

Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Plzni, Šiklův ústav patologie

Disertační práce

MUDr. Martin Dušek

2017

**Univerzita Karlova v Praze, Lékařská Fakulta v Plzni**

**Šiklův ústav patologie**



**Klinickopatologické aspekty a diferenciální diagnóza  
Lynchova syndromu**

MUDr. Martin Dušek

Doktorská disertační práce

Plzeň 2017

Obor: Patologie

Školitel: doc. MUDr. Ondřej Daum, Ph.D.

Konzultant: prof. MUDr. Dmitry Kazakov, Ph.D.

## **Předmluva**

Doktorská disertační práce je souhrnem dosavadních poznatků o Lynchovu syndromu. Zahrnuje jeho stručnou historii, genetický podklad, fenotypické varianty, diagnostické metody, diferenciální diagnostiku a některé klinické aspekty onemocnění. Součástí jsou i práce publikované spolu s dalšími autory, zabývající se především diagnostickým algoritmem Lynchova syndromu. Práce je psána především z pohledu patologie a molekulární genetiky. Pro diagnostiku, screeningové programy a léčbu je však nezbytná spolupráce s klinickými lékaři, zejména oborů chirurgie, interní medicíny, onkologie a klinické genetiky. Autor v žádném případě nechce upozadřovat ostatní disciplíny, ani si nechce přivlastňovat myšlenky či zásluhy spoluautorů.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně, i že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi UK LF Plzeň.

V Plzni, 13. 6. 2017

# 1 Abstrakt

Lynchův syndrom (LS), dříve nazývaný hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC), je familiární karcinomový syndrom s autozomálně dominantním vzorem dědičnosti. Jeho podkladem je nejčastěji zárodečná mutace některého z tzv. mismatch repair (MMR) genů, které jsou odpovědné za opravy chyb vznikajících při replikaci DNA. Dysfunkce tohoto opravného systému vede ke vzniku a progresi nádorů, především kolorektálních karcinomů (CRC). Podle literatury tvoří LS 3-5 % ze všech CRC.

Mezi extrakolonické nádory asociované s LS patří karcinom endometria, ovária, žaludku, tenkého střeva, pankreatu, hepatobiliárního traktu, horního uroteliálního traktu, tumory mozku a sebaceózní nádory kůže. Typickým znakem tumorů asociovaných s LS, při porovnání s běžnou populací, je vznik v časnějším věku. Malignita je většinou prvním projevem a diagnostika LS je tak důležitá nejen pro pacienta samotného a jeho další management, ale především také pro jeho rodinné příslušníky. Výjimku může tvořit vznik sebaceózních tumorů kůže předcházejících interní malignity u jedné z fenotypických variant LS, tzv. Muir-Torre syndromu.

Vhodně zvolenými screeningovými metodami lze předejít vzniku maligních tumorů zachycením jejich premaligních lézí, nebo alespoň docílit záchytu časných stádií maligních nádorů. Pro diagnózu LS je nutné molekulárně genetické potvrzení zárodečné mutace. Vzhledem k finanční a technické náročnosti tohoto vyšetření je nezbytné vybrat vhodné pacienty pomocí dalších vyšetřovacích metod. Tyto metody se zaměřují na identifikaci tzv. mikrosatelitní nestability (MSI) vznikající při dysfunkci MMR systému. Průkaz MSI probíhá buďto nepřímo pomocí imunohistochemického průkazu exprese nejdůležitějších MMR proteinů (MLH1, PMS2, MSH2 a MSH6) nebo přímo molekulárně genetickým stanovením MSI. Užití těchto metod lze cíleněji aplikovat na podkladě vyšetření histomorfologických znaků tumoru asociovaných s MSI. Pro vyloučení somatických (epi)mutací způsobující MSI u sporadických karcinomů se dále provádí genetické vyšetření mutace V600E genu *BRAF* a hypermetlace promotoru genu *MLH1*.

Pro diagnózu LS, management pacienta a jeho rodinných příslušníků jsou nejdůležitějšími faktory správná koordinace vyšetřovacích metod s ohledem na možnosti laboratoře a fungující spolupráce s klinickými lékaři, především chirurgy, internisty, onkology, a klinickými genetiky.

## 2 Summary

Lynch syndrome (LS), formerly known as hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) is a familial cancer syndrome with an autosomal dominant inheritance pattern. Its genetic basis is most commonly a germline mutation in one of the mismatch repair (MMR) genes, that are responsible for correction of errors occurring during DNA replication. Dysfunction of this repairing system leads to the formation and progression of tumors, especially colorectal cancer (CRC). According to the literature LS represents 3-5 % of all CRC.

Additional extracolonic tumors associated with LS include endometrium, ovary, stomach, small bowel, pancreas, hepatobiliary tract, upper uroepithelial tract, brain and cutaneous sebaceous tumors. Early age of onset is a typical feature of LS-associated tumors, in comparison with general population. Malignancy is often the first manifestation, therefore the LS diagnosis is important not only for the individual patient and his next management, but also for his family members. An exception is represented by the formation of cutaneous sebaceous tumors prior to internal malignancy in one of LS phenotypic variant, called Muir-Torre syndrome.

Properly selected screening methods can prevent the formation of malignant tumors by early detection of their premalignant lesions, or at least early stage of malignant tumors. Molecular genetic confirmation of germline mutations is required for the diagnosis of LS. Due to financial and technical demands of this examination it is necessary to select appropriate patients using other auxiliary examination methods. These methods focus on identifying so-called microsatellite instability (MSI) emerging due to MMR system dysfunction. MSI detection is provided either indirectly by immunohistochemical detection of the most important MMR proteins (MLH1, PMS2, MSH2 a MSH6) or directly by genetic analysis of MSI. Application of these methods can be targeted by evaluation of histomorphologic features of MSI-associated tumor. Molecular genetic analysis of *BRAF* V600E mutation and *MLH1* promoter hypermethylation is further performed to exclude somatic (epi)mutations causing MSI in sporadic cancers.

Synchronization of examination methods with regard to laboratory possibilities and functional cooperation with clinicians, especially surgeons, internists, oncologists and clinical geneticists are the most important factors in LS diagnosis and management of the patient and his family members.

# Obsah

1	Abstrakt.....	4
2	Summary .....	5
3	Historie.....	11
4	Definice a hlavní znaky Lynchova syndromu.....	13
5	Molekulární genetika .....	14
5.1	Mismatch repair geny .....	14
5.2	Genová přeskupení .....	17
5.3	Abnormality v promotoru MMR genu .....	18
5.4	Homozygotní bialelické mutace MMR genů.....	19
5.5	Rekurentní a ancestrální mutace.....	20
6	Varianty Lynchova syndromu.....	21
6.1	Syndrom Muir-Torre .....	21
6.2	Turcotův syndrom.....	23
6.3	Syndrom konstitučního mismatch repair deficitu.....	24
7	Diagnostika .....	25
7.1	Klinická diagnostika .....	25
7.2	Histologie.....	25
7.3	Imunohistochemické vyšetření .....	27
7.3.1	Imunohistochemické vyšetření exprese MMR proteinů.....	27
7.3.2	Imunohistochemické vyšetření exprese annexinu A10.....	28
7.3.3	Imunohistochemické vyšetření VE1 (exprese mutované formy proteinu BRAF) .....	29
7.4	Stanovení mikrosatelitní nestability .....	29
7.5	Mutace V600E genu <i>BRAF</i> .....	30
7.6	Hypermethylace genu <i>MLH1</i> .....	31
7.7	Molekulárně genetické vyšetření na zárodečné mutace MMR genů.....	32
7.8	Analýza konverze .....	33
8	Klinické aspekty Lynchova syndromu.....	34
8.1	Screening a léčba kolorektálního karcinomu.....	34
8.2	Gynekologické nádory.....	38
8.3	Karcinom žaludku.....	39
8.4	Karcinom tenkého střeva .....	40
8.5	Karcinom močového traktu .....	40

8.6	Karcinom biliárního traktu .....	41
8.7	Nádory mozku .....	41
8.8	Sebaceózní nádory kůže .....	41
8.9	Karcinom pankreatu .....	42
8.10	Karcinom prostaty, prsu a další extrakolonické nádory .....	42
8.11	Klinická genetika .....	42
9	Diferenciální diagnóza .....	44
9.1	Lynch-like syndrom.....	44
9.2	Familiární kolorektální karcinom typu X .....	45
9.3	Familiární adenomatózní polypóza .....	45
9.4	MUTYH-associovaná polypóza .....	46
9.5	Peutz–Jeghersův syndrom .....	47
9.6	Familiární juvenilní polypóza.....	48
9.7	Cowdenův syndrom.....	48
9.8	Syndrom hereditární smíšené polypózy .....	49
9.9	Polymerase proofreading-associovaná polypóza.....	49
9.10	Brooke-Spieglerův syndrom.....	50
9.11	Gorlinův syndrom (Basal cell nevus syndrome) .....	50
9.12	Ferguson-Smithův syndrom .....	50
9.13	Tuberózní skleróza .....	51
9.14	Syndrom Birt–Hogg–Dube.....	51
9.15	Syndrom hyperplastické polypózy .....	51
9.16	Ashkenazi 11307-k.....	52
9.17	Mutace 1100delC genu CHEK2 .....	52
10	Cíl práce .....	53
	Zavedení algoritmu depistáže Lynchova syndromu.....	53
11	Materiál a vyšetřovací metody .....	55
11.1	Analýza somatického genomu.....	55
11.2	Analýza germinálních mutací .....	56
12	Výsledky .....	57
12.1	Pacienti s diagnostikovaným Lynchovým syndromem.....	58
12.2	Případy s diagnostikovaným Lynch-like syndromem .....	65
13	Diskuze .....	66

14	Přílohy.....	68
15	Publikované práce .....	80
15.1	Lynchův syndrom v rukách patologa .....	80
15.2	Moderní diagnostika Lynchova syndromu .....	93
15.3	Diagnóza Lynchova syndromu od patologa .....	105
16	Závěr .....	118
17	Literatura.....	119



## Seznam použitých zkratek

ACI, ACII – Amsterdamská kritéria I, II  
AFM – American Founder Mutation  
BCNS – basal cell nevus syndrom (Gorlinův syndrom, Gorlin-Goltzův syndrom)  
BER – base excision repair geny  
BG – Bethesda guidelines  
BRSS – Brooke-Spieglerův syndrom  
CAPP2 – The Colorectal/Adenoma/Carcinoma Prevention Programme 2  
CHRPE – kongenitální hypertrofie pigmentového epitelu sítnice  
CIMP – CpG island methylator phenotype  
CMMRD – syndrom konstitučního mismatch repair deficitu  
CRC – kolorektální karcinom  
CS – Cowdenův syndrom  
EC – Endometriální karcinom  
EGD – esofagogastroduodenoskopie  
FAP – familiární adenomatózní polypóza  
FCRCTX – familiární kolorektální karcinom typu X  
FJP – familiární juvenilní polypóza  
GBM – glioblastoma multiforme  
GS – Gardnerův syndrom  
HGMD – databáze Human Gene Mutation Data, <http://www.hgmd.org>  
HNPCC – hereditární nepolypózní kolorektální karcinom  
HMPS – syndrom hereditární smíšené polypózy (Hereditary Mixed Polyposis Syndrome)  
HPF – pole velkého zvětšení v mikroskopu (High Power Field)  
ICG-HNPCC - International Collaborative Group on HNPCC  
IHC – imunohistochemie  
IPAA – ileo-pouch-anální anastomóza  
LLS – Lynch-like syndrom  
LOH – ztráta heterozygosity  
LOVD – Leiden Open Variation Database, <http://www.lovd.nl/3.0/home>  
LPF – pole malého zvětšení v mikroskopu (Low Power Field)  
LS – Lynchův syndrom  
MAP – MUTYH asociovaná polypóza  
MLPA – multiplex ligation-dependent probe amplification  
MMR – mismatch repair  
MMRGVD – Mismatch Repair Genes Variant Database, <http://www.med.mun.ca/mmrvariants/>  
MSI – mikrosatelitní nestabilita  
MSI-H – mikrosatelitní nestabilita vysokého stupně  
MSI-L – mikrosatelitní nestabilita nízkého stupně  
MSSE – multiple self-healing squamous epithelioma (Ferguson-Smithův syndrom)  
MTS – syndrom Muir-Torre  
NCBI – National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>  
NBI – narrow band imaging  
NCCN – National Comprehensive Cancer Network  
NF, NF1 – neurofibromatóza, neurofibromatóza 1. typu  
OMIM – databáze Online Mendelian Inheritance in Man, <https://www.omim.org/>  
PCR – polymerázová řetězová reakce  
PREDICT – Pathological Role in the Determination of Instability in Colorectal Tumors

PJS – Peutz–Jeghersův syndrom  
PPAP – polymerase proofreading-associated polypóza  
RBG – Revised Bethesda guidelines  
SBHD – syndrom Birt–Hogg–Dube  
SHP – syndrom hyperplastické polypózy  
SNP - Database of single nucleotide polymorphisms  
SSA – sesilní serrated adenom  
TBS – Tuberózní skleróza  
TS – Turcotův syndrom

### 3 Historie

V roce 1913 publikoval prof. Warthin v časopise Archives of Internal Medicine článek, ve kterém shrnul své poznatky o možné dědičné predispozici ke vzniku nádorového onemocnění. [511] Vycházel z lékařských záznamů patologické laboratoře Michiganské univerzity mezi lety 1895-1913, ze kterých zrevidoval celkem 3600 nádorových onemocnění, z nichž bylo 1000 karcinomů s pozitivní rodinnou anamnézou. U čtyř rodin (označených rodina G, F, P a S) se podařilo získat dostatečně podrobnou rodinnou anamnézu od prarodičů přes všechny potomky s ohledem na nádorová onemocnění. V těchto rodinách byla incidence nádorového onemocnění tak vysoká, že vyvolávala podezření na dědičnost predispozic pro vznik malignity. Byl zaznamenán nápadně vyšší výskyt karcinomů, především dělohy a gastrointestinálního traktu, vyskytujících se často v mladém věku, a to zejména v rodině G. Podobné pozorování rodinného výskytu karcinomů u dvou rodin, označených podle jejich bydliště jako N (Nebraska) a M (Michigan) poté publikoval v roce 1966 ve stejném časopise prof. Lynch. [321]

V roce 1970 se prof. Lynch vrátil k původní "karcinomové rodině G" profesora Warthina a doplnil údaje o dalších členech rodiny. [317] To už bylo v této rodině celkem více než 650 členů, z nichž se u 95 projevilo maligní nádorové onemocnění, u 14 % mnohočetně. Ve své další práci pak shrnul základní poznatky o výskytu karcinomů v této rodině. Povšiml si zvýšené incidence adenokarcinomů určitých lokalizací (především kolorektálních a endometriálních), zvýšeného rizika multiplicity karcinomů, zvýšeného rizika vzniku nádoru v mladším věku a autozomálně dominantního vzoru dědičnosti.

V roce 1985, při studiu incidence kolorektálních karcinomů v rodině původních amerických indiánů kmene Navajo, navrhl pro tento syndrom, dosud označovaný jako "syndrom karcinomové rodiny", název hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC). [315] Zároveň ale již začal být používán i název Lynchův Syndrom (LS) pro familiární výskyt karcinomů (především kolorektálních) bez souvislosti s familiární polypózou či Gardnerovým syndromem. [58]

V roce 1990 byla ustanovena mezinárodní skupinou International Collaborative Group on HNPCC (ICG-HNPCC) tzv. Amsterdamská kritéria pro klinickou diagnostiku Lynchova syndromu, která byla v roce 1999 pro zvýšení senzitivity a možnost prezentace syndromu extrakolonickou malignitou (tzv. Lynchův syndrom 2. typu) revidována na tzv. Amsterdamská kritéria II. [492,495] Následně byly vyvinuty Bethesda guidelines pro výběr pacientů s CRC vhodných pro genetické vyšetření na LS. [487]

V letech 1993-1995 byly objeveny geny s tzv. DNA mismatch repair funkcí (MMR geny) a mutace ve čtyřech z nich (*MSH2*, *MLH1*, *MSH6* a *PMS2*) identifikovány jako příčina Lynchova syndromu. [65,142,284,385,394] Prostřednictvím celogenomového vyhledání a vazebné analýzy ve velkých rodinách byl identifikován lokus náchylnosti ke karcinomu na chromosomu 2p. [396] Krátce nato byl objeven druhý lokus pro LS na chromosomu 3p. [295] Bylo prokázáno, že tumory vyskytující se u pacientů s LS, mají charakteristickou molekulární změnu, původně nazvanou „všudypřítomné somatické mutace v jednoduchých opakujících se sekvencích“ (ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences) nebo „fenotyp replikační chyby“ (replication error phenotype, RER). [2,221] Tyto charakteristické molekulární změny byly později nazvány „mikrosatelitní nestabilita“ (microsatellite instability, MSI). [91,477] Rozpoznání, že MSI je následek defektní opravy replikačních chyb

DNA nebo postsyntetické korektury DNA, přispělo k identifikaci prvních dvou genů LS na chromosomu 2p a 3p, konkrétně *MSH2* a *MLH1*. [465] Tyto geny kódují proteiny účastníci se identifikace a oprav mismatch chyb DNA. [65,142,284,385] Objev zárodečných mutací v genech *MLH1* a *MSH2* rychle následovalo popsání dalších lidských genů, které kódují proteiny zahrnuté v tzv. mismatch repair (MMR) komplexu. Tyto geny zahrnují *MLH1* [65,385,396], *MSH2* [142,284,295], *MSH6* [202], *PMS2* [361] a možná *MLH3* [205,530].

## 4 Definice a hlavní znaky Lynchova syndromu

V současné době se, mimo jiné z důvodu možnosti výskytu i extrakolonických malignit, opouští název hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC). Lynchův syndrom (LS) je dnes definován jako autozomálně dominantně dědičné onemocnění vytvářející predispozici ke vzniku maligních nádorů, jehož podkladem je zárodečná mutace některého z genů odpovědných za opravy replikačních chyb v DNA, tzv. mismatch repair (MMR) genů.

Syndromové tumory se u LS v rodokmenu dědí na základě autozomálně dominantního vzoru. [319] Kolorektální karcinom vzniká u pacientů s LS průměrně v časnějším věku než v normální populaci a častěji s proximální (pravostrannou) predilekcí. Drobné adenomy tlustého střeva mohou mít rychlejší zvrát v karcinom než je tomu u běžné populace a je zvýšené riziko následného vzniku dalšího CRC. Histologicky jsou CRC u LS častěji hůře diferencované, s tvorbou hlenu, buňkami tvaru pečetního prstenu, s Crohn-like lymfocytární reakcí a výraznějším výskytem tumor-infiltrujících lymfocytů. U CRC asociovaných s LS se však uvádí zvýšené přežití. Podmínkou pro diagnózu LS je identifikace zárodečné mutace MMR genu (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* nebo *PMS2*), genu *EPCAM* nebo germinální metylace genu *MLH1*. U nosičů zárodečné mutace MMR genu je navíc zvýšené riziko vzniku dalších extrakolonických nádorů, a to zejména nádorů endometria, ovarií, žaludku, tenkého střeva, hepatobiliárního traktu, pankreatu, močového traktu, mozku a kůže. [39,515] Hlavní znaky LS jsou shrnuty v tabulce 1.

## 5 Molekulární genetika

Naprostá většina případů LS je způsobena zárodečnou mutací jednoho z genů odpovědných za opravy replikačních chyb v DNA (replication error repair, RER), které jsou označovány jako mismatch repair (MMR) geny [142,284]. MMR proteiny kódované těmito geny se fyziologicky spojují do funkčních komplexů, především v heterodimery *MLH1-PMS2* a *MSH2-MSH6* (případně *MSH2-MSH3*). Zatímco druhý jmenovaný dimer se uplatňuje v rozpoznávání chyb (především nespárovaných nebo špatně spárovaných nukleotidů) v DNA, první heterodimer slouží k opravě těchto nalezených chyb. Inaktivace obou alel některého ze jmenovaných genů vede k dysfunkci celého komplexu a ke vzniku nádorů charakteristických vysokým stupněm tzv. nestability mikrosatelitů [397,477].

LS je způsoben jednou dominantní mutací zděděnou v zárodečné linii zvyšující riziko vzniku karcinomu. Nádory se však u LS tvoří až po dalším zásahu (second hit) některým z mechanismů genetického poškození. K tomuto poškození dochází v somatické tkáni, což způsobuje ztrátu funkce normální (wild-type) alely. Defekt obou alel má za následek ztrátu MMR aktivity DNA v buňce a následnou MSI. Proto se nemoc dědí jako mendeliánsky dominantní, ale nádory se vyskytují až po somatické bialelické inaktivaci genu, s jednou mutací zděděnou a jednou získanou.

### 5.1 Mismatch repair geny

Hlavní úlohou opravného systému DNA je odstranit neshody na podkladě inzercí a delecí bazí které vznikají jako důsledek chyb DNA polymerázy během syntézy DNA. MMR geny zajišťují několik funkcí souvisejících s genetickou stabilizací. Uplatňují se v opravě chyb vznikajících při syntéze DNA, zajištění přesnosti genetické rekombinace a účastní se v počátečních fázích apoptotických odpovědí na poškození DNA různých tříd.

První studie MMR genů byly prováděny na bakteriích *Escherichia coli* (*E. coli*), u kterých je oprava neshod charakterizována absencí adeninové metylace na pozici d(GATC) v nově syntetizované DNA. To znamená, že funkce hemimetylovaného d(GATC) vlákna při opravě neshod u *E. coli*, je poskytnout značku na nemetylovaném vlákně, která slouží jako skutečný signál řídicí reakci. [227] Tento signál řídicí opravu replikačních chyb u eukaryot stále nebyl přesně definován, ale obdobně, specifická značka na vlákně je dostatečná k řešení opravy v DNA savčích buněk. Tento objev a fakt, že oprava neshod je účinnější na opožděném vlákně replikační vidličky, naznačuje, že konce DNA, které se vyskytují jako přirozené meziprodukty při replikaci (3' konec na vedoucím vlákně; 3' a 5' konce na opožděném vlákně) mohou postačit jako signály vlákna k řízení opravy biosyntetických chyb DNA v eukaryotických buňkách. [340] Geny byly původně označeny jako „*Mut S*“ a „*Mut H*“ atd., protože jejich inaktivace udělila bakterii „mutátorový“ („mut“) fenotyp. Homooligomery odpovědné za iniciaci oprav neshod u *E. coli* jsou *MutS* a *MutL*. *MutS* je odpovědný za rozpoznání neshody a povolání *MutL* na její místo a tím odstartování navazující činnosti. [271,340,394] Buňky savců vykazují aktivitu dvou homologních *MutS* které pracují jako heterodimery ve kterých je *MutSa* tvořen komplexem *MSH2-MSH6* a *MutSβ* komplexem *MSH2-MSH3*. [271] V eukaryotických buňkách bylo identifikováno šest homologů *MutS*. [394] Komplex *MSH2-MSH6* představuje 80-90 % buněčné hladiny MSH2 a jeho funkcí je rozpoznat neshody bazí z inzercí a delecí obsahující jeden nebo dva nespárované nukleotidy, ale i velké delece a inserce. [246] Předpokládá se, že protein MSH6 je podjednotka

odpovědná za rozpoznání neshody. [219] Komplex *MSH2-MSH3* je odpovědný za rozpoznávání a opravy inzercí a delecí od dvou do osmi nukleotidů. Experimentální studie neprokázaly žádnou spojitost tohoto komplexu s LS,[215,376] ačkoli gen *MSH3* představuje časté somatické mutace v nádorech a jeho inaktivace může zvýšit potenciální důsledky mutací v ostatních MMR genech. V eukaryotických buňkách jsou přítomny také tři komplexy homologů *MutL* jako u *E. coli*. *MLH1-PMS2 (MutLa)*, *MLH1-PMS1 (MutLβ)* a *MLH1-MLH3 (MutLy)*. *MutLa* je nejaktivnější z těchto komplexů u lidí a podporuje reparační iniciaci iniciovanou *MutS* komplexem.[227] Komplex *MutLβ* už byl izolován, avšak jeho účast v opravách DNA nebyla dosud objasněna. Stejně tak nebylo prokázáno spojení *MLH3* s rozvojem kolorektálních tumorů.[308]

Obrovský pokrok v molekulární genetice napomohl ke klinickému porozumění Lynchovu syndromu. S objevem mikrosatelitní nestability se objevily první molekulární charakteristiky nádorů u LS.[477] U pacientů s Lynchovým syndromem byly zjištěny odchylky v počtu opakování nukleotidů v mikrosatelitních jednotkách. Při nefunkčnosti MMR proteinů tyto odchylky vznikající při replikaci DNA zůstávají neopraveny.

Zárodečná mutace v alespoň jednom MMR genu je identifikována u více než 80% pacientů s Lynchovým syndromem.[395] Zbytek mohou tvořit jednak dosud neobjevené mutace MMR genů, mutace ostatních MMR genů (které však dosud nejsou potvrzené, jako například *PMS1*), delece genu *EPCAM* vedoucí k posunu čtecího rámce a inaktivaci přilehlého genu *MSH2* nebo mutace dalších součástí MMR systému (jako exonukleáza 1 nebo DNA polymeráza  $\delta$ ), případně germinální metylace *MLH1*. Většinou se jedná o automatickým sekvenováním snadno detekovatelné mutace malého rozsahu (substituce, delece, inserce) typu missense (substituční mutace měnící smysl polypeptidového vlákna zejména takovými substitucemi, které způsobí zařazení odlišné aminokyseliny při proteosyntéze), nonsense (nesmyslné mutace způsobené delecí nebo inzercí jiného než 3n násobku množství bází zapříčínující vznik předčasného terminačního kodonu v sekvenci DNA, přičemž syntéza takového polypeptidu pak není dokončena a výsledkem je zcela nefunkční protein), splice junction mutace (sestříhové mutace) nebo frameshift mutace. Frameshift mutace posunují čtecí rámec zařazením jednoho nebo více nadbytečných nukleotidových párů, čímž dojde k syntetizování zcela odlišného polypeptidu nebo dokonce k předčasnému ukončení proteosyntézy vznikem terminačního kodonu (pokud je však zařazen celočíselný násobek 3n nukleotidů, prodlužuje se polypeptidový řetězec o n aminokyselin podle inzertované sekvence). [170,377] Velké delece celých exonů bývají nacházeny hlavně u *MSH2* genu (až 1/3 mutací) ale poměrně často i u *MLH1* genu. Podle literatury je 1 z 660 lidí nositelem germinální mutace některého z MMR genů. [92]

Gen *MLH1*, v databázi lidských genů a genetických poruch OMIM (online mendelian inheritance in man) vedený pod číslem 120436, je lokalizovaný na chromozomu 3p21 s devatenácti exony v délce přibližně 100 Kb. Dodnes bylo identifikováno více než 250 různých jeho zárodečných mutací a je nejdůležitějším genem LS. U nosičů mutace genu *MLH1* bývá často jedinou diagnostikovanou malignitou kolorektální karcinom. [261] Někteří autoři popsali mutace v tomto genu, jejichž přítomnost se geograficky liší. V rodinách s LS z evropských zemí a severní ameriky není běžný karcinom žaludku, zatímco v asijských zemích jako je Korea a Japonsko nebo v Brazílii je hlášena jeho vysoká incidence. [377,389,398] Neexistují však studie z těchto zemí zkoumající relativní riziko vzniku karcinomu žaludku u lidí s mutovaným MMR genem. Dle literatury byly mutace v genu *MLH1* nalezeny u 50 % případů s LS. [395]

Gen *MSH2*, v databázi lidských genů OMIM vedený pod číslem 609309, se nachází na chromosomu 2p22-p16 se šestnácti exony v délce 73 Kb a společně s *MLH1* představují více než 90 % zárodečných mutací LS.[92,386,395] Pacienti se zárodečnou mutací v *MSH2* vykazují, na rozdíl od nosičů mutace *MLH1*, častější výskyt extrakolonických nádorů. [261] V některých případech se ukazuje, že pacienti s mutací *MSH2* mají vyšší riziko vzniku karcinomu močových cest, žaludku a ovárií. Mutace v genu *MSH2* byly nalezeny u 40 % případů s LS. [395]

Gen *MSH6*, v databázi OMIM vedený pod číslem 600678, je na chromosomu 2p16 s deseti exony v délce 500 Kb. V současnosti jsou zárodečné mutace v tomto genu identifikovány jako častá příčina atypického LS (tj. nespĺňujícího Amsterdamská kritéria). První studie mutací genu *MSH6* ukazují, že klinický fenotyp postižených rodin se liší od těch s klasickým LS způsobeným mutacemi *MLH1* a *MSH2* genu. Jeho penetrance se zdá být nižší, přičemž pravděpodobně nejdůležitější klinickou manifestací žen nesoucích mutaci *MSH6* genu je endometriální karcinom. Uvádí se až šestkrát častější asociace s karcinomy endometria než s nádory kolorekta a častější levostranná lokalizace CRC v porovnání s LS způsobeným mutacemi jiných MMR genů. Navíc mají mutace *MSH6*, pravděpodobně díky tvorbě alternativního heterodimeru *MSH2-MSH3*, nízkou incidenci mikrosatelitní nestability a vyskytují se spíše v mononukleotidových sekvencích. [11,46,187,272,404,523,529]

Porovnání rodin se zárodečnou mutací v *MLH1* nebo *MSH2* genu a rodin s mutací genu *MSH6* ukázalo, že v případě *MSH6* byl vznik kolorektálního karcinomu pozdější (ve věku 54 let oproti 44 letům u případů s mutací *MLH1* a *MSH2*). Ženy ve skupině *MSH6* vykazovaly nízké riziko vzniku kolorektálního karcinomu (30 % do věku 71 let), ale vysoké riziko vzniku endometriálního karcinomu (71% do 71 let). [404,202] Mutace v genu *MSH6* se vyskytují u 7-10 % případů LS. [395]

Geny *PMS1* a *PMS2*, v databázi OMIM vedené pod čísly 600258 a 600259, jsou lokalizovány na chromosomech 2q31-q33 a 7p22 s délkou 16 KB a 15 exony. Podle některých údajů způsobují 5 % případů LS. [355] Přestože je gen *PMS2* klíčový v opravném systému, jsou jeho mutace v etiologii LS nebo Turcotova syndromu hlášeny jen vzácně. [238] Mutace v genu *PMS2* vedou většinou ke vzniku MSI-H tumorů a jsou asociovány jak s časným kolorektálním tak i endometriálním karcinomem, ale ani u nich není penetrance příliš vysoká. [201,355,485] Stále však existují některé nejasnosti v mechanismu, kterým se mohou *PMS2* a *PMS1* podílet na predispozici ke vzniku karcinomu. [355] Mutační analýza genu *PMS2* je ztížena přítomností jeho pseudogenů v genomu a jako příčina LS se uvádí u <5 % případů. [447]

V roce 1994 byla poprvé určena role genů *PMS1* a *PMS2* v LS u dvou nepříbuzných rodin identifikováním in-frame delece (delece jednoho nebo několika kodonů bez porušení čtecího rámce čímž vzniká bílkovina zkrácená o jednu či několik aminokyselinových zbytků) v genu *PMS1* a nonsense mutace v genu *PMS2*. [361] Zmapování 14 amerických a kanadských rodin s Turcotovým syndromem v roce 1995 odhalilo jedno dítě s heterozygotní zárodečnou mutací *PMS2* genu a rozsáhlou mikrosatelitní nestabilitou v normálních buňkách. [184] V roce 1997 byla hlášena mutace typu missense v genu *PMS2* u dítěte s Turcotovým syndromem bez rodinné anamnézy (otec byl nosičem stejné mutace, avšak bez diagnostikovaného nádoru) tohoto syndromu. [338] Další dvě missense mutace v genu *PMS2* u mladého pacienta s Turcotovým syndromem bez rodinné historie tohoto syndromu byly popsány v roce 2000. [112] Tyto mutace byly vrozené jak od otce i od matky, kteří byli oba heterozygotní pro *PMS2*. Kromě obou rodičů bylo v rodině dalších pět členů heterozygotních pro jednu z těchto mutací, ale žádný z nich se neprezentoval zvýšenou predispozicí ke vzniku karcinomu. Tento objev vedl k názoru, že pro zvýšení predispozice ke kancerogenezi je potřeba inaktivace obou alel *PMS2* genu, což potvrzuje myšlenku "two-hit modelu" navrhovanou Knudsonem. [269]



V rozporu s těmito nálezy je však studie, která identifikovala sedm mutací genu *PMS2*, včetně čtyř genových přeskupení (genomic rearrangements) a tří bodových mutací. [201] Šest z těchto případů vykazovalo znaky autozomálně dominantní dědičnosti, což naznačuje, že heterozygotní *PMS2* mohou predisponovat ke vzniku malignity. Vyšetření 99 probandů s tumory asociovanými s LS imunohistochemicky vykazujícími izolovanou ztrátou exprese *PMS2* detekovalo zárodečné mutace *PMS2* u 62 % probandů (55 monoalelických a 6 s bialelickými mutacemi) s použitím long-range PCR a MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification). [202] Při popisu klinického fenotypu LS v této velké skupině nosičů mutace *PMS2*, bylo zjištěno, že 65,5 % rodin s monoalelickou mutací *PMS2* splňovalo revidované Bethesda guidelines. Incidence CRC byla 5,2 krát vyšší a incidence endometriálního karcinomu byla 7,5 krát vyšší než v normální populaci. Tato čísla představují ve věku 70 let kumulativní riziko karcinomu v Severní Americe 15-20 % pro CRC, 15 % pro endometriální karcinom a 25-32 % pro jiné tumory asociované s LS. To znamená, že penetrance u nosičů monoalelické mutace *PMS2* byla nižší než u ostatních MMR genů. Podle těchto zjištění *PMS2* rodiny potenciálně zasluhují upravené poradenství a sledování pro karcinomy, ale žádná doporučení pro upravený management nebyla dosud předložena. Později bylo identifikováno dalších sedm mutací *PMS2* genu přes objevení homologního genu lokalizovaného v jeho těsné blízkosti (také na chromosomu 7p22-23). [355] Gen byl pojmenován *PMS2CL* a vykazuje 97 % podobnost s *PMS2*. Tento homolog má mnoho podobností s oblastí, ve které *PMS2* protein interaguje s *MLH1* proteinem za vytvoření komplexu *MLH1-PMS2*. Je tvořen COOH koncem a je schopen generovat falešné nemutované alely (wild-type alely). Podle Centra Biotechnologických Informací (National Center for Biotechnology Information) existuje v různých oblastech nejméně 13 sekvencí homologních k *PMS2*. Uvádí se také, že přítomnost *PMS2CL* genu brání detekci frameshift mutací v automatickém sekvenování. Navíc malý počet detekovaných mutací v exonech 1 až 5 genu *PMS2* může být způsoben existencí jiných homologních oblastí, protože velký počet homologů může značně snižovat schopnost detekovat mutace v *PMS2* genu. To naznačuje, že mutace v *PMS2* mohou být mnohem častější.

Nejčastěji postiženými geny při LS jsou tedy *MLH1* a *MSH2* (dohromady více než 80 %), dále následuje *MSH6* (10 %) a zbylé případy představují vzácná zárodečná postižení dalších MMR genů (*PMS2*, *PMS1*, *MSH3*). [371] Zárodečné mutace *MLH3* prozatím nebyly spojeny s fenotypem LS. [94,205,274,302,379]

## 5.2 Genová přeskupení

Metodou MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) bylo zjištěno, že překvapivě velká část mutací vyplývajících z genomových přeskupení jednoho nebo více exonů může postihovat geny *MLH1* a *MSH2*. [354] Mnoho studií demonstruje, že genomická přeskupení představují 15-55 % ze všech mutací MMR genů. [41,71,161,169,505,509,522] V souboru 67 anglických pacientů činil podíl genomických přeskupení 15 % (tj. 10 případů), s pěti typy genomických přeskupení. [9] Jiná práce objevila různé genomické delece u pěti ze šestnácti (31 %) příbuzných pacientů s podezřením na LS, kteří nevykazovali zárodečné mutace v genech *MLH1* a *MSH2*. [537] Studie dalších autorů odhalila čtrnáct genomických přeskupení u 85 pacientů (16,5 %), z nichž čtyři byly v *MLH1* a zbylých deset v *MSH2*. [402]

### 5.3 Abnormality v promotoru MMR genu

I přes rozsáhlý výzkum genetických abnormalit v kódujících oblastech MMR genů u pacientů s LS, nebyly příliš prozkoumány mutace v promotoru těchto genů. Některé studie však identifikovali zárodečné mutace v centrální oblasti promotorů těchto genů. Korejská studie objevila tři nové mutace v promotorové oblasti genu *MSH2* u 141 pacientů s LS, u kterých do té doby nebyly detekovány žádné zárodečné mutace. [453] Tyto mutace v promotoru ovlivňovaly počáteční místo transkripce a místo pro navázání transkripčního faktoru. Následkem toho vznikl nový DNA-proteinový komplex. Tyto výsledky ukazují, že mutace v promotoru genu *MSH2* jsou zodpovědné za počáteční proces vzniku tumoru u menší části případů s LS.

Jako epigenetické jsou označovány dědičné změny v genové expresi bez změny v sekvenci DNA, zahrnující zejména metylaci DNA a acetylaci histonů. Metylace postihuje téměř výlučně cytosin (na pátém atomu uhlíku) v dinukleotidu CpG, případně chromatinové struktury. [430,473] Dinukleotidy CpG (Cytosin-fosfát-Guanin) se vyskytují hojně v repetitivních sekvencích a jejich akumulace vytváří tzv. ostrůvky CpG, které se často vyskytují v oblasti promotoru genu, kde se váží transkripční faktory. Asi 60 % genů má promotory asociované s těmito CpG ostrůvky. Bylo demonstrováno, že v lidském genomu je 60-90 % z CpG ostrůvků metylováno v cytosinových zbytcích, přestože oblasti bohaté na CG bez metylace jsou často asociovány s aktivními geny. [154] Metylace této oblasti je spojena s inaktivací genů, přičemž metylace buď brání vazbě transkripčních faktorů, nebo umožňuje vazbu inhibičních komplexů, obsahujících histon deacetylázy a další faktory, které vedou k přestavbě chromatinu do inaktivní podoby, čímž je tento gen umlčen.

Studie potvrdily, že hypermetylace *MLH1*, také nazývaná epimutace, není omezena jen na nádorové buňky. U některých pacientů hypermetylace jedné alely vzniká v průběhu germinace a je distribuována v somatických buňkách. [154,339,430,469,473] Přestože se zárodečné mutace v genech přenášejí věrně napříč generacemi v mendelovském vzoru, epimutace nezahrnují změny DNA sekvence a jsou relativně nestabilní vůči procesu epigenetického přeprogramování v zárodečných buňkách. V jedné studii zkoumající 160 pacientů s podezřením na LS byla objevena pacientka vykazující hemimetylacii *MLH1*, která tuto alelu zdědila po matce. [207] Pozorování naznačují, že epigenetické chyby mohou vznikat častěji během oogeneze a mohou se více udržovat během tohoto procesu. Tato hypotéza může být potvrzena reverzí epimutace syna této pacientky. Na základě práce, která objevila přítomnost metylace ve spermatozoidech (i když u méně než jednoho procenta) syna jiného pacienta s metylací, nelze však ani vyloučit dědičnost po otci. [469] V další práci, zkoumající 24 pacientů s kolorektálním nebo endometriálním karcinomem diagnostikovaným před 50 rokem věku, vykazujícím mikrosatelitní nestabilitu, ale bez potvrzení zárodečné mutace v MMR genech, měli dva pacienti typickou epimutaci v *MLH1* a všechny somatické buňky hemimetylované. [208] Syn jednoho z nich vykazoval částečnou metylaci *MLH1*, avšak analýza jeho spermatozoidu neukázala žádnou. U druhé pacientky, přestože předala její haplotyp jednomu z jejích dětí, nebyl nalezen žádný důkaz metylace, pravděpodobně díky reverzi během gametogeneze. Tyto výsledky naznačují, že došlo k nekompletní reverzi epimutace s možností, že předaná alela může mít větší náchylnost k průběhu následné metylace v další generaci. Hypermetylace spojená s umlčením *MLH1* může tedy představovat alternativu k "two-hit" modelu. [312,430]

Pacienti se zárodečnou hypermetylací *MLH1* jsou hlášeni vzácně. [154,208]. Pro tyto události, původně popsané jako zárodečné epimutace, je spíše vhodnější označení konstituční

epimutace, odrážející aberantní umlčení genu, který je při absenci sekvenční mutace v somatických tkáních normálně aktivní. Pacienti nemají v genu *MLH1* změny v sekvenci nebo přeskupení a tato epimutace se jeví jako mozaika, zahrnující různé tkáně, v různé míře. Je obvykle reverzibilní, takže potomci bývají nepostiženi, ale u několika rodin byla dědičnost prokázána. Pacienti s touto epimutací mají časný nástup LS nebo mnohočetné malignity v rámci LS. [206] Vzhledem k tomu, že LS je obecně vnímán jako důsledek zárodečné mutace MMR genů, může neznalost tohoto odlišného mechanismu vedoucího ke stejné dysfunkci MMR proteinů a tím i stejnému klinickému postižení, způsobit diagnostické rozpaky.

Byly popsány i zárodečné delece 3' konce genu *EPCAM* (dříve nazývaného *TACSTD1*) lokalizovaného v blízkosti genu *MSH2*, které zase vedou k epigenetické inaktivaci genu *MSH2*. [276,294] Umlčením genu *MSH2* ve tkáních, které exprimují *EPCAM*, vzniká fenotyp odpovídající LS. [276] Při vyšetřování dvou rodin, kdy byla delece izolovaná na stop kodon genu *EPCAM*, byl přítomen pouze fenotyp s postižením colon. [320] V jiné studii, kdy delece zahrnovala také kritické části promotoru *MSH2*, byl plně rozvinut fenotyp LS. [263] U řady mutací a polymorfizmů MMR genů nebyl však jejich klinický význam dosud objasněn.

Konstituční epimutace *MLH1* a *MSH2* mohou tedy být také vzácně identifikovány u LS rodin bez sekvenčních mutací MMR genů. [154,207,294,469] Podobně jako zárodečné mutace vykazují konstituční epimutace *MSH2* klasický autozomálně dominantní vzor dědičnosti a jsou spojeny s 50 % rizikem přenosu na potomky. [294,343]

#### 5.4 Homozygotní bialelické mutace MMR genů

Většina případů LS se týká dominantních mutací zahrnujících jednu alelu MMR genu, ale existují i vzácné případy bialelických mutací. První zmínky pocházejí ze zprávy o třech sourozencích, jejichž rodiče byli pokrevně příbuzní a u kterých se zdálo, že mají neurofibromatózu (NF1) doprovázenou leukémií nebo lymfomem v kojeneckém věku, asociovanou s bialelickou zárodečnou mutací *MLH1*. [418] Později byla v jiné geografické oblasti popsána podobná rodina s jinou *MLH1* mutací. [149] Jedenáctiletý chlapec měl café-au-lait skvrny a rozvinutý metastatický duodenální adenokarcinom, vzniklý malignizací tubulovilózního adenomu. Jeho devítiletá sestra, také s café-au-lait skvrnami a axilárními pihami měla malignizované kolonické polypy. Jejich šestiletá sestra vykazovala café-au-lait skvrny, vlasaté (hairy) névy a plexiformní neurofibrom jazyka, ale bez rozvinuté vniřní malignity. Přestože nebyla splněna kritéria AC-I, dva příbuzní měli v šesté dekádě karcinom žaludku a CRC. Rodiče těchto tří dětí byli pokrevně příbuzní, ale ani u jednoho z nich nebyl diagnostikován karcinom. Někteří autoři se pokusili zavést pro toto onemocnění způsobené bialelickými mutacemi MMR genů, jejichž deficiencie se zaměřuje na geny NF (neurofibromatózy), nový název. Například s důrazem na tumory tlustého střeva, leukémii/lymfom a rysy NF byl navržen termín „CoLoN“. [33] V jiném případě byl, s odvoláním na termíny Lynchův syndrom I a II navržené v roce 1984, upřednostňován název Lynchův syndrom III. [58,137] Ani jeden z těchto termínů se však neujal. V současnosti se pro tyto případy s bialelickou mutací v jenom z MMR genů, manifestující se především karcinomem v dětství, hematologickými malignitami a skvrnami café au lait, používá termín syndrom konstitučního mismatch-repair deficitu (constitutional mismatch repair-deficiency syndrome, CMMRD). [525]

## 5.5 Rekurentní a ancestrální mutace

Běžně se vyskytující mutace mohou být rekurentní (tj. vyskytující se opakovaně de novo) nebo ancestrální (tzv. founder mutace), které se objeví jednou (u tzv. zakladatele) a poté se předávají na potomky. Důležitým aspektem rekurentních a founder mutací je, že jejich testování v prvním kroku může snížit náklady molekulární diagnostiky u vyčleněných populací. Nejznámější rekurentní mutací způsobující LS, která se vyskytuje celosvětově a může způsobovat 5-10 % ze všech LS, je transverze  $A \rightarrow T$  v donorovém místě sestřihu intronu 5 genu *MSH2* s označením c.942 + 3A  $\rightarrow$  T. [115,147,186,299,300] V kanadském Newfoundlandu se vyskytuje také jako founder mutace, odpovídá za 20-25 % ze všech LS, jejímž tzv. zakladatelem (první u koho se objevila a další ji po něm dědili) byl místní osadník před více než 300 lety. [172]

Ve Finsku byla zase popsána delece exonu 16 genu *MLH1*, která se datuje pravděpodobně 1000 nebo i více let zpět a v některých částech Finska zodpovídá za více než 50 % všech LS. [341,370] Další founder mutace (*MSH2* 1906G  $\rightarrow$  C) byla zdokumentována v populaci aškenázských Židů a čítá okolo 20 % všech LS. [93,144]

Přes heterogenitu populace Spojených států amerických byla i zde identifikována founder mutace jakožto genomová delece exonů 1-6 genu *MSH2*. [354,505] Tato mutace zůstávala dlouho neobjevena, protože ji nelze detekovat standardními sekvenovacími metodami. Sekvence zlomových bodů této delece exonů 1-6 a haplotypů obklopujících mutaci byla identická v příbuzenstvu rozšířeném po 14 státech, což hovoří pro společný původ této mutace pojmenované jako American Founder Mutation (AFM). [314,505,506] Následně bylo odhadnuto, že velké delece, včetně AFM, tvoří až 20 % všech škodlivých mutací *MSH2* genu. [100] V identifikaci 32 rodin nesoucích AFM pomohla robustní multiplexová polymerázová řetězová reakce (PCR). Testování rodinných příslušníků pomocí místně specifické diagnostické polymerázové řetězové reakce (PCR) vedlo k identifikaci 126 nosičů AFM. Genealogické studie pak spojily 27 ze 41 rodin nesoucích AFM do sedmi rozsáhlých rodokmenů, které byly sledovány zpět až do 18. století bez jakéhokoliv důkazu o další konvergenci. [100] Údaje dostupné po analýze naznačují ještě dřívější výskyt události vedoucí ke vzniku mutace, než se původně předpokládalo. Pravděpodobně k ní došlo ještě v evropské populaci nebo v populaci původních Američanů. To znamená, že AFM by mohlo být v USA mnohem častější, než se dosud předpokládalo. [100] Objevení této founder mutace by mohlo zvýšit účinnost a následně snížit náklady na identifikaci pacientů s LS, kteří by pak mohli být vhodnými kandidáty pro cílené protinádorové postupy. [93]

## 6 Varianty Lynchova syndromu

Jak již bylo popsáno výše, mohou se klinické projevy LS lišit v závislosti na postiženém genu nebo konkrétním typu mutace. Zatímco mutace *MLH1* je často spojena s diagnózou CRC jakožto jedinou malignitou, u pacientů se zárodečnou mutací v genu *MSH2* se častěji vyskytují extrakolonické nádory. [261] Mutace v genu *MSH6* a *PMS2* se vyznačují nižší penetrancí, přičemž mutace *MSH6* je spojována s častějším výskytem karcinomu endometria a levostrannou lokalizací CRC. [46,187] Na základě těchto a dále uvedených fenotypických vlastností vznikají někdy takové kombinace klinických znaků, které zapříčinili popis nových klinických syndromů. Ve skutečnosti jde však pouze o varianty LS.

### 6.1 Syndrom Muir-Torre

Syndrom Muir-Torre (MTS) byl prvně popsán dvěma nezávislými skupinami autorů, v roce 1967 jej popsal Muir s kolektivem a rok poté Torre s kolektivem. [347,481] Jde o vzácnou genodermatózu charakterizovanou kombinací alespoň jednoho kožního tumoru sebaceózních žlázek a nejméně jedné viscerální malignity. [193,251,357] Po několika letech byl identifikován fenotyp MTS u pacientů s LS a začalo se tak hovořit o jejich možné spojitosti. [316] Dnes je MTS považován za podtyp LS vzhledem k jeho spojitosti se zárodečnou mutací DNA MMR genů (především *MLH1* a *MSH2*). [34] Vzor dědičnosti MTS je většinou autozomálně dominantní s vysokou penetrací a variabilní expresí, ale jsou hlášeny i sporadické případy. Více než 90 % pacientů s MTS vykazuje mutace genu *MSH2* a přibližně 70 % z MTS asociovaných tumorů vykazuje mikrosatelitní nestabilitu. [193,211,324,328,406] MTS představuje jedinou variantu LS vykazující premorbidní fenotyp a umožňující tím někdy diagnózu LS, na základě kožních sebaceózních tumorů, ještě před rozvojem viscerální malignity. Sebaceózní nádory předcházejí viscerální malignity ve 22 % případů, v 56 % se rozvíjí později a v 6 % se vyskytují současně [10,101,141]. Prezentují se průměrně ve věku 53 let a muži jsou postiženi častěji, s poměrem 3:2. [193,357,400] Sebaceózní tumory bývají mnohočetné, ale mohou být i solitární a zahrnují sebaceózní adenom, sebaceom/sebaceózní epitelium, sebaceózní karcinom, keratoakantom se sebaceózní diferenciací, bazaliom se sebaceózní diferenciací a cystické sebaceózní neoplazie. [18,171,193] Sebaceózní hyperplazie se může vyskytovat u MTS, ale nesplňuje diagnostická kritéria. [446]

Obecně lze říci, že mnohočetné kožní nádory se sebaceózní diferenciací vyskytující se u jedinců před 50. rokem života nebo postihující tělní partie mimo obličej, podobně jako mnohočetné keratoakantomy vznikající na místech chráněných před sluncem u mladých osob, vyvolávají silné podezření na MTS. [446] Sporadické sebaceózní tumory vznikají predilekčně v místech bohatých na sebaceózní žlázky, jako nos a oční víčka, ale mohou se objevit i na jakýchkoliv jiných místech, kde se vyskytují sebaceózní žlázky. Sebaceózní tumory asociované s MTS jsou častěji lokalizované od krku dolů, naopak výskyt periokulárních sebaceózních tumorů je u MTS vzácný. [456] Klinicky se MTS asociované tumory neliší od sporadických. Jde většinou o málo nápadné, hladké, nažloutlé či narůžovělé papuly a noduly, někdy s centrální vkleslinou, velikosti do 5 cm. [132] Sebaceózní karcinomy mohou mít na povrchu ulceraci, neostrou hranici, rychlejší růst a větší rozměry. Sebaceózní karcinomy se mohou vyskytovat kdekoli na těle, včetně obličeje, uší a zevního genitálu, ale obvykle vznikají v Meibomských žlázkách očních víček, kde může dojít k jejich záměně za chalazion, karbunkl nebo chronickou blefarokonjunktivitidu. Tumory asociované s MTS jsou často nodulocystické a často se vyskytují na trupu a končetinách. Sebaceózní karcinom, narozdíl od

benigních nádorů, vykazuje typické znaky malignity. [18,399] Histologické typy sebaceózního karcinomu zahrnují bazaloidní, vřetenobuněčnou, skvamoidní a dediferencovanou (pleomorfní) variatu. [18] Sebaceózní karcinom je imunoreaktivní na cytokeratiny AE1/3, nízkomolekulární cytokeratiny, EMA (epiteliální membránový antigen), anti-breast carcinoma-associated antigen-225 (BCA-225, CU18), anti-CA 15-3 (cancer antigen 15-3) a protein androgenních receptorů (androgen receptor protein). Naopak nereaguje s karcinoembryonálním proteinem (CEA), S-100 proteinem nebo GCDFP-15 (gross cystic disease fluid protein-15). [21,42] Cystické sebaceózní tumory jsou vzácné léze, které byly zaznamenány pouze u pacientů s MTS a zahrnují spektrum od benigních cystických adenomů až k proliferujícím cystickým sebaceózním tumorům. [6,431] Bazaliom se také může u pacientů s MTS vyskytovat v oblasti hlavy a krku. Pokud se bazaliom vyskytne vícečetně nebo v časnějším věku, měl by být podnětem pro zvažování podkladové mendeliánské poruchy, jako například „basall cell nevus syndrome“, „xeroderma pigmentosum“ nebo jiné genodermatózy s defektní replikací nebo opravou DNA, jako je MTS. [86]

Nejčastější viscerální malignitou jsou kolorektální adenokarcinomy, následované urogenitálními karcinomy, dále endometriální karcinom a méně často pak karcinom prsu, hematologické malignity nebo karcinom žaludku. Adenokarcinomy tlustého střeva asociované s MTS se více objevují proximálně od splenické flexury. [357] Sebaceózní tumory i viscerální malignity v rámci MTS vykazují ve větší míře zmnožení tumor infiltrujících lymfocytů a peritumorální lymfocytární infiltráty v porovnání s odpovídajícími sporadickými tumory. [378,449] Ačkoli CRC u pacientů s MTS často vykazují více tumor infiltrujících lymfocytů a histologickou heterogenitu, nejsou histologické rysy dostatečně specifické k předpovědi mikrosatelitní nestability. [17,449]

Sebaceózní nádory se vyskytují v populaci vzácně a více než 50 % je jich asociováno s MTS. Je proto vhodné vyšetřovat všechny tyto tumory imunohistochemicky, bez ohledu na nádorovou zátěž, lokalizaci nebo věk pacienta. [140,287,378] Zároveň se doporučuje screening na viscerální malignity. Kromě horní a dolní gastrointestinální endoskopie pro všechny pacienty se sebaceózními tumory doporučují někteří autoři i urogenitální dohled. [405] Mezi další vyšetření může patřit i pravidelné rtg hrudníku, sledování sérové hladiny CEA (karcinoembryonální antigen), cervikální a močová cytologie, endometriální biopsie a abdominální CT. [407]

Pro potvrzení diagnózy MTS je stejně jako u LS vyžadováno potvrzení zárodečné mutace, kterému předchází vyšetření mikrosatelitní nestability. [91] Imunohistochemické panely pro sebaceózní kožní nádory by měly zahrnovat alespoň *MLH1*, *MSH6* a *PMS2* s nebo bez *MSH2*. [90] Přestože je IHC ztráta exprese proteinu MMR vysoce podezřelá ze zárodečné mutace, může být i v tomto případě způsobena sporadickou mutací MMR genu. Dochází k nim se zvýšenou frekvencí také u pacientů po transplantaci. [424] V případě IHC intaktních MMR proteinů je ale u pacientů s osobní nebo rodinnou anamnézou CRC genetické vyšetření přesto indikováno (podobně jako u jiných případů LS).

V diferenciální diagnostice je třeba brát v úvahu další poruchy (shrnuté v kapitole diferenciální diagnostika), které se prezentují kožními noduly, jako Gardnerův syndrom, Cowdenův syndrom, mnohočetné trichoepitheliomy, basal cell nevus syndrom, mnohočetné keratoakantomy a tuberózní skleróza. [163,262,423,518]

Pro nízký maligní potenciál kožních lézí asociovaných s MTS (kromě sebaceózního karcinomu) spočívá jejich léčba v kompletní chirurgické excizi. [193,357] Léčba

sebaceózního karcinomu vyžaduje širokou chirurgickou excizi nebo Mohsovu mikrografickou chirurgii (Mohs micrographic surgery, MMS). Tento karcinom má sice u MTS v porovnání se sporadickými případy lepší prognózu, ale přesto může mít agresivní chování se sklonem k recidivám, angioinvasi nebo vzdáleným metastázám s úmrtností až 25 %. [18,69,193,357]

Přestože je MTS vzácný, identifikace postižených pacientů a jejich rizikových rodinných příslušníků umožňuje odpovídající vyšetření a screening na viscerální malignity, čímž se významně sníží morbidita a mortalita.

## 6.2 Turcotův syndrom

Turcotův syndrom (TS) byl prvně popsán v roce 1959. [346,479,486] Vyznačuje se vznikem primárních nádorů centrálního nervového systému (CNS) jako je glioblastoma multiforme (GBM) nebo meduloblastom, spolu s četnými adenomatózními kolorektálními polypy a adenokarcinomy. TS je někdy také označován jako „brain-tumor polyposis“ pro výskyt primárních tumorů mozku společně s mnohočetnými kolorektálními adenomy nebo karcinomy. [310,388] Obvykle se projevuje v mladistvém věku a může být geneticky určen buď jako familiární adenomatózní polypóza (FAP) nebo Lynchův syndrom (LS). [225,338] Vzor dědičnosti je autozomálně dominantní. [225,292] Syndrom byl v roce 1997 na základě některých projevů rozdělen na dva typy. [388] TS typu I je charakterizován přítomností gliálních tumorů v dětství i dospělosti a relativně malým množstvím kolonických polypů se vznikem adenokarcinomu. TS typu II se projevuje až tisícovkami polypů tlustého střeva a zvýšeným rizikem vzniku meduloblastomu především v dětství. Genetický podklad obou typů je také odlišný. [184] První typ se projevuje, stejně jako LS, mutací genu *MMR* a má vysoké riziko vzniku GBM. V tomto případě byly mutace detekovány zejména v genech *MLH1* a *PMS2*. [112] Druhý typ se manifestuje zárodečnou mutací genu *APC* (adenomatous polyposis coli), která se obvykle nachází u familiární adenomatózní polypózy (FAP) a vyznačuje se vysokým rizikem vzniku meduloblastomu. [283,387,388] Tuto klasifikaci však nelze aplikovat na všechny případy z literatury, protože některé zprávy hovoří o případech se současným výskytem GBM a meduloblastomu. [331] To ovšem může být způsobeno například léčbou meduloblastomu celomozkovou radiační terapií, na základě které může vzniknout radiací indukovaný GBM. Hlášen je ovšem i výskyt jiných tumorů než GBM a meduloblastom. [472] Fenotypické spektrum FAP a LS se obvykle liší v počtu a velikosti adenomů tlustého střeva a někdy se rozděluje na tři typy. [63,224,226] První typ je charakterizován mnohočetnými polypy v počtu mezi 20-100, z nichž některé mohou být větší než 3 cm v průměru. Typ 2 je spojen s výskytem malého počtu polypů (obvykle méně než 10). U typu 3 se vyskytují mnohočetné malé polypy typické pro klasickou FAP.

Některá pozorování naznačují, že většina pacientů s TS s malým počtem kolorektálních neoplazií, CRC v dětství nebo adolescenci, glioblastomem nebo skvrnami café au lait mají LS spíše než FAP. [184,224,413,479] Histopatologické rozlišení mezi sporadickým GBM a GBM asociovaným s TS nebylo dosud dostatečně objasněno. U třech pacientů s TS-asociovaným GBM zahrnovaly histologické znaky obrovskobuněčnou (giant-cell) variantu GBM, ve dvou případech se sarkomatózními změnami. [310] Nejčastěji hlášenými tumory CNS asociovanými s TS jsou GBM a anaplastický astrocytom. Z 33 hlášených případů bylo 21 GBM a anaplastických astrocytomů. [232] Většina případů TS z literatury je charakterizována rozdílnými časovými intervaly mezi klinickou prezentací tumoru CNS a adenokarcinomem tlustého střeva. [88,184] Současná klinická prezentace GBM a kolorektálního karcinomu přináší více potíží v managementu léčby a může zkracovat dobu

přežití. Navíc je podle většiny hlášených případů přítomnost GBM asociovaného s TS možnou předzvěstí kratšího přežívání v porovnání s ostatními tumory CNS a zároveň přítomnost GBM má také v porovnání s ostatními tumory CNS asociovanými s TS negativní vliv na přežívání. [331,413]

V některých případech mají pacienti s TS další symptomy typické pro jiné familiární polypózy tlustého střeva. Zaznamenány jsou pigmentované léze očního pozadí, epidermální inkluzní cysty, osteosklerotické léze čelistí, cafe-au-lait skvrny nebo lipomy. Zárodečné APC mutace jsou detekovatelné u 2/3 pacientů s TS a zbývající 1/3 představují mutace MMR genů. Molekulární analýzy ukázaly, že mutace TS mohou být heterozygotní, homozygotní nebo smíšené heterozygotní. [88,112]

### 6.3 Syndrom konstitučního mismatch repair deficitu

Jak již bylo zmíněno v kapitole Genetika, syndrom konstitučního mismatch repair deficitu (constitutional mismatch repair deficiency, CMMRD) je velmi vzácně se vyskytující porucha způsobená zárodečnou bialelickou mutací MMR genů. Dědičný vzor je autozomálně recesivní a vyskytuje se tedy především jako výsledek příbuzenských vztahů. CMMRD je charakterizován nádory zažívacího traktu, nádory mozku, hematologickými malignitami a kožními lézemi. CRC je v těchto případech diagnostikován již v průměrném věku 16 let a fenotypický obraz často může připomínat neurofibromatózu 1. typu (NF1), zejména výskytem skvrn café-au-lait. [28,33,149] Mozkové nádory jsou reprezentovány především glioblastomy vznikajícími v prvních dvou dekádách života a hematologické malignity tvoří hlavně T-lymfomy. [33,149] Dalšími malignitami mohou být embryonální nádory a rhabdomyosarkomy. Rodokmeny pacientů s CMMRD většinou vykazují jen malé stopy dědičných nádorových syndromů a většina rodičů je nepostižených. [124] Rodinná anamnéza je proto často nepřínosná. Pro diagnostiku má IHC stanovený deficit exprese MMR proteinů vyšší senzitivitu než analýza MSI. [30] Výhodou představuje možnost provést IHC vyšetření v nenádorové tkáni (postačuje i kožní biopsie). [124] Diagnóza CMMRD s sebou přináší nutnost upraveného screeningového management vzhledem k fenotypickým projevům a jejich manifestaci již ve velmi mladém věku.



## 7 Diagnostika

Včasná klinická diagnostika LS je většinou obtížná z důvodu absence tzv. premorbidního fenotypu. To znamená, že nejsou přítomny benigní změny, které by umožnily diagnózu LS ještě před vznikem maligního tumoru. Výjimku mohou tvořit kožní nádory sebaceózních žlázek a keratoakantomy, které v případě MTS někdy předcházejí vznik interní malignity, nebo skvrny café au lait pacientů s bílelickými mutacemi MMR genů u varianty LS označované jako syndrom konstitučního deficitu MMR. [10,101,123,141,484]

Podezření LS je tedy většinou vysloveno až při nálezů maligního tumoru. Diagnóza LS je proto důležitá především pro rodinné příslušníky pacienta, u kterých pak lze, při prokázání dědičné mutace, vhodně zvoleným screeningem předejít vzniku malignity nebo alespoň docílit jejího včasného záchytu. I v nepřítomnosti typických klinických znaků musí však existovat kritéria pro vyhledávání rizikových pacientů vhodných pro genetické vyšetření. LS je definován zárodečnou mutací v DNA MMR genu. [54] Pro finanční a materiální náročnost genetického vyšetření však není standardem diagnostiky testovat každého pacienta s CRC na zárodečné mutace v DNA MMR genech. Proto byly vyvinuty další vyšetřovací metody s cílem vytipovat rizikové pacienty vhodné ke genetickému vyšetření na zárodečnou mutaci. Žádná z těchto vyšetřovacích metod však není 100 % specifická pro LS a z důvodu zvýšení záchytnosti by proto měly být používány v kombinaci. Výhodou těchto vyšetřovacích metod je také možnost jejich provedení na archivované tkáni vzorků z chirurgických resekcí tumoru nebo biopsií fixovaných formalinem. Někteří odborníci doporučují i testování adenomů větších než jeden centimetr u rizikových jedinců.

