

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (Lynchův syndrom):
molekulárně genetické vyšetření hlavních predispozičních genů *MSH2*, *MLH1*,
MSH6, *PMS2* a *EPCAM*

Bakalářská práce

2020

Klára Ševčíková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Klára Ševčíková**
Osobní číslo: **C17225**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (Lynchův syndrom):
molekulárně genetické vyšetření hlavních predispozičních genů *MSH2*,
MLH1, *MSH6*, *PMS2* a *EPCAM***
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

- 1) Vypracujte literární rešerši o vzácném hereditárním nepolypózním kolorektálním karcinomu (HNPCC/Lynchův syndrom).
- 2) Charakterizujte typ dědičnosti, vysvětlete etiopatogenezi a popište fenotypické projevy onemocnění.
- 3) Rozvedte metodické postupy molekulárně genetické diagnostiky.
- 4) Zohledněte současné a výzkumné možnosti v laboratorní diagnostice, případně strategii cílené léčby onemocnění.
- 5) Pro vytvoření kompilačního textu využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI Pubmed*, *ScienceDirect*, *Web of Science*, *Scopus*, apod. Jako zdroje využijte zejména odborné články publikované v recenzovaných zahraničních časopisech.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Markéta Gančarčíková**
Katedra porodní asistence a zdravotně sociální práce
Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Lucie Stříbrná, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2019**
Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (Lynchův syndrom): molekulárně genetické vyšetření hlavních predispozičních genů *MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS2* a *EPCAM*“ vypracovala samostatně s použitím odborné literatury uvedené na seznamu této práce.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 19.7.2020

.....
Klára Ševčíková

Poděkování

Děkuji vedoucí bakalářské práce paní Mgr. Markétě Gančarčíkové za cenné rady, připomínky, trpělivost a vedení práce. Dále bych chtěla poděkovat paní Mgr. Lucii Stříbrné Ph.D. za ochotu a vstřícnost, které mi během psaní práce poskytla.

ANOTACE

Tato práce mapuje Lynchův syndrom se zaměřením na laboratorní diagnostiku genů *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* a *EPCAM*, které toto onemocnění způsobují. V práci jsou také uvedena kritéria pro hodnocení Lynchova syndromu, možné projevy tohoto onemocnění, způsoby léčby a prevence.

KLÍČOVÁ SLOVA

HNPCC, Lynchův syndrom, genetika, mutace, diagnostika, projevy, dědičnost

TITLE

Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome): Molecular Genetic Testing of Major Predisposing Genes *MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS2* and *EPCAM*

ANNOTATION

This work maps Lynch syndrome with a focus on laboratory diagnosis of *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* and *EPCAM* genes that cause this disease. Criteria for the evaluation of Lynch syndrome, manifestations of this disease, methods of treatment and prevention are also stated.

KEYWORDS

HNPCC, Lynch syndrome, genetics, mutation, diagnostics, manifestations, heredity

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	9
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	10
TERMINOLOGIE.....	11
ÚVOD.....	12
1. HEREDITÁRNÍ NEPOLYPÓZNÍ KOLOREKTÁLNÍ KARCINOM.....	13
1.1. Historie Lynchova syndromu.....	14
1.2. Epidemiologie	15
1.3. Mutace a mikrosatelitová nestabilita.....	16
1.4. Predispoziční geny v etiopatogenezi Lynchova syndromu.....	20
1.4.1. <i>MLH1</i> gen	20
1.4.2. <i>MSH2</i> gen	21
1.4.3. <i>MSH6</i> gen	22
1.4.4. <i>PMS2</i> gen.....	23
1.4.5. <i>EPCAM</i> gen	23
1.5. Dědičnost.....	25
2. KRITÉRIA PRO URČENÍ LYNCHOVA SYNDROMU	28
2.1. Amsterodamská kritéria I a II	28
2.2. Kritéria Bethesdy	30
3. LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA LYNCHOVA SYNDROMU	32
3.1. Metoda MLPA	34
3.1.1. Využití metody MLPA	35
3.2. Sangerovo sekvenování.....	37
3.3. Metoda NGS.....	39
4. PROJEVY ONEMOCNĚNÍ.....	40
4.1. Kolorektální karcinom	40
4.2. Rakovina horních močových cest	40
4.3. Rakovina kůže.....	41
4.4. Karcinom žaludku	41
4.5. Karcinom varlat.....	41
4.6. Nádor endometria a ovariální karcinom.....	42
4.7. Karcinom prsu.....	42

