

A mikroszatellita rendszer vizsgálata és klinikai jelentősége

Szöllősi Zoltán

A mikroszatellita-régiókról általában

A mikroszatellita-régiók 1–6 bázispárnyi ismétlődő szekvenciák, melyek a teljes humán genomban megtalálhatók, gyakorta a kódoló szekvenciák közelében, de előfordulhatnak intronikus szekvenciákban is. A mikroszatellita-régiók specificitását általában azok központi elemeiben ismétlődő nukleotidok száma határozza meg. A mikroszatelliták ismétlődő szekvenciáinak száma csökkenhet (deléció), illetve emelkedhet (inszerció) is, mely jelenséget mikroszatellita-instabilitásnak (MSI) nevezünk. A mikroszatellita-instabilitás a genom instabilitásának indikátora, melyet alapvetően a DNS hibajavító mechanizmusok genomikus, vagy funkcionális károsodása okoz. A DNS-repair mechanizmusban érintett géneket mismatch repair (MMR) géneknek nevezik, közéjük tartoznak: MLH1, MSH2, MSH6 és PMS2. A Lynch szindróma az említett MMR gének örökletes, domináns, funkcióvesztő mutációja. Egyes esetekben mutáns lehet az MSH2 gén közelében elhelyezkedő EPCAM gén, mely genetikailag ép MMR gének mellett is az MSH2 gén működésének kiesését fogja előidézni.

Az MSI a sporadikus daganatok között leggyakrabban a vastagbélrákokban (CRC) fordul elő, itt 10–15%-ban mutatható ki, de egyéb szolid tumorokban is, mint például endometrium-, valamint a felső tápcsatornai rákokban is jelentőséggel bír. Az MSI-tumorokon belül a mikroszatellita-régiók érintettsége szempontjából két csoport különül el: *MSI-high* (MSI-H, későbbiekben MSI), amikor a mikroszatellita-régiók 30%-a vagy annál nagyobb aránya instabil, és *MSI-low* (MSI-L), amikor ezen régiók kevesebb mint 30%-a instabil. A mikroszatellita-régiók stabilitása esetén a tumorokat mikroszatellita-stabilnak (*MSS*) tekintjük. A deficiens MMR (dMMR)/MSI különböző mechanizmusok eredménye lehet. Sporadikus CRC esetében a dMMR/MSI általában CpG hypermetiláció okozta epigenetikus elcsendesítés eredménye, ritkábban valamelyik MMR gén örökletes mutációjának, vagy a fentiekben már említett, MSH2 gén közelében elhelyezkedő, EPCAM gén deléciójának a következménye. Diagnosztikus szempontból szintén ki kell emelni azt, hogy a BRAF gén V600 mutáció ritkán figyelhető meg csírasejtes mutáció okozta dMMR esetében, ugyanakkor MMR gén metilációja kapcsán az esetek 75%-ban jelen van. Ennek oka nem pontosan ismert. A BRAF mutáció vizsgálata tehát alkalmas lehet MSI tumorok esetén a sporadikus vagy örökletes eredet meghatározására.

Jelenleg az MSI státusz meghatározása a CRC-s betegek rutin molekuláris patológiai vizsgálatának részét képezi, mint prognosztikus és prediktív jellegű biomarker. Az MSI daganatok fluorouracil monoterápiára kevésbé reagálnak, illetve bebizonyosodott, hogy nem csak CRC esetén, hanem más lokalizációk tumoros folyamataiban is, az MSI tumorok jól reagálnak immun-ellenőrzőpont gátlókkal történő kezelésre.

A mikroszatellita-instabilitás vizsgálómódszerei

Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai módszerek nem közvetlenül a mikroszatellita-régiók instabilitását vizsgálják, hanem az ahhoz vezető genetikai működészavar eredményeképpen megjelenő aberráns vagy hiányzó MLH1, MSH2, MSH6 és PMS2 fehérje expressziót mutatják ki. Egy vagy több fehérje expressziójának hiánya dMMR státuszt eredményez (d=deficiens). Az MLH1 gén metilációja vagy mutációja, illetve az MSH2 gén mutációja következtében mindig párban esnek ki az MMR fehérjék (MLH1-PMS2, MSH2-MSH6). Extrém ritkán előfordulhat izolált MSH6 vagy PMS2 fehérje kiesés, amikor az MSH6 vagy PMS2 génben van a mutáció. Az MLH1-PMS2 kiesésen kívül az összes többi eset egyértelműen Lynch szindrómára utal. Fontos megjegyezni, hogy az MMR fehérjék immunhisztokémiai vizsgálata nagyon érzékeny a preanalitikára, rosszul fixált tumorokban korlátozottan értékelhető.

PCR alapú vizsgálatok

Hagyományosan ez a módszer tekinthető a mikroszatellita rendszer közvetlen, DNS alapú vizsgálatának, melynek során fluoreszcens festékekkel jelölt primereket alkalmaznak öt mikroszatellita régió leírására a tumorból és a szomszédos ép szövetből származó területből izolált DNS párhuzamosan történő vizsgálatával. A gének kiválasztása a Bethesda konszenzus során történt, maguk a gének a következők: BAT-25, BAT-26, D2S123, D5S346 és D17S250. A PCR termékek fragment analízisét kapilláris elektroforézis segítségével végzik, összehasonlítják a tumorból és normál szövetből izolált DNS görbéit és ezek eltéréseitől függően állapítják meg a fentiekben már említett *MSI-high*, *MSI-low*, illetve *MSS* kategóriákat. Újabb diagnosztikai módszer az *Idylla MSI Assay* a fentiktől eltérő, összesen hét (ACVR2A, BTBD7, DIDO1, MRE11, RYR3, SEC31A, SULF2) mikroszatellita régiót használ, és ezek automata analízisét követően adja meg a tumor *MSI-H* vagy *MSS* státuszát.

NGS alapú vizsgálatok

Az új generációs szekvenálás (NGS) szintén alkalmas egyidejűleg számtalan mikroszatellita régió DNS alapú vizsgálatára. Különböző, elsősorban kutatási célokra használt, több száz génes panelekben különböző mikroszatellita régiók szerepelnek, ahol a vizsgált génszakasz hosszából automatizált algoritmusok segítségével a mikroszatellita instabilitás meghatározható. Újabban leírtak kisebb, 20-25 génes paneleket is, melyekkel a mikroszatellita instabilitás pontosan meghatározható.

Lynch szindróma gyanúja esetén genetikai konzultáció javasolt és mind a Sanger szekvenálás, mind az NGS alapú technikák tisztázhatják a fennálló mutáció jellegét és helyét.

Gyakorlati megfontolások

Az alábbi táblázatban, fentről lefelé haladva láthatjuk azt az algoritmust, ami Lynch szindróma gyanúja esetén javasolt.

A táblázat első három sora mutatja a rutin molekuláris vizsgálat során alkalmazott módszereket. A mindennapi gyakorlatban a metiláció vizsgálata kevésbé elterjedt. A mismatch repair fehérjék expressziójának kiesésekor, ha BRAF mutáció nem azonosítható, a családi anamnézis és a beteg kora függvényében általában csírasejtes mutáció analízis történik.

Vizsgálat	További lépést indokló eltérés
MMR immunhisztokémia	dMMR vagy egyértelműen nem eldönthető a fehérje expresszió kiesése
PCR alapú MSI teszt	MSI-H
BRAF V600E mutáció meghatározás	negatív
MLH1 promoter hypermetiláció	negatív
Genetikai vizsgálat, szekvencia analízis Lynch szindróma kizárására	