### 7.1 Klinická diagnostika

Důležitou roli v diagnóze LS hraje získání komplexní rodinné anamnézy nádorů všech anatomických oblastí s důrazem na hlavní znaky LS. Algoritmický přístup pro posuzování rizik, vyšetřování a screening pacientů a jejich rodinných příslušníků s pokyny pro klinickou praxi však není zcela jednotný. [318] Mezi profesionální skupiny, které vyvinuly obecný konsenzus pro sledování a management LS patří zejména American Cancer Society, American Society of Colorectal Surgeons, National Comprehensive Cancer Network (NCCN) a United States Gastrointestinal Consortium (American Gastroenterology Association). [97,352,458,528] Jiné skupiny jako například American Society of Clinical Oncology a National Society of Genetic Counselors se pak zaměřily především na vlastní genetické testování. Zpočátku se klinická diagnostika LS opírala o tzv. Amsterdamská kritéria (ACI), shrnutá v tabulce 2. [492] Vzhledem k tomu, že u LS se vyskytují i extrakolonické tumory, přestože ne tak často jako CRC, může znalost spektra těchto tumorů také pomoci vyslovit podezření na fenotyp LS. ACI ovšem tyto tumory přehlížela, takže následně došlo k jejich revizi na Amsterdamská kritéria II (ACII), viz tabulka 3. [495]

### 7.2 Histologie

Histologické vyšetření je základní a nejméně finančně náročnou metodou v diagnostice LS. Využívá toho, že MSI-H tumory (především CRC) vykazují typické histologické znaky zahrnující lymfoidní odpověď organismu charakterizovanou tumor infiltrujícími lymfocyty, peritumorálním lymfoidním lemem nebo Crohn-like lymfocytární reakcí, mucinózní

morfologii nebo se vyznačují buňkami tvaru pečetního prstenu (signet-ring cells) se špatnou diferenciací. [237,239,240,459] Medulární karcinom byl popsán jako podtyp v klasifikaci Světové zdravotnické organizace (World Health Organization classification, WHO) a vyskytuje se téměř výhradně v tumorech s MSI-H. [183] Tato typická morfologie společně s klinickými znaky dala vznik pokynům Bethesda guidelines (BG) a jejich později revidované verzi (Revised Bethesda Guidelines, RGB), shrnutým v tabulce 4 a 5. [280,487] Ani RGB však nejsou schopny zachytit odhadem až 25 % pacientů s LS, zejména v případě mutace genu *PMS2* nebo *MSH6*. [121,186,197,201,268,303] Ukázalo se, že samotné histologické znaky charakteristické pro CRC s MSI-H mají vyšší senzitivitu než souhrn zbývajících čtyř kritérií RGB. [218, 244] Snaha nalézt efektivnější algoritmus detekce MSI-H karcinomů vedla ke vzniku dalších modelů predikujících MSI-H status karcinomu. [31,59,173,342,426] Model MMRpredict využívá pro výpočet rizika mutace genu LS u pacienta jeho pohlaví, věk v době diagnózy, lokalizaci nádoru (proximální nebo distální), výskyt vícečetných CRC (synchronních nebo metachronních), výskyt endometriálního karcinomu u někoho z příbuzných prvního stupně a věk v době diagnózy CRC u příbuzných prvního stupně. Hlášená senzitivita a specifita toho modelu byla 69 % nebo 90 %. [36,173] Tento model je dostupný online na <http://hnpccpredict.hgu.mrc.ac.uk/>.

Model MMRpro využívá k určení rizika zárodečné mutace *MLH1*, *MSH2* nebo *MSH6* genu osobní a rodinnou anamnézu kolorektálních a endometriálních karcinomů, věk v době diagnózy a výsledky molekulárního vyšetření na MMR geny, pokud jsou dostupné. [36] Tento kalkulátor rovněž uvádí riziko vzniku karcinomu v budoucnu u asymptomatických nosičů mutace a dalších nepostižených jedinců. Senzitivita u tohoto modelu je uváděna 89 % respektive 85 %. Model MMRpro je taktéž dostupný online, na adrese <http://www4.utsouthwestern.edu/breasthealth/cagene/>.

Model PREMM1,2,6 využívá jako proměnné pohlaví, osobní a rodinnou anamnézu kolorektálních, endometriálních a ostatních karcinomů LS. [259] Výsledkem je konkrétní odhad rizika mutace *MLH1*, *MSH2* a *MSH6* genu. Analýza přesnosti tohoto modelu ukázala senzitivitu 90 % a specifitu 67 %. Použití tohoto modelu pro stanovení rizika LS u obecné populace je nákladově efektivní, pokud byl použit 5 % cutoff jako kritérium pro podstoupení genetického vyšetření zárodečné mutace. [116] Model je k dispozici na <http://premm.dfci.harvard.edu/>.

V současné době se jako jeden z nejefektivnějších jeví model Model PREDICT (Pathological Role in the Determination of Instability in Colorectal Tumors) nebo jeho zjednodušená semikvantitativní forma Semi PREDICT skóre. [218] Tento model využívá lokalizace CRC, věku pacienta a přítomnosti histologických znaků. Konkrétně jde o přítomnost mucinu dissekujícího stroma v jakémkoli množství, přítomnost tumor-infiltrujících lymfocytů (TIL), peritumorální lymfoidní lem a zastoupení plazmatických buněk mezi leukocyty ve stromatu převyšující 25 % (model PREDICT a Semi PREDICT jsou shrnuty v tabulce 6).

CRC v rámci LS vzniká z konvenčního adenomu (tubulárního, vilózního popřípadě tubulovilózního), zatímco sporadické MSI-H karcinomy, obvykle způsobené somatickou metylací promotoru genu *MLH1*, vznikají většinou ze sesilných serrated adenomů (SSA). Přestože ne vždy je při histologickém vyšetření prekursorová léze zachycena, pokud se na okraji CRC vyskytují zbytky SSA, lze usuzovat, že jde pravděpodobně o sporadický karcinom. [237]

## 7.3 Imunohistochemické vyšetření

### 7.3.1 Imunohistochemické vyšetření exprese MMR proteinů

Zárodečné i somatické mutace DNA MMR genů se projevují ztrátou nebo snížením produkce MMR proteinu produkovaného tímto genem. Imunohistochemické vyšetření nádorů využívá protilátky proti MMR proteinům pro odhalení ztráty této exprese. [66,296] Geny *MLH1* a *MSH2* jsou označovány jako hlavní a jsou stabilizovány interakcemi s některým z vedlejších DNA MMR genů (*PMS2* a *MSH6*), se kterými pracují jako heterodimery tvořené komplexy *MLH1-PMS2* a *MSH2-MSH6*. [56,89] Vedlejší DNA MMR geny jsou závislé na svých vazebných partnerech pro expresi na úrovni proteinu a proto je exprese proteinů *MLH1* a *PMS2* nebo *MSH2* a *MSH6* ztracena většinou současně a ukazuje nejspíše na mutaci hlavního genu. Izolovaná ztráta exprese proteinu *PMS2*, *MSH2* nebo *MSH6* obvykle ukazuje na zárodečnou mutaci těchto genů a má tudíž vysokou specifitu pro diagnózu LS. [56,384] Ztráta exprese proteinu *MSH2* může být způsobena také mutací genu *EPCAM*. Zárodečné mutace *MLH1* jsou často typu missense a mohou mít za následek vznik změněného nefunkčního proteinu, který může být exprimován i se zachovalou imunoreaktivitou. [394] To znamená, že normální nebo slabá exprese *MLH1* proteinu, ve spojení se ztrátou exprese *PMS2* proteinu, může být v MSI-H nádorové tkáni způsobena buď inaktivující zárodečnou mutací *PMS2*, nebo missense zárodečnou mutací *MLH1* genu. Z toho důvodu byly také vyvinuty funkční testy pro *MLH1* protein. [51,55,414] Kompletní ztráta exprese *MLH1* a *PMS2* proteinů je často pozorována u sporadických MSI-H CRC způsobených epigenetickým umlčením *MLH1*, protože tento proces zcela umlčuje obě *MLH1* alely. [384,436] Intaktní IHC barvení *MLH1* bylo například pozorováno u 2 z 15 nebo 27 z 818 MSI-H tumorů. [433]

IHC barvení může být nejednoznačné a jeho přesnost tak závisí na zkušenosti patologa a zručnosti laboratoře provádějící toto vyšetření. [40] Nenádorové buňky na skle slouží jako pozitivní kontrola pro případné technické nedostatky barvení, ale MMR geny jsou předmětem fyziologické regulace a nemusí být silně exprimovány v každé buňce. Klíčovým nálezem je tedy absence barvení genového produktu v jádrech nádorových buněk oproti pozitivnímu barvení jader normálních buněk. Kromě přístupu, který hodnotí přítomnost nebo nepřítomnost barvitelnosti jader, existují i návrhy semikvantitativního hodnocení exprese proteinů. [38]

Někteří autoři, vzhledem k možné obtížné interpretaci IHC barvení, doporučují, aby toto vyšetření bylo prováděno v uznávaných referenčních laboratořích s vysoce kvalitními kontrolními mechanismy. Zpočátku byla imunohistochemicky stanovována pouze exprese hlavních proteinů *MLH1* a *MSH2*. Z výše uvedeného však vyplývá, že opominutím proteinů *PMS2* a *MSH6* toto vyšetření nezachytí LS při mutaci jednoho z těchto genů. Detekce exprese těchto vedlejších genů umožní nejen průkaz jejich vlastních strukturálních abnormalit, ale nepřímo i průkaz ztráty aktivity jejich dominantních partnerů. Některé mutace, především v genu *MLH1*, vedou ke ztrátě funkce při zachování IHC antigenicity. V těchto případech může být IHC barvení proteinu *MLH1* pozitivní, ale projeví se ztráta exprese proteinu *PMS2*. [448] Toto zjištění, že ztráta exprese *PMS2* by měla detekovat mutace *MLH1* i *PMS2*, a obdobně *MSH6* i poškození *MSH2*, vedlo k návrhu imunohistochemického detekčního modelu založeného pouze na dvou protilátkách detekujících vedlejší proteiny *PMS2* a *MSH6*. [450] Efektivita tohoto modelu byla však později zpochybněna. [38]

V současné době jsou komerčně dostupné protilátky proti proteinům MLH1, PMS2, MSH2 a MSH6 a při použití všech čtyř je senzitivita IHC vyšetření srovnatelná se stanovením MSI. [185,448] Senzitivita IHC se uvádí 83-95 % a specifita 89-100 %. [40,296] Specifita IHC i MSI vyšetření klesá se zvyšujícím se věkem v důsledku zvýšeného výskytu somatické hypermetylace *MLH1*. U osob starších 70 let se ztrátou exprese MLH1 pak může pomoci rozlišit somatickou ztrátu MLH1 od zárodečné mutace vyšetření na mutaci *BRAF*. [260] Názory na prioritu stanovení MSI nebo IHC vyšetření nejsou jednotné a někteří autoři prosazují plošný screening pomocí MSI, zatímco jiní upřednostňují IHC. Kombinace obou metod má však vyšší senzitivitu než při samostatném použití, protože některé MSI-H tumory nejsou IHC zachyceny a stejně tak MSI neodhalí všechny případy LS. [148,182,296] Hlavními výhodami IHC je nižší finanční a technická náročnost spojená se snadnější dostupností i v menších zdravotnických zařízeních bez pokročilé molekulární laboratoře, kde se diagnostika a výzkum kolorektálních karcinomů stále opírá o interpretaci exprese proteinů detekované IHC. Další nespornou výhodou je možnost identifikovat konkrétní defektní MMR gen pro následné molekulárně genetické vyšetření, čímž se dále sníží náklady detekce zárodečné mutace. [185] Nevýhodou je potom především nemožnost detekovat missense mutace, které nezpůsobují ztrátu exprese MMR proteinů, ale mohou postihovat jejich funkci. Tyto mutace se často objevují u rodin s karcinomem nesplňujícím Amsterdamská kritéria a vedou zřejmě k méně závažným strukturálním změnám kódovaných proteinů a tím k nižší agresivitě nemoci. [43]

V poslední době některé práce doporučují univerzální IHC vyšetřování CRC jako metodu s nejvyšší senzitivitou pro identifikaci LS. [344,349] Testování MMR deficitu by se mělo provádět buď u všech nově diagnostikovaných CRC nebo u CRC diagnostikovaných do 70 let věku a u osob starších 70 let s rodinnou anamnézou zahrnující LS. Testování IHC nebo MSI by mělo být provedeno u každého, jehož osobní a rodinná anamnéza splňuje Amsterdamská kritéria nebo Bethesda guidelines nebo kdo má  $\geq 5$  % predikci rizika podle predikčních modelů. Nádory, které vykazují ztrátu exprese MLH1 by měly být vyšetřeny na mutaci *BRAF* a/nebo hypermetylaci promotoru *MLH1*. S cílem usnadnit operační plánování se doporučuje testování podezřelých CRC pokud možno již na předoperačních biopsiích.

### 7.3.2 Imunohistochemické vyšetření exprese annexinu A10

Jako pomocný IHC marker pro odlišení sporadických MSI-H karcinomů od LS se v poslední době ukazuje také annexin A10, jehož vysoká exprese se prokazuje u sesilných serrated adenomů. Vzhledem k tomu, že na podkladě serrated polypů vzniká většina sporadických MSI-H tumorů, zatímco karcinomy LS vznikají transformací konvenčních adenomů, může být k jejich rozlišení využita právě exprese tohoto proteinu. Jedna práce zaznamenala 378 násobné zvýšení ( $P < 0.001$ ) annexinu A10 ve sporadických MSI-H tumorech oproti nádorům asociovaným s LS. [382] Annexin byl exprimován u 43 % *BRAF* mutovaných a 41 % *BRAF* wild-type sporadických tumorů, zatímco u LS tumorů pouze v 5 % ( $P < 0.0001$ ). Těchto 5 % představovali 3 pacienti, z nichž jeden měl deleční mutaci *MSH2*, druhý variantu nejasného významu v genu *MSH6* a třetí pravděpodobně zárodečnou hypermetylaci *MLH1*. Annexin A10 může být tedy využit jako pomocný marker, nejlépe v kombinaci s IHC vyšetřením exprese MMR proteinů, zejména v menších laboratořích s horší dostupností molekulární genetiky.

### 7.3.3 Imunohistochemické vyšetření VE1 (exprese mutované formy proteinu BRAF)

Podobně jako IHC vyšetření annexinu A10 může být hlavně v menších zařízeních využito jako levnější a dostupnější pomocné metody IHC vyšetření protilátkou VE1, která ukazuje na mutaci V600E genu *BRAF*. Senzitivita této metody dosahuje 91,3-100 % a specifita 98,8 %. [79,190] V další práci bylo dosaženo shody mezi IHC vyšetřením VE1 a genetickou analýzou mutace V600E genu *BRAF* v 98,5 % případů. [439]

### 7.4 Stanovení mikrosatelitní nestability

Mikrosatelity jsou krátké opakující se sekvence většinou jednoho až čtyř nukleotidů, které se poměrně hojně vyskytují v lidském genomu především v intronových sekvencích. Počet opakování těchto sekvencí, tedy délka jednotlivých mikrosatelitů, je u jednoho člověka stejná. V průběhu replikace DNA snadno dochází kvůli horší vazebnosti DNA polymerázy v těchto oblastech ke vzniku kratších případně delších úseků. Pokud nedochází k opravě těchto chyb reparativním systémem DNA, může délka mikrosatelitů u takto postiženého jedince kolísat. Tento jev se potom nazývá mikrosatelitní nestabilita (MSI). Historicky bylo vyšetření na MSI prvním testem pro identifikaci charakteristik tumoru nepřímo poukazujícím na mutaci MMR genu. Tyto testy vyžadovaly standardizaci a výběr optimálních mikrosatelitních sekvencí pro rutinní testování. [57] Podle Bethesda guidelines je ve vyšetřovaném panelu používáno pět mikrosatelitních markerů, z toho tři dinukleotidové a dva mononukleotidové. V naší laboratoři provádíme fragmentační analýzou vyšetření mikrosatelitní nestability pěti mononukleotidových (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24, MONO-27) a tří dinukleotidových markerů (D2S123, D17S250, D5S346), tedy rozšířený Bethesda panel.

Pokud nádorová DNA vykazuje v porovnání s normální nenádorovou tkání novou alelu v jednom z těchto pěti mikrosatelitů, je tento stav označován jako mikrosatelitní nestabilita nízkého stupně (MSI-L). [2] V případě postižení dvou nebo více z těchto mikrosatelitů je potom stav klasifikován jako mikrosatelitní nestabilita vysokého stupně (MSI-H). Nádory bez variability mikrosatelitů jsou označovány jako mikrosatelitně stabilní (MSS). [250] MSI je tedy arbitrárně stanoveným stavem, který vyjadřuje genetické poškození DNA ukazující na defekt jednoho z MMR genů. [57] MSI tedy vyžaduje pro srovnání vzorek normální nenádorové tkáně, byl však také identifikován nový panel pěti mikrosatelitních markerů, které mohou být použity v pentaplexové polymerázové řetězové reakci (PCR), která je více sensitivní i specifická a nevyžaduje analýzu normální tkáně. [468] Význam MSI-L tumorů je kontroverzní. Někteří autoři uvádějí, že MSI-L tumory nemají klinické nebo patologické znaky pozorované u MSI-H karcinomů, nejsou spojeny se zárodečnou mutací MMR genů a tudíž MSI-L v CRC neukazuje na LS a tato abnormalita se zdá být způsobena nemutační somatickou down-regulací *MSH3* genu. [195,289] Existují náznaky spojení s některými zárodečnými mutacemi genu *MSH6*. [529] Somatická down-regulace *MSH3* je spojena s MSI-L, stejně jako mutace v trinukleotidových a tetranukleotidových opakováních, ovšem už ne mutace v mononukleotidových a dinukleotidových sekvencích, které se používají pro standardní zjišťování MSI. [195] Nádory s MSI-L tvoří asi 20 % ze všech CRC.

Nádory s MSI-H vznikají buď jako sporadické tumory vyvolané genetickými a epigenetickými změnami v somatické buňce, nebo jako familiárně se vyskytující nádory v rámci LS způsobené zárodečnou mutací některého z MMR genů. Čtyři z pěti MSI-H CRC jsou sporadické tumory způsobené somatickou epigenetickou inaktivací MMR genu, nejčastěji metylací promotoru *MLH1*.

Samotné vyšetření MSI bez analýzy genu *BRAF* a stavu metylace promotoru *MLH1* tedy nedokáže odlišit sporadické CRC od syndromových. Ačkoli je mutovaná alela děděna autozomálně dominantně, k vlastnímu vzniku nádoru dochází až somatickou inaktivací druhé alely téhož genu, protože MMR geny patří mezi typické tumor supresorové geny s recesivním charakterem účinku. [535] Příčinou této inaktivace může být somatická mutace v druhé alele genu, ztráta heterozygosity (LOH) nebo metylace promotoru, jak tomu bývá u genu *MLH1*. [277]

Přestože je MSI-H sice typická pro LS, není však specifická a tvoří asi 15 % ze všech CRC. Z této skupiny MSI nádorů představuje asi 20-25 % LS a zbývajících 75-80 % jsou tumory sporadické. [105,255,325] Nádory v rámci LS pak vykazují MSI-H v 70-90 %, zatímco sporadické CRC pouze ve 12-15 % případů. [2,131,254,397] U sporadických karcinomů je MSI-H spojena většinou spíše s hypermetylací promotoru genu *MLH1* než se somatickými mutacemi MMR genů. [2,131,254,397]

Výběr pacientů s tumorem vhodným k testování na MSI byl usnadněn se vznikem Bethesda guidelines. Ukázalo se však, že pouze část lidí s CRC před 50. rokem věku má LS. V jedné studii vykazovalo 58 % pacientů mladších než 35 let CRC s MSI, zatímco mezi 35 a 55 lety už to bylo pouze 17 %. [301] Diagnostický přínos testování zárodečných mutací všech mladých pacientů s CRC nebo testování případů pouze z rodinných důvodů je uváděn méně než 50 %. Nádory bez MSI mají mnohem nižší diagnostický přínos z mutačního testování, a proto testování na MSI zvyšuje predikční význam vybraných klinických znaků.

Senzitivita molekulárně biologického testování CRC na MSI pro diagnostiku LS je odhadována na 85-86 % se specificitou až přes 90 %. [56,384,448] Někteří autoři uvádějí, že kolem 5 % ze všech nosičů mutace LS není MSI testováním odhaleno. To je také důvod, proč někteří autoři doporučují používat toto vyšetření v kombinaci s IHC. Typickým příkladem přínosu IHC mohou být případy s mutací genu *MSH6*, protože *MSH2* může vytvořit komplex také s *MSH3* a nemusí tedy nutně vzniknout stav MSI-H. [56,202,448] Vyšetření zárodečné mutace je však obecně doporučeno, pokud je u tumoru identifikována MSI-H. Jak již bylo také uvedeno, specificita MSI vyšetření klesá se zvyšujícím se věkem v důsledku zvyšujícího se výskytu somatické hypermethylace promotoru *MLH1*, často v přítomnosti somatické mutace V600E genu *BRAF*. [260] Výhodou testování MSI je také její prediktivní hodnota. MSI je totiž spojována s lepší klinickou prognózou (celkovou i podle stádií) a horší odpovědí na adjuvantní chemoterapii ve druhém a třetím stádiu CRC. [180,419]

## 7.5 Mutace V600E genu *BRAF*

Gen *BRAF* je lokalizovaný v chromozomálním regionu 7q34, skládá se z 18 exonů a délka transkribované mRNA je 2478 bp. Gen *BRAF* je členem *RAF-RAS* rodiny genů a kóduje protein z rodiny raf/mil serin/threoninových kináz, důležitou složku signální cesty MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase) ovlivňující buněčné dělení, diferenciaci a sekreci. Asi 80 % mutací genu *BRAF* je způsobeno transverzí T1799A v kodonu 600, která vede k aminokyselinové záměně V600E. Mutace V600E propůjčuje buňkám transformační aktivitu, protože simuluje fosforylaci na T599 nebo S602 v aktivační doméně proteinu BRAF. Díky tomu zůstává protein BRAF permanentně v aktivním stavu, bez ohledu na signalizaci RAS. Geny *BRAF* a *KRAS* se účastní stejné proliferaci podporující signální cesty a ve většině CRC je možné identifikovat buď mutaci

*BRAF* nebo *KRAS*, ale ne obojí. Zatímco *BRAF* mutace jsou úzce spojeny se sporadickými MSI CRC, tak mutace genu *KRAS* bývají pozorovány u karcinomů asociovaných s LS. Somatické mutace genu *BRAF* byly detekovány u sporadických CRC, kde tvoří 15-50 % ze všech případů, ale jen výjimečně u LS. [113,117,118] Mutace *BRAF* je u LS obvykle wild-type a pouze 1,4 % pacientů s LS nese mutaci *BRAF* V600E. [391]

Přítomnost mutace *BRAF* v MSI-H karcinomu tedy obvykle svědčí pro sporadický CRC. [356] Tyto karcinomy vznikají důsledkem metylační cesty CIMP (CpG island methylator phenotype) a mohou také vykazovat MSI-H díky somatické metylaci promotoru *MLH1*. Tyto tumory se často vyskytují u starších pacientů bez pozitivní rodinné anamnézy, vykazují inaktivaci *MLH1*, ale neprokáže se zárodečná mutace některého z MMR genů. [3] Ukázalo se, že většina takových karcinomů má epigenetický základ a že případy s prokázanou hypermetylací promotoru *MLH1* často nesou *BRAF* mutaci V600E. [47,255]

CRC u LS mají také metylátorový fenotyp, ale v tomto případě je definován metylací jiných cílových míst a aktivační mutací *KRAS*. To ukazuje jak rozdílně nebo i paralelně fungují tyto mechanismy při stimulaci rychlého růstu v CRC s MSI. [353] Ve studii obsahující 1222 CRC byl ve 119 případech identifikován MSI status (u 111 pacientů) nebo ztráta exprese proteinu (u 81 případů). Z toho byla *BRAF* mutace prokázána u 22 nádorů (18,5 %), avšak v žádném případě u jednoznačně prokázané zárodečné mutace MMR.

Detekce mutace V600E genu *BRAF* tedy pomáhá rozlišit sporadické MSI-H karcinomy od syndromových, čímž snižuje celkové náklady genetického testování. Její význam je vidět především při nedostupnosti rodinné anamnézy, protože pravděpodobnost MSI na podkladě sporadické mutace je tím menší, čím je klinické podezření na LS větší. Pro odhalení sporadických MSI tumorů by měl být současně proveden i test hypermetylace promotoru *MLH1*. [186] Analýza *BRAF* mutace je u LS přínosná pouze u CRC, a ne extrakolonických nádorů.

## 7.6 Hypermetylace genu *MLH1*

Sporadické deficity MMR proteinů v CRC často vznikají kvůli metylaci CpG ostrůvků v promotoru genu *MLH1*. [164,375] Některé z běžně metylovaných promotorů nemají zřejmou roli ve vývoji nádoru a byly označeny jako *MINT* (methylated in tumor) geny, ale metylace se vyskytuje také v promotorech známých tumor supresorových genů DNA opravných genů, včetně *MLH1*. [375] Oblast promotoru *MLH1*, ve které metylace zprostředkovává umlčení genů je 3' konec, blízko start kodonu. 5'konec promotoru je také náchylný k metylaci, ale metylace v této oblasti nemá funkční význam, pokud se nerozšíří do 3' kritické oblasti. [114] Proto jsou specifické CpG zbytky pro umlčení genů důležitější než ostatní oblasti. Většina CRC se sporadickou MSI vzniká tedy na pozadí CIMP a tím se významně odlišují od tumorů asociovaných s LS. [60,353,375]

Metylace se zvyšuje s vyšším věkem, je akcelerovaná v tlustém střevě jakožto odpověď na chronický zánět a může představovat součást adaptivní odpovědi na poranění. [222,223] Většina CRC se sporadickým deficitem MMR proteinů vzniká u pacientů starších než 60 let s predominancí žen 2-3:1. Tato metylace je z velké většiny somatickou událostí a jen vzácně bývá dědičná (viz kap. Genetika). Pokud je hypermetylace promotoru *MLH1* genu bialeická, vyústí ve ztrátu exprese proteinu *MLH1* s *PMS2*.

Vyšetření *BRAF* mutace spolu s metylací *MLHI* pomáhá v diagnostice LS určením sporadických CRC, které tak mohou být vyloučeny z nákladného testování na zárodečné mutace MMR genů. Protože se však může vzácně vyskytnout zárodečná metylace *MLHI* i mutace *BRAF* u LS, je třeba brát v úvahu i rodinnou anamnézu a při silném podezření na LS tuto diagnózu hned nevylučovat.

Přibližně u 50-70 % CRC s metylací promotoru *MLHI* může být identifikována mutace V600E genu *BRAF*. [194,245,330,345,391] MSI v CRC následkem hypermetylace *MLHI* vzniká přibližně u 12 % případů. [106] Extrakolonické tumory zažívacího traktu mohou také vykazovat hypermetylacii promotoru *MLHI*, která není asociovaná s mutací *BRAF* V600E.

## 7.7 Molekulárně genetické vyšetření na zárodečné mutace MMR genů

Pro definitivní diagnózu LS je nezbytné molekulárně genetické prokázání zárodečné mutace genu MMR, které se provádí za pomoci PCR přímým sekvenováním dle Sangera. Přítomnost rozsáhlých delecí, případné metylace promotorů MMR genů a mutace genu *EPCAM* se vyšetřují za pomoci metody MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). Analýza se provádí z nesrážlivé periferní krve pacienta jednak proto, že průkaz mutace mimo nádorovou tkáň potvrzuje její zárodečnou povahu, a jednak proto, že z důvodu technické náročnosti je výtěžnost z krve výrazně vyšší než z nenádorové tkáně fixované ve formolu. Krev se odebírá do vakuety EDTA (pro geny *MLHI*, *MSH2* a *MSH6* vyšetřením gDNA) skladovaných při teplotě 4-8 °C. Pro gen *PMS2*, který se analyzuje z RNA, se používají speciální vakuety PAX gene bránící RNA před degradací. Tyto vakuety se před použitím skladují v pokojové teplotě (18-25 °C), plní se jako poslední, poté se 8-10x převrátí dnem vzhůru a po dvouhodinovém odstání v pokojové teplotě se skladují nastojato buďto krátkodobě (do 24 hodin) v teplotě 4-8 °C, nebo při nutnosti delšího skladování při teplotě -20 °C. Senzitivita a specifita sekvenování se pohybuje okolo 99% a v případě metody MLPA se uvádí senzitivita 90 % a specifita 98 %. Diagnostickou chybu mohou způsobit vzácné polymorfismy v místě nasedání primerů nebo prob a mutace hluboko v intronových a regulačních sekvencích nemusí být zachyceny. Somatické mutace nemusí být sekvenováním zachyceny, pokud nejsou poškozené buňky zastoupeny alespoň ve 20 %.

Detekce zárodečných mutací DNA sekvenováním je zlatým standardem, ale pro finanční náročnost může být nahrazena denaturační vysokotlakou kapalinovou chromatografií (Denaturing high pressure liquid chromatography, dHPLC) jakožto primární screeningovou metodou pro mutace, díky její nižší ceně. Nevýhodou dHPLC je, že nemůže detekovat přesnou pozici mutace a proto může být nutné následné DNA sekvenování. Aby se co nejvíce snížil počet zbytečných nebo neopodstatněných nákladných genetických testů, je v současné době nutné předem vybrat pacienty vhodné pro analýzu zárodečných mutací pomocí výše uvedených vyšetřovacích metod. Průkaz ztráty exprese konkrétního MMR proteinu pomůže zacílit genetiku na konkrétní MMR gen, čímž se také dále sníží náklady. Potvrzení diagnózy LS je důležité nejen pro další management pacienta, ale také pro rizikové členy jeho rodiny, kteří jsou pak testováni přímo na identifikovanou mutaci probanda za vynaložení menších nákladů.

Tradiční indikace pro genetické testování LS byly vyvinuty konsenzem odborníků z různých institucí a národních organizací, včetně NCCN (National Comprehensive Cancer Network). [19,155,159,210,351,352,425,461,462,483] Genetická analýza je indikována pro pacienty z rodin splňujících Amsterdamská kritéria I, II nebo revidovaná Bethesda guidelines, pacienty



s endometriálním karcinomem diagnostikovaným před 50 lety věku, nebo u příbuzných prvního stupně pacientů se známou MMR/EPCAM mutací, a někteří odborníci ho doporučují i u pacientů s >5 % pravděpodobností genové mutace podle počítačového modelu. [116] Jestliže není k dispozici vzorek nádoru pro předchozí metody, pak je testování zárodečné mutace u nepostížených příbuzných pacienta opodstatněné se zaměřením na rodinné příslušníky s největší pravděpodobností výskytu mutace. Genetické testování by mělo být nabídnuto všem rizikovým příbuzným v rodinách se známou mutací MMR nebo *EPCAM* genu. U pacientů s CRC v rodinách splňujících Amsterdamská kritéria I, kdy se prokáže MSS s expresí všech MMR proteinů by měla být, kromě sporadického CRC, zvažena diagnóza FCRCTX (familiární CRC typ X).

Výsledkem zárodečného testování může být patogenní mutace MMR nebo *EPCAM* genu, která potvrzuje diagnózu LS u pacienta a rodiny. Pokud není nalezena žádná mutace, jde buď o neprůkazné zjištění (dokud se patogenní mutace nenalezne u jiného člena rodiny) nebo o výsledek nejasného významu s neprůkazným zjištěním. Variantou nejasného významu se rozumí změna v genetické sekvenci, jejíž asociace s rizikem onemocnění je neznámá, dokud není budoucí status alterace určen testovací laboratoří. V těchto případech pokud IHC odhalí samostatnou ztátu MSH2, MSH6 nebo PMS2 proteinu, by mělo být podezření na LS zachováno a měla by být v úvahu brána diagnóza Lynch-like syndromu. U vzácných epigenetických mutací by měla být metylace promotoru *MLH1* jak v nádorové tak ve zdravé tkáni. Neustále jsou reportovány nové typy mutací, genetických alterací podobně jako efekt *EPCAM* delecí na expresi *MSH2* nebo vzácné germinální epimutace *MLH1*.

Některé komerční laboratoře provádějící zárodečné testování mohou také postrádat citlivé technologie pro stanovení alterace v promotorech a intronech MMR genů nebo pro genetické přestavby, ve kterých jsou všechny genetické komponenty zachovány. Rodiny s podezřelou klinickou historií a současně průkazem deficitu MMR v nádorové tkáni by měly být poučeny o nezbytnosti podstupování pravidelné opakované analýzy, protože se mohou objevit nová genetická data, která mohou objasnit základní příčinu zvýšeného rizika malignity v jejich rodině. Konkrétní mutace lze dohledat v databázi HGMD (The Human Gene Mutation Database) online, na adrese <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>.

## 7.8 Analýza konverze

Konvenční DNA sekvenování nemůže detekovat některé mutace MMR genů z toho důvodu, že wild-type alela může maskovat alelu mutovanou. K detekci těchto případů byla vyvinuta analýza konverze z diploidní na haploidní, aby se oddělily alely otce a matky, čímž se odmaskuje přesný typ kryptické mutace. Tato technika byla vyvinuta pro její potenciál detekovat heterogenní zárodečné mutace v genech *MLH1*, *MSH2* a *MSH6* u pacientů s CRC podezřelých z LS. Konverzní analýza zprostředkovala 56 % nárůst diagnostického výtěžku genetického testování v porovnání se samotným genomovým DNA sekvenováním. [84] Ve skutečnosti nebyla původně zárodečná mutace rodiny G získána přímým sekvenováním, ale byla identifikována jako T → G transverzní mutace v místě sestříhu akceptoru exonu 4 genu *MSH2* za pomoci konverze [532]. Tato metoda je však těžkopádná na provedení a v běžné klinické praxi se neujala.

## 8 Klinické aspekty Lynchova syndromu

Doporučení pro management léčby a screeningu pacientů s LS se u některých částečně liší, ale v základních otázkách se jednotlivá doporučení většinou shodují. Existuje více skupin zabývajících se touto problematikou, především NCCN, skupina Mallorca group a US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. [312,313,352] Publikováno bylo mnoho článků zabývajících se diagnózou, molekulární genetikou, screeningem a managementem LS. [32,95,143,297,312,313]

### 8.1 Screening a léčba kolorektálního karcinomu

Kolorektální karcinom (CRC) se odhadem ročně projeví u více než jednoho milionu pacientů. [220] V České republice se incidence pohybuje okolo 8000 případů ročně. Z toho počtu způsobuje LS odhadem 3-5 % a osvětluje 10-25 % familiárních CRC, které tvoří asi 20 % ze všech CRC. [1,7,185] CRC se při asociaci s LS vyskytuje většinou v proximální části tlustého střeva, 70-80 % vzniká proximálně od splenické flexury. Riziko vzniku CRC u LS se udává 50-80 % s průměrným věkem v době diagnózy 45 let, což je přibližně o 20 let dříve než u sporadických CRC. [243,412] S tím souvisí i rychlejší progresse z adenomu do karcinomu, ke které dochází u LS pravděpodobně během 2-3 let, na rozdíl od 8-10 let u sporadických případů. [241,312] Je také zvýšené riziko vzniku synchronního a metachronního CRC. [312]

U LS je často popisováno lepší přežívání pacientů s CRC a přestože není zcela jasné, na jakém podkladě tato výhoda vzniká, je popisována i u sporadických CRC s MSI-H. [180,221,477] Jedna retrospektivní studie porovnávala stádia CRC a přežití u pacientů s LS oproti náhodným nemocničním skupinám pacientů se sporadickým CRC. [514] Ukázalo se, že v době diagnózy vykazovali pacienti s LS nižší stádium onemocnění a méně vzdálených metastáz ve srovnání s náhodnými sériemi pacientů. Po úpravě výsledků pro jejich mladší věk v době diagnózy měli pacienti s LS značnou výhodu v přežití před náhodně vybranými pacienty, s poměrem rizik 0,67 ( $p < 0.0012$ ).

Prognostické výhody či nevýhody u extrakolonických malignit v rámci LS jsou popsány mnohem méně. Jedna z prací například uvádí, že na rozdíl od CRC nebyly objeveny žádné rozdíly v 5 letém přežívání mezi pacientkami s ovariálním karcinomem u LS a těmi se sporadickými ovariálními karcinomy. [103]

Celogenomovými asociačními studii 675 pacientů s LS byly identifikovány některé běžné varianty mutací ovlivňující CRC. [521] Výsledky odhalily významnou souvislost mezi rizikem vzniku CRC u nosičů těchto mutací a jednonukleotidovými polymorfismy rs16892766 na chromozomu 8q23.3 a rs3802842 na chromozomu 11q23.1. Tyto dva identifikované lokusy mohou pomoci vytipovat členy rodiny s LS, kteří vyžadují intenzivnější screening na CRC. Přítomnost jedné z těchto variant může dokonce mírně zvýšit riziko CRC i u těch členů rodiny, kteří nemají MMR mutaci.

První návrhy kolorektálního screeningu vycházely z dlouhodobé studie srovnávající výskyt CRC ve dvou skupinách ohrožených příslušníků 22 rodin s LS. [233] Karcinom se vyvinul u 8 pacientů (6 %) podstupujících screening tlustého střeva a u 19 pacientů (16 %;  $p = 0.014$ ) bez screeningu. To odpovídá snížení o 62 %. Navíc byly všechny CRC u screenované skupiny lokalizované a nezpůsobily smrt pacienta, zatímco v nescreenované skupině pacientů jich 9 na

CRC zemřelo. Jako argument pro kratší intervaly mezi screeningovými vyšetřeními použila jiná studie 5 nově vzniklých karcinomů během 3,5 roku po poslední negativní kolonoskopii u pacientů s LS. [390]

Při zkoumání kumulativního rizika rozvoje kolorektálního adenomu nebo karcinomu v očekávaném kolonoskopickém screeningu 420 nosičů mutace LS bez předchozího CRC bylo zjištěno kumulativní riziko vzniku adenomu do věku 60 let přibližně 68 % u mužů a 48 % u žen. [333] Kumulativní riziko vzniku CRC do věku 60 let, při screeningových intervalech 2-3 roky, bylo 35 % u mužů a 22 % u žen. Přibližně polovina ze všech těchto adenomů byla lokalizována proximálně od lienálního ohbí.

Zkušenosti ukazují, že endoskopické odstraňování adenomů snižuje riziko vzniku CRC. I v případech kdy byla screeningová kolonoskopie v intervalech 2-3 roky stále spojena s poměrně vysokým počtem nově vzniklých CRC, nebylo v souvislosti s těmito karcinomy zaznamenáno žádné úmrtí, pokud byla dodržena screeningová doporučení.

Byl také zaznamenán výskyt typický výskyt drobných a plochých adenomů v proximální části tlustého střeva s vysokým rizikem maligního zvratu. [217] Ke zlepšení záchytu těchto malých lézí byly vyvinuty různé techniky. Objevilo se například použití chromoendoskopie s indigokarmínem nebo metylenovou modří a tzv. narrow band imaging (NBI). NBI je endoskopická metoda umožňující pozorovat slizniční změny charakteristické pro rozvoj a růst epitelových nádorů, která pomocí filtrovaného světla dosahuje vyššího kontrastu mezi epitelem a slizničními cévami než při pozorování bílým světlem. Filtrované světlo je složeno pouze ze dvou vlnových délek (415 a 540 nm), které jsou vysoce absorbovány červeným krevním barvivem. Kratší vlnová délka penetruje velmi povrchově a zvýrazní velmi dobře kapilární kličky v slizničním epitelu, zatímco světlo s větší vlnovou délkou proniká dále a zvýrazní spíše venózní hlouběji uložené pleteně. Protože je patologická neovaskularizace spojena s každým výskytem slizniční malignity, metoda výrazně zlepšuje citlivost vyšetření a lze tak zachytit i velmi drobné změny, které v bílém světle nejsou pozorovatelné.

Ve studii porovnávající některé tyto metody v páru tandemových kolonoskopií u 25 asymptomatických pacientů splňujících Amsterdamská kritéria I bylo potvrzeno, že pankolonická chromoskopie zlepšuje detekci signifikantní neoplázie. [217] Práce srovnávala konvenční kolonoskopii s využitím cílené chromoskopie a následnou pankolonickou chromoskopickou kolonoskopií. Panchromoskopie v porovnání s konvenční kolonoskopií identifikovala výrazně více stopkatých adenomů ( $p = 0.001$ ) a plochých adenomů ( $p = 0.004$ ). Za účelem otestovat screeningový program v Holandsku, de Jong s kolektivem porovnali CRC mortalitu před a po roce 1990. [249] Jejich studie ukázala 70 % pokles v CRC mortalitě po nástupu rozsáhlejšího kolonoskopického screeningu po tomto arbitrárně stanoveném roce. Při porovnání konvenční kolonoskopie s chromoendoskopií za použití indigokarmínového barviva nastříknutého do proximální části tlustého střeva vykazuje chromoendoskopie signifikantně vyšší záchyt adenomů v proximální části tlustého střeva (z 3/33 na 10/33 pacientů,  $p = 0.005$ ). [285]

Při NBI následované po konvenční kolonoskopii s bílým světlem u 62 pacientů s LS bylo nalezeno více plochých adenomů oproti stopkatým adenomům (45 % proti 12 %). [125] Jiné srovnání metod endoskopických vyšetření proběhlo na 54 pacientech s LS pomocí tandemových kolonoskopií. [464] Byla porovnávána senzitivita chromoendoskopie oproti intenzivní inspekci při identifikaci polypů přehlédnutých konvenční kolonoskopií. Všichni pacienti nejprve podstoupili konvenční kolonoskopii s odstraněním všech viditelných polypů

a u druhé kolonoskopie byli náhodně rozděleni na skupinu, která podstoupí pankolonickou indogokarmínovou chromoendoskopií a skupinu, která podstoupí intenzivnější konvenční kolonoskopii s bílým světlem (20 minut). Průměrný interval od poslední kolonoskopie byl 17,5 měsíce. Celkem 17 polypů (10 adenomů a 7 hyperplastických polypů) bylo identifikováno během standardních kolonoskopií, zatímco dalších 23 polypů (12 adenomů a 11 hyperplastických polypů) bylo identifikováno u druhých vyšetření. Míra přehlédnutí adenomu byla tedy 55 %. 15 z těchto napodruhé nalezených polypů (5 adenomů a 10 hyperplastických polypů) bylo identifikováno chromoendoskopií a 8 polypů (7 adenomů a 1 hyperplastický polyp) intenzivní konvenční endoskopií s bílým světlem. Chromoendoskopie detekovala více polypů ( $p = 0.04$ ), ale detekce adenomů nebyla nijak významně rozdílná. Pokud jde o lokalizaci adenomů v tlustém střevě, tak porovnání 25 adenomů tlustého střeva u pacientů s potvrzeným LS a 75 adenomů od pacientů splňujících Amsterdamská kritéria I oproti 152 sporadickým adenomům potvrdilo převažující pravostrannou lokalizaci familiárních lézí. [420,421] Zatímco sporadické adenomy byly situovány v proximální části střeva ve 26 % případů, familiární adenomy se v této lokalizaci vyskytovaly v 50 % případů a navíc v této oblasti častěji progredovaly do high-grade dysplazie a to i při menší velikosti než distálně situované ( $p < 0.001$ ) a sporadické adenomy. Adenomy u familiárních případů byly také celkově menší v porovnání se sporadickými.

Časná kolonoskopie v častějších intervalech má tedy přínos především v odhalování plochých a rychle progredujících adenomů a další metody jako například chromoendoskopie nebo NBI mohou ještě zvýšit záchytnost.

Pro zvýšené riziko vzniku CRC a extrakolonických malignit v časném věku u pacientů s LS se obecně doporučuje s pravidelnými kontrolami začít ve věku 20-25 let. Prevence pacientů s LS je založena na odlišných charakteristikách těchto malignit oproti nádorům bez asociace s LS. Jde především o prezentaci tumorů v mladším věku, predominanci v pravém tračníku a rychlý růst polypů s kratší dobou prodlevy před maligním zvratem. Efektivita screeningu na CRC na snížení mortality byla prezentována již v několika studiích. [233,234,236] Pacienti, kteří podstoupili kolonoskopický screening měli o 65 % ( $P=0.003$ ) méně úmrtí na CRC v porovnání s těmi, kteří endoskopií odmítli.

Jiná prospektivní observační studie kolonoskopického screeningu členů rodin s LS ukazuje 72 % pokles úmrtnosti na CRC u pacientů podstupujících endoskopický screening. [120] Další práce prezentují spojení častějšího kolonoskopického screeningu s časnějším stádiem CRC v době diagnózy a menším počtem CRC než u endoskopie v intervalech delších než dva roky. [130,390,467,489] Kolonoskopický screening na CRC je doporučován u pacientů s LS a jejich příbuzných prvního řádu každý 1-2 roky, se začátkem mezi 20-25 lety věku nebo 2-5 let před nejmladším věkem výskytu CRC v rodině, pokud byl před 25 lety věku.

U nosičů zárodečné mutace genu MMR je třeba zvážit každoroční kolonoskopii. Vhodný věk pacienta pro začátek screeningu CRC a jeho frekvence se víceméně shoduje v doporučeních různých odborných organizací. [158,177,236,297,352,490] Nosiči patogenních mutací *MSH6* a *PMS2* mají menší riziko vzniku CRC a věk v době diagnózy bývá pozdější než u pacientů s mutacemi *MLH1* a *MSH2*, proto by u nich měl být počátek screeningu zvážen ve 30 letech u mutací *MSH6* a ve 35 letech u mutací *PMS2*, pokud se v jejich rodině nevyskytl CRC časněji. [29,158,447]

Primární metoda léčby pacientů s CRC nebo premaligními polypy, které nemohou být odstraněny kolonoskopicky, spočívá v kolektomii s ileorektální anastomózou. LS však přináší

i vyšší riziko vzniku metachronního CRC. V případě léčby částečnou kolektomií je v některých studiích hlášeno poměrně vysoké (16-19 %) 10 leté kumulativní riziko metachronního CRC, které se dále zvyšuje s narůstající délkou pozorování, a to i u těch pacientů kteří podstupují zvýšený kolonoskopický dohled. [126,390,503,526]

Celkové riziko vzniku CRC se uvádí 24,5 % a kumulativní riziko do 30 let až 69 %. [526] Toto riziko se podstatně sníží (asi na 0-3,4 %), pokud je provedena subtotální kolektomie s anastomózou tenkého střeva na sigmoideum nebo totální kolektomie s ileorektální anastomózou. [126,390,526] V jedné studii srovnávající kvalitu života mezi 51 pacienty s LS, kteří podstoupili částečnou kolektomii, a 53 pacienty se subtotální kolektomií nebyly zaznamenány žádné výraznější rozdíly. Přesto ale funkční výsledky, jako například frekvence stolice a sociální dopady s tím související, byly horší po subtotální než po parciální kolektomii. [181]

Při srovnání délky života získané provedením totální kolektomie oproti hemikolektomii u pacientů s LS ve věku 27, 47 a 67 let podle Markovova modelu bylo 2,3, 1 a 0,3 roku. [501] Totální kolektomie je preferovanou léčbou CRC u LS, ale hemikolektomie může být alternativou obzvláště u pacientů starších než 60-65 let nebo se současnou dysfunkcí svěrače. [158] Někteří autoři však doporučují kolektomii s ileorektální anastomózou bez ohledu na věk pacienta. [352,490] Jak již bylo uvedeno, většina CRC u LS je pravostranně lokalizovaných, ale až 20 % nádorů může vzniknout v rektu. U pacientů s LS, kteří měli přední resekci pro karcinom rekta, bylo zjištěno až 51 % riziko metachronního karcinomu nebo těžké dysplazie. [253] V těchto případech je tedy třeba zvážit i použití neoadjuvantní chemoradioterapie a totální proktokolektomie s ileo-pouch-anální anastomózou (IPAA). Tento postup se běžně využívá při familiární adenomatózní polypóze (FAP) u pacientů s těžkou rektální polypózou nebo karcinomem. V případě FAP jsou však v době zákroku pacienti obvykle mladší než pacienti karcinomem rekta u LS a tato operace by u nich měla představovat výzvu k chirurgické obnově a tím zvýšení pooperační kvality života.

Jako možnou chemoprevenci u pacientů s LS posuzoval program prevence kolorektálního adenomu/karcinomu (The Colorectal/Adenoma/Carcinoma Prevention Programme 2, CAPP2) rezistentní škrob a aspirin (kyselinu acetylsalicylovou). Šlo o randomizovanou placebem kontrolovanou studii zkoumající účinek rezistentního škrobu v dávce 30 g/den a aspirinu v dávce 600 mg/den po dobu 4 let na vznik kolorektálního adenomu a karcinomu. [72] Náhodně bylo vybráno 727 osob pro škrob nebo placebo a 693 dalších pro aspirin nebo placebo. Výstupy z tohoto programu však nejsou jednoznačné. V prvních výstupech použití rezistentního škrobu, aspirinu nebo obou neukázalo žádný efekt na incidenci kolorektální neoplazie u nosičů LS během průměrné doby sledování 29 měsíců. Ani další analýza dlouhodobého efektu s mediánem sledování 52,7 měsíců neodhalila u rezistentního škrobu žádný efekt na vznik CRC. [327] Další hodnocení se týkalo dlouhodobého účinku 600 mg aspirinu na vznik CRC. [73] Při průměrné době sledování 55,7 měsíců analýza ukázala poměr rizik 0,63 (95 % CL: 0,35-1,13; P = 0.12). Pro účastníky, kteří dokončili dvouletou studii (258 na aspirin a 250 na placebo) analýza odhalila poměr rizik 0,41 (95 % CL: 0,19-0,86; P = 0.02). Při hodnocení vzniku i dalších karcinomů asociovaných s LS, včetně CRC, endometriálního karcinomu, nádorů vaječníků, slinivky, tenkého střeva, močového, žaludku, ledvin a mozku, výsledky ukazují na protektivní účinek aspirinu oproti placebo s poměrem rizik 0,65 (95 % CL: 0,42-1,00; P = 0.05). Nežádoucí účinky se mezi skupinou s aspirinem a skupinou s placebem během výzkumu nelišily. Chemoprotektivní účinek aspirinu na kolorektální a extrakolonické tumory zaznamenaný v CAPP2 studii pacientů s LS podporuje analýza randomizovaných studií o denním užívání aspirinu s průměrnou dobou léčby 4 a více

let oproti pacientům aspirin neužívajícím. [429] Podle této práce bylo snížené riziko úmrtí na CRC nebo extrakolonickou malignitu po 10-20 letech sledování. Výsledky také poukazují na fakt, že tento benefit nesouvisel s dávkami aspirinu >75 mg/d. Přes některé nedostatky studie CAPP2 jako například možnou intenzivnější kolonoskopii u skupiny s aspirinem z důvodu častějších nežádoucích účinků, molekulárně geneticky nepotvrzené zárodečné mutace MMR genů extrakolonických tumorů nebo použití významně vyšších denních dávek aspirinu než 75 mg/d, výsledky naznačují, že by při vhodně zvolených dávkách mohla léčba aspirinem dlouhodobě snižovat riziko vzniku kolorektálních a extrakolonických malignit u pacientů s LS. [429] Přes nedostatečnou přesvědčivost důkazů však někteří autoři navrhují, aby individuální léčba pacientů aspirinem přicházela v úvahu po zvážení specifických rizik, výhod a nejistého výsledku u konkrétního pacienta. [352,490]

Další důležitá pozorování se týkají rezistence MSI-H nádorů na některá chemoterapeutika. Jak již bylo uvedeno, systém MMR DNA byl původně objeven u bakterií a bylo u nich zjištěno, že mutátorový fenotyp jim poskytuje relativní rezistenci vůči efektu toxických sloučenin poškozujících DNA (především alkylačních činidel). Vznikla tedy teorie, že by tyto tumory mohli být také relativně rezistentní k efektům těchto chemoterapeutických látek. [257] První test této hypotézy proběhl stabilním chromozomovým přenosem chybějícího MMR genu do MMR-deficientní buněčné linie lidského CRC čímž vznikla linie rezistentní k cytotoxickým účinkům alkylačního činidla N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidinu (MNNG). [270] Prokázalo se, že deficit MMR zrušil G2/M kontrolní bod buněčného cyklu a že MMR aktivita byla zapojena do cytotoxické reakce na poškození DNA buď prostřednictvím alkylace DNA, nebo inkorporací 6-thioguaninu. [81,196] Navíc byla zjištěna i rezistence proti mnoha dalším běžně používaným chemoterapeutickým látkám, včetně cisplatinu a neočekávaně i 5-fluorouracilu (5-FU). [8,80] Protože většina CRC nereagovala na chemoterapii na bázi 5-FU, následovaly studie za účelem objasnění efektu adjuvantní chemoterapie u pacientů s MMR-deficientními tumory. První studie sice ukazovala, že pacienti s MSI tumory jsou naopak vhodnými kandidáty na chemoterapii 5-FU, ale namísto randomizovaného souboru pacientů probíhala spíše na mladších pacientech v dobrém klinickém stavu a starší pacienti v horším klinickém stavu pak byli použiti jako kontrolní skupina. [127] Další práce, které už využívaly prospektivně randomizované soubory pacientů, většinou neprokázaly buď žádné výhody z této léčby nebo i 2-3 násobné zvýšení mortality pro CRC ve stádiu II a III. [45,82,250,420,502] Tyto výsledky potvrdily laboratorní pozorování a podporují tedy závěr, že pacientům s MSI tumory, ať už na podkladě dědičného nebo získaného defektu MMR genů, by neměla být podána adjuvantní chemoterapie s režimem na bázi 5-FU. Efekt chemoterapeutik na jiné bázi než 5-FU není zatím dostatečně prozkoumán, ale existují práce naznačující přínos některých léků, které se ukazují jako cytotoxické vůči nádorovým buňkám s defekty MMR genů. [136,228]

## 8.2 Gynekologické nádory

Endometriální karcinom (EC) je druhou nejčastější malignitou vyskytující se v rámci LS. Odhadované kumulativní riziko EC se v závislosti na specifické mutaci pohybuje u pacientů s LS v rozmezí 20-71 %. [15,29,61,122,202,412,496] Popisuje se, že endometriální karcinom vzniká až u 54 % žen s *MLH1* a *MSH2* mutacemi, u 15 % žen s *PMS2* mutacemi a u 71 % žen s *MSH6* mutacemi. [202,447] Na základě tohoto poměrně vysokého kumulativního rizika bylo navrženo několik screeningových metod zahrnujících vyšetření pánve, transvaginální ultrazvuk, endometriální sampling a vyšetření CA-125 (cancer antigen 125) v séru, který bývá u nádorů ovária, endometria a některých dalších zvýšený. Věk při stanovení diagnózy těchto

malignit je většinou o deset i více let nižší než u sporadických karcinomů a pohybuje se v rozmezí 48-62 let. Přes tyto údaje však není mnoho studií zabývajících se přínosem gynekologického screeningu u pacientek s LS. 75 % pacientek s EC u LS se prezentuje ve stádiu I s 88 % pětiletým přežitím a pokles úmrtnosti tak může být obtížnější dokázat. Výsledky transvaginálního ultrazvuku ukazují poměrně nízkou senzitivitu a specifitu pro diagnózu EC u LS. [119,416,422] Endometriální sampling vykazuje lepší výsledky při záchytu asymptomatických EC a pemalignních lézí endometria. [157,286,466]

Podle většiny autorů by měl screening EC pánevním vyšetřením a endometriálním samplingem u žen s diagnostikovaným LS nebo zvýšeným rizikem vzniku tohoto karcinomu probíhat každoročně, se začátkem ve věku 30-35 let. [158,297,352,490]

Méně jednoznačná je už situace kolem karcinomu ovárií, kde se kumulativní riziko u pacientek s LS pohybuje v rozmezí 0,3-20 %. [5,39,61,129,188,494,513,515] Přínos ovariálního screeningu nebyl zatím dostatečně potvrzen. Ve studii na pacientkách s hereditárním karcinomem prsu u mutací *BRCA1* nebo *BRCA2*, které mají zvýšené riziko ovariálního karcinomu, se však screening transvaginálním ultrazvukem ani CA-125 neukázal užitečným. [133] Přesto někteří autoři doporučují screening na ovariální karcinom pomocí transvaginálního ultrazvuku u žen s LS nebo zvýšeným rizikem tohoto karcinomu každoročně, se začátkem ve věku 30-35 let. [158,297,352,490]

Jedna americká studie souboru 315 žen s mutacemi MMR genů prokázala přínos profylaktické gynekologické chirurgie (hysterektomie s oboustrannou salpingo-oophorektomií) na snížení nebo eliminaci gynekologických malignit. [441] Retrospektivní analýza neprokázala žádný karcinom u pacientek po zákroku, zatímco ve skupině bez chirurgické operace se u 33 % prokázal vznik EC a u 5,5 % vznik ovariálních karcinomů. [441] Navíc analýza efektivity vynaložených nákladů u gynekologického screeningu oproti profylaktické gynekologické operaci v teoretické populaci 30 letých žen s LS ukázala v případě profylaktické chirurgie nižší náklady a vyšší kvalitu života v následujících letech života. [533] Jako nejefektivnější přístup v prevenci gynekologických malignit se potom ukázal každoroční screening začínající ve 30 letech následovaný profylaktickým zákrokem ve 40 letech, ale tohoto přínosu bylo dosaženo samozřejmě při vynaložení vyšších nákladů než u samotné profylaktické operace ve věku 40 let. [279]

Na základě těchto pozorování někteří autoři obecně doporučují zvážení hysterektomie s bilaterální salpingo-oophorektomií u žen, které již neplánují děti nebo ve věku 40 let. [352,490] V úvahu je ale třeba brát rozdílné riziko vzniku těchto karcinomů u různých MMR genů, operační morbiditu, riziko menopauzálních symptomů, osteoporózy a srdečních onemocnění pokud není poskytnuta substituční hormonální terapie.

### 8.3 Karcinom žaludku

Odhady celoživotního rizika pro vznik karcinomu žaludku u LS dosahují až 13 %. [4,39,61,78,129,494,515] Jedna z obsáhlejších studií výskytu žaludečního karcinomu u pacientů s mutací MMR genu ukazuje 8 % celoživotní riziko vzniku této malignity u mužů, 5,3 % riziko u žen a malý výskyt v jednotlivých rodinách. [78] Čísla se ale poměrně výrazně liší v různých geografických oblastech. Mnohem nižší výskyt se ukazuje v Severní Americe a západní Evropě, zatímco u pacientů s orientálním původem je karcinom žaludku mnohem častější. Většina karcinomů žaludku u pacientů s LS se zdá být intestinálního typu a tudíž

potenciálně přístupných endoskopickému sledování. [4,78] Podrobnější studie o přínosu screeningu žaludku u pacientů s MMR mutacemi nejsou k dispozici. Výskyt intestinální metaplazie a infekce *Helicobacter pylori*, jakožto prekursorových stavů, u pacientů s potvrzenou mutací MMR genu se například uvádí u 14-26 %. [417]

Někteří autoři doporučují screening na karcinom žaludku pomocí esofagogastroduodenoskopie (EGD) s biopsií antrální sliznice u osob s LS nebo zvýšeným rizikem ve věku 30-35 let s léčbou infekce *Helicobacter pylori*, pokud je nalezen. Následující kontroly každé 2-3 roky pak podle individuálních rizikových faktorů pacienta. [158,352] Jiná expertní skupina doporučuje počáteční screening EGD s biopsií bez doporučení pro další sledování. [490]

#### 8.4 Karcinom tenkého střeva

Celoživotní riziko vzniku karcinomu tenkého střeva se podle literatury pohybuje v rozmezí 0,4-12 %. [5,39,61,129,188,494] Ukázalo se také, že většina karcinomů tenkého střeva u pacientů s LS je lokalizována v duodenu nebo ileu a to v dosahu EGD a kolonoskopie s ileální intubací. [443] Zdá se ale, že není žádný důkaz o vyšším výskytu těchto malignit v rámci jedné rodiny s LS. [515] Screeningové pozorování 35 nosičů mutace odhalilo u dvou pacientů jejunální adenomy a u jednoho karcinom jejunu. [438] Kapslovou endoskopií šesti dalších osob bylo pak indikováno u 5 pacientů následné invazivní vyšetření pro obrazy nejasného klinického významu.

Přes nedostatek studií podporujících efektivitu screeningu tenkého střeva doporučují někteří autoři zvážení kapslového endoskopického screeningu ve 2-3 letých intervalech se začátkem ve věku 30-35 let. [352] Ostatní specialisté však screening nedoporučují, mimo jiné i pro to, že se ukázal jako nákladově neefektivní, ale navrhuje věnovat zvýšenou pozornost distálnímu duodenu a ileu při jiném endoskopickém vyšetřování. [158,490,515]

#### 8.5 Karcinom močového traktu

Odhady celoživotního rizika vzniku karcinomu močového traktu se u mužů s *MSH2* mutacemi pohybují v rozmezí 0,2-25 %. Zvýšené riziko se týká především uroteliálního karcinomu močovodu, ledvinné pánvičky a močového měchýře. [5,39,61,129,188,350,409,463,494] Ani v tomto případě však není dostatek údajů o možném přínosu screeningu močového traktu u pacientů s LS. Screening cytologií moči u pacientů a rodin s LS se v retrospektivní studii ukázal jako nízké senzitivní (29 %) při diagnostikování karcinomu u asymptomatických pacientů, s mnoha falešně pozitivními výsledky vyžadujícími následné invazivní vyšetření. [350] Screeningové metody jako cytologie moči a rozbor na analýzu mikroskopické hematurie se neukázaly efektivní ani v obecné populaci ani ve skupinách s vyšším rizikem vzniku karcinomu močového měchýře z environmentálních faktorů. [373,476] Otázka přínosu ultrazvukového vyšetření také není dostatečně prozkoumána.

