

MED-3950

5.-årsoppgave – våren 2013

Profesjonsstudiet i medisin ved Universitetet i Tromsø

# **Utredning og oppfølging av familier med mistanke om arvelig tykktarmskreft**

Av medisinstudent

Knut-Bjørnar Ulriksen

MK-08

Nina Strømsvik, hovedveileder

PHD, Leder for kompetansesenteret for arvelig kreft, Medisinsk genetisk avdeling,

UNN og førsteamanuensis, Klinisk medisin, UiT.

Thomas Berg, biveileder

PhD, Forsker, Molekylærpatologisk laboratorium, Klinisk patologi, UNN

## FORORD

Denne studentoppgaven ble utført fra perioden høst 2011 til og med våren 2013 i forbindelse med femteårsoppgave MED 3950 på Universitetet i Tromsø. Dette ble gjort i samarbeid med hovedveileder Nina Strømsvik, Medisinsk genetisk avdeling, UNN Tromsø og biveileder Thomas Berg ved Molekylærpatologisk laboratorium, Klinisk patologi, UNN.

Jeg vil rette en stor takk til mine veiledere for uvurderlig bidrag til å øke min kunnskap om oppgavens tema samt god hjelp under skriveprosessen.

Jeg vil også takke Kristin Åberg på Molekylærpatologisk laboratorium for fantastisk god bistand under hospiteringen ved Molekylærpatologisk laboratorium. Vil samtidig takke Samer Al-Saad, Klinisk patologi, UNN Tromsø for å ha delt sin kunnskap om immunhistokjemi.

Tromsø, juni 2013

Knut-Bjørnar Ulriksen

## SAMMENDRAG

### **Bakgrunn**

Det er ofte utfordrende å skille sporadisk og arvelig tykk- og endtarms kreft. Oppgaven beskriver hvordan man kan oppdage de som har en medfødt sårbarhet i MMR-gener og hvorfor slike undersøkelser er viktig i oppfølging av pasienter og familiemedlemmer.

### **Metode**

Studentoppgaven baserer seg på litteratursøk i egnede databaser hovedsaklig Pubmed med nøkkelordene «colorectal neoplasms», «Lynch syndrome», «microsatellite instability», «DNA mismatch repair». Studien baseres også noe på erfaring ved hospitering på Medisinsk genetisk avdeling og Klinisk patologi, UNN.

### **Resultat**

Genetisk utredning starter med å kartlegge familiens krefthistorie. Dersom pasienten ønsker videre utredning, gjøres undersøkelse av mikrosatelittinstabilitet (MSI) og immunhistokjemi (IH) av tumormaterialet for å se etter tegn til mutasjon i gener som er assosiert med Lynch syndrom. Ved videre mistanke gjøres det så mutasjonsutredning av relevante MMR-gener. Det anbefales jevnlig kontrollert hvis man finner feil i MMR-gener eller hvis familiehistorien tilsier at det foreligger en familiær belastning.

### **Diskusjon/konklusjon**

Det foreligger sterke holdepunkter for økt overlevelse og redusert morbiditet gjennom et kontrollopplegg dersom man følger henvisningskriteriene for genetisk utredning og bruker molekylærgenetiske teknikker som kan indikere feil i MMR-gener.

## INNHALDSFORTEGNELSE

Forord.....	2
Sammendrag.....	3
Innholdsfortegnelse.....	4
Bakgrunn	
Innledning.....	5
Sporadisk eller arvelig kolorektalcancer?.....	6
Metode.....	8
Resultat	
Genetisk veiledning og utredning.....	8
Molekylær diagnostikk.....	11
Videre analyse.....	15
Utfordringer i utredningen.....	17
Kontroll ved påvist mutasjon.....	18
Kasuistikker.....	18
Diskusjon/konklusjon.....	20
Referanser.....	22

## BAKGRUNN

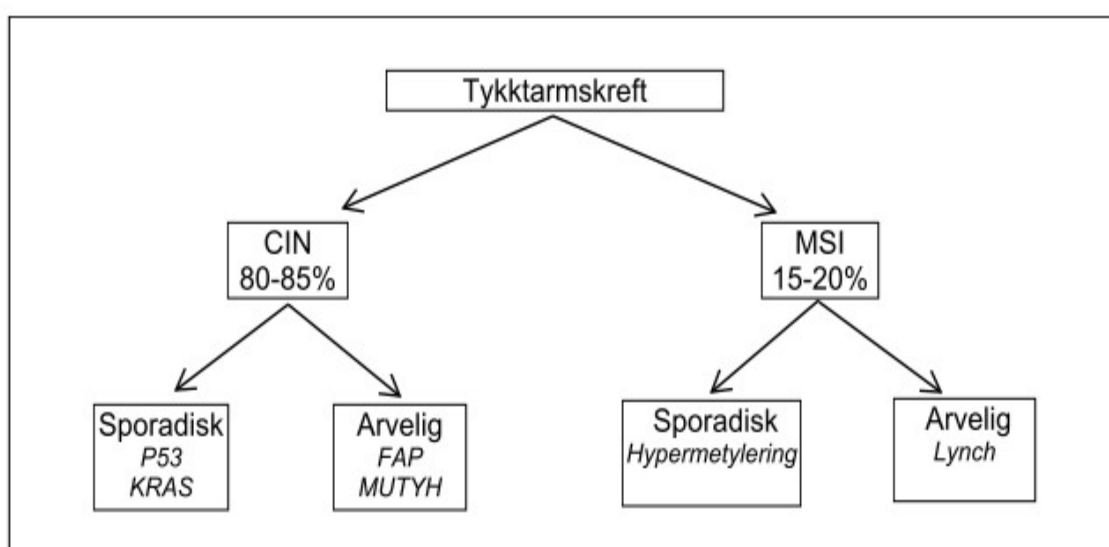
### Innledning

Kolorektalcancer (CRC) har hatt en økende insidens de siste ti årene med 3624 nye tilfeller i 2009. Kreft i tykktarmen er den tredje hyppigste kreftformen hos menn (prostata- og lungekreft er på henholdsvis første og andreplass) og den nest hyppigste kreftformen blant kvinner (brystkreft er hyppigst)[1]. Norge har den høyeste insidensen av de nordiske landene og ligger på verdenstoppen blant kvinner i utvikling av nye tilfeller av CRC. Det er rimelig å anta at den raske veksten vil fortsette hovedsaklig på grunn av økt levealder i befolkningen. Samtidig har overlevelsen for denne kreftformen økt de siste 40 årene og de viktigste årsakene til dette mener man er utvikling av bedre diagnostiske verktøy for å oppdage kreft i et tidligere stadium og ikke minst bedre behandlingsalternativer. I klinikken prøver man å skille mellom arvelig og sporadisk CRC da det avgjør videre strategi for pasientens utredning og kontrollopplegg, samt at man kan tilby genetisk testing med påfølgende kontrollopplegg av familiemedlemmer. De sporadiske tumorene utgjør omtrent 75% av alle tilfellene, mens om lag 25% får CRC som et resultat av familiær sårbarhet i arvestoffet [2]. Arvelig CRC deler seg inn i to greiner: polypøst syndrom, blant annet familiær adenomatøs polypose (FAP) som står for 1-2 % av tilfellene av arvelig CRC, og Lynch syndrom (tidligere kalt hereditær ikke-polypøs kolorektalcancer, HNPCC) som utgjør 2-5 %. Andre familiære tilfeller av CRC på grunn av hittil ukjente genetiske faktorer utgjør rundt 20%. FAP skyldes nedarvet autosomal dominant mutasjon i tumorsuppressorgenet APC, som resulterer i redusert hemming av cellyklus. Kliniske manifesterer dette seg ved dannelse av hundrevis av polyper i tykktarmen. Lynch syndrom nedarves også autosomal dominant, men skyldes mutasjon i mutatorgener, det vil si gener som koder for proteiner som ivaretar genomets integritet [3]. Utvikling av kolorektalkreft kan kobles opp mot tre ulike molekylære hovedmekanismer:

- 1) Kromosominstabilitet (CIN)
- 2) Epigenetiske endringer som gir hypermetylering i proteinkodende områder
- 3) Mikrosatelittinstabilitet (MSI)

Man mener at forstyrrelse i disse tre mekanismene kan redusere den genetisk stabiliteten i onkogen, tumorsuppressorgener og DNA-reparasjonsenzymmer på en

måte som favoriserer karsinogenese. Ved CIN ses et unormalt kromosomantall i hver somatiske celle noe som er assosiert med for eksempel mutasjon i APC og gir opphav til familiær adenomatøs polypose. Det er beregnet at 80-85% av CRC skyldes CIN og 15-20% skyldes MSI og inkluderer både sporadisk og arvelig etiologi (figur 1). Epigenetiske årsaker skyldes ikke endringer av selve genomet, men forandrer proteinuttrykking ved hypermetylering av proteinkodende områder. Ved CRC er det spesielt overmetylering av CpG-øyer (områder med mange cystein- og guaninbaser) som ligger rett ved promotorregioner slik at transkripsjon av genene og følgelig proteinuttrykking uteblir [4, 5].

