

Več obrazov sindroma Lynch: odkrivanje zarodnih mutacij v genu MSH6

Uršula Prosenec Zmrzljak, Srdjan Novaković

Povzetek

Na Oddelku za molekularno diagnostiko Onkološkega inštituta Ljubljana smo uvedli testiranje zarodnih mutacij v genu *MSH6*. Mutacije v tem genu so povezane z Lynchevim sindromom in predstavljajo povečano verjetnost za nastanek raka na debelem črevesu in danki, raka maternične sluznice, raka jajčnikov in drugih vrst raka. Za testiranje prisotnosti mutacij v genu *MSH6* uporabljamo metodo neposrednega sekvenciranja in metodo MLPA (ang. *multiplex ligation-dependent probe amplification*). S sekvenciranjem odkrivamo točkovne mutacije in manjše delecije ter insercije. Z metodo MLPA pa prisotnost večjih delecij in insercij v genu, oziroma delecijo celotnega gena. Mutacije v genu *MSH6* testiramo pri osebah, za katere se v postopku genetskega svetovanja pokaže večja verjetnost Lynchevega sindroma. Pravočasno odkrivanje mutacij v genih, povezanih z nastankom raka, je za nosilce mutacij pomembno, saj je dokazana mutacija razlog za prilagojeno klinično spremljanje in preventivne ukrepe pri nosilcih mutacije.

Uvod

Lynchev sindrom je posledica mutacij v genih za popraviljanje DNA (MMR – ang.: *mis-match repair*) v zarodnih celicah. Največkrat so mutirani geni *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* in *PMS2*. Pri Lynchevem sindromu so heterozigotne mutacije prisotne v vseh celicah v organizmu (tudi v zarodnih spolnih celicah). To pomeni, da imajo potomci osebe z Lynchevim sindromom 50 % možnosti, da mutacijo podedujejo. Mutacije se pri Lynchevem sindromu dedujejo avtosomno dominantno. Osebe z Lynchevim sindromom so izpostavljene večjemu tveganju za nastanek različnih vrst raka [1]. Zaradi pogostega nastajanja raka na debelem črevesu in danki pri osebah s tem sindromom, so ga poimenovali tudi dedni nepolipozni rak debelega črevesa (HNPCC - ang. *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*). HNPCC ni povsem ustrezno poimenovanje in ga po mednarodnih priporočilih naj ne bi več uporabljali. Mutacije v genih MMR se lahko pojavijo tudi v somatskih celicah, kot posledica najrazličnejših mutagenih dejavnikov znotraj celic ali iz okolja. Mutacije v somatskih celicah se ne dedujejo. V tem prispevku se bomo omejili na zarodne mutacije v genu *MSH6*.

Bolniki z Lynchevim sindromom imajo najpogosteje mutirana gena *MLH1* (mutL homolog 1) in *MSH2* (mutS homolog 2). Delež bolnikov z mutacijami v enem od teh genov je skoraj 90 %. Mutacija v genu *MSH6* (mutS homolog 6) je prisotna v 9 do 10 % primerov bolnikov z Lynchevim sindromom, medtem ko so mutacije v genu *PMS2* zelo redke (manj kot 1 %) [2].

Tveganje za nastanek raka pri bolnikih z Lynchevim sindromom, ki imajo mutacijo v genu MSH6

Pri nosilcih zarodne mutacije v genu *MSH6* je doživljensko tveganje za razvoj raka debelega črevesa in danke pri moških 69 %, pri ženskah pa 30 %. Tveganje za razvoj raka debelega črevesa in danke je po 70. letu starosti izenačeno [3]. Tveganje za nastanek raka debelega črevesa in danke za nosilce zarodnih mutacij v *MSH6* je nižje v primerjavi s tveganjem pri nosilcih mutacij v *MLH1* in *MSH2* tako za ženske kot za moške. Nosilci zarodnih mutacij v *MSH6* sicer zbolevajo v povprečju pozneje kot nosilci mutacij v *MLH1* ali *MSH2*. Pri ženskah, nosilkah zarodnih mutacij v *MSH6*, je srednja starost ob diagnozi raka debelega črevesa in danke 57 let (za nosilke mutacije v *MLH1* 43 let in za nosilke mutacije v *MSH2* 44 let). Pri moških, nosilcih zarodnih mutacij v *MSH6*, pa je srednja starost ob diagnozi raka debelega črevesa in danke 55 let (za nosilce mutacij v *MLH1* 43 let in za nosilce mutacij v *MSH2* 44 let).

Pri ženskah, nosilkah zarodnih mutacij v *MSH6*, je tveganje za nastanek raka maternične sluznice 71 % do 70. leta. Doživljensko tveganje za nastanek raka maternične sluznice, kakor tudi srednja starost ob diagnozi, sta višji za nosilke zarodne mutacije v *MSH6* v primerjavi z nosilkami mutacij v *MLH1* in *MSH2*. Srednja starost ob diagnozi raka maternične sluznice je za nosilke mutacije v *MSH6* 54 let, za nosilke mutacije v *MLH1* 48 let in za nosilke mutacije v *MSH2* 49 let.