5. LÉČBA.....	43
5.1. Využití 5-fluorouracilu.....	43
5.2. Kolonoskopie	43
5.3. Studie v pokroku léčby rakoviny konečníku.....	44
5.4. Strategie detekce rakoviny endometria a vaječníků.....	44
5.4.1. Profylaktická chirurgie	45
6. PREVENCE	46
6.1. Rizikové faktory	46
6.2. Důležitost rodinné anamnézy	47
6.3. Prognóza.....	47
ZÁVĚR	48
SEZNAM LITERATURY.....	50

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 Nádorové spektrum Lynchova syndromu.....	14
Obrázek 2 Histologický preparát kolorektálního karcinomu	15
Obrázek 3 Schéma znázorňuje MSI.....	18
Obrázek 4 Zobrazení MSI a MSS cesty	19
Obrázek 5 Ukázka chybné opravy párování bází spojená s nestabilitou mikrosatelitů.....	19
Obrázek 6 Označení polohy MLH1 genu na 3. chromozomu v poloze p22.2	21
Obrázek 7 Označení polohy MSH2 genu na 2. chromozomu v pozici p21-p16.3	22
Obrázek 8 Označení polohy MSH6 genu na 2. chromozomu v pozici p16.3.....	22
Obrázek 9 Označení polohy PMS2 genu na 7. chromozomu v pozici p22.1	23
Obrázek 10 Označení polohy EPCAM genu na 2. chromozomu v pozici p21	24
Obrázek 11 Procentuální zastoupení výskytu mutací u Lynchova syndromu.....	25
Obrázek 12 Genealogie Lynchova syndromu.....	26
Obrázek 13 Schéma prezentuje vývoj mechanismu pacientů s Lynchovým syndromem.....	27
Obrázek 13 Postup při testování mutací při Lynchově syndromu.....	33
Obrázek 14 Princip MLPA reakce.....	34
Obrázek 15 Výsledek analýzy MLPA při určení stavu metylace.....	35
Obrázek 16 Detekce delecí MSH2 pomocí metody MLPA.....	36
Obrázek 17 Další příklad elektroforeogramu s použitím probemixu sond P008	36
Obrázek 18 Analýza pomocí P003	37
Obrázek 19 Syntéza DNA po přidání dNTP do syntetizujícího řetězce.....	38
Tabulka 1 Kritéria Amsterdam I pro diagnostiku HNPCC/ LS.....	29
Tabulka 2 Kritéria Amsterdam II pro diagnostiku HNPCC/LS.....	29
Tabulka 3 Revidovaná kritéria pro Bethesda	30
Tabulka 4 Zastoupení genových mutací MMR u pacientů s rakovinou kůže	41

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ACACAC	střídající se báze adenin a cytosin
BMI	Body mass index
BRAF	gen kódující protein B-RAF
BRCA1	Breast Cancer
BRCA2	Breast Cancer
CAPP	Colorectal Adenoma/Carcinoma Prevention Program
CAPP2	Colorectal Adenoma/Carcinoma Prevention Program
CCFR	Colon Cancer Family Registry
CDH1	Cadherin-1, epiteliální kadherin
CRC	Colorectal Cancer
DNA	Deoxyribonucleic acid
dTTP	Deoxythymidine triphosphate
EPCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
EpEX	Extracellular domain of EPCAM
EpIDC	Intracellular domain of EPCAM
FAP	Familiární adenomatózní polypóza
HBOC	Hereditary Breast and Ovarian Cancer
HNPCC	Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer
KRAS/BRAF	Signální onkogeny
MLH1	MutL homolog 1
MMR	DNA mismatch repair
MSH2	MutS homolog 2
MSH2-MSH3	Complex MutS homolog 2-MutS homolog 3
MSH6	MutS homolog 6
MSI	Microsatellite instability
non-MSI	non-Microsatellite instability
NGS	Next Generation Sequencing
PMS2	MPS1 Homolog 2
TACSTD1	Tumor-Associated Calcium Signal Transducer 1
TYMS	Thymidylate Synthetase
V600E	Substitution – Missense, position 600, V → E

