

DIAGNOSTIKA LYNCHOVA SYNDROMU - NOVÉ GENY A METODY

DIAGNOSTICS IN LYNCH SYNDROME - NEW GENES AND METHODS

KŘEPELOVÁ A.¹⁾, PAVLÍKOVÁ K.¹⁾, PLEVOVÁ P.²⁾

¹⁾ÚSTAV BIOLOGIE A LÉKAŘSKÉ GENETIKY, FN V MOTOLE A 2. LF UK V PRAZE,

²⁾ODDĚLENÍ LÉKAŘSKÉ GENETIKY FNŠP OSTRAVA,

Souhrn

Lynchův syndrom - hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC) - je nejčastější známou hereditární predispozicí ke karcinomu tlustého střeva. Je zodpovědný přibližně za 2% všech karcinomů tlustého střeva v populaci. Pacienti s Lynchovým syndromem mají vysoké celoživotní riziko karcinomu tlustého střeva a některých dalších zhoubných nádorů. Hlavní příčinou Lynchova syndromu jsou zárodečné mutace některého z tzv. „DNA mismatch repair“ (MMR) genů. Klinické podezření na Lynchův syndrom se opírá zejména o současnou přítomnost kolorektálního karcinomu u pacienta bez familiární adenomatózní polypózy, výskyt karcinomu střeva u jeho nejbližších příbuzných a postižení před 50 rokem věku. Pro diagnózu Lynchova syndromu svědčí dále průkaz mikrosatelitové nestability v DNA nádoru a ztráta exprese MMR proteinu v nádorové tkáni při imunohistochemickém vyšetření. Diagnóza Lynchova syndromu je na molekulární úrovni potvrzena průkazem patogenní zárodečné mutace některého z MMR genů. Pro zvýšení efektivity diagnostického procesu, komplikovaného nutností odlišit případy sporadických a familiárních CRC v populaci, byly navrženy komplexní diagnostické postupy. Průkaz patogenní mutace u pacienta umožní prediktivní DNA testování u jeho příbuzných. Doporučené klinické sledování nemocných s Lynchovým syndromem a jejich pozitivně testovaných příbuzných zohledňuje vysoké riziko vzniku zhoubných nádorů a prokazatelně zlepšuje jejich prognózu. Hledání dalších kauzálních genů a optimalizace diagnostiky a klinického sledování jsou stále předmětem výzkumu.

Klíčová slova: HNPCC, Lynchův syndrom, kolorektální karcinom, mikrosatelitová nestabilita

Summary

Lynch syndrome - hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) is the most frequent of known hereditary predispositions to colon cancer. It is responsible for approximately 2% of all colon cancers in the population. Patients with Lynch syndrome are at high lifelong risk of the colon cancer and some other malignancies. The main cause of Lynch syndrome is the germline mutation of one of the DNA mismatch repair (MMR) genes. Clinical suspicion of the Lynch syndrome is based mainly on concurrent colorectal cancer without familial adenomatous polyposis, colon cancer in relatives and manifestation before the age of 50 years. The diagnosis is supported by the presence of microsatellite instability in tumour DNA and by the loss of expression of MMR proteins in tumour tissue demonstrated by immunohistochemistry. The diagnosis of Lynch syndrome is confirmed at the molecular level by the detection of a pathogenic germline mutation in the MMR gene. Complex diagnostic procedures were suggested to improve the effectivity of diagnostic process. Detection of a pathogenic mutation in a patient enables a predictive testing in his/her relatives. Long term follow up of patients and their positively tested relatives improves their prognosis. Search for new candidate genes, optimisation of the diagnosis and follow up are the matter of current research.

Key words: HNPCC, Lynch syndrome, colorectal cancer, microsatellite instability

Obecné poznámky ke kolorektální kancerogenezi

Na vzniku a vývoji karcinomu tlustého střeva se významným způsobem podílejí genetické a epigenetické faktory. Genetické faktory představuje vrozená nebo získaná genetická informace v buňce - zpravidla mutace nebo varianty různých genů, které se účastní regulace proliferace, diferenciace, nebo smrti buňky, epigenetické faktory pak nedědičné změny genetické informace mající za následek změny exprese těchto genů. Některé mutace a genové varianty mohou být přítomny ve všech buňkách organismu (vrozené, tzv. zárodečné mutace) a jejich nosičství může představovat různě významné rizikové nebo predispoziční faktory, většina genových mutací významných v procesu kancerogeneze jsou mutace získané, somatické, vzniklé v některé tělní buňce a dále děděné jen dceřinými somatickými buňkami. Mutace v buňkách vznikají neustále v důsledku působení zevních chemických a fyzikálních vlivů nebo chyb vzniklých během replikace nebo rekombinace DNA. Prokaryotické a eukaryotické buňky používají

mnoho funkčních systémů k zachování integrity genetické informace, t.j. pro vyhledávání a opravu chyb v DNA. Tento přísný dohled zaručuje přenos prakticky konstantní genetické informace na dceřinné buňky. Nelze-li chyby v DNA opravit, existují mechanismy, které mohou a mají zabránit buňce v dalším dělení a navodit řízenou smrt - apoptosu takové buňky. Dále existují složité vzájemně provázané interakce při regulaci exprese genů a složité interakce v oblasti metabolismu buňky, jejichž cílem je zajistit nejen dostatek potřebného proteinu, ale i jeho případnou aktivaci, inaktivaci a likvidaci podle aktuální potřeby. Pokud dojde k poruše na kterékoliv z uvedených úrovní v buňce, která má, nebo znovu získá schopnost dělení, může dojít při splnění dalších podmínek až ke vzniku nádoru. Vznik zhoubného nádoru je mnohastupňový proces zahrnující dynamické změny genomu buněk. Jen některé mutace a genetické změny se však v kancerogenezi uplatní - nejvýznamnější jsou aktivující mutace onkogenů a inaktivující mutace tumor-supresorových genů. Vzniku a kumulaci muta-