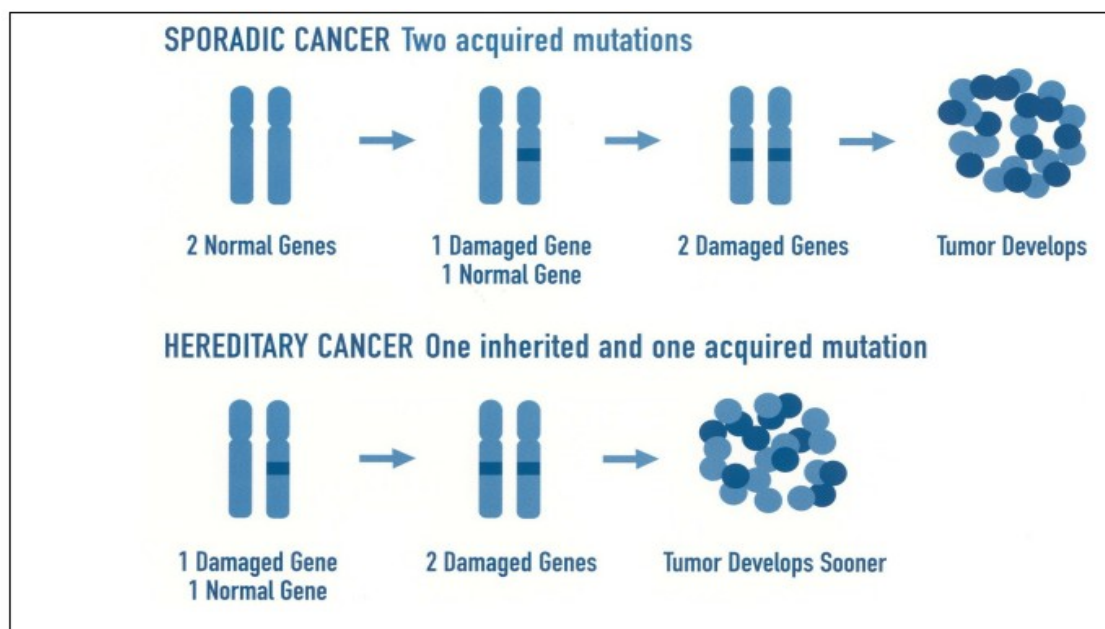


**Figur 1:** Her illustreres at CRC enten kan komme av kromosominstabilitet (CIN) eller mikrosatelittinstabilitet, MSI. CIN er vanligst og ses i 80-85% av krefttilfellene, mens MSI utgjør 15-20%. Det vanligste er sporadisk ervervet kromosominstabilitet (CIN), f.eks mutasjon i tumorsuppressorgenet P53 eller onkogenet KRAS, og er årsak til 78-83% av alle krefttilfellene i tykktarm. Familiær adenomatøs polyppose (FAP) og MUTYH nedarves henholdsvis autosomal dominant og autosomalt resessivt og utgjør om lag 2%. MSI skyldes oftest hypermetylering, det vil si epigenetisk «silencing» av promotorregioner og som derved gir redusert proteinuttrykk. 2-5% av CRC oppstår pga Lynch syndrom [3].

### **Sporadisk eller arvelig kolorektalcancer?**

De aller fleste av oss blir født med to friske alleler (genvarianter) av genene våre. Skjer det en mutasjon i et allel har man fortsatt det andre allelet som kan ivareta genfunksjon. Det må altså skje to mutasjoner for å tape total genfunksjonen, et såkalt «two hit»-fenomen. Er man derimot født med en mutert variant i ett av allelene vil

mutasjon i det normale allelet gi tap av genfunksjon. Det betyr at én mutasjon er tilstrekkelig for å medføre sykdom, og det defineres derfor som «one hit»-fenomen (figur 2).



**Figur 2.** Øverst forklares prinsippet der man blir født med to friske gener hvor det trengs to sporadiske mutasjoner for å utvikle kreft, såkalt «two-hit»-prinsipp. Nederst ser en tilfellet hvor man ved fødsel allerede har en mutasjon i et gen der det kun behøver å skje en sporadisk mutasjon i det andre genet for å utvikle kreft, «one-hit»-prinsipp, og derved øker risikoen betydelig for å utvikle kreft tidligere i livet enn normalt. Illustrasjonen kalles også Knudsons «Two-hit»-teori (Arkivbilde, Medisinsk genetisk avdeling, UNN).

Fokuset i denne oppgaven blir å vise hvilke pasienter som innfrir henvisningskriteriene for genetisk utredning med hensyn på Lynch syndrom. Den tar også for seg hvordan man ved hjelp av ulike molekylærgenetiske teknikker kan skille mellom sporadisk og arvelig kreft i tykk- og endetarm og hvordan man videre følger opp pasienter der man har funnet eller sterkt mistenker at det foreligger en arvelig disposisjon for utvikling av CRC. På grunn av oppgavens begrensning tar jeg ikke med utredning og oppfølging av pasienter med mistenkt polyposesyndrom, men legger hovedfokuset på Lynch syndrom da dette er den vanligste formen for arvelig CRC. Oppgaven tar heller ikke grundig for seg selve behandlingen av CRC.

## METODE

Oppgaven baserer seg på litteratursøk i egnede databaser, hovedsaklig Pubmed, med nøkkelordene *colorectal neoplasms*, *Lynch syndrome*, *microsatellite instability*, *DNA mismatch repair*. Wenche Sjursens artikkel «Molekylærgenetiske analyser ved utredning av arvelig kolorektal cancer» [15] er brukt i stor grad ved beskrivelse av molekylær diagnostikk. Undertegnede har lite klinisk erfaring på området noe som gjør det vanskelig å trekke inn egne erfaringer om temaet. Har imidlertid under andre valgfriperiode fått hospitere på UNN ved Medisinsk genetisk avdeling med deltakelse på genetisk veiledning av pasienter, og vært på Klinisk patologi og sett hvordan patologene vurderer immunhistokjemiske snitt. Til slutt var jeg en uke ved Molekylærpatologisk laboratorium og deltok i prosessen fra der man tar vevsbiter fra tumorvev med skalpell (og friskt vev for sammenligning), ekstrahere DNA og analysere materialet via laboratorietekniske metoder.

## RESULTAT

### Genetisk veiledning og utredning

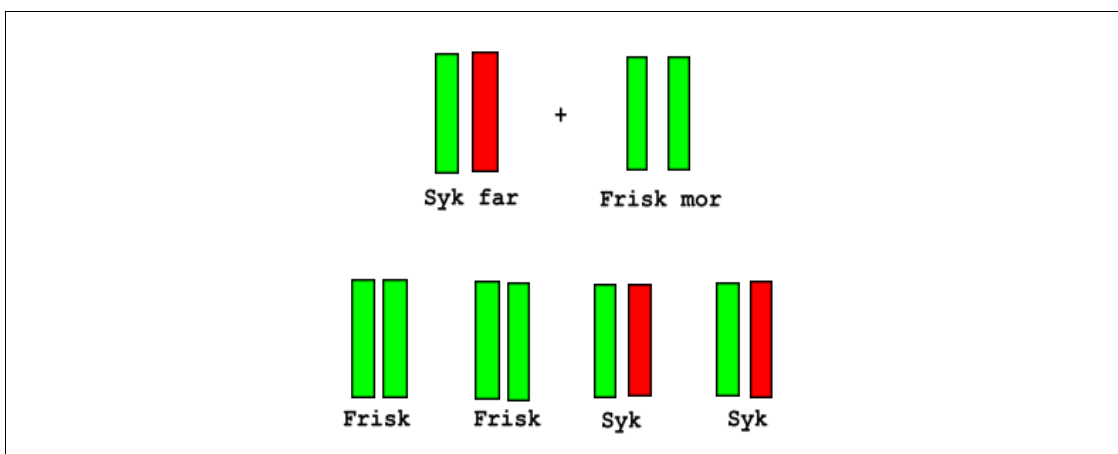
Det er opprettet genetiske nasjonale retningslinjer for hvilke pasienter som bør henvises til genetisk veiledning [6]:

- Alle pasienter med  $\geq 5$  adenomatøse polypper  $< 70$  år eller
- Alle pasienter med hamartøse polypper
- Familier der det er minst tre syke med tarm-, livmor- eller urinsveiskreft i minst to generasjoner og minst en av dem  $\leq 50$  år, og ingen friske mellom de syke.
- Påvist MSI eller unormal IH i kolorektal- eller endometrie-cancer  $\leq 60$  år
- To nære slektninger med gjennomsnittsalder for tykktarmskreft  $\leq 50$  år, eller
- Tre nære slektninger med gjennomsnittsalder tykktarmskreft  $\leq 70$  år.