I přes nedostatek dat o přínosu těchto vyšetřovacích metod doporučují někteří autoři tato vyšetření v rámci screeningu zvážet. Rozbor moči je levné, neinvazivní vyšetření, většinou snadno proveditelné jako součást rutinního fyzikálního vyšetření, a měl by tedy podle nich být



u pacientů s LS nebo zvýšeným rizikem (především s rodinnou anamnézou karcinomu močového traktu, ledvinné pánvičky nebo hematurii) zvážen počínaje věkem 30-35 let nebo od prvního průkazu hematurie. [158,352] Jiní autoři však rutinní screening na karcinomy močového traktu nedoporučují. [490]

## 8.6 Karcinom biliárního traktu

Ve skupině 472 pacientů z 15 LS rodin byl karcinom biliárního traktu nalezen u 18 jedinců. [334] Z těchto 18 nádorů jich 11 (79 %) vzniklo v extrahepatálních žlučových cestách nebo Vaterské papile. Několik případů karcinomu biliárních cest a Vaterské papily bylo hlášeno i v asociaci s MTS, včetně nově objevené missense mutace genu *MSH2*. [10,329,499] U pacientů s LS je riziko biliárních malignit hlášeno v rozmezí 0,2-25 % při průměrném věku v době diagnózy 52-60 let, zatímco v obecné populaci nedosahuje ani 1 %. [5,39,61,188]

Přes až devítinásobné zvýšení rizika vzniku biliárního karcinomu u pacientů s LS není rutinní screening na tyto malignity doporučován, především také s ohledem na jeho nižší výtěžnost a vyšší obtížnost provedení. [5,273] V některých případech, zejména s pozitivní rodinnou anamnézou, však může být zvážen. [329]

## 8.7 Nádory mozku

Nádory mozku jsou popisovány zejména v souvislosti s Turcotovým syndromem (TS) jakožto fenotypickou variantou LS. Jde zejména o glioblastomy a meduloblastomy. V jednom souboru 30 LS rodin se ukázalo, že při úplném deficitu MMR se nádory mozku mohou objevit v první dekádě života, zatímco při částečném nebo parciálním deficitu nejčastěji mezi druhou a čtvrtou dekádou. [137] Riziko vzniku těchto nádorů u obecné populace je méně než 1 %, zatímco u LS je popisováno v rozmezí 1-4 %, při průměrném věku v době diagnózy 50 let. [5,39,61,129,188,261,494,515,527]

Neexistují žádná jednotná doporučení pro screening na mozkové nádory u pacientů s LS. Při rodinném výskytu těchto tumorů (především tedy u TS), je však třeba vyšetření mozku zobrazovacími metodami u postižených příbuzných brát v úvahu.

## 8.8 Sebaceózní nádory kůže

Sebaceózní nádory kůže se vyskytují v rámci LS asociované s jeho fenotypickou variantou zvanou MTS. V obecné populaci se vyskytují vzácně (s rizikem <1 %), přičemž u LS/MTS se popisuje zvýšení rizika jejich vzniku na 1-9 %, při průměrném věku v době diagnózy 53 let. [61,129,188,193,261,357,400,406,460,527] Význam těchto tumorů tkví především v možnosti diagnostikovat syndrom často ještě před vznikem interní malignity a měl by tak následovat screening na jejich případné odhalení.

## 8.9 Karcinom pankreatu

Zvýšené riziko vzniku karcinomu pankreatu u pacientů s LS bylo zaznamenáno ve dvou prospektivních studiích, kde v jedné je SIR (standardized incident ratio) pro karcinom pankreatu udáváno 10,7 s desetiletým kumulativním rizikem 0,95 %. [527] V druhém případě bylo analyzováno 6342 členů 147 rodin s MMR mutacemi, přičemž karcinom pankreatu byl zaznamenán u 21,1 % rodin, což odpovídá 8,6 násobnému nárůstu oproti obecné populaci, s kumulativním rizikem 3,7 % do věku 70 let. [258,261] Jiné práce však zvýšené riziko vzniku tohoto karcinomu nepotvrdily. [39,26]

Většina autorů tak pro nedostatek údajů rutinní screening pankreatu nedoporučuje. [158,352,490] Mezinárodní konsenzuální panel pankreatu (International Pancreas Consensus Panel) však doporučuje, aby nosiči mutace MMR genu s jedním příbuzným prvního řádu postiženým karcinomem pankreatu byli pro screening zváženi. [76]

## 8.10 Karcinom prostaty, prsu a další extrakolonické nádory

O riziku vzniku několika dalších extrakolonických malignit u pacientů s LS existují protichůdné údaje. Zatímco se několika studiím nepodařilo odhalit žádné významně zvýšené riziko vzniku karcinomu prostaty, jiná pozorování došla k opačným závěrům s relativním rizikem v rozmezí 2,5-10 násobků a celoživotním rizikem mezi 9-30 % do věku 70 let. [37,39,129,175,415,460,527]

Také u karcinomu prsu jedna velká studie neodhalila žádné zvýšené riziko tohoto karcinomu u pacientů s LS, zatímco jiné zvýšené riziko karcinomu prsu objevily u pozitivních a obligátních nosičů mutace *MLH1* genu s kumulativním rizikem 18,2 % do 70 let (95 % CI: 11,9-24,5), avšak ne u nosičů mutace *MSH2*. [39,493,515] Jiná práce například zjistila mírné zvýšení v kumulativním riziku karcinomu prsu na 14 % do 70 let věku a další prospektivní studie zaznamenala zvýšení kumulativního rizika karcinomu prsu o 4,5 % v průběhu desetiletého pozorování (SIR=standardized incident ratio = 3,95; 95 % CL: 1,59-8,13). [129,527] Také se ukázalo, že v rodinách s MSI fenotypem LS se u některých příbuzných vyskytují časně vznikající karcinomy prsu. [68,507]

S ohledem na protichůdné údaje a chybění prací o případném efektu důslednějšího screeningu není rutinní screening prostaty ani karcinomu prsu nad rámec obecné populace doporučován. [158,352,490]

Dále byl popsán také zvýšený výskyt laryngeálních malignit, hematologických malignit a sarkomů, ale definitivní souvislost s LS potvrzena nebyla a nejsou k dispozici ani data týkající se případného screeningu. [178,322,368,475] Kumulativní rizika extrakolonických malignit jsou shrnuta v tabulce 7.

## 8.11 Klinická genetika

Klinická genetika je v současné době u nás jediným oborem oprávněným indikovat genetické vyšetření na LS. Do její kompetence také spadá poradenství pro pacienty s ohledem na klinické, psychologické, finanční a etické otázky vznikající během procesu genetického

testování. [210,313,351,425,461] Součástí poradenství by mělo být i získání osobní a rodinné anamnézy, poučení o nemoci a následné péči, průzkum psychosociálních rozměrů, získání informovaného souhlasu, správná interpretace výsledků genetických testů a plánování dalších, pokud jsou nezbytné. [12,311] Dále by se poradenství mělo týkat také pacientových obav z možné genetické diskriminace, například v oblasti zaměstnání, komerčních pojištění či finančních služeb. [374]

## 9 Diferenciální diagnóza

Vzhledem k tomu, že nejčastější malignitou v rámci LS je CRC, zahrnuje diferenciální diagnostika kromě sporadických karcinomů především některé další syndromy se zvýšeným rizikem vzniku CRC. Patří sem zejména syndromy prezentující se tvorbou polypů v zažívacím traktu a u MTS pak připadají v úvahu také některé další syndromy s výskytem mnohočetných kožních nodulů.

### 9.1 Lynch-like syndrom

Jako Lynch-like syndrom (LLS) se označuje stav, kdy pacient s tumorem s deficitem exprese některého z MMR proteinů nemá žádné patogenní germinální alterace MMR genů ani genu *EPCAM*, zároveň ale, je-li tumor *MLH1*-deficientní, není v něm přítomna mutace genu *BRAF* ani metylace promotoru *MLH1*. Tento stav může být podmíněn bialelickou somatickou inaktivací MMR genu, přítomností germinální mutace nedetekovatelné použitými metodami, nesprávnou interpretací IHC barvení MMR proteinů, případně jinými germinálními mutacemi (*MUTYH*). [381]

V práci zkoumající 4765 CRC byla identifikována MSI a proteinový deficit MMR u 6,3 %. [256] Pomocí testování na zárodečné mutace genů MMR bylo ze 124 případů identifikováno 54 pacientů s LS na podkladě zárodečné mutace MMR, 15 s LS na podkladě *EPCAM* mutace a 55 LLS. Z těchto 55 LLS mělo 6 (10,9 %) v testovaných genech změny nejasného významu a jeden měl objevenou novou somatickou mutaci (p.S459P). U pacientů s bialelickými delekcemi *EPCAM* vykazovaly všechny tumory a okolní nenádorová sliznice hypermetylací promotoru *MSH2*. Mezi pacienty s mutacemi *EPCAM* a LLS byli zaznamenány klinické odlišnosti ve srovnání s LS na podkladě zárodečné mutace MMR. Kritéria Revised Bethesda guidelines byla splněna u 83,6 % mutací *EPCAM*, 86,7 % případů LLS a u 98,1 % LS způsobených zárodečnou mutací MMR genů. Průměrný věk u *EPCAM* mutací byl 52,6 let, u LLS 52,7 let a 43,9 let u MMR LS.

V jiné práci se souborem 3352 CRC a 215 endometriálních karcinomů bylo na základě histologických kritérií vybráno 356 CRC (10,6 %) a 72 endometriálních karcinomů (33 %) se suspektní MSI-H morfologií. [326] Následné molekulárně genetické testování 66 pacientů prokázalo u 45 (68 %) zárodečné mutace MMR, zatímco u 21 případů (32 %) se tyto mutace nepotvrdily a byly tedy zařazeny do kategorie LLS. V této práci měla většina pacientů s LLS pravostranně lokalizovaný CRC na rozdíl od LS (93 % oproti 45 %,  $P < 0.002$ ). Všichni pacienti s CRC a izolovanou ztrátou exprese *MSH6* měli geneticky potvrzený LS. Synchronní a metachronní karcinomy asociované s LS byly diagnostikovány mnohem častěji u pacientů s LS než u LLS (38 % oproti 7 %,  $P = 0.04$ ). V případě endometriálních karcinomů nebyly zaznamenány žádné významné rozdíly mezi pacienty s LS a LLS.

Jiní autoři při zkoumání 210 endometriálních karcinomů odhalili deficit MMR proteinů u 66 případů (31,4 %). [337] Genetickým vyšetřením 15 z nich pak byl u 7 případů (46,7 %) potvrzen LS a zbylých 8 bylo klasifikováno jako LLS. MSI-H byla pozorována u 71,4 % případů LLS. Histologicky vykazovaly high grade nebo bifazickou morfologii 3 nádory asociované s LS (42,9 %) a 5 případů LLS (62,5 %), zatímco ostatní tumory měly low grade konvenční endometroidní morfologii. Nízké stádium (T1a/T1b) bylo diagnostikováno u 85,7 % nádorů LS a u 87,5 % LLS. Rodinná anamnéza byla pozitivní u 28,5 % LS a 12,5 % LLS.

## 9.2 Familiární kolorektální karcinom typu X

Diagnóza familiární kolorektální karcinom typu X (FCRCTX) se používá pro pacienty s rodinnou anamnézou CRC splňující Amsterdamská kritéria, ale nevykazující MSI, IHC MMR deficienci a zárodečné mutace MMR genů ani genu *EPCAM*. [298] Až 40 % rodin splňujících ACI nevykazuje MSI. [298] Klinicky vykazuje FCRCTX některé rozdíly ve srovnání s LS. Riziko vzniku CRC u FCRCTX je oproti běžné populaci zvýšeno přibližně dvojnásobně, zatímco u LS je zvýšeno více než šestinásobně. Navíc se v rodinách s FCRCTX nevyskytují extrakolonické tumory. [298] Písmeno X v názvu poukazuje na neznámý genetický podklad FCRCTX. Některá pozorování naznačují, že FCRCTX může být heterogenní skupinou. Byly identifikovány mutace některých genů, které se ale vyskytují pouze u jedné nebo několika málo rodin. Jde například o mutaci *RPS20*, kódující maturační protein rRNA. [366] Z dalších jsou to třeba *SEMA4A*, *HNRNPA0* a *WIF1*, kódující proteiny zahrnuté v regulaci PI3 kinázy, MAPK/ERK signalizaci a biosyntéze NAD. [444,519] Navíc se FCRCTX může fenotypicky překrývat s jinými genetickými poruchami, jako polymerase proofreading-associated polypóza (PPAP) a zárodečnými mutacemi *BMPRIA* asociovanými s juvenilní polypózou. [365] Ve většině případů však genetické vyšetření nepřináší výsledky.

## 9.3 Familiární adenomatózní polypóza

Familiární adenomatózní polypóza (FAP) je pravděpodobně prvním popsáným dědičným onemocněním způsobujícím CRC s prvními klinickými zprávami od roku 1861. [75,309] Až později byl popsán vztah mezi mnohočetnými adenomy a jejich maligní transformací do CRC. [306] V databázi OMIM lze FAP dohledat pod číslem 175100. I před identifikací *APC* genu v roce 1991 se vědělo, že je tento syndrom autosomálně dominantně dědičný a jeho fenotyp byl dobře definován, což umožnilo rozvoj efektivního rodinného dohledu a profylaktické chirurgické péče. [248] FAP má asi desetinový výskyt oproti LS a objevuje se v populaci u 1 z 5000-13000 osob. [48,70,74]

Nejvýraznějším rysem je vznik stovek až tisíců adenomatózních polypů v tlustém střevě a jejich progresu. Polypy se typicky vyskytují již v období druhé dekády života, ale byly zaznamenány i v pozdějším věku. Adenomy nevyhnutelně vedou k malignímu zvratu v CRC a jediným možným řešením je profylaktická totální proktokolektomie s ileoanální anastomózou. V některých případech s menším postižením rekta může být provedena subtotální kolektomie s ileorektální anastomózou, ale zbytek tlustého střeva musí být intenzivně monitorován.

Mezi extraintestinální příznaky patří polypy fundických žlázek žaludku, adenomatózní polypy tenkého střeva (především duodena), kongenitální hypertrofie pigmentového epitelu sítnice (CHRPE), nadpočetné zuby, osteomy, kožní lipomy a cysty, tumory štítné žlázy, desmoidní tumory, adenomy kůry nadledvin a hepatoblastomy. U pacientů s FAP je tedy navíc zvýšené riziko vzniku karcinomu štítné žlázy, adenokarcinomu žaludku (<1 % celoživotní riziko), adenokarcinomu duodena (5–10 % celoživotní riziko) a ampulárního adenokarcinomu. Desmoidní tumory jsou benigní fibroblastické neoplazie vyskytující se typicky intraabdominálně, zejména po provedené kolektomii, které mají tendenci k rekurenci po jejich odstranění.

S rozvojem genetiky byl postupně identifikován gen FAP, nyní známý jako *APC* (Adenomatous Polyposis of the Colon) s 15 exony a délkou 6,5 kb na chromozomu 5q21.

[53,176,203,266,369] Zárudečné mutace genu *APC*, většinou v podobě nonsense mutací, se nejčastěji vyskytují v exonu 15. Gen *APC* je zapojen v buněčné adhezi interakcí s beta-cateninem. Pravděpodobně reguluje přenos inhibičních kontaktních signálů do buněk, protože *APC* mutace jsou spojeny s hyperplazií jakožto počátkem tumorigeneze. Je také možné, že komplex APC-catenin reguluje adheze, protože ztáta cadherinem řízených adhezí může přispět ke vzniku metastáz. Mutace *APC* jsou detekovány v 80 % případů FAP a odhaduje se, že téměř 70 % sporadických adenomů tlustého střeva vykazuje somatické mutace genu *APC*. [410]

FAP byla v roce 1992 rozdělena na dvě jednotky: klasickou (CFAP) a oslabenou (attenuated FAP, AFAP). [323] AFAP syndrom je charakterizován pozdějším věkem v době diagnózy, menším počtem polypů (méně než 100), častější lokalizací v pravém tračníku a menším počtem extrakolonických manifestací v porovnání s CFAP. Pro pacienty s AFAP je také při chirurgické léčbě doporučováno zachování rekta v podobě totální kolektomie s ileorektální anastomózou vzhledem k méně častému výskytu polypů v této oblasti a je také popisováno méně následných proktokolektomií s ileo-pouch-anální anastomózou než u CFAP. [290,367,491,531] U AFAP se však častěji vyskytují desmoidní tumory, které mohou následnou ileo-pouch-anální anastomózu znemožnit a operace se zachováním rekta tak nemusí být pro pacienty s AFAP vždy přínosnější. [85,146,213] O profylaktickém operačním postupu by se tak mělo rozhodovat spíše individuálně, na základě endoskopického nálezu.

Pokud se u pacienta prokáže konkrétní mutace genu *APC*, může pak být s velmi vysokou přesností využita při screeningu rizikových příbuzných. Klinické sledování začíná mezi 10-12 lety flexibilní sigmoideoskopií nebo kolonoskopií jednou ročně, horní endoskopií každý 1-2 roky od věku 20-25 let a každoročním vyšetřením štítné žlázy ultrazvukem. Je také třeba zvážit vyšetření dalších orgánů s potenciálně zvýšeným rizikem vzniku malignity.

Fenotypickou variantou FAP s vysokou penetrancí a variabilní expresivitou je Gardnerův syndrom (GS). [110,359] Charakterizován je kromě mnohočetných adenomů tlustého střeva také výskytem desmoidních tumorů, osteomů a dalších neoplazií. [99,145,151,174,267,369,488] V rámci GS jsou dále hlášeny abnormality zubů, karcinomy Vaterské papily, adrenální adenomy a karcinomy štítné žlázy. [44,83,135,152,153,235,358] Častým nálezem u GS je kongenitální hypertrofie pigmentového epitelu sítnice (CHRPE), která navíc často předchází ostatní projevy. [49,482] Léze může být zaměněna za maligní melanom, ale je považována za benigní. Přesto je hlášeno několik případů vzniku tumoru v tomto terénu a sledování je tudíž na místě. [451,452] Vzácně jsou také hlášeny sarkomy kostí a hepatoblastomy. [150,160,198,209,216,265,278,293]

#### 9.4 MUTYH-asociovaná polypóza

MUTYH asociovaná polypóza (MAP) je autozomálně recesivně dědičná porucha s incidencí 1/5000 charakterizovaná vznikem kolorektálních adenomů, obvykle v počtu mezi 10-500, s možnou následnou progresí do CRC. [13,23,162,362,435,455] Počet polypů u pacientů s MAP může být velmi variabilní a nelze jej tudíž použít jako jednoznačné diagnostické kritérium. [247] V databázi OMIM je MAP vedena pod číslem 608456 a je způsobena bialelickou mutací genu *MYH* (známého také jako *MUTYH*). Gen *MYH* je lokalizován na chromozomu 1p33-34 se 16 exony a patří mezi tzv. base excision repair geny (BER). Proteinové produkty BER genů jsou zodpovědné za opravy mutací způsobených reaktivními produkty kyslíku vznikajícími během aerobního metabolismu.

Mutace genu *MYH* mohou být typu missense nebo nonsense a více než 80 % případů tvoří dvě nejběžnější mutace Y179C a G396D (dříve označované jako Y165C a G382D). Zdá se, že mutace Y179C je spojena se závažnějšími fenotypickými projevy než mutace G396D. [363]

Přestože je MAP definovaná jako bialelická inaktivace genu *MYH*, bylo prokázáno, že i mutace jedné alely může zvýšit riziko vzniku CRC a proto všechny polypózy spojené s mutacemi v genu *MYH* byly zařazeny do skupiny MYH-asociovaných polypóz. [24,455]

MAP může být také asociována s extrakolonickými manifestacemi zahrnujícími adenomatózní polypy žaludku a tenkého střeva s případným zvratem do karcinomu, karcinomy endometria, ovárií, prsu, močového měchýře a štítné žlázy, sebaceózní i jiné kožní tumory, cysty čelistí a kongenitální hypertrofii pigmentového epitelu sítnice (CHRPE). [23,35,281,364,408,455,500] Zárůdečné mutace genu *MYH* jsou asociované s částí klinických případů atenuované familiární polypózy (AFAP) s autozomálně recesivním typem dědičnosti. [14] Klinický nález zvýšeného počtu polypů může vyvolat podezření buď na MAP nebo AFAP. Korelace mezi genotypem a fenotypem u FAP, AFAP a MAP není vždy zcela nejasná. Uvádí se, že MAP syndrom zahrnuje přítomnost polypů v tračníku, ale nikdy v počtu tisíců, lokalizaci spíše v pravém tračníku, pozdější věk v době diagnózy a manifestaci v horním zažívacím traktu. V případě, že není identifikována mutace *APC*, mělo by následovat testování na mutaci *MYH*.

Pacienti s MAP mohou mít také rodinnou anamnézu konzistentní s LS a je tedy třeba na tyto mutace myslet v případě, že se nepodaří prokázat zárodečnou mutaci MMR genu. Podobně je třeba tuto diagnózu zvážit v případě fenotypických projevů syndromu Muir-Torre bez průkazu MMR mutace.

U pacientů s MAP se podle Americké společnosti klinické onkologie (ASCO) doporučuje kolonoskopický screening každý 1-2 roky s počátkem ve věku 18-20 let a každoročně pokud se již polypy objevily. V případě velkého počtu polypů nebo již vzniklého CRC je třeba zvážit parciální nebo totální kolektomii. Horní endoskopie by měla proběhnout ve věku 25-30 let nebo pokud se objeví kolorektální polypy. Mezi lety 25-30 by také měla být zvážena sonografie štítné žlázy.

## 9.5 Peutz–Jeghersův syndrom

Peutz–Jeghersův syndrom (PJS) je syndrom hamartomatózní polypózy s autozomálně dominantním vzorem dědičnosti. [242,401] Incidence je hlášena mezi 1/30000-1/200000 a projevuje se v raném dětství vznikem malého počtu středně velkých až velkých hamartomatózních polypů, především v tenkém střevě, ale i v žaludku a tlustém střevě. V databázi OMIM je uveden pod číslem 175200. Histologicky jsou nejvýraznějším znakem prominující vlákna hladké svaloviny mezi lobuly slizničních žlázek. Polypy se mohou zvětšovat, způsobovat krvácení nebo invaginaci s obstrukcí a mají zvýšené riziko vzniku CRC a vzácně i karcinomu tenkého střeva. [159] V pozdějším věku mají pacienti zvýšené riziko i pro další karcinomy, jako karcinom žaludku, pankreatu, prsu, vaječnicků, dělohy, plic a varlat. [159] Další fenotypické projevy mohou zahrnovat makuly v různých anatomických oblastech, které v pubertě slábnou, ale přetrvávají v bukální sliznici a periorálně. Také se mohou objevit v sinech, bronších a měchýři. Gen odpovědný za PJS byl lokalizován na chromozomu 19p13.3

a označen jako *STK11* (serine–threonin kinase 11) nebo *LKB1*. [20,200] *STK11/LKB1* je tumor supresorový gen účastnící se regulace proliferace, růstu a pravděpodobně apoptózy.

Pacienti s diagnostikovaným PJS by měli pravidelně podstupovat horní i dolní endoskopii a s věkem okolo 30 let další vyšetření s ohledem na zvýšené riziko jiných malignit, především karcinomu pankreatu.

## 9.6 Familiární juvenilní polypóza

Familiární juvenilní polypóza (FJP) je autozomálně dominantně dědičná porucha, u které se v zažívacím traktu vyskytuje 10 a více juvenilních polypů. Incidence je 1/100000 a ke klinické manifestaci dochází v dětství nebo adolescenci, ale až 15 % se může objevit v dospělosti. [166] Polypy mohou krvácet nebo vytvářet obstrukce a vyskytují se především v tlustém střevě, ale mohou být i v jiných partiích gastrointestinálního traktu. FJP s sebou nese zvýšené riziko vzniku CRC, přičemž k malignímu zvratu polypů dochází přibližně v 20 % případů. [159,189] Asociace FJP s dalšími karcinomy (hlášeny byly karcinomy žaludku, tenkého střeva a pankreatu) není dosud potvrzena, protože juvenilní polypy mohou být i sporadické. [159] FJP je způsobena heterozygotní mutací genu *SMAD4* na chromozomu 18q21 nebo genu *BMPRI1* (bone morphogenic protein receptor-1A) na chromozomu 10q21 a v databázi OMIM ji lze najít pod číslem 174900. [214,470]

O syndromu juvenilní polypózy/hemoragické teleangiectazie se hovoří při současném výskytu hamartomatózních gastrointestinálních polypů a projevů hereditární hemoragické teleangiectazie (zahrnující teleangie kůže a sliznic, epistaxe a arteriovenózní malformace plic, jater, mozku a zažívacího traktu). Způsoben je heterozygotní mutací genu *SMAD4* na chromozomu 18q21 (OMIM 175050).

## 9.7 Cowdenův syndrom

Cowdenův syndrom (CS) je autozomálně dominantně dědičnou poruchou s incidencí 1/200000. V rámci tohoto syndromu se v celém zažívacím traktu vyskytují polypy různého charakteru. [128,304,516] Vyskytují se juvenilní lipomy, ganglioneuromy, inflamatorní a lymfoidní polypy. Celoživotní riziko vzniku CRC může podle některých údajů dosahovat až 10%. V diagnostice CS mají zásadní úlohu kožní projevy zahrnující akrální verukózní papuly, fibromy ústní sliznice, gingivy a jazyka a trichilemomy obličeje, zejména v oblasti očí, nosu a úst (podobně jako u PJS). [67] Asi 2/3 pacientů mají strumu a 10 % celoživotní riziko vzniku karcinomu štítné žlázy. Okolo 75 % žen má fibrocystickou nemoc prsů, fibroadenomy a téměř 50% celoživotní riziko vzniku karcinomu prsu, typicky v časném věku. [508,524] Mezi další projevy patří tumory měkkých tkání a vnitřních orgánů jako lipomy, neurofibromy, leiomyomy dělohy a meningiomy. Přibližně 80 % pacientů s CS má zárodečné mutace genu *PTEN* (phosphatase and tensin homolog). [52] U ostatních pacientů byly popsány mutace genů *SDHB*, *SDHD*, *PIK3CA*, *AKT1*, *SEC23B* a hypermethylace promotoru genu *KLLN*. V databázi OMIM je CS veden pod číslem 158350. Za součást CS se také považuje Lhermitte-Duclosova choroba (cerebeloparenchymální porucha VI) s mentálními poruchami a zvýšeným intrakraniálním tlakem. [16,380] Za zmínku stojí i syndrom Bannayan-Ruvalcaba-Riley (také známý jako Bannayan-Zonana), který je alelický s CS, způsobený také mutacemi *PTEN*, a zahrnuje lipomy, pigmentované makuly penisu a makrocefalii. [22] U pacientů s CS



je, kromě screeningu tlustého střeva, doporučováno i vyšetřování na léze štítné žlázy a prsu. [508]

## 9.8 Syndrom hereditární smíšené polypózy

Syndrom hereditární smíšené polypózy (Hereditary mixed polyposis syndrom, HMPS) je autozomálně dominantně dědičný familiární karcinomový syndrom charakterizovaný vznikem různých typů kolonických polypů s rozvojem CRC. Mezi léze v rámci HMPS patří atypické juvenilní polypy, hyperplastické polypy a adenomy. Jde o vzácnou poruchu vyskytující se u několika rodin s aškenázským původem. [520] Syndrom byl definován při výzkumu velké skupiny se smíšenými hamartomatózními a hyperplastickými polypy v souvislosti s chromozomem 6q. [478,520] Další genové lokalizace byly identifikovány na chromozomu 15q13-14 a 10q23. [231,478] Chromozom 10q23 však může představovat variantu juvenilní polypózy, protože u jedné rodiny byla zaznamenána ztráta funkce *BMPRIA*. [77,231]

Vztah mezi HMPS a juvenilní polypózou není zcela dořešený. V databázi OMIM je uvedený pod číslem 601228 a je také známý jako CRAC1 (colorectal adenoma and carcinoma 1). Genomové asociace odhalily predispozici s nízkou penetrancí spojenou s rizikem CRC. [230] Gen způsobující HMPS byl identifikován jako 40kb duplikace v blízkosti genu *GREM1* v oblasti CRAC1 způsobující porušení BMP/TGF-beta signální cesty, stejně jako je tomu u juvenilní polypózy. [229] Byla také prokázána synergistická interakce *GREM1* s aktivovanou signální cestou Wnt. Epiteliální exprese *GREM1* se vyskytuje také u tradičních serrated adenomů a tyto léze mohou tak být považovány za sporadickou formu HMPS polypů. [111] Zdá se, že klinické znaky a typ střevních polypů jsou důležité pro stanovení diagnózy.

## 9.9 Polymerase proofreading-asociovaná polypóza

Polymerase proofreading asociovaná polypóza (PPAP) je teprve nedávno popsáný autozomálně dominantně dědičný syndrom s vysokou penetrancí charakterizovaný vznikem adenomatózních polypů, kdy v časném věku dochází ke vzniku CRC a endometriálního karcinomu. [98,383] Popsán byl při celogenomovém sekvenování 15 případů s více než deseti adenomy ve věku před 60 lety a endometriálním karcinomem. U některých příbuzných se vyskytlo více než pět adenomů tlustého střeva a u všech testovaných nebo jejich příbuzných prvního řádu byl diagnostikován CRC. Žádné jiné extrakolonické manifestace nebyly pozorovány. Všechny testované případy byly negativní na mutace genů *APC*, *MYH* a *MMR*.

Genetický podklad PPAP tvoří zárodečné mutace v exonukleázových (proofreading) doménách dvou DNA polymeráz, které jsou nezbytné pro replikaci DNA. Konkrétně jde o polymerázu *POLD1* (polymerase delta1) a *POLE* (polymerase epsilon 1), které jsou v databázi OMIM uvedené pod čísly 174761 a 174762. [199] Ztráta schopnosti korektury polymeráz způsobuje četné mutace, které se projevují vznikem MSS a chromozomálně nestabilních karcinomů. Somatické mutace exonukleázových domén *POLE* byly navíc objeveny i u sporadických CRC a endometriálních karcinomů. [199] U endometriálních karcinomů s mutací *POLE* je popisována příznivá prognóza, která pravděpodobně souvisí s masivní intratumorální T-buněčnou odpovědí. [96,165] Testování na mutace *POLE* a *POLD1* by mělo přijít v úvahu u pacientů s mnohočetnými nebo velkými adenomy a

podezřením na LS nebo MAP, kdy se neprokázaly mutace jejich genů. Při potvrzení diagnózy PPAP je třeba zvážit intenzivnější screening na CRC a endometriální karcinom.

## 9.10 Brooke-Spieglerův syndrom

Brooke-Spieglerův syndrom (BRSS) je autozomálně dominantně dědičná porucha charakterizovaná výskytem mnohočetných kožních tumorů, typicky v oblasti hlavy a krku. [440] Tumory vznikají v časně dospělosti, v průběhu života se pak zvětšují a roste i jejich počet. Histologicky jde především o cylindromy, trichoepiteliomy a spiradenomy. V některých etnikách jsou hlášeny také maligní lymfoepiteliální léze příušní žlázy. [25,165] BRSS je způsoben heterozygotní mutací genu *CYLD* (cylindromatosis) lokalizovaného na chromozomu 16q12 a v databázi OMIM je uveden pod číslem 605041. [50,138] Syndromy familiární cylindromatózy a mnohočetných familiárních trichoepiteliomů jsou alelické s BRSS, ale mají v rámci jedné rodiny různé projevy a jde tedy pravděpodobně o fenotypické varianty BRSS. [64,156,288,432,534] Vzhledem k mnohočetnému výsevu kožních tumorů mohou tyto syndromy klinicky připadat v úvahu při diferenciální diagnóze MTS.

## 9.11 Gorlinův syndrom (Basal cell nevus syndrome)

Gorlinův syndrom (jinak známý také jako Gorlin-Goltzův syndrom nebo basal cell nevus syndrom, BCNS) je familiární autozomálně dominantně dědičný syndrom projevující se mnohočetnými bazaliomy, epidermoidními cystami, jamkami na dlaních a chodidlech, odontogenními keratocystami, ovariálními nebo srdečními fibromy, zkrácenými metakarpály, hypertelorismem a abnormalitami čelistí, žeber a obratlů. [167,437] Je popisováno také zvýšené riziko vzniku meduloblastomu a v menší míře fibrosarkomu čelisti. [134,204,437] Součástí BCNS mohou být také hamartomatózní polypy žaludku. [445] Genetický podklad BCNS může spočívat v zárodečné mutaci genu *PTCH1* (patched homolog) na chromozomu 9q22, mutací genu *PTCH2* na chromozomu 1p32 nebo mutací genu *SUFU* na chromozomu 10q24-25. V databázi OMIM je BCNS dohledatelný pod číslem 109400. Některé znaky se překrývají s FAP (epidermoidní cysty, abnormality čelistí), Turcotovým syndromem (meduloblastom se zárodečnými mutacemi *APC*) nebo MTS (bazaliomy s MSI) a je tak třeba brát tento syndrom v úvahu při jejich diferenciální diagnóze.

## 9.12 Ferguson-Smithův syndrom

Ferguson-Smithův syndrom (jinak známý také jako multiple self-healing squamous epithelioma, MSSE) je charakterizovaný vznikem mnohočetných keratoakantomů a dlaždicobuněčných karcinomů, které spontánně regredují za vzniku důlkovitých jizev. [139] Počátek projevů může být variabilní (v rozmezí 8-62 let). MSSE je způsoben heterozygotní mutací se ztrátou funkce genu *TGFBR1* na chromozomu 9q22 s autozomálně dominantním vzorem dědičnosti. [168] Pro vznik mnohočetných keratoakantomů může být zvažován v diferenciální diagnóze MTS.

### 9.13 Tuberózní skleróza

Tuberózní skleróza (TBS) je autozomálně dominantně dědičná porucha s různě vyjádřeným multisystémovým postižením a incidencí 1/6000. Charakterizována je výskytem hamartomů v různých lokalizacích, zejména mozku, kůže, srdce, ledvin a plic.

TBS je způsobena přibližně v 10-30 % případů mutacemi genu *TSC1* (tuberous sclerosis) lokalizovaného na chromozomu 9q34. Většinu ostatních případů představují mutace genu *TSC2* umístěného na chromozomu 16p13, ale u 15-20 % pacientů se nepodaří identifikovat žádnou germinální mutaci a TBS může být v těchto případech způsobena mozaicismem. [104,107,498] Mutace genu *TSC1* způsobují 15-30 % familiárních případů a 10-15 % sporadických (75-80 % je způsobeno mutacemi genu *TSC2*). Mutace genu *TSC2* jsou asociovány se závažnějšími projevy. [104] V databázi OMIM je TBS pod číslem 191100.

Kožní léze představují především hypomelanotické makuly, obličejové angiofibromy a unguální fibromy. [474,517] V ledvinách se vyskytují, většinou mnohočetně a oboustranně, zejména angiomyolipomy a cysty. [27,102] Postižení ledvin se může projevovat krvácením nebo jejich selháváním z útlaku parenchymu. Projevy postižení centrálního nervového systému zahrnují epilepsii, autismus, poruchy chování a učení. [372,504] Je i zvýšené riziko výskytu astrocytomů v mladém věku. [392] Srdeční manifestace je charakterizována výskytem rhabdomyomů od raného věku, které však mohou regredovat. [192,457] Jako komplikace se mohou objevit poruchy rytmu, obstrukce nebo embolizace. [62] Dále jsou popisovány také chordomy, plicní lymfangioleiomyomatóza a anomálie zubů. [332,348,434]

### 9.14 Syndrom Birt–Hogg–Dube

Syndrom Birt–Hogg–Dube (SBHD) je autozomálně dominantně dědičná genodermatóza s incidencí 1/200000, známá také jako syndrom Hornstein-Knickenberg. Je způsoben mutací genu *FLCN* na chromozomu 17p11 a v databázi OMIM ho lze nalézt pod číslem 135150. SBHD je charakterizován hamatomy vlasových folikulů, nádory ledvin a spontánním pneumotoraxem. [360] Z tumorů ledvin se popisují onkocytomy, světlobuněčné, papilární a chromofobní karcinomy, ale také cysty. [275,393] Kromě spontánního pneumotoraxu jsou v plicích rovněž popisovány cysty. [442,480] Mnohočetné kožní léze (popisované jako fibrofolliculomy, akrochordony, perifolikulární fibromy nebo trichodiskomy) postihují zejména hlavu, krk, axilu, záda a třísla. [191] Navíc je hlášen i výskyt polypů tlustého střeva, protože tento syndrom může také připadat v úvahu při diferenciální diagnostice LS, respektive MTS. [212,291,428,442]

### 9.15 Syndrom hyperplastické polypózy

Syndrom hyperplastické polypózy (SHP) je vzácný syndrom s predispozicí ke vzniku CRC (riziko bývá udáváno 40-50 %). Vzor dědičnosti není jednoznačný a klinická definice je arbitrární. Incidence se někdy odhaduje na 1/100000. Jedna studie zahrnující 115 pacientů s vícečetnými serrated polypy a mediánem věku 62 let odhaluje, že pravděpodobně existuje více fenotypů SHP. [252] Rodinnou nebo osobní anamnézu s CRC mělo 38 %, respektive 25 % pacientů. Navíc se vyskytovaly i extrakolonické nádory (u 54 % v rodinné anamnéze a u 28 % v osobní anamnéze). Mezi extrakolonickými nádory jsou popisovány tumory prsu, plic,

prostaty a varlat. Práce ukázala 3 odlišné fenotypické vzory. Jedna skupina (n=55) vykazovala poměrně malý počet velkých pravostranně lokalizovaných polypů, druhá skupina (n=18) velký počet malých levostranných polypů a třetí skupina (n=42) kombinaci levostranných i pravostranných polypů. Tento syndrom však vyžaduje další zkoumání. Vzhledem ke zvýšenému riziku CRC vznikajícímu z polypů tlustého střeva ale tento syndrom připadá v úvahu při diferenciální diagnostice LS. Zatímco u SHP jde o serrated adenomy a CRC vzniklé na jejich podkladě, tak prekurzorovou lézí CRC asociovaného s LS jsou klasické „konvenční“ adenomy (tubulární, tubulovilózní a vilózní).

## 9.16 Ashkenazi I1307-k

Missense mutace v kodonu I1307K genu APC byla objevena u aškenázských Židů, u kterých je často zvýšený výskyt CRC. Mutace se vyskytuje u 6-10 % této populace a ukázalo se, že zvyšuje riziko vzniku CRC. [305] Podle některých údajů je mutace I1307K přítomná až u 28 % aškenázských Židů s CRC a pozitivní rodinnou anamnézou. [471] Některé práce popisují také asociaci s časnějším vznikem CRC a mnohočetnými adenomy. [179,282] Ojediněle byla mutace identifikována u neaškenázských jedinců s podezřením na efekt founder mutace. [454] Studie zkoumající 215 aškenázských Židů s CRC odhalila mutaci I1307K u 26 jedinců (12,1 %). [305] U nosičů mutace nebyly ve srovnání s ostatními zaznamenány žádné rozdílné znaky CRC, rozdílný věk v době diagnózy ani rozdíly ve výskytu dalších nádorů. Výskyt CRC u příbuzných prvního řádu byl však u nosičů mutace vyšší než u nepostižených (50 % oproti 28 %,  $P < 0.04$ ). Jiná práce hodnotila přítomnost mutace na souboru 231 pacientů s alespoň jedním polypem tlustého střeva, z nichž 183 bylo aškenázských Židů. [471] Mutace I1307K byla identifikována u 14 % jedinců s aškenázskými kořeny a adenomatózními polypy v anamnéze a u jednoho pacienta (5 %) s hyperplastickými polypy. Fenotypické znaky adenomů ani rodinná anamnéza se v tomto případě nelišily od sporadických variant.

## 9.17 Mutace 1100delC genu CHEK2

Patogenní varianta genu *CHEK2* 1100delC hraje roli v citlivosti alely k predispozici karcinomu prsu. Byly ovšem hlášeny holandské rodiny s mutací *CHEK2* 1100delC, u kterých se vyskytovaly pacienti s CRC. [512] Zatímco případy FAP nevykazovaly přítomnost *CHEK2* 1100delC, tato mutace byla identifikována u 10 z 297 (4,2 %) případů HNPCC, což je výrazně více než 1 % frekvence v populaci. Z těchto 10 případů CRC s *CHEK2* 1100delC jich 9 splňovalo Amsterdamská kritéria II nebo Bethesda guidelines. I někteří další autoři pak identifikovali mutaci 1100delC u členů rodin vykazujících tento fenotyp „hereditárního karcinomu prsu a střeva“ (hereditary breast and colorectal cancer, HBC). [336] Varianta *CHEK2* I157T byla také asociována s rizikem CRC ve finské a polské populaci, což ukazuje, že rizikovost *CHEK2* pro vznik CRC se neomezuje pouze na variantu 1100delC. [108,109,264] To znamená, že *CHEK2* varianty mohou vysvětlovat část familiárních CRC splňujících Amsterdamská kritéria I při absenci zárodečné mutace genu MMR, například některé FCRTX. Různé alely s nízkou penetrací byly spojeny se zvýšeným rizikem vzniku CRC, ale dodnes nebyla žádná potvrzena jako příčina familiárního nebo syndromického CRC. Přestože je tedy nárůst CRC mezi některými rodinami s *CHEK2* 1100delC mutací, neexistuje dosud dostatek důkazů, že by tato mutace odpovídala za jednoznačně syndromický CRC. [108,411] Jedná se o oblast, která vyžaduje další studium a objasnění.

## 10 Cíl práce

### Zavedení algoritmu depistáže Lynchova syndromu

Nastavení optimálního managementu vyšetřování je pro diagnostiku LS klíčové. Některé dílčí postupy se mohou v jednotlivých zařízeních lišit, zejména s ohledem na personální, finanční nebo technické možnosti laboratoře. Optimální vyšetřovací algoritmus by měl být co nejefektivnější, což zahrnuje nejen co nejvyšší senzitivitu a specifitu, ale také efektivitu logistiky a finančních nákladů. Vzhledem k často nedostatečné anamnéze slouží klinická kritéria spíše jako pomocný faktor a navíc se jejich samostatná senzitivita a specifita ukázala nedostatečnou. Základem vyšetřovacího postupu je v současné době detekce MSI-H tumorů. Její průkaz lze provádět jednak přímo, jednak zprostředkovaně pomocí IHC exprese MMR proteinů, nebo na základě histologických znaků typických pro MSI-H tumory. Právě systém použití těchto metod se může lišit. Plnohodnotný postup by měl zahrnovat všechny zmíněné metody z důvodu jejich vzájemné komplementárnosti, nicméně z finančních i časových důvodů je nutné nalézt vstupní metodu detekce, která je dostatečně efektivní při zachování únosných nákladů (finančních, časových i personálních).

Na našem pracovišti jsme z počátku zavedli algoritmus začínající histologickým zhodnocením přítomnosti MSI-H morfologie (pomocí Semi PREDICT skóre), na jehož podkladě byla v suspektních případech indikována molekulárně genetická analýza MSI, hypermetylace promotoru genu *MLH1* a mutace genu *BRAF*. Pro analýzu MSI a hypermetylace promotoru *MLH1* je však zapotřebí kontrolní nenádorová tkáň, která většinou nebývá k dispozici u endoskopických biopsií. V těchto případech je potřeba ji zajistit od zainteresovaného gastroenterologa v podobě endoskopického vzorku nenádorové sliznice nebo nesrážlivé periferní krve, což se ukázalo jako takřka neřešitelný problém. Uvedený komplex molekulárně genetických metod navíc neumožňoval určit, který gen by měl být podroben vyšetření na germinální mutace, což nakonec spolu s vyšší časovou náročností uvedeného komplexu molekulárně genetických metoda a jejich vyšší cenou rozhodlo o upřednostnění imunohistochemického vyšetření exprese MMR proteinů.

V současnosti na našem pracovišti provádíme u všech CRC univerzálně IHC vyšetření, které je zadáváno už při makroskopickém zpracování materiálu. Navíc provádíme IHC vyšetření exprese MMR proteinů i u karcinomů endometria, u těch ovšem až na základě histologického průkazu karcinomu. Samotné hodnocení IHC reakce je centralizováno na 1 až 2 lékaře, kteří řídí případný další následný postup. Tímto centralizovaným přístupem se, spolu s vyšší senzitivitou imunohistochemického vyšetření ve srovnání s „MSI-H morfologií“ podle Semi PREDICT skóre se zvyšuje celková efektivita screeningového systému. V případě průkazu deficitu exprese proteinů *MSH2* a/nebo *MSH6* je pak hned kontaktován klinický lékař s požadavkem na odeslání pacienta na oddělení lékařské genetiky. Genetik by měl zajistit zaslání nesrážlivé periferní krve současně s informovaným souhlasem pacienta k molekulárně genetickému vyšetření zárodečných mutací příslušných genů. Při prokázání deficiencie exprese proteinů *MLH1* a/nebo *PMS2*, následují další, již zmíněná vyšetření (test MSI, hypermetylace *MLH1* a mutace *BRAF*) s cílem vyloučit případy sporadických MSI-H karcinomů a MSS karcinomů s falešnou IHC negativitou exprese MMR proteinů. V případě, že jsou výsledky imunohistochemického vyšetření nepochybné, s jasně pozitivní vnitřní kontrolou, je možné molekulárně genetický MSI test vynechat, protože za těchto okolností nepřináší zásadní informaci. Pacienty s prokázanou mutací V600E genu *BRAF* nebo hypermetylací *MLH1* lze s velkou pravděpodobností vyřadit z dalšího diagnostického

managementu, pokud tomu nebrání jiné okolnosti (např. nízký věk, výrazné familiární postižení, multiplicita nádorů). Schéma managementu LS na našem pracovišti viz Obr.1. Podrobnější informace jsou uvedeny v příložených publikacích.

Jako velmi důležité se také ukázalo provedení všech vyšetření v co nejkratší době, ideálně dokud je pacient, například po resekci tlustého střeva, stále v nemocničním zařízení. Další management totiž kromě compliance pacienta záleží na mezioborové spolupráci, která se po propuštění pacienta z hospitalizace dále rozšiřuje. Získání periferní krve pro genetickou analýzu zárodečných mutací MMR genů se pak často ukazuje jako velmi problematické. Dosud totiž dostatečně nefunguje systém zpětné vazby s klinickými lékaři, kteří by měli organizovat další vyšetřování pacienta a jeho rodinných příslušníků. Během předávání informací mezi chirurgy, praktickými lékaři a onkology se totiž často žádost laboratoře molekulární genetiky o periferní krev pacienta vytratí z popředí zájmu.

## 11 Materiál a vyšetřovací metody

Pro histologickou analýzu byly použity standardní vzorky tkáně fixované v 10% formolu a zpracované klasickou parafinovou technikou a obarvené hematoxylinem a eosinem při tloušťce řezů 4  $\mu\text{m}$ . Pro imunohistochemické vyšetření byly řezy odparafinovány a rehydratovány v jednom kroku na přístroji BenchMark ULTRA od společnosti Ventana. Následně byla skla pokryta Tris-EDTA puftrem (pH 8,6) a zahřáta na 95°C po dobu 64 minut pro odmaskování antigenu. Skla byla poté inkubována při 37°C po dobu 40 minut se 100  $\mu\text{l}$  primární protilátky proti MLH1 (MutL Protein Homolog 1, M1, RTU, Ventana), MSH2 (MutS Protein Homolog 2, G219-1129, RTU, Cell Marque), MSH6 (MutS Protein Homolog 6, 44, RTU, Ventana) a PMS2 (Postmeiotic Segregation Increased 2, EPR3947, RTU, Cell Marque). Poté byla skla omyta TBS (Tris-buffered saline) pro odstranění reagentů. Detekce byla zprostředkována alkalickou fosfatázou s amplifikací (ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red detection Kit) od společnosti Ventana nebo inkubací 200  $\mu\text{l}$  DAB (3,3 - diaminobenzidine) substrate/chromogen po dobu 3 minut. Kvalita barvení byla verifikována jak použitím adekvátní vnější kontroly, tak zejména vnitřní kontrolou, kterou představují nenádorové lymfocyty. Jako ztráta exprese bylo označeno negativní barvení nádorové tkáně při zachované barvitelnosti vnitřní kontroly.

### 11.1 Analýza somatického genomu

Nejprve byly z bloků nakrájeny 20  $\mu\text{m}$  řezy do mikroskopu a po odparafinování byla extrahována DNA dle manuálu výrobce (QIASymphony DSP DNA kit). Na spektrofotometru Nanodrop byla změřena koncentrace a čistota DNA a za použití PCR s primery k vybraným „housekeeping“ genům i její kvalita.

Pro vyšetření nestability mikrosatelitních markerů (MSI) ve tkáni se využívá multiplexní PCR s následnou fragmentační analýzou při použití kitu Promega MSI Analysis System. Fragmentační analýzou provádíme vyšetření MSI pěti mononukleotidových (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24, MONO-27) a dvou pentanukleotidových repeticí (Penta C and Penta D).

Mutace genu *BRAF* byly prováděny vyšetřením části exonu 15 se zaměřením na detekci mutací v kodonech V600 a K601 metodou PCR a reverzní hybridizace kitem BRAF 600/601 StripAssay (Viennalab), nebo metodou real-time PCR kitem cobas 4800 BRAF V600 Mutation Test (Roche). Analýza somatických mutací nezachytí mutace, pokud alterovaná buněčná linie nebude zastoupena alespoň v 1 % u reverzní hybridizace, v 5 % u real-time cobas, ve 20 % u sekvenování a v 1 % u reverzní hybridizace. Analytická senzitivita a specifita sekvenování je 99 %.

Analýza metylace promotoru genu *MLH1* byla prováděna pomocí metody bisulfidické konverze a metylačně specifické PCR dle protokolu uvedeného v práci, kterou publikoval v roce 2002 Chan AO s kolektivem. [87]

## 11.2 Analýza germinálních mutací

DNA a RNA z krve odebrané do EDTA zkumavky (DNA) a PAX zkumavky (RNA, PAXgene blood RNA tubes IVD) byla extrahována dle manuálu výrobce (QIASymphony DSP DNA kit a PAXgene blood RNA kit IVD).

Detekce mutací celé kódující oblasti genu *MLH1* byla provedena pomocí metody PCR (s primery amplifikujícími všech 19 exonů, včetně exon-itrónových spojů) a přímého sekvenování. Analýza strukturálních aberací byla provedena pomocí MLPA-mP003 kitu. Kombinací přímého sekvenování gDNA (všech exonů a přilehlých intrónových úseků) a MLPA-mP003 testu lze zachytit zhruba 98 % známých mutací genu *MLH1*, viz HGMD databáze (Human Gene Mutation Data, <http://www.hgmd.org>).

Detekce případné germinální metylace promotoru genu *MLH1* byla provedena pomocí MLPA-ME011 kitu.

Detekce mutací celé kódující oblasti genu *PMS2* byla provedena pomocí metody RT-PCR (mRNA byla přepsána na cDNA, a ta použita jako templát pro PCR) a přímého sekvenování všech 15 exonů. Analýza strukturálních aberací byla provedena pomocí MLPA-mP008 kitu. Kombinací přímého sekvenování cDNA a MLPA-mP008 testu lze zachytit zhruba 87 % známých mutací genu *PMS2* (viz HGMD databáze). Mutační analýza tohoto genu je ztížená přítomností jeho pseudogenů v genomu.

Detekce mutací celé kódující oblasti genu *MSH2* byla provedena pomocí metody PCR (s primery amplifikujícími všech 16 exonů, včetně exon-itrónových spojů) a přímého sekvenování. Analýza strukturálních aberací byla provedena pomocí MLPA-mP003 kitu. Kombinací přímého sekvenování gDNA (všech exonů a přilehlých intrónových úseků) a MLPA-mP003 testu lze zachytit zhruba 99 % známých mutací genu *MSH2* (viz HGMD databáze).

Detekce mutací celé kódující oblasti genu *MSH6* byla provedena pomocí metody PCR (s primery amplifikujícími všech 10 exonů, včetně exon-itrónových spojů) a přímého sekvenování. Analýza strukturálních aberací byla provedena pomocí MLPA-mP072 kitu. Kombinací přímého sekvenování gDNA (všech exonů a přilehlých intrónových úseků) a MLPA-mP072 testu lze zachytit zhruba 98 % známých mutací genu *MSH6* (viz. HGMD databáze).



## 12 Výsledky

V roce 2013 bylo na našich pracovištích (Šiklův ústav patologie FN a LF UK v Plzni a Bioptická laboratoř s.r.o. Plzeň) vyšetřeno celkem 1382 pacientů (unikátních rodných čísel) s diagnózou C18-20 bez ohledu na to, zda šlo o resekát střeva nebo endoskopickou biopsii (z toho 1006 případů bylo v Bioptické laboratoři a 376 případů v Šiklově ústavu). Na základě klinických údajů a histologických znaků bylo celkem u 84 pacientů (6,1 %) vysloveno podezření na LS a byla provedena další analýza, která zahrnovala imunohistochemické stanovení MSI, mutace *BRAF* V600E, metylace promotoru *MLH1* a vyšetření exprese MMR genů. Pro závěrečné molekulárně genetické potvrzení či vyvrácení germinálních mutací MMR genů z periferní bylo uvedenými metodami vybráno 20 případů. U 7 pacientů (0,5 %) se potvrdila zárodečná mutace některého z MMR genů a u 6 pacientů se zárodečná mutace neprokázala. Do konce roku 2016 se však přes veškeré snahy nepodařilo z různých důvodů vyšetřit 12 pacientů (0,86 %), z nichž 7 (0,5 %) je velmi suspektních z diagnózy LS. Navíc byl jednou diagnostikován Lynch-like syndrom v materiálu z adenokarcinomu endometria (somatická frameshift duplikace c.1597\_1600dupCTTC v exonu 10 genu *MSH2*).

V roce 2014 bylo vyšetřeno celkem 1568 pacientů s diagnózou C18-20 (z toho 1181 v Bioptické laboratoři a 387 v Šiklově ústavu). Pokud jde o metodiku výběru pacientů, je tento rok poměrně heterogenní. V první polovině roku byla prvním krokem analýza MSI-H morfologie formou Semi PREDICT skóre, v druhé polovině došlo k přechodu na primární použití imunohistochemického vyšetření exprese MMR proteinů. Zároveň však došlo v důsledku tlaku klientů Bioptické laboratoře způsobeného opatřením tzv. indukované péče k výraznému omezení množství pacientů, kteří mohli být v Bioptické laboratoři dále vyšetřeni. Od poloviny roku 2014 tedy byly v Bioptické laboratoři prakticky vyšetřovány pouze případy konzultační, které byly zaslány externími patology na podkladě suspektního Semi PREDICT skóre, a to zejména z oddělení patologie Krajské nemocnice Liberec. Pro další analýzu bylo na základě morfologie a IHC vyšetření určeno 67 pacientů (4,3 %). U 3 pacientů (0,2 %) byl molekulárně geneticky potvrzen LS, ve 36 případech (2,3 %) byl potvrzen sporadický MSI-H tumor, 4 případy (0,3 %) se suspektním LS zůstávají dosud nevyšetřeny. U 2 pacientů (0,1 %) se jednalo Lynch-like syndrom v důsledku somatické jednobasové substituce c.942+3A>T třetí hraniční base intronu 5 v genu *MSH2* a v důsledku somatické mutace c.1252delA v exonu 7 genu *MSH2*. Navíc byl LS diagnostikován u dvou pacientek s adenokarcinomem endometria a u jedné pacientky s adenokarcinomem duodena.

V roce 2015 mělo diagnózu C18-20 celkem 1441 pacientů (z toho 1118 v Bioptické laboratoři a 323 v Šiklově ústavu). Pro další vyšetřování bylo na základě morfologie a IHC vyšetření vybráno 32 případů (2,2 %). Molekulárně genetická analýza prokázala LS u 5 pacientů (0,4 %). Ve 20 případech (1,4 %) se jednalo o sporadický MSI-H tumor, 3 pacienti (0,2 %) se suspektním LS nebyli dodnes geneticky vyšetřeni.

V roce 2016 bylo celkem vyšetřeno 1423 pacientů s diagnózou C18-20 (v Bioptické laboratoři 1092 a v Šiklově ústavu 331). Pro další analýzu bylo vybráno 45 případů (3,2 %). LS se molekulárně geneticky prokázal u 5 pacientů (0,4 %), 7 pacientů (0,5 %) velmi suspektních z diagnózy LS se však dosud nepodařilo na germinální mutace vyšetřit. Ve 27 případech (1,9 %) šlo o sporadický MSI-H tumor. U jednoho pacienta (0,1 %) byl diagnostikován Lynch-like syndrom se somatickou frameshift delecí c.1670\_1677delAAGAACTG v exonu 15 genu *MLH1*.

Celkem tedy bylo v letech 2013-2016 vyšetřeno 5814 pacientů s diagnózou C18-20 (4397 pacientů v Bioptické laboratoři s.r.o. a 1417 v Šiklově ústavu patologie). Suspektní MSI-H morfologii a/nebo IHC deficit MMR proteinů vykazovalo 228 případů. Zárodečná mutace definující LS byla molekulárně geneticky potvrzena u 20 pacientů (0,3 %) s CRC (viz graf 1). V Bioptické laboratoři s.r.o. bylo diagnostikováno 10 případů, což při přepočtu na celkově vyšetřené případy CRC v této laboratoři činí 0,2 %. Šiklův ústav patologie diagnostikoval také 10 případů, ale vzhledem k menšímu počtu vyšetření s diagnózou CRC byl podíl LS 0,7 %. Navíc byl u dvou pacientek LS diagnostikován na podkladě adenokarcinomu endometria a u jedné pacientky prezentující se adenokarcinomem duodena. U 4 pacientů (0,1 %) byl diagnostikován LLS. Sporadický MSI-H karcinom se prokázal u 178 pacientů (3,1 %). Celkem 26 pacientů (0,4 %) se dosud nepodařilo z různých důvodů vyšetřit molekulárně genetickou analýzou germinálních mutací, z toho 21 pacientů (0,4 %) je velmi suspektních z diagnózy LS. U 4 pacientů byla stanovena diagnóza Lynch-like syndromu.

Germinální mutace v genu *MLH1* byla zaznamenána u 6 případů (26 %), v genu *PMS2* u 3 případů (13 %), v genu *MSH2* u 5 případů (22 %) a v genu *MSH6* u 9 případů (39 %), viz graf 2. LS se potvrdil u 10 pacientů mužského pohlaví ve věku 26-80 let (průměr 58,5 let) a 13 pacientů byly ženy ve věku 38-78 let (průměr 55,3 let), přičemž 5 pacientům (21,7 %) bylo v době diagnózy více než 70 let, což znamená, že v literatuře někdy udávaná hranice 70 let pro vyšetřování pacientů na LS je neopodstatněná (tabulka 9). Kolorektální karcinomy byly lokalizovány u 7 pacientů (30 %) v céku, u 2 pacientů (8,7 %) v colon ascendens, u 2 pacientů (8,7 %) v oblasti hepatálního ohbí, u 3 pacientů (13 %) v colon transversum, u jednoho pacienta (4,3 %) v colon descendens, u jednoho (4,3 %) v colon colon sigmoideum a u jednoho (4,3 %) v rektosigmatu. V soulase s literaturou je tak většina CRC v rámci LS lokalizována pravostranně. U 3 pacientů (13 %) nebyla lokalizace v tlustém střevě upřesněna.

## 12.1 Pacienti s diagnostikovaným Lynchovým syndromem

V následujícím textu jsou klinickopatologické údaje o pacientech s potvrzeným LS, které jsou stručně shrnuty i v tabulce 10.

1) Muž ve věku 51 let s adenokarcinomem céka (grade 2 s invazí do muscularis propria, bez metastatického postižení lymfatických uzlin). Morfologické znaky tumoru: ojediněle tumor budding, ojediněle tumor infiltruující lymfocyty, středně výrazný peritumorální lymfoidní lem, ložiskově výrazná mucinózní diferenciaci. Imunohistochemické vyšetření prokázalo deficienci exprese proteinů *MLH1* a *PMS2*.

V analyzovaném materiálu byla molekulárně geneticky prokázána zárodečná mutace malého rozsahu genu *MLH1*. Jedná se o "frameshift" delecii c.1210\_1211delCT v exonu 12 genu *MLH1*. Tato mutace má za následek vznik předčasného STOP kodonu a je uvedena v databázích HGMD i MMRGVD (Mismatch Repair Genes Variant Database, která je dostupná na <http://www.med.mun.ca/mmrvariants/>). Jedná se o patologickou mutaci. [536]

Od tohoto pacienta jsme vyšetřovali v roce 2015 také metastázu světlobuněčného renálního karcinomu (dle Fuhrmannové grade 2). Molekulárně geneticky se neprokázala MSI, mutace *BRAF* ani metylace promotoru *MLH1*.

2) Pacientka ve věku 44 let s adenokarcinomem colon sigmoideum (grade 2 s ložiskovou invazí až do perikolické tukové tkáně, bez metastatického postižení lymfatických uzlin). Morfologické znaky tumoru: výrazná extracelulární hlenotvorba (hlenová jezírka tvoří až třetinu objemu), ve spodině malé množství Crohn-like lymfoidních agregátů. Imunohistochemické vyšetření prokázalo deficienci exprese proteinů MSH2 a MSH6.

V analyzovaném materiálu byla molekulárně geneticky prokázána zárodečná mutace malého rozsahu. Jedná se o duplikaci c.1282dupC v exonu 8 genu *MSH2*, která má za následek vznik předčasného STOP kodonu zhruba v 50 % délky sekvence proteinu MSH2. Jedná se o patogenní mutaci.

3) Pacient ve věku 60 let s adenokarcinomem colon ascendens v endoskopické biopsii polypu průměru 1 cm (grade 1 s invazí do submukózy, nedosahující do resekcčního okraje a bez metastatického postižení lymfatických uzlin). Morfologické znaky tumoru: tumor infiltrující lymfocyty (>2/HPF), Crohn-like lymfoidní noduly (>4/LPF), mucinózní diferenciaci (40 %), stromální plasmocyty (>25 % stromálních leukocytů). IHC vyšetření prokázalo deficit exprese proteinů MSH2 a MSH6.

V analyzovaném materiálu byla prokázána zárodečná mutace. Jedná se o jednobasovou substituci c.366+1G>A první hraniční base intronu 2 v genu *MSH2*, která má za následek zrušení konzervovaného sestřihového "donor" místa, což činí tuto substituci s největší pravděpodobností patogenní. Tato varianta je uvedena v databázi HGMD.

V roce 2012 byl pacientovi diagnostikován středně diferencovaný tubulární a kribriformní adenokarcinom tenkého střeva (invaze až do tukové tkáně, LU bez metastáz), v roce 2014 byl pacientovi odstraněn hyperplastický polyp tlustého střeva bez dysplazie a v roce 2015 hyperplastický polyp žaludku. Navíc byl v roce 2015 u pacienta diagnostikován prostatický acinární adenokarcinom (Gleason skóre 8 (4+4)) a v roce 2016 mu byl odstraněn tubulární adenom tlustého střeva s nízkým stupněm dysplazie, bez invazivního růstu.

4) Pacientka ve věku 52 let s adenokarcinomem céka (grade 3 s invazí na peritoneální povrch a metastatickým postižením jedné lymfatické uzliny). Morfologické znaky tumoru: lymfatická invaze, tumor infiltrující lymfocyty (>2/HPF), Crohn-like lymfoidní noduly (>4/LPF), mucinózní diferenciaci (60 %). IHC byl zaznamenán deficit exprese proteinu MSH6.

V analyzovaném materiálu byla molekulárně geneticky prokázána zárodečná mutace malého rozsahu. Jedná se o frameshift delecii c.402delT v exonu 2 genu *MSH6*, která má za následek posunutí čtecího rámce a vznik předčasného STOP kodonu.