cí napomáhá vrozená či získaná porucha reparace DNA, přežití a dalšímu dělení abnormálních buněk napomáhají poruchy regulace buněčného cyklu a porucha exekuce apoptózy. Dochází také k hrubším a komplexnějším změnám - chromosomové nestabilitě, t.j. změnám počtu a struktury chromosomů v důsledku chybné segregace chromosomů v mitose, nebo mikrosatelitové nestabilitě, t.j. změnám počtu opakování krátkých repetitivních sekvencí v genomu buňky v důsledku chyb při replikaci. Tyto hrubší změny jsou jak příčinou, tak i důsledkem zmíněných genových mutací. Typickou epigenetickou změnou doprovázející kancerogenesu jsou např. změny metylace promotorových oblastí některých genů, které mají za následek ztrátu exprese těchto genů. Poznatky o genetických změnách v buňce doprovázejících kancerogenesi zhodnotili v obsáhlé práci Hanahan a Weinberg (1). Poznatky o genetických změnách charakteristických pro vznik a vývoj kolorektálního karcinomu shrnuli v dnes již klasické publikaci Fearon a Vogelstein (2), později s důrazem na hereditární formy kolorektálního karcinomu Kinzler a Vogelstein (3).

Dědičnost u karcinomu tlustého střeva.

Podle rodinné anamnézy můžeme pacienty s kolorektálním karcinomem rozdělit na pacienty se sporadickým karcinomem, pokud nemocný nemá žádné příbuzné s CRC, pacienty s familiálním výskytem CRC, pokud má pacient příbuzné s CRC, výskyt však nesvědčí pro jasně dominantní typ dědičnosti, a pacienty s hereditární formou CRC, kdy jsou karcinomem střeva postiženi další blízcí příbuzní pacienta a genealogie svědčí pro dominantní typ dědičnosti. Sporadických karcinomů je asi 75%, familiárních 15-25%, hereditárních asi 5%. Kromě pozitivní rodinné anamnézy svědčí pro možný dědičný podklad karcinomu tyto okolnosti: výskyt mnohočetných (synchronních nebo metachronních) nádorů u pacienta, výskyt jiných nádorů v rodině, které patří do spektra nádorů typických pro některý syndrom (např. karcinom endometria u Lynchova syndromu), nízký věk pacienta v době diagnózy (méně než 50, významně pak méně než 35 let).

Dosud byly popsány dva hlavní syndromy s predispozicí ke karcinomu tlustého střeva - Lynchův syndrom a familiární adenomatózní polypóza - a několik dalších vzácných syndromů s hamartomatosní polypózou a rovněž zvýšeným rizikem kolorektálního karcinomu. U těchto syndromů známe molekulární podstatu onemocnění, t.j. geny, jejichž mutace jsou za příslušný syndrom odpovědné. Molekulárně genetické vyšetření se zde stalo součástí klinické praxe. Ve skupině familiárních karcinomů kolorekta nelze zpravidla z klinických projevů nebo histopatologického nálezu rozhodnout, zda jde o náhodné nezávislé postižení dvou nebo více příbuzných, nebo zda skutečně sdílí společnou vlnu. Pro tuto skupinu nemocných jsou vypracovávány diagnostické postupy kombinující hodnocení klinických údajů s jednoduššími laboratorními analýzami s cílem identifikovat jedince s vysokou pravděpodobností hereditární predispozice a jen tyto pak dále molekulárně geneticky testovat. Také u mladých a velmi mladých nemocných se sporadickým karcinomem střeva je nutno zvážit možnost vrozené predispozice. Následující text se bude zabývat pouze Lynchovým syndromem, neboť familiární adenomatózní polypóza a vzácným syndromům s hamartomatózní polypózou jsou věnovány jiné články tohoto čísla.

Hereditární nepolypózní karcinom tlustého střeva - Lynchův syndrom.

Klinický obraz.

HNPCC je nejčastějším hereditárním syndromem s predispozicí ke karcinomu tlustého střeva - nemocní s HNPCC představují asi 2% ze všech nemocných s CRC (4). Průměrný věk nemocných v době diagnózy CRC je 42-44 let, o dvacet let méně, než u populace s běžným rizikem. Karcinomu nepředchází mnohočetná polypóza, jako časná a málo diagnostická změna může být zachycen ojedinělý adenom s dysplázií nebo

několik (méně než 10) adenomatózních polypů střeva. Karcinom bývá častěji, ne však výlučně, pravostranný, častý je výskyt synchronních a metachronních nádorů kolorekta. Kromě karcinomu tlustého střeva se u nemocných s Lynchovým syndromem vyskytuje významně častěji, než odpovídá populačnímu riziku, také karcinom endometria, žaludku, tenkého střeva, hepatobiliárního traktu, pankreatu, ovaria, ureteru a ledvinné pánvičky a nádory mozku (5, 6). Syndrom Muir-Torre je variantou Lynchova syndromu, při níž je nádor typický pro HNPCC asociován s nádorem sebaceouských žláz, bez ohledu na rodinnou zátěž. Turcotův syndrom je charakterizován výskytem kolorektálních adenomů a karcinomů a primárními nádory CNS.

Etiologie. Genetika HNPCC.

Od roku 1993 dosud byly identifikovány čtyři geny, jejichž zárodečné mutace jsou zodpovědné za Lynchův syndrom. Jde o geny ze skupiny tzv. „DNA mismatch-repair“ genů (MMR genů), t.j. genů, které se účastní rozpoznání a opravy chyb v DNA, vznikajících při replikaci.