Når det er etablert kontakt med avdelingen på sykehus sender genetiker ut et familiekart til personen som er henvist, også kalt index, slik at denne kan fylle ut informasjon om hvilke familiemedlemmer som har hatt kreftsykdom. I tillegg legges



det ved et samtykkeskjema for å gi tillatelse til å verifisere diagnosene det opplyses om i familiekartet via Kreftregisteret eller behandlende sykehus [7]. Skjemaene returneres tilbake til sykehuset slik at genetiker kan vurdere risiko for at index kan være arvelig belastet eller ikke. Hvis det er grunnlag for det gis det tilbud om videre genetisk utredning. Som genetiker er det viktig å kunne presentere for pasienten på en enkel måte hva som kjennetegner autosomal dominant arvegang og hvilke verktøy som er tilgjengelige for å påvise eventuelle mutasjoner i genene våre. Typisk for en autosomal dominant mutasjon er at barn med en forelder med mutasjon har 50% risiko for å arve mutasjon (figur 3) og det rammer gjennom hver generasjon. Penetrans og debut for kliniske symptomer kan variere ut i fra hvilken sykdom det er snakk om. Man mistenker Lynch syndrom hos de som er syke eller har syke førstegradslektninger som innfrir Amsterdam II-kriteriene (tabell 1) eller får påvist mikrosatelittinstabilitet eller unormal immunhistokjemi i kolorektalkreft eller livmorkreft  $\leq 60$  år [6]. En studie viser at diagnosen Lynch syndrom gir en livstidsrisiko på 58,6-78,9% for menn og 37,6-66,9% for kvinner for å utvikle CRC, og rammer i gjennomsnitt personer i alderen 56,3-68 år, noe som er høyere enn hva tidligere studier har vist. Ved UNN praktiseres det i dag at man gjør rutinemessig analyse med henblikk på Lynch syndrom på tumorer fra alle pasienter under 60 år ved diagnosetidspunktet for CRC (forutsatt at pasienten ikke reserverer seg mot slike undersøkelser). Det foreligger holdepunkter for at man bør øke aldersgrensen for hvem man tester rutinemessig [8].



**Figur 3.** Hvert individ har to genvarianter (alleler): ett fra mor og ett fra far. Rød rektangel representerer syk genvariant og grønn er frisk genvariant. Ved autosomal arvegang er det nok å arve en syk genvariant for å utvikle sykdom og derved 50% risiko hvis en av foreldrene er affisert.

Pasienter med påvist Lynch syndrom har økt livstidsrisiko for å utvikle andre Lynch-relaterte krefttyper som primærcancer (tabell 2) og det er vist at det sannsynligvis er større risiko for å utvikle disse kreftformene hos disse pasienter sammenlignet med den øvrige befolkningen [9]. Den vanligste primærcanceren hos begge kjønn etter CRC er kreft i urinveiene og deretter kreft i øvre GI-traktus. Hos kvinner er det betraktelig økt risiko for endometriskancer sammenlignet resten av befolkningen. Hos kvinner med Lynch syndrom er endometriskreft den vanligste primærcanceren og en undersøkelse viste det seg at omtrent 2% av kvinnene med nydiagnostisert kreft i livmorslimhinne hadde Lynch syndrom [9, 10].

Amsterdam II-kriteriene (alle må være oppfylt):

- Minst tre slektninger med HNPCC-relatert kreft, der én skal være førstegradsslektning\* av en av de andre to.
- Minst to etterfølgende generationsjoner skal være affisert.
- Minst én diagnostisert < 50 år
- Kolorektalcancer skal være histologisk verifisert og følgelig skal FAP være ekskludert.

\* Foreldre, barn, søsken.

HNPCC-relatert kreft: tarm-, livmor- eller urinveiskreft.

**Tabell 1.** Amsterdam II-kriteriene [6].

### *DNA-testing:*

Man klassifiserer DNA-tester for å påvise genmutasjon og risiko for sykdom i tre grupper [11]:

1. Diagnostisk analyse: test av personer som allerede har utviklet symptomer og er syke.
2. Presymptomatisk analyse: test av friske personer der påvist mutasjon gir 100% sannsynlighet for at man utvikler sykdommen.
3. Prediktiv analyse: test av friske personer der man ved påvist genmutasjon kan beregne risiko for å utvikle sykdommen.

Lynchrelatert cancer	10-års livstidsrisiko 95% KI	20-års livstidsrisiko 95% KI	Risiko sammenlignet med øvrig befolkning. 95% KI
Nyre, nyrebekken og ureter.	0,87 – 3,17	2,86 – 7,68	7,97 – 17,94
Urinblære	0,65 – 2,75	1,37 – 5,20	4,08 – 10,99
Tynntarm	0,28 – 1,73	1,92 – 6,41	39,95 – 111,29
Magesekk	0,13 – 1,40	0,19 – 2,48	2,32 – 9,69
Galleveiene	0,16 – 1,69	0,42 – 2,73	1,81 – 10,94
Prostata	0,86 – 4,77	2,69 – 9,76	1,23 – 3,01
Endometrium	7,66 – 17,11	16,79 – 32,84	27,91 – 56,06
Mammae (hos kvinner)	0,58 – 3,83	0,63 – 16,69	1,07 – 2,56
Ovariene	0,00 – 2,11	0,50 – 4,14	1,28 – 7,97

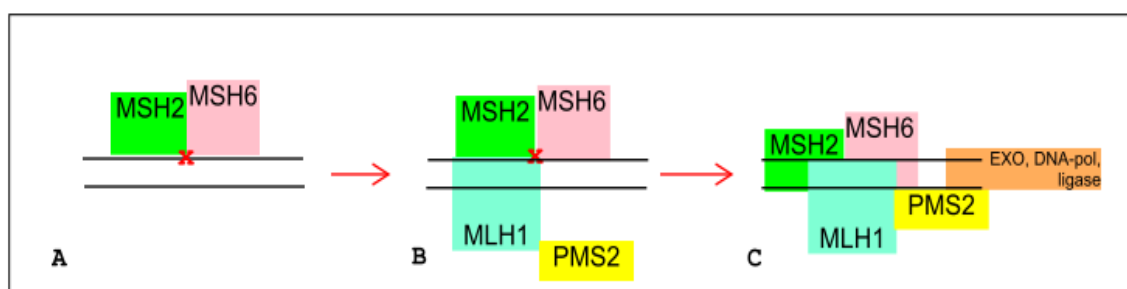
**Tabell 2.** Oversikt over risiko for å utvikle andre Lynchrelatert kreft utenom kolorektalkreft som primærcancer. Det er kun endometriecancer som har en signifikant økt 10-års livstidsrisiko. Det er ikke signifikant økt 20-års livstidsrisiko for å utvikle kreft i magesekk, galleveiene, mammae hos kvinner eller ovariene [9].

Ved påvist genfeil i familien tilbys i dag en frivillig prediktiv gentest av friske individer for å avklare om man er bærer av sykdomsmutasjon. I følge Bioteknologiloven skal det gis genetisk veiledning før, under og etter gentesten er tatt, samt at det ved prediktive og presymptomatiske undersøkelser skal foreligge skriftlig samtykke fra pasient. Det er heller ikke lov for helsepersonell å drive oppsøkende informasjonsvirksomhet. Det betyr at det er index som kan informere sine familiemedlemmer om mulig arvelig sykdom i familien [12]. Cathrine Bjorvatn ved Universitetet i Bergen har i sin doktoravhandling funnet at de fleste takler informasjon om sin bærerstatus på en god måte, men hun finner også at 25% sliter med angst, depresjon og stressrelaterte symptomer i etterkant av veiledningen. De som hadde oppsøkt genetisk avdeling selv, hadde høy utdanning og et solid sosialt nettverk taklet det best [13]. Det kan tenkes at en klinisk genetiker bør gjøre seg en mening om pasientens mentale sårbarhet ved å vurdere personens iboende og eksterne ressurser før testene utføres.

