

Výšetrenie expresie MMR proteínov v nádoroch endometria imunohistochemicky je vhodný spôsob primárnej selekcie potenciálnych prípadov s Lynchovým syndrómom

Kristína Mikuš Kuracinová^{1,2}, Veronika Mihál³, Veronika Poorová⁴, Monika Sekerešová⁴

¹Ústav patologickej anatómie LFUK a UNB

²MEDIREX GROUP ACADEMY n. o.

³Neurológia, Klinikum Passau, Nemecko

⁴Oddelenie patológie, FN Nitra

Lynchov syndróm (LS) alebo hereditárny nonpolypózny kolorektálny karcinóm (HNPCC) predstavuje autozomálne dominantné ochorenie, pri ktorom dochádza k mutácii génov pre MMR proteíny zodpovedných za reparáciu DNA pri replikácii. Pacienti s Lynchovým syndrómom majú vysokú pravdepodobnosť rozvoja kolorektálneho karcinómu u oboch pohlaví, u žien s pridaným rizikom vzniku karcinómu endometria. Diagnóza Lynchovho syndrómu je stanovená na základe identifikácie zárodočného heterozygotného patogénneho variantu v MSH2, MLH1, MSH6, PMS2 alebo delécie génu pre EPCAM pri molekulárnom genetickom testovaní. Imunohistochemická analýza MMR proteínov je všeobecne akceptovanou metódou rutinného skríningu s relatívne vysokou citlivosťou a špecifickosťou. V našom súbore sme analyzovali expresiu MMR proteínov na tkanivách s karcinómom endometria. Analýza preukázala v 24 % prípadov stratu jedného alebo viacerých MMR proteínov. Imunohistochemia je relatívne lacná, jednoduchá a dostupná metóda primárnej selekcie potenciálnych prípadov s Lynchovým syndrómom. Ak by sa rutinné testovanie expresie MMR proteínov každého biopsického tkaniva z maternice stalo štandardom tak, ako je to pri kolorektálnom karcinóme, prispelo by to ku skoršiemu zachyteniu pacientok s Lynchovým syndrómom.

Kľúčové slová: Lynchov syndróm, endometrium, imunohistochemia

Using immunohistochemistry to examine MMR protein expression in endometrial tumours is a suitable method for the primary selection of potential cases with Lynch syndrome

Lynch syndrome (LS), or hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC), is an autosomal dominant disease in which mutations occur in genes for MMR proteins responsible for DNA repair during replication. Patients with Lynch syndrome are likely to develop colorectal cancer in both sexes, with an added risk of endometrial cancer in females. Diagnosis of Lynch syndrome is based on identifying a germline heterozygous pathogenic variant in MSH2, MLH1, MSH6, PMS2, or deletion of the EPCAM gene in molecular genetic testing. Immunohistochemical analysis of MMR proteins is a widely accepted routine screening method with relatively high sensitivity and specificity. In our series, we analyzed the expression of MMR proteins on endometrial cancer tissues. The analysis showed a loss of one or more MMR proteins was present in 24% of cases. Immunohistochemistry is a relatively inexpensive, simple and accessible method for the primary selection of potential cases with Lynch syndrome. If routine MMR protein expression testing of every biopsy tissue from the uterus were to become standard, as it is for colorectal cancer, it would contribute to earlier detection of patients with Lynch syndrome.

Keywords: Lynch syndrome, endometrium, immunohistochemistry

NewsLab, 2022; roč. 13 (1): 5 – 8

Úvod

Lynchov syndróm, hereditárne ochorenie s autozomálne dominantným typom dedičnosti, vzniká ako dôsledok zárodočnej mutácie v DNA mismatch repair genoch (MMR)⁽¹⁾. LS sa spája s 30 – 75 % rizikom vzniku karcinómu hrubého čreva u mužov, u ženy je pravdepodobnosť vzniku kolorektálneho karcinómu 25 – 50 %⁽¹⁾. Poruchy zárodočnej línie v MMR DNA boli zistené u 1,8 % až 2,1 % pacientok s neselektovaným karcinómom endometria a až 9 % pacientok s karcinómom endometria mladších ako 50 rokov⁽²⁾. Ďalšie malígne tumory asociované s HNPCC s extrakolonickou lokalitou majú prav-

depodobnosť vzniku menej ako 15 %⁽³⁾. LS spôsobí ročne približne 4 000 kolorektálnych karcinómov a 1 800 karcinómov endometria (Centers for Disease Control and Prevention).

