

mr Vesna Hadživdić, viši asistent,
Odsjek za biologiju, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u
Tuzli

dr Izet Eminović, vanredni profesor,
Odsjek za biologiju, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u
Tuzli

Mikrosatelitna nestabilnost i replikacijska greška kod nasljednog nepolipoznog karcinoma debelog crijeva (HNPCC)¹

UDK 575.1:616.345:616-006.6]

Sažetak

Razvoj HNPCC (nasljednog nepolipoznog karcinoma debelog crijeva) je uzrokovan mutacijama u genima koji su uključeni u sistem reparacije (popravaka) gena. Cilj naših istraživanja je bio da odredimo visoko senzitivne mikrosatelitne markere koji nam mogu biti brz i efikasan mikrosatelitni skrining za detekciju HNPCC pacijenata. U istraživanje su uključena 54 uzorka tumorskog i okolnog zdravog tkiva pacijenata sa karcinomom debelog crijeva. Kompletna studija je urađena prema Bethesda i Amsterdamskim kriterijima, i prema njima 9 pacijenata pripada grupi nasljednog nepolipoznog karcinoma debelog crijeva. Naša istraživanja mikrosatelitne nestabilnosti pokazuju da mononukleotidni marker Bat 40 ima frekvenciju 77,78% tumorskih uzoraka, mononukleotidni marker Bat 26 and Bat 25 imaju 55,56%. Od dinukleotidnih markera mikrosatelitnu nestabilnost ima TP 53 55,56% i DS123 kod 44,44% tumorskih uzoraka. Ispitivanja su pokazala da visoku mikrosatelitnu nestabilnost pokazuju mononukleotidni marker Bat 40 u skupini pacijenata koje smo odredili da pripadaju HNPCC.

¹ Magistarski rad: Molekularno-genetička identifikacija karcinoma debelog crijeva kod stanovništva tuzlanskog regiona, Sarajevo, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Sarajevu

Ključne riječi: HNPCC, mikrosatelitna nestabilnost, RER fenotip.

Uvod

HNPCC je jedan od najučestalijih oblika porodičnog kolorektalnog karcinoma i čini oko 5-13% svih kolorektalnih karcinoma. HNPCC se razvija u životnom dobu prije 40–45 godine života za razliku od sporadičnih karcinoma kod kojih životna dob pojavljivanja je, u prosjeku, oko 55-60 godine. Smatra se da HNPCC i sporadični RER+ kolorektalni tumori imaju različite puteve razvoja karcinoma. Za ove tumore kaže se da imaju povećan mutacijski nivo, tzv. mutator fenotip, koji su rezultat inaktivacije MMR gena. Postoje dva puta za nastanak kolorektalnih tumora: tumor supresorski put: mutacijska inaktivacija oba alela i mutator fenotipski put: mikrosatelitna nestabilnost kod HNPCC i sporadičnih RER + kolorektalnih karcinoma. Razvoj HNPCC je uzrokovan mutacijama gena koji su uključeni u sistem genetičkog popravka greški. Kod 60% bolesnika mutacija je prisutna u hMSH2 genu, kod 30% hMLH1 i kod 10% u hPMS1 i hPMS2 genima. RER+ je prisutna oko 90% kod nasljednog nepolipoznog kolorektalnog karcinoma i oko 15-28% sporadičnih karcinoma. Internacionalna kolaborativna grupa je u Amsterdamu 1990. god ustanovila Amsterdamske kriterije (Annonymous, 1998) koje se koriste u dijagnostici HNPCC porodica: najmanje tri člana porodice: imaju karcinom debelog crijeva, a ostala dva su rođaci prvog reda; karcinom debelog crijeva se razvio u više od jedne generacije porodice sa HNPCC; najmanje je kod jednog člana porodice je dijagnosticiran karcinom debelog crijeva prije 50. godine života; u porodici HNPCC nema historije FAP-a.

