

MIKROSATELITNA NESTABILNOST PRI KOLOREKTALNIH KARCINOMIH

Metka Ravnik-Glavač

Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani

Povzetek

Mikrosatelitna nestabilnost (angl. kratica MSI) je fenomen, za katerega so značilne majhne delecije ali insercije v kratkih ponavljajočih se zaporedjih v tumorski DNA v primerjavi z normalno DNA istega človeka. Približno 10% vseh kolorektalnih karcinomov je mikrosatelitno nestabilnih, medtem ko je MSI značilnost kar več kot 90% tumorjev bolnikov s sindromom Lynch. Bolniki z MSI tumorji imajo boljšo prognozo, vendar zdravljenje s kemoterapijo s fluorouracilom pri njih ni uspešno. MSI status tumorjev pomeni tudi prvo selekcijsko stopnjo pri presejanju sindroma Lynch. Za določitev MSI smo razvili nov multipleksni sistem za pomnoževanje mikrosatelitne DNA s petimi kvazi-monomorfnimi markerji. Nadaljnja strategija za presejanje sindroma Lynch, ki temelji izključno na molekularnogenetskih spoznanjih (metilaciji promotorja gena MLH1 in mutacijska analiza nekaterih genov DNA popravljalnega mehanizma), je stopnjo določitve podedovanih mutacij povečala s približno 65% na 87% in nam omogočila identificirati nove bolnike s sindromom Lynch. Sindrom Lynch je najpogostejša avtosomno dominantno dedovana predispozicija za kolorektalni karcinom. Nosilci mutacije imajo 70-80% doživljenjsko tveganost, da razvijejo sindrom Lynch, zato je potrebno, da v družinah, kjer je ta sindrom prisoten, ugotovimo, kdo od družinskih članov nosi mutacijo. Genetsko svetovanje in genetsko testiranje rizičnih sorodnikov, spremljanje in preventiva s kolonoskopijo in kemoprevencijo omogočajo, da bolezen zasledimo v zgodnji še ozdravljivi obliki, kar je povezano z zmanjšanjem stroškov zdravljenja in najpomembnejše s povečanjem preživetja bolnikov.

Predstavitev

Mikrosatelitna nestabilnost (angl. kratica MSI za Microsatellite Instability) je fenomen, katerega značilnost so delecije ali insercije znotraj tandemskih ponovitev v tumorski DNA v primerjavi z normalno DNA istega posameznika. Mikrosatelitno nestabilnost so najprej opazili pri kolorektalnem karcinomu, kjer je bilo približno 10% tumorjev mikrosatelitno nestabilnih. Z ozirom na mikrosatelitno stanje lahko tumorje razvrstimo v tri skupine: visiko mikrosatelitno nestabilni (MSI-H) tumorji so nestabilni na vsaj 40% testiranih marker-

jih; nizko nestabilni (MSI-L) tumorji izražajo mikrosatelitno nestabilnost na manj kot 40% testiranih markerjih; mikrosatelitno stabilni (MSS) tumorji niso nestabilni na nobenem markerju. MSI tumorji predstavljajo tudi posebno skupino tumorjev, ki ima specifične klinično-patološke značilnosti, bolniki s to vrsto tumorjev pa imajo ugodnejšo prognozo.

80-90% vseh mikrosatelitno nestabilnih kolorektalnih tumorjev je sporadičnih, ostali pa pripadajo bolnikom z dednim nepolipoznim kolorektalnim karcinomom, imenovanim tudi sindrom Lynch.

Sindrom Lynch je najpogostejša avtosomno dominantno dedovana predispozicija za nastanek kolorektalnega karcinoma. Najobičajnejši način diagnosticiranja te bolezni je na osnovi družinske anamneze po amsterdamskih kriterijih I in II. V družini s sindromom Lynch so vsaj trije bolniki s kolorektalnim karcinomom ali z drugim karcinomom, povezanim s sindromom Lynch (materice, želodca, ovarija, hepatobiliarnega in urinarnega trakta, možganov ali kože) v dveh zaporednih generacijah in vsaj en bolnik je mlajši od 50 let. Tumorji bolnikov s sindromom Lynch imajo visoko stopnjo mikrosatelitne nestabilnosti, bolniki pa imajo podedovano mutacijo v enem od genov, ki kodirajo proteine sistema za popraviljanje napak pri podvojevanju DNA (ang. kratica MMR za Mismatch Repair). Pri analizi mutacij v genih MMR so ugotovili, da pri velikem številu bolnikov iz družin, ki so ustrezale amsterdamskim kriterijem, niso odkrili podedovane mutacije, po drugi strani pa so bile mutacije odkrite pri bolnikih iz družin, ki niso izpolnjevale amsterdamskih kriterijev. Zato je bilo potrebno razviti novo metodologijo za odkrivanje družin s sindromom Lynch. Tukaj opisujemo našo strategijo za presejanje sindroma Lynch, ki temelji izključno na molekularnogenetskih spoznanjih in je stopnjo določitve podedovanih mutacij povečala s približno 65% na 87%.