Gen MSH2 byl identifikován jako první v roce 1993. Metodou vazebné analýzy ve dvou velkých rodinách s HNPCC byla nejprve prokázána genetická vazba na chromosom 2, oblast 2p16-p15, později upřesněna na 2p21. Prakticky současně byly v nádorech pacientů s HNPCC zjištěny charakteristické změny mikrosatelitních repetitivních sekvencí DNA - tzv. mikrosatelitová nestabilita (7). Funkční a strukturální homologie s již dříve známými MMR geny u *E.coli* a *S.cerevisiae* pomohla identifikovat v kritické oblasti i lidský homolog, který byl u nemocných s HNPCC mutován (8, 9, 10). Gen MSH2 je 73 kb dlouhý, obsahuje 16 exonů, kódovaný polypeptid má 934 aminokyselin. Dosud bylo u nemocných s HNPCC identifikováno více než 200 různých patogenních zárodečných mutací tohoto genu. Mutace genu MSH2 jsou druhou nejčastější příčinou HNPCC - byly prokázány asi u 40% nemocných (11).

Gen MLH1 byl identifikován vazebnou analýzou v rodinách, které nemapovaly do oblasti genu MSH2. Gen byl lokalizován na krátké raménko chromosomu 3 do oblasti 3p23-21 a u nemocných s HNPCC byl mutován (12, 13, 14). Gen MLH1 je dlouhý asi 100 kb, obsahuje 19 exonů a kóduje polypeptid o 756 aminokyselinách. Dosud bylo u nemocných s HNPCC identifikováno více než 250 různých patogenních zárodečných mutací genu MLH1 (11). Mutace MLH1 jsou nejčastější příčinou HNPCC ve většině studovaných populací, také v České republice (Křepelová A, vlastní pozorování).

Gen MSH6 leží v oblasti 2p21, jen 1Mb vzdálen genu MSH2. Protein Msh6, původně označovaný GTBP, byl objeven jako součást funkčního heterodimeru tvořeného společně s proteinem MSH2 (15, 16). Teprve později byly v některých rodinách s HNPCC nalezeny zárodečné mutace tohoto genu (17, 18). Zárodečné mutace genu MSH6 jsou zodpovědné asi za 10% případů HNPCC.

Gen PMS2 je v oblasti 7q11.23 a kóduje polypeptid o 932 aminokyselinách. Mutace genu PMS2 byly zjišťovány jako příčina HNPCC jen vzácně, také proto, že tento gen není rutinně vyšetřován. Analýza genu PMS2 je navíc komplikována existencí několika vysoce homologních pseudogenů v lidském genomu. Až po zpřesnění detekční metody a kombinaci s imunohistochemickou analýzou PMS2 proteinu byly revidovány některé starší nálezy a nejnovější práce svědčí proto, že patogenní zárodečné mutace PMS2 genu jsou příčinou Lynchova syndromu častěji, než se dlouho myslelo (19).

Úloha zárodečných mutací **genu MLH3** při vzniku Lynchova syndromu se nepotvrdila (20, 21), zárodečné mutace dalších MMR genů nebyly u nemocných s Lynchovým syndromem popsány.

Zárodečné mutace MMR genů zjišťované u nemocných s HNPCC jsou různé: krátké inserce, delece vedoucí k posunu čtecího rámce, mutace tvořící předčasný terminační kodon, sestřihové mutace, mutace vedoucí k záměně aminokyseliny, nebo

dlouhé delece v některém z výše uvedených genů. Mutace jsou uvedeny např. v databázi InSiGHT. Souhrnně lze říci, že mutace genu MSH2 a MLH1 jsou zodpovědné za typický Lynchův syndrom, rodiny nesoucí tyto mutace často splňují Amsterdamská kritéria, nádory těchto nemocných mají MSI-H charakter. Nosiči mutace genu MSH6 onemocní spíše ve vyšším věku a ženy mají vyšší riziko karcinomu endometria, jejich nádory mají nízký stupeň mikrosatelitové nestability (MSI-L). Mutace genu PMS2 byly zjištěny u pacientů se sporadickým pravostranným karcinomem tlustého střeva. U vzácně popisovaných pacientů - homozygotů nebo složených heterozygotů pro mutace MLH1, MSH2, MSH6, nebo PMS2 - byly už v dětském věku pozorovány hematologické malignity, nádory mozku a neurofibromatóza (22, 23).

Patogenesa. Funkce MMR proteinů a jejich význam v kolo- rektální kancerogeneze.

Proteiny kódované MMR geny se účastní rozpoznání a opravy určitých typů chyb v DNA, které vznikají během replikace v nově syntetizovaném vlákně DNA. Jde zejména o chyby typu krátkých inserčně-delečních smyček v úseku krátkých mono- nebo dinukleotidových repetitivních sekvencí v genomu, které vznikají sklouznutím řetězce, nebo chyby v párování bází, zejména G-T neshody, které vznikají zařazením nesprávného nukleotidu. MMR proteiny pracují jako heterodimery (komplexy složené ze dvou různých proteinů) s částečnou substrátovou specificitou. Důsledkem ztráty funkce tohoto opravného systému se až o tři řády zvýší frekvence vzniku mutací tohoto typu v postižených dceřinných buňkách. Přímý důsledek závisí na lokalizaci mutace. Postihne-li nekódující oblast genomu, nemá funkční význam, ale můžeme ji prokázat molekulárně genetickým testem jako tzv. nestabilitu mikrosatelitů (MSI) v nádorové tkáni. MSI je charakteristickým znakem nádorů nemocných s Lynchovým syndromem, je prokazována u přibližně 90% jejich karcinomů střeva, ale také u cca 15% karcinomů sporadických, kde může mít jinou příčinu. Postihne-li mutace kódující oblast nějakého genu, kde se taková citlivá repetitivní sekvence vyskytuje, může to být jeden ze stupňů ke vzniku karcinomu. Mutace tohoto typu byly opakovaně prokázány např. v genu TGFβRII, MSH6, PTEN, nebo v genu APC.