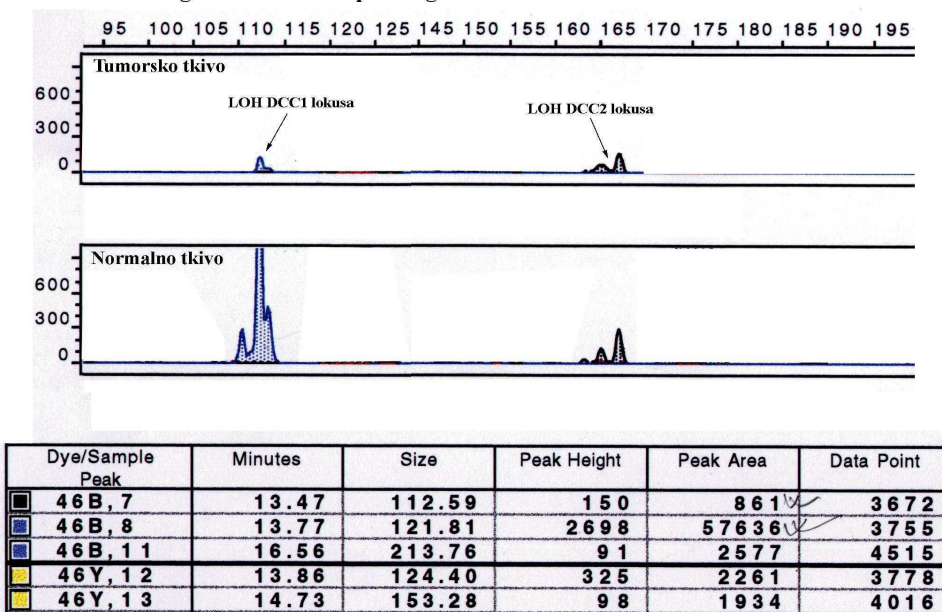
Za naša istraživanja koristili smo Bethesda kriterije koji određuju koji se kolorektalni karcinomi mogu testirati na mikrosatelitni nestabilnost. Mikrosatelitni panel mora imati mononukleotidne markere: Bat 25 i Bat 26, a od dinukleotidnih markera obavezno DS 123. Prema ovim kriterijima, postoji podjela tumora prema mikrosatelitnoj nestabilnosti: MSI – L tumori niskog reda (ako pokazuju MSI u lokusima manje od 30-40% ili jednom ili u dva lokusa); MSI-H tumori visokog reda (ako pokazuju MSI više od 40% lokusa; u tri ili više lokusa; pozitivna replikacijska greška - RER+) i MSS- tumori kod kojih su

mikrosatelitni lokusi stabilni. Cilj naših istraživanja je bio da odredimo visoko senzitivne mikrosatelitne markere koji nam mogu biti brz i efikasan mikrosatelitni skrining za detekciju HNPCC pacijenata.

Materijal i metode

Naša istraživanja su uključila 54 uzorka tumorskog i okolnog zdravog tkiva pacijenata sa dijagnosticiranim karcinomom debelog crijeva. Uzorci su uzeti sa Gastroenterološke i Hirurške klinike Univerzitetskog Kliničkog centra Tuzla.

Gubitak heterozigotnosti tumor supresor gena DCC1 i DCC2



Slika 1: Gubitak heterozigotnosti tumor supresor gena DCC 1 i DCC 2

Tumorsko i zdravo okolno tkivo fiksirano je u formalinu, a nakon toga ukalopljeno u parafinske blokove. Molekularna analiza je urađena na Institutu za molekularnu biologiju Medicinskog fakulteta u Ljubljani, Slovenija. Metoda izolacije genomske DNK zasnovana je na deparafinizaciji tkivnih rezova i na proteolizi ćelija tkiva proteinazom K. Fluorescentana lančana reakcija sinteze DNK je metoda koja ima veoma široku primjenu u detekciji tumora, a posebno je značajna u determinaciji mikrosatelitne nestabilnosti (*MSI*). Za detekciju mikrosatelitne nestabilnosti koristili smo mononukleotidne i dinukleotidne mikrosatelitne markere.