Karcinóm endometria ako súčasť Lynchovho syndrómu

Karcinóm endometria je najčastejším malígnym nádorom u žien v západných častiach sveta. Celosvetovo narastá incidencia karcinómu endometria, najvyšší výskyt je v Severnej Amerike a západnej Európe⁽⁴⁾. Karcinóm endometria sa vyskytuje u starších žien, priemerne okolo 70. roku života,

u žien mladších ako 40 rokov je tento karcinóm zriedkavý. Výskyt premalígných a malígných porúch endometria sa zvyšuje v postmenopauzálnom období. Morfológicky ide o rôznorodú skupinu nádorov s odlišnou patogenézou, správaním a prognózou. Na základe klinickopatologických rysov boli tieto tumory triedené do dvoch skupín ako I. typ a II. typ. Typickým morfológickým predstaviteľom I. typu karcinómov endometria je endometrioidný karcinóm, serózný karcinóm pri II. type.

Pacientky, ktoré majú endometriálny karcinóm ako súčasť LS, sú mladšie – medián predstavuje 48. rok života⁽⁵⁾. Karcinóm endometria býva asociovaný s I. typom⁽⁶⁾, avšak relatívna frekvencia nonendometrioidných subtypov, ako je serózný a svetlobunkový karcinóm, majú vyšší výskyt práve u pacientok s LS⁽⁵⁾. U žien s LS je počiatočná diagnóza karcinómu endometria minimálne taká pravdepodobná, ako je riziko vzniku kolorektálneho karcinómu. Uvádza sa, že až u 26 % žien, ktoré prežili kolorektálny karcinóm ako súčasť LS, sa rozvinie karcinóm endometria do 10 rokov od počiatočnej diagnózy⁽⁷⁾. Pacientky s mutáciou MSH6 alebo MSH2 majú vyššie riziko vzniku karcinómu endometria s celoživotným rizikom až 44 %⁽⁷⁾.

Genetické zmeny pri Lynchovom syndróme

Genetickým podkladom pre vznik Lynchovho syndrómu je mutácia niektorého z MMR proteínov. Medzi gény, kódujúce tieto proteíny patrí MSH2, MSH6, MLH1 a PMS2⁽⁸⁾ alebo zárodočná delécia 3' konca EPCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule), ktorej dôsledkom je epigenetický silencing MSH2 génu⁽⁹⁾. Štyri z proteínov MMR tvoria dva funkčné kľúče heterodiméry pozostávajúce z MSH2/MSH6 a MLH1/PMS2. Mutácia MSH2 a MSH6 sa nachádza na chromozóme 2p16, MLH1 na chromozóme 3p21, PMS2 na chromozóme 7p22⁽⁸⁾.

Počas replikácie DNA vznikajú chyby, ktoré sú za normálnych okolností následne enzýmom DNA polymerázou opravené. Proteínové produkty spomínaných génov sú súčasťou autoreparačných mechanizmov v bunke. Tieto gény udržiavajú stabilitu genómu najmä korekciou nesprávne spárovaných báz, ktoré sa generujú počas replikácie DNA. Za fyziologických okolností vznikajú z MMR génov multiproteínové komplexy, ktoré majú schopnosť rozlíšiť a opraviť replikačné chyby – tzv. mismatch, ktoré vznikli pri narušenej syntéze nového vlákna DNA. Poruchy MMR génov môžeme pozorovať práve v mikrosatelitných repetitívnych sekvenciách DNA. Mikrosatelity sú krátke repetitívne sekvencie mono-, di-, tri- a tetranukleotidov voľne distribuované v ľudskom genóme a práve poruchy v génoch „mismatch“ reparačného systému vedú k zmenám v počte opakovaní týchto sekvencií. Výsledkom chybného opravy je zmena v počte opakovaní mikrosatelitov, keď hovoríme o mikrosatelitnej nestabilite (MSI)⁽¹⁰⁾. MSI je často sprievodným javom tumorov asociovaných s LS.

