

Potenciál novej generácie sekvenovania pri skríningu Lynchovho syndrómu

Ondrej Pös, Mária Haršanyová, Tomáš Szemes
Vedecký park Univerzity Komenského, Bratislava

Lynchov syndróm je najčastejšou príčinou dedičnej formy kolorektálneho karcinómu, ktorý má celosvetovo najväčšiu incidenciu práve v slovenskej populácii mužov. Molekulárne metódy, ktoré sa v súčasnej klinickej praxi na Slovensku využívajú pri vyšetrovaní Lynchovho syndrómu, majú viacero limitácií, preto nie vždy sú správne diagnostikovaní všetci pacienti. Viaceré štúdie naznačujú, že pre skríning Lynchovho syndrómu majú veľký potenciál sekvenačné technológie novej generácie. Pri testovaní táto metóda preukázala vysokú senzitivitu i efektivitu a odporúča sa jej zavedenie do klinickej praxe, pretože by mala zlepšiť výsledky pacientov a pomôcť systému zdravotnej starostlivosti.

Kľúčové slová: Lynchov syndróm, kolorektálny karcinóm, sekvenovanie novej generácie

Potential of next generation sequencing in screening of Lynch syndrome

Lynch syndrome is the most common cause of hereditary colorectal carcinoma and the population of males in Slovakia have the highest incidence worldwide. Molecular methods used for examining of Lynch syndrome in current clinical practice in Slovakia have several limitations. Therefore, some patients are not always correctly diagnosed. Several studies suggest that next generation sequencing has significant potential for screening of Lynch syndrome. This method showed high sensitivity and efficiency, and its implementation into clinical practice is recommended as it should improve outcomes of patients and optimize health care system.

Keywords: Lynch syndrome, colorectal cancer, next generation sequencing

NewsLab, 2018; roč. 9 (2): 125 – 127

Lynchov syndróm

Lynchov syndróm (OMIM: #120435) (LS) je autozomálne dominantné dedičné ochorenie spôsobené heterozygotnými zárodočnými mutáciami v génoch mutL homolog 1 (*MLH1*), mutS homolog 2 (*MSH2*), mutS homolog 6 (*MSH6*) a PMS1 homolog 2 (*PMS2*), ktoré sa podieľajú na DNA mismatch opravách (MMR; *mismatch repair*). Okrem uvedených mutácií však boli opísané mutácie v géne pre adhezívnu molekulu epiteliálnych buniek (*EPCAM*), ktoré spôsobujú epigenetický *silencing* susediaceho MMR génu *MSH2* (**graf 1**)⁽¹⁾. MMR je evolučne konzervovaný proces, ktorý opravuje chyby spôsobené DNA polymerázou počas replikácie genómu⁽²⁾. Mutácie v génoch pre MMR spôsobujú poruchy *mismatch* opravného systému, výsledkom čoho je akumulácia spontánnych mutácií v DNA⁽³⁾. Genetické analýzy ukázali, že u pacientov s LS je vysoká frekvencia inzerčno/delečných mutácií, ktoré vznikajú v jednoduchých sekvenčných opakovaníach (mikrosatelitoch). Obvykle sa tieto mutácie prejavujú ako zmeny v dĺžke krátkych sekvenčných opakovaní DNA, čo je fenomén známy tiež ako mikrosatelitová instabilita (MSI)⁽⁴⁾.

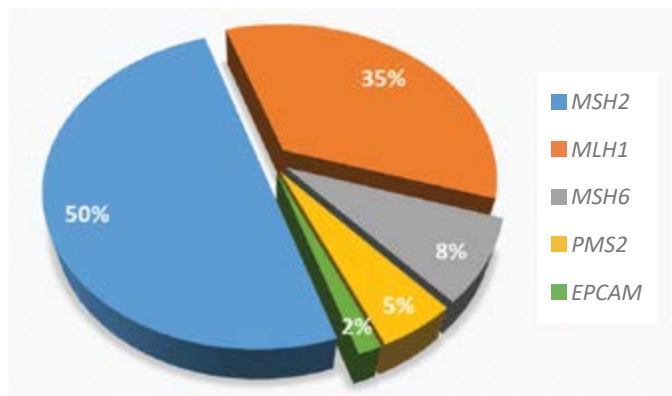
LS sa prejavuje ako predispozícia na rôzne typy rakoviny. Pacienti s týmto syndrómom majú výrazne zvýšené riziko rozvoja kolorektálneho karcinómu, rakoviny endometria, ale aj iných nádorových ochorení vrátane rakoviny žalúdka, vaječníkov, tenkého čreva, močových ciest a iných (**graf 2**)^(5,6). Na označenie tohto syndrómu sa od roku 1984 začal používať názov hereditárny nepolypózny kolorektálny karcinóm, tento termín sa však považuje za nesprávny, keďže súčasťou