5) Pacient ve věku 70 let s adenokarcinomem colon transversum (grade 2 s invazí do perikolické tukové tkáně, bez metastatického postižení lymfatických uzlin). Morfologické znaky tumoru: mucinózní diferenciaci (30 %), tumor infiltrující lymfocyty (> 2/HPF), Crohn-like lymfoidní noduly (> 4/LPF), peritumorální lymfoidní lem se stromálními plasmocyty (přesahujícími 25 % stromálních leukocytů). IHC vyšetřením byla zjištěna deficeence exprese proteinů MLH1 a PMS2.

V analyzovaném materiálu byla následně prokázána zárodečná mutace malého rozsahu. Jedná se o "in-frame" delecii dvanácti basí c.170\_181del (p.K57\_Q60del) v exonu 2 genu *MLH1*. Tato mutace není uvedena v databázích HGMD, MMRGVD, ani v SNP NCBI (Database of single nucleotide polymorphisms, National Cancer for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). V rámci projektu sekvenování "1000 Genomes" nebyla tato mutace v běžné populaci zachycena. Predikční program Provean (<http://provean.jcvi.org>) označuje tuto mutaci jako pozitivní. Přímá souvislost s Lynchovým syndromem nebyla dosud publikována.

U tohoto pacienta byl již v roce 2009 v endoskopické biopsii diagnostikován invazivní adenokarcinom tlustého střeva (hepatálního ohbí) grade 1, který byl resekován mimo FN Plzeň. Navíc u něho bylo v minulosti endoskopicky odstraněno 10 low-grade tubulárních adenomů tlustého střeva a 3 hyperplastické polypy.

6) Pacientka ve věku 42 let s adenokarcinomem céka (grade 2 s invazí do perikolické tukové tkáně, bez metastatického postižení lymfatických uzlin). Z morfologických znaků tumoru byla výrazná mucinózní diferenciacie (90 %). IHC vyšetření odhalilo deficienci exprese proteinu MSH6.

Molekulárně geneticky byla prokázána zárodečná mutace malého rozsahu genu *MSH6*. Jedná se o frameshift duplikaci c.741dupA v exonu 4 genu *MSH6*, která má za následek posunutí čtecího rámce a vznik předčasného STOP kodonu.

7) Pacient věku 39 let, jehož biopsie byla zaslána v rámci konzultačního vyšetření při podezření na LS. V analyzovaném materiálu byla následně prokázána zárodečná mutace velkého rozsahu v genu *MSH2*. Jedná se o delecii exonů 9 až 16.

8) Pacientka 65 let s adenokarcinomem colon transversum. Šlo o polypózní stenozyjící nádor s invazí do perikolické tukové tkáně, bez metastatického postižení lymfatických uzlin. Morfologické znaky tumoru: stromální zánětlivá reakce Crohn-like typu v okraji nádoru, pod nádorem v perikolické tukové tkáni menší absces, obrovskobuněčný granulom a výrazné fibroproduktivní zánětlivé změny. Ve střevě byl dále zastížen benigní tubulovillozní adenom s low-grade dysplazií bez známek invazivního růstu. IHC vyšetření odhalilo deficienci exprese proteinů MLH1 a PMS2.

V analyzovaném materiálu byla následně kombinací metod (sekvenování *PMS2* cDNA a předešlého P008 MLPA testu) prokázána zárodečná mutace velkého rozsahu. Jedná se o hemizygotní delecii exonů 12, 13 a 14 genu *PMS2*. Tato delece je uvedena v databázi genetických variant HGMD a byla popsána v literatuře jako škodlivá. [497]

U této pacientky byl již v roce 2013 diagnostikován adenokarcinom lienální flexury (grade 1 s invazí do muscularis propria, bez metastatického postižení lymfatických uzlin). Morfologické znaky tumoru: fokální hlenotvorba, bohatý smíšený zánětlivý infiltrát na periférii nádoru (místa s přechodem do ulceroflegmonózního zánětu v okolí nádoru, fokálně ve stěně až abscedujícího s přítomností obrovskobuněčné granulomatózní reakce typu z cizích těles kolem zbytku rostlinných struktur a četnými pseudoxantomy), v tukové tkáni lymfoplazmocytární zánětlivá infiltrace (místa výrazně denzní).

9) Pacientka ve věku 72 let s adenokarcinomem v oblasti céka u Bauhinské chlopně (grade 2 s prorůstáním do submukózy, bez metastatického postižení lymfatických uzlin). Morfologické znaky tumoru: minimální extracelulární hlenotvorba, na spodině drobné Crohn-like lymfoidní agregáty, malé množstvím tumor infiltrujících lymfocytů. IHC vyšetření odhalilo deficienci exprese proteinů MLH1 a PMS2.

V analyzovaném materiálu byla následně prokázána zárodečná mutace. Jedná se o "frameshift" duplikaci c.1489dupC (p.Arg497Profs) v exonu 13 genu *MLH1*. Tato duplikace má za následek posun čtecího rámce a vznik předčasného STOP kodonu zhruba v 65 % délky sekvence proteinu MLH1. Tato varianta je uvedena v databázích genetických variant NCBI (rs63751031), HGMD, MMRGVD a byla popsána v literatuře jako patogenní. [307]

V roce 2009 byl u pacientky odstraněn tubulární LG adenom tlustého střeva a v témže roce středně diferencovaný adenokarcinom tenkého střeva. V roce 2010 byl u pacientky odstraněn špatně diferencovaný solidně uspořádaný endokrinní malobuněčný karcinom tenkého střeva (infiltrující všechny vrstvy stěny střevní, přilehlé mezenterium přilehlé tlusté střevo s metastázou v jedné LU). V roce 2011 byla v tukové tkáni a na seróze tenkého střeva histologicky diagnostikována metastáza nediferencovaného rozsáhle nekrotického karcinomu a v roce 2012 byl u pacientky objeven difuzní exulcerovaný a rozsáhle nekrotický karcinom tenkého střeva (s invazivním růstem celou stěnou až do tukové tkáně mezenteria a přilehlé stěny žaludku, fokálně s nádorovou lymfangiopatií, bez metastatického postižení lymfatických uzlin).

10) Pacient ve věku 72 let s lokalizačně nespecifikovaným adenokarcinomem tlustého střeva zaslaným v rámci konzultačního vyšetření. IHC vyšetření odhalilo deficienci exprese proteinu MSH6.

V analyzovaném materiálu (nádorová tkáň FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded) byla prokázána pravděpodobně patogenní varianta mutace. Jedná se o inframe delecii c.1153\_1155delAGG (p.Arg385del) v exonu 4 genu *MSH6*. Výsledný protein má deletovanou jednu aminokyselinu. Tato varianta je uvedena v databázi mutací HGMD a databáze NCBI klasifikuje tuto delecii jako variantu nejasného významu. V literatuře je uváděna jako potenciálně patogenní. [427] Predikční online software Provean klasifikuje tuto mutaci jako patogenní a vzhledem k pravděpodobné patogenicitě této varianty bylo doporučeno provést segregaci analýzu u příbuzných pacienta.

11) Pacient ve věku 46 let s adenokarcinomem céka (grade 2 s invazí do svaloviny, bez metastatického postižení lymfatických uzlin). Morfologické znaky tumoru: výrazná hlenotvorba, velmi denzní lymfoidní stroma, velmi objemné lymfoidní agregáty v parakolické tukové tkáni. IHC vyšetření odhalilo deficienci exprese proteinů MSH2 a MSH6.

V periferní krvi byla prokázána zárodečná jednobasová substituce c.2086C>A (p.Pro696Thr) v exonu 13 genu *MSH2*. Tato varianta je vzácná a není uvedena v databázích HGMD a NCBI. Predikční programy Sift, Polyphen a Provean však klasifikují tuto mutaci jako patogenní.

12) Pacient ve věku 68 let s adenokarcinomem v oblasti colon ascendens zaslaným v rámci konzultace. IHC vyšetření odhalilo deficienci exprese proteinu MSH6, IHC průkaz BRAF V600E byl negativní.

Následně byla prokázána zárodečná mutace malého rozsahu. Jedná se o frameshift delecii c.2062\_2063delGT (p.Val688LeuFS) v exonu 4 genu *MSH6*, která má za následek vznik předčasného STOP kodonu zhruba v 50 % délky sekvence proteinu MSH6. Tato delece je uvedena v databázích NCBI (rs63750075), HGMD a v literatuře byla popsána jako patogenní. [403]

13) Pacient ve věku 73 let s adenokarcinomem colon descendens zaslaným na naše pracoviště jako konzultace s podezřením na LS. IHC vyšetření odhalilo deficienci exprese proteinu MSH6.

V periferní krvi byla prokázána zárodečná jednobasová nonsense substituce c.1572C>G (p.Tyr524Ter) v exonu 4 genu *MSH6*, která má za následek vznik předčasného STOP kodonu zhruba ve 40 % délky sekvence proteinu MSH6. Tato vzácná varianta je uvedena v databázi NCBI jako patogenní (rs587779215).

14) Pacient ve věku 26 let s adenokarcinomem hepatální flexury tlustého střeva (grade 2 s invazí do muscularis propria, bez metastatického postižení lymfatických uzlin). IHC vyšetření odhalilo deficienci exprese proteinu PMS2.

Následně byla prokázána zárodečná mutace. Jedná se o jednobasovou nonsense substituci c.1939A>T (p.Lys647Ter) v exonu 11 genu *PMS2*, která má za následek vznik předčasného STOP kodonu zhruba v 75 % délky sekvence proteinu PMS2. Tato varianta je uvedena v databázi NCBI jako patogenní (rs201451115).

15) Pacientka ve věku 40 let se dvěma adenokarcinomy rektosigmatu (grade 2-3, oba invadující přes muscularis propria do přilehlé perikolické tukové tkáně, v jedné lymfatické uzlině byla zastížena metastáza). Morfologické znaky tumoru: lymfangioinvaze, ložisková extracelulární hlenotvorba, ložiskově mírný lymfoplazmocytární infiltrát, drobná satelitní ložiska nádoru v perikolické tukové tkáni. Mezi těmito dvěma tumory bylo na sliznici resekatu přítomno 10 stopkatých i přisedlých tubulárních adenomů s low-grade dysplasiemi, místy až s high-grade dysplasiemi a ložiskovou invazí přes muscularis mucosae. IHC vyšetření odhalilo deficit exprese proteinů MSH2 a MSH6.

V periferní krvi byla prokázána zárodečná jednobasová substituce c.2086C>A (p.Pro696Thr) v exonu 13 genu *MSH2*. Tato varianta je vzácná a není uvedena v databázích HGMD a NCBI. Predikční programy Sift, Polyphen a Provean však klasifikují tuto mutaci jako patogenní.

16) Pacient ve věku 80 let s adenokarcinomem jaterního ohbí tlustého střeva (grade 1 s invazí do svaloviny, bez metastatického postižení lymfatických uzlin). Morfologické znaky tumoru: Crohn-like lymfoidní infiltráty, intraepiteliální leukocyty. IHC vyšetření odhalilo deficit exprese proteinů MLH1 a PMS2.

V analyzovaném materiálu byla prokázána zárodečná dvoubasová substituce c.1852\_1853delAAinsGC (p.Lys618Ala) v exonu 16 genu *MLH1*. Tato varianta je uvedena v databázi HGMD i NCBI (rs35502531). Predikční programy Provean, Sift a Polyphen označují tuto mutaci jako škodlivou. Nejedná se o plně penetrantní mutaci, ale není ani zcela

bez efektu; zhruba 2x zvyšuje riziko výskytu tumoru souvisejícího s Lynch. Syndromem. [335]

V roce 2015 byl u pacienta diagnostikován acinární prostatický adenokarcinom, Gleason skóre 8 (4+4).

17) Pacientka ve věku 38 let s lokalizačně nespecifikovaným adenokarcinomem tlustého střeva zasláným na naše pracoviště jako konzultace s podezřením na LS. IHC vyšetření (ve verzi 2 markerů) odhalilo deficit exprese proteinu MSH6.

V periferní krvi byla prokázána zárodečná mutaci malého rozsahu. Jedná se o frameshift delecii c.3573delT v exonu 7 genu *MSH6*, která má za následek vznik předčasného STOP kodonu zhruba v 88 % délky sekvence proteinu MSH6, což činí mutaci s největší pravděpodobností patogenní. Tato vzácná varianta není uvedena v databázích genetických variant (NCBI, HGMD, 1000 Genomes) a nebyla dosud popsána v literatuře.

18) Pacientka ve věku 60 let s adenokarcinomem céka (grade 2-3 s invazí do subserózní tukové tkáně, bez metastatického postižení lymfatických uzlin). Morfologické znaky tumoru: výrazná hlenotvorba (místy až vzhledu mucinózního karcinomu). V appendixu nalezen hůře diferencovaný, místy tubulární adenokarcinom invazivně rostoucí do vnitřní cirkulární vrstvy svaloviny. Dále byly zastiženy 2 tubulární adenomy s dysplasií lehkého, místy až těžkého stupně bez známek invazivního růstu. IHC vyšetření odhalilo deficit exprese proteinů MLH1 a PMS2.

V analyzovaném materiálu byla prokázána zárodečná mutace malého rozsahu genu *MLH1*. Jedná se o frameshift duplikaci c.2252\_2253dupAA (p.Lys751delinsLysLysfs) v exonu 19 genu *MLH1*, která má za následek záměnu 2 koncových aminokyselin a také posunutí stop kodonu, takže vzniklá RNA je o 4 aminokyseliny delší. Tato mutace je uvedena v databázích HGMD i MMRGVD. V literatuře bývá řazena mezi varianty s dosud neobjasněným významem (viz databáze Eiden Open Variation Database, LOVD, <http://www.lovd.nl/3.0/home>). V rámci projektu sekvenování "1000 Genomes" nebyla tato mutace v běžné populaci zachycena.

Ve stejném roce byl u pacientky objeven adenokarcinom colon transversum (grade 1 s invazí do muscularis propria, bez metastatického postižení lymfatických uzlin). Morfologické znaky tumoru: tumor infiltrující lymfocyty (>2/HPF), Crohn-like lymfoidní noduly (>4/LPF), peritumorální lymfoidní lem, mucinózní diferenciace (40 %), stromální plasmocyty (>25 % stromálních leukocytů). Dále byl v témže roce u pacientky endoskopicky odstraněn tubulární low grade adenom bez známek invazivního růstu. Podle anamnézy byl jeden tubulární low grade adenom odstraněn již v roce 2005.

19) Pacientka ve věku 56 let s adenokarcinomem céka (grade 3 s invazí do perikolické tukové tkáně, bez metastatického postižení lymfatických uzlin). Morfologické znaky tumoru: medulární vzhled, výrazná lymfotropie. IHC vyšetření odhalilo deficit exprese proteinu PMS2.

U pacientky byla odhalena metylace promotoru genu *MLH1*, ale byla prokázána i zárodečná mutace. Jedná se o jednobasovou nonsense substituci c.1687C>T (p.Arg563Ter) v exonu 11 genu *PMS2*. Tato substituce má za následek vznik předčasného STOP kodonu zhruba v 65 % délky sekvence proteinu PMS2. Tato varianta je uvedena v databázi NCBI jako patogenní (rs587778618).

20) Pacientka ve věku 78 let s adenokarcinomem colon transversum (grade 2 s invazí do muscularis propria, bez metastatického postižení lymfatických uzlin). Morfologicky byl přítomen peritumorální lymfocytární lem. IHC vyšetření odhalilo deficienci exprese proteinů MLH1 a PMS2. Molekulárně geneticky byla prokázána germinální metylace promotoru genu *MLH1* (tzv. constitutional *MLH1* epimutation) při metylaci jedné alely ze dvou. Dle literatury se doporučuje zacházet s takovýmto pacientem jako s pacientem s Lynchovým syndromem. [510] Přenos na potomstvo není vyloučený.

21) Pacientka ve věku 68 let s mucinozním adenokarcinomem duodena (grade 3 s invazí přes muscularis mucosae i do subserózy s desmoplastickou reakcí v okolí). IHC vyšetření odhalilo deficienci exprese proteinu MSH6.

V analyzovaném materiálu byla následně prokázána zárodečná mutace. Jedná se o jednobasovou nonsense substituci c.856G>T (p.Glu286Ter) v exonu 4 genu *MSH6*, která má za následek vznik předčasného STOP kodonu zhruba ve 20 % délky sekvence proteinu MSH6, což činí tuto substituci s největší pravděpodobností patogenní. Tato vzácná varianta není uvedena v databázích genetických variant (NCBI, HGMD, 1000 Genomes a MMRGVD) a nebyla dosud popsána v literatuře. Predikční program Provean ale klasifikuje tuto mutaci jako patogenní.

U této pacientky byl následně v letech 2015-2017 odstraněn 5x tubulární low grade adenom tlustého střeva.

22) Pacientka ve věku 55 let s invazivním endometroidním adenokarcinomem (grade 1 s hloubkou invaze 2 mm při tloušťce stěny 18 mm). Zastižena byla ložiska adenomyozy kolonizované epitelem s obrazem komplexní atypické hyperplazie. IHC vyšetření odhalilo deficienci exprese proteinu MSH6.

Molekulárně geneticky byla prokázána zárodečná mutace. Jedná se o jednobasovou nonsense substituci c.1691C>A (p.Ser564Ter) v exonu 4 genu *MSH6*, která má za následek vznik předčasného STOP kodonu zhruba ve 40% délky sekvence proteinu MSH6, což činí tuto substituci s největší pravděpodobností patogenní. Tato vzácná varianta není uvedena v databázích genetických variant (NCBI, HGMD, 1000 Genomes a MMRGVD) a nebyla dosud popsána v literatuře. Predikční program Provean klasifikuje však tuto mutaci jako patogenní.

23) Pacientka 49 let s endometroidním adenokarcinomem (grade 1 s invazí do hloubky 1 mm při tloušťce stěny 16 mm). IHC vyšetření odhalilo deficienci exprese proteinu MSH6.

Molekulárně geneticky byla následně prokázána zárodečná mutace malého rozsahu. Jedná se o frameshift duplikaci c.1862dupT v exonu 4 genu *MSH6*, která má za následek vznik



předčasného STOP kodonu zhruba v 50 % délky sekvence proteinu MSH6, což činí tuto duplikaci s největší pravděpodobností patogenní. Tato vzácná varianta není uvedena v databázích genetických variant (NCBI, HGMD, 1000 Genomes a MMRGVD) a nebyla dosud popsána v literatuře.

## 12.2 Případy s diagnostikovaným Lynch-like syndromem

1) Pacientka ve věku 53 let s endometroidním endometriálním adenokarcinomem (grade 1 infiltrující více než polovinu tloušťky myometria). Morfologické znaky tumoru: středně výrazný peritumorální a intratumorální lymfocytární zánětlivý infiltrát s výrazným podílem plazmocytů, některé nádorové žlázové struktury prezentují centrální "špinavou" nekrózu. IHC vyšetření odhalilo deficienci exprese proteinů MSH2 a MSH6. Molekulárně geneticky byla prokázána somatická frameshift duplikace c.1597\_1600dupCTTC v exonu 10 genu *MSH2*.

2) Pacient ve věku 59 let s metastázou pravděpodobně kolorektálního karcinomu v játrech. Imunohistochemický průkaz cytokeratinu 7, cytokeratinu 20 i transkripčního faktoru CDX2 byl sice negativní, což však s jistotou CRC nevyklučuje, zejména k dále uvedeným výsledkům vyšetření exprese MMR proteinů. Tumory této kategorie mohou vykazovat i takovouto abnormální imunoexpresi. Materiál z primárního tumoru k porovnání s morfologickým obrazem metastázy nebyl k dispozici. Imunohistochemické vyšetření exprese proteinů MSH2 a MSH6 je negativní. Molekulárně geneticky byla prokázána somatická jednobasová substituce c.942+3A>T třetí hraniční base intronu 5 v genu *MSH2*.

3) Pacientka 44 let s mucinózním adenokarcinomem colon sigmoideum (grade 2 s invazí do subserózního tukového vaziva, bez metastatického postižení lymfatických uzlin). Morfologické znaky tumoru: Crohn-like lymfoidní noduly (>4/LPF), mucinózní diferenciaci (> 50 %). IHC vyšetření odhalilo deficienci exprese proteinů MSH2 a MSH6. Molekulárně genetické vyšetření odhalilo somatickou mutaci c.1252delA v exonu 7 genu *MSH2*.

4) Pacientka ve věku 66 let a adenokarcinomem céka. IHC vyšetření (ve verzi 2 markerů) odhalilo deficit exprese proteinu PMS2. Molekulárně genetické vyšetření prokázalo v nádoru "frameshift" delecii 8 basí c.1670\_1677delAAGAACTG v exonu 15 genu *MLH1*, která má za následek posun čtecího rámce a vznik předčasného STOP kodonu zhruba v 75 % délky sekvence proteinu MLH1. Tato delece není uvedena v databázích genetických variant NCBI a HGMD a nebyla popsána v literatuře. Vzhledem k absenci germinálních mutací MMR genů v periferní krvi a průkazu mutace *MLH1* v materiálu z nádoru jde o tzv. Lynch-like syndrom způsobený somatickou mutací genu *MLH1*.

## 13 Diskuze

Frekvence záchytu LS na našem pracovišti je nižší než je udávána v literatuře. Zejména je-li hodnocena souhrnně pro Bioptickou laboratoř (0,2 %) a Šiklův ústav (0,7 %). Nepoměr mezi těmito dvěma pracovišti je však snadno vysvětlitelný systémem financování zdravotnictví v ČR, který je jednoznačně orientován na terapii, nikoli prevenci tudíž ani na screening. Zdaleka ne u všech případů totiž bylo možno vyslovit podezření na LS nebo provést další vyšetření. Většina klientů (klinických lékařů) Bioptické laboratoře se totiž postavila proti vyšetřování jejich materiálu na Lynchův syndrom, jelikož by jim příliš navyšovalo indukovanou péči.

Nicméně i frekvence Lynchova syndromu mezi pacienty s kolorektálním karcinomem vyšetřovaným v Šiklově ústavu je relativně nízká, a i po započtení případů suspektních, u nichž dosud vyšetření nebylo dokončeno (protože nebyla dodána periferní krev k analýze germinálních mutací), tvoří 1,3 %. Možných vysvětlení je několik:

### 1. Problém malých čísel

Vzhledem k celkově nízkému počtu pacientů s kolorektálním karcinomem v regionu není statistické zhodnocení zcela spolehlivé, protože v malých souborech statistické odchylky získávají na významnosti.

### 2. Vliv zevních faktorů

V České republice je každý rok hlášeno více než 8000 nově diagnostikovaných případů kolorektálního karcinomu (MKN C18-20), z toho okolo 550 případů v Plzeňském kraji, který má nejvyšší incidenci v ČR (viz grafy 3-11). Námi zaznamenaná nižší incidence LS u CRC oproti literatuře může být způsobena nejen tím, že nám některé případy unikají, ale také možnou souvislostí s některými exogenními faktory zapříčiňujícími vyšší incidenci CRC v Plzeňském kraji za snížení podílu geneticky podmíněných CRC.

### 3. Nadhodnocení prevalence Lynchova syndromu v literatuře

Ne všechny literární zdroje udávající incidenci, prevalenci nebo četnost Lynchova syndromu v rámci kolorektálního karcinomu, mají jasně definována kritéria diagnózy Lynchova syndromu, tedy podle dnešní definice průkaz germinálních mutací MMR genů, germinálních mutací genu *EPCAM* nebo germinální metylace promotoru genu *MLH1*. Tyto zdroje mohou zahrnovat tedy i případy Lynch-like syndromu, případně, byla-li použita pouze klinická kritéria, i jiné familiární syndromy asociované s CRC.

### 4. Falešná pozitivita exprese MMR proteinů

Nesoulad mezi hodnocením exprese MMR proteinů na základě imunohistochemického vyšetření a funkcí daného proteinu může být dán jednak charakterem mutace, která sice umožní syntézu proteinu zachovávajícího antigenicitu, ale postrádajícího funkci, jednak chybným hodnocením imunohistochemické reakce. Tato možnost přichází v úvahu zejména v případě komplexu MLH1/PMS2. Je totiž známo, že tyto proteiny jsou velmi citlivé na autolýzu, a proto zejména ve větších resekátech je jejich antigenicita často snížena v důsledku pomalého a/nebo nedostatečného průniku fixativa do tkáně. Z toho vyplývající

adaptivní snížení nároků na intenzitu hodnocené imunohistochemické reakce pak může mít za následek mylnou interpretaci slabého zbarvení v důsledku abnormální struktury proteinu jako následek neadekvátní fixace. Pro tuto možnost by mohl svědčit fakt, že v našem souboru výrazně převažovaly případy LS asociované s germinální mutací *MSH6* nad případy způsobenými germinální mutací *MLH1*, což je dle literatury nejčastější možnost.

Ačkoli je problematika nízké frekvence LS v našem souboru zajímavá a důležitá a vyžaduje hlubší analýzu většího souboru v ještě delším časovém období, aktuálně se jako zásadnější jeví vysoký počet nedovyšetřených případů suspektních z Lynchova syndromu. Vzhledem k tomu, že analýzu germinálních mutací může dle platné legislativy indikovat pouze lékařský genetik, k němuž může pacienta odeslat pouze jiný klinický lékař, je evidentní, že na této úrovni screeningového systému se jeho management dostává zcela mimo možnosti ovlivnění patogemem. Mezioborová spolupráce s aktivní účastí zainteresovaných klinických lékařů je tak v současnosti jedním z nejkritičtějších momentů v diagnostice LS. V dalších letech bude tedy nezbytné zainteresovat do diagnostiky LS i klinické lékaře, bez jejichž aktivní účasti není možná kompletní diagnostika pacienta, jeho rodinných příslušníků ani navazující screeningové metody. Několik let snahy o zavedení plošného screeningového systému nás přesvědčilo i o tom, že výše uvedené nebude možné bez politické podpory a bez finanční účasti zdravotních pojišťoven.

## 14 Přílohy

**Tabulka 1 - Hlavní znaky Lynchova syndromu**

• Autozomálně dominantní vzor dědičnosti syndromových tumorů v rodokmenu
• Časnější průměrný věk vzniku CRC než v normální populaci (průměrný věk u LS je 45 let oproti 69 letům v běžné populaci)
• Častější proximální (pravostranná) lokalizace CRC (~70 % CRC u LS se vyskytuje proximálně od splenického ohbí)
• Akcelerovaná kancerogeneze - drobné adenomy mohou projít rychlejším maligním zvratem v karcinom než u běžné populace (během 2–3 let u LS oproti 8–10 letům v běžné populaci)
• Zvýšené riziko vzniku dalšího (metachronního) CRC (u 25–30 % pacientů po chirurgickém zákroku pro CRC asociovaný s LS má další primární CRC do 10 let po zákroku, pokud byl zákrok menší než subtotální kolektomie)
• Zvýšené riziko vzniku extrakolonických malignit určitých lokalizací – Endometrium (40–60 % celoživotní riziko u žen nesoucích mutaci) – Ovárium (12–15 % celoživotní riziko u žen nesoucích mutaci) – Žaludek (zvýšené riziko zejména v rodinách pocházejících z orientu) – Tenké střevo – Hepatobiliární trakt – Pankreas – Horní močový trakt (uroteliální karcinom močovodu a ledvinné pánvičky), především u mužů s mutacemi genu MSH2 – Mozek (u Turcotova syndromu) – Mnohočetné sebaceózní adenomy, sebaceózní karcinomy a keratoakantomy (u syndromu Muir–Torre)
• Histologické znaky CRC - častěji horší diferenciace, tvorba hleny a buňky tvaru pečetního prstenu (signet-ring cells), Crohn-like lymfocytární reakce, výraznější výskyt tumor infiltrujících lymfocytů
• Příznivější prognóza CRC (zvýšené přežití)
• Identifikace zárodečné mutace MMR genu (MLH1, MSH2, MSH6 nebo PMS2) vyskytující se různě v rodině (příbuzní nesoucí mutaci vykazují vyšší výskyt karcinomů souvisejících s LS než členové kteří mutaci nenesou)

CRC – kolorektální karcinom, LS – Lynchův syndrom, MMR – mismatch repair

### **Tabulka 2 - Amsterdamská kritéria I (podle ICG-HNPCC)**

Alespoň 3 příbuzní by měli mít kolorektální karcinom.

Všechna následující kritéria by měla být přítomna:

- Jeden by měl být příbuzný prvního stupně dalších dvou.
- Alespoň dvě následující generace by měly být postiženy.
- Alespoň jeden kolorektální karcinom by měl být diagnostikován před 50 rokem věku.
- Familiární adenomatózní polypóza by měla být vyloučena.
- Nádory by měly být ověřené patologickým vyšetřením.

### **Tabulka 3 - Amsterdamská kritéria II (revidovaná podle ICG-HNPCC)**

Alespoň 3 příbuzní by měli mít karcinom asociovaný s HNPCC/LS (kolorektální karcinom, karcinom endometria, tenkého střeva, ureteru nebo ledvinné pánvičky).

Všechna následující kritéria by měla být přítomna:

- Jeden by měl být příbuzný prvního stupně dalších dvou.
- Alespoň dvě následující generace by měly být postiženy.
- Alespoň jeden karcinom by měl být diagnostikován před 50 rokem věku.
- Familiární adenomatózní polypóza by měla být vyloučena v případech s kolorektálním karcinomem (pokud nějaké jsou).
- Nádory by měly být ověřené patologickým vyšetřením.

HNPCC – hereditární nepolypózní kolorektální karcinom, LS – Lynchův syndrom

#### **Tabulka 4 - Bethesda Guidelines - původní**

• Výskyt karcinomu v rodině splňující Amsterdamská kritéria.
• Výskyt dvou karcinomů asociovaných s HNPCC/LS, včetně synchronních a metachronních CRC nebo extrakolonických nádorů (endometria, ovárií, žaludku, hepatobiliárního traktu, tenkého střeva, pánvičky nebo močovodu).
• Výskyt CRC u pacienta společně s výskytem CRC, adenomu nebo extrakolonického nádoru (asociovaného s HNPCC/LS) u jeho příbuzného prvního stupně. Jeden z karcinomů by měl být diagnostikován před 50. rokem věku (adenom před 40. rokem věku).
• Výskyt CRC nebo endometriálního karcinomu diagnostikovaného před 50. rokem věku.
• Výskyt proximálně (pravostranně) lokalizovaného nediferencovaného (solidního/kribriformního) CRC s diagnostikovaného před 50. rokem věku.
• Výskyt CRC s buňkami tvaru pečetního prstenu (signet-ring cells) diagnostikovaného před 50. rokem věku.
• Výskyt adenomů tlustého střeva diagnostikovaných před 40. rokem věku.

CRC – kolorektální karcinom, HNPCC – hereditární nepolypózní kolorektální karcinom, LS – Lynchův syndrom

#### **Tabulka 5 - Bethesda Guidelines - revidované**

• Výskyt CRC diagnostikovaného před 50. rokem věku.
• Výskyt synchronních CRC, metachronních CRC nebo jiných nádorů asociovaných s HNPCC/LS (endometria, ovárií, žaludku, pankreatu, biliárního traktu, tenkého střeva, pánvičky nebo močovodu, mozku, keratoakantomů a sebaceózních nádorů kůže), bez ohledu na věk.
• Výskyt CRC diagnostikovaného před 60. rokem věku s MSI-H histologií zahrnující přítomnost tumor infiltrujících lymfocytů, Crohn-like lymfocytární reakce, medulárního růstu, mucinózní diferenciaci nebo buněk pečetního prstenu (signet-ring cells).
• Výskyt CRC u jednoho nebo více příbuzných prvního stupně s extrakolonickým nádorem (asociovaným s HNPCC/LS), kdy alespoň jeden z karcinomů byl diagnostikován před 50. rokem věku.
• Výskyt CRC u dvou a více příbuzných prvního nebo druhého stupně s extrakolonickým nádorem (asociovaným s HNPCC/LS), bez ohledu na věk.

CRC – kolorektální karcinom, HNPCC – hereditární nepolypózní kolorektální karcinom, LS – Lynchův syndrom, MSI-H – mikrosatelitní nestabilita vysokého stupně (změny ve dvou a více z pěti mikrosatelitních markerů doporučených National Cancer Institute)

**Tabulka 6 - Model PREDICT a semiPREDICT**

Znak	Skóre
pravostranná lokalizace	1,6
jakékoli množství disekujícího mucinu	1,6
věk pod 50 let	1,3
tumor infiltrující lymfocyty	1,3
peritumorální lymfocytární lem	0,7
plazmocyty tvoří > 25 % stromálních leukocytů	0,7

**PREDICT skóre:** Suspekce na MSI-H vzniká při skóre  $\geq 2,5$  (maximální možné skóre: 7,8)

**Semi PREDICT skóre:** Suspekce na MSI-H vzniká, pokud jsou přítomny dva a více znaků

**Tabulka 7 - Kumulativní riziko ve věku 70 let u extrakolonických nádorů asociovaných s Lynchovým syndromem**

Původ nádoru	Riziko u obecné populace (%)	Riziko u LS (%)	Průměrný věk v době diagnózy u LS (roky)
Endometrium - <i>MLH1/MSH2</i> mutace - <i>MSH6</i> mutace - <i>PMS2</i> mutace	2.7	14-54 17-71 15	65 48-62 54-57 49
Žaludek	<1	0.2-13	49-55
Ovárium	1.6	4-20	43-45
Hepatobiliární trakt	<1	0.02-4	54-57
Močový trakt	<1	0.2-25	52-60
Tenké střevo	<1	0.4-12	46-49
Mozek	<1	1-4	50
Sebaceózní nádory kůže	<1	1-9	53
Pankreas	1.5	0.4-4	63-65
Prostata	16.2	9-30	59-60
Prs	12.4	5-18	52

**Tabulka 8 - Nejdůležitější syndromy v diferenciální diagnostice Lynchova syndromu**

Syndrom	OMIM #	Geny	incidence v populaci	Lokalizace lézí
Familiární adenomatózní polypóza	175000	<i>APC</i>	1/5000-30000	Tlusté střevo, tenké střevo, žaludek, štítná žláza, pankreas, játra, kosti, kůže
<i>MYH/MUTYH</i> -asociovaná polypóza (MAP)	608456	<i>MYH</i>	1/5000	Tlusté střevo, tenké střevo, žaludek, štítná žláza, děloha, ovária, prs, močový měchýř, kůže
Peutz–Jeghersův syndrom	175200	<i>STK11</i>	1/30000–1/100000	Tlusté střevo, tenké střevo, žaludek, prs, pankreas, ovária, varlata, děloha, plíce
Familiární juvenilní polypóza	174900	<i>BMPRIA</i>	1/100000	Tlusté střevo, tenké střevo, žaludek, pankreas
Familiární juvenilní polypóza/syndrom hemoragické telangiektazie	175050	<i>SMAD4</i>	1/100000	Tlusté střevo, tenké střevo, žaludek, pankreas, plíce, játra, mozek, kůže a sliznice
Cowdenův syndrom	158350	<i>PTEN</i>	1/200000	Tlusté střevo, prs, štítná žláza, kůže a sliznice, děloha,
Syndrom hereditární smíšené polypózy	601228	<i>CRAC1</i>	neznámá	Tlusté střevo
Brooke-Spieglerův syndrom	605041	<i>CYLD</i>	neznámá	Kůže
Gorlinův syndrom (Basal cell nevus syndrom)	109400	<i>PTCH</i>	neznámá	Kůže, čelisti, srdce, žaludek, kosti, ovária, mozek
Tuberózní skleróza	191100	<i>TSC</i>	1/6000	Kůže, ledviny, mozek, srdce, plíce
Syndrom Birt–Hogg–Dube	135150	<i>BHD</i>	1/200000	Kůže, ledviny, plíce, tlusté střevo
Syndrom hyperplastické polypózy	-----	neznámý	1/100000	Tlusté střevo, prs, plíce, prostata, varlata

OMIM – Online Mendelian Inheritance in Man ([www.omim.org](http://www.omim.org))

**Tabulka 9 – Věkové rozložení pacientů s diagnostikovaným Lynchovým syndromem**

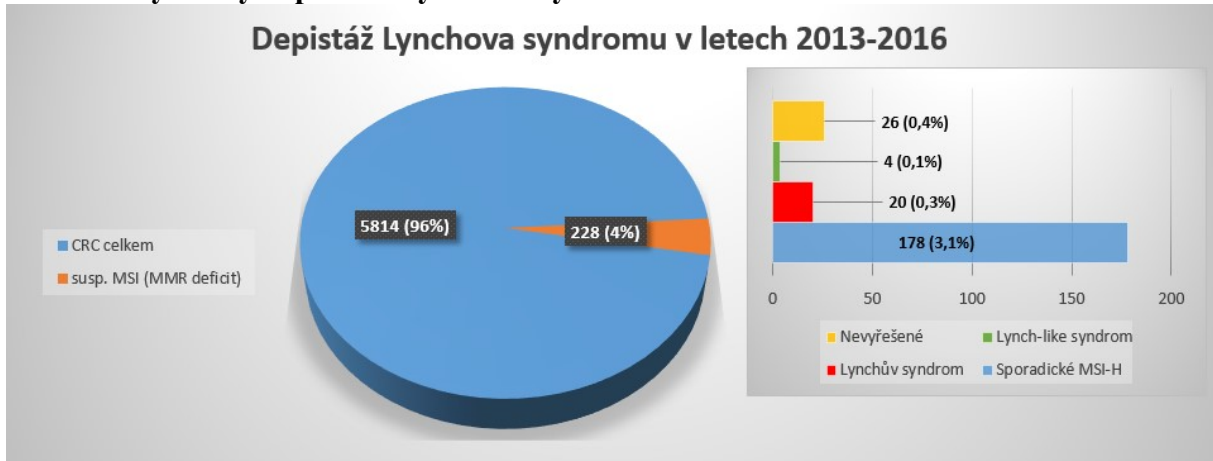
Pohlaví	Počet případů	Věk (roky)	Průměr (roky)
muži	10	26-80	58,5
ženy	13	38-78	55,3



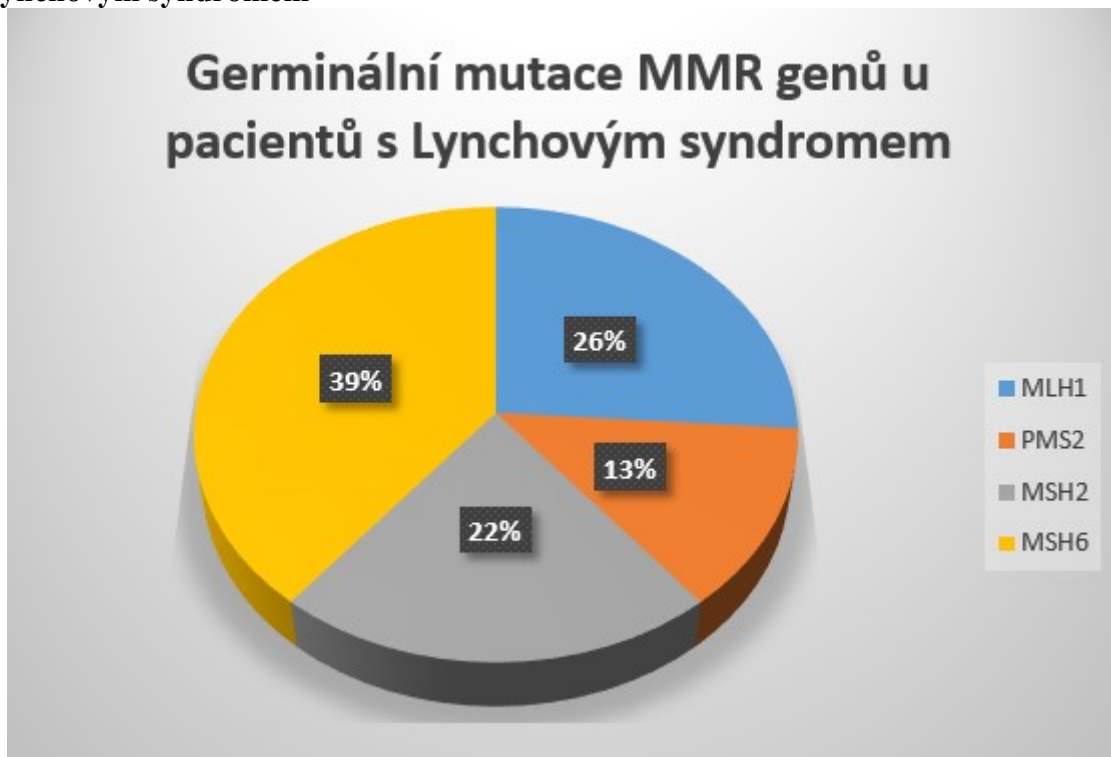
**Tabulka 10 – Pacienti s diagnostikovaným Lynchovým syndromem**

Číslo	Pohlaví	Věk	Lokalizace tumoru	Germinální mutace	Význam mutace
1	muž	51	cékum	frameshift delece c.1210_1211delCT v exonu 12 genu <i>MLH1</i>	patogenní
2	žena	44	colon sigmoideum	duplikace c.1282dupC v exonu 8 genu <i>MSH2</i>	patogenní
3	muž	60	colon ascendens	jednobasová substituce c.366+1G>A první hraniční base intronu 2 v genu <i>MSH2</i>	pravděpodobně patogenní
4	žena	52	cékum	frameshift delece c.402delT v exonu 2 genu <i>MSH6</i>	patogenní
5	muž	70	colon transversum	in-frame delece dvanácti basí c.170_181del (p.K57_Q60del) v exonu 2 genu <i>MLH1</i>	nejasná
6	žena	42	cékum	frameshift duplikace c.741dupA v exonu 4 genu <i>MSH6</i>	patogenní
7	muž	39	neuveдена	delece exonů 9 až 16 v genu <i>MSH2</i>	patogenní
8	žena	65	colon transversum	hemizygotní delece exonů 12, 13 a 14 genu <i>PMS2</i>	patogenní
9	žena	72	cékum	frameshift duplikace c.1489dupC (p.Arg497Profs) v exonu 13 genu <i>MLH1</i>	patogenní
10	muž	72	neuveдена	inframe delece c.1153_1155delAGG (p.Arg385del) v exonu 4 genu <i>MSH6</i>	pravděpodobně patogenní
11	muž	46	cékum	jednobasová substituce c.2086C>A (p.Pro696Thr) v exonu 13 genu <i>MSH2</i>	patogenní
12	muž	68	colon ascendens	frameshift delece c.2062_2063delGT (p.Val688LeuFS) v exonu 4 genu <i>MSH6</i>	patogenní
13	muž	73	colon descendens	jednobasová nonsense substituce c.1572C>G (p.Tyr524Ter) v exonu 4 genu <i>MSH6</i>	patogenní
14	muž	26	hepatální flexura	jednobasová nonsense substituce c.1939A>T (p.Lys647Ter) v exonu 11 genu <i>PMS2</i>	patogenní
15	žena	40	rektosigma	jednobasová substituce c.2086C>A (p.Pro696Thr) v exonu 13 genu <i>MSH2</i>	patogenní
16	muž	80	hepatální flexura	dvoubasová substituce c.1852_1853delAAinsGC (p.Lys618Ala) v exonu 16 genu <i>MLH1</i>	patogenní
17	žena	38	neuveдена	frameshift delece c.3573delT v exonu 7 genu <i>MSH6</i>	pravděpodobně patogenní
18	žena	60	cékum	frameshift duplikace c.2252_2253dupAA (p.Lys751delinsLysLysfs) v exonu 19 genu <i>MLH1</i>	nejasná
19	žena	56	cékum	jednobasová nonsense substituce c.1687C>T (p.Arg563Ter) v exonu 11 genu <i>PMS2</i>	patogenní
20	žena	78	colon transversum	germinální metylace promotoru genu <i>MLH1</i> (tzv. constitutional <i>MLH1</i> epimutation) při metylaci jedné alely ze dvou	patogenní
21	žena	68	duodenum	jednobasová nonsense substituce c.856G>T (p.Glu286Ter) v exonu 4 genu <i>MSH6</i>	pravděpodobně patogenní
22	žena	55	endometrium	jednobasová nonsense substituce c.1691C>A (p.Ser564Ter) v exonu 4 genu <i>MSH6</i>	pravděpodobně patogenní
23	žena	49	endometrium	frameshift duplikace c.1862dupT v exonu 4 genu <i>MSH6</i>	pravděpodobně patogenní

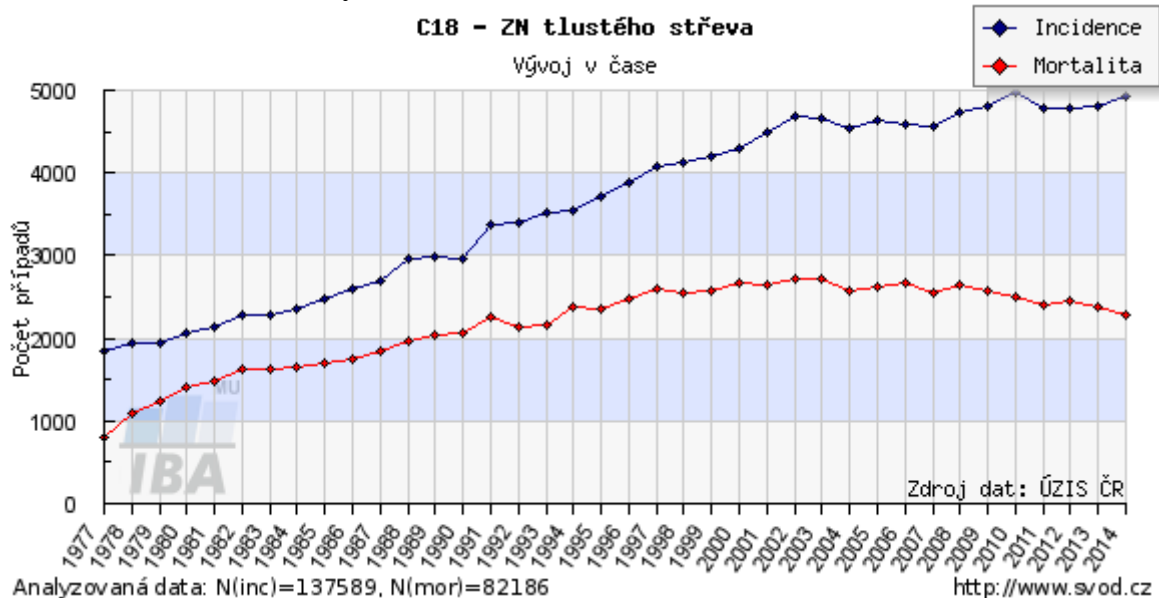
**Graf 1 – Výsledky depistáže Lynchova syndromu v letech 2013-2016**



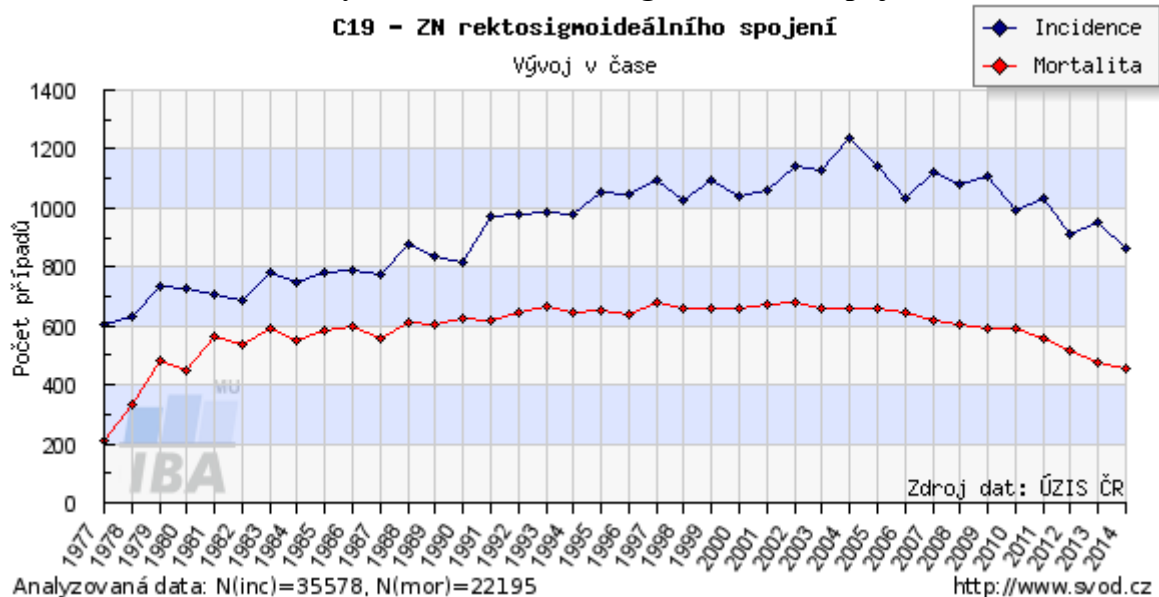
**Graf 2 – Rozložení germinálních mutací jednotlivých MMR genů u pacientů s Lynchovým syndromem**



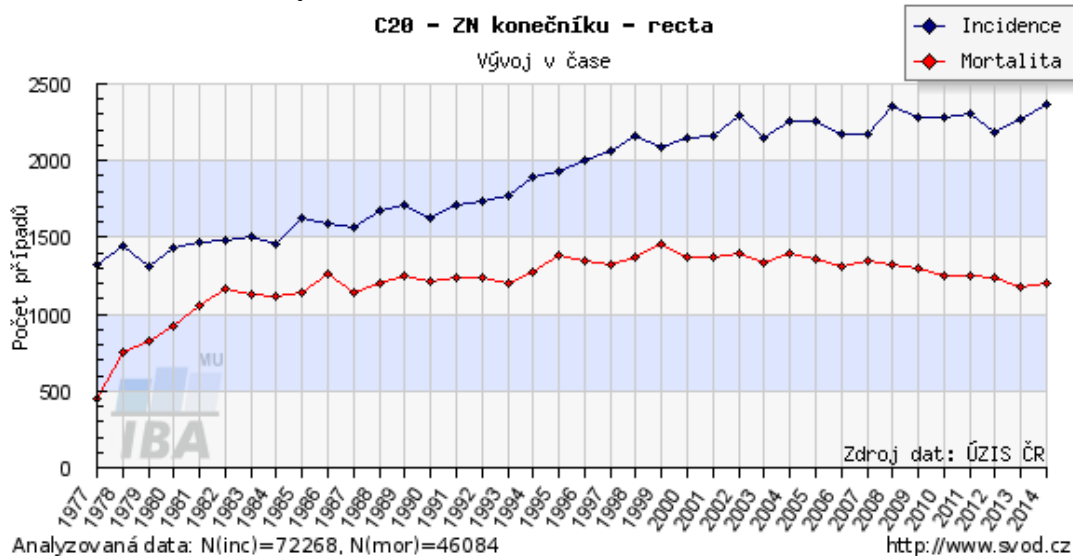
**Graf 3 – Incidence zhoubných novotvarů tlustého střeva v ČR**



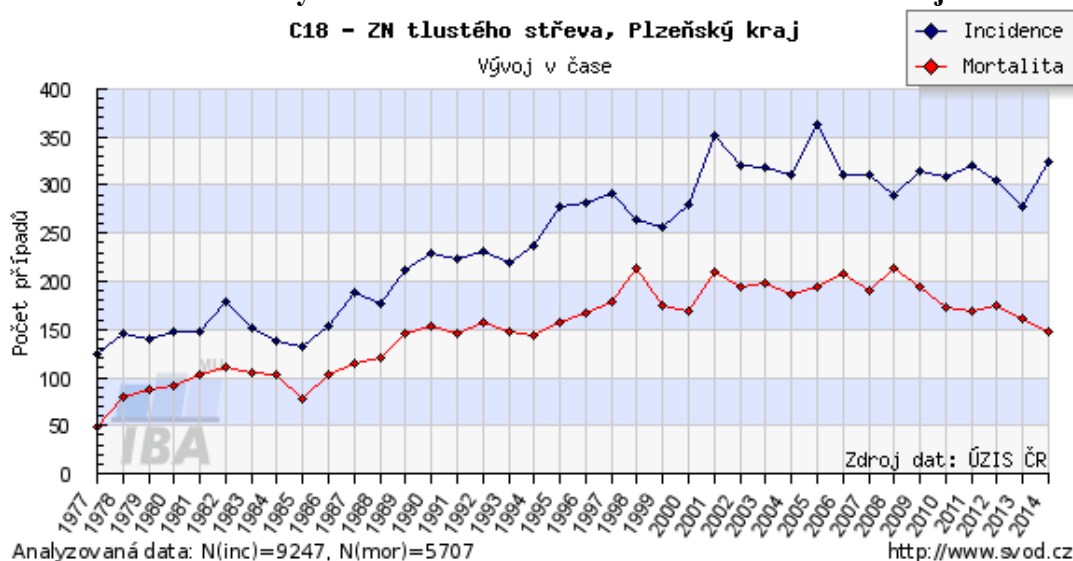
**Graf 4 – Incidence zhoubných novotvarů rektosigmoideálního spojení v ČR**



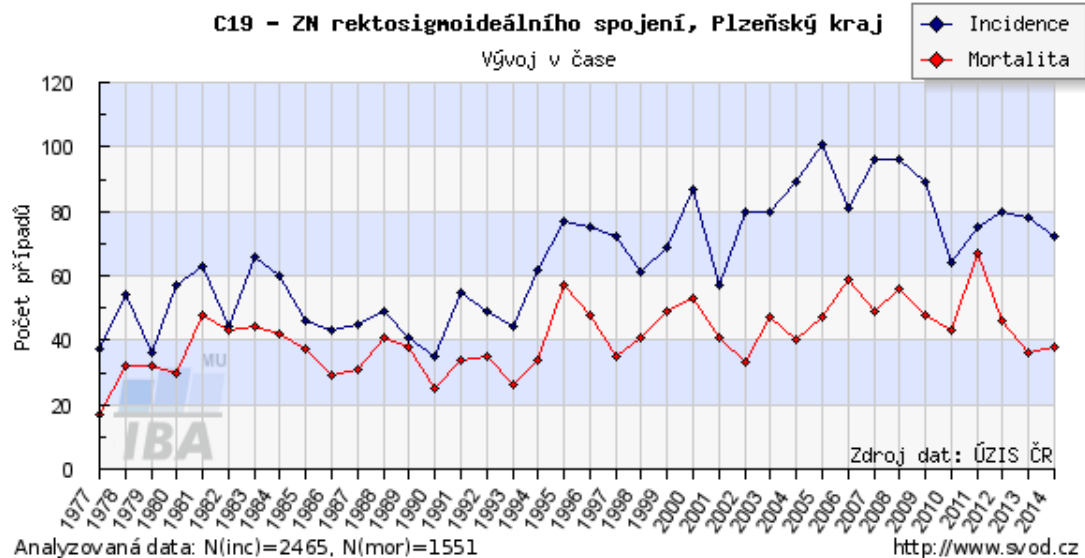
**Graf 5 - Incidence zhoubných novotvarů konečnicku v ČR**



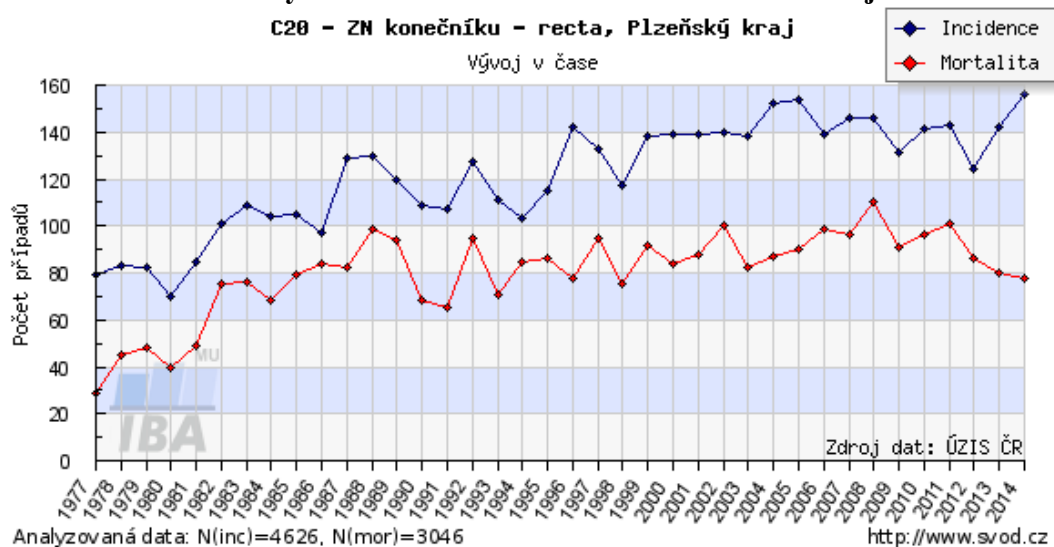
**Graf 6 - Incidence zhoubných novotvarů tlustého střeva v Plzeňském kraji**



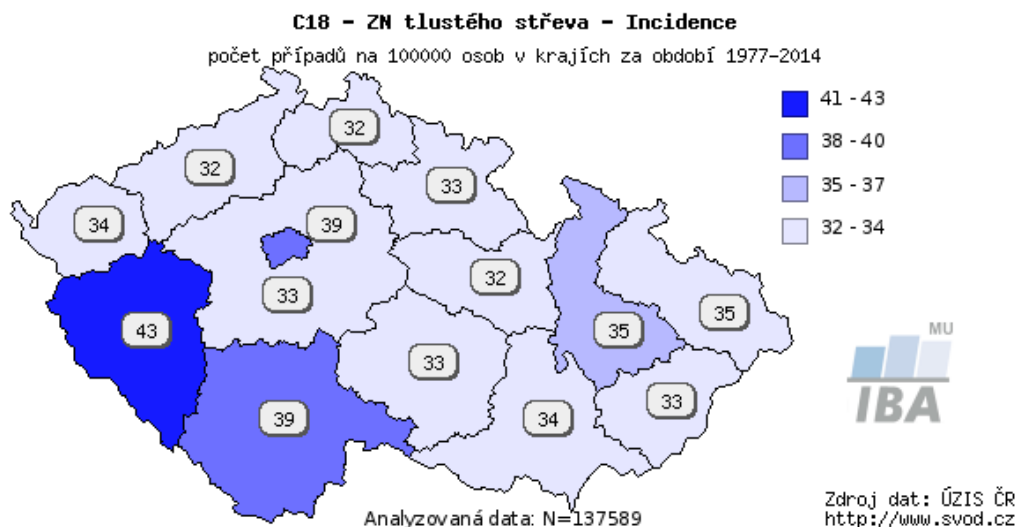
**Graf 7 - Incidence zhoubných novotvarů rektosigmoideálního spojení v Plzeňském kraji**



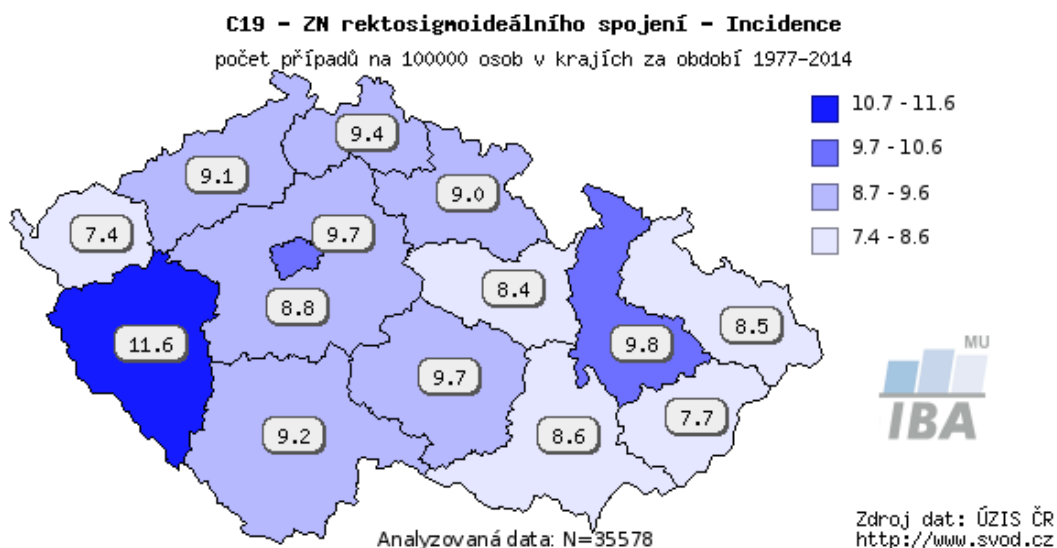
**Graf 8 - Incidence zhoubných novotvarů konečníku v Plzeňském kraji**



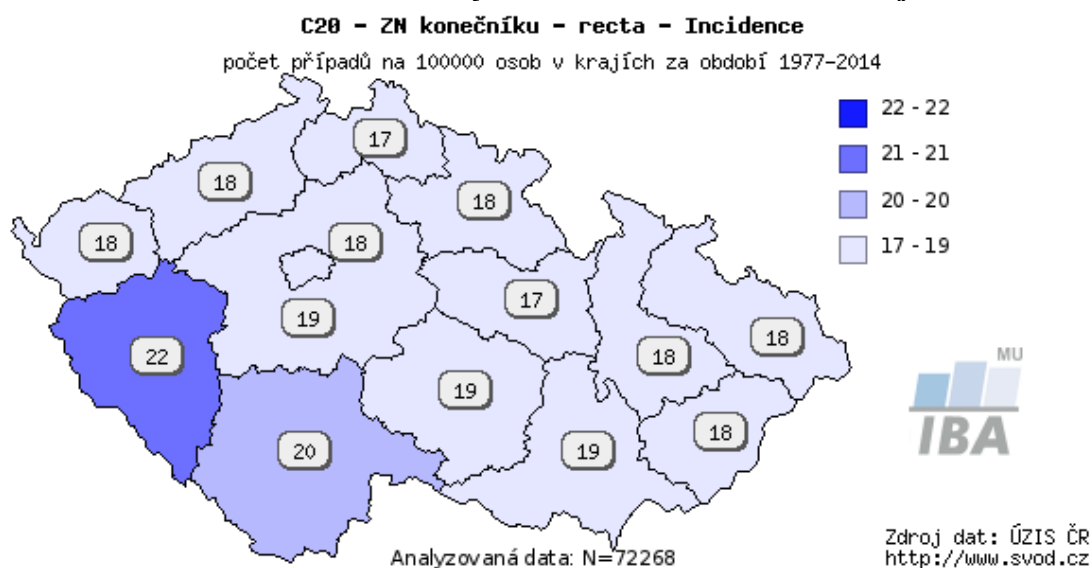
## Graf 9 – Porovnání incidence zhoubných novotvarů tlustého střeva v krajích



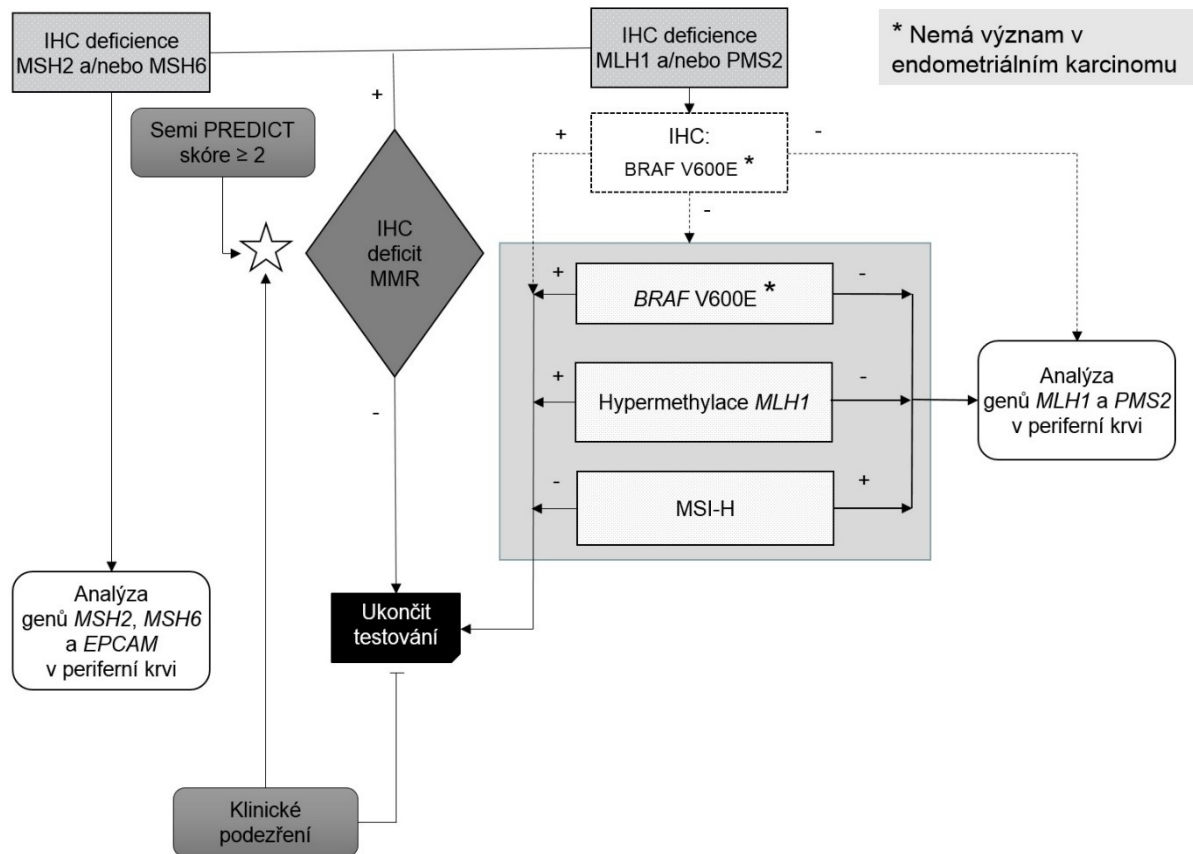
## Graf 10 – Porovnání incidence zhoubných novotvarů rektosigmoideálního spojení v krajích



## Graf 11 – Porovnání incidence zhoubných novotvarů konečníku v krajích



**Obr.1 - Algoritmus diagnostiky Lynchova syndromu**



**LEGENDA:**

Na pracovištích vyššího typu zapojených do depistáže LS diagnostika začíná vyšetřením všech CRC monoklonálními protilátkami proti jednotlivým MMR proteinům (hvězda). V případě průkazu deficiencí MSH2 a/nebo MSH6 je kontaktován klinik s požadavkem na zaslání nesrážlivé periferní krve spolu s Informovaným souhlasem pacienta k molekulárně genetickému vyšetření zárodečných mutací příslušných genů. Je-li prokázána deficiencí proteinů MLH1 a/nebo PMS2, následuje komplex vyšetření obsažený v šedém obdélníku, jehož cílem je vyloučit z dalšího vyšetřování případy sporadických MSI-H karcinomů, případně MSS karcinomy s falešnou negativitou IHC průkazu MMR proteinů. Volitelně lze místo těchto molekulárně genetických metod (nebo spolu s nimi) k vyloučení sporadického MSI-H karcinomu využít IHC vyšetření exprese proteinu mutované formy BRAF (bílý obdélník a přerušované šipky). MSI-H tumory bez mutace genu *BRAF* a hypermethylace promotoru *MLH1* jsou indikovány k molekulárně genetickému vyšetření zárodečných mutací příslušných genů (opět je nutné získat vzorek periferní krve a Informovaný souhlas).

