšou pravdepodobnosťou na rozdielnom genetickom podklade.

Podľa WHO na diagnózu SPS musí pacient spĺňať niektoré z troch kritérií:

1. viac ako päť seratovaných polypov proximálne od sigmy, z toho min. 2 > 10 mm,
2. akýkoľvek počet seratovaných polypov proximálne od sigmy a príbuzný I. stupne s SPS,
3. viac ako 20 seratovaných polypov akejkoľvek veľkosti v celom kolorekte.

Polypy u SPS bývajú vo väčšine prípadov veľké, ploché, proximálne lokalizované a často zle rozpoznateľné pri kolonoskopickom vyšetrení. Až 90 % pacientov s SPS má okrem seratovaných lézií zistenú prítomnosť aj tradičných adenómov, čo sa považuje za súčasť klinického obrazu. Priemerný vek manifestácie polypózy je 55 rokov, pričom familiárny výskyt je zaznamenaný až do 59 % prípadov [17,18]. U SPS sa uvažuje o monogénovej etiológii, kauzálna mutácia však doteraz zistená nebola. SPS tak ostáva jediným dedičným polypóznym syndrómom bez známej kauzálnej genetickej alterácie. Molekulárne štúdie dokazujú u týchto pacientov vysokú hladinu atypickej hypermetylácie rôznych génov (CIMP+) v kolorektálnych karcinómoch, ale aj polypoch. Vysoký stupeň DNA metylácie bol zistený dokonca aj v zdravej kolorektálnej mukóze mladých pacientov s SPS, čo je za normálnych okolností nález pozorovaný s rastúcim vekom. Vzniká tak predpoklad, že môže ísť o geneticky podmienenú poruchu epigenetickej kontroly a dedičnú predispozíciu k hypermetylácii, čo by sa dalo opísať aj ako geneticky naprogramované predčasné stárnutie kolorektálnej sliznice. Pacienti s klinickým nálezhom spĺňajúcim kritériá SPS majú

päťnásobne vyššie riziko vývoja CRC, ako je bežne v populácii, a doporučuje sa u nich každoročná kolonoskopia. Tá sa doporučuje aj u ich I. stupne príbuzných od veku 40 rokov v päťročných intervaloch do objavenia sa polypov.

Frekvencia doporučeného kolonoskopického sledovania pacientov s menším počtom seratovaných lézií sa odvíja od lokalizácie, veľkosti, počtu a histologického typu zistených lézií v intervaloch od jedenkrát ročne do jedenkrát za 10 rokov [19].

Záverečné zhrnutie

CRC predstavuje ideálny model pre štúdium molekulárnej patogenézy solídnych nádorov z dôvodu ľahkého prístupu k biopsii tkaniva a jasnej progresie z normálneho kolonického epitelu do štádia invazívneho karcinómu cez prekursor-polyp. Viackrokový proces špecifických genetických zmien aktivuje transformáciu z normálneho kolonického epitelu na invazívny karcinóm. Jedna špecifická germinatívna mutácia sa môže podieľať na vývoji známych vrodených syndrómov (napr. FAP, Lynchov syndróm), kým sporadický kolorektálny karcinóm je výsledkom akumulácie postupných viacpočetných somatických mutácií. Mutácia APC génu sa vyskytuje najčastejšie ako včasný krok, kým mutácia *TP53* supresorového génu ako jedna z neskorých v tomto procese. Koncept MSI predstavuje ďalšiu z úrovni tohto modelu. MSI-H fenotyp je asociovaný s Lynchovým syndrómom, ale tiež je zistený aj u 10–15 % sporadických CRC. Podľa toho, o aký mechanizmus straty genomickej stability bunky ide, sú v súčasnosti vyšpecifikované tri molekulárne cesty kolorektálnej karcinogenézy: chromozómová instabilita, porucha funkcie MMR génov a CIMP+ (CpG island methylator phenotype). Bez ohľadu na typ molekulárnej cesty konečným výsledkom je vždy adenokarcinóm. Identifikácia špecifických genetických mutácií zodpovedných za kolorektálnu tumorigenézu má význam nielen na vytypovanie pacientov so zvýšeným rizikom vývoja CRC, ale aj ako prognostický marker, potenciálny terapeutický cieľ a vo vývoji sú aj metódy včasného záchytu CRC využitím detekcie iníciačných mutácií tumorigenézy v stolici pacienta.