Ak sú zmutované dve alebo viac z piatich mikrosatelitných sekvencií v nádorovej DNA, daný tumor sa označuje ako MSI-high (MSI-H). Ak bola zmutovaná iba jedna z piatich mikrosatelitných sekvencií v nádorovej DNA, tak sa tumor označuje ako MSI low (MSI-L). Ak nie je zmutovaná žiadna z piatich mikrosatelitných sekvencií v nádorovej DNA, daný tumor sa nazýva mikrosatelitno stabilný (MSS)⁽¹¹⁾. Pacienti s LS sú zvyčajne nositeľmi zárodočnej mutácie v jednej alele génu MMR,

druhá alela je následne inaktivovaná mutáciou, stratou heterozygoty alebo epigenetickým silencingom.

Diagnostika Lynchovho syndrómu

Pre jednoduchšiu diagnostiku LS boli sformulované Amsterdamské kritériá, ktoré však nezahŕňali všetky potrebné aspekty vzhľadom na dokázanú extrakolonickú propagáciu LS, čo viedlo k úprave v roku 1998⁽¹²⁾. Neskôr boli vypracované Bethesda kritériá zohľadňujúce stav mikrosatelitnej instability v danom nádorovom tkanive⁽⁸⁾. Diagnóza LS je stanovená na základe identifikácie zárodočného heterozygotného patogénneho variantu v MSH2, MLH1, MSH6, PMS2 alebo delécie EPCAM pri molekulárnom genetickom testovaní⁽¹³⁾.

Testovanie mikrosatelitnej instability je senzitívna vyšetrovacia metóda, ktorá je schopná s vysokou pravdepodobnosťou odhaliť poruchu mismatch repair systému. Mikrosatelitná instabilita sa deteguje prostredníctvom polymerázovej reťazovej reakcie (PCR), kde sa vyšetrí DNA z buniek zdravého tkaniva a nádorového tkaniva pacienta, u ktorého je suspektný LS. Pacienti, u ktorých bola v nádore zistená mikrosatelitná instabilita v najmenej dvoch mikrosatelitných sekvenciách, sú klasifikovaní ako MSI-H a sú považovaní za vysokorizikové osoby pre rozvoj Lynchovho syndrómu⁽¹⁴⁾. Treba spomenúť, že mikrosatelitná instabilita (MSI) je hypermutovateľný fenotyp, ktorý obvykle vzniká buď zárodočnou mutáciou v zložkách MMR u pacientov s LS, alebo ako somatická hypermetylácia promotora MLH1 pri sporadických karcinómoch⁽¹⁵⁾.

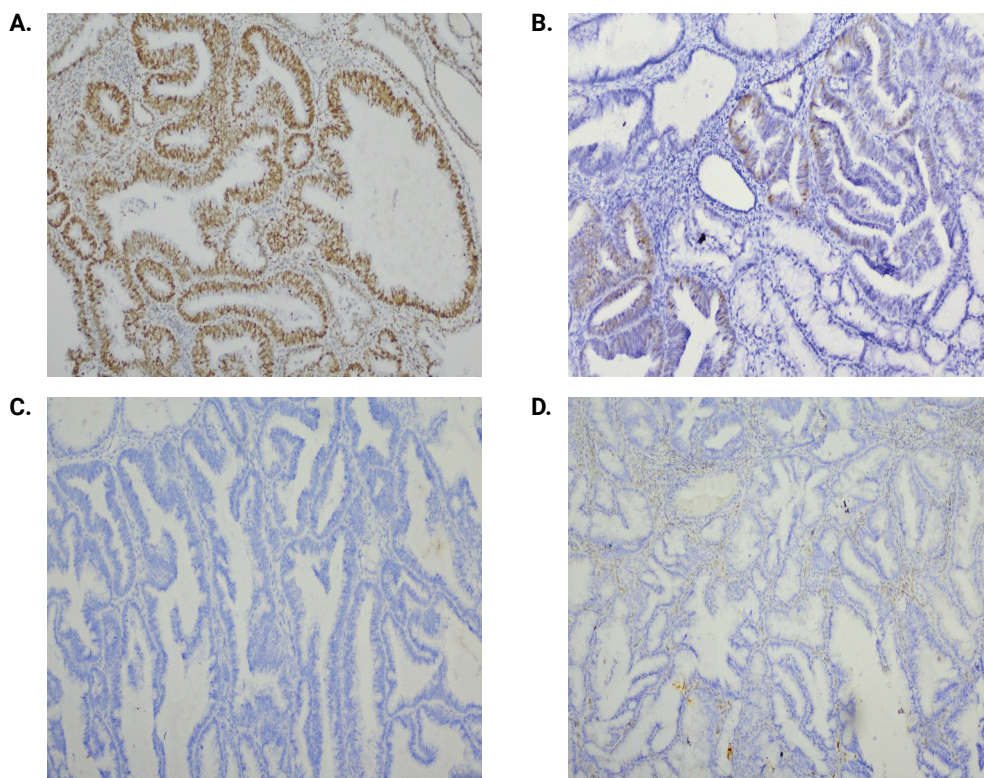
Imunohistochemia v primárnej selekcii potenciálnych prípadov s Lynchovým syndrómom