TERMINOLOGIE

5-fluoracil	cytostatikum
adnexektomie	chirurgické odstranění vaječníků a vejcovodu
aminokyselina	molekula s karboxylovou a aminovou skupinou
anamnéza	souhrn prodělaných nemocí pacienta
bilaterální	oboustranný
diagnostika	metody určující choroby pacienta
endometrium	slizniční vrstva dělohy
genová exprese	vyjádření genetické informace do struktury proteinu
gen	základní jednotka genetické informace
hereditární	dědičný
heterodimer	dimer, který obsahuje dvě různé složky
hysterektomie	odstranění dělohy
karcinom	zhoubné nádory
keratoakantom	jeden z typů kožních nádorů
laparoskopie	endoskopická minimálně invazivní operace kontrolovaná kamerou
léze	poškození, postižení, porucha orgánu či tkáně
matrice	předloha při biosyntéze nové molekuly
mikrosatelit	sekvence DNA složené z opakujících se jednotek
Muir-Torr syndrom	autozomálně dominantně dědičné onemocnění
mutace	náhodné změny v molekule DNA
neoplastický	nádorový původ
nepolypózní	nemusí být přítomny polypy
polyp	lokální prominence sliznice
profylaxe	preventivní opatření
protein	neboli bílkovina patřící mezi biopolymery složená z aminokyselin
replikace DNA	proces tvorby kopií DNA
symptom	projev onemocnění

ÚVOD

Ve své práci jsem shrnula problematiku Lynchova syndromu neboli hereditárního nepolypózního kolorektálního karcinomu (HNPCC), protože v současné době není mezi lidmi širší povědomí o tomto onemocnění. Jedná se o velmi závažné dědičné onemocnění, které bylo poprvé popsáno v 60. letech 20. století kvůli častěji se vyskytujícím případům kolorektálního karcinomu. Jako hlavní predispoziční geny byly identifikovány *MSH2*, *MSH6*, *MLH1*, *PMS2* a *EPCAM*. Pro precizní diagnostiku Lynchova syndromu byla zavedena a revidována kritéria Bethesda pro testování nestability mikrosatelitů nebo imunohistochemické vyšetření exprese proteinů *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* eventuálně *PMS2* ve tkáních nádoru a Amsterdamská kritéria II jako indikace k vyšetření genů *MLH1*, *MSH2* a *MSH6*.

Úvodní část se mé bakalářské práce se zabývá pochopením Lynchova syndromu po stránce dědičné a výčtem hlavních predispozičních genů s jejich charakteristikou. Při mutacích v těchto genech vzniká mikrosatelitová instabilita, a tedy špatná oprava chyb párování bází při replikaci DNA. HNPCC je děděn autozomálně dominantním způsobem, tedy potomek má 50% pravděpodobnost zdědění tohoto genu po rodičích, pokud se u nich vyskytuje patogenní varianta v predispozičních genech. Ve druhém oddílu jsou popsána kritéria Amsterodam II a Bethesda jako indikační kritéria pro zařazení pacientů k molekulárně genetickému testování.

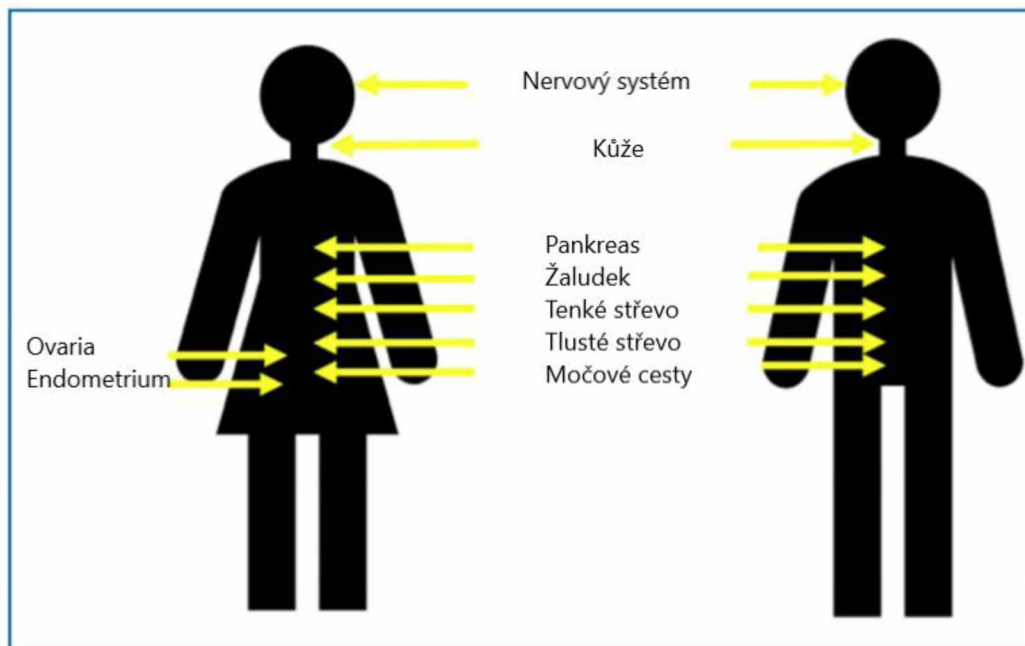
Ve třetím oddílu bakalářské práce se zabývám samotnou laboratorní diagnostikou Lynchova syndromu. Jako tři hlavní cesty, jak molekulárně geneticky verifikovat klinickou diagnózu Lynchova syndromu, jsou především využívány metody NGS, MLPA a Sangerovo sekvenování. V neposlední řadě rozebírám problematiku projevů, léčby a prevence Lynchova syndromu.