Není-li místní pracoviště patologie vybaveno laboratoří disponující možností imunohistochemických a molekulárně genetických vyšetření uvedených výše, měl by patolog provést histologické vyšetření znaků „MSI-H histologie“ podle modelu PREDICT. V případě suspektního Semi PREDICT skóre pak odeslat vzorek karcinomu (a optimálně i nenádorové tkáně pro možnost komparace) na specializované pracoviště provádějící výše uvedená imunohistochemická a molekulárně genetická vyšetření. Alternativně může být indikací k tomuto odeslání na specializované pracoviště žádost gastroenterologa či onkologa v případě klinické suspekce na LS (např. na podkladě RBG). Klinické podezření na hereditární podklad onemocnění může být stimulem i pro další pokračování vyšetřování pacientů, u nichž byl LS běžným algoritmem vyloučen (např. může být dále vyšetřována možnost MAP). V nádorech dělohy není třeba provádět vyšetření *BRAF*.

## 15 Publikované práce

Níže uvedené práce publikované společně s dalšími autory shrnují základní poznatky o LS využitě pro zavedení jeho vyšetřovacího algoritmu na našem pracovišti a snaží se s ním seznámit kromě patologů také klinické lékaře. V tomto případě se jedná o obory gastroenterologie a onkologie, v jejichž péči se pacienti s LS často nacházejí a jejich zainteresování v diagnostických postupech je tak velmi důležité. Redakce časopisu Klinická Onkologie udělila článku Diagnóza Lynchova syndromu od patologa cenu za nejlepší přehledovou práci publikovanou v roce 2016.

### 15.1 Lynchův syndrom v rukách patologa

Cesk Patol 2014; 50(1): 18-24.

**O. Daum<sup>1</sup>, Z. Beneš<sup>2</sup>, L. Hadravský<sup>1</sup>, J. Stehlík<sup>3</sup>, K. Černá<sup>3</sup>, M. Dušek<sup>1,3</sup>, B. Kokošková<sup>1</sup>, M. Michal<sup>3</sup>. Cesk Patol 2014; 50(1): 18-24**

<sup>1</sup> Šiklův ústav patologie LF UK a FN Plzeň

<sup>2</sup> Interní oddělení Fakultní Thomayerovy nemocnice, Praha

<sup>3</sup> Bioptická laboratoř, s.r.o., Plzeň

#### SOUHRN

Lynchův syndrom (dříve hereditární nepolypózní kolorektální karcinom) je nejčastější příčinou familiárního výskytu kolorektálního karcinomu se známým molekulárně genetickým podkladem. Příčinou je germinální mutace některého z genů kódujících takzvané MMR proteiny, které opravují chyby ve struktuře DNA vznikající při její replikaci. Tyto mutace způsobují dysfunkci opravného komplexu, která vede k rozvoji nestability mikrosatelitů (MSI) a ke vzniku a progresi nádorů, zejména kolorektálního karcinomu. Tradičně se jeho frekvence odhaduje na 2 % všech kolorektálních karcinomů, v současné době však odhady dosahují až 5 %. Vzhledem k této poměrně vysoké četnosti, absenci premorbidního fenotypu, familiárnímu výskytu a prezentaci maligních nádorů v produktivním věku se z jeho diagnostiky stává problém nejen medicínský, ale i socioekonomický. Bohužel, Bethesda guidelines, natož Amsterdamská kritéria, která byla sestavena především ke klinickému zachytu pacientů se suspekci na Lynchův syndrom, nejsou dostatečně senzitivní. Ukázalo se, že vyšší senzitivitu vykazuje histologická detekce karcinomů s morfoloickými znaky asociovanými s MSI. Jedna pětina karcinomů s MSI by měla být podmíněna Lynchovým syndromem, zbytek tvoří sporadické MSI-H karcinomy způsobené epigenetickou inaktivací opravného proteinu. K vyloučení těchto sporadických případů z dalšího testování slouží vyšetření genu BRAF a analýza methylace promotoru genu MLH1. Podezření na Lynchův syndrom vyplývající z výsledků výše uvedeného komplexu vyšetření by mělo být nakonec potvrzeno detekcí germinální mutace některého z MMR genů v periferní krvi s následným vyšetřením rodinných příslušníků pro zajištění účinné prevence.

**Klíčová slova:** kolorektální karcinom – Lynchův syndrom – HNPCC – MSI – nestabilita mikrosatelitů

#### SUMMARY

Lynch syndrome (formerly hereditary non-polyposis colorectal cancer) is the most common familial colorectal cancer syndrome with a known molecular genetic background. The syndrome is caused by a germline mutation of one of the genes encoding mismatch repair (MMR) proteins that are responsible for DNA replication errors repair. Impaired function of



these proteins leads to microsatellite instability (MSI) and forms a suitable background for the development and progression of tumors, mainly colorectal cancer. Traditionally, Lynch syndrome was regarded to be responsible for 2 % of all cases of colorectal cancer, however recent estimates reach even 5 %. Due to this relatively high frequency, familial occurrence, the absence of the premorbid phenotype and the development of malignant tumors during the productive years of life, the correct diagnosis becomes not only a medical, but also a socioeconomical problem. Unfortunately, clinical means of diagnostics of Lynch syndrome (like the Amsterdam criteria and Bethesda guidelines) lack sensitivity. It was shown that predictive models based on histological signs of MSI are more sensitive than the clinical criteria used to detect patients suspicious of Lynch syndrome. Of all MSI-H colorectal cancers, 1/5 is caused by Lynch syndrome, the rest being only sporadic cancers caused by epigenetic inactivation of a MMR protein. To rule out the sporadic cases, molecular genetic investigation of the BRAF gene and methylation analysis of MLH1 is used in the diagnostic workup of Lynch syndrome. The suspicion of Lynch syndrome, based on the results of the assortment of diagnostic methods mentioned above, should be proven by detection of a germline mutation of an MMR gene in peripheral blood, and followed by screening of family members, which is a necessary condition for efficient prevention.

**Keywords:** colorectal cancer – Lynch syndrome – HNPCC – MSI – microsatellite instability

## **LYNCHŮV SYNDROM - SOUČASNÁ DEFINICE**

Lynchův syndrom (LS) je autozomálně dominantně dědičné onemocnění vytvářející predispozici ke vzniku maligních nádorů, jehož podkladem je (až na výjimky) germinální mutace některého z genů odpovědných za opravy replikačních chyb v DNA, takzvaných mismatch repair (MMR) genů. Nejčastějším karcinomem vznikajícím při Lynchově syndromu je kolorektální karcinom (CRC), je však zvýšené riziko vzniku i extrakolonických malignit, zejména karcinomů endometria, žaludku, tenkého střeva, ovária, ledvinné pánvičky a močododů, nádorů mozku a kůže. Na podkladě LS vzniká pravděpodobně až 5 % CRC. Na rozdíl od familiární adenomatózní polypózy (FAP) tyto nádory nevznikají v terénu polypózy (definované jako >100 polypů), což však neznamená, že nemohou být přítomny žádné polypy. Dalším důležitým znakem LS je absence „premorbidního fenotypu“, tedy přítomnosti benigních změn, které by umožňovaly diagnostikovat tento syndrom ještě před vznikem maligního tumoru (jako je tomu třeba v případě FAP, neurofibromatózy 1. typu a dalších familiárních karcinomových syndromů). Výjimkou z tohoto pravidla je fenotypická varianta LS projevující se vznikem kožních sebaceózních nádorů, označovaná jako Muir-Torreho syndrom (MTS) (1). V ostatních případech může být LS diagnostikován prakticky až při nálezů maligního tumoru, případně při genetickém vyšetření rodinných příslušníků již diagnostikovaného probanda.

## **HISTORIE A VÝVOJ TERMINOLOGIE**

První známou dokumentovanou rodinou s (tehdy samozřejmě ještě nepojmenovaným) LS je „karcinomová rodina G“, kterou v roce 1913 popsal prof. Warthin (2). Pozorování podobně významného rodinného výskytu kolorektálního karcinomu při absenci polypózy (3) přivedlo Lynche ke studiu a doplnění materiálů o „karcinomové rodině G“ a zaznamenání základních znaků tohoto syndromu:

1. zvýšená incidence adenokarcinomů, zejména kolorektálních a endometriálních,
2. zvýšené riziko multiplicity nádorů,
3. autosomálně dominantní dědičnost, a
4. vznik karcinomů v mladším věku (4).

Ve svých prvních publikacích Lynch používal k jeho označení termín „syndrom karcinomové rodiny“, v pozdějších „hereditární nepolypózní kolorektální karcinom“ (HNPCC) (5).

Zároveň se však začalo synonymicky používat označení „Lynchův syndrom“ (6). V současné době se upouští od termínu HNPCC, přičemž označení „Lynchův syndrom“ se používá pro případy splňující Amsterdamská kritéria (viz níže) a zároveň nesoucí germinální mutaci některého z MMR genů, zatímco pro případy splňující Amsterdamská kritéria, ale bez prokazatelné germinální mutace některého z MMR genů, se doporučuje termín „familiární kolorektální karcinom typu X“ (7).

### MOLEKULÁRNĚ GENETICKÝ PODKLAD

Příčinou LS je ve většině případů germinální mutace v některém z genů zodpovědných za opravy replikačních chyb v DNA, takzvaných mismatch repair (MMR) genů (8,9). Fyziologicky se MMR proteiny kódované těmito geny spojují do funkčních komplexů, a to zejména v heterodimery MSH2-MSH6 (příp. MSH2-MSH3) a MLH1-PMS2. První z těchto dimerů rozpoznává chyby v DNA (nespárované nebo špatně spárované nukleotidy) a signalizuje poškození, druhý chyby opravuje. Zároveň se podílí na zastavení buněčného cyklu a indukci apoptózy v reakci na poškození DNA. Pokud některý z proteinů není funkční následkem inaktivace obou alel jeho genu, dochází ke vzniku nádorů charakteristických vysokým stupněm nestability v takzvaných mikrosatelitech, tedy krátkých tandemových repetičích (short tandem repeats, STR) (10,11).

Mikrosatelity jsou úseky DNA tvořené několikanásobným opakováním jednoho, dvou, tří, čtyř a vzácněji více nukleotidů, které se vyskytují v celém genomu poměrně hojně. Délky jednotlivých mikrosatelitů (tedy počty opakování těchto sekvencí) jsou v rámci jedince stejné, ale mohou se lišit mezi jednotlivci. Mikrosatelitní sekvence jsou velmi snadno zranitelné při replikaci DNA, protože DNA polymeráza na takovýchto místech snadněji sklouzává a dochází tak ke vzniku delších (inzerce sekvence) či kratších (delece sekvence) úseků. Kolísá-li délka mikrosatelitů v rámci jednoho jedince, hovoříme o nestabilitě mikrosatelitů (microsatellite instability, MSI). Stanovení stupně MSI spočívá ve stanovení nestability mezinárodně kodifikovaných markerů, přičemž na základě počtů postižených markerů se rozlišují stavy (resp. nádory) se stabilními mikrosatelity (microsatellite stable, MSS), s nízkým stupněm nestability (microsatellite instability – low, MSI-L) a s vysokým stupněm nestability mikrosatelitů (microsatellite instability – high, MSI-H) (12). Přehled používaných markerů a algoritmus stanovení stupně MSI shrnuje tabulka 1.

**Tabulka 1.** Panel mikrosatelitních markerů a jeho použití

<b>Bethesda panel mikrosatelitních markerů doporučený NCI</b>
a. mononukleotidové: BAT25, BAT26
b. dinukleotidové: D2S123, D5S346, D17S250
<b>Rozdělení nádorů podle stability mikrosatelitů</b>
1. MSS: 0 nestabilních markerů
2. MSI-L: 1 nestabilní marker v Bethesda panelu (nebo frekvence nestabilních $\leq 30 - 40$ %*)
3. MSI-H: > 1 nestabilní marker v Bethesda panelu (nebo frekvence nestabilních > 30 - 40 %*)

NCI: National Cancer Institute, MSS: microsatellite stable, nádor se stabilními mikrosatelity, MSI-L: microsatellite instability – low, nádor s nízkým stupněm nestability mikrosatelitů, MSI-H: microsatellite instability – high, nádor s vysokým stupněm nestability mikrosatelitů  
\*: možnost v závorce platí i při použití panelu složeného z většího počtu markerů

MSI-H tumory mohou vznikat dvěma různými základními způsoby. Buď jde o sporadické nádory vyvolané genetickými a/nebo epigenetickými změnami v somatické buňce, nebo o familiárně se vyskytující nádory v rámci LS způsobené nejčastěji germinální mutací

některého z MMR genů. Mutovaná alela je děděna autozomálně dominantně. Jelikož ale MMR geny patří mezi typické tumor supresorové geny, k vlastnímu vzniku nádoru dochází až somatickou inaktivací druhé alely téhož genu (13). LS je z více než 80 % asociován se zárodečnými mutacemi genů MLH1 a MSH2 (14), přibližně 10 % objevených mutací je lokalizováno v genu MSH6 a ostatní mutace připadají na další MMR geny (PMS2, PMS1, MSH3, MLH3). Většinou se jedná o mutace malého rozsahu, jako jsou substituce, inserce nebo delece, rozsáhlé delece a duplikace celých exonů bývají nacházeny hlavně v MSH2 (až 1/3 mutací) a poměrně často také v MLH1 (15). U posledně jmenovaného genu byly už popsány i germinální hypermetylace promotoru vedoucí k jeho epigenetické inaktivaci (16,17). V nedávné době byly popsány i germinální delece 3' konce genu EPCAM (TACSTD1), které vedou k epigenetické inaktivaci MSH2 (18,19). U některých mutací a polymorfizmů MMR genů zatím nebyl prokázán jejich klinický význam, nicméně poznatky o variantách genů jsou neustále aktualizovány na stránkách International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours (<http://www.insight-group.org/>).

Je-li u osob nesoucích jednu germinálně mutovanou alelu MMR genu během jejich života inaktivována i alela druhá, dochází ke vzniku různých malignit, jako například CRC, karcinomů dalších částí GIT, urotelu a dalších. Důvodem může být somatická mutace v druhé alele genu, ztráta heterozygoty (LOH), nebo také metylace promotoru, jak tomu často bývá u genu MLH1 (20). Velmi vzácně se vyskytuje germinální bíalelická mutace genů MMR, a to zejména jako následek incestu. Tento stav je charakteristický vznikem CRC již v mladém věku, hematologickými malignitami a fenotypickým obrazem připomínajícím neurofibromatózu 1. typu (21,22).

Klinické projevy mohou být u mutací jednotlivých genů různé. Například nosiči germinální mutace MLH1 mají riziko vzniku kolorektálního karcinomu v nízkém věku nižší, než je tomu u nosičů mutací v ostatních MMR genech, a také u nich často bývá kolorektální karcinom jedinou diagnostikovanou malignitou.

Ostatní nádorová onemocnění vyskytující se v souvislosti s Lynchovým syndromem jsou detekována častěji u pacientů s germinální mutací v MSH2 (23). Mutace v MSH6, které mají poměrně nízkou penetranci, jsou 6x častěji asociovány s karcinomy endometria než s nádory kolorekta, navíc jsou u těchto pacientů kolorektální karcinomy (v porovnání s Lynchovými syndromy způsobenými mutacemi jiných MMR genů) častěji levostranné. Důležité také je, že mutace v MSH6 nevedou vždy ke vzniku nestability mikrosatelitů, pravděpodobně díky tvorbě alternativního heterodimeru MSH2-MSH3 (24,25). Naopak mutace v PMS2 vedou většinou ke vzniku MSI-H tumorů a jsou asociovány jak s časným kolorektálním, tak endometriálním karcinomem, avšak ani zde penetrance není příliš vysoká (26-28). Na vzniku MTS se podílí především germinální mutace v genech MLH1 a MSH2, přičemž mutace v genu MSH2 je převažující (29,30). Turcotův syndrom, který je charakterizován společným výskytem nádorů mozku (většinou gliomů) a CRC, může být také způsoben zárodečnou mutací některého z MMR genů, mutace byly detekovány zejména v MLH1 a PMS2 (31).

Nádory pacientů s LS a MTS jsou v 89 %, resp. 70 % MSI-H, na rozdíl od sporadických kolorektálních karcinomů, kde se MSI-H status vyskytuje pouze u 15 % pacientů a v naprosté většině případů bývá asociován s hypermetylací promotoru genu MLH1, nikoli se somatickými mutacemi MMR genů (10,39,33). Mutační analýza je prováděna v ideálním případě z periferní krve pacienta, lze k ní využít ale i nenádorovou tkáň pacienta. K detekci rozsáhlých delecí a duplikací, které zahrnují celé exony nebo několik exonů, je v poslední době stále častěji využívána metoda MLPA (multiple ligation probe amplification). Drobné mutace mohou být detekovány pomocí SSCP (single strand conformation polymorphism) nebo přímou sekvenací celých exonů a exon-intronových oblastí.

## ZÁKLADY KLINICKÉ DIAGNOSTIKY LYNCHOVA SYNDROMU

V roce 1990 byla formulována klinická kritéria k diagnostice HNPCC, která se označují jako Amsterdamská kritéria (34). Pro zvýšení senzitivity, zejména s přihlédnutím k možnosti prezentace syndromu extrakolonickou malignitou, byla tato kritéria v roce 1998 revidována na Amsterdamská kritéria II (Tabulka 2) (35).

**Tabulka 2.** Amsterdamská kritéria II

• Alespoň tři členové rodiny mají karcinom, který bývá součástí Lynchova syndromu (CRC, karcinom endometria, tenkého střeva, močových cest)
• Alespoň jeden pacient je přímý příbuzný dvou ostatních
• Postižení jedinců v rodině v nejméně dvou po sobě následujících generacích
• Nádorové onemocnění u alespoň jednoho z jedinců v rodině bylo diagnostikováno ve věku pod 50 let
• Byla vyloučena familiární adenomatózní polypóza (FAP)
• Diagnóza karcinomu byla potvrzena histopatologickým vyšetřením

### Bethesda guidelines

K identifikaci pacientů s CRC, u kterých by měla být vyšetřena nestabilita mikrosatelitů (MSI), případně provedeno molekulárně genetické vyšetření, byla v roce 1996 vypracována a v roce 2002 revidována tzv. Bethesda guidelines (BG, resp. RBG), která berou v potaz nejen klinická kritéria, ale i morfologické znaky tumoru (Tabulka 3) (36). Bohužel ani tato širší kritéria nezachytí všechny případy LS (37), zejména v případě postižení MSH6 a PMS2 (27, 38-41). Odhaduje se, že až čtvrtina pacientů s LS propadne sítím kritérií RBG. Vzhledem k tomu, že falešná negativita v případě LS nemá za následek nerozpoznání tohoto syndromu pouze u vyšetřovaného pacienta, ale i u jeho případných příbuzných, nelze tuto senzitivitu pokládat za dostatečnou.

**Tabulka 3.** Revidovaná Bethesda guidelines

• CRC diagnostikovaný u pacienta mladšího než 50 let
• Přítomnost synchronního nebo metachronního CRC nebo jiného karcinomu, který bývá součástí Lynchova syndromu, bez ohledu na věk
• CRC s MSI-H histologií u pacienta mladšího 60 let
• Alespoň u jednoho přímého příbuzného byl ve věku nižším než 50 let diagnostikován CRC nebo jiný karcinom, který bývá součástí Lynchova syndromu
• Alespoň u dvou příbuzných prvního nebo druhého stupně byl diagnostikován CRC nebo jiný karcinom, který bývá součástí Lynchova syndromu (bez ohledu na věk)

### ROLE MORFOLOGA VE ZVÝŠENÍ ZÁCHYTU LYNCHOVA SYNDROMU

Současný nárůst role morfologických vyšetření v diagnostice Lynchova syndromu je způsoben potřebou zvýšení senzitivity, byť i za cenu snížení specificity, které je v tomto případě možné familiární tendence ke vzniku maligních nádorů ospravedlnitelné jak z hlediska etického, tak ekonomického. Mezi hlavní argumenty pro zvýšení senzitivity systému depistáže patří fakt, že 1 ze 660 lidí je nositelem geminální mutace některého z MMR genů (42), riziko vzniku CRC u LS je 60 - 80 % (43,44), dále že k progresi z adenomu do karcinomu pravděpodobně dochází během 2-3 let, narozdíl od 8 - 10 let u sporadických případů (45,46), a zejména že průměrný věk v době diagnózy je 45 let, tedy asi o 20 let méně než u sporadického CRC, navíc se zvýšeným rizikem synchronního a metachronního CRC (45).

## 1. Konvenční histologie

Zapojení histopatologa do vyhledávání pacientů s LS je založeno na detekci histologických znaků charakteristických pro CRC s vysokým stupněm nestability mikrosatelitů, tedy takzvané „**MSI-H histologii**“. Tyto morfologické rysy sice nejsou charakteristické pouze pro LS, protože se vyskytují i u sporadických MSI-H karcinomů způsobených epigenetickou inaktivací MLH1, ale odhaduje se, že 1 z 5 MSI-H CRC je CRC v rámci LS. Tento jistě ospravedlnitelný pokles specificity je daní za fakt, že samotná MSI-H morfologie má vyšší senzitivitu než souhrn zbývajících 4 kritérií RBG (47). Ačkoli byly morfologické znaky vídané v MSI-H CRC popsány již v RBG (konkrétně byly uváděny karcinomy se špatnou diferenciací, karcinomy mucinózní, medulární nebo „z buněk pečetního prstenu“, přítomnost Crohn-like lymfoidních nodulů a tumor-infiltrujících lymfocytů (TIL)), nebyla dostatečně známa ani prediktivní hodnota jednotlivých znaků, ani jejich reprodukovatelná kvantitativní definice, která by byla použitelná v rutinní praxi (36,48). Proto v posledních letech proběhlo několik studií (49), jejichž cílem bylo nalézt racionální algoritmus detekce MSI-H karcinomů, z nichž se v současné době jako nejužitečnější jeví model Model PREDICT (Pathological Role in the Determination of Instability in Colorectal Tumors) (47), zejména ve své zjednodušené formě jako Semi PREDICT skóre (Tabulka 4). Histologickými znaky, na nichž je tento model založen jsou: přítomnost mucinu dissekujícího stroma v jakémkoli množství (obr. 1), přítomnost tumor-infiltrujících lymfocytů (TIL) (obr. 1,2), peritumorální lymfoidní lem (obr. 3) a zastoupení plazmatických buněk mezi buňkami zánětlivého infiltrátu ve stromatu převyšující 25 % (obr. 4).

**Tabulka 4.** Model PREDICT

Znak	Skóre	Charakteristika
Pravostranná lokalizace	1,6	
Mucin	1,6	Dissekující mucin i v minimální komponentě nádoru
Věk pod 50 let	1,3	
TIL	1,3	Třeba > 2/HPF, jinde zas > 10/100 epitelových jader
Peritumorální lymfoidní lem	0,7	Lichenoidní pruh při invazivním okraji nádoru
Stromální plasmocyty	0,7	> 25 % stromálních leukocytů

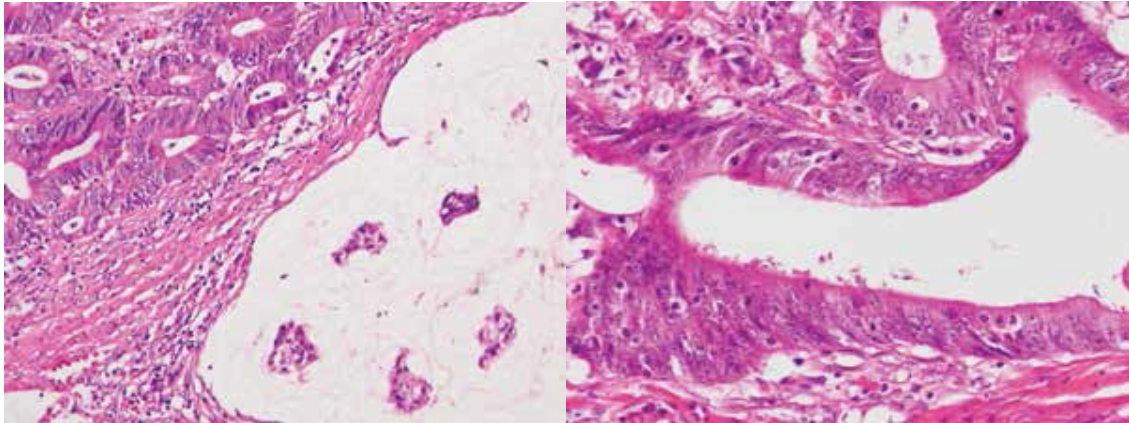
TIL: tumor-infiltrující lymfocyty

### **PREDICT skóre:**

Maximální možné skóre: 7,8

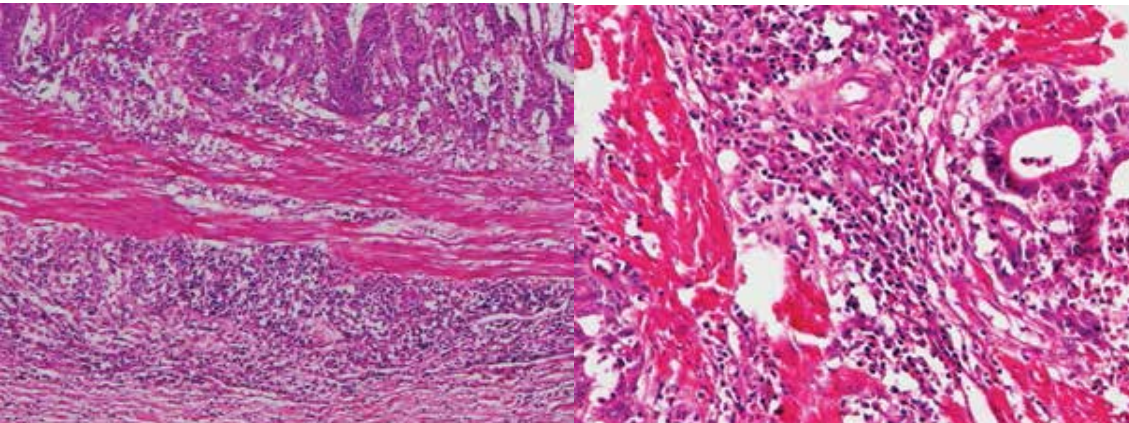
Suspekce na MSI-H: skóre  $\geq 2,5$

**Semi PREDICT skóre:** přítomny 2 a více znaků  $\rightarrow$  MSI-H susp.



**Obr. 1.** V dolní části obrázku je patrný hlen disekující stroma a vytvářející hlenové jezírko. V hleně plavou ostrůvky nádorových buněk. V horní části obrázku je zřetelně vidět „posypání“ nádorových žlázek lymfocyty obklopenými světlými halo (HE, původní objektiv 10x).

**Obr. 2.** Tumor-infiltrující lymfocyty ve větším detailu (HE, původní objektiv 20x).



**Obr. 3.** Vpravo od nádoru je souvislý lem lymfocytů, který částečně proniká i do přilehlé hladké svaloviny (HE, původní objektiv 10x).

**Obr. 4.** Zánětlivá infiltrace v nádorovém stromatu v tomto zorném poli je ve výrazné většině tvořena plazmatickými buňkami (HE, původní objektiv 20x).

## 2. Imunohistochemie a stanovení MSI

Méně zprostředkovanou informací o funkci MMR komplexu lze získat pomocí imunohistochemického vyšetření exprese hlavních MMR proteinů (tedy MLH1, PMS2, MSH2 a MSH6) nebo prostřednictvím vyšetření MSI Bethesda panelem mikrosatelitních markerů (viz výše a Tabulka 1). Zpočátku, když byla imunohistochemicky stanovována pouze exprese MLH1 a MSH2, zdála se senzitivita imunohistochemického vyšetření ve srovnání s MSI nedostatečná. Avšak po zavedení dalších dvou protilátek, které detekují partnery MLH1 a MSH2 pro tvorbu heterodimerů (tedy proteiny PMS2 a MSH6), je senzitivita imunohistochemického vyšetření a stanovení MSI srovnatelná (50). Význam detekce těchto funkčně minoritních partnerů pro tvorbu heterodimerů spočívá nejen v průkazu jejich vlastních strukturálních abnormalit, ale i v nepřímém průkazu ztráty aktivity jejich dominantních partnerů. Některé mutace totiž vedou ke ztrátě funkce při zachování antigenicity, zejména v případě MLH1, což se ale projeví ztrátou exprese PMS2 (50). Tento efekt závislosti exprese funkčně minoritních proteinů (PMS2 a MSH6) na intaktní funkci jejich dominantních partnerů (MLH1 a MSH2) vedl i k vytvoření imunohistochemického detekčního modelu založeného pouze na dvou protilátkách detekujících PMS2 a MSH6. Podle něj by ztráta exprese PMS2 měla detekovat mutace MLH1 i PMS2, ztráta exprese MSH6 detekuje i poškození MSH2 (51). Další studie však tento model zpochybnila, navíc dokonce navrhla semikvantitativní model místo dosavadního binárního (pozitivní/negativní) (52).



V současné době jsou obě metody (stanovení MSI a imunohistochemické vyšetření) vnímány jako komplementární, protože v kombinaci mají vyšší senzitivitu než při samostatném použití (53,54). Typickým příkladem přínosu imunohistochemie jsou případy s mutací MSH6, které mohou uniknout při detekci MSI pomocí PCR, protože MSH2 může také tvořit komplex s MSH3 (50,55). Imunohistochemická detekce MMR proteinů navíc (na rozdíl od stanovení MSI) umožňuje predikovat postižený gen pro molekulárně genetické vyšetření.

### **3. Rozlišení mezi karcinomem při Lynchově syndromu a sporadickým MSI-H karcinomem**

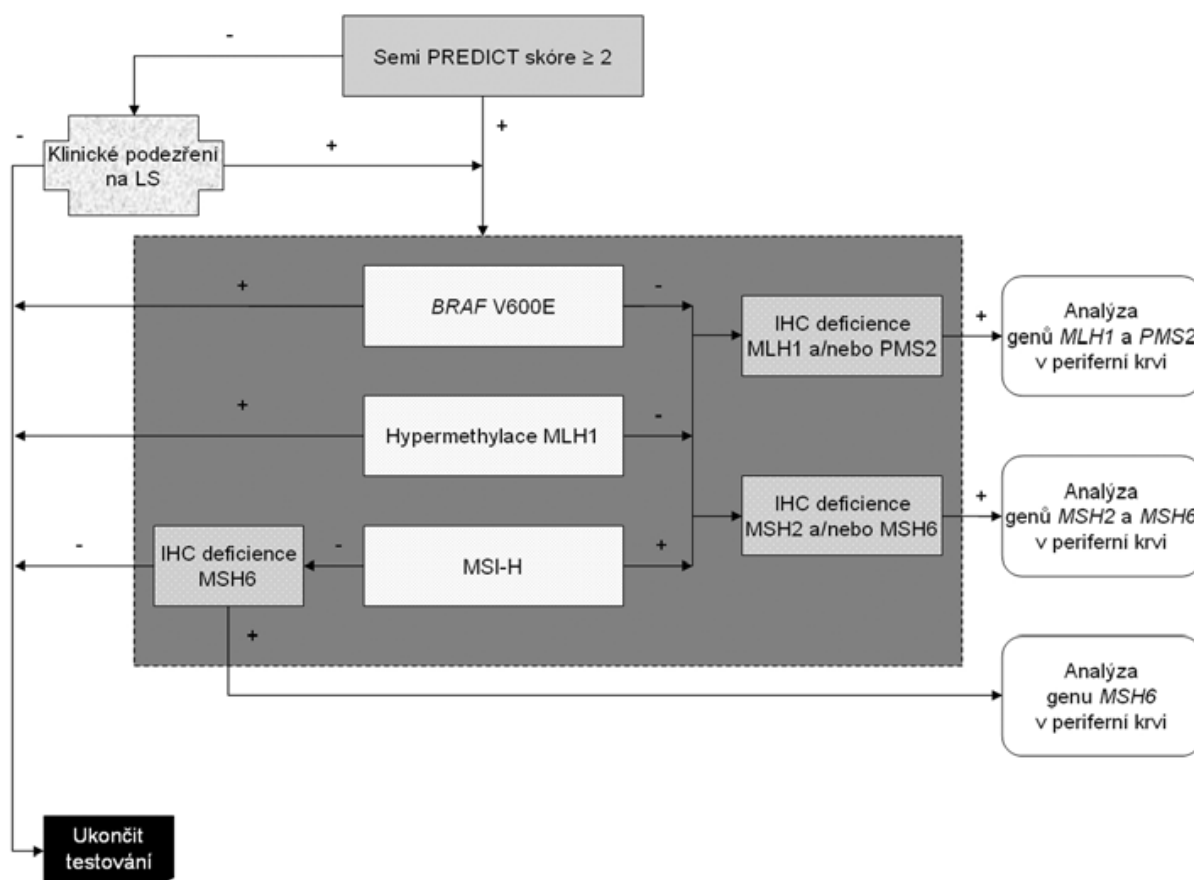
Běžná světelná mikroskopie může být nápomocna i v diferenciální diagnostice mezi sporadickým MSI-H karcinomem a MSI-H karcinomem při LS. Zatímco sporadické MSI-H karcinomy s metylací promotoru MLH1 vznikají z tzv. „sesilných serrated adenomů“ (do češtiny někdy nešťastně překládaných jako „přisedlé pilovité adenomy“), prekursorovou lézí karcinomů v terénu LS je „konvenční“ (tubulární, tubulovilózní nebo vilózní) adenom. Z toho lze odvodit, že najdeme-li v periférii tumoru zbytky prekursorového sesilného serrated adenomu, jde s největší pravděpodobností o sporadický MSI-H karcinom (56). Nicméně tento jednoduchý diagnostický znak vylučující LS nemusí být vždy dostupný, ať již z důvodu nedostatečného samplingu nebo destrukce adenomu pokročilým adenokarcinomem, což vyžaduje použití dalších metod k diferenciální diagnostice. V současné době umožňuje rozlišení sporadických a LS-asociovaných MSI-H karcinomů zapojení dvou metod molekulární patologie do managementu CRC. První z nich je analýza genu BRAF, konkrétně průkaz mutace V600E, která je přítomna až u poloviny sporadických MSI-H CRC, ale (téměř) nikdy u LS. Druhou metodu představuje průkaz hypermethylace promotoru MLH1, která je markerem sporadických MSI-H CRC a naopak až na výjimky nebývá přítomna u LS (57). S vědomím určitého statistického zjednodušení lze tedy tyto dvě metody využít k vyřazení pacientů z dalšího (nákladného) diagnostického managementu, pokud tomu nebrání jiné okolnosti (např. nízký věk, výrazné familiární postižení, multiplicita nádorů). Spíše teoretickou hodnotu má fakt, že MSI je přítomna již asi v polovině případů adenomů u LS, zatímco ve sporadických adenomech není prakticky nikdy, takže průkaz MSI v adenomu je celkem specifický pro LS.

### **4. Komplexní diagnostický management CRC**

Ke zvýšení zachytu LS využíváme v současné době diagnostický algoritmus, na jehož počátku stojí mikroskopické vyšetření histologických řezů obarvených hematoxylinem a eozinem, na něž v případě přítomnosti znaků „MSI-H histologie“ navazuje sada metod imunohistochemických a molekulárně patologických, jejichž cílem je potvrdit přítomnost MSI-H, vyloučit možnost sporadického MSI-H karcinomu a určit pravděpodobně postižený gen k detekci germinální mutace. Nádory, jejichž Semi PREDICT skóre vzbuzuje podezření na MSI-H, vykazují ztrátu exprese některého (nebo některých) z MMR proteinů, nemají hypermethylovaný promotor genu MLH1 a nebyla u nich prokázána substituce V600E genu BRAF, jsou určeny k detekci germinální mutace MMR genu určeného na základě imunohistochemického vyšetření. Celý algoritmus je znázorněn na obr. 5. Zatímco imunohistochemické vyšetření a analýza genu BRAF se běžně provádí v materiálu z parafinových bloků tumoru (ačkoli pro molekulárně genetickou analýzu by byla vhodnějším materiálem čerstvá nádorová tkáň, jejíž získání je však z logistických důvodů kromě specifických situací poměrně obtížné), analýza hypermethylace promotoru MLH1 a stanovení MSI vyžaduje srovnání s nenádorovou tkání. Tato sice bývá běžně dostupná v případě chirurgických resektátů (většinou jsou k tomuto účelu používány vzorky z chirurgických okrajů resektátu), většinou však není k dispozici při vyšetřování endoskopických biopsií. V těchto případech je nutná domluva se zainteresovaným gastroenterologem, aby zajistil kontrolní tkáň, ať už v podobě endoskopického vzorku z

nenádorové sliznice nebo nesrážlivé periferní krve. Pokud jde o finální analýzu MMR genů, zde je optimálním materiálem nesrážlivá periferní krev, protože průkaz mutace mimo nádorovou tkáň potvrzuje její germinální povahu, přičemž z důvodu technické náročnosti analýzy těchto genů je výtěžnost z krve výrazně vyšší než z nenádorové tkáně fixované ve formolu.

Ačkoli jsou možné i odlišné přístupy (např. primární plošné vyšetřování MSI u všech CRC), plnohodnotný postup by měl zahrnovat všechny uvedené diagnostické modalitty. Důvodem je jejich vzájemná komplementárnost. Kupříkladu samotné vyšetření MSI bez analýzy genu BRAF a stavu methylace promotoru MLH1 nedokáže odlišit sporadické CRC od syndromových, dále značná část karcinomů s mutací MSH6 nemusí vykazovat MSI-H, a konečně bez imunohistochemického vyšetření nelze zúžit spektrum MMR genů, jejichž stav má být analyzován.



**Obr. 5. Algoritmus diagnostiky Lynchova syndromu.** Na základě mikroskopického nálezu MSI-H histologie (nebo klinické žádosti) je proveden komplex vyšetření situovaný do tmavě šedého obdélníku, který sestává z imunohistochemického vyšetření exprese MMR proteinů, analýzy MSI, methylace promotoru MLH1 a stavu genu BRAF. Tyto metody jsou v současné době na našem pracovišti z časových důvodů prováděny simultánně. K dalšímu genetickému vyšetření germinálních mutací MMR genů jsou primárně vybráni pacienti s MSI-H tumory bez mutace BRAF a bez hypermethylace promotoru genu MLH1. Za zvláštních okolností (zejména při ztrátě imunoexpresí MSH6) je však vhodné testovat i MSS karcinomy (blíže viz text).

## PREZENTACE LYNCHOVA SYNDROMU MIMO KOLOREKTÁLNÍ KARCINOM

Ačkoli germinální mutace způsobující LS může být teoreticky zodpovědná za vznik maligního tumoru ve kterékoli lokalizaci (viz výše), zvláštní zřetel zasluhuje endometriální karcinom a syndromologické varianty LS. Endometriální karcinom je totiž u žen druhou nejčastější malignitou asociovanou s LS, přičemž riziko vzniku je podle literárních údajů 40 - 60 % (44,58,59). Odhaduje se, že 1,8% všech nově zjištěných karcinomů endometria je součástí LS, přičemž častěji než u typických případů LS je u nich zastoupena mutace MSH6 (24). S tím jde ruku v ruce nižší penetrance LS, která může zakrýt familiární



vazbu endometriálního karcinomu, prezentace ve vyšším věku než je pro LS typické, absence MSI-H a morfologických znaků svědčících pro LS. Z toho důvodu se jeví jako nutnost provádění imunohistochemického vyšetření exprese MMR proteinů u všech diagnostikovaných endometriálních karcinomů (60).

Ze syndromologických variant byl samostatně popsán Turcotův syndrom 1. typu, který (ačkoli použití internetového vyhledávače odhaluje v této oblasti značný terminologický chaos) je v našich podmínkách definován jako asociace CRC a nádoru mozku, zejména astrocytárního. Ačkoli je tento syndrom závažný z hlediska prognózy pacienta a může hrát i určitou diagnostickou roli, nelze jej významem srovnávat s MTS, který se vyznačuje přítomností sebaceozních kožních nádorů, které jsou snadno přístupné vyšetření, a představuje jedinou variantu LS s premorbidním fenotypem (1).

## **ZÁVĚR**

Lynchův syndrom (LS) je familiární karcinomový syndrom způsobený germinální mutací některého z genů, jehož proteinový produkt se účastní opravy chyb v DNA vzniklých při replikaci. Vzhledem k tomu, že výskyt LS v populaci se nyní odhaduje až na 5% a vede ke vzniku maligních nádorů již v produktivním věku, sílí v současné době tlak na zvýšení senzitivity jeho detekce. Protože klinický přístup k jeho záchytu se ukázal jako nedostatečně efektivní, klade se dnes stále větší důraz na morfologickou a molekulárně patologickou diagnostiku. Ta by měla představovat komplex vyšetření histologického, imunohistochemického a molekulárně biologického, byť vzájemné uspořádání jednotlivých komponent tohoto komplexu může být různé v závislosti na lokálních podmínkách. Podle našich zkušeností je nezbytné zavést jasný algoritmus, aby se diagnostika LS stala rutinní záležitostí a její management se co nejvíce zautomatizoval. Bohužel se dosud nepodařilo v našich podmínkách vytvořit spolehlivě fungující systém zpětné vazby s klinickými lékaři, kteří by měli organizovat další průběh vyšetření rodiny nemocného s LS. V nejbližších letech je tedy nezbytné zainteresovat do diagnostiky LS i klinické lékaře, bez jejichž aktivní účasti není možná ani kompletní diagnostika pacienta ani další vyšetření jeho rodinných příslušníků.

## **SEZNAM ZKRATEK**

**BG** - Bethesda guidelines

**CRC** - colorectal carcinoma, kolorektální karcinom

**EPCAM** - epithelial cell adhesion molecule

**FAP** - familiární adenomatózní polypóza

**HNPCC** - hereditary non-polyposis colorectal cancer, hereditární nepolypózní kolorektální karcinom

**LS** - Lynchův syndrom

**MLH1** - mut L homolog 1

**MMR** - mismatch repair

**MSH2** - mut S homolog 2

**MSH6** - mut S homolog 6

**MSI** - microsatellite instability, nestabilita mikrosatelitů

**MSI-H** - microsatellite instability – high, vysoký stupeň nestability mikrosatelitů

**MSS** - microsatellite stable, stabilní mikrosatelity

**MTS** - Muir – Torreho syndrom

**PMS2** - postmeiotic segregation increased 2

**RBG** - revidovaná Bethesda guidelines

## LITERATURA

1. Kacerovská D, Kazakov DV, Černá K, et al. Muir-Torre syndrom - fenotypická varianta Lynchova syndromu. *Cesk Patol* 2010; 46(4): 86-94.
2. Warthin AS. Heredity with reference to carcinoma: as shown by the study of the cases examined in the pathological laboratory of the University of Michigan, 1895-1913. *Arch Intern Med* 1913; 12(5): 546-555.
3. Lynch HT, Shaw MW, Magnuson CW, Larsen AL, Krush AJ. Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds. *Arch Intern Med* 1966; 117(2): 206-212.
4. Lynch HT, Krush AJ. Cancer family "G" revisited: 1895-1970. *Cancer* 1971; 27(6): 1505-1511.
5. Lynch HT, Drouhard TJ, Schuelke GS, et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer in a Navajo Indian family. *Cancer Genet Cytogenet* 1985; 15(3-4): 209-213.
6. Boland CR, Troncale FJ. Familial colonic cancer without antecedent polyposis. *Ann Intern Med* 1984; 100(5): 700-701.
7. Lindor NM, Rabe K, Petersen GM, et al. Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. *JAMA* 2005; 293(16): 1979-1985.
8. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993; 75(5): 1027-1038.
9. Leach FS, Nicolaidis NC, Papadopoulos N, et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993; 75(6): 1215-1225.
10. Peltomaki P, Lothe RA, Aaltonen LA, et al. Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res* 1993; 53(24): 5853-5855.
11. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260(5109): 816-819.
12. 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.
13. Yuen ST, Chan TL, Ho JW, et al. Germline, somatic and epigenetic events underlying mismatch repair deficiency in colorectal and HNPCC-related cancers. *Oncogene* 2002; 21(49): 7585-7592.
14. 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): 763-769.
15. Wijnen J, van der Klift H, Vasen H, et al. MSH2 genomic deletions are a frequent cause of HNPCC. *Nat Genet* 1998; 20(4): 326-328.
16. Gazzoli I, Loda M, Garber J, Syngal S, Kolodner RD. A hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma case associated with hypermethylation of the MLH1 gene in normal tissue and loss of heterozygosity of the unmethylated allele in the resulting microsatellite instability-high tumor. *Cancer Res* 2002; 62(14): 3925-3928.
17. Hitchins MP, Wong JJ, Suthers G, et al. Inheritance of a cancer-associated MLH1 germline epimutation. *N Engl J Med* 2007; 356(7): 697-705.
18. Ligtenberg MJ, Kuiper RP, Chan TL, et al. Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat Genet* 2009; 41(1): 112-117.

19. Kovacs ME, Papp J, Szentirmay Z, Otto S, Olah E. Deletions removing the last exon of TACSTD1 constitute a distinct class of mutations predisposing to Lynch syndrome. *Hum Mutat* 2009; 30(2): 197-203.
20. Kruse R, Rutten A, Hosseiny-Malayeri HR, et al. "Second hit" in sebaceous tumors from Muir-Torre patients with germline mutations in MSH2: allele loss is not the preferred mode of inactivation. *J Invest Dermatol* 2001; 116(3): 463-465.
21. Gallinger S, Aronson M, Shayan K, et al. Gastrointestinal cancers and neurofibromatosis type 1 features in children with a germline homozygous MLH1 mutation. *Gastroenterology* 2004; 126(2): 576-585.
22. Bandipalliam P. Syndrome of early onset colon cancers, hematologic malignancies & features of neurofibromatosis in HNPCC families with homozygous mismatch repair gene mutations. *Fam Cancer* 2005; 4(4): 323-333.
23. Kastrinos F, Stoffel EM, Balmana J, et al. Phenotype comparison of MLH1 and MSH2 mutation carriers in a cohort of 1,914 individuals undergoing clinical genetic testing in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17(8): 2044-2051.
24. Hampel H, Frankel W, Panescu J, et al. Screening for Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) among endometrial cancer patients. *Cancer Res* 2006; 66(15): 7810-7817.
25. Berends MJ, Wu Y, Sijmons RH, et al. Molecular and clinical characteristics of MSH6 variants: an analysis of 25 index carriers of a germline variant. *Am J Hum Genet* 2002; 70(1): 26-37.
26. 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(14): 4721-4727.
27. Hendriks YM, Jagmohan-Changur S, van der Klift HM, et al. Heterozygous mutations in PMS2 cause hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome). *Gastroenterology* 2006; 130(2): 312-322.
28. Truninger K, Menigatti M, Luz J, et al. Immunohistochemical analysis reveals high frequency of PMS2 defects in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2005; 128(5): 1160-1171.
29. Mathiak M, Rutten A, Mangold E, et al. Loss of DNA mismatch repair proteins in skin tumors from patients with Muir-Torre syndrome and MSH2 or MLH1 germline mutations: establishment of immunohistochemical analysis as a screening test. *Am J Surg Pathol* 2002; 26(3): 338-343.
30. Mangold E, Pagenstecher C, Leister M, et al. A genotype-phenotype correlation in HNPCC: strong predominance of msh2 mutations in 41 patients with Muir-Torre syndrome. *J Med Genet* 2004; 41(7): 567-572.
31. De Rosa M, Fasano C, Panariello L, et al. Evidence for a recessive inheritance of Turcot's syndrome caused by compound heterozygous mutations within the PMS2 gene. *Oncogene* 2000; 19(13): 1719-1723.
32. Kamory E, Kolacsek O, Otto S, Csuka O. hMLH1 and hMSH2 somatic inactivation mechanisms in sporadic colorectal cancer patients. *Pathol Oncol Res* 2003; 9(4): 236-241.
33. Entius MM, Keller JJ, Drillenburger P, et al. Microsatellite instability and expression of hMLH-1 and hMSH-2 in sebaceous gland carcinomas as markers for Muir-Torre syndrome. *Clin Cancer Res* 2000; 6(5): 1784-1789.
34. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991; 34(5): 424-425.

35. 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(6): 1453-1456.
36. 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(4): 261-268.
37. Hampel H, Frankel WL, Martin E, et al. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med* 2005; 352(18): 1851-1860.
38. Liu T, Yan H, Kuismanen S, et al. The role of hPMS1 and hPMS2 in predisposing to colorectal cancer. *Cancer Res* 2001; 61(21): 7798-7802.
39. van der Klift H, Wijnen J, Wagner A, et al. Molecular characterization of the spectrum of genomic deletions in the mismatch repair genes MSH2, MLH1, MSH6, and PMS2 responsible for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 44(2): 123-138.
40. Dovrat S, Figer A, Fidder HH, et al. Mutational analysis of hMsh6 in Israeli HNPCC and HNPCC-like families. *Fam Cancer* 2005; 4(4): 291-294.
41. Hegde MR, Chong B, Blazo ME, et al. A homozygous mutation in MSH6 causes Turcot syndrome. *Clin Cancer Res* 2005; 11(13): 4689-4693.
42. de la Chapelle A. The incidence of Lynch syndrome. *Fam Cancer* 2005; 4(3): 233-237.
43. Jenkins MA, Baglietto L, Dowty JG, et al. Cancer risks for mismatch repair gene mutation carriers: a population-based early onset case-family study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4(4): 489-498.
44. Quehenberger F, Vasen HF, van Houwelingen HC. Risk of colorectal and endometrial cancer for carriers of mutations of the hMLH1 and hMSH2 gene: correction for ascertainment. *J Med Genet* 2005; 42(6): 491-496.
45. Lynch HT, de la Chapelle A. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 1999; 36(11): 801-818.
46. Jass JR, Stewart SM. Evolution of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut* 1992; 33(6): 783-786.
47. Hyde A, Fontaine D, Stuckless S, et al. A histology-based model for predicting microsatellite instability in colorectal cancers. *Am J Surg Pathol* 2010; 34(12): 1820-1829.
48. Jenkins MA, Hayashi S, O'Shea AM, et al. Pathology features in Bethesda guidelines predict colorectal cancer microsatellite instability: a population-based study. *Gastroenterology* 2007; 133(1): 48-56.
49. Roman R, Verdu M, Calvo M, et al. Microsatellite instability of the colorectal carcinoma can be predicted in the conventional pathologic examination. A prospective multicentric study and the statistical analysis of 615 cases consolidate our previously proposed logistic regression model. *Virchows Arch* 2010; 456(5): 533-541.
50. Shia J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I. The utility of immunohistochemistry. *J Mol Diagn* 2008; 10(4): 293-300.
51. Shia J, Tang LH, Vakiani E, et al. Immunohistochemistry as first-line screening for detecting colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: a 2-antibody panel may be as predictive as a 4-antibody panel. *Am J Surg Pathol* 2009; 33(11): 1639-1645.
52. Barrow E, Jagger E, Brierley J, et al. Semiquantitative assessment of immunohistochemistry for mismatch repair proteins in Lynch syndrome. *Histopathology* 2010; 56(3): 331-344.

53. Funkhouser WK, Jr., Lubin IM, Monzon FA, et al. Relevance, pathogenesis, and testing algorithm for mismatch repair-defective colorectal carcinomas: a report of the association for molecular pathology. *J Mol Diagn* 2012; 14(2): 91-103.
54. Halvarsson B, Lindblom A, Rambech E, Lagerstedt K, Nilbert M. Microsatellite instability analysis and/or immunostaining for the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer? *Virchows Arch* 2004; 444(2): 135-141.
55. Boland CR, Koi M, Chang DK, Carethers JM. The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome: from bench to bedside. *Fam Cancer* 2008; 7(1): 41-52.
56. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007; 50(1): 113-130.
57. Domingo E, Laiho P, Ollikainen M, et al. BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. *J Med Genet* 2004; 41(9): 664-668.
58. Dunlop MG, Farrington SM, Carothers AD, et al. Cancer risk associated with germline DNA mismatch repair gene mutations. *Hum Mol Genet* 1997; 6(1): 105-110.
59. Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, et al. Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int J Cancer* 1999; 81(2): 214-218.
60. Clarke BA, Cooper K. Identifying Lynch syndrome in patients with endometrial carcinoma: shortcomings of morphologic and clinical schemas. *Adv Anat Pathol* 2012; 19(4): 231-238.

## 15.2 Moderní diagnostika Lynchova syndromu

*Gastroent Hepatol* 2014; 68(2): 157-165.

**B. Kokošková<sup>2</sup>, O. Daum<sup>1</sup>, Z. Beneš<sup>3</sup>, M. Dušek<sup>2</sup>, J. Stehlík<sup>2</sup>, K. Černá<sup>2</sup>, L. Hadravský<sup>1</sup>, M. Michal<sup>2</sup>. *Gastroent Hepatol* 2014; 68(2): 157-165**

<sup>1</sup> Šiklův ústav patologie, LF UK a FN Plzeň

<sup>2</sup> Bioptická laboratoř, s. r. o., Plzeň

<sup>3</sup> Interní oddělení Fakultní Thomayerovy nemocnice, Praha

### SOUHRN

Lynchův syndrom (dříve zvaný hereditární nepolypózní kolorektální karcinom - HNPCC) je nejčastější genetickou příčinou familiárního výskytu kolorektálního karcinomu. Příčinou je zárodečná mutace některého z MMR genů, které jsou zodpovědné za opravy chyb ve struktuře DNA vznikající při její replikaci. Tyto mutace způsobují dysfunkci opravného komplexu, která vede k rozvoji nestability mikrosatelitů (MSI) a ke vzniku a progresi nádorů, zejména kolorektálního karcinomu. V současné době se odhaduje, že až 5 % kolorektálních karcinomů vzniká v asociaci s Lynchovým syndromem. Vzhledem k této poměrně vysoké četnosti, absenci premorbidního fenotypu, familiárnímu výskytu a prezentaci maligních nádorů v produktivním věku je včasná diagnostika Lynchova syndromu důležitá nejen z etického, ale i ekonomického hlediska. Bohužel, Bethesda guidelines, natož Amsterdamská kritéria, nejsou dostatečně senzitivní. Vyšší senzitivitu vykazuje detekce morfologických znaků asociovaných s MSI při histologickém vyšetření vzorků kolorektálních karcinomů. Přibližně jedna pětina karcinomů s MSI je geneticky podmíněna Lynchovým syndromem, zbytek tvoří sporadické MSI-H karcinomy způsobené epigenetickou inaktivací MMR genu. K vyloučení těchto sporadických případů z dalšího testování slouží vyšetření genu BRAF a analýza metylace promotoru genu MLH1. Podezření na Lynchův syndrom vyplývající z výsledků výše uvedeného komplexu vyšetření by mělo být nakonec potvrzeno detekcí zárodečné mutace některého z MMR genů v periferní krvi pacienta s následným vyšetřením rodinných příslušníků pro zajištění účinné prevence.

**Klíčová slova:** kolorektální karcinom - Lynchův syndrom - HNPCC - nestabilita mikrosatelitů

### **Summary**

Lynch syndrome (formerly known as hereditary non-polyposis colorectal cancer - HNPCC) is the most common hereditary colorectal cancer syndrome. The syndrome is caused by a germline mutation of one of the mismatch repair (MMR) genes which are responsible for DNA replication error repair. Impaired function of the proteins encoded by these genes leads to microsatellite instability (MSI) and forms a suitable background for development and progression of tumours, mainly colorectal cancer. According to recent estimates up to 5% of all cases of colorectal cancer are associated with Lynch syndrome. Due to this relatively high frequency, familial occurrence, absence of premorbid phenotype and development of malignant tumors in productive age, correct diagnosis is important not only from the ethical but also the economical point of view. Unfortunately, clinical means of diagnostics of Lynch syndrome (like the Amsterdam criteria and Bethesda guidelines) lacks sensitivity. It was shown that predictive models based on histological signs of MSI are more sensitive than the clinical criteria used to detect patients with suspected Lynch syndrome. Of all MSI-H colorectal cancers, 1/5 is caused by Lynch syndrome, while the rest are sporadic cancers caused by epigenetic inactivation of an MMR gene. To rule out the sporadic cases, molecular genetic investigation of the BRÁFgene and methylation analysis of the MLH1 promoter is used in the diagnostic workup of Lynch syndrome. The suspicion of Lynch syndrome, based on the results of the complex of diagnostic methods mentioned above, should be proved by detection of a germline mutation of an MMR gene in peripheral blood, and followed by screening of family members, which is a necessary condition for efficient prevention.

**Key words:** colorectal cancer- Lynch syndrome - HNPCC - microsatellite instability

### **Lynchův syndrom - historie a současnost**

V současné době je Lynchův syndrom (LS) definován jako autozomálně dominantně dědičné onemocnění vytvářející predispozici ke vzniku maligních nádorů, jehož podkladem je zárodečná mutace některého z genů odpovědných za opravy replikačních chyb v DNA, tzv. mismatch repair (MMR) genů. Nejčastějším karcinomem vznikajícím při LS je kolorektální karcinom (CRC), je však zvýšené riziko vzniku i dalších malignit zejména karcinomů endometria, žaludku, tenkého střeva, ovaria, ledvinné pánvičky a močovodu, nádorů mozku a kůže. Navzdory svému názvu je první literární zpráva o LS obsažena v publikaci prof. Warthina z roku 1913, v níž je popsána „karcinomová rodina G“ (1). Obdobné pozorování rodinného výskytu kolorektálního karcinomu při absenci polypózy (2) přivedlo dr. Lynche k návratu ke „karcinomové rodině G“, aktualizaci informací a rozpoznání základních znaků tohoto syndromu, kterými jsou [3]:

1. zvýšená incidence adenokarcinomů, zejména kolorektálních a endometriálních,
2. zvýšené riziko multiplicity nádorů,
3. autozomálně dominantní dědičnost,
4. vznik karcinomů v mladším věku.

Onemocnění bylo zpočátku označováno jako „syndrom karcinomové rodiny“, později „hereditární nepolypózní kolorektální karcinom“ (HNPCC) (4). Zároveň se však začalo

synonymně používat označení „Lynchův syndrom“ (5). Z důvodu možnosti výskytu extrakolonických malignit se v současné době upouští od zavádějícího termínu HNPCC, přičemž označení „Lynchův syndrom“ se používá pro případy způsobené germinální mutací některého z MMR genů, zatímco pro případy splňující Amsterdamská kritéria, ale bez prokazatelné zárodečné mutace některého z MMR genů, se doporučuje termín „familiární kolorektální karcinom typu X“ (6). Na podkladě LS vzniká podle současných odhadů až 5% CRC. Důvodem, proč přesto stále zůstává ve stínu méně časté familiární adenomatózní polypózy (FAP, cca 1%) je, že tyto nádory nevznikají v terénu polypózy (definované jako > 100 polypů), což však neznamená, že nemohou být přítomny žádné polypy. Absence „premorbidního fenotypu“, tedy přítomnosti benigních změn, které by umožňovaly diagnostikovat tento syndrom ještě před vznikem maligního tumoru (jako je tomu třeba v případě FAP, neurofibromatózy 1. typu a dalších familiárních karcinomových syndromů) výrazně ztěžuje jeho včasnou klinickou diagnostiku. Výjimkou z tohoto pravidla je fenotypická varianta LS projevující se vznikem kožních sebaceózních nádorů, označovaná jako Muir-Torrehova syndrom (MTS) (7). V ostatních případech může být LS diagnostikován prakticky až při nálezů maligního tumoru, případně při genetickém vyšetření rodinných příslušníků již diagnostikovaného probanda.