U skupini mononukleotidnih markera upotrebljavali smo BAT25, BAT26 i BAT40, a u skupini dinukleotidnih markera koristili smo DS123 i TP 53. Uvjeti umnožavanja u radnoj smjesi (engl. *Master mix-u*) do kanačnog volumena 25 μ l. Amplifikacija je postavljena na PCR Thermocycler 9600 (Perkin-Elmer). Za razdvajanje amplificiranih produkata, upotrebljavali smo automatski sekvenator 310 ABI PRISM, Genetic Analyser 310, Perkin Elmer), koji omogućava razdvajanje i kvantifikaciju DNK fragmenata po principu kapilarne elektroforeze. Mikrosatelitna analiza predstavlja komparaciju zdravog i tumorskog tkiva istog pacijenta pomoću posebnog Genescan programskog paketa analize (Slika 1). Softverski program detektuje fluorescentne vrhove i prikazuje ih na elektroferogramu (Slika 2). Svaki fluorescentni vrh je automatski kvantificiran u veličini baza, visini i polju vrha. Svi uzorci su testirani dva puta za potvrdu rezultata. Za statističku obradu podataka korišteni su χ^2 test i Fisher's exact test (Arcus Quickstat biomedical for Windows).

Rezultati i diskusija

Prema Amsterdamskim kriterijima i Bethesda kriterijima, određeno je 9/54 (16,67%) pacijenata pripadaju skupini nasljednog ne polipoznog kolorektalnog karcinoma. Analiza mikrosatelitne nestabilnosti pokazala je da mononukleotidni marker Bat 40 ima zastupljenost u 7/9 (77,78%) tumorskih uzoraka, zatim Bat 26 i Bat 25 podjednako u 5/9 (55,56%). Od dinukleotidnih markera mikrosatelitne nestabilnosti pokazuje TP 53 u 5/9 (55,56 %) i DS 123 u 4/9 (44,44%) tumorskih uzoraka (Tabela 1).

Mikro-satelitna nestabilnost	Mononukleotidni markeri						Dinukleotidni markeri			
	Bat 25		Bat 26		Bat 40		TP 53		DS 123	
	Broj	%	Broj	%	Broj	%	Broj	%	Broj	%
MSS	4	44,44	4	44,44	2	22,22	4	44,44	5	55,56
MSI	5	55,56	5	55,56	7	77,78	5	55,56	4	44,44
Ukupno	9	100,00	9	100,00	9	100,00	9	100,00	9	100,00

Tabela 1: Mikrosatelitna nestabilnost mononukleotidnih i dinukleotidnih markera

P<0,01

Na osnovu Bethesda kriterija, tumorski uzorci *HNPCC* su podjeljeni u tri skupine:

1. *MSI-H* – mikrosatelitnu nestabilnost u tri ili više lokusa pokazuje 6/9 (66,67%) uzoraka;
2. *MSI-L* – mikrosatelitna nestabilnost u jednom ili u dva lokusa pokazuje 3/9 (33,33%) uzoraka i
3. *MSS* – mikrosatelitnu stabilnost lokusa ne pokazuje ni jedan uzorak 0/9 (0%).

Broj mikrosatelitnih nestabilnih lokusa nekog uzorka definiše njegov *RER* (+) pozitivan i *RER* (-) negativan fenotip. Istraživanja su pokazala se da 6/9 (66,67%) tumorskih uzoraka pripada *RER* pozitivnom fenotipu, a 3/9 (33,33%) pripada *RER* negativnom fenotipu. Kod *RER* pozitivnog fenotipa, 4/6 (66,67%) tumora pokazuje nestabilnost u tri lokusa, 2/6 (33,33%) u četiri lokusa. Kod *RER* negativnog fenotipa, 3/3 (100%) tumora pokazuju nestabilnost u jednom lokusu (Tabela 2).

RER status tumora	Broj mikrosatelitnih nestabilnih lokusa						
	N	2 lokusa broj	%	3 lokusa broj	%	4 lokusa broj	%
RER +	6	0	0	4	66,67	2	33,33
RER -	3	3	100	0	0	0	0

Tabela 2: Odnos broja alteracija u mikrosatelitnim lokusima i RER fenotipa

$P < 0.01$

U skupini tumora sa *RER* pozitivnim fenotipom, uočena je pojava mikrosatelitne nestabilnosti mononukleotidnog markera pokazuje Bat 40 u 5/6 (83,33%). U skupini tumora sa *RER* negativnim fenotipom, takođe mononukleotidni marker Bat 40 i Bat 26 pokazuje nestabilnosti u 2/3 (66,67%) tumorskih tkiva (Tabela 3).