Tveganje za nastanek ostalih, s sindromom Lynch povezanih tumorjev, je nižje kot za nosilce mutacij v genih *MLH1* in *MSH2* [3].

Vloga MSH6 v celici

Gen *MSH6* se nahaja na kromosomu 2p16.3 in je sestavljen iz 10 eksonov. Alternativno ime gena je *GTBP* (ang. *G/T mismatch-binding protein*). Gen so sklonirali leta 1995, ko so Drummond s sod. [4] in Palombo s sod. [5] pokazali, da 160 kD protein *MSH6* sodeluje v heterodimernem kompleksu s 100 kD proteinom *MSH2*. Glede na sorodnost skevence so tako določili, da spada v MutS homologno družino proteinov. *MSH2* in *MSH6* tvorita MutS α kompleks, ki zazna enotočk-ovne mutacije in duplikacije dveh ali treh nukleotidov. Poleg MutS α kompleksa, *MSH2* skupaj z *MSH3* tvorita še MutS β kompleks. Ta zazna bolj zapletene spremembe na DNA, ki nastanejo zaradi večjega števila nepravilno parjenih baz v DNA. MutS kompleks objamejo DNA in po njej potujejo, ko zaznajo nepravilnost v parjenju baz, aktivirajo ostale prote- inske komplekse, vpletene v popraviljanje DNA (npr. MutL kompleks, v katerem sodeluje protein *MLH1*). Za pravilno delovanje MutS α kompleksa morata biti oba sodelujoča proteina *MSH6* in *MSH2* nepoškodovana oz. morata pravilno

delovati. V primeru mutacij v enem od genov, ki kodirata enega od obeh proteinov, nastane nedelujoč kompleks in zato se pojavi večje število naključnih mutacij v drugih genih (kar je lahko vzrok za začetek kancerogeneze).

Glede na funkcijo, ki jo imajo geni MMR v celici, ne preseneča, da so mutacije v genih MMR pogosto vzrok za nastanek t. i. mikrosatelitne nestabilnosti (MSI - ang. *microsatellite instability*). Zato lahko v onkološki diagnostiki, na osnovi dokazane MSI, z veliko verjetnostjo sklepamo, da so v genih MMR prisotne mutacije. Pri osebah z Lynchvim sindromom je MSI prisotna pri 85 do 92 % oseb, ki so zbolele za rakom debelega črevesa in danke, ter vsaj 75 % oseb z rakom maternične sluznice. Pri 5 do 10 % teh primerov lahko pričakujemo mutacije v genu *MSH6* [6].

Metode za zaznavanje mutacij v genu *MSH6*

Na Oddelku za molekularno diagnostiko Onkološkega inštituta Ljubljana določamo mutacije v genu *MSH6* pri osebah, za katere se v postopku genetskega svetovanja pokaže večja verjetnost Lynchevega sindroma. Ker iščemo zarodne mutacije v genu *MSH6*, testiranje opravimo na vzorcu DNA iz periferne krvi.

Velike delecije v genu *MSH6* določamo z metodo MLPA (metoda hkratnega pomnoževanja od ligacije odvisnih sond) [7]. Z metodo MLPA lahko v genu zaznamo insercije in delne ter popolne delecije.

Točkovne mutacije v genu *MSH6* določamo z metodo neposrednega sekvenciranja vseh eksonov gena. Dele gena *MSH6* pomnožimo z metodo PCR, pri čemer uporabljamo specifične oligonuklotidne začetnike za posamezne eksonne gena *MSH6*. PCR-produkte sekvenciramo s sekvencatorjem ABI3500 in odčitamo morebitne točkovne spremembe v primerjavi z referenčnim zaporedjem gena *MSH6*. Pri mutacijah v genu *MSH6* (tabela 1) se največkrat spremeni nukleotidno zaporedje, ki povzroči krajšo obliko proteina (zapis za aminokislino se spremeni v stop kodon), v redkih primerih pa pride do spremembe nukleotida na mestu, ki je pomembno za izrezovanje intronov (ang. *splice donor/acceptor site*).

V nekaterih primerih se spremeni nukleotidno zaporedje, kar na ravni proteina vodi do spremembe aminokislinske. Če ni potrjeno, da takšna sprememba lahko povzroči zmanjšano aktivnost proteina, potem takšno spremembo poimenujemo neopredeljena variacija (ang. *unknown variant*). Primer takšne neopredeljene variacije je prikazan na sliki 1.

Slika 1: Sprememba DNA-zaporedja v intronski regiji c.3646+29_3646+32dupCTAT. Opisana je v podatkovni bazi LOVD, kot neopredeljena variacija.