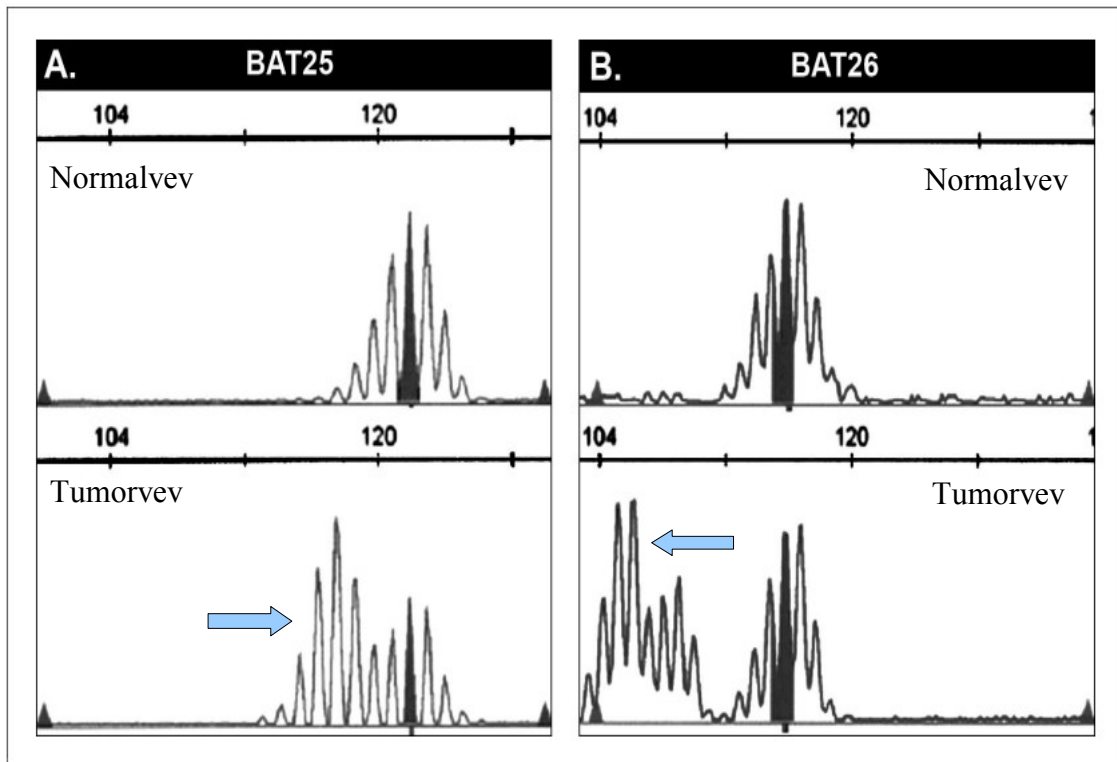
### **Molekylær diagnostikk**

Ved molekylærpatologisk laboratorium på UNN utføres i dag analyser for å påvise mikrosatelittinstabilitet (MSI) samt immunhistokjemi (IH) som kan finne reduksjon i

uttrykk av fire spesifikke mismatch repair-proteiner (MMR) knyttet til Lynch syndrom; MLH1, MSH2, MSH6 og PMS2. Mikrosatelitter er DNA-sekvenser vanligvis bestående av 1-6 basepar som kan repeteres opptil 100 ganger og kan være spredt gjennom hele genomet. Disse områdene er spesielt sårbare for feil under DNA-replikasjon noe som kan resultere i DNA-sløyfer med insersjoner eller delesjoner. Vanligvis blir slike glipper tatt hånd om av mismatch repair-proteiner, MMR, slik at mikrosatelittenes integritet ivaretas fra cellegenerasjon til cellegenerasjon (figur 4). MSI kan påvirke områder som har med regulering av cellyklus å gjøre, der i blant tumorsuppressorgener og onkogen, som i verste fall kan gi ukontrollert celledeling. MSI-undersøkelse er en indirekte test på mutasjon i reparasjonsgenene og man henter ut tumorvev og normalvev som er formalinfiksert og parafinstøpt i blokker. DNA'et blir så ekstrahert fra vevet med *QIAamp DNA mini kit*. PCR-teknikk benyttes så for å amplifisere et panel av seks mikrosatelitter: BAT25, BAT26, BAT40, D2S123, D5S346 og D17S250. Disse størrelsesbestemmes så ved kapillærelektroforese og gjør det mulig å sammenligne størrelse på mikrosatelitter fra tumor- og normalvev (figur 5). Dersom to eller flere mikrosatelitter viser lengdeforskjell i tumorvev i forhold til normalvev defineres tumor som MSI og derved sterk indikasjon for videre utredning. MSI manifesterer seg i over 90% av alle tumorer fra pasienter med Lynch syndrom, men man finner også MSI hos 10-15% av de med sporadisk CRC [15]. Det betyr at MSI-analyse ikke er spesifikk for Lynch syndrom, men likevel hensiktsmessig helt i starten av utredningen fordi det er en sterk indikasjon på mutasjon i MMR-genene.

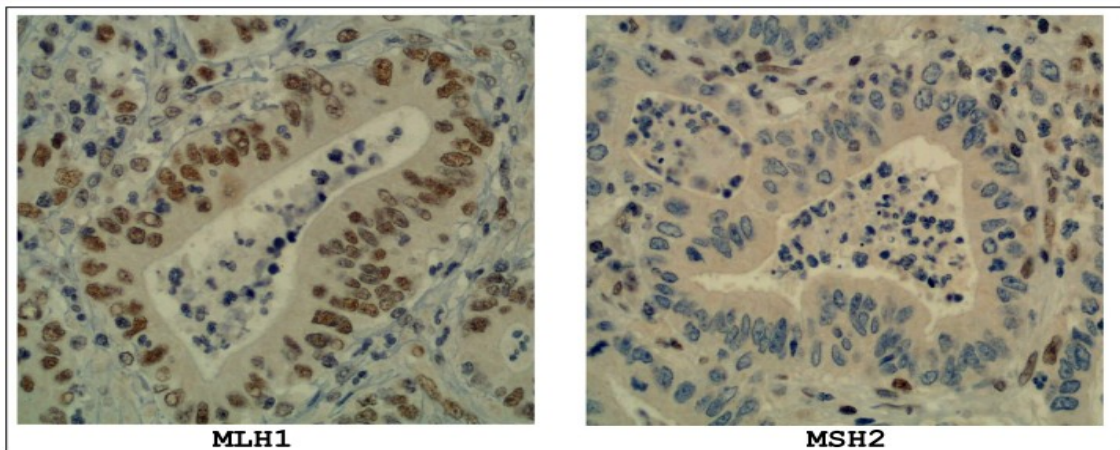


**Figur 4.** MMR-proteinene binder seg sammen i komplekser og reparerer DNA. MSH2/MSH6-komplekset gjenkjenner insersjoner og delesjoner. Rødt kryss representerer DNA-skade på grunn av feilkopiering (A). MSH2/MSH6-komplekset gjenkjennes av MLH1/PMS2 som også fester seg til DNA-tråden (B). Proteinene aktiverer exonuklease, DNA-polymerase og ligase som fullfører DNA-reparasjon. [14].



**Figur 5.** Her vises to mikrosatellittmarkører, BAT25 og BAT26, som begge er mononukleotider analysert gjennom kapillær elektroforese. Størrelsen på fragmentene oppgis i basepar (bp). De to øverste utsnittene representerer normalt vev og brukes som referanse, mens de to nederste er prøve tatt fra tumorvev. Hvis prøven hadde vært negativ for MSI hadde tumorvevsprøvene vist samme mønster som normalvev. Denne figuren viser tydelig MSI da man kan se en ekstra topp fra tumorvev i begge markørene (markert med pil) [16]

Parallelt med MSI gjøres immunohistokjemi der man lager fire histologiske snitt av tumorvev og benytter primærantistoff mot henholdsvis MLH1, MSH2, MSH6 og PMS2. Enzymmerket sekundærantistoff tilføres og vil visualisere MMR-proteinene som et brunt fargeomslag når en ser på snitt gjennom mikroskop (figur 6). Vurdering av proteinuttrykk ved immunhistokjemi gjøres av patolog. Tap av MLH1 har en sterk assosiasjon med samtidig tap av PMS2, mens tap av MSH2 forbindes med samtidig tap av MSH6. Tap av PMS2 og MSH6 kan forekomme isolert, men det er svært sjelden isolert tap av MLH1 og MSH2. En gruppe ved Stanford University i USA har gjort funn som tyder på at det er tilstrekkelig med to antistoffpanel, mot dagens fire, fokusert på PMS2 og MSH6 for screening på om MMR-proteinene uttrykkes, noe som kan være med å øke kostnadseffektiviteten for laboratoriet [17].