Literatúra

1. eco.iarc.fr [homepage on the Internet]. WHO, International Agency for Research on Cancer; [updated 2012 Jul 26; cited 2015 Jun 15]. Available from: <http://www.eco.iarc.fr/eucan>.
2. nczisk.sk [internetová stránka]. Národné centrum zdravotníckych informácií, Slovenská republika; [aktualizované 31. decembra 2008; citované 15. júna 2015]. Dostupné z: <http://www.nczisk.sk>.
3. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colonic tumorigenesis. *Cell* 1990; 61(5): 759–767.
4. Takayama T, Ohi M, Hayashi T et al. Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 2001; 121(3): 599–611.
5. Zauber AG, Winawer SJ, O'Brien MJ et al. Colonoscopic polypectomy and long term prevention of colorectal cancer deaths. *N Engl J Med* 2012; 366(8): 687–696. doi: 10.1056/NEJMoa1100370.
6. Bienz M, Clevers H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 2000; 103(2): 311–320.
7. Russo A, Bazan V, Iacopetta B et al. The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of the p53 mutation. *J Clin Oncol* 2005; 23(30): 7518–7528.
8. Morán A, Ortega P, de Juan C et al. Differential colorectal carcinogenesis: molecular basis and clinical relevance. *World J Gastrointest Oncol* 2010; 2(3): 151–158. doi: 10.4251/wjgo.v2.i3.151.
9. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1988; 48(22): 5248–5257.
10. Křepelová A, Pavlíková K, Plevová P. Diagnostika Lynchova syndromu – nové geny a metódy. *Klin Onkol* 2006; 19 (Suppl): S76–S81.
11. Whitehall VL, Wals MD, Zoung J et al. Methylation of O-6-methylguanine DNA methyltransferase characterises a subset of colorectal cancer with low-level DNA microsatellite instability. *Cancer Res* 2001; 61(3): 827–830.
12. Palomaki GE, McClain MR, Melilo S et al. EGAPP supplementary evidence review: DNA testing strategies aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome. *Genet Med* 2009; 11(1): 42–65. doi: 10.1097/GIM.0b013e31818fa2db.
13. Kempers MJ, Kuiper RP, Ockeloen CW et al. Risk of colorectal and endometrial cancer in EPCAM deletion-positive Lynch syndrome: a cohort study. *Lancet Oncol* 2011; 12(1): 49–55. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70265-5.
14. Weissman SM, Bellcross C, Bitter CC et al. Genetic counseling considerations in the evaluation of families for Lynch syndrome – a review. *J Genet Couns* 2011; 20(1): 5–19. doi: 10.1007/s10897-010-9325-x.
15. Goodenberg M, Lindor NM. Lynch syndrome and MYH-associated polyposis: review and testing strategy. *J Clin Gastroenterol* 2011; 45(6): 488–500. doi: 10.1097/MCG.0b013e318206489c.
16. Guarinos C, Sánchez-Fortún C, Rodríguez-Soler M et al. Serrated polyposis syndrome: molecular, pathological and clinical aspects. *World J Gastroenterol* 2012; 18(20): 2452–2461. doi: 10.3748/wjg.v18.i20.2452.
17. Guarinos C, Sánchez-Fortún C, Rodríguez-Soler M et al. Clinical subtypes and molecular characteristics of serrated polyposis syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013; 11(6): 705–711. doi: 10.1016/j.cgh.2012.12.045.
18. Leggett B, Whitehall V. Role of serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 2010; 138(6): 2088–2100. doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.066.
19. Rex DK, Ahnen DJ, Baron JA et al. Serrated lesions of colorectum: review and recommendations from an expert panel. *Amer J Gastroenterol* 2012; 107(9): 1315–1329. doi: 10.1038/ajg.2012.161.