1. HEREDITÁRNÍ NEPOLYPÓZNÍ KOLOREKTÁLNÍ KARCINOM

Lynchův syndrom (také nazývaný hereditární nepolypózní kolorektální karcinom, OMIM 120435) patří mezi celoživotní riziko vzniku kolorektálního karcinomu, jak u mužů, tak i u žen a vzniká už v mladém věku. Jedná se o poruchu systému oprav nesprávných párů bází, a tím dochází k instabilitě mikrosatelitů (MSI) DNA. Jejich porucha vede k nestabilitě celého systému a způsobí vznik nádoru (Plevová, 2009).

Jedná se o autozomálně dominantní onemocnění, které se týká především vzniku nádoru tlustého střeva, ale vede také ke vzniku dalších druhů nádorů, například u žen ke karcinomu endometria nebo ovarií. Základem tohoto onemocnění je mutace některého z MMR genů (z ang. mismatch repair, tedy oprava párování bází), hlavními predispozičními geny jsou *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* a *EPCAM*, z nichž nejčastější mutací jsou právě v genech *MLH1* (32%) a *MSH2* (39%). K určení rizikových jedinců se používají Amsterodamské a Bethesda kritéria, která určují modely familiárních výskytů, klinický a histologický charakter (Mlková, 2016).

U pacientů se mohou vyvinout rakoviny i v mladém věku spojené s Lynchovým syndromem. Kolorektální karcinom je nejčastější nádor, ale zvyšuje se také riziko maligních onemocnění endometria, vaječnicků, žaludku, tlustého střeva, pankreatu, nervového systému nebo i kůže (viz Obr. 1) (Carethers, 2015).



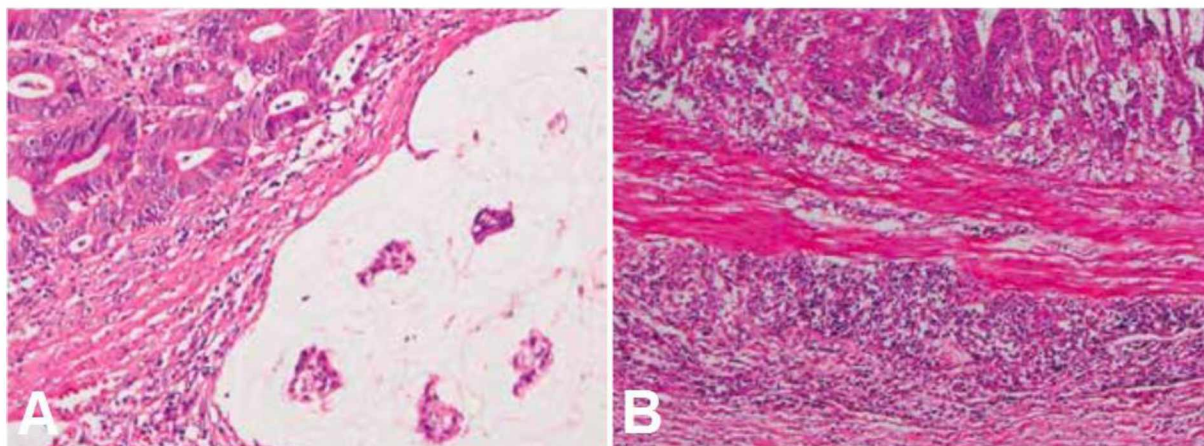
Obrázek 1 Nádorové spektrum Lynchova syndromu. Na obrázku jsou zvýrazněna nejohroženější místa při diagnóze Lynchova syndromu (Přeloženo a použito z: Coffin, 2019).