**Figur 6.** Til venstre ses normalt uttrykk av MLH1 og til høyre er det redusert uttrykk av MSH2. Cellekjerner i tumorceller farges brunt ved uttrykk av MMR-proteiner. Ved fravær av uttrykk ses bare den blå bakgrunnsfarge i kjerne (Arkivbilde, Thomas Berg, PhD, Klinisk patologi, UNN).

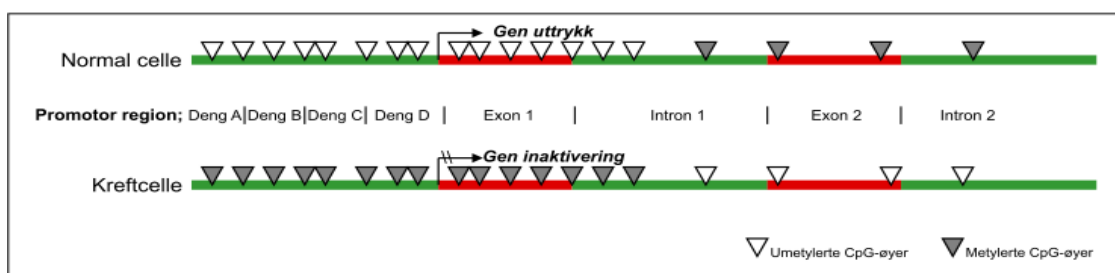
Grovt kan man si at det indikasjon for videre utredning hvis det foreligger:

1. MSI-H (to eller flere unormale mikrosatelitter) med unormal eller normal IH
2. MSI-L (ingen eller én unormal mikrosatelitt) med unormal IH
3. Mikrosatelittstabilitet og normal IH, men ved sterk mistanke på bakgrunn av familiehistorie. For eksempel at pasienten innfrir Amsterdamkriteriene.

Det er potensielle feilkilder ved både MSI- og IH-analyser. For å teste MSI bør disseksjonsmaterialet inneholde minimum 30-50% tumorvev. I formalinfikserte preparat med små mengder tumorvev kan det være utfordrende å ta ut relevant vev fra vevsbløkk eller snitt. For større presisjon kan tumorvev dissekeres ut med laser. Ulempen er at cellemengden kan bli så liten at man kan få falsk-negativt svar på MSI-undersøkelsen. IH kan gi både falsk-positive og falsk-negative resultat fordi vurderingen om MMR-proteinene uttrykkes vurderes ut fra patologens skjønn om det er tilstrekkelig fargeutfelling, og metoden er sensitiv for tekniske forhold ved materialet; for eksempel vil fiksering og lagring av vev påvirke immunfarging. Det kreves derfor erfaring for å gjøre mest mulig sikre vurderinger [18] i forhold til materialets beskaffenhet. I noen tilfeller kan MMR-genene være mutert og miste sin funksjon, men likevel danne proteiner som kan ta til seg farge ved IH noe som kan gi falsk negativ resultat [19]. Ved tap av MLH-1 og MSI-H gjøres det rutinemessig en undersøkelse av metyleringsstatus i MLH-1-genet da ca 15 % av sporadisk CRC skyldes

hypermetylering av CpG-øyer i promotorregionen til MLH-1-genet (figur 7) . På grunn av økt metylering vil ikke transkripsjonsfaktorer feste seg til MMR-genet og uttrykke MLH-1 som kan ivareta genomet noe som manifesterer seg som MSI [16].

Metyleringsstatus i MMR-gener kan bestemmes ved hjelp av Methylation Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MS-MLPA) (figur 8). Det brukes en probemix (SALSA®MS-MLPA®kit ME011 MMR, MRC-Holland) som er spesifikk for å registrere metyleringsstatus i CpG-øyer i MMR-gener. Man kan skille mellom metylert og ikke-metylert DNA ved å bruke restriksjonsenzym, *HhaI*, som kutter ikke-metylert DNA. Metylert DNA kuttet ikke og vil ses som intakte fragmenter når resultatene fra MS-MLPA tolkes i programmet Genemapper (figur 9). I tillegg til MS-MLPA gjøres også sekvensering av onkogenet BRAF for punktmutasjon V600E som er positiv i 40-50% av sporadisk CRC og alltid negativ ved Lynch-assosierte tumorer [15,16].



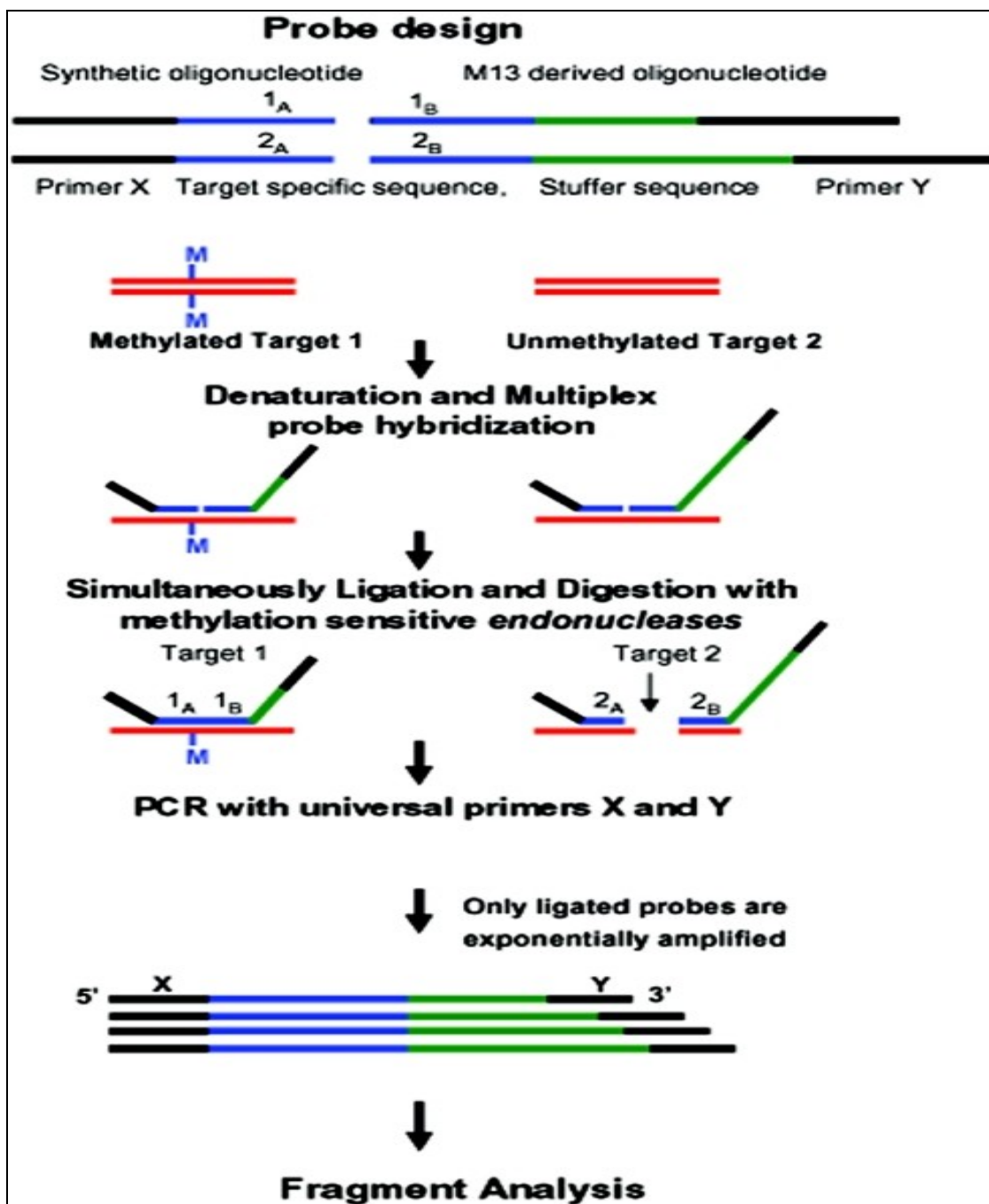
**Figur 7.** Illustrerer hvordan hypermetylering av Deng A-D, av og til delvis inn i intron 1, hindrer transkripsjonsfaktorer å binde seg til promotor og derved fører til inaktivering av MMR-transkripsjon [15].