Testovanie MSI a imunohistochemia (IHC) sú komplementárne vyšetrenia. Strata expresie MMR proteínu IHC sa preukázala ako vysoko zhodná s testovaním mikrosatelitnej instability na báze DNA, pričom senzitivita je viac ako 90 % a špecificita je 100 %⁽¹⁴⁾. Najčastejšie sa vyšetruje strata expresie MLH1, MSH6, MSH2 a PMS2 mismatch repair proteínov. Podľa imunohistochemického hodnotenia sa pri neprítomnej expresii MLH1 a PMS2 nedá spoľahlivo určiť diagnóza LS. Pri absencii MSH2 a MSH6 proteínov alebo len absencii MSH6, prípadne PMS2 proteínu je veľmi pravdepodobné, že pacient má Lynchov syndróm. Ak sú, naopak, prítomné proteíny všetkých 4 génov, t. j. MLH1, PMS2, MSH6 a MSH2, diagnóza LS je vylúčená. Nádory vykazujúce stratu expresie MLH1 a PMS2 by mali byť ďalej skúmané na mutačný stav génu BRAF a zmeny promotora génu MLH1 na vylúčenie sporadických prípadov. Ak je v nádore dokázaná MSI a zároveň prítomnosť mutácie v géne BRAF alebo metylácie promotora MLH1, ide s vysokou pravdepodobnosťou o sporadický typ karcinómu⁽¹¹⁾.

Pri podozrení na Lynchov syndróm a dostupnosti nádorového tkaniva sa diagnostika začína imunohistochemickým vyšetrením MLH1, MSH6, MSH2 a PMS2 proteínov v nádorovom tkanive a súčasne sa vykonáva analýza mikrosatelitnej instability z DNA, ktorá bola izolovaná z nádorového tkaniva pacienta.

Napriek známej asociácii nádorov endometria s LS nie sú všetky prípady nádorov endometria doposiaľ štandardne geneticky testované. Diagnostika LS je ekonomicky a časovo náročná, preto sa hľadajú postupy na jej zjednodušenie. Sek-

Obrázok 1. Imunohistochemické zobrazenie MMR proteínu v karcinóme endometria: A. MSH6 pozitivita; B. MSH2 pozitivita; C. MLH1 negativita; D. PMS2 negativita.



venovanie zárodočných mutácií sa považuje za zlatý štandard v diagnostike LS, v súčasnosti však stále táto metóda nie je všeobecne dostupná tak, aby mohla byť využitá ako primárny skriningový nástroj⁽¹⁶⁾. V kontraste s tým je imunohistochemické testovanie jednoduché, univerzálne a lacné, s 83 % senzitivitou a 89 % špecifitou, a to bez ohľadu na to, o ktorý gén MMR ide⁽¹⁶⁾.

Metodika

S cieľom overiť výskyt straty expresie MMR proteínov sme hodnotili náhodne vybraný biotický materiál z rokov 2016 – 2019 z oddelenia patológie Fakultnej nemocnice Nitra. Biotický materiál pozostával z tkanív získaných kyretážou pre neprimerané krvácanie s nálezom endometrioidnej intraepitelovej neoplázie (EIN) alebo hysterektómiou pre nádorové ochorenie maternice. Skúmané vzorky pochádzali od 46 pacientok, ktorým bol diagnostikovaný karcinóm maternice v rôznom štádiu vývoja. Prípady zahŕňali:

- 14 pacientok s EIN
- 8 pacientok s EIN s prechodom do adenokarcinómu
- 15 pacientok s diagnostikovaným endometrioidným adenokarcinómom G1
- 9 pacientok s diagnostikovaným endometrioidným adenokarcinómom G2