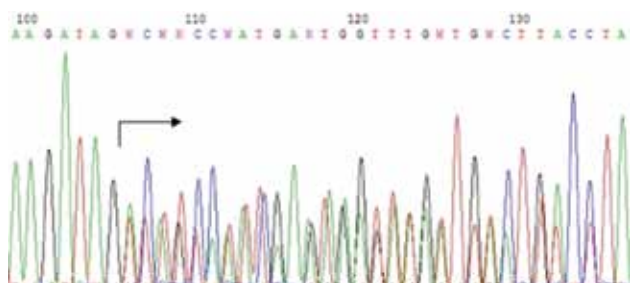


Tabela 1: Nekatere najpogostejše znane mutacije v genu *MSH6*, ki povzročijo krajšo obliko proteina ali napačno izrezovanje intronov. *stop kodon, fs ang. - frame shift – premik bralnega okvirja.

Aminokislinska sprememba	Splice donor/acceptor site	Vir
p. Ser156*		[3, 8]
p. Lys218*		[3, 9]
p. Arg248*		[3, 8]
p. Glu272*		[9]
p. Arg379*		[9]
p. Cys426fs*		[3]
p. Arg482*		[3]
p. Tyr538*		[3]
p. Glu731*		[3, 8]
p. Arg911*		[3]
p. Glu939*		[9]
p. Arg1035*		[3]
p. Pro1087fs*		[3]
p. Phe1088fs*		[9]
p. Lys1092*		[9]
p. Ala939fs*		[9]
p. Glu1280*		[9]
p. Ser1329fs*		[3]
	"splice donor" ekson 4	[3]
	"splice acceptor" ekson 5	[3]
	"splice acceptor" intron 8	[8]
	"splice donor" ekson 9	[8]

Pri določanju vpliva sprememb v genu *MSH6* na delovanje proteina *MSH6* se opiramo na strokovne baze podatkov (LOVD, HGMD, BIC in druge), ki združujejo preverjene podatke o vplivu sprememb v zaporedju DNA na delovanje proteinov.

Zaključek

Zarodne mutacije v genih, ki so odgovorni za popraviljanje napak na DNA (genih MMR), so pomemben dejavnik tveganja za nastanek različnih vrst raka. Zato nam informacija o podedovanih mutacijah v genih MMR omogoča, da pri nosilcih teh mutacij s pravilnim spremljanjem in kliničnim ukrepanjem preprečimo nastanek raka ali ga odkrijemo v zgodnejših fazah. Osebe z Lynchvim sindromom spadajo v skupino oseb z večjo ogroženostjo za različnimi vrstami raka zaradi mutacij v genih MMR, kot so *MLH1*, *MSH2* in *MSH6*. Mutacije v genu *MSH6* so redkejšje kot v genih *MLH1* in *MSH2* in predstavljajo 5 do 10 % mutacij v genih MMR pri osebah z Lynchvim sindromom. Zato smo na Oddelku za molekularno diagnostiko Onkološkega inštituta Ljubljana pred leti začeli z določanjem germinalnih mutacij v genih *MLH1* in *MSH2*, s koncem 2012 pa smo testiranje razširili tudi na mutacije v genu *MSH6*. Mutacije v genu *MSH6* testiramo, tako kot tudi v genih *MLH1* in *MSH2*, pri osebah, za katere se v postopku genetskega svetovanja pokaže večja verjetnost Lynchevega sindroma.

Viri

1. Lynch, H. T., Lynch, P. The cancer-family syndrome: a pragmatic basis for syndrome identification. *Dis. Colon Rectum* 1979. 22: 106-110.
2. Karran, P., Offman J., Bignami M. Human mismatch repair, drug-induced DNA damage, and secondary cancer. *Biochimie* 2003. 85: 1149-1160.
3. Hendriks, Y. M., et. al. Cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer due to MSH6 mutations: impact on counseling and surveillance. *Gastroenterology* 2004. 127: 17-25.
4. Drummond, J. T., Li, G.-M., Longley, M. J., Modrich, P. Isolation of an hMSH2-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells. *Science* 1995. 268: 1909-1912.
5. Palombo, F., Gallinari, P., Iacchino, I., Lettieri, T., Hughes, M., D'Arrigo, A., Truong, O., Hsuan, J. J., Jiricny, J. GTBP, a 160-kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells. *Science* 1995. 268: 1912-1914.
6. Thibodeau, S.N., et. et. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993. 260: 816-819.
7. Schouten, J.P., et al., Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*, 2002. 30(12): p. e57.
8. Meijers-Heijboer, H., et al. Familial endometrial cancer in female carriers of MSH6 germline mutations. *Nature genetics* 1999. 23: 142-144.
9. Kets, C.M., et. al. Very low prevalence of germline MSH6 mutations in hereditary non-polyposis colorectal cancer suspected patients with colorectal cancer without microsatellite instability. *British Journal of Cancer* 2006. 95: 1678-1682.