BRAF-mutasjon er ikke vanlig i sporadisk endometrisk cancer og kan derfor ikke brukes for å skille sporadisk livmorkreft fra de som har med Lynch syndrom å gjøre [20]. MSI og IH er nyttige redskaper i utredningen, men uten å analysere metyleringsstatus ved funn av MLH1-tap ville nok mange pasienter fått diagnosen Lynch syndrom når det faktisk var et sporadisk tilfelle. Det er beregnet at kun 1/3 av pasienter hvis tumor-DNA gjennomgår disse analysene viser seg å være arvelig betinget [21].

### Videre analyse

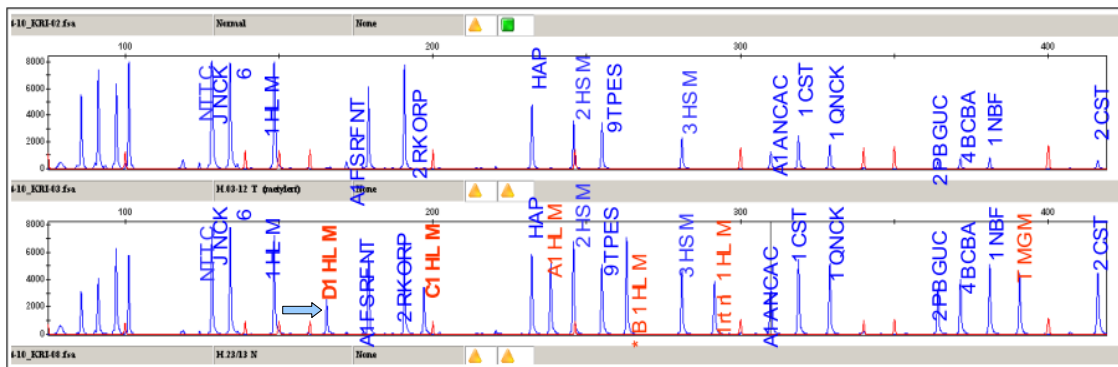
Hvis det foreligger unormalt MSI og IH samt negativ utslag på MS-MLPA og ikke-

mutert BRAF gir dette meget sterke holdepunkter for Lynch syndrom og det gjøres



**Figur 8.** Prinsippet bak MS-MLPA. DNA blir først denaturert, så tilsatt probemix og deretter hybridisert. Probemixen består av to oligonukleotider; en kort og en lang. Begge har primerseter og målspesifikke sekvenser (blått) som fester seg til de genene man ønsker å utrede (CpG-øyer i promoterregioner ved Lynch syndrom). Den lengste oligonukleotiden har en stuffersekvens som varierer i lengde. Analyseprogrammet Genemapper registrerer de ulike lengdene slik at man kan skille de ulike fragmentene fra hverandre. I Probe-DNA-blandingen skjer ligering og klipping av metyleringsspesifikke enzymer; umetylerte CpG-øyer klippes og følgelig ingen ligering og amplifisering. Hvis CpG-øyene er metylerte vil probene ligeres og danne amplifiseringsprodukt ved PCR [27].





**Figur 9.** Resultat av fragmentanalyse i programmet Genemapper. Fragment med blå skrift representerer kontrollgener. De med rød skrift er genfragmenter som viser metylering. Fra tumorprøven H03.12T ses tydelig at fragmentene MLH1D (pil) er metylerte hvilket indikerer sporadisk CRC (Arkivbilde, Thomas Berg, PhD, Klinisk patologi, UNN).

mutasjonsanalyse av de aktuelle MMR-genene. Medisinsk genetisk avdeling ved UNN sender sine prøver til St. Olavs Hospital i Trondheim for mutasjonsutredning av MMR-gener. Typisk innebærer en slik utredning først at DNA ekstraheres fra blod, for så å undersøkes for delesjoner eller duplikasjoner i MMR-gen ved Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) med probemix (SALSA® MIPA® kit P003/P008, MMR, MRC-Holland). Hvis MLPA-resultatet er negativt gjøres det ytterligere undersøkelser via sekvensering av hele det aktuelle genet for å påvise eventuelle mutasjoner, enten substitusjoner, delesjoner eller duplikasjoner av enkeltbaser. Ved påvist mutasjon gis diagnosen Lynch syndrom [15].

### Utfordringer i utredningen

Det er gjort funn som viser at de Reviderte Amsterdamkriteriene har en sensitivitet på 87%, 62%, 38% og 48% for å oppdage personer med mutasjoner i henholdsvis MLH1, MSH2, PMS2 og MSH6. Det er utfordrende å identifisere mulige bærere av MMR-mutasjonene gjennom de reviderte Amsterdamkriteriene særlig tilfellene med genfeil i PMS2 og MSH6 på grunn av lav sensitivitet [22]. MSH6-relaterte tumorer er estimert til å utgjøre 5-27% av årsaken til Lynch-familier. I disse tilfellene ser man krefttilfellene debutere i senere alder (median 56 år). Penetransen er omtrent lik MLH1/MSH2-assosierte tumorer hos menn (22-69%), men er lavere hos kvinner (10-30%). Dette kan resultere i at man i noen tilfeller ikke detekterer foreldre som er

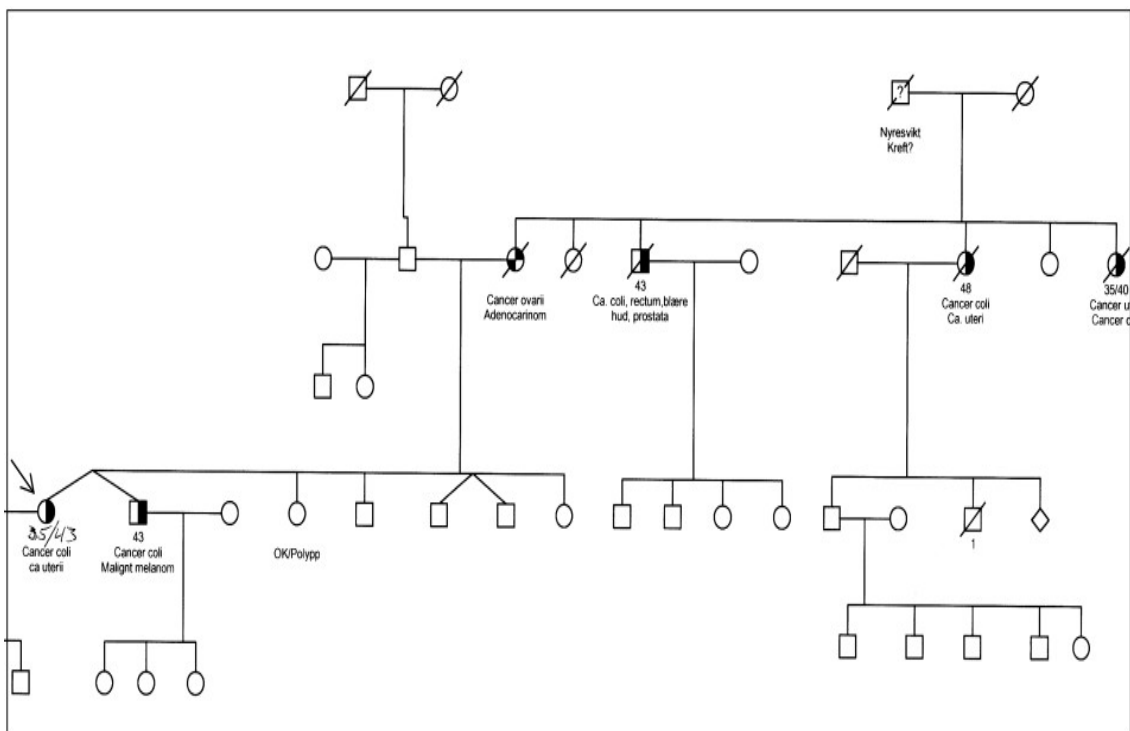
mutasjonsbærere til individer som er rammet av Lynch-relatert kreft når man kartlegger familiens krefthistorikk [23]. Man kan ikke ekskludere arvelig risiko selv om ikke kartlegging av familietreet indikerer dette. Noen familiemedlemmer kan for eksempel underrapportere sykdom eller være i fornektelse av sykdom og enkelte kan oppgi ikke-biologiske familiemedlemmer i familietreet. Det kan være at klinikere unnlater å kartlegge en mulig hereditær årsak til CRC selv om dette er standard anbefaling og retningslinjene for henvisning er lett tilgjengelige [24].