Všetky hodnotené tkanivá boli v úvodnej fáze spracované štandardným postupom, následne fixované 4 % formaldehydom počas 24 hodín, zaliate do parafínu a narezané na 5 µm hrubé rezy. Následne sme materiál pripravili na imunohistochemickú analýzu. Imunohistochemické farbenie na hodnotený marker MSH6, MSH2, MLH1 a PMS2 prebiehalo

v aparátúre Imuno Autostainer (DAKO, Carpinteria, USA) podľa nasledovného protokolu: tkanivá boli prepláchnuté pufrom dodaným výrobcom aparátúry, revitalizované v zásaditom pufri počas 20 minút, primárna protilátka (MSH6, MSH2, MLH1 a PMS2 monoklonálna protilátka) bola inkubovaná 60 minút, po prepláchnutí pufrom boli preparáty inkubované sekundárnou protilátkou (Histofine anti-mouse, anti-rabbit) počas 30 minút. Po opätovnom prepláchnutí pufrom použijeme na vizualizáciu systém diaminobenzidínu (DAKO, Carpinteria, USA) a nakoniec boli tkanivá dofarbené hematoxylnom.

Imunohistochemicky pozitívne farbenie je definované ako jednoznačná nukleárna expresia v nádorových bunkách (**obrázok 1**).

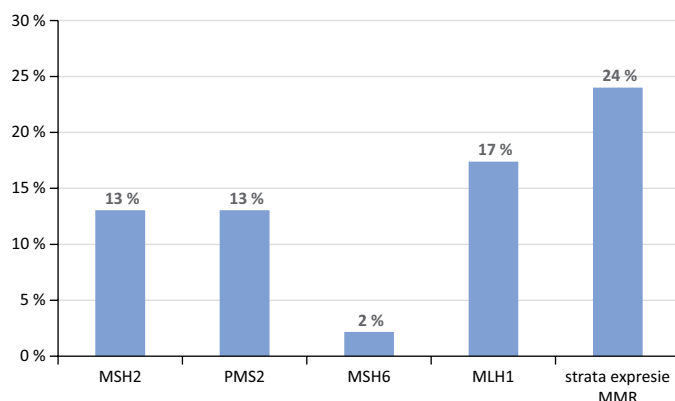
Výsledky

Na základe uvedených diagnostických kritérií a imunohistochemickej analýzy bola strata expresie niektorého MMR proteínu prítomná u 23,91 % zo skúmaného súboru pacientok (**graf 1**). Dominovala najmä strata expresie MLH1 (v 17 % prípadov), expresia MSH2 a PMS2 nebola prítomná v 13 % prípadov. Až na jednu vzorku všetky prípady exprimovali MSH6 proteín (**graf 1**). Viacnásobná strata expresie bola zachytená u 8 pacientok, čo tvorí 17,39 % pacientok. Strata expresie MMR proteínu nekorelovala s typom diagnózy.

Diskusia

V našej analýze expresie MMR proteínov imunohistochemicky sa v 24 % prípadov vyskytovala strata jedného alebo viacerých MMR proteínov. Strata expresie proteínu je definovaná ako úplná absencia jadrového zafarbenia v nádorových bunkách. V prípade absencie expresie PMS2 a MLH1 prote-

Graf 1. Strata expresie jednotlivých MMR proteínov z celkového počtu vzoriek a strata expresie z celkového počtu prípadov.



inov test nevie s presnosťou určiť, resp. vylúčiť diagnózu LS a je potrebné vykonať genetickú analýzu. Prevažná väčšina diagnóz LS je dôsledkom mutácie MLH1 alebo MSH2, pretože oba tieto gény sú esenciálne pre tvorbu heteroduplexných dimérov. Ak bola výsledkom imunohistochemie strata expresie len u jedného markera, vždy je potrebné vyšetriť aj metylačný status na vylúčenie diagnózy LS.

Imunohistochemia je relatívne lacná, jednoduchá metóda a má lepšiu dostupnosť a rýchlejší čas spracovania v porovnaní s genetickou analýzou. Ak by bola táto metóda využívaná ako rutinné vyšetrenie tkaniva maternice, tak by sa mohol zvýšiť záchyt pacientok, ktoré majú mutáciu MMR génov, ešte pred rozvojom malígneho ochorenia. Pacientky s LS ma-

jú podobnú pravdepodobnosť rozvoja prvej malignity v endometriu aj v hrubom čreve. Bolo by zaujímavým zistením, či sa u niektorých z našich sledovaných pacientok rozvinul aj kolorektálny karcinóm.