## LYNCHŮV SYNDROM Z POHLEDU MOLEKULÁRNÍ GENETIKY

### MMR geny a MMR proteiny

Naprostá většina případů LS je způsobena zárodečnou mutací některého z genů odpovědných za opravy replikačních chyb v DNA (replication error repair, RER), které jsou označovány jako mismatch repair (MMR) geny (8,9). Fyziologicky se MMR proteiny kódované těmito geny spojují do funkčních komplexů, především v heterodimery MLH1-PMS2 a MSH2-MSH6 (příp. MSH2-MSH3). Zatímco druhý jmenovaný dimer se uplatňuje v rozpoznávání chyb (především nespárovaných nebo špatně spárovaných nukleotidů) v DNA, první heterodimer slouží k opravě těchto nalezených chyb. Inaktivace obou alel některého ze jmenovaných genů vede k dysfunkci celého komplexu a ke vzniku nádorů charakteristických vysokým stupněm tzv. nestability mikrosatelitů (10,11).

### Mikrosatelity a MSI

Mikrosatelity jsou úseky DNA tvořené několikanásobným opakováním jednoho až čtyř, vzácněji i více nukleotidů. Tyto krátké repetitivní sekvence se vyskytují v genomu poměrně hojně, přičemž délky jednotlivých mikrosatelitů (tedy počty opakování těchto sekvencí) jsou za normálních okolností v rámci jedince stejné, ale mohou se lišit mezi jednotlivci. Sekvence mikrosatelitů jsou snadno zranitelné při replikaci DNA, protože DNA polymeráza v oblasti repetice „sklouzává“ a v důsledku toho dochází ke vzniku delších či kratších úseků. Jestliže nedochází ke korekci těchto chyb, potom může délka mikrosatelitů v rámci jednoho jedince kolísat, což je stav označovaný jako nestabilita mikrosatelitů (microsatellite instability, MSI). MSI však není jednoznačně daným stavem, který by přímo způsoboval vznik nádorů. Jde spíše o semikvantitativní vyjádření genetického poškození DNA uvedeným mechanismem. Stanovení stupně MSI je tedy arbitrární a spočívá ve stanovení nestability mezinárodně kodifikovaných markerů, přičemž na základě počtu postižených markerů se rozlišují stavy (hlavně nádory) se stabilními mikrosatelity (microsatellite stable, MSS), s nízkým stupněm nestability (microsatellite instability - low, MSI-L) a s vysokým stupněm nestability mikrosatelitů (microsatellite instability - high, MSI-H) (12).

### **MMR geny a MSI-H tumory**

Tumory s MSI-H vznikají dvěma různými mechanismy, a to buď jako sporadické nádory vyvolané genetickými a/nebo epigenetickými změnami v somatické buňce, nebo jako familiárně se vyskytující nádory v rámci LS způsobené zárodečnou mutací některého z MMR genů. Ačkoli je mutovaná alela děděna autozomálně dominantně, k vlastnímu vzniku nádoru dochází až somatickou inaktivací druhé alely téhož genu, což je dáno tím, že MMR geny patří mezi typické tumor supresorové geny s recesivním charakterem účinku (13). Teprve tehdy, je-li u osob nesoucích jednu zárodečně mutovanou alelu MMR genu během jejich života inaktivována i alela druhá, dochází ke vzniku maligních tumorů. Příčinou této inaktivace může být somatická mutace v druhé alele genu, ztráta heterozygosity (LOH) nebo metylace promotoru, jak tomu bývá u genu MLH1 (14). Nejčastěji postiženými geny při LS jsou MLH1 a MSH2 (dohromady více než 80%) (15), dále následuje MSH6 (10%) a zbylé případy představují vzácná zárodečná postižení dalších MMR genů (PMS2, PMS1, MSH3, MLH3).

### **Vzácné příčiny Lynchova syndromu**

Ačkoli je LS obecně vnímán jako důsledek zárodečné mutace MMR genů, vzácně může vést ke stejné dysfunkci MMR proteinů, a tím i ke stejnému klinickému postižení, odlišný mechanismus, jehož neznalost může mít za následek diagnostické rozpaky. V případě genu MLH1 byly například popsány zárodečné hypermetylace promotoru vedoucí k jeho epigenetické inaktivaci (16,17). V nedávné době byly popsány i zárodečné delece 3' konce genu EPCAM (TACSTD1), které zase vedou k epigenetické inaktivaci MSH2 (18,19). Navíc dosud u řady mutací a polymorfizmů MMR genů nebyl objasněn jejich klinický význam.

### **Klinické a genetické varianty Lynchova syndromu**

Klinické projevy LS se mohou lišit podle postiženého genu, případně i podle konkrétního typu mutace. Například u nosičů zárodečné mutace MLH1 často bývá kolorektální karcinom jedinou diagnostikovanou malignitou na rozdíl od pacientů se zárodečnou mutací v MSH2, u nichž se častěji vyskytují i extrakolonické nádory (20). Mutace v MSH6 mají jednak nízkou penetranci, dále jsou šestkrát častěji asociovány s karcinomy endometria než s nádory kolorekta, a navíc jsou u těchto pacientů kolorektální karcinomy (v porovnání s LS způsobeným mutacemi jiných MMR genů) častěji levostranné. Důležité také je, že mutace v MSH6 nevedou vždy k MSI-H, pravděpodobně díky tvorbě alternativního heterodimeru MSH2-MSH3, což může ovlivnit jejich diagnostiku (21,22). Naopak mutace v PMS2 vedou většinou ke vzniku MSI-H tumorů a jsou asociovány jak s časným kolorektálním, tak endometriálním karcinomem, avšak ani zde penetrance není příliš vysoká (23-25). Nádory pacientů s LS a MTS jsou v 89%, resp. 70% MSI-H, na rozdíl od sporadických kolorektálních karcinomů, kde se MSI-H status vyskytuje pouze u 15% pacientů a v naprosté většině případů bývá asociován s hypermetylací promotoru genu MLH1, nikoli se somatickými mutacemi MMR genů (10,26,27). V některých případech je kombinace klinických znaků natolik výrazná, že dala vznik novým klinickým syndromům, které ve skutečnosti představují pouze varianty LS.

### **Muir-Torreho syndrom**

MTS zahrnuje kombinaci nejméně jednoho kožního nádoru se sebaceózní diferenciací a minimálně jednoho viscerálního tumoru. Byl to právě „otec“ LS Henry Lynch, kdo v roce 1981 poukázal na společnou možnou etiologii MTS a LS, poté co identifikoval pacienty s fenotypem MTS v rodině postižené LS (28). MTS jako varianta LS je unikátní v tom, že jako jediná představuje premorbidní fenotyp, tedy vykazuje znaky umožňující diagnózu LS



ještě před rozvojem CRC. Mezi kožní léze asociované s MTS patří sebaceózní adenom, sebaceom a extraokulární sebaceózní karcinom (naopak výskyt periokulárních sebaceózních tumorů je u MTS vzácný). Kožní tumory jsou většinou mnohočetné, ale byly popsány i případy solitárních lézí (29). Klinický obraz se neliší od jejich sporadických protějšků, které jsou statisticky častější. Ve většině případů se jedná o nenápadné papuly a noduly hladkého povrchu, nažloutlé či růžové barvy anebo zbarvení kůže, velikosti od několika mm do 5 cm. u sebaceózních karcinomů mohou léze dosahovat větších rozměrů, vyznačují se nepřesným ohraničením, rychlým růstem a možnou ulcerací jejich povrchu. Přítomna může být také hyperplazie mazových žlázek (30). Ta se jeví jako žlutobělavé papulky velikosti několika milimetrů, s typickou centrální vkleslinou. Obecně lze shrnout, že mnohočetné kožní nádory se sebaceózní diferenciací vyskytující se u jedinců před 50. rokem života nebo postihující tělní partie mimo obličej jsou silným indikátorem MTS (31). Podobně i mnohočetné keratoakantomy vznikající na místech chráněných před sluncem u mladých osob slouží jako vodítko pro správnou diagnózu. Tyto se nejprve manifestují jako narůžovělé noduly s rychlým růstem, později na vrcholu s rohovatěním, případně i ulcerací. Na vzniku MTS se podílí především zárodečné mutace v genech MLH1 a MSH2, přičemž mutace v genu MSH2 je převažující (32,33).

### **Turcotův syndrom 1. typu**

Turcotův syndrom (TS) je klasicky charakterizován společným výskytem nádorů mozku a CRC. Podtyp označovaný jako TS 1. typu je blíže specifikován vazbou mozkového nádoru (hlavně gliomu) s CRC bez polypózy, přičemž může být také způsoben zárodečnou mutací některého z MMR genů; mutace byly detekovány zejména v MLH1 a PMS2 (34). Za těchto podmínek se TS 1. typu jeví ve většině případů jako fenotypická varianta LS.

### **Syndrom konstitučního mismatch repair deficitu**

Syndrom konstitučního mismatch repair deficitu (constitutional mismatch repair deficiency, CMMRD) je velmi vzácně se vyskytující zárodečná bílelická mutace genů MMR. Vzhledem k tomu, že jde o onemocnění dědičně autozomálně recesivně, vyskytuje se zejména jako následek incestu. Tento stav je charakteristický vznikem CRC již v mladém věku, hematologickými malignitami a fenotypickým obrazem připomínajícím neurofibromatózu 1. typu, zejména skvrnami café-au-lait (35,36). Z diagnostického hlediska je také důležité, že imunohistochemicky stanovený deficit MMR proteinu má vyšší senzitivitu než vyšetření MSI (37). V některých pramenech se tento syndrom označuje jako Turcotův syndrom. Přestože je i v tomto případě přítomna koincidence mozkového nádoru s CRC, celková odlišnost fenotypového obrazu i genetického podkladu je jasným argumentem proti zaměňování těchto dvou syndromů.

### **Tradiční diagnostika Lynchova syndromu**

Ke klinické diagnostice HNPCC sloužila Amsterdamská kritéria (38), která byla pro zvýšení senzitivity, zejména s přihlédnutím k možnosti prezentace syndromu extrakolonickou malignitou (tzv. LS 2. typu), v roce 1998 revidována na Amsterdamská kritéria II (39).

Nicméně protože se postupně zlatým standardem diagnózy LS stávalo molekulárně genetické vyšetření, prioritou se stal záchyt co největšího množství pacientů pro toto vyšetření, nikoli samotná klinická diagnóza LS.

### **Bethesda guidelines**

K identifikaci pacientů s CRC, u kterých by měla být vyšetřena nestabilita mikrosatelitů (MSI), případně provedeno molekulárně genetické vyšetření, byla v roce 1996 vypracována a v roce 2002 revidována tzv. Bethesda guidelines (BG, resp. RBG), která berou v potaz nejen

klinická kritéria, ale i morfologické znaky tumoru (40). Bohužel ani tato širší kritéria nezachytí všechny případy LS (41), zejména v případě postižení MSH6 a PMS2 (24,42-45). podle současných odhadů není až 25% pacientů s LS zachyceno systémem kritérií RBG. Vzhledem k tomu, že falešná negativita v případě LS nemá za následek nerozpoznání tohoto syndromu pouze u vyšetřovaného pacienta, ale i u jeho případných příbuzných, nelze senzitivitu RBG pokládat za dostatečnou.

### **Moderní diagnostika Lynchova syndromu**

Výše uvedená nedostatečná senzitivita RBG, případně další klinická kritéria sloužící k záchytu pacientů s LS, je příčinou současné snahy o zavedení senzitivnějšího systému depistáže, byť i za cenu snížení specifity. V tomto případě je možné familiární tendence ke vzniku maligních nádorů ospravedlnit jak z hlediska etického, tak ekonomického.

Mezi hlavní argumenty pro zvýšení senzitivity systému depistáže patří fakt, že 1 ze 660 lidí je nositelem germinální mutace některého z MMR genů (46), riziko vzniku CRC u LS je 50-80% (47,48), dále že k progresi z adenomu do karcinomu pravděpodobně dochází během 2-3 let na rozdíl od 8-10 let u sporadických případů (49,50), a zejména že průměrný věk v době diagnózy je 45 let, tedy asi o 20 let méně než u sporadického CRC, navíc se zvýšeným rizikem synchronního a metachronního CRC (49).

V současné době jsou k dispozici tři základní senzitivní modely vyhledávání pacientů s podezřením na LS, přičemž každý z nich má své výhody a své nevýhody. Všechny tři mají společné, že detekují tumory s MSI-H, a to buď přímo (tedy molekulárně genetickým stanovením MSI), nebo zprostředkovaně. Do druhé skupiny patří jednak imunohistochemická detekce exprese MMR proteinů, jednak histologický průkaz morfologických znaků asociovaných s MSI. Nicméně čtyři z pěti MSI-H CRC jsou sporadické tumory způsobené somatickou epigenetickou inaktivací MMR genu (zdaleka nejčastěji metylací promotoru MLH1). Tyto sporadické nádory je třeba odlišit před nákladnou analýzou jednotlivých MMR genů. V současné době umožňuje rozlišení sporadických a LS-asociovaných MSI-H karcinomů zapojení dvou metod molekulární patologie do managementu CRC. První z nich je analýza genu BRAF, konkrétně průkaz mutace V600E, která je přítomna až u poloviny sporadických MSI-H CRC, ale (téměř) nikdy u LS. Druhou metodu představuje průkaz hypermetylace promotoru MLH1, která je markerem sporadických MSI-H CRC a naopak až na výjimky nebývá přítomna u LS (51). S vědomím určitého statistického zjednodušení lze tedy tyto dvě metody využít k vyřazení pacientů z dalšího (nákladného) diagnostického managementu, pokud tomu nebrání jiné okolnosti (např. nízký věk, výrazné familiární postižení, multiplicita nádorů).

### **Stanovení MSI**

Rozlišení tumorů na MSS, MSI-L a MSI-H na základě stanovení nestability mezinárodně kodifikovaných markerů se samozřejmě v diagnostice Lynchova syndromu využívalo již dříve, ale cíleně, nikoli plošně. Plošné využití stanovení MSI k depistáži Lynchova syndromu je založeno na vyšetření všech CRC touto metodou. Mezi nevýhody systému patří výrazný nárůst zátěže laboratoří molekulární genetiky, absence informace o postiženém genu a konečně i fakt, že (navzdory obecnému přesvědčení) ne všechny LS-asociované nádory musí vykazovat MSI-H. Praktické využití plošného vyšetřování MSI naráží též na nezbytnost porovnání stavu markerů ve tkáni nádoru s tkání nenádorovou. To vyžaduje buď přítomnost nenádorové tkáně v materiálu (např. chirurgický okraj střevního resektátu), nebo odběr periferní krve pacienta (zejména v případě endoskopicky získaných vzorků).

### **Imunohistochemická detekce MMR proteinů**

Zprostředkovanou informací o funkci MMR komplexu lze získat pomocí imunohistochemického vyšetření exprese hlavních MMR proteinů (tedy MLH1, PMS2, MSH2 a MSH6). Ačkoli zpočátku, kdy byla imunohistochemicky stanovována pouze exprese MLH1 a MSH2, bylo preferováno stanovení MSI, po zavedení protilátek proti jejich dvěma partnerům pro tvorbu heterodimerů (PMS2 a MSH6) je senzitivita imunohistochemického vyšetření a stanovení MSI srovnatelná (52). V současné době jsou obě metody (stanovení MSI a imunohistochemické vyšetření) vnímány jako komplementární, protože v kombinaci mají vyšší senzitivitu než při samostatném použití (53,54). Typickým příkladem přínosu imunohistochemie jsou případy s mutací MSH6, které mohou uniknout při detekci MSI pomocí PCR, protože MSH2 může také tvořit komplex s MSH3, a tím nemusí nutně vést ke stavu MSI-H (52,55). Imunohistochemická detekce MMR proteinů navíc (na rozdíl od stanovení MSI) umožňuje predikovat postižený gen pro molekulárně genetické vyšetření, což výrazně sníží náklady při následné detekci případné zárodečné mutace. Nicméně, názory na prioritu stanovení MSI nebo imunohistochemického vyšetření nejsou jednotné a různí autoři prosazují plošný screening pomocí MSI nebo pomocí imunohistochemie.

### **Detekce morfologických znaků MSI konvenční histologií**

Histologické vyšetření představuje finančně nejméně náročnou metodu plošné depistáže. Je založeno na detekci histologických znaků charakteristických pro CRC s vysokým stupněm nestability mikrosatelitů, tedy tzv. MSI-H histologii, která samotná má vyšší senzitivitu než souhrn zbývajících čtyř kritérií RBG (56). Ačkoli byly morfologické znaky pozorovatelné v MSI-H CRC popsány již v RBG (konkrétně byly uváděny karcinomy se špatnou diferenciací, karcinomy mucinózní, medulární nebo „z buněk pečetního prstenu“, přítomnost Crohn-like lymfoidních nodulů a tumor-infiltrujících lymfocytů (TIL)), nebyla dostatečně známa ani prediktivní hodnota jednotlivých znaků ani jejich reprodukovatelná kvantitativní definice, která by byla použitelná v rutinní praxi (40,57). Z různých studií jejichž cílem bylo nalézt racionální algoritmus detekce MSI-H karcinomů (58), se v současné době jako nejužitečnější jeví model Model PREDICT (Pathological Role in the Determination of Instability in Colorectal Tumors) (56), zejména ve své zjednodušené formě jako SemiPREDICT skóre (tab. 1). Histologickými znaky, na nichž je tento model založen, jsou: přítomnost mucinu dissekujícího stroma v jakémkoli množství, přítomnost tumor-infiltrujících lymfocytů (TIL), peritumorální lymfoidní lem a zastoupení plazmatických buněk mezi leukocyty ve stromatu převyšující 25% (obr. 1).

**Tab. 1.** Model PREDICT.

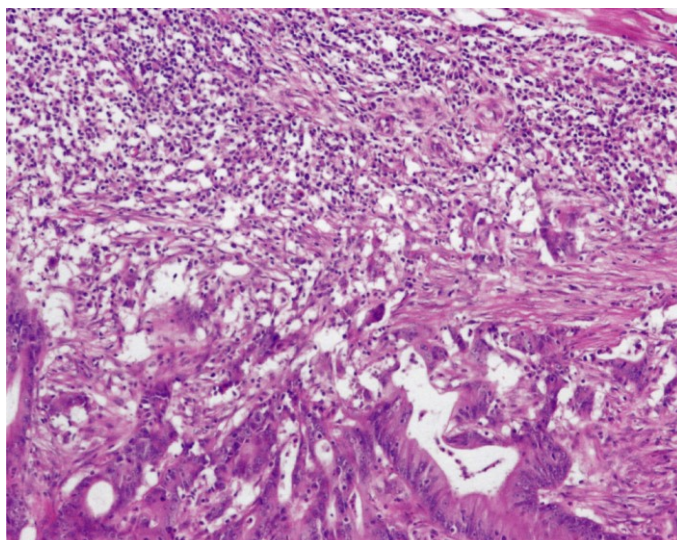
<b>Znak</b>	<b>Skóre</b>
pravostranná lokalizace	1,6
jakékoli množství dissekujícího mucinu	1,6
věk pod 50 let	1,3
tumor infiltrující lymfocyty	1,3
peritumorální lymfoidní lem	0,7
plazmocyty tvoří > 25% stromálních leukocytů	0,7

#### **PREDICT skóre:**

Maximální možné skóre: 7,8

Suspekce na MSI-H: skóre  $\geq 2,5$

**Semi PREDICT skóre:** přítomny dva a více znaků  $\rightarrow$  MSI-H susp.



**Obr. 1.** Příklad „MSI-H histologie“. Jeden z typických obrazů MSI-H CRC, zde představován zejména intraepiteliální lymfocytózou vytvářející v dolní části obrázku „posypání“ nádorových žlázek lymfocyty obklopenými světlými halo a souvislým lymfoidním lemem v horní části snímku (HE, původní objektiv 10x).

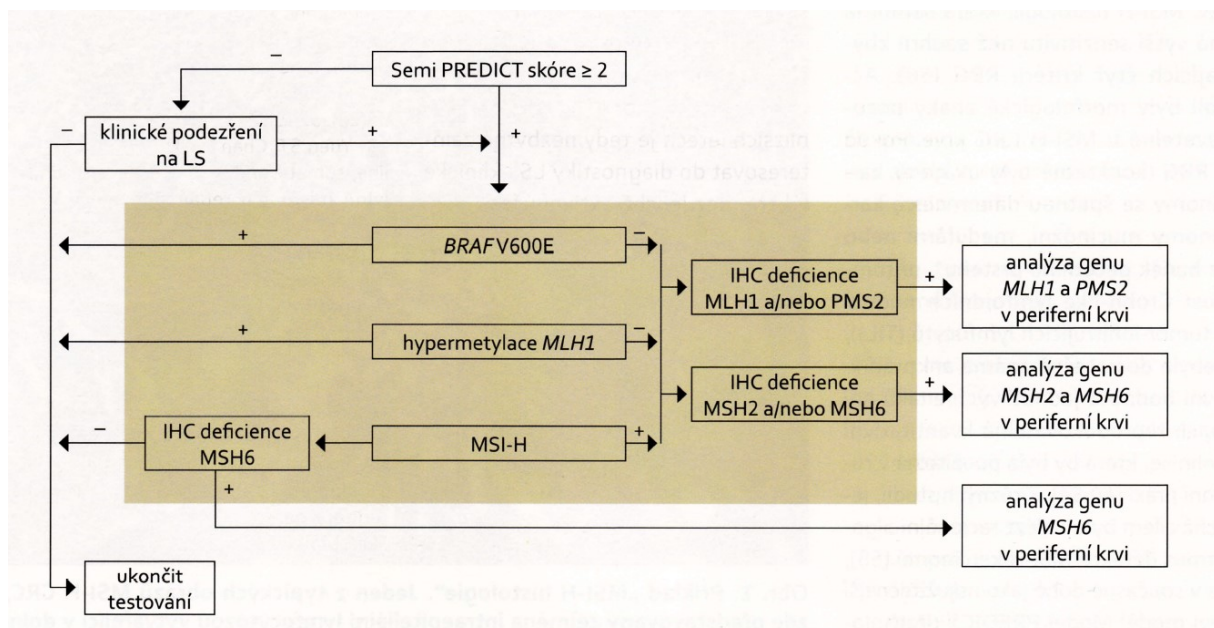
**Fig. 1.** Example of "MSI-H histology". One of the typical images of MSI-H CRC is represented in particular by intraepithelial lymphocytosis forming the "sprinkling" of cancer glandular cells with lymphocytes surrounded by bright halos at the bottom of the picture and continuous lymphoid band in the upper part of the image (HE, original lens 10x).

Mezi výhody histologického vyšetření patří i možnost levného, rychlého a jednoduchého vyloučení sporadických MSI-H karcinomů podmíněných většinou somatickou metylací promotoru genu MLH1. Zatímco tyto vznikají z tzv. „sesilných serrated adenomů“ (do češtiny někdy nešťastně překládaných jako „přisedlé pilovité adenomy“), prekurzorovou lézí karcinomů v terénu LS je „konvenční“ (tubulární, tubulovilózní nebo vilózní) adenom. Jsou-li tedy v periférii tumoru zbytky prekurzorového sesilního serrated adenomu, jde s největší pravděpodobností o sporadický MSI-H karcinom (59). Nicméně tento jednoduchý diagnostický znak vylučující LS nemusí být vždy dostupný, ať již z důvodu nedostatečného samplingu nebo destrukce adenomu pokročilým adenokarcinomem. Protože informace, kterou poskytuje histologické vyšetření o MSI, je značně zprostředkovaná, nemůže samozřejmě plnit roli samostatné metody depistáže. Pro svou finanční nenáročnost je však velmi vhodná jako první linie plošného vyšetřování CRC v rámci komplexního diagnostického managementu.

### **Komplexní diagnostický management CRC**

Efektivní algoritmus diagnostiky LS by měl být vysoce senzitivní, dostatečně specifický, (relativně) levný a logisticky jednoduchý. Z hlediska senzitivity a specificity se ukázalo zcela nedostatečným spoléhat se na klinická kritéria (zejména rodinnou anamnézu). Proto se současné postupy zaměřují na detekci MSI-H tumorů, a to buď přímo, zprostředkovaně pomocí imunohistochemie, nebo na základě histologického průkazu morfologických znaků specifických pro MSI-H karcinomy. Vzhledem k současným možnostem systému zdravotnictví a zvážení poměru ceny a užitku jsme na našem pracovišti místo plošného vyšetřování MSI či exprese MMR proteinů k vyhledávání pacientů s LS zavedli „komplexní diagnostický management“, na jehož počátku stojí mikroskopické vyšetření histologických řezů obarvených hematoxylinem a eozinem, na něž v případě přítomnosti znaků „MSI-H histologie“ navazuje sada metod imunohistochemických a molekulárně patologických, jejichž cílem je potvrdit přítomnost MSI-H, vyloučit možnost sporadického MSI-H karcinomu a určit pravděpodobně postižený, gen k detekci zárodečné mutace.

Nádory, jejichž Semi PREDICT skóre vzbuzuje podezření na MSI-H, vykazují ztrátu exprese některého (nebo některých) z MMR proteinů, nemají hypermetylovaný promotor genu MLH1 a nebyla u nich prokázána substituce V600E genu BRAF, jsou určeny k detekci germinální mutace MMR genu určeného na základě imunohistochemického vyšetření (obr. 2). Podobně jako již bylo uvedeno u vyšetování MSI, i stanovení hypermetylace promotoru MLH1 vyžaduje srovnání s nenádorovou tkání. Tato sice bývá běžně dostupná v případě chirurgických resektátů, většinou však není k dispozici při vyšetřování endoskopických biopsií. V těchto případech je nutná domluva se zainteresovaným gastroenterologem, aby zajistil kontrolní tkáň, ať už v podobě endoskopického vzorku z nenádorové sliznice nebo nesrážlivé periferní krve. Pokud jde o finální analýzu MMR genů, zde je optimálním materiálem nesrážlivá periferní krev, protože průkaz mutace mimo nádorovou tkáň potvrzuje její zárodečnou povahu, přemž z důvodu technické náročnosti analýzy těchto genů je výtěžnost z krve výrazně vyšší než z nenádorové tkáně fixované ve formolu.



**Obr. 2.** Komplexní management diagnostiky Lynchova syndromu. Na základě mikroskopického nálezu MSI-H histologie (nebo klinické žádosti) je proveden komplex vyšetření situovaný do hnědého obdélníku, který sestává z imunohistochemického vyšetření exprese MMR proteinů, analýzy MSI, metylace promotoru MLH1 a stavu genu BRAF. Tyto metody jsou v současné době na našem pracovišti z časových důvodů prováděny simultánně. K dalšímu genetickému vyšetření zárodečných mutací MMR genů jsou primárně vybráni pacienti s MSI-H tumory bez mutace BRAF a bez hypermetylace promotoru genu MLH1. Za zvláštních okolností (zejména při ztrátě imunoexpresy MSH6) je však vhodné testovat i MSS karcinomy (převzato z webu <http://www.lynych.cz>).

**Fig. 2.** Comprehensive management of Lynch syndrome diagnosis. Based on the microscopic finding of MSI-H histology (or clinical request), a complex of examinations is made (situated in the brown rectangle), which consist of immunohistochemical examination of the expression of MMR proteins, MSI analysis, methylation of the MLH1 promoter, and BRAF gene status. These methods are currently performed simultaneously in our department because of the time conditions. Further genetic testing of germ-line mutations of MMR genes is primarily made in patients with MSI-H tumors without BRAF mutations and without MLH1 gene promoter hypermethylation. Under special circumstances (especially the loss of MSH6 immunoreactivity) it is appropriate to test also MSS carcinoma (taken from website <http://www.lynych.cz>).

Ať už je konkrétní uspořádání tohoto algoritmu jakékoli, plnohodnotný postup by každopádně měl zahrnovat všechny uvedené diagnostické modalit. Důvodem je jejich vzájemná komplementárnost. Kupříkladu samotné vyšetření MSI bez analýzy genu BRAF a stavu metylace promotoru MLH1 nedokáže odlišit sporadické CRC od syndromových, dále značná

část karcinomů s mutací MSH6 nemusí vykazovat MSI-H a konečně bez imunohistochemického vyšetření nelze zúžit spektrum MMR genů, jejichž stav má být analyzován.

### **Závěr**

Lynchův syndrom (LS) je familiární karcinomový syndrom způsobený zárodečnou mutací některého z genů, jehož proteinový produkt se účastní opravy chyb v DNA vzniklých při replikaci. Vzhledem k tomu, že se nyní výskyt LS v populaci odhaduje až na 5% a vede ke vzniku maligních nádorů již v produktivním věku, sílí v současné době tlak na zvýšení senzitivity jeho detekce. Protože klinická kritéria jeho diagnostiky nedosahují dostatečné senzitivity, klade se dnes stále větší důraz na morfologickou a molekulárně patologickou diagnostiku. Podle našich zkušeností je nezbytné zavést jasný algoritmus, aby se diagnostika LS stala rutinní záležitostí a její management se co nejvíce zautomatizoval. Bohužel se dosud nepodařilo v našich podmínkách vytvořit spolehlivě fungující systém zpětné vazby s klinickými lékaři, kteří by měli organizovat další průběh vyšetření rodiny nemocného s LS. V nejbližších letech je tedy nezbytné zainteresovat do diagnostiky LS i klinické lékaře, bez jejichž aktivní účasti není možná ani kompletní diagnostika pacienta ani další vyšetření jeho rodinných příslušníků.

### **Literatura**

1. Warthin AS. Heredity with reference to carcinoma as shown by the study of the cases examined in the pathological laboratory of the University of Michigan 1895-1913. Arch Intern Med 1913;12(5):546-555.
2. Lynch HT, Shaw MW, Magnuson CW et al. Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds. Arch Intern Med 1966; 117(2): 206-212.
3. Lynch HT, Krush AJ. Cancer family "G" revisited: 1895-1970. Cancer 1971; 27(6): 1505-1511.
4. Lynch HT, Drouhard TJ, Schuelke GS et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer in a Navajo Indian family. Cancer Genet Cytogenet 1985; 15(3-4): 209-213.
5. Boland CR, Troncale FJ. Familial colonic cancer without antecedent polyposis. Ann Intern Med 1984;100(5): 700-701.
6. Lindor NM, Rabe K, Petersen GM et al. Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. JAMA 2005; 293(16):1979-1985.
7. Kacerovská D, Kazakov DV, Černá K et al. Muir-Torre syndrom - a phenotypic variant of Lynch syndrome. Cesk Patol 2010; 46(4): 86-94.
8. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. Cell 1993; 75(5): 1027-1038.
9. Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Cell 1993; 75(6): 1215-1225.
10. Peltomäki P, Lothe RA, Aaltonen LA et al. Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. Cancer Res 1993; 53(24): 5853-5855.
11. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. Science 1993; 260(5109): 816-819.
12. 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 .



13. Yuen ST, Chan TL, Ho JW et al. Germline, somatic and epigenetic events underlying mismatch repair deficiency in colorectal and HNPCC-related cancers. *Oncogene* 2002 ; 21(49): 7585-7592.
14. Kruse R, Rütten A, Hosseiny-Malayeri HR et al. "Second hit" in sebaceous tumors from Muir-Torre patients with germline mutations in MSH2: allele loss is not the preferred mode of inactivation. *J Invest Dermatol* 2001; 116(3): 463-465.
15. Nyström-Lahti M, Wu Y, Moisió 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): 763-769.
16. Gazzoli I, Loda M, Garber J et al. A hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma case associated with hypermethylation of the MLH1 gene in normal tissue and loss of heterozygosity of the unmethylated allele in the resulting microsatellite instability-high tumor. *Cancer Res* 2002; 62(14): 3925-3928.
17. Hitchins MP, Wong JJ, Suthers G et al. Inheritance of a cancer-associated MLH1 germline epimutation. *N Engl J Med* 2007; 356(7): 697-705.
18. Ligtenberg MJ, Kuiper RP, Chan TL et al. Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat Genet* 2009; 41(1): 112-117. doi: 10.1038/ng.283.
19. Kovacs ME, Papp J, Szentirmay Z et al. Deletions removing the last exon of TACSTD1 constitute a distinct class of mutations predisposing to Lynch syndrome. *Hum Mutat* 2009; 30(2): 197-203. doi:10.1002/humu.20942.
20. Kastrinos F, Stoffel EM, Balmana J et al. Phenotype comparison of MLH1 and MSH2 mutation carriers in a cohort of 1,914 individuals undergoing clinical genetic testing in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17(8): 2044-2051. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0301.
21. Hampel H, Frankel W, Panescu J et al. Screening for Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) among endometrial cancer patients. *Cancer Res* 2006; 66(15): 7810-7817.
22. Berends MJ, Wu Y, Sijmons RH et al. Molecular and clinical characteristics of MSH6 variants: an analysis of 25 index carriers of a germline variant. *Am J Hum Genet* 2002;70(1): 26-37.
23. 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(14): 4721-4727.
24. Hendriks YM, Jagmohan-Changur S, van der Klift HM et al. Heterozygous mutations in PMS2 cause hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome). *Gastroenterology* 2006; 130(2): 312-322.
25. Truninger K, Menigatti M, Luz J et al. Immunohistochemical analysis reveals high frequency of PMS2 defects in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2005; 128(5): 1160-1171.
26. Kámory E, Kolacsek O, Ottó S et al. HMLH1 and hMSH2 somatic inactivation mechanisms in sporadic colorectal cancer patients. *Pathol Oncol Res* 2003; 9(4): 236-241.
27. Entius MM, Keller JJ, Drillenburger P et al. Microsatellite instability and expression of hMLH-1 and hMSH-2 in sebaceous gland carcinomas as markers for Muir-Torre syndrome. *Clin Cancer Res* 2000; 6(5): 1784-1789.
28. Lynch HT, Fusaro RM, Roberts L et al. Muir-Torre syndrome in several members of a family with a variant of the Cancer Family Syndrome. *Br J Dermatol* 1985;113(3):295-301.
29. Graham R, McKee P, McGibbon D et al. Torre-Muir syndrome. An association with isolated sebaceous carcinoma. *Cancer* 1985; 55(12): 2868-2873.

30. Esche C, Kruse R, Lamberti C et al. Muir-Torre syndrome: clinical features and molecular genetic analysis. *Br J Dermatol* 1997;136(6): 913-917.
31. Schwartz RA, Torre DP. The Muir-Torre syndrome: a 25-year retrospect. *J Am Acad Dermatol* 1995; 33(1): 90-104.
32. Mathiak M, Rütten A, Mangold E et al. Loss of DNA mismatch repair proteins in skin tumors from patients with Muir-Torre syndrome and MSH2 or MLH1 germline mutations: establishment of immunohistochemical analysis as a screening test. *Am J Surg Pathol* 2002;26(3): 338-343.
33. Mangold E, Pagenstecher C, Leister M et al. A genotype-phenotype correlation in HNPCC: strong predominance of msh2 mutations in 41, patients with Muir-Torre syndrome. *J Med Genet* 2004; 41(7):567-572.
34. De Rosa M, Fasano C, Panariello L et al. Evidence for a recessive inheritance of Turcot's syndrome caused by compound heterozygous mutations within the PM52 gene. *Oncogene* 2000; 19(13): 1719-1723.
35. Gallinger S, Aronson M, Shayan K et al. Gastrointestinal cancers and neurofibromatosis type 1 features in children with a germline homozygous MLH1 mutation. *Gastroenterology* 2004; 126(2): 576-585.
36. Bandipalliam P. Syndrome of early onset colon cancers, hematologic malignancies & features of neurofibromatosis in HNPCC families with homozygous mismatch repair gene mutations. *Fam Cancer* 2005;4(4): 323-333.
37. Bakry D, Aronsoh M, Durno C et al. Genetic and clinical determinants of constitutional mismatch repair deficiency syndrome: Report from the constitutional mismatch repair deficiency consortium. *Eur J Cancer* 2014; 50(5): 987-996. doi:10.1016/j.ejca.2013.12.005.
38. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM et al. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991; 34(5) : 424-425.
39. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP et al. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999; 116(6): 1453-1456.
40. 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(4): 261-268.
41. Hampel H, Frankel WL, Martin E et al. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med* 2005; 352(18): 1851-1860.
42. Liu T, Yan H, Kuismanen S et al. The role of hPMS1 and hPMS2 in predisposing to colorectal cancer. *Cancer Res* 2001; 61(21): 7798-7802.
43. Van der Klift H, Wijnen J, Wagner A et al. Molecular characterization of the spectrum of genomic deletions in the mismatch repair genes MSH2, MLH1, MSH6, and PMS2 responsible for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 44(2): 123-138.
44. Dovrat S, Figer A, Fidder HH et al. Mutational analysis of hMsh6 in Israeli HNPCC and HNPCC-like families. *Fam Cancer* 2005; 4(4): 291-294.
45. Hegde MR, Chong B, Blazo ME et al. A homozygous mutation in MSH6 causes Turcot syndrome. *Clin Cancer Res* 2005; 11(13): 4689-4693.
46. De la Chapelle A. The incidence of Lynch syndrome. *Fam Cancer* 2005; 4(3): 233-237.
47. Jenkins MA, Baglietto L, Dowty JG et al. Cancer risks for mismatch repair gene mutation carriers: a population-based early onset case-family study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4(4): 489-498.
48. Quehenberger F, Vasen HF, van Houwelingen HC. Risk of colorectal and endometrial



- cancer for carriers of mutations of the hMLH1 and hMSH2 gene: correction for ascertainment. *J Med Genet* 2005; 42(6): 491-496.
49. Lynch HT, de la Chapelle A. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 1999; 36(11): 801-818.
50. Jass JR, Stewart SM. Evolution of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut* 1992; 33(6): 783-786.
51. Domingo E, Laiho P, Ollikainen M et al. BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. *J Med Genet* 2004; 41(9): 664-668.
52. Shia J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I. The utility of immunohistochemistry. *J Mol Diagn* 2008; 10(4): 293-300. doi:10.2353/jmoldx.2008.080031.
53. Funkhouser WK Jr, Lubin IM, Monzon FA et al. Relevance, pathogenesis, and testing algorithm for mismatch repair-defective colorectal carcinomas: a report of the association for molecular pathology. *J Mol Diagn* 2012; 14(2): 91-103. doi: 10.1016/j.jmoldx.2011.11.001.
54. Halvarsson B, Lindblom A, Rambech E et al. Microsatellite instability analysis and/or immunostaining for the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer? *Virchows Arch* 2004; 444(2): 135-141.
55. Boland CR, Koi M, Chang DK et al. The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome: from bench to bedside. *Fam Cancer* 2008; 7(1):41-52.
56. Hyde A, Fontaine D, Stuckless S et al. A histology-based model for predicting microsatellite instability in colorectal cancers. *Am J Surg Pathol* 2010; 3(12):1820-1829. doi: 10.1097/PAS.0b013e3181f6a912.
57. Jenkins MA, Hayashi S, O'Shea AM et al. Pathology features in Bethesda guidelines predict colorectal cancer microsatellite instability: a population-based study. *Gastroenterology* 2007; 133(1): 48-56.
58. Román R, Verdú M, Calvo M et al. Microsatellite instability of the colorectal carcinoma can be predicted in the conventional pathologic examination. A prospective multicentric study and the statistical analysis of 615 cases consolidate our previously proposed logistic regression model. *Virchows Arch* 2010; 456(5): 533-541. doi: 10.1007/s00428-010-0896-6.
59. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007; 50(1): 113-130.

### 15.3 Diagnóza Lynchova syndromu od patologa

*Klin Onkol.* 2016;29(3):180-6.

**Dušek M.<sup>1,2</sup>, Hadravský L.<sup>1</sup>, Černá K.<sup>2</sup>, Stehlík J.<sup>2</sup>, Švajdler M.<sup>1,2</sup>, Kokošková B.<sup>1,2</sup>, Dubová M.<sup>1</sup>, Michal M.<sup>1</sup>, Daum O.<sup>1,2</sup>. *Klin Onkol* 2016; 29(3): 1– 7.**

<sup>1</sup> Šiklův ústav patologie, LF UK a FN Plzeň

<sup>2</sup> Bioptická laboratoř, s. r. o., Plzeň

Tato práce byla realizována za podpory Interní grantové agentury MZ ČR (IGA MZ ČR) pod grantovým číslem IGA NT14227 a s přispěním SVV 260171/2015. Redakce časopisu *Klinická Onkologie* tomuto článku udělila cenu za nejlepší přehledovou práci publikovanou v roce 2016.

## Souhrn

Lynchův syndrom (dříve nazývaný hereditární nepolypózní kolorektální karcinom) je nejčastější genetickou příčinou familiárního výskytu kolorektálního karcinomu. Způsobuje jej zárodečná mutace některého z genů, které jsou zodpovědné za opravy chyb ve struktuře DNA vznikající při její replikaci. V důsledku toho dochází k dysfunkci opravného komplexu způsobující rozvoj nestability mikrosatelitů (MSI), která je asociována se zvýšením rizika vzniku nádorů, zejména kolorektálního karcinomu. V současné době se odhaduje, že až 5 % kolorektálních karcinomů vzniká v souvislosti s Lynchovým syndromem. Vzhledem k této poměrně vysoké četnosti, absenci premorbidního fenotypu, familiárnímu výskytu a prezentaci maligních nádorů v produktivním věku je včasná diagnostika Lynchova syndromu důležitá nejen z etického, ale i ekonomického hlediska. Klinická kritéria představovaná zejména revidovanými Bethesda guidelines, která byla navržena pro detekci pacientů vhodných ke genetickému vyšetření možnosti Lynchova syndromu, nejsou však dostatečně senzitivní. Vyšší senzitivity lze dosáhnout aplikací metod moderní patologie. Tato diagnostika je založena na přímém nebo nepřímém průkazu MSI. Mezi metody nepřímého průkazu MSI patří jednak detekce morfologických znaků asociovaných s MSI při histologickém vyšetření vzorků kolorektálních karcinomů, jednak imunohistochemické vyšetření exprese MMR proteinů, které navíc umožní i identifikaci dysfunkčního proteinu. K vyloučení sporadických MSI-H karcinomů způsobených somatickou epigenetickou inaktivací MMR genu z dalšího testování slouží hlavně vyšetření genu BRAF a analýza metylace promotoru genu MLH1. Podezření na Lynchův syndrom vyplývající z výsledků těchto vyšetření by mělo být nakonec potvrzeno detekcí zárodečné mutace některého z MMR genů v periferní krvi pacienta.

**Klíčová slova:** kolorektální karcinom – Lynchův syndrom – HNPCC – MSI – nestabilita mikrosatelitů

## Summary

Lynch syndrome (formerly known as hereditary non-polyposis colorectal cancer) is the most common hereditary colorectal cancer syndrome. The syndrome is caused by a germline mutation of one of the mismatch repair (MMR) genes responsible for DNA replication error repair. Impaired function of the proteins encoded by these genes leads to microsatellite instability (MSI), which is associated with increased incidence of neoplasms: mainly colorectal cancer. According to recent estimates, up to 5% of all colorectal cancers are associated with Lynch syndrome. Due to this relatively high frequency, familial occurrence, absence of premorbid phenotype, and development of malignant tumors at a reproductive age, a correct diagnosis is important not only from an ethical but also from an economical point of view. Unfortunately, clinical means of diagnosis, namely, the revised Bethesda guidelines designed to detect patients suitable for genetic testing for Lynch syndrome, lack sufficient sensitivity. The methods associated with modern pathology are more sensitive than the clinical criteria used to detect patients suspected of having Lynch syndrome. Pathological diagnostics are based on direct or indirect detection of MSI. Indirect methods include analysis of morphological signs associated with MSI in histological samples from colorectal carcinoma patients and immunohistochemical investigation of MMR protein expression. To rule out sporadic cases caused by epigenetic inactivation of an MMR gene, molecular genetic investigation of the BRAF gene and methylation analysis of the MLH1 promoter are performed during diagnostic workup. A suspicion of Lynch syndrome based on the results of the methods mentioned above should be proven by detection of a germline mutation in an MMR gene in peripheral blood leukocytes.

**Key words:** colorectal cancer – Lynch syndrome – HNPCC – MSI – microsatellite instability

### **Lynchův syndrom – definice**

Lynchův syndrom (LS) je autozomálně dominantně dědičné onemocnění vytvářející predispozici ke vzniku maligních nádorů, patří tedy mezi familiární karcinomové syndromy. Nejčastějším karcinomem vznikajícím při LS je kolorektální karcinom (colorectal cancer – CRC), je však zvýšené riziko vzniku i dalších malignit, zejména karcinomů endometria, tenkého střeva, ovaria, ledvinné pánvičky a močovodu, nádorů mozku a kůže. Na podkladě LS vzniká podle současných odhadů až 5 % CRC. Fakt, že je dosud do značné míry přehlížen, zejména v porovnání s méně častou familiární adenomatózní polypózou (FAP), která je zodpovědná pouze za 1 % CRC, je způsoben tím, že karcinomy při LS nevznikají v terénu polypózy (definované jako > 100 polypů), což však neznamená, že nemohou být přítomny žádné polypy. Absence polypózy nebo jiného premorbidního fenotypu, tedy benigních změn, které by umožňovaly diagnostikovat tento syndrom ještě před vznikem maligního tumoru (jako je tomu třeba v případě FAP nebo neurofibromatózy 1. typu) výrazně ztěžuje jeho včasnou klinickou diagnostiku. Na rozdíl od familiárních karcinomových syndromů s premorbidním fenotypem tak může být LS diagnostikován prakticky až při nálezů maligního tumoru, případně při genetickém vyšetření rodinných příslušníků již diagnostikovaného probanda. Výjimkou z tohoto pravidla je fenotypická varianta LS projevující se vznikem kožních sebaceózních nádorů, označovaná jako Muir-Torrehův syndrom (MTS) (1). Základní klinické charakteristiky syndromu karcinomové rodiny byly definovány dr. Lynchem takto (2):

1. zvýšená incidence adenokarcinomů, zejména kolorektálních a endometriálních,
2. zvýšené riziko multiplicity nádorů,
3. autozomálně dominantní dědičnost,
4. vznik karcinomů v mladším věku.

Ačkoli byl LS dlouhou dobu znám spíše pod pojmem hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (hereditary non-polyposis colorectal cancer – HNPCC) (3), v současné době se od tohoto označení upouští a preferuje se eponymon Lynchův syndrom, a to jednak z důvodu možnosti výskytu extrakolonických malignit, jednak kvůli příliš zakořeněné asociaci diagnózy HNPCC s Amsterdamskými kritérii, která je ve světle dnešních poznatků již neudržitelná, a konečně i jako vyjádření úcty otci Lynchova syndromu. V současnosti je tedy diagnóza LS založena především na molekulárně genetickém vyšetření (viz následující kapitola), přičemž pro případy splňující Amsterdamská kritéria, ale bez prokazatelného genetického poškození definujícího LS, se doporučuje termín familiární kolorektální karcinom typu X (4).

### **Molekulární biologie LS**

Detailně je molekulárně biologický podklad LS popsán v textu určeném primárně patologům (5), pro pochopení dále uvedených diagnostických algoritmů je zde však třeba alespoň stručně vysvětlit základní pojmy.

### **MMR (mismatch repair)**

MMR (neboli mismatch repair) proteiny jsou odpovědné za opravy v DNA vznikajících při replikaci (replication error repair – RER). Nejdůležitější z nich se spojují do funkčních heterodimerů MLH1-PMS2 a MSH2-MSH6. Naprostá většina případů LS je způsobena zárodečnou mutací genů kódujících tyto proteiny, tedy tzv. mismatch repair (MMR) genů (6,7). Inaktivace obou alel některého z MMR genů vede k dysfunkci celého komplexu a ke vzniku tzv. MSI-H tumorů, tedy nádorů charakteristických vysokým stupněm tzv. nestability mikrosatelitů (microsatellite instability – MSI) (8,9).

## **Mikrosatelity**

Mikrosatelity jsou v genomu hojně se vyskytující úseky DNA tvořené několikanásobným opakováním jednoho až čtyř, vzácněji i více nukleotidů. Tyto krátké repetitivní sekvence jsou snadno zranitelné při replikaci DNA, protože DNA polymeráza v oblasti repetice „sklouzává“ a v důsledku toho dochází ke vzniku delších či kratších úseků. Ve „zdravé“ buňce s funkčním MMR systémem jsou však tyto alterace ihned detekovány a opraveny.

## **MSI**

Délky jednotlivých mikrosatelitů (tedy počty opakování těchto sekvencí) jsou u zdravých jedinců ve všech buňkách stejné (mezi jedinci se však liší). Pokud ovšem nedochází ke korekci chyb vznikajících při replikaci, potom může délka mikrosatelitů v rámci jednoho jedince kolísat, což je stav označovaný jako nestabilita mikrosatelitů (MSI). MSI není však jednoznačně daným stavem, který by přímo způsoboval vznik nádorů. Jde spíše o semikvantitativní vyjádření genetického poškození DNA uvedeným mechanismem. Stanovení stupně MSI je tedy arbitrární a spočívá ve stanovení nestability mezinárodně kodifikovaných markerů, přičemž na základě počtu postižených markerů se rozlišují stavy (hlavně nádory) se stabilními mikrosatelity (microsatellite stable – MSS), s nízkým stupněm nestability (microsatellite instability, low – MSI-L) a s vysokým stupněm nestability mikrosatelitů (microsatellite instability, high – MSI-H) (10).

## **MSI-H tumory**

Tumory s MSI-H vznikají dvěma různými mechanismy, a to buď jako sporadické nádory vyvolané genetickými a/nebo epigenetickými změnami v somatické buňce, nebo jako familiárně se vyskytující nádory v rámci LS způsobené zárodečnou mutací některého z MMR genů. Teprve tehdy, je-li u osob nesoucích jednu zárodečně mutovanou alelu MMR genu během jejich života inaktivována i alela druhá, dochází ke vzniku maligních tumorů. Příčinou této inaktivace může být somatická mutace v druhé alele genu, ztráta heterozygoty (LOH) nebo metylace promotoru, jak tomu bývá u genu MLH1 (11).

Nejčastěji postiženými geny při LS jsou MLH1 a MSH2 (dohromady více než 80 %) (12), dále následuje MSH6 (10 %), a zbylé případy představují vzácná zárodečná postižení dalších MMR genů (PMS2, PMS1, MSH3, MLH3). Vzácně mohou dysfunkci MMR proteinů a tím pádem i LS způsobovat komplikovanější mechanismy, jako zárodečná hypermetylace promotoru genu MLH1 vedoucí k jeho epigenetické inaktivaci (13,14) nebo zárodečné delece 3' konce genu EPCAM (TACSTD1), které zase vedou k epigenetické inaktivaci MSH2 (15,16).

## **Variabilita klinických projevů LS**

Klasický typ LS se prezentuje především CRC vznikajícím v tlustém střevě bez polypózy (tedy hereditárním nepolypózním CRC). Mohou však být přítomny i extrakolonické malignity, a to relativně častěji u pacientů se zárodečnou mutací v MSH2 než MLH1 (17).

Mutace v MSH6 jsou zodpovědné za poněkud atypické prezentace LS, neboť mají jednak nízkou penetranci, dále jsou 6 krát častěji asociovány s karcinomy endometria než s nádory kolorekta, a navíc jsou u těchto pacientů CRC (v porovnání s LS způsobeným mutacemi jiných MMR genů) častěji levostranné. Důležité také je, že mutace v MSH6 nevedou vždy k MSI-H, pravděpodobně díky tvorbě alternativního heterodimeru MSH2-MSH3, což může negativně ovlivnit jejich diagnostiku (18,19). V některých případech je kombinace klinických znaků natolik výrazná, že dala vznik novým klinickým syndromům, které ve skutečnosti představují pouze varianty LS.

### **Muir-Torreho syndrom**

MTS zahrnuje kombinaci nejméně jednoho kožního nádoru se sebaceózní diferenciací a minimálně jednoho viscerálního tumoru. Již v roce 1981 dr. Henry Lynch poukázal na společnou možnou etiologii MTS a LS, když identifikoval pacienty s fenotypem MTS v rodině postižené LS (20). MTS jako varianta LS je unikátní v tom, že jako jediná představuje premorbidní fenotyp, tedy vykazuje znaky umožňující diagnózu LS ještě před rozvojem CRC. Kožní léze asociované s MTS jsou detailně popsány v textech určených primárně patologům (1) a gastroenterologům (21), obecně lze shrnout, že mnohočetné kožní nádory se sebaceózní diferenciací vyskytující se u jedinců před 50. rokem života nebo postihující tělní partie mimo obličej jsou silným indikátorem MTS (22).

### **Turcotův syndrom 1. typu**

Turcotův syndrom (TS) je klasicky charakterizován společným výskytem nádorů mozku a CRC. Podtyp označovaný jako TS 1. typu je blíže specifikován vazbou mozkového nádoru (hlavně gliomu) s CRC bez polypózy, přičemž může být také způsoben zárodečnou mutací některého z MMR genů, mutace byly detekovány zejména v MLH1 a PMS2 (23). Za těchto podmínek se TS 1. typu jeví ve většině případů jako fenotypická varianta LS, zejména u dětských a mladistvých pacientů pak ještě spíše bývá součástí syndromu bialelického mismatch repair deficitu.

### **Syndrom bialelického mismatch repair deficitu**

Syndrom bialelického mismatch repair deficitu (biallelic mismatch repair deficiency – BMMR-D, také constitutional mismatch repair deficiency – CMMRD) je velmi vzácně se vyskytující zárodečná bialelická mutace genů MMR. Vzhledem k tomu, že jde o onemocnění dědičné autozomálně recesivně, vyskytuje se zejména jako následek incestu. Tento stav je charakteristický fenotypickým obrazem připomínajícím neurofibromatózu 1. typu, zejména skvrnami café-au-lait, vznikem CRC již v mladém věku (průměrný věk v době diagnózy 16 let), mozgovými nádory, především glioblastomy vznikajícími již v prvních dvou dekádách života, a hematologickými malignitami (hlavně T lymfomy) (24,25). Z diagnostického hlediska je důležité, že imunohistochemicky stanovený deficit MMR proteinu má vyšší senzitivitu než vyšetření MSI (26), přičemž tento imunohistochemický test lze provést i v nenádorové tkáni, např. v kožní biopsii (27).

### **Možnosti diagnostiky LS**

#### **Tradiční klinická diagnostika LS**

Ke klinické diagnostice HNPCC primárně sloužila Amsterdamská kritéria (28), která byla pro zvýšení senzitivity, zejména s přihlédnutím k možnosti prezentace syndromu extrakolonickou malignitou, v roce 1998 revidována na Amsterdamská kritéria II (29). Ale protože se zlatým standardem diagnózy LS stalo molekulárně genetické vyšetření, v popředí zájmu se ocitl záchyt co největšího množství pacientů pro toto vyšetření, nikoli samotná klinická diagnóza LS.

K identifikaci pacientů s CRC, u kterých by měla být vyšetřena nestabilita mikrosatelitů (MSI), případně provedeno molekulárně genetické vyšetření, byla v roce 1996 vypracována a v roce 2002 revidována tzv. Bethesda guidelines (BG, resp. RBG), která berou v potaz nejen klinická kritéria, ale (v případě RBG) i morfologické znaky tumoru (30). Bohužel ani tato širší kritéria nezachytí všechny případy LS (31), zejména v případě postižení MSH6 a PMS2 (32–36). Podle současných odhadů až 25 % pacientů s LS není zachyceno systémem kritérií RBG. Jednou z velkých slabin jak Amsterdamských kritérií, tak (R)BG je důraz na údaje

získané rodinou anamnézou, které mohou trpět značnými nedostatky, ať už kvůli nedostatečné informovanosti pacienta, nezájmu vyšetřujícího lékaře, časté nejistotě ohledně biologického otcovství nebo i nízké penetranční zárodečné mutace (zejména v případě genu MSH6).

### **Moderní patologická diagnostika LS**

Mezi hlavní argumenty pro současné snahy o zavedení senzitivnějšího systému depistáže, byť i za cenu snížení specifity, které je v tomto případě možné familiární tendence ke vzniku maligních nádorů ospravedlnitelné jak z hlediska etického, tak ekonomického, patří tato fakta:

1. falešná negativita v případě LS nemá za následek nerozpoznání tohoto syndromu pouze u vyšetřovaného pacienta, ale i u jeho případných příbuzných;
2. přibližně 1 ze 660 lidí je nositelem germinální mutace některého z MMR genů (37);
3. riziko vzniku CRC u LS je 60–80 % (38,39);
4. k progresi z adenomu do karcinomu pravděpodobně dochází během 2–3 let, na rozdíl od 8–10 let u sporadických případů (40,41);
5. průměrný věk v době diagnózy je 45 let, tedy asi o 20 let méně než u sporadického CRC, navíc se zvýšeným rizikem synchronního a metachronního CRC (40).

V současné době jsou k dispozici tři základní modely vyhledávání pacientů s podezřením na LS, přičemž všechny mají společné, že detekují MSI-H tumory, a to buď přímo (tedy molekulárně genetickým stanovením MSI), nebo zprostředkovaně. Do této druhé skupiny patří jednak imunohistochemická detekce MMR proteinů, jednak histologický průkaz morfologických znaků asociovaných s MSI. V každém z modelů diagnostikujících MSI-H tumory je ale nutné před samotnou finančně nákladnou detekcí germinálních mutací MMR genů vyloučit možnost sporadických forem, protože čtyři z pěti MSI-H CRC jsou sporadické nádory způsobené zdaleka nejčastěji metylací promotoru MLH1. V současné době umožňuje rozlišení sporadických a LS asociovaných MSI-H karcinomů hlavně zapojení dvou metod molekulární patologie do managementu CRC. První z nich je analýza genu BRAF, konkrétně průkaz substituce V600E, která je přítomna až u 1/2 sporadických MSI-H CRC, ale (téměř) nikdy u LS. Mutovaný protein navíc může být v nádoru prokázán i monoklonální protilátkou (42). Druhou metodu představuje průkaz hypermetylace promotoru MLH1, která je markerem sporadických MSI-H CRC, a naopak až na výjimky nebývá přítomna u LS (43). Nověji je také k dispozici protilátka proti annexinu A10 umožňující odlišit sporadické MSI-H karcinomy od LS (44).

### **1. Stanovení MSI**

Rozlišení tumorů na MSS, MSI-L a MSI-H na základě stanovení nestability mezinárodně kodifikovaných markerů se samozřejmě v diagnostice LS využívalo již dříve, ale cíleně, u pacientů splňujících BG (resp. RBG). Některé laboratoře zavedly plošné vyšetření všech CRC touto metodou k depistáži LS. Mezi nevýhody tohoto systému patří výrazný nárůst zátěže laboratoří molekulární genetiky, absence informace o tom, který z MMR genů je postižen, a konečně i fakt, že (navzdory obecnému přesvědčení) ne všechny LS asociované nádory musí vykazovat MSI-H (zejména jde o pacienty s germinální mutací genu MSH6). Praktické využití plošného vyšetřování MSI naráží též na nezbytnost porovnání stavu markerů ve tkáni nádoru s nenádorovou tkání. To vyžaduje buď přítomnost nenádorové tkáně v materiálu (např. chirurgický okraj střevního resektátu), nebo odběr periferní krve pacienta (zejména v případě endoskopicky získaných vzorků).

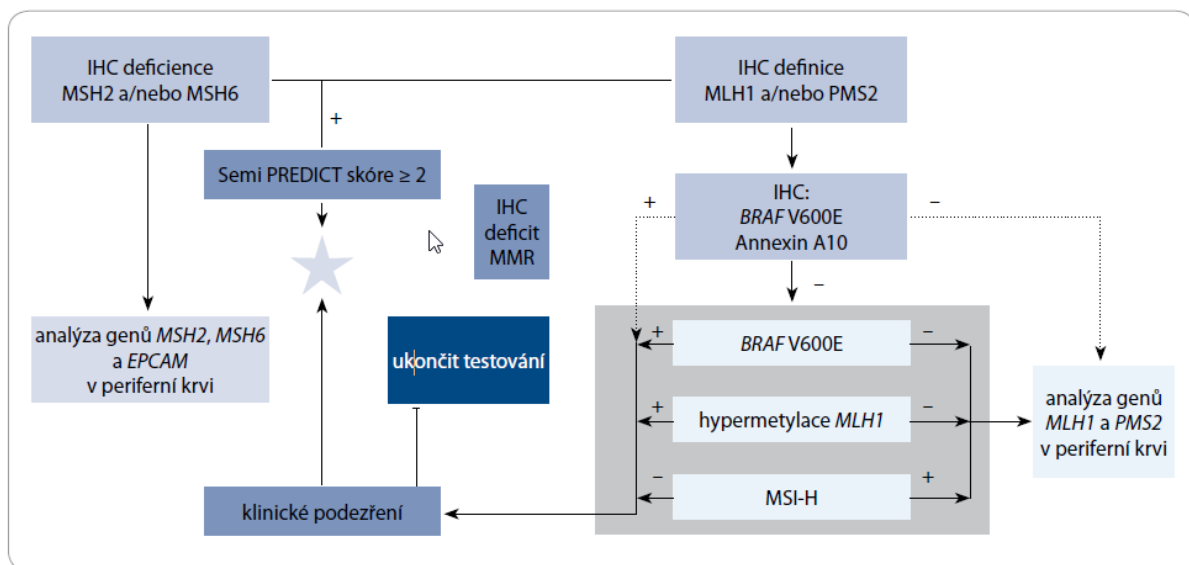
### **2. Imunohistochemická detekce MMR proteinů**

Na našem pracovišti používáme jako vstupní vyšetření pro zařazení pacienta do diagnostického managementu LS imunohistochemické vyšetření exprese hlavních MMR

proteinů (tedy MLH1, PMS2, MSH2 a MSH6) u všech CRC a karcinomů endometria. Senzitivita imunohistochemického vyšetření MMR proteinů a stanovení MSI je srovnatelná (45). V současné době jsou obě metody (stanovení MSI a imunohistochemické vyšetření) vnímány jako komplementární, protože v kombinaci mají vyšší senzitivitu než při samostatném použití (46,47). Také Jeruzalemská kritéria, podle nichž by měly být imunohistochemicky vyšetřeny všechny CRC u pacientů mladších 70 let, považují imunohistochemii za vhodnou vstupní diagnostickou metodu (48). Argumenty pro upřednostnění imunohistochemického vyšetření jako iniciální diagnostické metody jsou tyto:

1. vyšší záchyt případů s mutací MSH6, které mohou uniknout při detekci MSI pomocí PCR, protože MSH2 může také tvořit komplex s MSH3 a tím pádem nemusí nutně vést ke stavu MSI-H (45,49);
2. imunohistochemická detekce MMR proteinů, na rozdíl od stanovení MSI, umožňuje určit postižený gen pro molekulárně genetické vyšetření, což výrazně sníží náklady při následné detekci případné zárodečné mutace;
3. při iniciálním vyšetření není zapotřebí kontrolní nenádorová tkáň;
4. imunohistochemické vyšetření odhalí i případy BMMR-D, které se často neprojeví nestabilitou mikrosatelitů.

Další kroky diagnostického managementu založeného na iniciální imunohistochemické detekci MMR proteinů demonstruje schéma 1.