### **Kontroll ved påvist mutasjon**

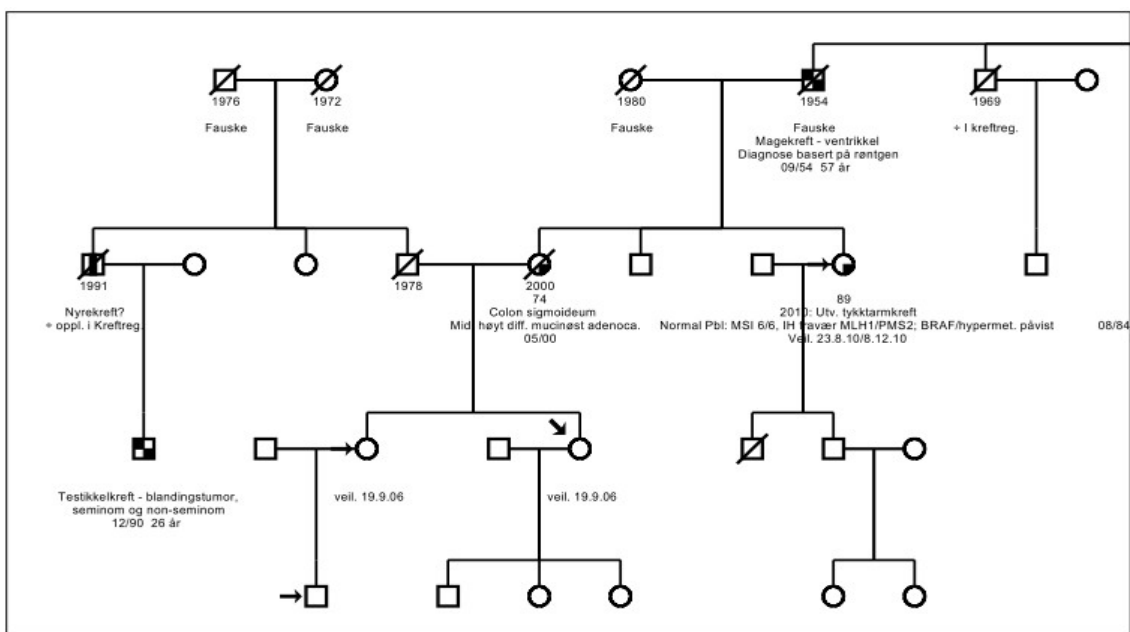
I følge NGAKs retningslinjer skal personer som har fått påvist feil i MMR-genene eller oppfyller Amsterdam 1-kriteriene (AMS 1) få tilbud om koloskopi hvert annet år fra fylte 25 år. Det tilbys også kontrollopplegg med koloskopi hvert 5. år fra 40 års alder til familiemedlemmer ved mistanke om familiær tarmkreft, det vil si to nære slektninger (første eller annengrad) med gjennomsnittsalder kolorektalkreft (CRC) < 50 år, eller tre nære slektninger (første eller annengrad) med gjennomsnittsalder CRC < 70 år. Hvis det påvises adenomatøs polypp skal man videre kontrolleres igjen etter ett år. I noen tilfeller må man også vurdere subtotal eller total kolektomi. Kontroller med intervaller på 1-2 år har vist å redusere risiko for å utvikle CRC, forhindre død og redusere mortalitet med 65% hos familier med Lynch syndrom [25]. Det viser seg at proximale kolon er predileksjonssted for MSI-assosierte tumorer [26]. Hos kvinner med påvist genfeil bør det også gjøres livmorundersøkelse hvert år fra fylte 30 år hos gynekolog med vaginal ultralyd og eventuelt biopsi av livmorslimhinne via papilleprøve [6]. I følge *Prioriteringsveileder for Gastroenterologisk kirurgi* skal tiden fra fastsatt diagnose til påbegynt behandling ikke overstige tre uker.

### **Kasuistikker**

Følgende figurer viser to familietrær: ett der man valgte å gå videre med utredning (figur 10) og ett der man ikke satte i gang kontrollopplegg (figur 11).



**Figur 10.** Illustrasjon av et familiekart der man gikk videre med kontrollopplegg og det ble senere påvist feil i MMR-gen. Dette var ikke uventet da samme person utviklet både cancer colli og cancer uteri (Arkivbilde, Nina Strømsvik, PhD, Medisinsk genetisk avdeling, UNN).



**Figur 11.** Illustrasjon av et familiekart der man ikke valgte videre kontrollopplegg siden familien ikke innfrir noen kriterier og undersøkelse med MSI og IH var normal. Skrå pil viser index mens de vannrette pilene viser de som har vært til genetisk veiledning. Det tilbys MSI og IH selv om familiehistorien ikke sterkt indikerer arvelig disposisjon (Arkivbilde, Nina Strømsvik, PhD, Medisinsk genetisk avdeling, UNN).

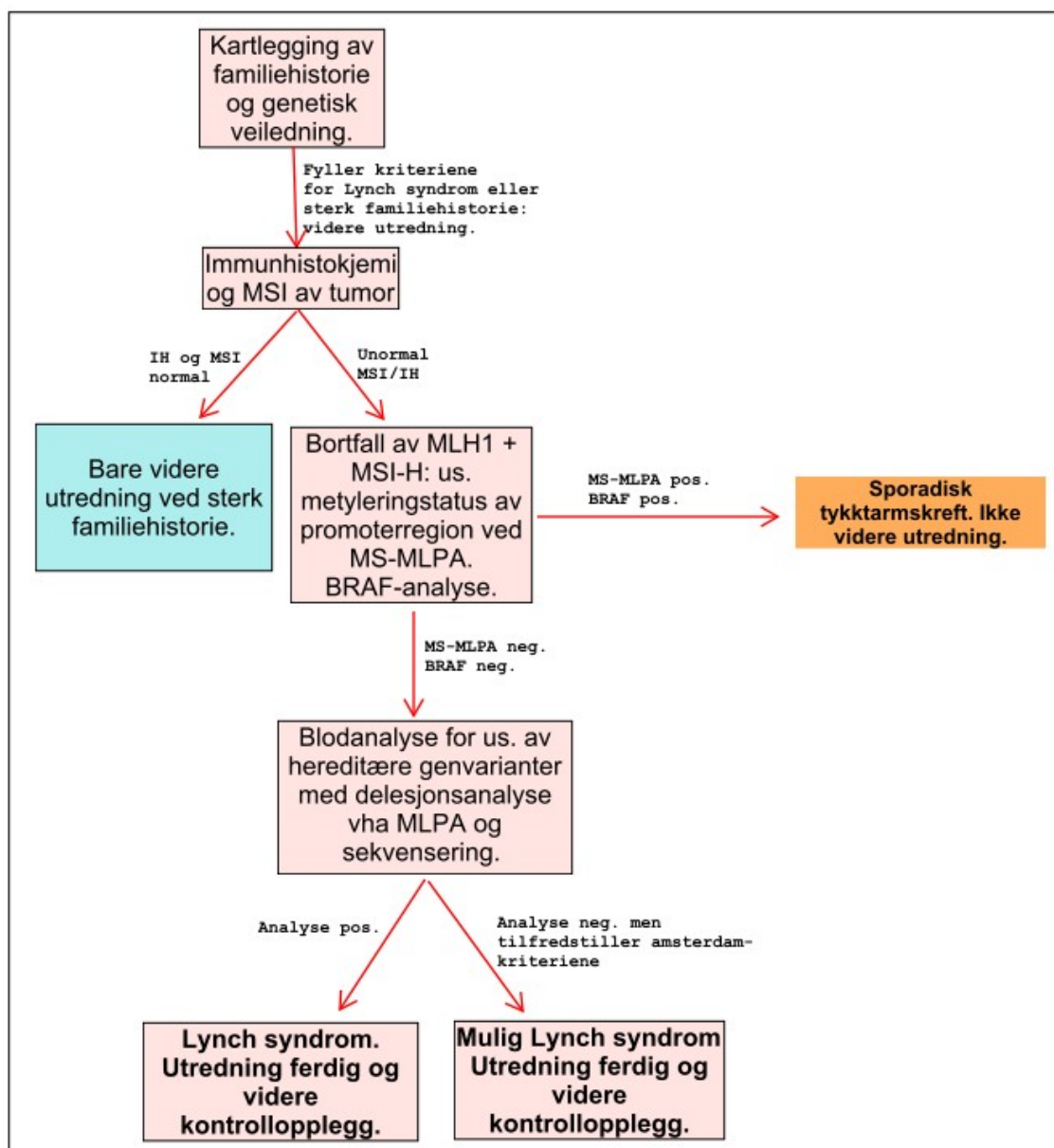
## DISKUSJON/KONKLUSJON

Lynch syndrom er den vanligste formen for arvelig CRC og sykdommen skyldes mutasjon i gener som koder for MMR-proteiner. Påvist genfeil gir økt livstidsrisiko for å utvikle andre kreftformer, spesielt endometriecancer hos kvinner. Kartlegging av familiehistorie er meget sentralt i utredning av pasienter med mistanke om arvelig CRC. Informasjon hentes eksempelvis fra Kreftregisteret og histologisvar fra tidligere journaler. I klinisk praksis er lav terskel for å utføre MSI og IH og det trenger nødvendigvis ikke være en tung familiehistorie for å utføre disse. Før man kan iverksette genetisk testing kreves det skriftlig samtykke fra pasienten, eller fra den etterlatte dersom undersøkelsesmaterialet kommer fra en som er død.