1.1. Historie Lynchova syndromu

Historii Lynchova syndromu (LS) je možné datovat do roku 1895, ve kterém se Warthin, uznávaný patolog z Univerzity v Michiganu, začal zajímat o rodinu s četným výskytem případů nádorového onemocnění (především tlustého střeva, žaludku a dělohy). Sestavil rodokmen rodiny s popisem patologických nálezů a společně s dalšími dvěma popsány rodinami své poznatky publikoval (Warthin, 1913). Lynchův syndrom byl definován až v 60. letech 20. století, přičemž mutace u pacientů s LS se nacházejí v genech *MSH2* (80 %) a *MLH1* (60 %), v genech *MSH6*, *PMS2* a *EPCAM* jsou mutace více vzácné (Moreira, 2012; Yurgelun 2017).

V roce 1966 bylo onemocnění nazváno Henry T. Lynchem a jeho kolegy jako hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (Hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC), aby se odlišil od zděděné adenomatózní polypózy – FAP. Adenomatózní polypy jsou totiž mnohem častější a podléhají maligní transformaci u pacientů s HNPCC než u zbytku obyvatel. Termín Lynchův syndrom se běžně používá od roku 1984 a představuje přibližně 3 % nově diagnostikovaných případů kolorektálního karcinomu (CRC), které vykazují charakteristické znaky syndromů predisponující k nádorovým onemocněním zahrnující

podstatně zvýšené riziko vzniku specifických nádorů, časný věk v době diagnózy a vysokou míru mnohočetných primárních karcinomů (Boland, 1984; Giardiello 2014).



Obrázek 2: Histologický preparát kolorektálního karcinomu při diagnostice Lynchova syndromu. (Převzato od Daum, 2014)

2a) V dolní části obrázku je patrný hlen disekující hlenové jezírko. V hleny plavou ostrůvky nádorových buněk. V horní části obrázku je zřetelně vidět “posypání“ nádorových žlázek lymfocyty.

2b) Vpravo od nádoru je souvislý lem lymfocytů, který částečně proniká i do přilehlé hladké svaloviny.

1.2. Epidemiologie

Lynchův syndrom patří k nejčastějším syndromům vzniku kolorektálního karcinomu. Průměrně se tato diagnóza vyskytuje ve 45. roku života (Plevová, 2019). Na světě existuje více než 1 milion případů. Pacienti s familiárním rizikem, ti, kteří mají 2 nebo více příbuzných prvního či druhého stupně (nebo obou) s CRC, tvoří přibližně 20 % všech pacientů s CRC, přičemž přibližně 5-10 % celkového počtu ročního přírůstku CRC je zděděno autozomálně dominantním způsobem. Ročně se tedy vyskytne několik tisíc nových případů (Lynch, 2003).

Lynchův syndrom byl nalezen přibližně u 1 ze 35 pacientů s CRC. Tyto odhady byly dříve omezeny na datové soubory pacientů s anamnézou karcinomu. Avšak po využití údajů z Colon Cancer Family Registry (CCFR), databáze s rodinným výskytem kolorektálního

karcinomu, se odhaduje prevalence Lynchova syndromu daleko vyšší a to tak, že touto nemocí trpí 1 člověk z 279 (Biller, 2019).

Pokud se potvrdí diagnóza Lynchova syndromu identifikací mutace zárodečné linie pro chybné opravy párování bází, doporučuje se testování pro členy rodiny, především příbuzné prvního stupně. Osoby s potvrzenou mutací mají 50% pravděpodobnost přenosu mutace na své potomky (Sinicrope, 2018).

