



### HNPCC-PRÄDIAGNOSTIK

Das zunehmende Verständnis molekularer Grundlagen der Tumorbio­logie und die technischen Fortschritte in den molekularbiologischen Untersuchungsmethoden eröffnen die Möglichkeit, direkt an Gewebepräparaten tumorassoziierte Veränderungen auf molekularer Ebene zu diagnostizieren. Solche molekularpathologischen Befunde gewinnen immer größere Bedeutung für die Diagnostik, Therapieplanung und Prognoseeinschätzung bei verschiedenen Tumorerkrankungen. Zu den Tests der molekularen Pathologie zählt die **HNPCC-Prädiagnostik**.

#### HINTERGRUND

**HNPCC (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer)**, auch Lynch-Syndrom genannt, betrifft etwa 3 % aller kolorektalen Karzinome (colorectal cancer; CRC) und ist damit die häufigste Form von erblichen CRC mit einer ca. 80%igen Penetranz. Somit ist die HNPCC-Prädiagnostik von herausragender Bedeutung für die Erkrankten und auch deren eventuell betroffenen Familienmitglieder!

#### KARZINOGENESE

Wie auch bei sporadischen CRC entsteht bei HNPCC der Tumor über eine Adenom-Karzinom-Sequenz, wobei im Vergleich zu den sporadischen CRC die Adenome früher und häufiger vorkommen und diese eine deutlich aggressivere und schnellere Tumorprogression aufweisen.

Molekularpathologisch beruht HNPCC auf einer inaktivierenden Keimbahnmutation in einem DNA-Mismatch-Repair- (MMR-)Gen, die autosomal-dominant vererbt wird. Die Produkte der MMR-Gene (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6 u. a.) erhalten die Integrität des Genoms, indem sie während der DNA-Replikation entstandene Basenfehlpaarungen in der DNA reparieren. Ist das MMR-System defekt so akkumulieren genomweit Mutationen durch nicht reparierte Basenfehlpaarungen. In Protoonkogenen oder Tumorsuppressorgenen können diese Mutationen die Adenom-Karzinom-Sequenz und damit die Tumorprogression vorantreiben. Ein Merkmal von Tumoren des mit defektem MMR-System sind Längenschiebungen in repetitiven DNA-Motiven, den sogenannten Mikrosatelliten. Die Tumore von klinisch (über die Amsterdam-Kriterien) diagnostizierten HNPCC-Patienten zeigen in ca. 60 % der Fälle eine hochgradige Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H). In Tumoren von HNPCC-Patienten mit einer MMR--Keimbahnmutation (Lynch-Syndrom), liegt die MSI-H-Häufigkeit bei über 90%.

#### KLINIK

Charakteristisch für HNPCC ist das frühe Auftreten von überwiegend rechtsseitig lokalisierten CRC, das Auftreten von syn- und metachronen kolorektalen Karzinomen sowie von Karzinomen anderer Organlokalisationen (s. u.).

Einen ersten starken Hinweis auf HNPCC gibt eine positive Familienanamnese. Die **klinische Diagnose** ist durch die **Amsterdam II-Kriterien** definiert:

##### Box 1

##### Amsterdam II-Kriterien (Vasen et al., 1999)

(alle Kriterien müssen erfüllt sein)

- mind. drei Familienangehörige mit HNPCC-assoziiertem CA (Kolon/Rektum, Endometrium, Dünndarm, Nierenbecken/Ureter)
- einer davon Verwandter ersten Grades der beiden anderen
- Erkrankungen in mindestens zwei aufeinanderfolgenden Generationen
- mind. ein Pat. mit der Diagnose eines CA vor dem 50. Lebensjahr
- Ausschluss einer familiären adenomatösen Polyposis (FAP)

Da nicht alle Familien mit nachgewiesener Keimbahnmutation, vor allem Kleinfamilien, die strengen Amsterdam-Kriterien erfüllen, wurden die **Bethesda-Kriterien** definiert, die jeweils **Indikatoren für eine HNPCC-Präanalytik** sind:

##### Box 2

##### Bethesda-Kriterien (überarbeitet; Umar et al., 2004a)

(mindestens ein Kriterium muss erfüllt sein)

- Amsterdam-Kriterien positiv
- Patient mit
  - kolorektalem Karzinom vor dem 50. Lebensjahr.
  - synchronen oder metachronen kolorektalen Karzinomen oder anderen HNPCC-assoziierten Tumoren\*, unabhängig vom Alter.
  - kolorektalem Karzinom mit MSI-H Histologie\*\* vor dem 60. Lebensjahr.
  - kolorektalem Karzinom (unabhängig vom Alter), der einen Verwandten 1. Grades mit einem kolorektalen Karzinom oder einem HNPCC-assoziierten Tumor vor dem 50. Lebensjahr hat.
  - kolorektalem Karzinom (unabhängig vom Alter), der mindestens zwei Verwandte 1. oder 2. Grades hat, bei denen ein kolorektales Karzinom oder ein HNPCC-assoziiertes Tumor (unabhängig vom Alter) diagnostiziert wurde.