**Schéma 1.** Management diagnostiky LS.

Na pracovištích vyššího typu zapojených do depistáže LS diagnostika začíná vyšetřením všech CRC monoklonálními protilátkami proti jednotlivým MMR proteinům (hvězda). V případě průkazu deficecí MSH2 a/nebo MSH6 je kontaktován klinik s požadavkem na zaslání nesrážlivé periferní krve spolu s informovaným souhlasem pacienta k molekulárně genetickému vyšetření zárodečných mutací příslušných genů. Je-li prokázána deficecí proteinů MLH1 a/nebo PMS2, následuje komplex vyšetření obsažený v šedém obdélníku, jehož cílem je vyloučit z dalšího vyšetřování případy sporadických MSI-H karcinomů, případně MSS karcinomy s falešnou negativitou IHC průkazu MMR proteinů. Volitelně lze místo těchto molekulárně genetických metod (nebo spolu s nimi) k vyloučení sporadického MSI-H karcinomu využít IHC vyšetření exprese annexinu A10 a/nebo mutované formy proteinu BRAF (bílý obdelník a přerušované šipky). Pouze MSI-H tumory bez mutace genu BRAF, hypermetylace promotoru MLH1 a případně bez exprese annexinu A10 jsou indikovány k molekulárně genetickému vyšetření zárodečných mutací příslušných genů (opět

je nutné získat vzorek periferní krve a informovaný souhlas). Není-li místní pracoviště patologie vybaveno laboratoří disponující možností imunohistochemických a molekulárně genetických vyšetření uvedených výše, měl by patolog provést histologické vyšetření znaků „MSI-H histologie“ podle modelu PREDICT. V případě suspektního Semi PREDICT skóre pak odeslat vzorek karcinomu (a optimálně i nenádorové tkáně pro možnost komparace) na specializované pracoviště provádějící výše uvedená imunohistochemická a molekulárně genetická vyšetření. Alternativně může být indikací k tomuto odeslání na specializované pracoviště žádost gastroenterologa či onkologa v případě klinické suspekce na LS (např. na podkladě RBG). Klinické podezření na hereditární podklad onemocnění může být stimulem i pro další pokračování vyšetřování pacientů, u nichž byl LS běžným algoritmem vyloučen (např. může být dále vyšetřována možnost MAP).

### 3. Histologická detekce morfologických znaků asociovaných s MSI-H

Pro většinu pracovišť patologie, která vyšetřují bioptické vzorky karcinomů tlustého střeva, endometria a dalších nádorů, však nejsou výše uvedené diagnostické metody přímo dostupné. I tato pracoviště se však mohou podílet na depistáži LS, a to detekci histologických znaků charakteristických pro CRC s vysokým stupněm nestability mikrosatelitů, tedy takzvané „MSI-H histologii“, která samotná má vyšší senzitivitu než souhrn zbývajících čtyř kritérií RBG (50). Z různých studií, jejichž cílem bylo nalézt racionální histologický algoritmus detekce MSI-H karcinomů (51), se v současné době jako nejužitečnější model jeví Model PREDICT (Pathological Role in the Determination of Instability in Colorectal Tumors) (50), zejména ve své zjednodušené formě jako Semi PREDICT skóre (tab. 1). Histologickými znaky, na nichž je tento model založen, jsou: přítomnost mucinu disekujícího stroma v jakémkoli množství, přítomnost tumor infiltrujících lymfocytů (TIL), peritumorální lymfoidní lem a zastoupení plazmatických buněk mezi leukocyty ve stromatu převyšující 25%. Detailněji je morfologie MSI-H CRC popsána v článku určeném patologům (5).

**Tab. 1.** Model PREDICT.

Znak	Skóre
lokalizace v pravém tračníku	1,6
disekující mucin (jakékoli množství)	1,6
věk < 50 let	1,3
tumor infiltrující lymfocyty (TIL)	1,3
peritumorální lymfoidní lem	0,7
plazmocyty tvoří > 25% stromálních leukocytů	0,7

**PREDICT skóre:** maximální možné skóre: 7,8; suspekce na MSI-H: skóre  $\geq 2,5$

**Semi PREDICT skóre:** přítomny dva a více znaků  $\rightarrow$  MSI-H susp.

Mezi výhody histologického vyšetření patří i možnost levného, rychlého a jednoduchého vyloučení sporadických MSI-H karcinomů podmíněných většinou somatickou metylací promotoru genu MLH1. Zatímco tyto vznikají ze „sesilných serrated adenomů“ (do češtiny někdy překládaných do ještě horší formy „přisedlé pilovité adenomy“), prekurzorovou lézí karcinomů v terénu LS je „konvenční“ (tubulární, tubulovilózní nebo vilózní) adenom. Jsou-li tedy v periférii tumoru zbytky prekurzorového sesilního serrated adenomu, jde s největší pravděpodobností o sporadický MSI-H karcinom (52). Nicméně tento jednoduchý diagnostický znak vylučující LS nemusí být vždy dostupný, ať již z důvodu nedostatečného samplingu, nebo destrukce původního adenomu pokročilým adenokarcinomem. Histologické vyšetření samo o sobě samozřejmě nemůže vést k diagnóze LS, může pouze vést k suspekci, která by měla vést k odeslání vzorku nádoru (a případně i nenádorové tkáně) na pracoviště



patologie vyššího typu zabývající se diagnostikou LS. Zde pak následují kroky popsané na schématu 1.

### **Problémy s algoritmy – suspektní LS a Lynch-like syndrom**

Tyto dva termíny se obsahově částečně překrývají, bohužel jsou dnes některými autory používány jako synonyma, ač se jejich význam liší. Termín „suspektní Lynchův syndrom“ (SLS) se dříve používal pro případy, kdy se nepodařilo prokázat molekulární podklad LS u pacienta splňujícího Amsterdamská kritéria a/nebo (R)BG. Zjednodušeně řečeno, většinou se jedná o familiárně se vyskytující často vícečetné karcinomy, zejména CRC, které nevznikají v terénu polypózy. Vysvětlení je samozřejmě řada, od environmentálních vlivů až po jiné familiární karcinomové syndromy, zejména tzv. MUTYH asociovanou polypózu (MAP), která se jednak nemusí prezentovat polypózou, jednak CRC vznikající při bialelické mutaci genu MUTYH může být také MSI-H (53).

Pojem „Lynch-like syndrom“ (LLS) je užší a lépe definovaný. Do této skupiny patří případy CRC, které vykazují známky dysfunkce MMR systému, tedy imunohistochemicky detekovaný deficit některého z MMR proteinů a/nebo průkaz MSI-H, spolu s vyloučením možnosti sporadického MSI-H tumoru průkazem absence mutace genu BRAF a hypermetylace promotoru genu MLH1, ale u nichž byly molekulárně genetickým vyšetřením periferní krve vyloučeny zárodečné mutace MMR genů a 3' konce genu EPCAM. Kromě možnosti falešně pozitivních výsledků imunohistochemického vyšetření na jedné straně a existenci mutací nedetekovaných současnými metodami může být tento fenomén vysvětlen dvěma stavy prokázanými v posledních dvou letech: somatickým mozaicismem (54) a somatickými bialelickými mutacemi MMR genů, jejichž možnost se dříve popírala (54– 57).

### **Závěr**

LS je familiární karcinomový syndrom způsobený zárodečnou mutací některého z genů, jehož proteinový produkt se účastní opravy chyb v DNA vzniklých při replikaci. Vzhledem k tomu, že výskyt LS v populaci se nyní odhaduje až na 5 % a vede ke vzniku maligních nádorů již v produktivním věku, sílí v současné době tlak na zvýšení senzitivity jeho detekce. Efektivní algoritmus diagnostiky LS by měl být vysoce senzitivní, dostatečně specifický, (relativně) levný a logisticky jednoduchý. Z hlediska senzitivity a specificity se ukázalo zcela nedostatečným spoléhat se na klinická kritéria (zejména rodinnou anamnézu). Proto se současné postupy zaměřují na detekci MSI-H tumorů, a to buď přímo, zprostředkovaně pomocí imunohistochemie, nebo na základě histologického průkazu morfologických znaků specifických pro MSI-H karcinomy. Přestože se již podařilo i v našich podmínkách zavést účinný algoritmus pro diagnostiku LS, nefunguje dosud dostatečně systém zpětné vazby s klinickými lékaři, kteří by měli organizovat další průběh vyšetření rodiny nemocného s LS. Na vině je do značné míry předávání pacienta po kolektorii mezi chirurgem, praktickým lékařem a onkologem, během kterého „zapadne“ žádost laboratoře molekulární genetiky o periferní krev, která je nezbytná k definitivnímu průkazu LS. K optimalizaci diagnostiky LS je tedy nezbytné zainteresovat do diagnostiky LS i klinické lékaře, bez jejichž aktivní účasti není možná ani kompletní diagnostika pacienta ani další vyšetření jeho rodinných příslušníků.

### **Literatura**

1. Kacerovská D, Kazakov DV, Černá K et al. Muir-Torre syndrom – fenotypická varianta Lynchova syndromu. *Cesk Patol* 2010; 46(4): 86– 94.

2. Lynch HT, Krush AJ. Cancer family „G“ revisited: 1895– 1970. *Cancer* 1971; 27(6): 1505–1511.
3. Lynch HT, Drouhard TJ, Schuelke GS et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer in a Navajo Indian family. *Cancer Genet Cytogenet* 1985; 15(3– 4): 209– 213.
4. Lindor NM, Rabe K, Petersen GM et al. Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. *JAMA* 2005; 293(16): 1979– 1985.
5. Daum O, Beneš Z, Hadravský L et al. Lynchův syndrom v rukách patologa. *Cesk Patol* 2014; 50(1): 18– 24.
6. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993; 75(5): 1027– 1038.
7. Leach FS, Nicolaidis NC, Papadopoulos N et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993; 75(6): 1215– 1225.
8. Peltomaki P, Lothe RA, Aaltonen LA et al. Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res* 1993; 53(24): 5853– 5855.
9. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260(5109): 816– 819.
10. 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.
11. Kruse R, Rutten A, Hosseiny-Malayeri HR et al. „Second hit“ in sebaceous tumors from Muir-Torre patients with germline mutations in MSH2: allele loss is not the preferred mode of inactivation. *J Invest Dermatol* 2001; 116(3): 463– 465.
12. 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– 769.
13. Gazzoli I, Loda M, Garber J et al. A hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma case associated with hypermethylation of the MLH1 gene in normal tissue and loss of heterozygosity of the unmethylated allele in the resulting microsatellite instability-high tumor. *Cancer Res* 2002; 62(14): 3925– 3928.
14. Hitchins MP, Wong JJ, Suthers G et al. Inheritance of a cancer-associated MLH1 germline epimutation. *N Engl J Med* 2007; 356(7): 697– 705.
15. Ligtenberg MJ, Kuiper RP, Chan TL et al. Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat Genet* 2009; 41(1): 112– 117. doi: 10.1038/ng.283.
16. Kovacs ME, Papp J, Szentirmay Z et al. Deletions removing the last exon of TACSTD1 constitute a distinct class of mutations predisposing to Lynch syndrome. *Hum Mutat* 2009; 30(2): 197– 203. doi: 10.1002/humu.20942.
17. Kastrinos F, Stoffel EM, Balmana J et al. Phenotype comparison of MLH1 and MSH2 mutation carriers in a cohort of 1,914 individuals undergoing clinical genetic testing in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17(8): 2044– 2051. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0301.
18. Hampel H, Frankel W, Panescu J et al. Screening for Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) among endometrial cancer patients. *Cancer Res* 2006; 66(15): 7810– 7817.
19. Berends MJ, Wu Y, Sijmons RH et al. Molecular and clinical characteristics of MSH6 variants: an analysis of 25 index carriers of a germline variant. *Am J Hum Genet* 2002; 70(1): 26– 37.

20. Lynch HT, Fusaro RM, Roberts L et al. Muir-Torre syndrome in several members of a family with a variant of the Cancer Family Syndrome. *Br J Dermatol* 1985; 113(3): 295– 301.
21. Kokošková B, Daum O, Beneš Z et al. Moderní diagnostika Lynchova syndromu. *Gastroent Hepatol* 2014; 68(2): 157– 165.
22. Schwartz RA, Torre DP. The Muir-Torre syndrome: a 25-year retrospect. *J Am Acad Dermatol* 1995; 33(1): 90– 104.
23. De Rosa M, Fasano C, Panariello L et al. Evidence for a recessive inheritance of Turcot's syndrome caused by compound heterozygous mutations within the PMS2 gene. *Oncogene* 2000; 19(13): 1719– 1723.
24. Gallinger S, Aronson M, Shayan K et al. Gastrointestinal cancers and neurofibromatosis type 1 features in children with a germline homozygous MLH1 mutation. *Gastroenterology* 2004; 126(2): 576– 585.
25. Bandipalliam P. Syndrome of early onset colon cancers, hematologic malignancies & features of neurofibromatosis in HNPCC families with homozygous mismatch repair gene mutations. *Fam Cancer* 2005; 4(4): 323– 333.
26. Bakry D, Aronson M, Durno C et al. Genetic and clinical determinants of constitutional mismatch repair deficiency syndrome: Report from the constitutional mismatch repair deficiency consortium. *Eur J Cancer* 2014; 50(5): 987– 996. doi: 10.1016/j.ejca.2013.12.005.
27. Durno CA, Sherman PM, Aronson M et al. Phenotypic and genotypic characterisation of biallelic mismatch repair deficiency (BMMR-D) syndrome. *Eur J Cancer* 2015; 51(8): 977– 983. doi: 10.1016/j.ejca.2015.02.008.
28. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM et al. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991; 34(5): 424– 425.
29. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP et al. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999; 116(6): 1453– 1456.
30. 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(4): 261– 268.
31. Hampel H, Frankel WL, Martin E et al. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med* 2005; 352(18): 1851– 1860.
32. Liu T, Yan H, Kuismanen S et al. The role of hPMS1 and hPMS2 in predisposing to colorectal cancer. *Cancer Res* 2001; 61(21): 7798– 7802.
33. van der Klift H, Wijnen J, Wagner A et al. Molecular characterization of the spectrum of genomic deletions in the mismatch repair genes MSH2, MLH1, MSH6, and PMS2 responsible for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 44(2): 123– 138.
34. Dovrat S, Figer A, Fidder HH et al. Mutational analysis of hMSH6 in Israeli HNPCC and HNPCC-like families. *Fam Cancer* 2005; 4(4): 291– 294.
35. Hegde MR, Chong B, Blazo ME et al. A homozygous mutation in MSH6 causes Turcot syndrome. *Clin Cancer Res* 2005; 11(13): 4689– 4693.
36. Hendriks YM, Jagmohan-Changur S, van der Klift HM et al. Heterozygous mutations in PMS2 cause hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome). *Gastroenterology* 2006; 130(2): 312– 322.
37. de la Chapelle A. The incidence of Lynch syndrome. *Fam Cancer* 2005; 4(3): 233– 237.
38. Jenkins MA, Baglietto L, Dowty JG et al. Cancer risks for mismatch repair gene mutation carriers: a population-based early onset case-family study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4(4): 489– 498.

39. Quehenberger F, Vasen HF, van Houwelingen HC. Risk of colorectal and endometrial cancer for carriers of mutations of the hMLH1 and hMSH2 gene: correction for ascertainment. *J Med Genet* 2005; 42(6): 491– 496.
40. Lynch HT, de la Chapelle A. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 1999; 36(11): 801– 818.
41. Jass JR, Stewart SM. Evolution of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut* 1992; 33(6): 783– 786.
42. Kuan SF, Navina S, Cressman KL et al. Immunohistochemical detection of BRAF V600E mutant protein using the VE1 antibody in colorectal carcinoma is highly concordant with molecular testing but requires rigorous antibody optimization. *Hum Pathol* 2014; 45(3): 464– 472. doi:10.1016/j.humpath.2013.10.026.
43. Domingo E, Laiho P, Ollikainen M et al. BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. *J Med Genet* 2004; 41(9): 664– 668.
44. Pai RK, Shadrach BL, Carver P et al. Immunohistochemistry for annexin A10 can distinguish sporadic from Lynch syndrome-associated microsatellite-unstable colorectal carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2014; 38(4): 518– 525. doi: 10.1097/PAS.000000000000148.
45. Shia J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I. The utility of immunohistochemistry. *J Mol Diagn* 2008; 10(4): 293– 300. doi: 10.2353/jmoldx.2008.080031.
46. Funkhouser WK Jr., Lubin IM, Monzon FA et al. Relevance, pathogenesis, and testing algorithm for mismatch repair-defective colorectal carcinomas: a report of the association for molecular pathology. *J Mol Diagn* 2012; 14(2): 91– 103. doi: 10.1016/j.jmoldx.2011.11.001
47. Halvarsson B, Lindblom A, Rambech E et al. Microsatellite instability analysis and/ or immunostaining for the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer? *Virchows Arch* 2004; 444(2): 135– 141.
48. Boland CR, Shike M. Report from the Jerusalem workshop on Lynch syndrome-hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010; 138(7): 2197e1– 2197e7. doi: 10.1053/j.gastro.2010.04.024.
49. Boland CR, Koi M, Chang DK et al. The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome: from bench to bedside. *Fam Cancer* 2008; 7(1): 41– 52.
50. Hyde A, Fontaine D, Stuckless S et al. A histology-based model for predicting microsatellite instability in colorectal cancers. *Am J Surg Pathol* 2010; 34(12): 1820– 1829. doi: 10.1097/PAS.0b013e3181f6a912.
51. Roman R, Verdu M, Calvo M et al. Microsatellite instability of the colorectal carcinoma can be predicted in the conventional pathologic examination. A prospective multicentric study and the statistical analysis of 615 cases consolidate our previously proposed logistic regression model. *Virchows Archiv* 2010; 456(5): 533– 541. doi: 10.1007/s00428-010-0896-6.
52. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007; 50(1): 113– 130.
53. Castillejo A, Vargas G, Castillejo MI et al. Prevalence of germline MUTYH mutations among Lynch-like syndrome patients. *Eur J Cancer* 2014; 50(13): 2241– 2250. doi: 10.1016/j.ejca.2014.05.022.
54. Sourrouille I, Coulet F, Lefevre JH et al. Somatic mosaicism and double somatic hits can lead to MSI colorectal tumors. *Fam Cancer* 2013; 12(1): 27– 33. doi: 10.1007/s10689-012-9568-9.

55. Geurts-Giele WR, Leenen CH, Dubbink HJ et al. Somatic aberrations of mismatch repair genes as a cause of microsatellite-unstable cancers. *J Pathol* 2014; 234(4): 548– 559. doi: 10.1002/ path.4419.
56. Mensenkamp AR, Vogelaar IP, van Zelst-Stams WA et al. Somatic mutations in MLH1 and MSH2 are a frequent cause of mismatch-repair deficiency in Lynch syndrome-like tumors. *Gastroenterology* 2014; 146(3): 643– 646. doi: 10.1053/ j.gastro.2013.12.002.
57. Haraldsdottir S, Hampel H, Tomsic J et al. Colon and endometrial cancers with mismatch repair deficiency can arise from somatic, rather than germline, mutations. *Gastroenterology* 2014; 147(6): 1308– 1316. doi: 10.1053/ j.gastro.2014.08.041.

## 16 Závěr

Lynchův syndrom (LS) je autozomálně dominantně dědičný syndrom jehož podkladem je nejčastěji zárodečná mutace některého z tzv. MMR genů, které jsou odpovědné za opravu chyb vznikajících během replikace DNA. Dysfunkce tohoto opravného systému má za následek zvýšenou incidenci nádorů u pacienta. Nejčastějším tumorem vznikajícím v asociaci s LS je kolorektální karcinom (CRC), ale je zvýšené riziko vzniku i dalších malignit, především endometria, ovária, žaludku, tenkého střeva, pankreatu, hepatobiliárního traktu, horního uroteliálního traktu, mozku a kůže. Navíc nádory v rámci LS vznikají v mladším věku než u obecné populace. Odhaduje se, že LS je odpovědný až za 5 % CRC, jehož celková incidence je v ČR okolo 8000 za rok a více než 1000000 celosvětově. Vzhledem z nezanedbatelné incidenci a vzniku nádorů v produktivním věku je diagnostika LS důležitá nejen pro samotného pacienta, ale především pro jeho příbuzné, u kterých pak lze vhodně zvolenými screeningovými metodami významně snížit morbiditu a mortalitu.

Pro diagnózu LS je nezbytné molekulárně genetické potvrzení zárodečné mutace z periferní krve pacienta, které je však v současné době finančně i technicky velmi nákladné a nelze ho tak použít jako rutinní vyšetřovací metodu. Proto byly vyvinuty další vyšetřovací metodiky, které pomáhají vyloučit sporadické CRC a snižují tak celkové náklady tím, že zabrání zbytečným genetickým testům u některých pacientů. Tyto postupy se zaměřují na detekci tzv. mikrosatelitní nestability (MSI), mutaci V600E genu *BRAF* a hypermetylaci promotoru genu *MLH1*. Zatímco MSI je pro LS typická (nikoli však specifická), mutace *BRAF* V600E a hypermetylace *MLH1* se vyskytují téměř výhradně u sporadických karcinomů. Průkaz MSI je prováděn buď nepřímo hodnocením histologických znaků spojených se stavem MSI, pomocí imunohistochemického (IHC) vyšetření exprese MMR proteinů, nebo přímo genetickým průkazem MSI. Výhodou IHC je kromě ceny i její dostupnost, takže se na diagnostice LS mohou (alespoň částečně) podílet i menší laboratě bez molekulární genetiky. Navíc identifikace deficitu exprese konkrétního MMR proteinu dále snižuje cenu genetické analýzy tím, že umožňuje zaměřit se pouze na tento gen (nebo geny).

Přestože byla vypracována klinická kritéria pro diagnózu LS, jejich efektivita se ukazuje jako nedostatečná a diagnostika je tak, mimo jiné pro absenci premorbidního fenotypu (tj. změn, které by předcházely vzniku malignit), z velké části v rukou patologů. Aby diagnostika LS byla co nejefektivnější, je nezbytné vhodně nastavit algoritmus uvedených vyšetřovacích metod a logistický postup s ohledem na možnosti konkrétní laboratoře. Velmi důležitá je však také spolupráce s klinickými lékaři (především oborů chirurgie, gastroenterologie, onkologie a praktické lékařství) a to nejen pro další screeningový dohled nad pacientem a jeho příbuznými, ale také pro samotný odběr periferní krve pacienta k vyšetření na zárodečné mutace. Právě tato fáze s odběrem krve se často ukazuje jako problematická. Žádost laboratoře o periferní krev na genetickou analýzu totiž zůstává v záplavě administrativy a dalšího pooperačního managementu často nevyslyšena. Ačkoli se vlastně jedná pouze o převážně administrativní fázi celého procesu, může zanedbání řešení její problematiky způsobit selhání celého systému založeného na racionálním a etablovaném morfologickém algoritmu.

## 17 Literatura

1. **Aaltonen L, Johns L, Järvinen H, et al.** Explaining the familial colorectal cancer risk associated with mismatch repair (MMR)-deficient and MMR-stable tumors. *Clin Cancer Res* 2007;13:356–361. [PubMed: 17200375]
2. **Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, et al.** Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993;260:812–816. [PubMed: 8484121]
3. **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. [PubMed: 9593786]
4. **Aarnio M, Salovaara R, Aaltonen LA, et al.** Features of gastric cancer in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Int J Cancer* 1997;74:551–555.
5. **Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, et al.** Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int J Cancer* 1999;81:214–218.
6. **Abbott JJ, Hernandez-Rios P, Amirkhan RH, et al.** Cystic sebaceous neoplasms in Muir-Torre syndrome. *Arch Pathol Lab Med.* 2003;127(5):614–617.
7. **Abdel-Rahman WM, Peltomäki P.** Lynch syndrome and related familial colorectal cancers. *Crit Rev Oncog* 2008;14:1–22. [PubMed: 19105568]
8. **Aebi S, Kurdi-Haider B, Gordon R, et al.** Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. *Cancer Res* 1996;56:3087–3090. [PubMed: 8674066]
9. **Ainsworth PJ, Kosciński D, Fraser BP, et al.** Family cancer histories predictive of a high risk of hereditary non-polyposis colorectal cancer associate significantly with a genomic rearrangement in hMSH2 or hMLH1. *Clin Genet.* 2004;66(3):183-8.
10. **Akhtar S, Oza K, Khan S, et al.** Muir-Torre syndrome: case report of a patient with concurrent jejuna and ureteral cancer and a review of the literature. *J Am Acad Dermatol.* 1999;41(5, pt 1):681–686.
11. **Akiyama M, 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(18):3920-3.
12. **Aktan-Collan K, Mecklin J-K, Jarivnen HJ, et al.** Predictive genetic testing for hereditary nonpolyposis colorectal cancer: Uptake and long-term satisfaction. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 2000;89:44–50.
13. **Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, et al.** Inherited variants of MYH associated with somatic G:C→T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet* 2002;30:227–232.
14. **Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, et al.** Inherited variants of MYH associated with somatic G:C→T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet.* 2002, 30(2):227-232.
15. **Alarcon F, Lasset C, Carayol J, et al.** Estimating cancer risk in HNPCC by the BRL method. *Eur J Hum Genet* 2007;15:831–836.
16. **Albrecht S, Haber RM, Goodman JC, et al.** Cowden syndrome and Lhermitte-Duclos disease. *Cancer* 1992;70: 869-876.
17. **Alexander J, Watanabe T, Wu TT, et al.** Histopathologic identification of colon cancer with microsatellite instability. *Am J Pathol.* 2001;158(2):527–535.
18. **Alsaad KO, Obaidat NA, Ghazarian D.** Skin adnexal neoplasms—part 1: An approach to tumours of the pilosebaceous unit. *J Clin Pathol.* 2007;60(2):129–144.
19. **American Gastroenterological Association Medical Position Statement:** hereditary colorectal cancer and genetic testing. *Gastroenterology* 2001;121:195–197.
20. **Amos CI, Bali D, Thiel TJ, et al.** Fine mapping of a genetic locus for Peutz-Jeghers syndrome on chromosome 19p. *Cancer Res.* 1997;57: 3653–3656.

21. **Ansai S, Mitsuhashi Y, Kondo S, et al.** Immunohistochemical differentiation of extra-ocular sebaceous carcinoma from other skin cancers. *J Dermatol.* 2004;31(12):998–1008.
22. **Arch EM, Goodman BK, Van Wesep RA, et al.** Deletion of PTEN in a patient with Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome suggests allelism with Cowden disease. *Am. J. Med. Genet.* 1997;71: 489–493.
23. **Aretz S, Uhlhaas S, Goergens H, et al.** MUTYH-associated polyposis: 70 of 71 patients with biallelic mutations present with an attenuated or atypical phenotype. *Int J Cancer* 2006;119:807–814.
24. **Aretz S, Uhlhaas S, Goergens H, et al.** MUTYH-associated polyposis: 70 of 71 patients with biallelic mutations present with an attenuated or atypical phenotype. *Int J Cancer.* 2006, 119(4):807-814.
25. **Autio-Harmainen H, Paakko P, Alavaikko M, et al.** Familial occurrence of malignant lymphoepithelial lesion of the parotid gland in a Finnish family with dominantly inherited trichoepithelioma. *Cancer* 1988;61: 161-166.
26. **Axilbund JE, Klein AP, Bacon JA, et al.** Risk of pancreatic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Insight Meeting, Dusseldorf, Germany, June 24–27, 2009.
27. **Baal van JG, Fleury P, Brummelkamp WH.** Tuberous sclerosis and the relation with renal angiomyolipoma: a genetic study on the clinical aspects. *Clin Genet* 1989;35: 167-173.
28. **Baas AF, Gabbett M, Rimac M, et al.** Agenesis of the corpus callosum and gray matter heterotopia in three patients with constitutional mismatch repair deficiency syndrome. *Europ. J. Hum. Genet.* 2013;21: 55-61, 2013.
29. **Baglietto L, Lindor NM, Dowty JG, et al.** Risks of Lynch syndrome cancers for MSH6 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 2010;102:193–201.
30. **Bakry D, Aronson M, Durno C et al.** Genetic and clinical determinants of constitutional mismatch repair deficiency syndrome: Report from the constitutional mismatch repair deficiency consortium. *Eur J Cancer* 2014; 50(5): 987-996. doi:10.1016/j.ejca.2013.12.005.
31. **Balmaña J, Balaguer F, Castellví-Bel S, et al.** Gastrointestinal Oncology Group of the Spanish Gastroenterological Association, comparison of predictive models, clinical criteria and molecular tumour screening for the identification of patients with Lynch syndrome in a population-based cohort of colorectal cancer patients. *J Med Genet* 2008;45:557–563.
32. **Balmaña J, Stockwell DH, Steyerberg EW, et al.** Prediction of MLH1 and MSH2 mutations in Lynch syndrome. *JAMA* 2006;296:1469–1478. [PubMed: 17003395]
33. **Bandipalliam P.** Syndrome of early onset colon cancers, hematologic malignancies & features of neurofibromatosis in HNPCC families with homozygous mismatch repair gene mutations. *Fam Cancer* 2005;4:323–333. [PubMed: 16341812]
34. **Barana D, van der Klift H, Wijnen J, et al.** Spectrum of genetic alterations in Muir-Torre syndrome is the same as in HNPCC. *Am J Med Genet A.* 2004;125A(3):318–319.
35. **Barnetson RA, Devlin L, Miller J, et al.** Germline mutation prevalence in the base excision repair gene, MYH, in patients with endometrial cancer. *Clin. Genet.* 2007;72: 551-555.
36. **Barnetson RA, Tenesa A, Farrington SM, et al.** Identification and survival of carriers of mutations in DNA mismatch-repair genes in colon cancer. *N Engl J Med* 2006;354:2751–2763.
37. **Barrow PJ, Ingham S, O’Hara C, et al.** The spectrum of urological malignancy in Lynch syndrome. *Fam Cancer* 2013;12:57–63.
38. **Barrow E, Jagger E, Brierley J, et al.** Semiquantitative assessment of immunohistochemistry for mismatch repair proteins in Lynch syndrome. *Histopathology* 2010; 56(3): 331-344.



39. **Barrow E, Robinson L, Alduaij W, et al.** Cumulative lifetime incidence of extracolonic cancers in Lynch syndrome: a report of 121 families with proven mutations. *Clin Genet* 2009;75:141–149. [PubMed: 19215248]
40. **Baudhuin LM, Burgart LJ, Leontovich O, et al.** Use of microsatellite instability and immunohistochemistry testing for the identification of individuals at risk for Lynch syndrome. *Fam Cancer* 2005;4:255–265. [PubMed: 16136387]
41. **Baudhuin LM, Ferber MJ, Winters JL, et al.** Characterization of hMLH1 and hMSH2 gene dosage alterations in Lynch syndrome patients. *Gastroenterology*. 2005;129(3):846-54.
42. **Bayer-Garner IB, Givens V, Smoller B.** Immunohistochemical staining for androgen receptors: a sensitive marker of sebaceous differentiation. *Am J Dermatopathol*. 1999;21(5):426–431.
43. **Beck NE, Tomlinson IP, Homfray T, et al.** Genetic testing is important in families with a history suggestive of hereditary non-polyposis colorectal cancer even if the Amsterdam criteria are not fulfilled. *Br J Surg*. 1997;84(2):233-7.
44. **Bell, B., Mazzaferri, E. L.** Familial adenomatous polyposis (Gardner's syndrome) and thyroid carcinoma: a case report and review of the literature. *Digest. Dis. Sci.* 38: 185-190, 1993.
45. **Benatti P, Gafa R, Barana D, et al.** Microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *Clin Cancer Res* 2005;11:8332–8340. [PubMed: 16322293]
46. **Berends MJ, Wu Y, Sijmons RH et al.** Molecular and clinical characteristics of MSH6 variants: an analysis of 25 index carriers of a germline variant. *Am J Hum Genet* 2002;70(1): 26-37.
47. **Bessa X, Balleste B, Andreu M, et al.** A prospective, multicenter, population-based study of BRAF mutational analysis for Lynch syndrome screening. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:206–214. [PubMed: 18096441]
48. **Bisgaard ML, Fenger K, Bulow S, et al.** Familial adenomatous polyposis (FAP): Frequency, penetrance, and mutation rate. *Hum. Mutat.* 1994;3: 121–125.
49. **Blair NP, Trempe CL.** Hypertrophy of the retinal pigment epithelium associated with Gardner's syndrome. *Am. J. Ophthal.* 90: 661-667, 1980.
50. **Blake PW, Toro JR.** Update of cylindromatosis gene (CYLD) mutations in Brooke-Spiegler syndrome: novel insights into the role of deubiquitination in cell signaling. *Hum Mutat* 2009;30: 1025-1036.
51. **Blasi MF, Ventura I, Aquilina G, et al.** A human cell-based assay to evaluate the effects of alterations in the MLH1 mismatch repair gene. *Cancer Res* 2006;66:9036–9044z. [PubMed: 16982745]
52. **Blumenthal GM, Dennis PA.** PTEN hamartoma tumor syndromes. *Europ. J. Hum. Genet.* 2008;16: 1289-1300.
53. **Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, et al.** Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* 1987;328:614–616. [PubMed: 3039373]
54. **Boland CR.** Evolution of the nomenclature for the hereditary colorectal cancer syndromes. *Fam Cancer* 2005;4:211–218. [PubMed: 16136380]
55. **Boland CR, Fishel R.** Lynch syndrome: form, function, proteins, and basketball. *Gastroenterology* 2005;129:751–755. [PubMed: 16083730]
56. **Boland CR, Koi M, Chang DK, et al.** The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome: from bench to bedside. *Fam Cancer* 2008;7:41–52. [PubMed: 17636426]
57. **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. [PubMed: 9823339]

- 58. Boland CR, Troncale FJ.** Familial colonic cancer without antecedent polyposis. *Ann Intern Med* 1984; 100(5): 700-701. [PubMed: 6712034]
- 59. Boland CR, Shike M.** Report from the Jerusalem Workshop on Lynch syndrome—hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010;138:2197–2201.
- 60. Boland CR, Shin SK, Goel A.** Promoter methylation in the genesis of gastrointestinal cancer. *Yonsei Med J* 2009;50:309–321. [PubMed: 19568590]
- 61. Bonadona V, Bonaïti B, Olschwang S, et al.** Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome. *JAMA* 2011;30:2304–2310.
- 62. Bosi G, Lintermans JP, Pellegrino PA, et al.** The natural history of cardiac rhabdomyoma with and without tuberous sclerosis. *Acta Pediat* 1996;85: 928-931.
- 63. Boughman FA Jr, List CF, Williams JR, et al.** The glioma-polyposis syndrome. *New Engl J Med* 1969;281:1345-1346.
- 64. Bowen S, Gill M, Lee DA, et al.** Mutations in the CYLD gene in Brooke-Spiegler syndrome, familial cylindromatosis, and multiple familial trichoepithelioma: lack of genotype-phenotype correlation. *J Invest Derm* 2005;124: 919-920.
- 65. Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, et al.** Mutations in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 1994;368:258–261. [PubMed: 8145827]
- 66. Brose MS, Smyrk TC, Weber B, et al.** Genetic predisposition to cancer. In: Kufe, DW.; Pollock, RE.; Weischelbaum, RR.; Bast, RC., Jr; Gansler, TS.; Holland, JF., et al., editors. *Cancer medicine*.
- 67. Brownstein MH, Mehregan AH, Bikowski JB.** Trichilemmomas in Cowden's disease. (Letter) *JAMA* 1997;238: 26.
- 68. Buerki N, Gautier L, Kovac M, et al.** Evidence for breast cancer as an integral part of Lynch syndrome. *Genes Chromosomes Cancer* 2012;51:83–91.
- 69. Buitrago W, Joseph AK.** Sebaceous carcinoma: the great masquerader: emerging concepts in diagnosis and treatment. *Dermatol Ther.* 2008;21(6):459–466.
- 70. Bülow S, Faurschou NT, Bülow C, et al.** The incidence rate of familial adenomatous polyposis. Results from the Danish Polyposis Register. *Int J Colorectal Dis* 1996;11:88–91. [PubMed: 8739833]
- 71. Bunyan DJ, Eccles DM, Sillibourne J, et al.** Dosage analysis of cancer predisposition genes by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Br J Cancer.* 2004;91(6):1155-9.
- 72. Burn J, Bishop DT, Mecklin JP, et al.** Effect of aspirin or resistant starch on colorectal neoplasia in the Lynch syndrome. *N Engl J Med* 2008;359:2567–2578.
- 73. Burn J, Gerdes AM, Macrae F, et al.** Long-term effect of aspirin on cancer risk in carriers of hereditary colorectal cancer: an analysis from the CAPP2 randomized controlled trial. *Lancet* 2011;378:2081–2087.
- 74. Bussey HJR.** *Familial polyposis coli: family studies, histopathology, differential diagnosis, and results of treatment.* Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press; 1975.
- 75. Bussey HJR.** *Familial Polyposis Coli.* Baltimore: John Hopkins University Press 1975.
- 76. Canto MI, Harinck F, Hruban RH, et al.** International Cancer of the Pancreas Screening (CAPS) Consortium summit on the management of patients with increased risk for familial pancreatic cancer International Cancer of Pancreas Screening (CAPS) Consortium. *Gut* 2013;62:339–347.
- 77. Cao X, Eu KW, Kumarasinghe MP, et al.** Mapping of hereditary mixed polyposis syndrome (HMPS) to chromosome 10q23 by genomewide high-density single nucleotide polymorphism (SNP) scan and identification of BMPR1A loss of function. *J. Med. Genet.* 2006 43: e13. doi: 10.1136/jmg.2005.034827.

- 78. Capelle LG, Van Grieken NC, Lingsma HF, et al.** Risk and epidemiological time trends of gastric cancer in Lynch syndrome carriers in the Netherlands. *Gastroenterology* 2010;138:487–492.
- 79. Capper D, Voigt A, Bozukova G, et al.** BRAF V600E-specific immunohistochemistry for the exclusion of Lynch syndrome in MSI-H colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2013 Oct 1;133(7):1624-30. doi: 10.1002/ijc.28183. Epub 2013 Apr 25.
- 80. Carethers JM, Dharam PC, Fink D, et al.** Mismatch repair proficiency and in vitro response to 5-fluorouracil. *Gastroenterology* 1999;117:123–131. [PubMed: 10381918]
- 81. Carethers JM, Hawn MT, Chauhan DP, et al.** Competency in mismatch repair prohibits clonal expansion of cancer cells treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *J Clin Invest* 1996;98:199–206. [PubMed: 8690794]
- 82. Carethers JM, Smith EJ, Behling CA, et al.** Use of 5-fluorouracil and survival in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. *Gastroenterology* 2004;126:394–401. [PubMed:14762775]
- 83. Carl W, Herrera L.** Dental and bone abnormalities in patients with familial polyposis coli. *Semin. Surg. Oncol.* 3: 77-83, 1987.
- 84. Casey G, Lindor NM, Papadopoulos N, et al.** Conversion analysis for mutation detection in MLH1 and MSH2 in patients with colorectal cancer. *JAMA* 2005;293:799–809. [PubMed: 15713769]
- 85. Caspari R, Olschwang S, Friedl W et al.** Familial adenomatous polyposis: desmoid tumours and lack of ophthalmic lesions (CHRPE) associated with APC mutations beyond codon 1444. *Hum Mol Genet.* 1995;4:337–40.
- 86. Castori M, Morrone A, Kanitakis J, et al.** Genetic skin diseases predisposing to basal cell carcinoma. *Eur J Dermatol.* 2012;22(3):299–309.
- 87. Chan AO, Broaddus RR, Houlihan PS et al.** CpG island methylation in aberrant crypt foci of the colorectum. *Am J Pathol.* 2002 May;160(5):1823-30.
- 88. Chan TL, Yuen ST, Chung LP, et al.** Germline hMSH2 and differential somatic mutations in patients with Turcot's syndrome. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;25:75-81.
- 89. 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. [PubMed: 10747992]
- 90. Chhibber V, Dresser K, Mahalingam M.** MSH-6: extending the reliability of immunohistochemistry as a screening tool in Muir-Torre syndrome. *Mod Pathol.* 2008;21(2):159–164.
- 91. Chapelle de la A.** Microsatellite instability. *N Engl J Med* 2003;349:209–210. [PubMed: 12867603]
- 92. Chapelle de la A.** The incidence of Lynch syndrome. *Fam Cancer.* 2005;4(3):233-7.
- 93. Chapelle de la A.** Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4:769–780. [PubMed: 15510158]
- 94. Charbonneau N, Amunugama R, Schmutte C, et al.** Evidence that hMLH3 functions primarily in meiosis and in hMSH2-hMSH3 mismatch repair. *Cancer Biol Ther.* 2009 Jul;8(14):1411-20. Epub 2009 Jul 30.
- 95. Chen S, Wang W, Lee S, et al.** Prediction of germline mutations and cancer risk in the Lynch syndrome. *JAMA* 2006;296:1479–1487. [PubMed: 17003396]
- 96. Church DN, Stelloo E, Nout RA, et al.** Prognostic significance of POLE proofreading mutations in endometrial cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2014 Dec 12;107(1):402. doi: 10.1093/jnci/dju402. Print 2015 Jan.
- 97. Church J, Simmang C.** Collaborative Group of the Americas on Inherited Colorectal Cancer et al. Practice parameters for the treatment of patients with dominantly inherited colorectal cancer (familial adenomatous polyposis and hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *Dis Colon Rectum* 2003;46:1001–1012. [PubMed: 12907889]

- 98. Church JM.** Polymerase proofreading-associated polyposis: a new, dominantly inherited syndrome of hereditary colorectal cancer predisposition. *Dis Colon Rectum*. 2014 Mar;57(3):396-7. doi: 10.1097/DCR.0000000000000084.
- 99. Clark SK, Neale KF, Landgrebe JC, et al.** Desmoid tumours complicating familial adenomatous polyposis. *Brit. J. Surg.* 86: 1185-1189, 1999.
- 100. Clendenning M, Baze ME, Sun S, et al.** Origins and prevalence of the American founder mutation of MSH2. *Cancer Res* 2008;68:2145–2153. [PubMed: 18381419]
- 101. Cohen PR, Kohn SR, Kurzrock R.** Association of sebaceous gland tumors and internal malignancy: the Muir-Torre syndrome. *Am J Med.* 1991;90:606–613.
- 102. Cook JA, Oliver K, Mueller RF, et al.** A cross sectional study of renal involvement in tuberous sclerosis. *J. Med. Genet.* 33: 480-484, 1996.
- 103. Crijnen ThEM, Janssen-Heijnen MLG, Gelderblom H, et al.** Survival of patients with ovarian cancer due to a mismatch repair defect. *Fam Cancer* 2005;4:301–305. [PubMed: 16341807]
- 104. Crino PB, Nathanson KL, Henske EP.** The tuberous sclerosis complex. *New Eng J Med* 2006;355: 1345-1356.
- 105. Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ, et al.** Hyper-methylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res* 1998;58:3455–3460. [PubMed: 9699680]
- 106. Cunningham JM, Kim CY, Christensen ER, et al.** The frequency of hereditary defective mismatch repair in a prospective series of unselected colorectal cancers. *Am J Hum Genet* 2001;68:795–801.
- 107. Curatolo P, Bombardieri R, Jozwiak S.** Tuberous sclerosis. *Lancet* 2008;372: 657-668.
- 108. Cybulski C, Górski B, Huzarski T, et al.** CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene. *Am J Hum Genet* 2004;75:1131–1135. [PubMed: 15492928]
- 109. Cybulski C, Wokolorczyk D, Kladny J, et al.** Germline CHEK2 mutations and colorectal cancer risk: different effects of a missense and truncating mutations? *Eur J Hum Genet* 2007;15:237–241. [PubMed: 17106448]
- 110. Danes BS, Gardner EJ.** The Gardner syndrome: a cell culture study of kindred 109. *J. Med. Genet.* 15: 346-551, 1978.
- 111. Davis H, Irshad S, Bansal M, et al.** Aberrant epithelial GREM1 expression initiates colonic tumorigenesis from cells outside the stem cell niche. *Nat Med* 2015 Jan;21(1):62-70. doi: 10.1038/nm.3750. Epub 2014 Dec 1.
- 112. De Rosa M, Fasano C, Panariello L, et al.** Evidence for a recessive inheritance of Turcot's syndrome caused by compound heterozygous mutations within the PMS2 gene. *Oncogene.* 2000;19(13):1719-23.
- 113. Deng G, Bell I, Crawley S, et al.** BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:191–195.
- 114. Deng G, Nguyen A, Tanaka H, et al.** Regional hypermethylation and global hypomethylation are associated with altered chromatin conformation and histone acetylation in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2006;118:2999–3005. [PubMed: 16425274]
- 115. Desai DC, Lockman JC, Chadwick RB, et al.** Recurrent germline mutation in MSH2 arises frequently de novo. *J Med Genet* 2000;37:646–652. [PubMed: 10978353]
- 116. Dinh TA, Rosner BI, Atwood JC, et al.** Health benefits and cost-effectiveness of primary genetic screening for Lynch syndrome in the general population. *Cancer Prev Res* 2010;4:9–22.
- 117. Domingo E, Laiho P, Ollikainen M et al.** BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. *J Med Genet* 2004; 41(9): 664-668.

- 118. Domingo E, Niessen RC, Oliveria C, et al.** BRAF-V600E is not involved in the colorectal tumorigenesis of HNPCC in patients with functional MLH1 and MSH2 genes. *Oncogene* 2005;24:3995–3998.
- 119. Dove-Edwin I, Boks D, Goff S, et al.** The outcome of endometrial carcinoma surveillance by ultrasound in women at risk of hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma and familial colorectal carcinoma. *Cancer* 2002;94:1708–1712.
- 120. Dove-Edwin I, Sasieni P, Adams J, et al.** Prevention of colorectal cancer by colonoscopic surveillance in individuals with a family history of colorectal cancer: 16 year, prospective, follow-up study. *BMJ* 2005;331:1047.
- 121. Dovrat S, Figer A, Fidder HH et al.** Mutational analysis of hMsh6 in Israeli HNPCC and HNPCC-like families. *Fam Cancer* 2005; 4(4): 291-294.
- 122. Dunlop MG, Farrington SM, Carothers AD, et al.** Cancer risk associated with germline DNA mismatch repair gene mutations. *Hum Mol Genet* 1997;6:105–110. [PubMed: 9002677]
- 123. Durno CA, Holter S, Sherman PM, et al.** The gastrointestinal phenotype of germline biallelic mismatch repair gene mutations. *Am J Gastroenterol* 2010;105:2449–2456.
- 124. Durno CA, Sherman PM, Aronson M et al.** Phenotypic and genotypic characterisation of biallelic mismatch repair deficiency (BMMR-D) syndrome. *Eur J Cancer* 2015;51(8): 977–983. doi: 10.1016/j.ejca.2015.02.008.
- 125. East JE, Suzuki N, Stavrinidis M, et al.** Narrow band imaging for colonoscopic surveillance in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut* 2008;57:65–70. [PubMed: 17682000]
- 126. Edelstein DL, Axilbund JE, Baxter M, et al.** Rapid development of colorectal neoplasia in patients with Lynch syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011;9:340–343.
- 127. Elsaleh H, Joseph D, Grieu F, et al.** Association of tumour site and sex with survival benefit from adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Lancet* 2000;355:1745–1750. [PubMed: 10832824]
- 128. Elston DM, James WD, Rodman OG, et al.** Multiple hamartoma syndrome (Cowden's disease) associated with non-Hodgkin's lymphoma. *Arch. Derm.* 1986;122: 572-575.
- 129. Engel C, Loeffler M, Steinke V, et al.** Risks of less common cancers in proven mutation carriers with lynch syndrome. *J Clin Oncol* 2012;30:4409–4415.
- 130. Engel C, Rahner N, Schulmann K, et al.** Efficacy of annual colonoscopic surveillance in individuals with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010;8:174–182.
- 131. Entius MM, Keller JJ, Drillenburger P et al.** Microsatellite instability and expression of hMLH-1 and hMSH-2 in sebaceous gland carcinomas as markers for Muir-Torre syndrome. *Clin Cancer Res* 2000; 6(5): 1784-1789.
- 132. Esche C, Kruse R, Lamberti C et al.** Muir-Torre syndrome: clinical features and molecular genetic analysis. *Br J Dermatol* 1997; 136(6): 913-917.
- 133. Evans DG, Gaarenstroom KN, Stirling D, et al.** Screening for familial ovarian cancer: poor survival of BRCA1/2 related cancers. *J Med Genet* 2009;46:593–597.
- 134. Evans DGR, Ladusans EJ, Rimmer S, et al.** Complications of the naevoid basal cell carcinoma syndrome: results of a population based study. *J Med Genet* 1993;30: 460-464.
- 135. Fader M, Kline SN, Spatz SS, et al.** Gardner's syndrome (intestinal polyposis, osteomas, sebaceous cysts) and a new dental discovery. *Oral Surg.* 15: 153-172, 1962.
- 136. Fallik D, Borrini F, Boige V, et al.** Microsatellite instability is a predictive factor of the tumor response to irinotecan in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Res* 2003;63:5738–5744. [PubMed: 14522894]
- 137. Felton KEA, Gilchrist DM, Andrew SE.** Constitutive deficiency in DNA mismatch repair: is it time for Lynch III? *Clin Genet* 2007;71:499–500. [PubMed: 17539898]

- 138. Fenske C, Banerjee P, Holden C, et al.** Brooke-Spiegler syndrome locus assigned to 16q12-q13. *J Invest Derm* 2000;114: 1057-1058.
- 139. Ferguson-Smith MA, Wallace DC, James ZH, et al.** Multiple self-healing squamous epithelioma. *Birth Defects Orig. Art. Ser.* VII(8): 157-163, 1971.
- 140. Fernandez-Flores A.** Considerations on the performance of immunohistochemistry for mismatch repair gene proteins in cases of sebaceous neoplasms and keratoacanthomas with reference to Muir-Torre syndrome. *Am J Dermatopathol.* 2012;34(4):416-422.
- 141. Finan MC, Connolly SM.** Sebaceous gland tumors and systemic disease: a clinicopathologic analysis. *Medicine (Baltimore).* 1984;63:232-242.
- 142. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR et al.** The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993; 75(5): 1027-1038.
- 143. Ford JM, Whittemore AS.** Predicting and preventing hereditary colorectal cancer. *JAMA* 2006;296:1521-1523. [PubMed: 17003401]
- 144. Foulkes WD, Thiffault I, Gruber SB, et al.** The founder mutation MSH2\*1906G->C is an important cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Hum Genet* 2002;71:1395-1412. [PubMed: 12454801]
- 145. Fraumeni JF Jr, Vogel CL, Easton JM.** Sarcomas and multiple polyposis in a kindred. A genetic variety of hereditary polyposis? *Arch. Intern. Med.* 121: 57-61, 1968.
- 146. Friedl W, Caspari R, Sengteller M et al.** Can APC mutation analysis contribute to therapeutic decisions in familial adenomatous polyposis? Experience from 680 FAP families. *Gut.* 2001;48:515-21.
- 147. Froggatt NJ, Koch J, Davies R, et al.** Genetic linkage analysis in hereditary non-polyposis colon cancer syndrome. *J Med Genet* 1995;32:352-357. [PubMed: 7616541]
- 148. Funkhouser WK Jr, Lubin IM, Monzon FA et al.** Relevance, pathogenesis, and testing algorithm for mismatch repair-defective colorectal carcinomas: a report of the association for molecular pathology. *J Mol Diagn* 2012; 14(2): 91-103. doi: 10.1016/j.jmoldx.2011.11.001.
- 149. Gallinger S, Aronson M, Shayan K, et al.** Gastrointestinal cancers and neurofibromatosis type 1 features in children with a germline homozygous MLH1 mutation. *Gastroenterology* 2004;126:576-585. [PubMed: 14762794]
- 150. Garber JE, Li FP, Kingston JE, et al.** Hepatoblastoma and familial adenomatous polyposis. *J. Nat. Cancer Inst.* 80: 1626-1628, 1988. Note: Erratum: *J. Nat. Cancer Inst.* 81: 461 only, 1989.
- 151. Gardner JE.** A genetic and clinical study of intestinal polyposis, a predisposing factor for carcinoma of the colon and rectum. *Am. J. Hum. Genet.* 3: 167-176, 1951.
- 152. Gardner JE.** Follow-up study of a family group exhibiting dominant inheritance for a syndrome including intestinal polyps, osteomas, fibromas and epidermal cysts. *Am. J. Hum. Genet.* 14: 376-390, 1962.
- 153. Gardner JE, Plenk HP.** Hereditary pattern for multiple osteomas in a family group. *Am. J. Hum. Genet.* 4: 31-36, 1952.
- 154. Gazzoli I, Loda M, Garber J et al.** A hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma case associated with hypermethylation of the MLH1 gene in normal tissue and loss of heterozygosity of the unmethylated allele in the resulting microsatellite instability-high tumor. *Cancer Res* 2002; 62(14): 3925-3928. [PubMed: 12124320]
- 155. Genetic testing for colon cancer:** joint statement of the American College of Medical Genetics and American Society of Human Genetics. Joint Test and Technology Transfer Committee Working Group. *Genet Med* 2000;2:362-366.
- 156. Gerretsen AL, Beemer FA, Deenstra W, et al.** Familial cutaneous cylindromas: investigations in five generations of a family. *J Am Acad Derm* 1995;33: 199-206.

- 157. Gerritzen LH, Hoogerbrugge N, Oei AL, et al.** Improvement of endometrial biopsy over transvaginal ultrasound alone for endometrial surveillance in women with Lynch syndrome. *Fam Cancer* 2009;8:391–397.
- 158. Giardiello FM, Allen JI, Axilbund JE, et al.** Guidelines on genetic evaluation and management of Lynch syndrome: a consensus statement by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Dis Colon Rectum*. 2014 Aug;57(8):1025-48.
- 159. Giardiello FM, Brensinger JD, Petersen GM.** AGA technical review on hereditary colorectal cancer and genetic testing. *Gastroenterology* 2001;121:198–213.
- 160. Giardiello, FM, Offerhaus, GJA, Krush, AJ, et al.** Risk of hepatoblastoma in familial adenomatous polyposis. *J. Pediat.* 119: 766-768, 1991.
- 161. Gille JJ, Hogervorst FB, Pals G, et al.** Genomic deletions of MSH2 and MLH1 in colorectal cancer families detected by a novel mutation detection approach. *Br J Cancer*. 2002;87(8):892-7.
- 162. Gismondi V, Meta M, Bonelli L, et al.** Prevalence of the Y165C, G382D and 1395delGGA germline mutations of the MYH gene in Italian patients with adenomatous polyposis coli and colorectal adenomas. *Int J Cancer* 2004;109:680–684.
- 163. Go JW, Kim SH, Yi SY, Cho HK.** Basal cell nevus syndrome showing several histologic types of basal cell carcinoma. *Ann Dermatol*. 2011;23(suppl 1):S36–S40.
- 164. Goel A, Nagasaka T, Arnold CN, et al.** The CpG island methylator phenotype and chromosomal instability are inversely correlated in sporadic colorectal cancer. *Gastroenterology* 2007;132:127–138. [PubMed: 17087942]
- 165. Gool van IC, Eggink FA, Freeman-Mills L, et al.** POLE Proofreading Mutations Elicit an Antitumor Immune Response in Endometrial Cancer. *Clin Cancer Res*. 2015 Jul 15;21(14):3347-55. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0057. Epub 2015 Apr 15.
- 166. Gorlin RJ, Cohen MMJr, Condon LM, et al.** Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome. *Am J Med Genet* 1992;44: 307-314.
- 167. Gorlin RJ, Goltz RW.** Multiple nevoid basal-cell epithelioma, jaw cysts and bifid rib: a syndrome. *New Eng J Med* 1960;262: 908-912.
- 168. Goudie DR, D'Alessandro M, Merriman B, et al.** Multiple self-healing squamous epithelioma is caused by a disease-specific spectrum of mutations in TGFBR1. *Nature Genet* 2011;43: 365-369.
- 169. Grabowski M, Mueller-Koch Y, Grasbon-Frodl E, et al.** Deletions account for 17% of pathogenic germline alterations in MLH1 and MSH2 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) families. *Genet Test*. 2005;9(2):138-46.
- 170. Grady WM.** Molecular basis for subdividing hereditary colon cancer? *Gut*. 2005;54(12):1676-8.
- 171. Graham R, McKee P, McGibbon D et al.** Torre-Muir syndrome. An association with isolated sebaceous carcinoma. *Cancer* 1985; 55(12): 2868-2873.
- 172. Green J, O'Driscoll M, Barnes A, et al.** Impact of gender and parent of origin on the phenotypic expression of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in a large Newfoundland kindred with a common MSH2 mutation. *Dis Colon Rectum* 2002;45:1223–1232. [PubMed: 12352241]
- 173. Green RC, Parfrey PS, Woods MO, et al.** Prediction of Lynch syndrome in consecutive patients with colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:331–340.
- 174. Greer JAJr, Devine KD, Dahlin DC.** Gardner's syndrome and chondrosarcoma of the hyoid bone. *Arch. Otolaryng.* 103: 425-427, 1977.
- 175. Grindedal EM, Moller P, Eeles R, et al.** Germ-line mutations in mismatch repair genes associated with prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18:2460–2467.
- 176. Groden J, Thliveris A, Samowitz W, et al.** Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 1991;66: 589–600.

- 177. Grover S, Sygal S.** Risk assessment, genetic testing and management of Lynch syndrome. *J NCCN* 2010;8:98–105.
- 178. Gruber SB.** Cancer genetics: lesions from colorectal cancer. In: Kelsen DP, Daly JM, Kern SE, et al., eds. *Gastrointestinal oncology: principles and practice*. Philadelphia, PA: Lippincott William and Wilkins, 2002:1635–1639.
- 179. Gryfe R, Di Nicola N, Lal G, et al.** Inherited colorectal polyposis and cancer risk of the APC I1307K polymorphism. *Am J Hum Genet* 1999;64:378-384.
- 180. Gryfe R, Kim H, Hsieh ETK, et al.** Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000;342:69–77. [PubMed: 10631274]
- 181. Haanstra JF, de Vos Tot Nederveen Cappel WH, Gopie JP, et al.** Quality of life after surgery for colon cancer in patients with Lynch syndrome: partial versus subtotal colectomy. *Dis Colon Rectum* 2012;55:653–659.
- 182. Halvarsson B, Lindblom A, Rambech E et al.** Microsatellite instability analysis and/or immunostaining for the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer? *Virchows Arch* 2004; 444(2): 135-141.
- 183. Hamilton SR, Aaltonen LA, editors.** *Tumours of the digestive system*. Lyon: IARC Press; 2000.
- 184. Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, et al.** The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med*. 1995;332(13):839-7.
- 185. Hampel H, Frankel WL, Martin E, et al.** Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:5783–5788. [PubMed: 18809606]
- 186. Hampel H, Frankel WL, Martin E, et al.** Screening for Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med* 2005;352:1851–1860. [PubMed: 15872200]
- 187. Hampel H, Frankel W, Panescu J, et al.** Screening for Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) among endometrial cancer patients. *Cancer Res* 2006; 66(15): 7810-7817.
- 188. Hampel H, Stephens JA, Pukkala E, et al.** Cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: later age of onset. *Gastroenterology* 2005;129:415–421.
- 189. Handra-Luca A, Condroyer C, de Moncuit C, et al.** Vessels' morphology in SMAD4 and BMPR1A-related juvenile polyposis. *Am J Med Genet* 2005;138A: 113-117.
- 190. Hang JF, Li AF, Chang SC, et al.** Immunohistochemical detection of BRAF V600E mutant protein in colorectal cancers in Taiwan is highly concordant with the molecular test. *Histopathology*. 2015 Nov 20. doi: 10.1111/his.12903.
- 191. Happle R.** Hornstein-Birt-Hogg-Dube syndrome: a renaming and reconsideration. *Am J Med Genet* 2012;158A:1247-1251.
- 192. Harding CO, Pagon RA.** Incidence of tuberous sclerosis in patients with cardiac rhabdomyoma. *Am J Med Genet* 1990;37: 443-446.
- 193. Hare HH, Mahendraker N, Sarwate S, et al.** Muir-Torre syndrome: rare but important disorder. *Cutis*. 2008;82(4):252–256.
- 194. Hartman DJ, Brand RE, Hu H, et al.** Lynch syndrome-associated colorectal carcinoma: frequent involvement of the left colon and rectum and late-onset presentation supports a universal screening approach. *Hum Pathol*. 2013;44:2518–2528.
- 195. Haugen AC, Goel A, Yamada K, et al.** Genetic instability caused by loss of MutS homologue 3 in human colorectal cancer. *Cancer Res* 2008;68:8465–8472. [PubMed: 18922920]
- 196. Hawn MT, Umar A, Carethers JM, et al.** Evidence for a connection between the mismatch repair system and the G2 cell cycle checkpoint. *Cancer Res* 1995;55:3721–3725. [PubMed: 7641183]



- 197. Hegde MR, Chong B, Blazo ME et al.** A homozygous mutation in MSH6 causes Turcot syndrome. *Clin Cancer Res* 2005; 11(13): 4689-4693.
- 198. Heimann A, White PF, Riely CA, et al.** Hepatoblastoma presenting as isosexual precocity: the clinical importance of histologic and serologic parameters. *J. Clin. Gastroent.* 9: 105-110, 1987.
- 199. Heitzer E, Tomlinson I.** Replicative DNA polymerase mutations in cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2014 Feb;24:107-13. doi: 10.1016/j.gde.2013.12.005. Epub 2014 Feb 26.
- 200. Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, et al.** A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature* 1998;391: 184–187.
- 201. Hendriks YM, Jagmohan-Changur S, van der Klift HM et al.** Heterozygous mutations in PMS2 cause hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome). *Gastroenterology* 2006; 130(2): 312-322.
- 202. Hendriks YMC, Wagner A, Morreau H, et al.** Cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer due to MSH6 mutations: impact on counseling and surveillance. *Gastroenterology* 2004;127:17–25. [PubMed: 15236168]
- 203. Herrera L, Kakati S, Gibas L, et al.** Brief clinical report: Gardner’s syndrome in a man with an interstitial deletion of 5q. *Am J Med Genet* 1986;25:473–476. [PubMed: 3789010]
- 204. Herzberg JJ, Wiskemann A.** Die fuenfte Phakomatose. Basalzellnaevus mit familiaerer Belastung und Medulloblastom. *Dermatologica* 1963;126: 106-123.
- 205. 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. [PubMed: 12800209]
- 206. Hitchins MP, Ward RL.** Constitutional (germline) MLH1 epimutation as an aetiological mechanism for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 2009;46:793–802.
- 207. Hitchins M, Williams R, Cheong K, et al.** MLH1 germline epimutations as a factor in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2005;129(5):1392-9. [PubMed: 16285940]
- 208. Hitchins MP, Wong JJ, Suthers G, et al.** Inheritance of a cancer-associated MLH1 germ-line epimutation. *N Engl J Med.* 2007; 356(7): 697-705.
- 209. Hoffmann DC, Brooke BN.** Familial sarcoma of bone in a polyposis coli family. *Dis. Colon Rectum* 13: 119-120, 1970.
- 210. Holtzman NA.** Promoting safe and effective genetic testing in the United States: work of the task force on genetic testing. *Clin Chem* 1999;45:732–738.
- 211. Honchel R, Halling KC, Schaid DJ, et al.** Microsatellite instability in Muir-Torre syndrome. *Cancer Res.* 1994;54(5):1159–1163.
- 212. Hornstein OP, Knickenberg M.** Perifollicular fibromatosis cutis with polyps of the colon--a cutaneo-intestinal syndrome sui generis. *Arch Derm Res* 1975;253: 161-175.
- 213. Houlston R, Crabtree M, Phillips R et al.** Explaining differences in the severity of familial adenomatous polyposis and the search for modifier genes. *Gut.* 2001;48:1–5.
- 214. Howe JR, Roth S, Ringold JC, et al.** Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. *Science* 1998;280: 1086–1088.
- 215. Huang J, Kuismanen SA, Liu T, et al.** MSH6 and MSH3 are rarely involved in genetic predisposition to nonpolyptotic colon cancer. *Cancer Res.* 2001;61(4):1619-23.
- 216. Hughes LJ, Michels VV.** Risk of hepatoblastoma in familial adenomatous polyposis. *Am. J. Med. Genet.* 43: 1023-1025, 1992.
- 217. Hurlstone DP, Karajeh M, Cross SS, et al.** The role of high-magnification-chromoscopic colonoscopy in hereditary nonpolyposis colorectal cancer screening: A prospective “back-to-back” endoscopic study. *Am J Gastroenterol* 2005;100:2167–2173. [PubMed: 16181364]

- 218. Hyde A, Fontaine D, Stuckless S et al.** A histology-based model for predicting microsatellite instability in colorectal cancers. *Am J Surg Pathol* 2010; 34(12): 1820-1829. doi: 10.1097/PAS.0b013e3181f6a912.
- 219. Iaccarino I, Marra G, Palombo F, et al.** hMSH2 and hMSH6 play distinct roles in mismatch binding and contribute differently to the ATPase activity of hMutSalpha. *EMBO J*. 1998;17(9):2677-86.
- 220. International Agency for Research on Cancer.** Globocan 2002. 2008 [accessed on: 25 November 2008.]. Available at: <http://www-dep.iarc.fr/>
- 221. Ionov YM, Peinado MA, Malkhosyan S, et al.** Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993;363:558–561. [PubMed: 8505985]
- 222. Issa JP, Ahuja N, Toyota M, et al.** Accelerated age-related CpG island methylation in ulcerative colitis. *Cancer Res* 2001;61:3573–3577. [PubMed: 11325821]
- 223. Issa JP, Baylin SB, Belinsky SA.** Methylation of the estrogen receptor CpG island in lung tumors is related to the specific type of carcinogen exposure. *Cancer Res* 1996;56:3655–3658. [PubMed:8706002]
- 224. Itoh H, Hirata K, Ohsato K.** Turcot's syndrome and familial adenomatous polyposis associated with brain tumor: review of related literature. *Int J Colorectal Dis* 1993;8:87-94.
- 225. Itoh H, Ohsato K, Yao T, et al.** Turcot's syndrome and its mode of inheritance. *Gut* 1979;20:414-419.
- 226. Itoh H, Ohsato K.** Turcot syndrome and its characteristic colonic manifestations. *Dis Colon rectum* 1985;28:399-402.
- 227. Iyer RR, Pluciennik A, Burdett V, et al.** DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem Rev*. 2006;106(2):302-23.
- 228. Jacob S, Aguado M, Fallik D, et al.** The role of the DNA mismatch repair system in the cytotoxicity of the topoisomerase inhibitors camptothecin and etoposide to human colorectal cancer cells. *Cancer Res* 2001;61:6555–6562. [PubMed: 11522654]
- 229. Jaeger E, Leedham S, Lewis A, et al.** Hereditary mixed polyposis syndrome is caused by a 40-kb upstream duplication that leads to increased and ectopic expression of the BMP antagonist GREM1. *Nature Genet* 2012;44: 699-703.
- 230. Jaeger E, Webb E, Howarth K, et al.** Common genetic variants at the CRAC1 (HMPS) locus on chromosome 15q13.3 influence colorectal cancer risk. *Nature Genet* 2008;40: 26-31.
- 231. Jaeger EEM, Woodford-Richens KL, Lockett M, et al.** An ancestral Ashkenazi haplotype at the HMPS/CRAC1 locus on 15q13-q14 is associated with hereditary mixed polyposis syndrome. *Am J Hum Genet* 2003;72: 1261-1267.
- 232. Jamjoom ZAB, Sadiq S, Mofti AB, et al.** Turcot syndrome: report of a case and review of the literature. *International Surgery*, vol. 74, no. 1, pp. 45–50, 1989.
- 233. Järvinen HJ, Aarnio M, Mustonen H, et al.** Controlled 15-year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 2000;118:829–834. [PubMed: 10784581]
- 234. Järvinen HJ, Mecklin JP, Sistonen P.** Screening reduces colorectal cancer rate in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 1995;108:1405–1411.
- 235. Järvinen HJ, Peltokallio P, Landtman M, et al.** Gardner's stigmata in patients with familial adenomatous coli. *Brit. J. Surg.* 69: 718-721, 1982.
- 236. Järvinen HJ, Renkonen-Sinisalo L, Aktán-Collán K, et al.** Ten years after mutation testing for Lynch syndrome: cancer incidence and outcome in mutation-positive and mutation-negative family members. *J Clin Oncol* 2009;27:4793–4797.