LS môžu byť nádory z mimočrevných oblastí⁽³⁾. LS je hlavnou príčinou dedičnej formy kolorektálneho karcinómu, ktorý patrí medzi najčastejšie príčiny úmrtia. Populačné údaje z roku 2012 ukázali, že tento typ karcinómu je tretím najčastejším rakovinovým ochorením a práve slovenská populácia mužov má najväčšiu incidenciu tohto ochorenia na svete⁽⁷⁾.

Diagnostické postupy

Na identifikáciu rodín s rizikom LS sa využívajú amsterdamské kritériá a revidované bethesdské smernice, ktoré sú založené na poznatkoch o rodinnej anamnéze a veku v čase stanovenia diagnózy⁽⁸⁾. Pacienti, ktorí spĺňajú tieto kritériá, sú odporučeniami na analýzu MSI v nádorovom tkanive prostredníctvom molekulárnych metód ako PCR a imunohistochemia (IHC)⁽⁹⁾. Princíp IHC spočíva v značení MMR proteínov pomocou protilátok. Ak je nádorové tkanivo málo zafarbené, znamená to, že vo vzorke je nedostatok MMR proteínov a poukazuje to na prítomnosť mutácie v prislúchajúcom MMR géne. Limitáciou IHC metódy sú patologické mutácie, ktoré dokážu znefunkčňovať kódovaný proteín bez toho, aby ovplyvnili jeho antigenicitu. V takomto prípade vznikne falošne pozitívny výsledok a pre správnu interpretáciu je potrebná analýza pomocou PCR⁽¹⁰⁾. Na stanovenie stupňa MSI pomocou PCR sa využíva analýza dvoch mononukleotidových (BAT25, BAT26) a troch dinukleotidových (D2S123, D5S346, D17S250) sekvenčných opakovaní. Ak vykazujú instabilitu dva alebo viac z týchto markerov, nádor sa klasifikuje ako MSI-H (*High-frequency MSI*). Ak iba jeden z markerov vykazuje instabilitu,

Graf 1. Frekvencia mutácií, ktoré spôsobujú deficienciu mismatch opravného systému u pacientov s Lynchovým syndrómom⁽¹⁾