Přenašeči heterozygotní zárodečné mutace v jednom z MMR genů mají zvýšené riziko mnoha nádorů v dospělém věku, nejčastěji CRC a karcinomu endometria, ale také ovarií, žaludku, dělohy, renální pánvičky, mozku, tenkého střeva, hepatobiliárního traktu, ale stejně tak i karcinomu prsu a prostaty. John A. Heath a kolektiv (2015) využili data z CCFR registru a porovnali výskyt nádorového onemocnění u dětských pacientů (diagnóza karcinomu před 18 rokem života) u 781 probandů s patogenní mutací v jednom z MMR genů (rodiny s LS) v porovnání s 5073 probandy bez prokázané mutace v MMR genech (rodiny s non-LS). Ve své studii neprokázali signifikantně zvýšené riziko vzniku nádorů v dětském věku u skupiny rodin s LS oproti kohortě rodin s non-LS, nejčastějšími typy nádorů u obou skupin byly hematologické malignity (34 % u LS a 3 % u non-LS) a nádory centrální nervové soustavy (29 % a 11 %) (Umar, 2004; Win, 2013; Ryan, 2014).

1.3. Mutace a mikrosatelitová nestabilita

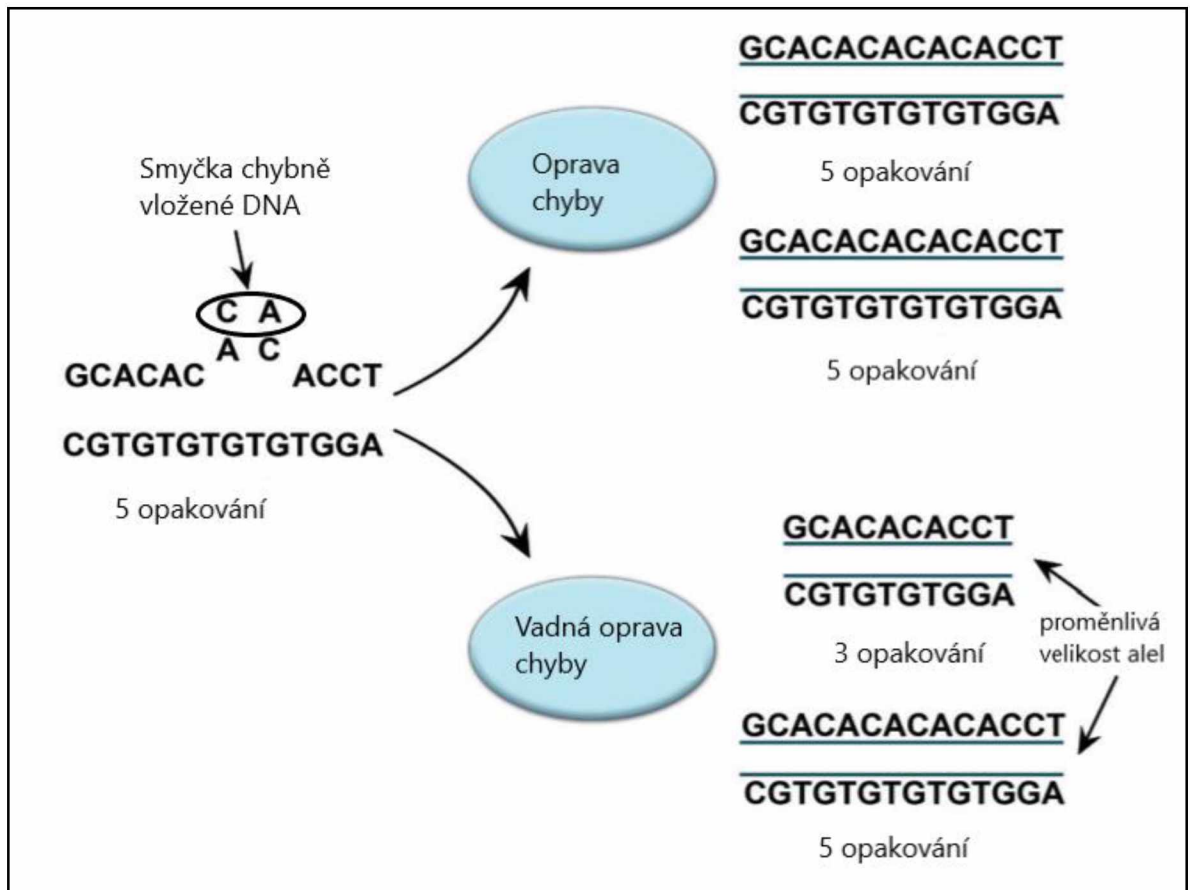
Souvislost mezi HNPCC a chybnou opravou párování bází vzniklo z pozorování rodin, které měly potvrzené toto onemocnění a vykazovaly stejné fenotypové projevy, vycházející z nestability mikrosatelitů během replikace DNA. Původní studie se zabývaly kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae*, které vedly k identifikaci skupiny genů zodpovídající za správné opravy párování bází při replikaci DNA, což umožnilo formulovat hypotézu, že lidské homology těchto genů jsou zahrnuty v patogenezi syndromu HNPCC (Strand, 1993). Následně byly identifikovány první geny, *MLH1* (umístěn na chromozomovém lokusu 3p21 - 23) a *MSH2* (2p21), ve kterých byly nalezeny patogenní mutace a byla prokázána segregace těchto mutací s onemocněním, a to jak u pacientů s HNPCC, tak i jejich příbuzných (Fishel, 1993; Bronner, 1994; Mitchell, 2002).