Skorá identifikácia pacientov s LS je rozhodujúca pre klinický manažment a prognózu vrátane skríningu najbližších členov rodiny. Viaceré štúdie preukázali, že imunoterapia môže mať prínos v liečbe pacientov s MMR mutáciami bez ohľadu na základnú zárodočnú mutáciu.

Ak by sa rutinné testovanie na prítomnosť LS každého biopsického tkaniva z maternice stalo zlatým štandardom tak, ako je to pri kolorektálnom karcinóme, prispelo by to ku skoršiemu zachyteniu pacientok s LS. Zároveň by bolo prínosné presné zisťovanie a identifikácia genetických mutácií na lepšie porozumenie celkovej problematiky Lynchovho syndrómu.

Podakovanie

„Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Centrum pre biomedicínsky výskum – BIOMEDIRES – II. etapa, kód ITMS: 313011W428 a Dlhodobý strategický výskum a vývoj zameraný na výskyt Lynchovho syndrómu v populácii SR a možnosti prevencie nádorov spojených s týmto syndrómom spolufinancovaný zo zdrojov, kód ITMS: 313011V578 spolufinancovaných z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.“

LITERATÚRA

- Hunter, J.E., et al. Universal screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer: patient perspectives on screening and sharing results with at-risk relatives. *Familial Cancer*, 2017. 16(3): p. 377-387.
- Mills, A.M., et al. Lynch Syndrome Screening Should Be Considered for All Patients With Newly Diagnosed Endometrial Cancer. *American Journal of Surgical Pathology*, 2014. 38(11): p. 1501-1509.
- Lier, M. GF Van, Wagner, A., Leerdam, M.E. Van, et al. A review on the molecular diagnostics of Lynch syndrome: a central role for the pathology laboratory. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2010. 14(1-2): p. 181-197.
- Yoon, G., et al. Stromal p16 expression is significantly increased in endometrial carcinoma. *Oncotarget*, 2017. 8(3): p. 4826-4836.
- Hanley, K.Z., G.G. Birdsong, and M.B. Mosunjac, Recent Developments in Surgical Pathology of the Uterine Corpus. *Arch Pathol Lab Med*, 2017. 141(4): p. 528-541.
- Niskakoski, A., et al. Converging endometrial and ovarian tumorigenesis in Lynch syndrome: Shared origin of synchronous carcinomas. *Gynecologic Oncology*, 2018. 150(1): p. 92-98.
- Cohen, S.A. and A. Leininger, The genetic basis of Lynch syndrome and its implications for clinical practice and risk management. *Appl Clin Genet*, 2014. 7: p. 147-58.
- Durauto, F., et al. Genetics, diagnosis and treatment of Lynch syndrome: Old lessons and current challenges. *Oncol Lett*, 2019. 17(3): p. 3048-3054.
- Pai, R.K., et al., DNA mismatch repair protein deficient non-neoplastic colonic crypts: a novel indicator of Lynch syndrome. *Modern Pathology*, 2018. 31(10): p. 1608-1618.
- Sehgal, R., et al. Lynch syndrome: an updated review. *Genes (Basel)*, 2014. 5(3): p. 497-507.
- Umar, A., et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*, 2004. 96(4): p. 261-8.
- Vasen, H.F.A., et al. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch Syndrome) proposed by the International Collaborative Group n HNPCC. *Gastroenterology*, 1999. 116(6): p. 1453-1456.
- Idos, G. and L. Valle, Lynch Syndrome, in *GeneReviews*((R)), M.P. Adam, et al. Editors. 1993: Seattle (WA).
- Kawakami, H., MSI testing and its role in the management of colorectal cancer. *Current Treatment Options in Oncology* 2015. 16(7): p. 30.
- Remo, A., M. Fassan, and G. Lanza, Immunohistochemical evaluation of mismatch repair proteins in colorectal carcinoma: the AIFEG/GIPAD proposal. *Pathologica*, 2016. 108(3): p. 104-109.
- Wang, A., et al. The practice of universal screening for Lynch syndrome in newly diagnosed endometrial carcinoma. *Health Sci Rep*, 2018. 1(7): p. e43.

MUDr. Kristína Mikuš Kuracinová, MGA
Ústav patologickej anatómie LFUK a UNB
Sasinkova 4, 81108 Bratislava
e-mail: kristina.kuracinova@gmail.com