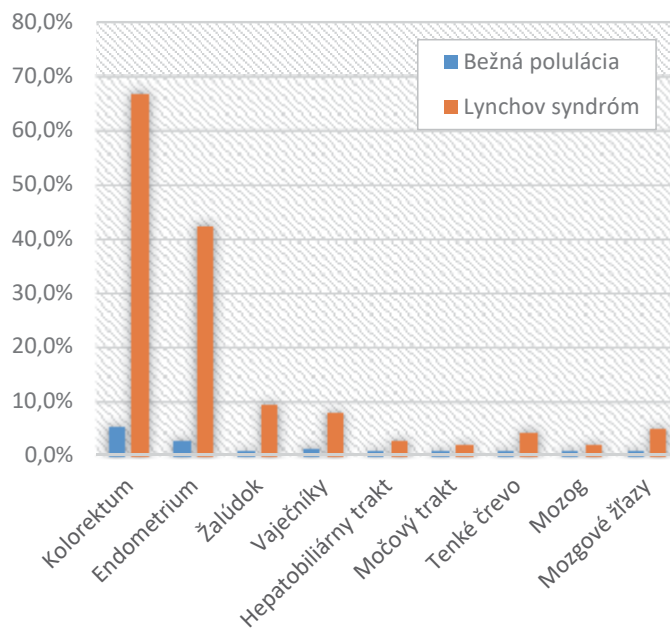


nádor sa radí do skupiny MSI-L (*Low-frequency MSI*) a ak žiadny z markerov nepreukáže instabilitu, tumor sa považuje za stabilný (MSS; *microsatellite stable*)⁽¹¹⁾. Limitáciou tejto metódy sú nádory, v ktorých sa nenahromadil dostatok replikačných porúch na to, aby boli spoľahlivo detegovateľné prostredníctvom PCR. V takých prípadoch je potrebná analýza pomocou IHC. Približne 10-15 % sporadických CRC vykazuje MSI, avšak príčinou tejto instability sú väčšinou metylácie v promótoroch génu *MLH1*. Preto je potrebná analýza metylácií v promótorovej oblasti génu *MLH1*. Ďalším testom je analýza mutácie p. V600E v *BRAF* géne, pretože 50 – 68 % sporadických tumorov, ktoré vykazujú MSI, obsahuje práve túto mutáciu⁽⁹⁾. Viaceré štúdie ukázali, že metódy IHC a PCR je vhodné používať súčasne, napriek tomu však existujú podmienky, pri ktorých obidve metódy poskytujú falošne pozitívne výsledky, ktoré treba overiť ďalšími testami^(12,13,14).

Sekvenovanie novej generácie

S rozvojom sekvenačných technológií sa čoraz častejšie objavujú štúdie, ktoré naznačujú, že práve sekvenovanie novej generácie (NGS; *next-generation sequencing*) má veľký potenciál pre skrining LS. Vhodným príkladom je klinický diagnostický test ColoSeq. Je to test pre dedičnú formu kolorektálneho karcinómu, ktorý deteguje jednonukleotidové zámery, inzerčné, delečné a duplikačné mutácie v génoch *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *EPCAM*, *APC*, *MUTYH*. Pri testovaní vzoriek DNA z periférnej krvi onkologických pacientov a z bunkových línií rakoviny čreva táto metóda preukázala 100 % senzitivitu a podarilo sa detegovať všetky typy mutácií vrátane *missense*, *frameshift*, *splicing* mutácií, *in-frame* delécií, veľkých delécií a duplikácií⁽¹⁵⁾. Niektorí pacienti vykazujú symptómy nerozoznateľné od LS, a pritom sú nositeľmi patogénnych mutácií v génoch, ktoré nie sú špecifické pre toto ochorenie. Prostredníctvom štandardných testov, ktoré sa v súčasnosti využívajú, by tieto varianty neboli identifikované, avšak NGS panely dokážu detegovať patogénne varianty aj v génoch, ktoré nie sú špecifické len pre LS⁽¹⁶⁾.

Graf 2. Porovnanie rizika vybraných typov rakoviny v bežnej populácii s rizikom u pacientov, ktorým bol diagnostikovaný Lynchov syndróm⁽⁶⁾



Štúdia Gallego et al. sa pokúsila ohodnotiť efektívnosť NGS panelov a porovnať ich so štandardnými postupmi, ktoré sa využívajú pri diagnóze dedičných foriem kolorektálneho karcinómu a polypózných syndrémov. Ukázalo sa, že testovanie pomocou NGS panelov, ktoré obsahujú gény asociované s kolorektálnym karcinómom a LS, je cenovo efektívne a odporúča sa ich používanie ako prvý krok na diagnostiku týchto ochorení⁽¹⁶⁾. Predpokladá sa, že v blízkej budúcnosti génové panely založené na NGS technológii zmenia prístup skriningu LS⁽¹⁷⁾. Aj táto metóda má však svoje limitácie. Ako sa ukázalo v niektorých štúdiách, s častejším používaním panelového testovania bude vzrastať množstvo identifikovaných variantov neurčitého významu^(18,19). Je dôležité, aby boli tieto varianty správne anotované, preto je veľkou výzvou vývoj spoľahlivých nástrojov na ich klasifikáciu⁽²⁾.

Záver

Štatistické údaje o incidencii kolorektálneho karcinómu poukazujú na potrebu výskumu LS na Slovensku. Doposiaľ na Slovensku nebola urobená žiadna populačná štúdia, ktorá by identifikovala podiel kolorektálnych karcinómov vznikajúcich následkom LS a neboli ani objasnené príčiny vysokej incidencie tohto ochorenia v slovenskej populácii. V tejto štúdii sme poukázali na potenciál NGS technológie, ktorá by mohla byť efektívnou metódou na skrining LS pacientov, pričom údaje získané týmto prístupom by bolo možné využiť na vytvorenie populačných štúdií a následné zodpovedanie uvedených otázok.