RER status tumora	Mikrosatelitni markeri										
	N	Bat 25		Bat 26		Bat 40		TP 53		DS 123	
		Broj	%	Broj	%	Broj	%	Broj	%	Broj	%
RER +	6	4	66,67	3	50,00	5	83,33	4	66,67	4	66,67
RER -	3	1	33,33	2	66,67	2	66,67	1	33,33	0	0

Tabela 3. Povezanost RER statusa i mikrosatelitne nestabilnosti
P<0,0

Analiza pojedinih kliničkopatoloških parametara (godine starosti, lokalizacija tumora) pokazuje da najvišu frekvenciju mikrosatelitne nestabilnosti ima monukleotidni marker Bat 40 a analiza spola pokazuje da nestabilan marker kod žena je Bat 25 i TP 53 (Tabela 4).

Kliničkopatološke karakteristike	Mikrosatelitna nestabilnost					
	N	Bat 25 broj %	Bat 26 broj %	Bat 40 broj %	TP 53 broj %	DS 123 broj %
Spol	7	3 42,86	4 57,14	7 100,00	3 42,86	4 57,14
ž	2	2 100,00	1 50,00	0 0,00	2 100,00	0 0,00
Dobna kateg. (god.)	6	4 66,67	3 50,00	5 83,33	4 66,67	3 50,00
>50	3	1 33,33	2 66,66	2 66,67	1 33,33	1 33,33
<50						
Lokalizacija tumora						
lijevostrani	7	5 71,43	3 42,86	5 71,43	4 57,14	3 42,86
desnostrani	2	0 0,00	2 100,00	2 100,00	1 50,00	1 50,00
Histopatološka klasifikacija						
mucin.adenokar	1	0 0,00	1 100,00	1 100,00	1 100,00	1 100,00
aenokarcinom	8	5 62,50	4 50,00	6 75,00	4 50,00	3 37,50

Tabela 4. Povezanost između mononukleotidnih i dinukleotidnih markera i broja kliničkopatoloških parametara.
p>0,05

Analiza *RER* fenotipa i kliničkopatoloških karakteristika pokazala je da *RER* pozitivan fenotip zastupljen kod muškarca u 5/7 (71,43%). U starosnoj skupini >50 godina je izražen u 5/6 (83,33%) i kod lokalizacije tumora *RER* pozitivan fenotip je zastupljeniji kod lijevostranih tumora u 5/7 (71,43%). *RER* negativan fenotip je zastupljeniji kod žena u 1/2 (50%); u starosnoj skupini manjoj od 50 godina u 2/3 (66,67%), a pripada skupini desnostranih tumora 1/2 (50%) (tabela 5).

Kliničkopatološke karakteristike	N	<i>RER</i> + fenotip tumora Broj %	<i>RER</i> – fenotip tumora Broj %
Spol			
m	7	5 71,43	2 28,57
ž	2	1 50,00	1 50,00
Dobna kateg. (god.)			
>50	6	5 83,33	1 16,67
<50	3	1 33,33	2 66,67
Lokalizacija tumora			
lijevostrani	7	5 71,43	2 28,57
desnostrani	2	1 50,00	1 50,00
Histopatološka klasifikacija			
muzin..adenokar	1	1 100,00	0 0
adenokarcinoma.	8	5 62,50	3 37,5