Diagnostika.

Diagnostická kritéria. HNPCC se nemanifestuje specifickými projevy, proto je podezření na HNPCC vysloveno u nemocných s karcinomem tlustého střeva s pozitivní rodinnou anamnézou a/nebo s manifestací před 50. rokem věku. Jako diagnostická kritéria se často používají tzv. Amsterdamská kritéria I (Tabulka 1), původně použitá pro výběr rodin pro kolaborativní studii a identifikaci zodpovědných genů. Tato kritéria byla později s přihlédnutím k novým zkušenostem upravena na Amsterdamská kritéria II (Tabulka 2). Většina nemocných s kolo-
rektálním karcinomem Amsterdamská kritéria nesplňuje. Jako vodítko, zda a kteří z nich by měli také podstoupit genetické testování, byla na konferenci v Bethesda vypracována vodítka - Bethesda Guidelines, později také revidovaná a zjednodušená (Tabulka 3), pro indikaci k vyšetření mikrosatelitové nestability (MSI) v nádoru. Pro analýzu MSI postačuje splnění jediného z Bethesda vodítek (24). U nemocných s prokázanou MSI v nádoru je pak vhodné provést mutační analýzu MSH2 a MLH1 genu.

Diagnostický postup. Celý diagnostický postup shrnují doporučení, formulovaná v roce 2002 na konferenci v Bethesda (Tabulka 4) (24). Základem pro rozhodování je zde opět rodinná a osobní anamnéza. Je třeba zdůraznit, že podcenění nebo zanedbání pečlivé rodinné a osobní anamnézy může vážně poškodit právě pacienta s vysokým rizikem zhoubných nádorů a jeho příbuzné. Aktuální praxe v ČR je taková, že nemocní, splňující některé z revidovaných Bethesda vodítek, případně Amsterdamská kritéria II, jsou geneticky testováni na

přítomnost zárodečné mutace MSH2 a MLH1 genu přímo, bez předchozí analýzy nádorové tkáně (Tabulka 4, bod 3). Důvodem je, že prakticky nikdy není na onemocnění pomýšleno včas tak, aby byl k dispozici čerstvý nebo zamražený vzorek nádorové tkáně pro analýzu MSI. Dodatečné vyšetření tkáně z parafinového bločku je sice také možné, u IHC dokonce standardní, ale pro obtížnou dostupnost a nejistý výsledek je prováděno v menšině případů, prakticky vždy dodatečně jako doplňující vyšetření např. pro objasnění možné patogenity zjištěné mutace, jen vzácně jako skutečné vodítko k rozhodnutí o následné mutační analýze. Ze 120 nemocných doporučených v roce 2005 z různých pracovišť ČR k testování zárodečných mutací MMR genů byla jen u jednoho předem potvrzena MSI a u asi 5% provedena IHC (vlastní pozorování).

Metody mutační DNA analýzy.

Analýza zárodečných mutací MMR genů v rámci diagnostického testu se provádí v genomové DNA pacienta, izolované z leukocytů periferní krve. Vhodná je vysokomolekulární DNA izolovaná z 5 ml žilní krve odebrané do K₃EDTA. Většinou nejsou vhodné různé „miniizolace“ z kolonek nebo magnetické separace, takto izolovaná DNA nemá potřebnou koncentraci a kvalitu. Jakkoli se to může zdát okrajová záležitost, je otázce správné izolace DNA v současnosti věnována velká pozornost v rámci akreditačních a standardizačních procesů v ČR i v EU. Diagnostická DNA laboratoř má právo odmítnout nevhodný vzorek, je proto lepší, v případě pochybností, zasílat přímo 5ml vzorek krve pacienta. Po extrakci může být DNA uchovávána řadu let v tzv. DNA bance. Mutační analýza MMR genů spočívá v amplifikaci jednotlivých exonů (16 v genu MSH2, 19 v genu MLH1) a jejich analýze některou ze screeningových molekulárně genetických metod, které s různou mírou spolehlivosti, cca od 70 do 95%, odliší přítomnost mutace ve vyšetřovaném úseku ve srovnání s kontrolním vzorkem (DHPLC, DGGE, TGGE, HA, SSCP). Úseky podezřelé z přítomnosti mutace jsou následně sekvenovány a přítomná varianta přesně určena. Je možno také všechny úseky přímo sekvenovat, ovšem za cenu vyšších nákladů. K detekci částečných genových delecí nebo duplikací lze použít analýzu Southernova blotu, v poslední době se standardně využívá metoda MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) (25). V naší laboratoři používáme kombinaci PCR, DGGE (26), MLPA a sekvenování. Vzhledem k tomu, že molekulárně genetické testování je dnes součástí péče o pacienty s HNPCC, je snaha tyto analýzy standardizovat a kontrolovat jejich kvalitu. Proto se pravidelně účastníme mezinárodní mezilaboratorní kontroly kvality pořádané EMQN (European Molecular Genetics Quality Network). Tato organizace vydává také doporučení správné laboratorní praxe. Při kontrole kvality je kladen důraz nejen na správné určení genotypu, ale zejména na správnou interpretaci výsledku. Molekulárně genetické vyšetření je v ČR hrazeno zdravotními pojišťovnami. Prediktivní testy jsou jednodušší, v genomové DNA pacienta je detegována cíleně pouze mutace, dříve zjištěná u postiženého příbuzného. Je standardem provádět prediktivní test dvakrát, ve dvou nezávisle odebraných vzorcích krve, aby byla vyloučena možnost záměny.