Určení Lynchova syndromu může zahrnovat vyhodnocení nádorové tkáně testováním deficitu opravných proteinů pomocí imunohistochemické analýzy nebo se může testovat mikrosatelitová instabilita pomocí PCR techniky. Proteiny *MLH1* a *PMS2* fungují jako

stabilní heterodimery. Ztráta exprese *MLH1* a *PMS2* dohromady indikuje alteraci v *MLH1* somatickou metylací promotoru *MLH1* (sporadický případ CRC) nebo germinální mutací *MLH1* (CRC asociovaný s LS). Ztráta exprese *MSH2* nebo *MSH6* (případně obou) nebo *PMS2* je typicky způsobeno mutací v zárodečné linii (Sinicrope, 2018).

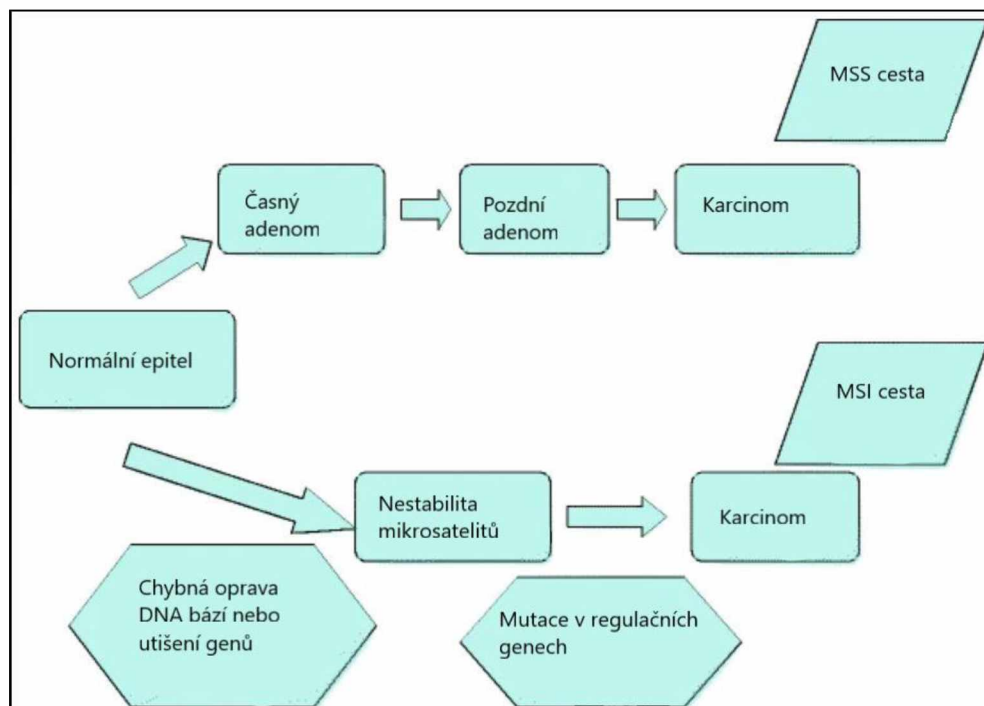
Mikrosatelity jsou krátké opakující se báze (obvykle 1-6) složené z několika nukleotidů (adeninu, guaninu, cytosinu a thyminu) rozptýlené po DNA v celém genomu a představují zhruba 3 % lidského genomu. Vzhledem k jejich opakující se struktuře jsou vysoce náchylné k tvorbě mutací (Nojadeh, 2018). Objev MSI v nádorových buňkách v roce 1993 byl revolucí v diagnostice pacientů s LS (Lynch, 2015).