- 237. Jass JR.** Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007;50:113–130. [PubMed: 17204026]
- 238. Jass JR.** Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer: the rise and fall of a confusing term. *World J Gastroenterol.* 2006;12(31):4943-50.
- 239. Jass JR, Do K-A, Simms LA, et al.** Morphology of sporadic colorectal cancer with DNA replication errors. *Gut* 1998;42:673–679. [PubMed: 9659163]
- 240. Jass JR, Smyrk TC, Stewart SM, et al.** Pathology of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Anticancer Res* 1994;14:1631–1634. [PubMed: 7979198]
- 241. Jass JR, Stewart SM.** Evolution of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut* 1992; 33(6): 783-786.
- 242. Jegers H, McKusick VA, Katz KH.** Generalized intestinal polyposis and melanin spots of the oral mucosa, lips and digits. *New Eng J Med* 1949;241: 993-1005 and 1031-1036.
- 243. Jenkins MA, Baglietto L, Dowty JG et al.** Cancer risks for mismatch repair gene mutation carriers: a population-based early onset case-family study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4(4): 489-498.
- 244. Jenkins MA, Hayashi S, O'Shea AM et al.** Pathology features in Bethesda guidelines predict colorectal cancer microsatellite instability: a population-based study. *Gastroenterology* 2007; 133(1): 48-56.
- 245. Jin M, Hampel H, Zhou X, et al.** BRAF V600E mutation analysis simplifies the testing algorithm for Lynch syndrome. *Am J Clin Pathol.* 2013;140:177–183.
- 246. Jiricny J.** Mediating mismatch repair. *Nat Genet.* 2000;24(1):6-8.
- 247. Jo WS, Bandipalliam P, Shannon KM, et al.** Correlation of polyp number and family history of colon cancer with germline MYH mutations. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2005;3: 1022–1028.
- 248. Johns LE, Houlston RS.** A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *Am J Gastroenterol.* 2001;96:2292–3003.
- 249. Jong de AE, Hendriks YMC, Kleibeuker JH, et al.** Decrease in mortality in Lynch syndrome families because of surveillance. *Gastroenterology* 2006;130:665–671. [PubMed: 16530507]
- 250. Jover R, Zapater P, Castells A, et al.** Mismatch repair status in the prediction of benefit from adjuvant fluorouracil chemotherapy in colorectal cancer. *Gut* 2006;55:848–855. [PubMed: 16299036]
- 251. Kacerovská D, Kazakov DV, Černá K et al.** Muir-Torre syndrom - a phenotypic variant of Lynch syndrome. *Cesk Patol* 2010;46(4): 86-94.
- 252. Kalady MF, Jarrar A, Leach B, et al.** Defining phenotypes and cancer risk in hyperplastic polyposis syndrome. *Dis Colon Rectum.* 2011 Feb;54(2):164-70. doi: 10.1007/DCR.0b013e3181fd4c15.
- 253. Kalady MF, Lipman J, McGannon E, et al.** Risk of colonic neoplasia after proctectomy for rectal cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Ann Surg* 2012;255:1121–1125.
- 254. Kámory E, Kolacsek O, Ottó S et al.** HMLH1 and hMSH2 somatic inactivation mechanisms in sporadic colorectal cancer patients. *Pathol Oncol Res* 2003; 9(4): 236-241.
- 255. Kane MF, Loda M, Gaida GM, et al.** Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res* 1997;57:808–811. [PubMed: 9041175]
- 256. Kang SY, Park CK, Chang DK, et al.** Lynch-like syndrome: characterization and comparison with EPCAM deletion carriers. *Int J Cancer.* 2015 Apr 1;136(7):1568-78. doi: 10.1002/ijc.29133. Epub 2014 Aug 22.

- 257. Karran P, Bignami M.** DNA damage tolerance, mismatch repair and genome instability. *Bioessays* 1994;16:833–839. [PubMed: 7840761]
- 258. Kastrinos F, Mukherjee B, Tayob N, et al.** Risk of pancreatic cancer in families with Lynch syndrome. *JAMA* 2009;302: 1790–1795.
- 259. Kastrinos F, Steyerberg EW, Mercado R, et al.** The PREMM(1,2,6) model predicts risk of MLH1, MSH2, and MSH6 germline mutations based on cancer history. *Gastroenterology* 2011;140:73–14081.
- 260. Kastrinos F, Steyerberg EW, Balmaña J, et al.** Comparison of the clinical prediction model PREMM(1,2,6) and molecular testing for the systematic identification of Lynch syndrome in colorectal cancer. *Gut* 2013;62:272–279.
- 261. Kastrinos F, Stoffel EM, Balmaña J et al.** Phenotype comparison of MLH1 and MSH2 mutation carriers in a cohort of 1,914 individuals undergoing clinical genetic testing in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17(8): 2044-2051. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0301.
- 262. Kazakov DV, Vanecek T, Zelger B, et al.** Multiple (familial) trichoepitheliomas: a clinicopathologic and molecular biological study, including CYLD and PTCH gene analysis, of a series of 16 patients. *Am J Dermatopathol.* 2011;33(3):251–265.
- 263. Kempers MJ, Kuiper RP, Ockeloen CW, et al.** Risk of colorectal and endometrial cancers in EPCAM deletion-positive Lynch syndrome: a cohort study. *Lancet Oncol* 2011;12:49–55.
- 264. Kilpivaara O, Alhopuro P, Vahteristo P, et al.** CHEK2 I157K associates with familial and sporadic colorectal cancer. *J Med Genet* 2006;43:e34. [PubMed: 16816021]
- 265. Kingston JE, Draper GJ, Mann JR.** Hepatoblastoma and polyposis coli. (Letter) *Lancet* 319: 457 only, 1982. Note: Originally Volume 1.
- 266. Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, et al.** Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 1991;253: 661–665.
- 267. Klemmer S, Pascoe L, DeCosse J.** Occurrence of desmoids in patients with familial adenomatous polyposis of the colon. *Am. J. Med. Genet.* 28: 385-392, 1987.
- 268. Klift van der H, Wijnen J, Wagner A et al.** Molecular characterization of the spectrum of genomic deletions in the mismatch repair genes MSH2, MLH1, MSH6, and PMS2 responsible for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 44(2): 123-138.
- 269. Knudson AG.** Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(23):10914-21.
- 270. Koi M, Umar A, Chauhan DP, et al.** Human chromosome 3 corrects mismatch repair deficiency and microsatellite instability and reduces N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine tolerance in colon tumor cells with homozygous hMLH1 mutation. *Cancer Res* 1994;54:4308–4312. [PubMed: 8044777]
- 271. Kolodner RD, Marsischky GT.** Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr Opin Genet Dev.* 1999;9(1):89-96.
- 272. Kolodner RD, Tytell JD, Schmeits JL, et al.** Germ-line msh6 mutations in colorectal cancer families. *Cancer Res.* 1999;59(20):5068-74.
- 273. Koornstra JJ, Mourits MJ, Sijmons RH, et al.** Management of extracolonic tumours in patients with Lynch syndrome. *The Lancet Oncology*, vol. 10, no. 4, pp. 400–408, 2009.
- 274. Korhonen MK, Vuorenmaa E, Nyström M.** The first functional study of MLH3 mutations found in cancer patients. *Genes Chromosomes Cancer.* 2008 Sep;47(9):803-9. doi: 10.1002/gcc.20581.
- 275. Kovacs G, Akhtar M, Beckwith BJ, et al.** The Heidelberg classification of renal cell tumors. *J Pathol* 1997;183: 131-133.

- 276. Kovacs ME, Papp J, Szentirmay Z et al.** Deletions removing the last exon of TACSTD1 constitute a distinct class of mutations predisposing to Lynch syndrome. *Hum Mutat* 2009; 30(2): 197-203. doi: 10.1002/humu.20942.
- 277. Kruse R, Rütten A, Hosseiny-Malayeri HR et al.** "Second hit" in sebaceous tumors from Muir-Torre patients with germline mutations in MSH2: allele loss is not the preferred mode of inactivation. *J Invest Dermatol* 2001; 116(3): 463-465.
- 278. Krush AJ, Traboulsi EI, Offerhaus GJA, et al.** Hepatoblastoma, pigmented ocular fundus lesions and jaw lesions in Gardner syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 29: 323-332, 1988.
- 279. Kwon JS, Sun CC, Peterson SK, et al.** Cost-effectiveness analysis of prevention strategies for gynecologic cancers in Lynch syndrome. *Cancer* 2008;113:326–335.
- 280. Laghi L, Bianchi P, Roncalli M, et al.** Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:1402–1403. [PubMed: 15367575]
- 281. LaGuardia L, O'Malley M, Milas M, et al.** Cleveland Clinic study: Uncovering the hidden risk of thyroid cancer in MYH-associated polyposis. Abstract 12. Montreal, Canada: 15th Annual Meeting of the Collaborative Group of the Americas on Inherited Colorectal Cancer. 2011.
- 282. Laken S, Petersen GM, Gruber SB. et al.** Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in APC. *Nat Genet* 1997;17:79-83.
- 283. Lasser DM, De Vivo DC, Garvin J, et al.** Turcot's syndrome: evidence for linkage to the adenomatous polyposis coli (APC) locus. *Neurology* 1994;44:1083-1086.
- 284. Leach FS, Nicolaidis NC, Papadopoulos N et al.** Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993; 75(6): 1215-1225. [PubMed: 8261515]
- 285. Lecomte T, Cellier C, Meatchi T, et al.** Chromoendoscopic colonoscopy for detecting preneoplastic lesions in hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005;3:897–902. [PubMed: 16234028]
- 286. Lécuru F, Le Frère Belda MA, Bats AS, et al.** Performance of office hysteroscopy and endometrial biopsy for detecting endometrial disease in women at risk of human non-polyposis colon cancer: a prospective study. *Int J Gynecol Cancer* 2008;18:1326–1331.
- 287. Lee BA, Yu L, Ma L, et al.** Sebaceous neoplasms with mismatch repair protein expressions and the frequency of co-existing visceral tumors. *J Am Acad Dermatol.* 2012;67(6):1228–1234.
- 288. Lee DA, Grossman ME, Schneiderman P, et al.** Genetics of skin appendage neoplasms and related syndromes. *J Med Genet* 2005;42: 811-819.
- 289. Lee SY, Chung H, Devaraj B, et al.** Microsatellite alterations at selected tetranucleotide repeats are associated with morphologies of colorectal neoplasias. *Gastroenterology* 2010;139:1519–1525.
- 290. Lefevre JH, Parc Y, Svrcek M et al.** APC, MYH, and the correlation genotype-phenotype in colorectal polyposis. *Ann Surg Oncol.* 2009;16:871-877.
- 291. Le Guyadec T, Dufau J-P, Poulain J-F, et al.** Multiple trichodiscomas associated with intestinal polyposis. *Ann Derm Venereol* 1998;125: 717-719.
- 292. Lewis JH, Ginsberg AL, Toomey KE.** Turcot's syndrome: evidence for autosomal dominant inheritance. *Cancer* 1983;51:524-528.
- 293. Li FP, Thurber WA, Seddon J, et al.** Hepatoblastoma in families with polyposis coli. *JAMA* 257: 2475-2477, 1987.
- 294. Ligtenberg MJ, Kuiper RP, ChanTL et al.** Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat Genet* 2009; 41(1): 112-117. doi: 10.1038/ng.283.

- 295. Lindblom A, Tannergard P, Werelius B, et al.** Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 1993;5:279–282. [PubMed: 7903889]
- 296. Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, et al.** Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol* 2002;20:1043–1048. [PubMed: 11844828]
- 297. Lindor NM, Petersen GM, Hadley DW, et al.** Recommendations for the care of individuals with an inherited predisposition to Lynch syndrome: A systematic review. *JAMA* 2006;296:1507–1517. [PubMed: 17003399]
- 298. Lindor NM, Rabe K, Petersen GM et al.** Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. *JAMA* 2005; 293(16) :1979-1985. [PubMed: 15855431]
- 299. Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, et al.** Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med.* 1996;2(2):169-74.
- 300. Liu B, Parsons RE, Hamilton SR, et al.** hMSH2 mutations in hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindreds. *Cancer Res* 1994;54:4590–4594. [PubMed: 8062247]
- 301. Liu B, Farrington SM, Petersen GM, et al.** Genetic instability occurs in the majority of young patients with colorectal cancer. *Nat Med* 1995;1:348–352. [PubMed: 7585065]
- 302. Liu HX, Zhou XL, Liu T, et al.** The role of hMLH3 in familial colorectal cancer. *Cancer Res* 2003;63:1894–1899.
- 303. Liu T, Yan H, Kuismanen S et al.** The role of hPMS1 and hPMS2 in predisposing to colorectal cancer. *Cancer Res* 2001; 61(21): 7798-7802.
- 304. Lloyd KM, Dennis M.** Cowden's disease: a possible new symptom complex with multiple system involvement. *Ann. Intern. Med.* 1963;58: 136-142.
- 305. Locker GY, Kaul K, Weinberg DS, et al.** The I1307K APC polymorphism in Ashkenazi Jews with colorectal cancer: clinical and pathologic features. *Cancer Genet Cytogenet.* 2006 Aug;169(1):33-8.
- 306. Lockhart-Mummery P.** Cancer and heredity. *Lancet* 1925;i:427–429.
- 307. Lotsari JE, Gylling A, Abdel-Rahman WM, et al.** Breast carcinoma and Lynch syndrome: molecular analysis of tumors arising in mutation carriers, non-carriers, and sporadic cases. *Breast Cancer Res.* 2012 Jun 12;14(3):R90.
- 308. Loukola A, Vilkkki S, Singh J, et al.** Germline and somatic mutation analysis of MLH3 in MSI-positive colorectal cancer. *Am J Pathol.* 2000;157(2):347-52.
- 309. Luschka H.** Ueber polypose Vegetationen der gesammten Dickdarmschleimhaut. *Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* 1861;20:133–142.
- 310. Lusic EA, Travers S, Jost SC, et al.** Glioblastomas with giant cell and sarcomatous features in patients with turcot syndrome type 1: a clinicopathological study of 3 cases. *Neurosurgery*, vol. 67, no. 3, pp. 811–817, 2010.
- 311. Lynch HT.** Family Information Service and hereditary cancer. *Cancer* 2001;91:625–628. [PubMed:11241226]
- 312. Lynch HT, Chapelle de la A.** Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet.* 1999;36(11):801-18. [PubMed:10544223]
- 313. Lynch HT, Chapelle de la A.** Genomic medicine: hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003;348:919–932. [PubMed: 12621137]
- 314. Lynch HT, Coronel SM, Okimoto R.** A founder mutation of the MSH2 gene and hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the United States. *JAMA* 2004;291:718–724. [PubMed: 14871915]
- 315. Lynch HT, Drouhard TJ, Schuelke GS et al.** Hereditary nonpolyposis colorectal cancer in a Navajo Indian family. *Cancer Genet Cytogenet* 1985; 15(3-4): 209-213 .

- 316. Lynch HT, Fusaro RM, Roberts L et al.** Muir-Torre syndrome in several members of a family with a variant of the Cancer Family Syndrome. *Br J Dermatol* 1985; 113(3): 295-301.
- 317. Lynch HT, Krush AJ.** Cancer family "G" revisited: 1895-1970. *Cancer* 1971; 27(6):1505-1511.
- 318. Lynch HT, Lynch PM.** Clinical selection of candidates for mutational testing for cancer susceptibility. *Oncology* 2006;20:29–34. [PubMed: 17354515]
- 319. Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ et al.** Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin Genet.* 2009 Jul;76(1):1-18. doi: 10.1111/j.1399-0004.2009.01230.x.
- 320. Lynch HT, Riegert-Johnson DL, Snyder C, et al.** Lynch syndrome-associated extracolonic tumors are rare in two extended families with the same EPCAM deletion. *Am J Gastroenterol* 2011;106:1829–1836.
- 321. Lynch HT, Shaw MW, Magnuson CW et al.** Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds. *Arch Intern Med* 1966; 117(2): 206-212.
- 322. Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, et al.** Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an update review. *Gastroenterology* 1993;104:1535–1549.
- 323. Lynch HT, Smyrk T, McGinn T et al.** Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP). A phenotypically and genotypically distinctive variant of FAP. *Cancer.* 1995;76:2427–33.
- 324. Mangold E, Pagenstecher C, Leister M et al.** A genotype-phenotype correlation in HNPCC: strong predominance of msh2 mutations in 41 patients with Muir-Torre syndrome. *J Med Genet* 2004; 41(7): 567-572.
- 325. Marcus V, Madlensky L, Gryfe R, et al.** Immunohistochemistry for hMLH1 and hMSH2: A practical test for DNA mismatch repair-deficient tumors. *Am J Surg Pathol* 1999;23:1248–1255. [PubMed: 10524526]
- 326. Mas-Moya J, Dudley B, Brand RE, et al.** Clinicopathological comparison of colorectal and endometrial carcinomas in patients with Lynch-like syndrome versus patients with Lynch syndrome. *Hum Pathol.* 2015 Nov;46(11):1616-25. doi: 10.1016/j.humpath.2015.06.022. Epub 2015 Jul 8.
- 327. Mathers JC, Movahedi M, Macrae F, et al.** Long-term effect of resistant starch on cancer risk in carriers of hereditary colorectal cancer: an analysis from the CAPP2 randomized controlled trial. *Lancet Oncol* 2012;13: 1242–1249.
- 328. Mathiak M, Rütten A, Mangold E et al.** Loss of DNA mismatch repair proteins in skin tumors from patients with Muir-Torre syndrome and MSH2 or MLH1 germline mutations: establishment of immunohistochemical analysis as a screening test. *Am J Surg Pathol* 2002; 26(3): 338-343.
- 329. Matthews JJ, Roberts R, O'Reilly DA, et al.** Muir-Torre syndrome: a case for surveillance of the ampulla of Vater. *Digestive Surgery*, vol. 19, no. 1, pp. 65–66, 2002.
- 330. McGivern A, Wynter CV, Whitehall VL, et al.** Promoter hypermethylation frequency and BRAF mutations distinguish hereditary non-polyposis colon cancer from sporadic MSI-H colon cancer. *Fam Cancer.* 2004;3:101–107.
- 331. McLaughlin MR, Gollin SM, Lese CM, et al.** Medulloblastoma and glioblastoma multiforme in a patient with Turcot syndrome: a case report. *Surgical Neurology*, vol. 49, no. 3, pp. 295–301, 1998.
- 332. McMaster ML, Goldstein AM, Parry DM.** Clinical features distinguish childhood chordoma associated with tuberous sclerosis complex (TSC) from chordoma in the general paediatric population. *J Med Genet* 2011;48: 444-449.

- 333. Mecklin J-P, Aarnio M, Läärä E, et al.** Development of colorectal tumors in colonoscopic surveillance in Lynch syndrome. *Gastroenterology* 2007;133:1093–1098. [PubMed: 17919485]
- 334. Mecklin J-P, Jarvinen HJ, Virolainen M.** The association between cholangiocarcinoma and hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma. *Cancer*, vol. 69, no. 5, pp. 1112–1114, 1992.
- 335. Medeiros F, Lindor MN, Couch JM, et al.** The germline MLH1 K618A variant and susceptibility to Lynch syndrome-associated tumors. *J Mol Diagn.* 2012 May; 14(3):264-73.
- 336. Meijers-Heijboer H, Wijnen J, Vasen H, et al.** The CHEK2 1100delC mutation identifies families with a hereditary breast and colorectal cancer phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* 72: 1308-1314, 2003.
- 337. Mills AM, Sloan EA, Thomas M, et al.** Clinicopathologic Comparison of Lynch Syndrome-associated and "Lynch-like" Endometrial Carcinomas Identified on Universal Screening Using Mismatch Repair Protein Immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol.* 2016 Feb;40(2):155-65. doi: 10.1097/PAS.0000000000000544.
- 338. Miyaki M, Nishio J, Konishi M, et al.** Drastic genetic instability of tumors and normal tissues in Turcot syndrome. *Oncogene.* 1997;15(23):2877-81.
- 339. Miyakura Y, Sugano K, Akasu T, et al.** Extensive but hemiallelic methylation of the hMLH1 promoter region in early-onset sporadic colon cancers with microsatellite instability. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2004;2(2):147-56.
- 340. Modrich P.** Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. *J Biol Chem.* 2006;281(41):30305-9.
- 341. Moisio A-L, Sistonen P, Weissenbach J, et al.** Age and origin of two common MLH1 mutations predisposing to hereditary colon cancer. *Am J Hum Genet* 1996:1243–1251. [PubMed: 8940269]
- 342. Monzon JG, Cremin C, Armstrong L, et al.** Validation of predictive models for germline mutations in DNA mismatch repair genes in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2010;126:930–939.
- 343. Morak M, Laner A, Scholz M, et al.** Report on de-novo mutation in the MSH2 gene as a rare event. in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008;20:1101–1105. [PubMed: 19047842]
- 344. Moreira L, Balaguer F, Lindor N, et al.** Identification of Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *JAMA* 2012;308:1555–1565.
- 345. Moreira L, Munoz J, Cuatrecasas M, et al.** Prevalence of somatic mutl homolog 1 promoter hypermethylation in Lynch syndrome colorectal cancer. *Cancer.* 2015;121:1395–1404.
- 346. Mori T, Nagase H, Horii A, et al.** Germ-line and somatic mutations of the APC gene in patients with Turcot syndrome and analysis of APC mutations in brain tumors. *Genes Chromosomes and Cancer*, vol. 9, no. 3, pp. 168–172, 1994.
- 347. Muir EG, Bell AJ, Barlow KA.** Multiple primary carcinomata of the colon, duodenum, and larynx associated with keratoacanthoma of the face. *Br J Surg.* 1967;54(3):191–195.
- 348. Muzykewicz DA, Sharma A, Muse V, et al.** TSC1 and TSC2 mutations in patients with lymphangioliomyomatosis and tuberous sclerosis complex. (Letter) *J Med Genet* 2009;46: 465-468.
- 349. Mvundura M, Grosse SD, Hampel H, et al.** The costeffectiveness of genetic testing strategies for Lynch syndrome among newly diagnosed patients with colorectal cancer. *Genet Med* 2010;12:93–104.
- 350. Myrhøj T, Andersen MB, Bernstein I.** Screening for urinary tract cancer with urine cytology in Lynch syndrome and familial colorectal cancer. *Fam Cancer* 2008;7:303–307.



- 351. National Advisory Council for Human Genome Research.** Statement on use of DNA testing for presymptomatic identification of cancer risk. *J Am Med Assoc* 1994;271:785.
- 352. National Comprehensive Cancer Network.** Practice guidelines in oncology. 2008 [Accessed on: 2 April 2008]. Available at: [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/default.asp](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.asp)
- 353. Nagasaka T, Koi M, Kloor M, et al.** Mutations in both KRAS and BRAF may contribute to the methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology* 2008;134:1950–1960. [PubMed: 18435933]
- 354. Nakagawa H, Hampel H, Chapelle de la A.** Identification and characterization of genomic rearrangements of MSH2 and MLH1 in Lynch syndrome (HNPCC) by novel techniques. *Hum Mutat.* 2003;22(3):258.
- 355. 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(14): 4721-4727.
- 356. Nakagawa H, Nagasake T, Culling HM, et al.** Efficient molecular screening of Lynch syndrome by specific 30 promoter methylation of the MLH1 or BRAF mutation in colorectal cancer with high-frequency microsatellite instability. *Oncol Rep* 2009;21:1577–1583.
- 357. Navi D, Wadhera A, Fung MA, et al.** Muir-Torre syndrome. *Dermatol Online J.* 2006;12(5):4.
- 358. Naylor EW, Gardner EJ.** Adrenal adenomas in a patient with Gardner's syndrome. *Clin. Genet.* 20: 67-73, 1981.
- 359. Naylor EW, Gardner EJ.** Penetrance and expressivity of the gene responsible for the Gardner syndrome. *Clin. Genet.* 11: 381-393, 1977.
- 360. Nickerson ML, Warren MB, Toro JR, et al.** Mutations in a novel gene lead to kidney tumors, lung wall defects, and benign tumors of the hair follicle in patients with the Birt-Hogg-Dube syndrome. *Cancer Cell* 2002;2: 157-164.
- 361. Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, et al.** Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 1994;371:75–80. [PubMed: 8072530]
- 362. Nielsen M, Franken PF, Reinards TH, et al.** Multiplicity in polyp count and extracolonic manifestations in 40 Dutch patients with MYH associated polyposis coli (MAP). *J Med Genet* 2005;42:e54.
- 363. Nielsen M, Joerink-van de Beld MC, Jones N, et al.** Analysis of MUTYH genotypes and colorectal phenotypes in patients With MUTYH-associated polyposis. *Gastroenterology.* 2009 Feb;136(2):471-6. doi: 10.1053/j.gastro.2008.10.056. Epub 2008 Oct 30.
- 364. Nielsen M, Poley JW, Verhoef S, et al.** Duodenal carcinoma in MUTYH-associated polyposis coli. *J Clin Pathol* 2006;59:1212–1215.
- 365. Nieminen TT, Abdel-Rahman WM, Ristimäki A, et al.** BMPR1A mutations in hereditary nonpolyposis colorectal cancer without mismatch repair deficiency. *Gastroenterology* 2011; 141: e23-e26 [PMID: 21640116 DOI: 10.1053/j.gastro.2011.03.063]
- 366. Nieminen TT, O'Donohue MF, Wu Y, et al.** Germline mutation of RPS20, encoding a ribosomal protein, causes predisposition to hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma without DNA mismatch repair deficiency. *Gastroenterology* 2014; 147: 595-598.e5 [PMID: 24941021 DOI: 10.1053/j.gastro.2014.06.009]
- 367. Nieuwenhuis MH, Vasen HFA.** Correlations between mutation site in APC and phenotype of familial adenomatous polyposis (FAP): A review of the literature. *Crit Rev Oncol/Hematol.* 2007;61:153–61.
- 368. Nilbert M, Therkildsen C, Nissen A, et al.** Sarcomas associated with hereditary nonpolyposis colorectal cancer: broad anatomical and morphologic spectrum. *Fam Cancer* 2009;8:209–213.

- 369. Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, et al.** Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 1991;253: 665–669.
- 370. Nystrom-Lahti M, Kristo P, Nicolaides NC, et al.** Founding mutations and Alu-mediated recombination in hereditary colon cancer. *Nat Med* 1995:1203–1206. [PubMed: 7584997]
- 371. Nyström-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): 763-769.
- 372. O'Callaghan FJK, Noakes M, Osborne JP.** Renal angiomyolipomata and learning difficulties in tuberous sclerosis complex. *J Med Genet* 2000;37: 156-157.
- 373. Office of Disease Prevention and Health Promotion.** Screening for bladder cancer. Available at: <http://odphp.osophs.dhhs.gov/pubs/guidecps/PDF/CH17.PDF>. Accessed November 1, 2013.
- 374. Offit K, Thom P.** Ethical and legal aspects of cancer genetic testing. *Semin Oncol* 2007;34:435–443. [PubMed: 17920900]
- 375. Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, et al.** CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut* 2009;58:90–96. [PubMed: 18832519]
- 376. Ohmiya N, Matsumoto S, Yamamoto H, et al.** Germline and somatic mutations in hMSH6 and hMSH3 in gastrointestinal cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Gene*. 2001;272(1-2):301-13.
- 377. Oliveira Ferreira F, Napoli Ferreira CC, Rossi BM, et al.** Frequency of extra-colonic tumors in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) and familial colorectal cancer (FCC) Brazilian families: An analysis by a Brazilian Hereditary Colorectal Cancer Institutional Registry. *Fam Cancer*. 2004;3(1):41-7.
- 378. Orta L, Klimstra DS, Qin J, et al.** Toward identification of hereditary DNA mismatch repair deficiency: sebaceous neoplasm warrants routine immunohistochemical screening regardless of patient's age or other clinical characteristics. *Am J Surg Pathol*. 2009;33(6):934–944.
- 379. Ou J, Rasmussen M, Westers H, et al.** Biochemical characterization of MLH3 missense mutations does not reveal an apparent role of MLH3 in Lynch syndrome. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009 Apr;48(4):340-50. doi: 10.1002/gcc.20644.
- 380. Padberg GW, Schot JDL, Vielvoye GJ, et al.** Lhermitte-Duclos disease and Cowden disease: a single phakomatosis. *Ann Neurol* 1991;29: 517-523.
- 381. Pai RK, Pai RK.** A Practical Approach to the Evaluation of Gastrointestinal Tract Carcinomas for Lynch Syndrome. *Am J Surg Pathol*. 2016 Apr;40(4):e17-34. doi: 10.1097/PAS.0000000000000620
- 382. Pai RK, Shadrach BL, Carver P et al.** Immunohistochemistry for annexin A10 can distinguish sporadic from Lynch syndrome-associated microsatellite-unstable colorectal carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2014; 38(4): 518– 525. doi: 10.1097/ PAS.0000000000000148.
- 383. Palles C, Cazier JB, Howarth KM, et al.** Germline mutations affecting the proofreading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas. *Nat Genet*. 2013 Feb;45(2):136-44. doi: 10.1038/ng.2503. Epub 2012 Dec 23.
- 384. Palomaki GE, McClain MR, Melillo S, et al.** EGAPP supplementary evidence review: DNA testing strategies aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome. *Genet Med* 2009:1142–1165.
- 385. Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei Y-F, et al.** Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 1994;263:1625–1629. [PubMed: 8128251]
- 386. Papp J, Kovacs ME, Olah E.** Germline MLH1 and MSH2 mutational spectrum including frequent large genomic aberrations in Hungarian hereditary non-polyposis

colorectal cancer families: implications for genetic testing. *World J Gastroenterol.* 2007;13(19):2727-32.

**387. Paraf F.** Turcot syndrome: evolution of knowledges. *Gastroenterologie Clinique et Biologique*, vol. 18, no. 3, pp. 297–299, 1994.

**388. Paraf F, Jothy S, Van Meir EG.** Brain tumor-polyposis syndrome: two genetic diseases? *Journal of Clinical Oncology*, vol. 15, no. 7, pp. 2744–2758, 1997.

**389. Park YJ, Shin KH, Park JG.** Risk of gastric cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer in Korea. *Clin Cancer Res.* 2000;6(8):2994-8.

**390. Parry S, Win AK, Parry B, et al.** Metachronous colorectal cancer risk for mismatch repair gene mutation carriers: the advantage of more extensive colon surgery. *Gut* 2011;60:950–957.

**391. Parsons MT, Buchanan DD, Thompson B, et al.** Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. *J Med Genet* (2012) 49:151–7 doi: 10.1136/jmedgenet-2011-100714

**392. Pascual-Castroviejo I, Patron M, Gutierrez M, et al.** Tuberous sclerosis associated with histologically confirmed ocular and cerebral tumors. *Pediatr Neurol* 1995;13: 172-174.

**393. Pavlovich CP, Walther MW, Eyler RA, et al.** Renal tumors in the Birt-Hogg-Dube syndrome. *Am J Surg Pathol* 2002;26:1542-1552.

**394. Peltomäki P.** Lynch syndrome genes. *Fam Cancer.* 2005;4: 227-32. [PubMed: 16136382]

**395. Peltomäki P.** Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol.* 2003;21(6):1174-9.

**396. Peltomäki P, Aaltonen L, Sistonen P.** Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science* 1993;260:810–812. [PubMed: 8484120]

**397. Peltomäki P, Lothe RA, Aaltonen LA et al.** Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res* 1993; 53(24): 5853-5855.

**398. Peltomäki P, Vasen H.** Mutations associated with HNPCC predisposition -- Update of ICG-HNPCC/INSiGHT mutation database. *Dis Markers.* 2004;20(4-5):269-76.

**399. Pereira PR, Odashiro AN, Rodrigues-Reyes AA, et al.** Histopathological review of sebaceous carcinoma of the eyelid. *J Cutan Pathol.* 2005;32(7):496–501.

**400. Petty AA, Walsh JS.** Muir-Torre syndrome: a case report and review of the literature. *Cutis.* 2005;75(3):149–155.

**401. Peutz JLA.** Very remarkable case of familial polyposis of mucous membrane of intestinal tract and nasopharynx accompanied by peculiar pigmentations of skin and mucous membrane. (Dutch). *Nederl. Maandschr. Geneesk* 1921;10: 134-146, 1921.

**402. Pistorius S, Görgens H, Plaschke J, et al.** Genomic rearrangements in MSH2, MLH1 or MSH6 are rare in HNPCC patients carrying point mutations. *Cancer Lett.* 2007;248(1):89-95.

**403. Plaschke J, Engel C, Krüger S, et al.** Lower Incidence of Colorectal Cancer and Later Age of Disease Onset in 27 Families With Pathogenic MSH6 Germline Mutations. *J Clin Oncol.* 2004 Nov 15;22(22):4486-94.

**404. Plaschke J, Kruppa C, Tischler R, et al.** Sequence analysis of the mismatch repair gene hMSH6 in the germline of patients with familial and sporadic colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2000;85(5):606-13.

**405. Ponti G, Longo C.** Microsatellite instability and mismatch repair protein expression in sebaceous tumors, keratocanthoma, and basal cell carcinomas with sebaceous differentiation in Muir-Torre syndrome. *J Am Acad Dermatol.* 2013;68(3):509–510.

- 406. Ponti G, Losi L, Pedroni M, et al.** Value of MLH1 and MSH2 mutations in the appearance of Muir-Torre syndrome phenotype in HNPCC patients presenting sebaceous gland tumors or keratoacanthomas. *J Invest Dermatol.* 2006;126(10):2302–2307.
- 407. Ponti G, Ponz de Leon M.** Muir-Torre syndrome. *Lancet Oncol.* 2005;6(12):980–987.
- 408. Ponti G, Ponz DL, Maffei S, et al.** Attenuated familial adenomatous polyposis and Muir-Torre syndrome linked to compound biallelic constitutional MYH gene mutations. *Clin Genet.* 2005;68:442–7.
- 409. Post van der RS, Kiemeney LA, Ligtenberg MJ, et al.** Risk of urothelial bladder cancer in Lynch syndrome is increased, in particular among MSH2 mutation carriers. *J Med Genet* 2010;47:464–470.
- 410. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, et al.** APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992;359: 235–237.
- 411. Puijtenbroek van M, van Asperen CJ, Van Mil A, et al.** Homozygosity for a CHEK2 \*1100delC mutation identified in familial colorectal cancer does not lead to a severe clinical phenotype. *J Pathol* 2005;206:198–204. [PubMed: 15818573]
- 412. Quehenberger F, Vasen HF, van Houwelingen HC.** Risk of colorectal and endometrial cancer for carriers of mutations of the hMLH1 and hMSH2 gene: correction for ascertainment. *J Med Genet* 2005; 42(6): 491-496.
- 413. Radin DR, Fortgang KC, Zee C-S, et al.** Turcot syndrome: a case with spinal cord and colonic neoplasms. *AJR Am J Roentgenol* 1984;142:475-6.
- 414. Rævaara TE, Korhonen MK, Lohi H, et al.** Functional significance and clinical phenotype of nontruncating mismatch repair variants of MLH1. *Gastroenterology* 2005;129:537–549. [PubMed: 16083711]
- 415. Raymond VM, Mukherjee B, Wang F, et al.** Elevated risk of prostate cancer among men with Lynch syndrome. *J Clin Oncol* 2013;31:1713–1718.
- 416. Renkonen-Sinisalo L, Butzow R, Leminen A, et al.** Surveillance for endometrial cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. *Int J Cancer* 2007;120:821–824.
- 417. Renkonen-Sinisalo L, Sipponen P, Aarnio M, et al.** No support for endoscopic surveillance for gastric cancer in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:574–577.
- 418. Ricciardone MD, Özçelik T, Cevher B, et al.** Human MLH1 deficiency predisposes to hematological malignancy and neurofibromatosis type I. *Cancer Res* 1999;59:290–293. [PubMed: 9927033]
- 419. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, et al.** Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003;349:247–257. [PubMed: 12867608]
- 420. Rijcken FEM, Hollema H, Kleibeuker JH.** Proximal adenomas in hereditary non-polyposis colorectal cancer are prone to rapid malignant transformation. *Gut* 2002;50:382–386. [PubMed: 11839719]
- 421. Rijcken FEM, Koornstra JJ, van der Sluis T, et al.** Early carcinogenic events in HNPCC adenomas: differences with sporadic adenomas. *Dig Dis Sci* 2008;53:1660–1668. [PubMed: 17999188]
- 422. Rijcken FE, Mourits MJ, Kleibeuker JH, et al.** Gynecologic screening in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gynecol Oncol* 2003;91:74–80.
- 423. Roach ES, Sparagana SP.** Diagnosis of tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol.* 2004;19(9):643–649.
- 424. Roberts ME, Riegert-Johnson DL, Thomas BC, et al.** Screening for Muir-Torre syndrome using mismatch repair protein immunohistochemistry of sebaceous neoplasms. *J Genet Couns.* 2013;22(3):393–405.

- 425. Robson ME, Storm CD, Weitzel J, et al.** American Society of Clinical Oncology policy statement update: genetic and genomic testing for cancer susceptibility. *J Clin Oncol* 2010;28:893–901.
- 426. Román R, Verdú M, Calvo M et al.** Microsatellite instability of the colorectal carcinoma can be predicted in the conventional pathologic examination. A prospective multicentric study and the statistical analysis of 615 cases consolidate our previously proposed logistic regression model. *Virchows Arch* 2010; 456(5): 533-541. doi: 10.1007/s00428-010-0896-6.
- 427. Roncari B, Pedroni M, Maffei S, et al.** Frequency of constitutional MSH6 mutations in a consecutive series of families with clinical suspicion of HNPCC. *Clin Genet.* 2007 Sep;72(3):230-7.
- 428. Rongioletti F, Hazini R, Gianotti G, et al.** Fibrofolliculomas, trichodiscomas and acrochordons (Birt-Hogg-Dube) associated with intestinal polyposis. *Clin Exp Derm* 1989;14: 72-74.
- 429. Rothwell PM, Fowkes FG, Belch JF, et al.** Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomized trials. *Lancet* 2011;377:31–41.
- 430. Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, et al.** DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene.* 2001;20(24):3156-65.
- 431. Rutten A, Burgdorf W, Hugel H, et al.** Cystic sebaceous tumors as marker lesions for the Muir-Torre syndrome: a histopathologic and molecular genetic study. *Am J Dermatopathol.* 1999;21(5):405–413.
- 432. Sagar S, Chernoff KA, Lodha S, et al.** CYLD mutations in familial skin appendage tumours. (Letter) *J Med Genet* 2008;45: 298-302.
- 433. Salahshor S, Koeble K, Rubio C.** Microsatellite instability and hMLH1 and hMSH2 expression analysis in familial and sporadic colorectal cancer. *Lab Invest* 2001;81:535–541. [PubMed: 11304573]
- 434. Sampson JR, Attwood D, Al Mughery AS, et al.** Pitted enamel hypoplasia in tuberous sclerosis. *Clin Genet* 1992;42: 50-52.
- 435. Sampson JR, Dolwani S, Jones S, et al.** Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MYH. *Lancet* 2003;362:39–41.
- 436. Sanchez JA, Vogel JD, Kalady MF, et al.** Identifying Lynch syndrome: We are all responsible. *Dis Colon Rectum* 2008;51:1750–1756. [PubMed: 18682882]
- 437. Sardi I, Piazzini M, Palleschi G, et al.** Molecular detection of microsatellite instability in basal cell carcinoma. *Oncol. Rep.* 2000;7: 1119–1122.
- 438. Saurin JC, Pilleul F, Soussan EB, et al.** Small-bowel capsule endoscopy diagnoses early and advanced neoplasms in asymptomatic patients with Lynch syndrome. *Endoscopy* 2010;42:1057–1062.
- 439. Schafroth C, Galván JA, Centeno I, et al.** VE1 immunohistochemistry predicts BRAF V600E mutation status and clinical outcome in colorectal cancer. *Oncotarget.* 2015 Dec 8;6(39):41453-63. doi: 10.18632/oncotarget.6162.
- 440. Scheinfeld N, Hu G, Gill M, et al.** Identification of a recurrent mutation in the CYLD gene in Brooke-Spiegler syndrome. *Clin Exp Derm* 2003;28: 539-541.
- 441. Schmeler KM, Lynch HT, Chen LM, et al.** Prophylactic surgery to reduce the risk of gynecological cancers in Lynch syndrome. *N Engl J Med* 2006;354:261–269.
- 442. Schmidt LS, Warren MB, Nickerson ML, et al.** Birt-Hogg-Dube syndrome, a genodermatosis associated with spontaneous pneumothorax and kidney neoplasia, maps to chromosome 17p11.2. *Am J Hum Genet* 2001;69: 876-882.
- 443. Schulmann K, Brasch FE, Kunstmann E, et al.** HNPCC-associated small bowel cancer: clinical and molecular characteristics. *Gastroenterology* 2005;128:590–599.

- 444. Schulz E, Klampfl P, Holzapfel S, et al.** Germline variants in the SEMA4A gene predispose to familial colorectal cancer type X. *Nat Commun* 2014; 5:5191 [PMID: 25307848 DOI: 10.1038/ncomms6191]
- 445. Schwartz RA.** Basal-cell-nevus syndrome and gastrointestinal polyposis. (Letter) *New Eng J Med* 1978;299: 49 only.
- 446. Schwartz RA, Torre DP.** The Muir-Torre syndrome: a 25-year retrospect. *J Am Acad Dermatol* 1995; 33(1): 90-104.
- 447. Senter L, Clendenning M, Sotamaa K, et al.** The clinical phenotype of Lynch syndrome due to germline PMS2 mutations. *Gastroenterology* 2008;135:419–428. [PubMed: 18602922]
- 448. Shia J.** Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I. The utility of immunohistochemistry. *J Mol Diagn* 2008; 10(4): 293-300. doi: 10.2353/jmoldx.2008.080031.
- 449. Shia j, Ellis NA, Paty PB, et al.** Value of histopathology in predicting microsatellite instability in hereditary nonpolyposis colorectal cancer and sporadic colorectal cancer. *Am J Surg Pathol.* 2003;27(11):1407–1417.
- 450. Shia J, Tang LH, Vakiani E, et al.** Immunohistochemistry as first-line screening for detecting colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: a 2-antibody panel may be as predictive as a 4-antibody panel. *Am J Surg Pathol* 2009; 33(11): 1639-1645.
- 451. Shields JA, Shields CL, Eagle RCJr, et al.** Adenocarcinoma arising from congenital hypertrophy of retinal pigment epithelium. *Arch. Ophthalmol.* 119: 597-602, 2001.
- 452. Shields JA, Shields CL, Singh AD.** Acquired tumors arising from congenital hypertrophy of the retinal pigment epithelium. *Arch. Ophthalmol.* 118: 637-641, 2000.
- 453. Shin KH, Shin JH, Kim JH, et al.** Mutational analysis of promoters of mismatch repair genes hMSH2 and hMLH1 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer and early onset colorectal cancer patients: identification of three novel germ-line mutations in promoter of the hMSH2 gene. *Cancer Res.* 2002;62(1):38-42.
- 454. Shtoyerman-Chen R, Friedman E, Figer A, et al.** The I1307K APC polymorphism: prevalence in non-Ashkenazi Jews and evidence for a founder effect. *Genet Test.* 2001 Summer;5(2):141-6.
- 455. Sieber OM, Lipton L, Crabtree M, et al.** Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *N Engl J Med.* 2003, 348(9):791-799.
- 456. Singh RS, Grayson W, Redston M, et al.** Site and tumor type predicts DNA mismatch repair status in cutaneous sebaceous neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2008;32(6):932–942.
- 457. Smith HC, Watson GH, Patel RG, et al.** Cardiac rhabdomyomata in tuberous sclerosis: their course and diagnostic value. *Arch Dis Child* 1989;64: 196-200.
- 458. Smith RA, von Eschenbach AC, Wender R, et al.** American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer: update of early detection guidelines for prostate, colorectal, and endometrial cancers; Also: Update 2001 – testing for early lung cancer detection. *CA Cancer J Clin* 51:38–75. [PubMed: 11577479]
- 459. Smyrk TC, Watson P, Kaul K, et al.** Tumor-infiltrating lymphocytes are a marker for microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer* 2001;91:2417–2422. [PubMed: 11413533]
- 460. South CD, Hampel H, Comeras I, et al.** The frequency of Muir-Torre syndrome among Lynch syndrome families. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:277–281.
- 461. Statement of the American Society of Clinical Oncology:** genetic testing for cancer susceptibility. *J Clin Oncol* 1996;14:1730–1740.

- 462. Stoffel EM, Chitenden A.** Genetic testing for hereditary colorectal cancer: challenges in identifying, counseling, and managing high-risk patients. *Gastroenterology* 2010;139:1436–1441.
- 463. Stoffel E, Mukherjee B, Raymond VM, et al.** Calculation of risk of colorectal and endometrial cancer among patients with Lynch syndrome. *Gastroenterology* 2009;137:1621–1627.
- 464. Stoffel EM, Turgeon DK, Stockwell DH, et al.** Missed adenomas during colonoscopic surveillance in individuals with Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *Cancer Prev Res* 2008;1:470–475.
- 465. Strand M, Prolla TA, Liskay RM, et al.** Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *365:274–276.*
- 466. Stuckless S, Green J, Dawson L, et al.** Impact of gynecological screening in Lynch syndrome carriers with an MSH2 mutation. *Clin Genet* 2013;83:359–364.
- 467. Stuckless S, Green JS, Morgenstern M, et al.** Impact of colonoscopic screening in male and female Lynch syndrome carriers with an MSH2 mutation. *Clin Genet* 2012;82:439–445.
- 468. Suraweera N, Duval A, Reperant M.** Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* 2002;123:1804–1811. [PubMed: 12454837]
- 469. Suter CM, Martin DI, Ward RL.** Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple cancers. *Nat Genet.* 2004;36(5):497-501. [PubMed: 15064764]
- 470. Sweet K, Willis J, Zhou XP, et al.** Molecular classification of patients with unexplained hamartomatous and hyperplastic polyposis. *JAMA* 2005;294: 2465–2473.
- 471. Syngal S, Schrag D, Falchuk M, et al.** Phenotypic characteristics associated with the APC gene I1307K mutation in Ashkenazi Jewish patients with colorectal polyps. *JAMA.* 2000 Aug 16;284(7):857-60.
- 472. Tamiya T, Hamazaki S, Ono Y, et al.** Ganglioglioma in a patient with Turcot syndrome. *Journal of Neurosurgery*, vol. 92, no. 1, pp. 170–175, 2000.
- 473. Tate PH, Bird AP.** Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev.* 1993;3(2):226-31.
- 474. Teplick JG.** Tuberous sclerosis. Extensive roentgen findings without usual clinical picture: a case report. *Radiology* 1969;93: 53-55.
- 475. Teruya-Feldstein J, Greene J, Cohen L, et al.** Analysis of mismatch repair defects in the familial occurrence of lymphoma and colorectal cancer. *Leuk Lymphoma* 2002;43:1619–1626.
- 476. Thériault GP, Tremblay CG, Armstrong BG.** Bladder cancer screening among primary aluminum production workers in Quebec. *J Occup Med* 1990;32:869–872.
- 477. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D.** Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993;260:816–819. [PubMed: 8484122]
- 478. Thomas HJ, Whitelaw SC, Cottrell SE, et al.** Genetic mapping of hereditary mixed polyposis syndrome to chromosome 6q. *Am. J. Hum. Genet.* 1996;58: 770–776.
- 479. Tops CMJ, Vasen HFA, van Berge Henegouwen G, et al.** Genetic evidence that Turcot syndrome is not allelic to familial adenomatous polyposis. *Am J Med Genet* 1992;43:888-93.
- 480. Toro JR, Glenn G, Duray P, et al.** Birt-Hogg-Dube syndrome: a novel marker of kidney neoplasia. *Arch. Derm.* 1999;135: 1195-1202.
- 481. Torre D.** Multiple sebaceous adenomas. *Arch Dermatol.* 1968;98(5):549–551.
- 482. Traboulsi EI, Krush AJ, Gardner EJ, et al.** Prevalence and importance of pigmented ocular fundus lesions in Gardner's syndrome. *New Eng. J. Med.* 316: 661-667, 1987.

- 483. Trimbath JD, Giardiello FM.** Genetic testing and counseling for hereditary colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:1843–1857.
- 484. Trimbath JD, Petersen GM, Erdman SH, et al.** Cafe-au-lait spots and early onset colorectal neoplasia: a variant of HNPCC? *Fam Cancer* 2001;1:101–105.
- 485. Truninger K, Menigatti M, Luz J, et al.** Immunohistochemical analysis reveals high frequency of PMS2 defects in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2005; 128(5): 1160-1171.
- 486. Turcot J, Despres JP, St. Pierre F.** Malignant tumors of the central nervous system associated with familial polyposis of the colon: report of two cases. *Dis Colon Rectum* 1959;2:465-468.
- 487. 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. [PubMed: 14970275]
- 488. Utsunomiya J, Nakamura T.** The occult osteomatous changes in the mandible in patients with familial polyposis coli. *Brit. J. Surg.* 62: 45-51, 1975.
- 489. Vasen HF, Abdirahman M, Brohet R, et al.** One to 2-year surveillance intervals reduce risk of colorectal cancer in families with Lynch syndrome. *Gastroenterology* 2010;138:2300–2306.
- 490. Vasen HFA, Blanco I, Aktan-Collan K, et al.** Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts. *Gut* 2013;62:812–823.
- 491. Vasen HF, Luijt van der RB, Slors JF et al.** Molecular genetic tests as a guide to surgical management of familial adenomatous polyposis. *Lancet.* 1996;348:433–5.
- 492. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM et al.** The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991; 34(5): 424-425.
- 493. Vasen HF, Morreau H, Nortier JW.** Is breast cancer part of the tumor spectrum of hereditary nonpolyposis colorectal cancer? *Am J Hum Genet* 2001;68:1533–1535.
- 494. Vasen HR, Stormorken A, Menko FH, et al.** MSH2 mutation carriers are a higher risk for cancer than MLH1 mutation carriers: a study of hereditary nonpolyposis colorectal cancer families. *J Clin Oncol* 2001;19:4074–4080.
- 495. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP et al.** New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999; 116(6): 1453-1456.
- 496. Vasen HFA, Wijnen JT, Menko FH, et al.** Cancer risk in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis. *Gastroenterology* 1996;110:1020–1027. [PubMed: 8612988]
- 497. Vasovcak P, Krepelova A, Menigatti M, et al.** Unique mutational profile associated with a loss of TDG expression in the rectal cancer of a patient with a constitutional PMS2 deficiency. *DNA Repair (Amst).* 2012 Jul 1;11(7):616-23.
- 498. Verhoef S, Bakker L, Tempelaars AMP, et al.** High rate of mosaicism in tuberous sclerosis complex. *Am J Hum Genet* 1999;64: 1632-1637.
- 499. Vernez M, Hutter P, Monnerat C, et al.** A case of Muir-Torre syndrome associated with mucinous hepatic cholangiocarcinoma and a novel germline mutation of the MSH2 gene. *Familial Cancer*, vol. 6, no. 1, pp. 141–145, 2007.
- 500. Vogt S, Jones N, Christian D, et al.** Expanded extracolonic tumor spectrum in MUTYH-associated polyposis. *Gastroenterology.* 2009 Dec;137(6):1976-85.e1-10.
- 501. Vos de tot Nederveen Cappel WH, Buskens E, van Duijvendijk P, et al.** Decision analysis in the surgical treatment of colorectal cancer due to a mismatch repair gene defect. *Gut* 2003;52:1752–1755.



- 502. Vos de tot Nederveen Cappel WH, Meulenbeld HJ, Kleibeuker JH, et al.** Survival after adjuvant 5-FU treatment for stage III colon cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Int J Cancer* 2004;109:468–471. [PubMed: 14961589]
- 503. Vos de tot Nederveen Cappel WH, Nagengast FM, Griffioen G, et al.** Surveillance for hereditary nonpolyposis colorectal cancer: a long-term study of 114 families. *Dis Colon Rectum* 2002;45:1588–1594.
- 504. Vries de PJ, Gardiner J, Bolton PF.** Neuropsychological attention deficits in tuberous sclerosis complex (TSC). *Am J Med Genet* 2009;149A: 387-395.
- 505. Wagner A, Barrows A, Wijnen JT, et al.** Molecular analysis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the United States: high mutation detection rate among clinically selected families and characterization of an American founder genomic deletion of the MSH2 gene. *Am J Hum Genet.* 2003;72(5):1088-100. [PubMed: 12658575]
- 506. Wagner A, Klift van der H, Franken P, et al.** A 10 Mb paracentric inversion of chromosome arm 2p inactivates MSH2 and is responsible for HNPCC in a North-American kindred. *Gene Chromosome Cancer* 2002;35:49–57.
- 507. Walsh MD, Buchanan DD, Cummings MC, et al.** Lynch syndrome-associated breast cancers: clinicopathologic characteristics of a case series from the colon cancer family registry. *Clin Cancer Res* 2010;16:2214–2224.
- 508. Walton BJ, Morain WD, Baughman RD, et al.** Cowden's disease: a further indication for prophylactic mastectomy. *Surgery* 1986;99: 82-86.
- 509. Wang Y, Friedl W, Lamberti C, et al.** Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: frequent occurrence of large genomic deletions in MSH2 and MLH1 genes. *Int J Cancer.* 2003;103(5):636-41.
- 510. Ward RL, Dobbins T, Lindor NM, et al.** Identification of constitutional MLH1 epimutations and promoter variants in colorectal cancer patients from the Colon Cancer Family Registry. *Genet Med.* 2013 Jan;15(1):25-35. doi: 10.1038/gim.2012.91. Epub 2012 Aug 9.
- 511. Warthin AS.** Heredity with reference to carcinoma as shown by the study of the cases examined in the pathological laboratory of the University of Michigan, 1895-1913. *Arch Intern Med* 1913; 12(5):546-555.
- 512. Wasielewski M, Vasen H, Wijnen J, et al.** CHEK2 1100delC is a susceptibility allele for HNPCC related colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:4989–4994. [PubMed: 18676774]
- 513. Watson P, Burzow R, Lynch HT, et al.** The clinical features of ovarian cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gynecol Oncol* 2001;82:223–228.
- 514. Watson P, Lin K, Rodriguez-Bigas MA, et al.** Colorectal carcinoma survival among hereditary nonpolyposis colorectal cancer family members. *Cancer* 1998;83:259–266. [PubMed: 9669808]
- 515. Watson P, Vasen HFA, Mecklin J-P, et al.** The risk of extra-colonic, extra-endometrial cancer in the Lynch syndrome. *Int J Cancer* 2008;123:444–449. [PubMed: 18398828]
- 516. Weary PE, Gorlin RJ, Gentry WCJr, et al.** Multiple hamartoma syndrome (Cowden's disease). *Arch. Derm.* 1972;106: 682-690.
- 517. Webb DW, Clarke A, Fryer A, et al.** The cutaneous features of tuberous sclerosis: a population study. *Brit J Derm* 1996;135: 1-5.
- 518. Wee SA.** Multiple eruptive keratoacanthomas, de novo. *Dermatol Online J* 2004;10(3):19.
- 519. Wei C, Peng B, Han Y, et al.** Mutations of HNRNPA0 and WIF1 predispose members of a large family to multiple cancers. *Fam Cancer* 2015; 14: 297-306 [PMID: 25716654 DOI: 10.1007/s10689-014-9758-8]

- 520. Whitelaw SC, Murday VA, Tomlinson IPM, et al.** Clinical and molecular features of the hereditary mixed polyposis syndrome. *Gastroenterology* 1997;112: 327-334.
- 521. Wijnen JT, Brohet RM, Eijk van R, et al.** Chromosome 8q23.3 and 11q23.1 variants modify colorectal cancer risk in Lynch syndrome. *Gastroenterology* 2009;136:131–137. [PubMed: 19010329]
- 522. Wijnen J, Klift van der H, Vasen H, et al.** MSH2 genomic deletions are a frequent cause of HNPCC. *Nat Genet.* 1998;20(4):326-8.
- 523. Wijnen J, Leeuw de W, Vasen H, et al.** Familial endometrial cancer in female carriers of MSH6 germline mutations. *Nat Genet.* 1999;23(2):142-4.
- 524. Williard W, Borgen P, Bol R, et al.** Cowden's disease: a case report with analyses at the molecular level. *Cancer* 1992;69: 2969-2974.
- 525. Wimmer K, Etzler J.** Constitutional mismatch repair-deficiency syndrome: have we so far seen only the tip of the iceberg? *Hum Genet* 2008;124:105–122. [PubMed: 18709565]
- 526. Win AK, Parry S, Parry B, et al.** Risk of metachronous colon cancer following surgery for rectal cancer in mismatch repair gene mutation carriers. *Ann Surg Oncol* 2013;20:1829–1836.
- 527. Win AK, Young JP, Lindor NM.** Colorectal and other cancer risks for carriers and noncarriers from families with a DNA mismatch repair gene mutation: a prospective cohort study. *J Clin Oncol* 2012;30:958–964.
- 528. Winawer S, Fletcher R, Rex D, et al.** Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale – update based on new evidence. *Gastroenterology* 2003;124:544–560. [PubMed: 12557158]
- 529. Wu Y, Berends MJ, Mensink RG, et al.** Association of hereditary nonpolyposis colorectal cancer-related tumors displaying low microsatellite instability with MSH6 germline mutations. *Am J Hum Genet.* 1999;65(5):1291-8.
- 530. Wu Y, Berends MJW, Sijmons RH, et al.** A role for MLH3 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 2001;29:137–138. [PubMed: 11586295]
- 531. Wu JS, Paul P, McGannon EA et al.** APC genotype, polyp number, and surgical options in familial adenomatous polyposis. *Ann Surg.* 1998;227:57–62.
- 532. Yan H, Papadopoulos N, Marra G, et al.** Conversion of diploidy to haploidy: Individuals susceptible to multigene disorders may now be spotted more easily. *Nature* 2000;403:723–724. [PubMed: 10693791]
- 533. Yang KY, Caughey AB, Little SE, et al.** A cost-effectiveness analysis of prophylactic surgery versus gynecologic surveillance for women from hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) families. *Fam Cancer* 2011;10:535–543.
- 534. Young AL, Kellermayer R, Szigeti R, et al.** CYLD mutations underlie Brooke-Spiegler, familial cylindromatosis, and multiple familial trichoepithelioma syndromes. *Clin Genet* 2006;70: 246-249.
- 535. Yuen ST, Chan TL, Ho JW et al.** Germline, somatic and epigenetic events underlying mismatch repair deficiency in colorectal and HNPCC-related cancers. *Oncogene* 2002; 21(49):7585-7592.
- 536. Zavodna K, Bujalkova MG, Krivulcik T.** Novel and recurrent germline alterations in the MLH1 and MSH2 genes identified in hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients in Slovakia. *Neoplasma* 2006 Jan; 53(4):269-76
- 537. Zhang J, Lindroos A, Ollila S, et al.** Gene conversion is a frequent mechanism of inactivation of the wild-type allele in cancers from MLH1/MSH2 deletion carriers. *Cancer Res.* 2006;66(2):659-64.