Výsledky a interpretace mutační DNA analýzy. Pokud pacient splňuje Amsterdamská kritéria II, je diagnóza HNPCC vysoce pravděpodobná a úspěšnost DNA analýzy a průkazu mutace MMR genu vysoká, 60 - 80% (78% v našem souboru 50 nepříbuzných nemocných). Zjištěné mutace jsou zpravidla jednoznačně patogenní. U nemocných, kteří kritéria nesplňují, je úspěšnost detekce výrazně nižší, 10-15%. Navíc často zjišťujeme mutace, jejichž etiopatogenetický význam není jasný - zpravidla dosud neidentifikované mutace vedoucí k záměně aminokyseliny. Při průkazu jasně patogenní zárodečné mutace je diagnóza Lynchova syndromu potvrzena na molekulární úrovni. Za jasně patogenní pokládáme mutace vedoucí ke vzniku předčasného terminačního kodonu, krátké inserce a delece

vedoucí k posunu čtecího rámce a zpravidla předčasněmu ukončení translace, mutace sestřihových míst, které vedou k chybnému sestřihu mRNA a syntéze abnormálního proteinu, a dlouhé částečné delece MMR genu. Obtížné, někdy nemožné, je zhodnocení významu mutace vedoucí k záměně aminokyselin. Zde lze použít některá pomocná kritéria. Pro patogenní charakter mutace svědčí, jde-li o nekonzervativní záměnu aminokyselin, jde-li o záměnu aminokyseliny vysoce konzervované mezi druhy nebo ve vysoce konzervované důležité funkční doméně proteinu, absence varianty u kontrolní populace, kosegregace s chorobou v rodině, asociace s MSI-H nebo ztrátou exprese proteinu v nádoru. Nutnost správné interpretace byla podnětem k řadě funkčních studií dosud popsanych variant nejasného významu. Tyto studie u mnoha mutací potvrdily, že mají za následek mutátorový fenotyp u modelového organismu, nebo brání správné funkční interakci MMR proteinů, u jiných mutací byla patogenita zpochybněna (27-30 a další). Co nejpresnější interpretace výsledku molekulárně genetické analýzy je úkolem laboratoře, která analýzu provádí. Pouze jednoznačně patogenní mutace lze použít pro následné prediktivní testování u příbuzných pacienta.

Analýza a interpretace mikrosatelitové nestability.

Vyšetření mikrosatelitové nestability se provádí v DNA izolované z nádorové tkáně. Je vhodné mít k dispozici také DNA z normální tkáně nebo periferní krve pacienta, aby mohla být vyšetřena nestabilita v dinukleotidových sekvencích. Je-li k dispozici jen nádorová tkáň, lze analyzovat zpravidla jen mononukleotidové repetice, vyšetření může mít omezenou výpovědní hodnotu. Standardně jsou podle doporučení z Bethesda analyzovány metodou fragmentační analýzy tři dinukleotidové a dvě mononukleotidové repetice, při nejjasnějším výsledku je postup modifikován (24). Je-li alespoň ve dvou repeticích z pěti přítomna mikrosatelitová nestabilita (přítomnost abnormální alely proti nenádorové DNA), je nádor hodnocen jako MSI-H, s vysokým stupněm MSI, je-li nestabilita v 1/5 repetice, je hodnocen jako MSI-L, s nízkým stupněm MSI, není-li MSI prokázána, mluvíme o MSS, stabilitě mikrosatelitů.

Metody imunohistochemické analýzy.

Ztrátu exprese proteinů lze vyšetřit pomocí metody imunohistochemie ve fixované nádorové tkáni zatavené do parafínu. V klinické praxi se běžně využívá vyšetření proteinů MLH1, MSH2 a MSH6. Lze vyšetřit také expresi proteinu PMS2, přičemž zárodečné mutace genu *PMS2* jsou vzácnější. Hodnotí se jaderná pozitivita exprese proteinů. Inaktivace obou alel příslušného genu se projeví kompletní ztrátou barvení jader nádorových buněk. Kontrolou správnosti barvení je pozitivita barvení jader normálních epitelálních buněk, stromálních buněk nebo lymfocytů v příslušném preparátu (31).

Ztráta exprese proteinů MLH1 nebo MSH2 je specifická pro nádory s vysokým stupněm nestability mikrosatelitů. Souhrnné zhodnocení výsledků publikovaných ve 49 člancích, které se týkaly imunohistochemické detekce proteinů MLH1 a MSH2 u pacientů s kolorektálním karcinomem, ukázalo, že pomocí imunohistochemie bylo správně detekováno 136 nádorů ze 154 od pacientů se zárodečnou mutací v genu *MLH1* [senzitivita 88,3% (95%CI, 85,8-90,8)] a 99 ze 109 nádorů od pacientů se zárodečnou mutací v genu *MSH2* [senzitivita 99,8% (95%CI, 88,5-93,1)]. Dále bylo pomocí imunohistochemické analýzy proteinů MLH1/MSH2 správně označeno 191 z 244 vysoce nestabilních nádorů od pacientů bez zárodečné mutace v genech *MLH1/MSH2* [senzitivita 78,3% (95%CI, 75,1-81,5)] a 1262 z 1382 nádorů s vysoce nestabilními mikrosatelity od pacientů bez provedené mutační analýzy [senzitivita 91,3% (95%CI, 90,4-92,2%)]. Specifita metody byla 99,4% (95%CI, 99,2-99,6) (31).