Molekularnogenetski pristop za odkrivanje visoko mikrosatelitno nestabilnih tumorjev in sindroma Lynch

Molekularnogenetska strategija temelji na določanju mikrosatelitne nestabilnosti v novoodkritih primarnih kolorektalnih karcinomih. Določitev tumorjev, ki so visoko mikrosatelitno nestabilni, je pomembna iz dveh vidikov: 1) omogoča odkrivanje posebne skupine sporadičnih MSI-H tumorjev. Bolniki s to vrsto tumorjev imajo boljšo prognozo in pri njih je uspešnejša drugačna kemoterapija, 2) predstavlja prvo stopnjo pri molekularni identifikaciji bolnikov s sindromom Lynch. Narejeno je bilo že veliko študij, da bi določili najprimernejši in najbolj občutljiveši set markerjev za odkrivanje visoko mikrosatelitno nestabilnih tumorjev, ki so vključevale tako dinukleotidne kot tudi mononukleotidne mikrosatelitne markerje. Izdelali smo metodologijo, ki temelji na hkratni analizi petih kvazimonomorfnih mononukleotidnih markerjev in pri kateri ni potrebno analizirati normalnega tkiva bolnikov. Testirali smo jo na 595 novoodkritih kolorektalnih karcinomih. 43 (7.2%) karcinomov je bilo visoko mikrosatelitno nestabilnih. Glavni molekularni vzrok mikrosatelitne nestabilnosti sporadičnih kolorektalnih karcinomov je hipermetilacija promotorka gena MLH1, karci-

nomov bolnikov s sindromom Lynch pa mutacije v genih MMR. Vsem MSI-H tumorjem smo zato najprej določili stanje metilacije promotorja gena MLH1. 8/43 (18.6%) tumorjev ni imelo hipermetilacije, zato smo jih nadalje analizirali na prisotnost mutacij v genih MMR. V 7/8 (87.5%) tumorjih smo odkrili mutacijo in s tem prisotnost sindroma Lynch.

Smiselnost molekularnogenetskega določanja sindroma Lynch

Izbira molekularnogenetskega pristopa za odkrivanje družin s sindromom Lynch je pomembna iz več razlogov:

- 1) V številnih deželah ni mogoč dostop do registrov dednih oblik raka.
- 2) Tudi, če registri obstajajo, so številne mutacije v genih MMR našli v družinah, ki niso izpolnjevale amsterdamskih kriterijev.
- 3) Ne glede na to, ali družina izpolnjuje amsterdamske kriterije, končno diagnozo sindroma Lynch lahko postavimo šele z odkritjem mutacije.

Potreba po populacijskem presejanju mikrosatelitno nestabilnih kolorektalnih karcinomov in sindroma Lynch postaja vse pomembnejša zaradi uspehov v preventivi po kolonoskopskih pregledih in obetov v kemopreventivi. V 15-letnem projektu, kjer so pri rizičnih posameznikih in nosilcih mutacije izvajali kolonoskopijo na vsake 3 leta, so več kot za polovico zmanjšali rizičnost za kolorektalni karcinom in zmanjšali umrljivost za približno 65%. Ker imajo nosilci mutacije 70-80% doživljenjsko tveganje za kolorektalni karcinom, je smiselno določiti družinske člane s prisotno mutacijo. Številne novejšje študije so pokazale, da je odločitev za genetsko testiranje precej pogosta, če genetsko svetovanje temelji na osebni in pozorni posvetu. Po molekularnogenetskem presejanju je mogoče spremljati družine s sindromom Lynch s preventivnimi pregledi in posegi za preprečevanje razvoja bolezni.

Zaključek

Približno 10% sporadičnih kolorektalnih karcinomov in več kot 90% kolorektalnih karcinomov bolnikov s sindromom Lynch je mikrosatelitno nestabilnih. Zaradi dovolj dobrega poznavanja molekularnih mehanizmov in razvoja občutljivih in dovolj hitrih metodologij lahko zaključimo, da je postalo smiselno populacijsko presejanje mikrosatelitno nestabilnega kolorektalnega karcinoma in sindroma Lynch na molekularno genetski osnovi. Bolniki z MSI-H tumorji imajo boljšo prognozo, ne glede na status tumorja ob diagnozi v primerjavi z bolniki z MSS tumorji in pri njih so uspešnejši drugačni načini kemoterapije. Pokazali smo, da bolnike s sindromom Lynch lahko uspešno določimo na osnovi analize MSI, metilacijskega statusa promotorja gena MLH1 in nadaljne mutacijske analize genov MMR. Genetsko svetovanje in genetsko testiranje rizičnih sorodnikov, spremljanje in preventiva s kolonoskopijo in kemoprevencijo omogočajo, da bolezen zasledimo v zgodnji še ozdravljivi

obliki, kar je povezano z zmanjšanjem stroškov zdravljenja in najpomembnejše s povečanjem preživetja bolnikov.

Viri in literatura

1. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993; 363(6429): 558-61.
2. 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* 1998; 58(22): 5248-57.
3. Ravnik-Glavač M, Potočnik U, Glavač D. Incidence of germline hMLH1 and hMSH2 mutations (HNPCC patients) among newly diagnosed colorectal cancers in a Slovenian population. *J Med Genet* 2000; 37(7):533-6.
4. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999; 116(6):1453-6.
5. Nystrom-Lahti M, Wu Y, Moisio AL et al. DNA mismatch repair gene mutations in 55 kindreds with verified or putative hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 1996; 5(6):763-9.
6. Suraweera N, Duval A, Reperant M, et al. Evaluation of tumour microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* 2002; 123(6): 1804-11.
7. Aktan-Collan K, Mecklin JP, de la Chapelle A, Peltomaki P, Uutela A, Kaariainen H. Evaluation of a counselling protocol for predictive genetic testing for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 2000; 37 (2):108 –13.