\* HNPCC-assoziierte Tumore: Tumore in Kolorektum, Endometrium, Magen, Ovarien, Pankreas, Ureter oder Nierenbecken, Gallengang, Dünndarm und Gehirn (meist Glioblastome) sowie Talgdrüsenadenome und Keratoakanthome.

\*\* Vorliegen von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten, Crohn-ähnlicher lymphozytärer Reaktion, muzinöser/Siegelring-Differenzierung, oder medullärem Wachstumsmuster.

#### MOLEKULARPATHOLOGISCHE DIAGNOSTIK

Erfüllt ein CRC-Patient mindestens ein Bethesda-Kriterium ist die molekularpathologische HNPCC-Prädiagnostik (Abb. 1) indiziert.

Die molekularpathologische HNPCC-Prädiagnostik beginnt mit der **Mikrosatellitenanalyse** sowie der immunhistochemischen Untersuchung der **MMR-Expression** von MLH1, PMS2, MSH6 und MSH2.

Bei der **Mikrosatellitenanalyse** wird das Tumor- und Normalgewebe mit mindestens fünf Mikrosatellitenmarkern untersucht. Für einen MSI-H-Befund müssen mindestens zwei von fünf Markern eine Instabilität aufweisen.

Die **MMR-Immunhistochemie** umfasst die MMR-Gene MLH1, PMS2, MSH6 und MSH2. Ein Expressionsverlust (< 10 % positiv gefärbte Tumorzellkerne) eines DNA-Reparaturgens im Tumor kann auf das Gen hinweisen, in dem ein HNPCC-assoziiertes Gendefekt bevorzugt vorliegen könnte.

Häufig zeigt sich das Bild eines MSI-H-Tumors mit MLH1-Expressionsverlust, da auch ca. 15 % der **sporadischen CRC** eine hochgradige Mikrosatelliteninstabilität zeigen, die auf dem Ausfall von MLH1 beruht.

Die weitere HNPCC-Prädiagnostik dient daher der Identifizierung der HNPCC-Kandidaten unter den häufigeren, sporadischen MSI-H CRC mit MLH1-Verlust!

#### BRAF-V600-Mutationsanalyse

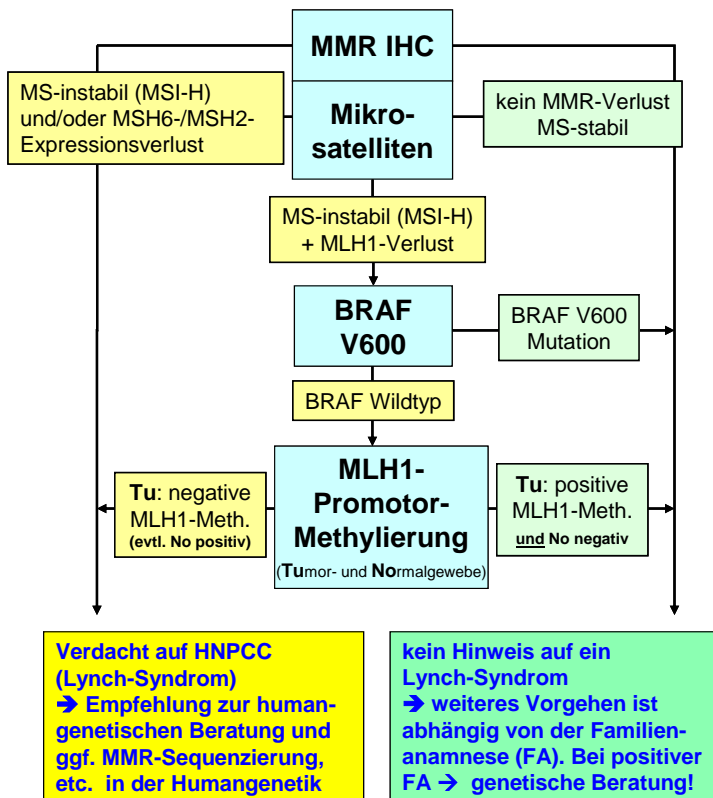
Nach derzeitigem Kenntnisstand kommen BRAFV600-Mutationen bei HNPCC-Patienten mit MLH1-Keimbahnmutationen praktisch nicht vor, sondern nur bei ca. 40 % der sporadischen kolorektalen MSI-H Tumore mit MLH1-Ausfall<sup>1,2,3</sup>. Somit schließt eine BRAF-V600-Mutation HNPCC mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit aus. In seltenen Einzelfällen wurde dennoch von BRAF-Mutationen bei HNPCC-Patienten berichtet<sup>4</sup>.