V dosud nejrozsáhlejší studii, která zahrnovala 1119 pacientů, mělo 58 (5,2%) nádorů normální imunohistochemický nálezh exprese proteinů MLH1 a MSH2, přestože vykazovaly vyso-

ký stupeň nestability mikrosatelitů. Asi 6% nosičů patogenních mutací (14 z 230) nebylo zachyceno pomocí imunohistochemie. Pozitivní prediktivní hodnota a specifita imunohistochemického vyšetření s ohledem na výsledek vyšetření nestability mikrosatelitů byly v této studii 99,1% a 99,6%. Nejvyšší pravděpodobnost nálezu patogenní mutace byla u pacientů, jejichž nádory byly vysoce nestabilní a ztrácely expresi některého z proteinů (32).

Specifita imunohistochemické detekce proteinu hMSH6 není tak vysoká jako u proteinů MLH1 a MSH2. Je popisována konkomitantní ztráta exprese proteinu MSH6 s proteinem MSH2 v nádorech pacientů se zárodečnou mutací genu *MSH2*. Toto pozorování je vysvětlováno skutečností, že tyto dva proteiny spolu vytváří funkční heterodimer v komplexu MutS α a porucha syntézy proteinu MSH2 vede k nestabilitě proteinu MSH6 (33, 34). Přes nízkou specifitu je doporučováno, aby protein MSH6 byl zařazen do spektra proteinů vyšetřovaných při podezření na deficit MMR, neboť vyšetření může odhalit nádory vzniklé na podkladě zárodečné mutace genu *MSH6*.

Pomocí metody imunohistochemické detekce exprese proteinů MLH1, MSH2, MSH6 a PMS2 je možné relativně snadno a levně vyhledávat jedince se zárodečnými mutacemi v příslušných genech. Metoda je v porovnání s vyšetřením nestability mikrosatelitů vysoce specifická, avšak o něco méně senzitivní. Ani jedna z obou metod však nedokáže rozlišit, zda vyřazení systému oprav chybného párování bází je podmíněno zárodečným či somatickým. K tomuto rozlišení je nutná mutační analýza genu.

Genetická konzultace a prediktivní testování.

Každé genetické testování, tedy také genetické testování pro podezření na Lynchův syndrom, má být spojeno s řádnou genetickou konzultací a provedeno jen s písemným informovaným souhlasem pacienta. V České republice provádí genetickou konzultaci specialista v oboru lékařské genetiky. Genetik posoudí osobní a rodinnou anamnézu pacienta (genealogii) a dostupnou zdravotnickou dokumentaci, provede odhad genetického rizika u pacienta a jeho příbuzných, informuje pacienta o rizicích a vyšetřeních, jimiž je možno predikci rizika upřesnit - zpravidla potvrdit nebo vyloučit nosičství vloh prediktivním testem. Genetik zajistí molekulárně genetickou analýzu, pokud s ní pacient souhlasí, interpretuje výsledek a organizuje následnou péči o pacienta. Současná legislativa nedovoluje, aby příbuzné v riziku informoval lékař, musí to učinit pacient sám. Také u příbuzných, kteří na základě této informace mají zájem o prediktivní testování, organizuje genetik konzultaci, molekulárně genetické vyšetření, interpretaci výsledku a následnou klinickou péči, včetně případné pomoci klinického psychologa. Doporučuje se, aby se genetické testování pro Lynchův syndrom, zejména testování prediktivní, provádělo u dospělých, t.j. od 18 let věku. Ve vzácných případech manifestace karcinomu u adolescenta nebo při podezření na homozygotitu či složenou heterozygotitu u dítěte je žádoucí provést vyšetření dříve, samozřejmě jen s informovaným souhlasem zákonného zástupce.

Dlouhodobé sledování nemocných a osob v riziku.

Podrobný rozbor doporučení klinického sledování je nad rámec tohoto sdělení, pro úplnost je však třeba se o něm zmínit. Původní doporučení dlouhodobého klinického sledování nemocných s Lynchovým syndromem formulovala Mezinárodní kolaborativní skupina pro HNPCC (Tabulka 5). Dlouhodobé klinické sledování pacientů podle dále uvedených doporučení se vztahuje a) na nemocné s CRC a molekulárně potvrzeným Lynchovým syndromem, b) nemocné s CRC a významnou pozitivní rodinnou anamnézou, kteří dosud nebyli testováni, nebo testování odmítli, nebo u nich nebyla mutační analýza úspěšná, c) na pozitivně testované příbuzné, t.j. dosud asymptomatické nosiče patogenní mutace. Pravidelný kolonoskopický screening prokazatelně snížil mortalitu ve Finské studii (35). Různá pracoviště doporučují mezi

kolonoskopiemi 1-3letý interval. Přínos navrženého gynekologického sledování byl některými studiemi zpochybněn (36, 37). Uvažuje se, že gynekologický screening by mohl být méně častý a více zaměřený na rizikovější skupinu, jako jsou nosičky mutace genu MSH6.

U ostatních nemocných s CRC a u osob dosud zdravých s různou mírou rodinné zátěže je doporučeno sledování, jehož intenzita je odstupňována podle míry empirického rizika (38).

Další směry ve výzkumu a v diagnostice.