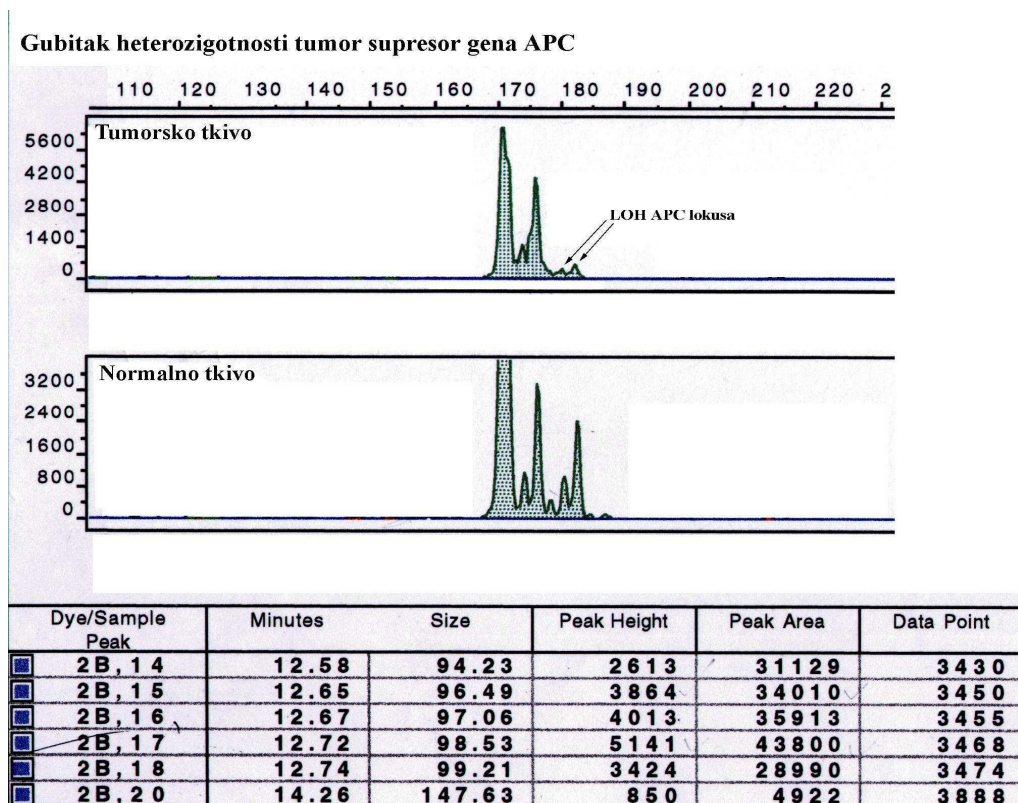
Tabela 5. Odnos *RER* statusa i kliničkopatoloških oblika
p>0,05

Ne postoji signifikantna razlika između *RER* statusa tumora i kliničkopatoloških karakteristika (p>0,05). Nedostatak *MMR* gena vodi visokom nivou mikrosatelitne nestabilnosti (*MSI-H*) u tkivu tumora. Mikrosatelitna nestabilnost može se pojaviti u ranom stadiju adenoma. Poznato je da puni razvoj mikrosatelitnog mutator fenotipa može zavisiti i od akumulacije sekundarnih mutacija (Yamamoto i sar, 1997).

Iino i sur. (2000) su ustanovili da 80% adenoma nasljednog nepolipoznog kolorektalnog karcinoma pokazuje mikrosatelitnu nestabilnost, a čak 66,7% pripada *MSI-H*. Istraživanja u ovoj skupini *MSI-L* nivoa pokazuje da su obično u vezi sa gubitkom ekspresije *hMLH1* ili *hMSH2*, što je drugačije od situacije sa *MSI-L* sporadičnih kolorektalnih karcinoma. Prema autorima, ova pojava

da *MSI-L* statusa pojavljuje se možda u ranijoj fazi i u vezi je sa dinukleotidnim markerima.

Istraživanja pokazuju da adenomi *MSI-H* statusa moraju prolaziti stanje *MSI-L* stanja ili možda *MSI-H* fenotip može nastati *de novo*, za sada je nepoznata. Ovo sugerise na zaključak da *MSI-L* se može pojaviti u evoluciji *MSI-H* ranije kod *HNPCC*, ili *MSI-L* i *MSI-H* mogu biti razdvojenih fenotipova kao kod sporadičnog kolorektalnog karcinoma (Cawkwell i sar, 1999). I u studijama De Leona i sar (1999) 61% slučajeva *HNPCC* pokazuju mikrosatelitnu nestabilnost i imaju *RER +* fenotip; druga istraživana grupa koja je klasifikovana kao *HNPCC* sumnjiva skupina (zbog nepotpunih podataka prema Amsterdamskim kriterijima) ima *RER +* status u 22% slučajeva. Autori su zaključili da porodice koje pripadaju



Slika 2: Gubitak heterozigotnosti tumor supresor gena APC

skupini *HNPCC* i one koje nemaju sve karakteristike tzv. sumnjivih *HNPCC* skupina, trebaju se uputiti na *RER* ispitivanje. Proučavanja Altonena i sur. (1998) su pokazala da 10 od 13 porodica su imaju *RER +* pozitivan fenotip. Analize su potvrdile sa kod ove skupine kolorektalnih pacijenata postoje signifikantne

razlike između *RER* + pozitivnog i *RER* – negativnog tumora za svaki ispitivani marker.