Molekylærgenetiske analysemetoder har vist seg å være meget nyttige for å skille mellom arvelig og sporadisk CRC. MSI og IH er viktige redskaper i utredningen ved mistanke om Lynch syndrom og det er hensiktsmessig å gjøre disse undersøkelsene tidlig i utredningen da de indikerer mulig mutasjon i MMR-genene. Det er nyttig å gjøre både MSI og IH fordi begge har potensielle feilkilder og risiko for at man kunne ha oversett en arvelig disposisjon hadde nok blitt større hvis man bare gjorde MSI eller IH. MSI og IH er metoder som er mulig å gjøre på mange av dagens laboratorier slik at analysemetodene er mer tilgjengelig. Hvis man finner MSI-H og bortfall av MLH1 gjøres metyleringsstatus ved hjelp av MS-MLPA og BRAF-undersøkelse og positive funn tyder på sporadisk kreft, mens negativt funn gir mistanke om Lynch syndrom og en analyserer aktuelle MMR-gener i blodprøve fra pasient. Ved påvist genfeil er det anbefalt at det i tillegg til regelmessig koloskopi og livmorundersøkelse også gjøres kontroller med tanke på kreft i urinveier, prostata, magesekk, eggstokker dersom det foreligger flere av disse kreftformene i familien. Det er ikke spesifisert i NGAK-retningslinjene hvor ofte disse bør gjøres. Noen kvinner vurderer også, i samråd med gynekolog, risikoreduserende fjerning av uterus og ovarier.

Det er spesielt utfordrende å identifisere MSH6-assosierte tilfeller da disse har et mer sporadisk mønster, for eksempel høyere debutalder. De fleste som tilbys utredning i dag er på bakgrunn av familiehistorie og ikke påvist genfeil. En fordel med prediktive tester er at man kan forebygge sykdom før man får symptomer, men en ulempe er at man skaper unødig bekymring fordi det ikke er 100% sikkert at man utvikler sykdom selv om man har genfeilen. Da er det viktig for klinikeren å gi god og ærlig

informasjon i den genetiske veiledningen av pasienten og å få fram positive og negative sider ved å gentestes. Basert på resultatet av litteraturgjennomgangen i denne oppgaven kan man sette sammen et flytskjema for gangen i utredning og oppfølging av pasienter med mistenkt Lynch syndrom (figur 12).



**Figur 12.** Forenklet flytskjema for utredning ved mistanke om Lynch syndrom.

## REFERANSER

1. *Cancer in Norway 2009*. 2011; Available from:  
[http://www.kreftregisteret.no/Global/Cancer%20in%20Norway/2009/Cancer\\_in\\_Norway\\_2009\\_trykkversjonen\\_for\\_web.pdf](http://www.kreftregisteret.no/Global/Cancer%20in%20Norway/2009/Cancer_in_Norway_2009_trykkversjonen_for_web.pdf)
2. Gala, M. and D.C. Chung, *Hereditary colon cancer syndromes*. *Semin Oncol*, 2011. **38**(4): p. 490-9.
3. *Nasjonalt handlingsprogram med retningslinjer for diagnostikk, behandling og oppfølging av kreft i tykktarm og endetarm*. 2010; Available from:  
<http://helsedirektoratet.no/publikasjoner/nasjonalt-handlingsprogram-med-retningslinjer-for-diagnostikk-behandling-og-oppfolging-av-kreft-i-tykktarm-og-endetarm/Publikasjoner/Tykk-%20og%20endetarm.pdf>.
4. Cardoso, J., et al., *Chromosomal Instability in MYH- and APC-Mutant Adenomatous Polyps*. *Cancer Research*, 2006. **66**(5): p. 2514-2519.
5. Søreide, K., *Genetikk og molekylær klassifisering ved kolorektal kreft*. *Tidsskrift for Den norske legeforening*, 2007. **127**: p. 2818-23.
6. NGAK. *NGAK retningslinjer - Arvelige syndromer med gastro-intestinal cancer*. 2009; Available from: <https://docs.google.com/viewer?a=v&pid=sites&srcid=ZGVmYXVsdGRvbWFpbmNub3J3Z2FrdmVkbGVnZ3xneDoxNTMzMmFhNDI5YjIjOTVm>.
7. Tromsø, U. *Kompetansesenter for arvelig kreft*. 2011 [cited 2012; Available from: <http://www.unn.no/kompetansesenter-for-arvelig-kreft/category26897.html>].
8. Hampel, H., et al., *Cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: later age of onset*. *Gastroenterology*, 2005. **129**(2): p. 415-21.
9. Win, A.K., et al., *Risks of primary extracolonic cancers following colorectal cancer in lynch syndrome*. *J Natl Cancer Inst*, 2012. **104**(18): p. 1363-72.
10. Hampel, H., et al., *Screening for Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) among endometrial cancer patients*. *Cancer Res*, 2006. **66**(15): p. 7810-7.
11. Bioteknologinemnda. *Gentesting*. 2010 22.09.2010 [cited 2013 30.03].
12. Omsorgsdepartementet, H.o. *Bioteknologiloven kap 5*. [cited 2003; Available from: <http://www.lovddata.no/all/tl-20031205-100-006.html>].

13. Fugelsnes, E. *Takler genetisk veiledning bra*. 2009 [cited 2012 14.06]; Available from: <http://www.forskning.no/artikler/2009/oktober/231044>.
14. Li, G.M., *Mechanisms and functions of DNA mismatch repair*. Cell Res, 2008. **18**(1): p. 85-98.
15. Sjursen, W. and L.A.S. Lavik, *Molekylærgenetiske analyser ved utredning av arvelig kolorektal cancer*. Bioingeniøren, 2009. **6/7**: p. 6-13.
16. Bedeir, A. and A.M. Krasinskas, *Molecular diagnostics of colorectal cancer*. Arch Pathol Lab Med, 2011. **135**(5): p. 578-87.
17. Mojtahed, A., et al., *A two-antibody mismatch repair protein immunohistochemistry screening approach for colorectal carcinomas, skin sebaceous tumors, and gynecologic tract carcinomas*. Mod Pathol, 2011. **24**(7): p. 1004-14.
18. Muller, A., et al., *Challenges and pitfalls in HNPCC screening by microsatellite analysis and immunohistochemistry*. J Mol Diagn, 2004. **6**(4): p. 308-15.
19. Wahlberg, S.S., et al., *Evaluation of microsatellite instability and immunohistochemistry for the prediction of germ-line MSH2 and MLH1 mutations in hereditary nonpolyposis colon cancer families*. Cancer Res, 2002. **62**(12): p. 3485-92.
20. Kawaguchi, M., et al., *Analysis of a correlation between the BRAF V600E mutation and abnormal DNA mismatch repair in patients with sporadic endometrial cancer*. Int J Oncol, 2009. **34**(6): p. 1541-7.
21. Perez-Carbonell, L., et al., *Methylation Analysis of MLH1 Improves the Selection of Patients for Genetic Testing in Lynch Syndrome*. J Mol Diagn, 2010. **12**(4): p. 498-504.
22. Sjursen, W., et al., *Current clinical criteria for Lynch syndrome are not sensitive enough to identify MSH6 mutation carriers*. J Med Genet, 2010. **47**(9): p. 579-85.
23. Klarskov, L., et al., *Challenges in the identification of MSH6-associated colorectal cancer: rectal location, less typical histology, and a subset with retained mismatch repair function*. Am J Surg Pathol, 2011. **35**(9): p. 1391-9.
24. Trano, G., et al., *Awareness of heredity in colorectal cancer patients is insufficient among clinicians: a Norwegian population-based study*. Colorectal Dis, 2009. **11**(5): p. 456-61.

25. Jarvinen, H.J., et al., *Controlled 15-year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer*. *Gastroenterology*, 2000. **118**(5): p. 829-34.
26. Soreide, K., et al., *Lymph node harvest in colon cancer: influence of microsatellite instability and proximal tumor location*. *World J Surg*, 2009. **33**(12): p. 2695-703.
27. Nygren, A.O.H., *Methylation-Specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences*. *Nucleic Acids Research*, 2005. **33**(14): p. e128-e128.