Lynchův syndrom je stále předmětem výzkumu. Jsou hledány molekulární příčiny onemocnění u negativně testovaných pacientů, jak zlepšením metod mutačního screeningu, tak snahou o identifikaci nových kauzálních genů pro HNPCC. Některé nádorové charakteristiky u dosud negativně testovaných osob, nejnapádnější absence MSI, svědčí pro jiný mechanismus kan-

cerogenese u těchto nemocných. Různými metodami je zkoumán etiopatogenetický význam mutací MMR genů, které vedou k záměně aminokyseliny, s cílem zpřesnit interpretaci výsledku vyšetření. Jsou hledány nádorové charakteristiky (metylace promotoru genu MLH1, somatické mutace genu BRAF) které by odlišily sporadický CRC od nádoru vzniklého v rámci HNPCC, zejména u velmi mladých nemocných se sporadickým CRC. Odlišení je významné pro predikci rizika u příbuzných těchto pacientů. Pokračuje se v zlepšování zobrazovacích metod, zlepšení terapie - optimalizace času a rozsahu chirurgické terapie, včetně profylaktických výkonů, optimalizace dlouhodobého sledování. Vše je vedeno snahou zlepšit prognózu nemocných s Lynchovým syndromem.

Poděkování
Podpořeno grantem IGA MZ ČR NR/8294-3.

Tabulka 1:Amsterdamská kritéria I (39)

1. V rodině jsou alespoň tři pacienti s karcinomem tlustého střeva, jeden z nich je příbuzný prvního stupně ostatních dvou
2. Jsou postiženy alespoň dvě generace
3. Aspoň jeden nemocný byl mladší padesáti let v době diagnózy
4. Nádor byl verifikován patologem
5. Je vyloučena familiární adenomatózní polypóza

Tabulka 2: Amsterdamská kritéria II (39)

1. V rodině jsou alespoň tři příbuzní s karcinomem sdruženým s HNPCC (kolorektální karcinom, karcinom endometria, tenkého střeva, ureteru a ledvinné pánvičky), jeden z nich je příbuzný prvního stupně ostatních dvou
2. Jsou postiženy alespoň dvě generace
3. Aspoň jeden nemocný byl mladší padesáti let v době diagnózy
4. Nádor byl verifikován patologem
5. Je vyloučena familiární adenomatózní polypóza

Tabulka 3: Revidovaná Bethesda vodítka pro testování MSI v nádorech (24)

1. Kolorektální karcinom diagnostikovaný u pacienta mladšího 50 let
2. Přítomnost synchronních nebo metachronních karcinomů střeva nebo jiných nádorů sdružených s HNPCC (karcinom kolorekta, endometria, žaludku, tenkého střeva, ovaria, pankreatu, ureteru a pánvičky, biliárního traktu, mozku – glioblastom, kůže – adenomy sebaceo- sních žláz a keratoakanthomy), bez ohledu na věk
3. Kolorektální karcinom s histologií odpovídající vysokému stupni MSI (MSI-H), diagnostikovaný u pacienta mladšího 60 let (přítomnost tumor-infiltrujících lymfocytů, lymfocytární reakce podobná Crohnově chorobě, mucinózní charakter, medulární růst, prstencové (signet ring) buňky v nádoru)
4. Kolorektální karcinom diagnostikovaný u jednoho nebo více příbuzných prvního stupně s nádorem charakteristickým pro HNPCC, jeden z nádorů byl diagnostikován před 50. rokem věku
5. Kolorektální karcinom diagnostikovaný u dvou nebo více příbuzných prvního nebo druhého stupně s nádory sdruženými s HNPCC, bez ohledu na věk.

Tabulka 4: Doporučení pro molekulární analýzy u pacientů v riziku, splňujících Bethesda vodítka (24)

1. Optimálním přístupem při vyšetření je analýza MSI v nádoru nebo imunohistochemická analýza nádoru, následovaná testováním zárodečných mutací MSH2 a MLH1 genu u nemocných s prokázanou MSI-H v nádoru nebo se ztrátou exprese některého MMR genu
2. Po identifikaci mutace by měla být příbuzným v riziku doporučena genetická konzultace a pokud si přejí, mohou být testováni
3. Alternativní postup, není-li proveditelná analýza tkáně, je přikročit přímo k analýze zárodečných mutací MSH2 a MLH1 genů
4. Není-li zjištěna zárodečná mutace MMR genu u probanda s tumorem s MSI-H a/nebo klinickými projevy HNPCC, je výsledek genetického testu neinformativní. Pacienti a příbuzní v riziku by měli být konzultováni, jako kdyby byla diagnóza HNPCC potvrzena, a dlouhodobě sledováni jako při vysokém riziku.
5. Pacienti musí být ujištěni o důvěrnosti výsledků, aby byla zmírněna obava z možné diskriminace kvůli jejich genetické dispozici.

Tabulka 5: Doporučené klinické sledování u osob s HNPCC/rizikem HNPCC. Doporučení ICG HNPCC (40)

vyšetření	počátek sledování	interval
kolonoskopie	od 20 – 25 let	2 roky
gynekologické vyšetření:		
transvaginální sonografie		
CA-125	od 30 – 35 let	1 – 2 roky
gastroskopie	od 30 – 35 let	1 – 2 roky
rozbor moči		
sonografie močového traktu	od 30 – 35 let	1 – 2 roky
genetické testování	po 18. roce	

Literatura

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000, 100:57-70.
2. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 1990, 61:759-767.
3. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. Cell 1996, 87:159-170.
4. Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo, P. et al. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. N Engl J Med 1998, 338:1481-1487.
5. Mecklin JP, Järvinen HJ. Tumor spectrum in cancer family syndrome (here-

ditary nonpolyposis colorectal cancer). Cancer 1991, 68:1109-1112.
6. Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, et al. Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch repair genes. Int J Cancer 1999, 71:677-685.
7. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, et al. Ubiquitous somatic mutations in simple repeat sequences reveal a new mutator mechanism for oncogenesis. Nature 1993, 363:558-561.
8. Peltomäki P, Aaltonen LA, Sistonen P, et al. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. Science 1993, 260:810-812.
9. Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS et al, Cell 1993,75:1027-1038.
10. Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, et al. Mutations of a MutS homolog in hereditary non-polyposis colorectal cancer. Cell 1993, 75:1215-1225.