LITERATÚRA

1. Tuttlewska K, Lubinski J, Kurzawski G. Germline deletions in the EP-CAM gene as a cause of Lynch syndrome - literature review. *Hered Cancer Clin Pract* 2013; 11(1): 9.
2. Rasmussen LJ, Heinen CD, Royer-Pokora B, et al. Pathological assessment of mismatch repair gene variants in Lynch syndrome: past, present, and future. *Hum Mutat* 2012; 33(12): 1617-1625.
3. Lynch HT, Snyder CL, Shaw TG, et al. Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015. *Nat Rev Cancer* 2015; 15(3): 181-194.
4. Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; 260(5109): 812-816.
5. Leenen CH, van Lier MG, van Doorn HC, et al. Prospective evaluation of molecular screening for Lynch syndrome in patients with endometrial cancer \leq 70 years. *Gynecol Oncol*. 2012; 125(2): 414-420.
6. Wolf AI, Buchanan AH, Farkas LM. Historical review of Lynch syndrome. *J Coloproctol* 2013; 33(2): 95-110.
7. <https://www.wcrf.org>
8. Lopez NE, Peterson CY. Advances in Biomarkers: Going Beyond the Carcinoembryonic Antigen. *Clin Colon Rectal Surg* 2016; 29(3): 196-204.
9. Hegde M, Ferber M, Mao R, et al; Working Group of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) Laboratory Quality Assurance Committee. ACMG technical standards and guidelines for genetic testing for inherited colorectal cancer (Lynch syndrome, familial adenomatous polyposis, and MYH-associated polyposis). *Genet Med* 2014; 16(1): 101-116.
10. Zhang L. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part II. The utility of microsatellite instability testing. *J Mol Diagn* 2008; 10(4): 301-307.
11. 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): 5248-5257.
12. Overbeek LI, Ligtenberg MJ, Willems RW, et al. Interpretation of immunohistochemistry for mismatch repair proteins is only reliable in a specialized setting. *Am J Surg Pathol* 2008; 32(8): 1246-1251.
13. Ward RL, Hicks S, Hawkins NJ. Population-based molecular screening for Lynch syndrome: implications for personalized medicine. *J Clin Oncol* 2013; 31(20): 2554-2562.
14. Cragun D, DeBate RD, Pal T. Applying public health screening criteria: how does universal newborn screening compare to universal tumor screening for Lynch syndrome in adults with colorectal cancer? *J Genet Couns* 2015; 24(3): 409-420.
15. Pritchard CC, Smith C, Salipante SJ, et al. ColoSeq provides comprehensive lynch and polyposis syndrome mutational analysis using massively parallel sequencing. *J Mol Diagn* 2012; 14(4): 357-366.
16. Gallego CJ, Shirts BH, Bennette CS, et al. Next-Generation Sequencing Panels for the Diagnosis of Colorectal Cancer and Polyposis Syndromes: A Cost-Effectiveness Analysis. *J Clin Oncol* 2015; 33(18): 2084-2091.
17. Peltomäki P. Update on Lynch syndrome genomics. *Fam Cancer* 2016; 15(3): 385-393.
18. Yurgelun MB, Allen B, Kaldate RR, et al. Identification of a Variety of Mutations in Cancer Predisposition Genes in Patients With Suspected Lynch Syndrome. *Gastroenterology* 2015; 149(3): 604-13.e20.
19. Hall MJ, Forman AD, Pilarski R, et al. Gene panel testing for inherited cancer risk. *J Natl Compr Canc Netw* 2014; 12(9): 1339-1346.



Mgr. Ondrej Pös

Vedecký park Univerzity Komenského
 Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava
 e-mail: ondrejpos.sk@gmail.com



ALL YOU NEED FOR GENOMICS

- Plasmid purification
- Genomic DNA purification
- RNA purification
- Clean-up
- Automated DNA/RNA extraction
- DNA/RNA storage
- Modifying enzymes
- And more



Request your copy from your local VWR sales office or sk.vwr.com