Loukola i sur. (2000) pokazala su da mononukleotidni marker Bat 26 je visoko senzibilan marker za skrining *MLH1/MSH2* pozitivnih mutacije kod *HNPCC*. Bat 26 marker je bio pozitivan kod svih 27 mutacija u ovim istraživanjima.

Visok nivo mikrosatelitne nestabilnosti bio je detektovan kod pacijenata starosne dobi iznad 35 godina i uglavnom su pripadali skupini *HNPCC* (Sengupta i sar, 1997). Naša istraživanja se slažu sa nekim prethodnim navedenim analizama, jer pokazuju da je mikrosatelitna nestabilnost uglavnom uočena kod pacijenata iznad 50 godina starosti, da su pripadnici muškog spola. Statistička analiza između *MSI* + i *MSI* – tumora pokazala je da nema signifikantne razlike u odnosu na kliničkopatološke karakteristike.

Zaključak

Ispitivanja su pokazala da visoku mikrosatelitnu nestabilnost pokazuju mononukleotidni marker Bat 40 u skupini pacijenata koje smo odredili da pripadaju *HNPCC*. Istraživanja su pokazala se da 66,67% tumorskih uzoraka pripada *RER* pozitivnom fenotipu, a 33,33% pripada *RER* negativnom fenotipu. U skupini tumora sa *RER* pozitivnim fenotipom, uočena je pojava mikrosatelitne nestabilnosti mononukleotidnog markera pokazuje Bat 40 u 83,33%. U skupini tumora sa *RER* negativnim fenotipom, takođe mononukleotidni marker Bat 40 i Bat 26 pokazuje nestabilnosti u 2/3 (66,67%) tumorskih tkiva. Analiza pojedinih kliničkopatoloških parametara (godine starosti, lokalizacija tumora) pokazuje da najvišu frekvenciju mikrosatelitne nestabilnosti ima mononukleotidni marker Bat 40, a analiza spola pokazuje da nestabilan marker kod žena je Bat 25 i TP 53. U zaključku, naša istraživanja ukazuju na važnost upotrebe Amsterdamskih kriterija i Bethesda kriterija u dijagnostici *HNPCC*. Ukoliko se to ne uradi, svi karcinomi su tretirani kao sporadični. Tumori koji pokazuju da su pozitivni, trebaju se dalji istraživati na mutacijskom nivou za *hMSH2* i *hMLH1* gene.

Literatura

1. Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, Canzian F, Hemminki A, Peltomaki P, Chadwich RB, Kääriäinen H, Eskellinen H, Järvinen H, Mecklin JP, De La Chapella (1998): Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 338:1481-1487.
2. Anonymous (1998): The World health repeat. Life in the 21st century, a vision for all. WHO, Geneva 88-89.
3. Cawkwell L, Gray S, Murgatroyd H, Jarvis P, Shepard N, Qiu P (1999): Choice of manager strategy for colorectal cancer based on diagnostic immunohistochemical test for defective mismatch repair system. *Gut* 45: 409-15.
4. De Leon MP, Pedroni M, Benatti P, Percesepe A, Di Gregorio C, Foroni M, Russi G, genuardi M, Nerri G, Leonardi F, Viel A, Capozzi E, Botocchi M, Roncucci (1999): Hereditary colorectal cancer in the general population: cancer regrisation to molecular diagnosis. *Gut* 45 32-38.
5. Iino H, Simms J, Young J, Arnold J, Winship, Webb SJ, Furlong KL, Leggett R, Jass JR (2000): Dna microsatellite instability and mismatch repair protein loss in adenomas presenting in hereditary non polpyposis colorectal cancer. *Gut* 47:37-42.
6. Loukola A, Eldin K, Laihn P, SatovaaraH, Kristo P, Jarvinen H, Mecklin JP, Launoneu V, Aaltonen LA (2000): Microsatellite marker analysis in screening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Cancer Res* 61 (11):4545-9.
7. Sengupta SB, Yiu CY, Boulus PB, de Silva M, Sams VR, Delhanty DA (1997): Genetic instability in patients with metachronous colorectal cancers. *Br J Surg* 84:996-1000.
8. Yamamoto H, Sawai H, Perucho M (1997): Frameshit somatic mutations in gastrointestinal cancer of microsatellite instability mutator phenotype. *Cancer Res* 57:4420-8.