11. Peltomäki P, Vasen H. Mutations associated with HNPCC predisposition - Update of ICG-HNPCC/InSiGHT mutation database. *Dis Markers* 2004, 20:269-276.
12. Lindblom A, Tannergrfd P, Werelius B, Nordenskjöld. Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary non- polyposis colon cancer. *Nat. Genet.*, 1993, 5:279-282.
13. Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polypoidis colon cancer. *Nature* 1994, 371:75-80.
14. Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei Y-F. Mutation of a mutL homolog is associated with hereditary colon cancer. *Science* 1994, 263:1625-1629.
15. Drummond JT, Li G-M, Longley MJ, Modrich P. Isolation of an hMSH2-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells. *Science* 1995, 268:1909-1912.
16. Palombo F, Gallinari P, Iaccarino I, et al. GTBP, a 160- kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells. *Science* 1995, 268:1912-1914.
17. Akiyama Y, Sato H, Yamada T, et al. Germ-line mutation of the hMSH6/GTBP gene in an atypical hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindred. *Cancer Res* 1997;57:3920-3923.
18. Miyaki M, Konishi M, Tanaka K, et al. Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 1997, 17:271-272.
19. Nakagawa H, Lockman JC, Frankel WL, et al. Mismatch repair gene PMS2: Disease-causing germline mutations are frequent in patients whose tumors stain negative for PMS2 protein, but paralogous genes obscure mutation detection and interpretation. *Cancer Res* 2004, 64:4721-4727.
20. Wu Y, Berends MJW, Sijmons RH, et al. A role for MLH3 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet*, 2001, 29:137-138.
21. Hienonen T, Laiho P, Salovaara R, et al. Little evidence for involvement of MLH3 in colorectal cancer predisposition. *Int J Cancer* 2003, 106:292-296.
22. Ricciardone MD, Ozcelik T, Cevher B, et al. Human MLH1 deficiency predisposes to hematological malignancy and neurofibromatosis type I. *Cancer Res* 1999, 59:290-293.
23. Raevaara TE, Gerdes AM, Lonnqvist KE et al. HNPCC mutation MLH1 P648S makes the functional protein unstable, and homozygosity predisposes to mild neurofibromatosis type I. *Genes Chromosomes Cancer* 2004, 40:261-265.
24. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, et al. Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004, 96:261-268.
25. Schouten JP, McElgun CJ, Waaijer R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiple ligation-dependent probe amplification. *Nucl Acids Res* 2002, 30:e57.
26. Wu Y, Nystrom-Lahti M, Osinga J, et al. MSH2 and MLH1 replication error-positive colorectal carcinoma as assessed by two-dimensional DNA electrophoresis. *Genes Chromosomes Cancer* 1997, 18:269-278.
27. Guerrette S, Wilson T, Gradia S, Fishel R. Interactions of human hMSH2 with hMSH3 and hMSH2 with hMSH6: examination of mutations found in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Mol Cell Biol* 1999, 18:6616-6623.
28. Ellison AR, Lofing J, Bitter GA. Functional analysis of human MLH1 and MSH2 missense variants and hybrid human-yeast MLH1 proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Hum Mol Genet*, 2001, 10:1889-1900.
29. Trojan J, Zeuzem S, Randolph A, et al. Functional analysis of hMLH1 variants and HNPCC-related mutations using a human expression system. *Gastroenterology* 2002, 122:211-219.
30. Raevaara TE, Korhonen MK, Lohi H, et al. Functional significance and clinical phenotype of nontruncating mismatch repair variants of MLH1. *Gastroenterology* 2005, 129:537-549.
31. Plevová P, Křepelová A, Papežová M, et al. Immunohistochemical detection of the hMLH1 and hMSH2 proteins in hereditary non-polyposis colon cancer and sporadic colon cancer. *Neoplasma* 2004, 51:275-284.
32. Engel C, Forberg J, Holinski-Feder E, et al. Novel strategy for optimal sequential application of clinical criteria, immunohistochemistry and microsatellite analysis in the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Int J Cancer* 2006, 118:115-122.
33. Chang DK, Ricciardiello L, Goel A, et al. Steady-state regulation of the human DNA mismatch repair system. *J Biol Chem* 2000, 275:18424-18431.
34. Plaschke J, Kruger S, Pistorius S, et al. Involvement of hMSH6 in the development of hereditary and sporadic colorectal cancer revealed by immunostaining is based on germline mutations, but rarely on somatic inactivation. *Int J Cancer* 2002, 97:643-648.
35. Jarvinen HJ, Aarnio M, Mustonen H, et al. Controlled 15- year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Arch Intern Med* 2000, 163:829-834.
36. Boks DES, Trujillo AP, Voogd AC, et al. Survival analysis of endometrial carcinoma associated with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Int J Cancer* 2002, 102:198-200.
37. Dove-Edwin I, Boks D, Goff S, et al. The outcome of endometrial carcinoma surveillance by ultrasound scan in women at risk of hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma and familial colorectal carcinoma. *Cancer* 2002, 94:1708-1712.
38. Winawer S, Fletcher R, Rex D, et al. Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale - update based on new evidence. *Gastroenterology*, 2003, 124:544- 660.
39. Vasen HFA, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on hereditary nonpolyposis colorectal cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991, 34:424- 425.
40. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999, 116:1453-1456.