#### Methylierungsanalyse des MLH1-Promotors (quantitativ)

Eine Promotormethylierung blockiert die Expression des entsprechenden Gens bei intakter Sequenz. Während bei sporadischen MSI-H CRC die Mikrosatelliteninstabilität durch eine hochgradige Methylierung des MLH1-Promotors verursacht wird, zeigen kolorektale Tumore von HNPCC-Patienten mit Lynch-Syndrom keine oder selten eine nur schwache (< 17 %) MLH1-Promotormethylierung, da bei diesen Patienten MLH1-Keimbahnmutationen für den MLH1-Ausfall verantwortlich sind<sup>3</sup>. In seltenen Fällen kann wurde bei HNPCC-Patienten eine Keimbahnmethylierung des MLH1-Promotors (Epimutation) festgestellt<sup>4,5</sup>. Daher testen wir bei einer Methylierungsanalyse auch Normalgewebe auf eine MLH1-Methylierung, um eventuelle Hinweise auf eine MLH1-Epimutation an die Humangenetik weiterleiten zu können.



HNPCC-PRÄDIAGNOSTIK



INDIKATION FÜR DIE HNPCC-PRÄDIAGNOSTIK

Bethesda-Kriterien-positive Patienten (s. Box 1); Verdacht auf HNPCC.

NACHWEISMETHODEN

**Mikrosatellitenanalyse:** Multiplex-PCR-Amplifizierung und vergleichende Fragmentanalyse von 5 Mikrosatellitenmarkern aus Tumor- und Normalgewebe.

**MMR-Genexpression:** Immunhistochemischer Nachweis der MMR-Proteine MLH1, PMS2, MSH6 und MSH2 in den Tumorzellkernen.

**BRAF-V600-Mutationsanalyse:** PCR-Amplifikation mit HRM (high resolution melting).

**quantitative Analyse der MLH1-Promotormethylierung:** realtimePCR-basierte MethyQESD-Methode<sup>3</sup>.

UNTERSUCHUNGSMATERIAL

Frisches oder Formalin-fixiertes **Tumorgewebe** aus PE oder OP-Präparat sowie entsprechendes **Normalgewebe** oder **5 ml EDTA-Blut** desselben Patienten.

ANSPRECHPARTNER

Dr. Marcus Bettstetter

ANSPRECHPARTNER HUMANGENETIK

z. B. [MGZ - Medizinisch Genetisches Zentrum München](#)

LITERATUR

- 1) Domingo *et al.* BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. *J Med Genet.* 2004. 41, 664-8.
- 2) McGivern *et al.* Promoter hypermethylation frequency and BRAF mutations distinguish hereditary non-polyposis colon cancer from sporadic MSI-H colon cancer. *Fam Cancer.* 2004. 3, 101-7.
- 3) Bettstetter *et al.* MethyQESD, a robust and fast method for quantitative methylation analyses in HNPCC diagnostics using formalin-fixed and paraffin-embedded tissue samples. *Lab Invest.* 2008 Dec;88(12):1367-75.
- 4) Crépin *et al.* Evidence of constitutional MLH1 epimutation associated to transgenerational inheritance of cancer susceptibility. *Hum Mutat.* 2012 Jan;33(1):180-8.
- 5) Morak *et al.* Further evidence for heritability of an epimutation in one of 12 cases with MLH1 promoter methylation in blood cells clinically displaying HNPCC. *Eur J Hum Genet.* 2008 Jul;16(7):804-11.

Übersichtsliteratur

Pineda *et al.* Detection of genetic alterations in hereditary colorectal cancer screening. *Mutat Res.* 2009 Nov 27.

Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology.* 2007 Jan;50(1):113-30.

LINKS

[hnpcc.de/](#), [darmkrebsvorsorge.net](#), [Krebsinformationsdienst](#), [Darmkrebs allgemein](#), [Wikipedia](#), [MGZ - Medizinisch Genetisches Zentrum München](#)

Abb. 1: Flussdiagramm Molekularpathologische HNPCC-Prädiagnostik

Bei CRC Patienten, die keine Amsterdam-Kriterien erfüllen, bestätigt erst der Nachweis einer Keimbahnmutation in einem MMR-Gen die Verdachtsdiagnose HNPCC. Diese Untersuchung erfolgt an Blut-DNA und kann nur nach einer humangenetischen Beratung und einer schriftlichen Einverständniserklärung des Patienten an einem Humangenetischen Institut durchgeführt werden.

Wird bei einer Mutationssuche eine pathogene Mutation detektiert, kann eine prädiktive Mutationstestung bei den direkten Verwandten des Patienten durchgeführt werden. Die Prognose von Mutationsträgern kann durch engmaschige Untersuchungen und Präventionen stark verbessert werden, und im Gegenzug können Familienmitglieder mit negativer Mutationstestung von den Präventionsmaßnahmen ausgeschlossen werden.