Lineární sekvence DNA je symbolizována prvním písmenem nukleotidové báze např. ACACAC. Během syntézy DNA díky mikrosatelitům mohou nastat mutace, které vedou k prodloužení nebo zkrácení mikrosatelitu. Tato nestálost v délce opakování se nazývá jako instabilita mikrosatelitů (MMI). Chyby DNA jsou obvykle opraveny proteiny MMR, ale u Lynchova syndromu je tento proces narušen (Cox, 2018).



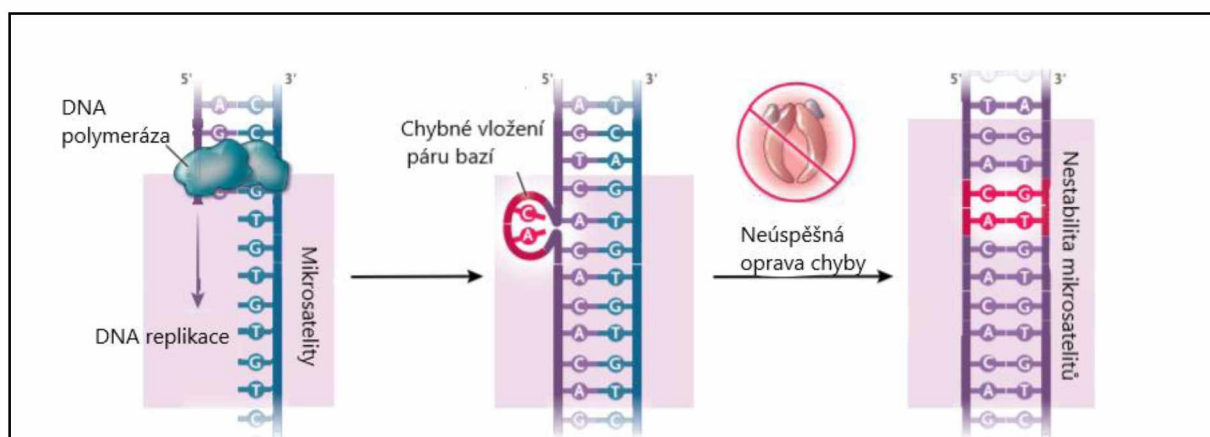
Obrázek 3 Schéma znázorňuje MSI. Pokud se neshoduje párování bází, chyba je detekována a je správně opravena, původní počet nukleotidů je zachován. Ve spodní části není chyba detekována a výsledkem jsou různé délky nukleotidového opakování mikrosatelitů. V tomto případě má jedna buňka 3 a druhá 5. Variabilita v opakování je označena jako nestabilita. (Použito a přeloženo z Cox, Lynch Syndrome: Genomics Update and Imaging Review 2018)

Přítomnost MSI můžeme nalézt ve střevě, žaludku, endometriu a v dalších typech nádorů a lze je využít ke klasifikaci a detekci nádorů (Setaffy, 2015; Yamamoto, 2015). Protože jsou nestabilní mikrosatelity vysoce imunogenní, aktivují imunitní systém a mohou mít pozitivní účinek na nestabilní nádory. Oproti tomu MSS (Microsatellite Stable) stabilní mikrosatelity, nereagují na imunoterapii a obecně se jedná o tzv. non-MSI. Tato zjištění vedla k návrhům na vývoj nádorových vakcín a přeměnu MSS nádorů na MSI k získání větší imunogenetické odpovědi (Nojadeh, 2018).



Obrázek 4: Zobrazení MSI a MSS cesty (Přeloženo a upraveno ze Schnitzler, 2007)

Zvýšený počet mikrosatelitů představuje nedostatečnou schopnost opravy, naproti tomu nízký výskyt mikrosatelitů značí sníženou nebo žádnou nestabilitu mikrosatelitů, tedy úspěšnou opravu neshod DNA. U kolorektálního karcinomu můžeme nalézt vysoký výskyt satelitů, tedy nedostatečnou opravu chybného párování bází v DNA. Tento zvýšený výskyt nalezneme jak u pacientů se ztrátou *MSH2* nebo *MSH6* (popřípadě *PMS2*), tak u pacientů se ztrátou *MLH1* proteinu. (Sinicrope, 2018).



Obrázek 5: Ukázka chybné opravy párování bází spojená s nestabilitou mikrosatelitů.

Chybné opravy párování bázi v DNA vedou k nádorům s mikrosatelitovou instabilitou, které jsou charakterizované extenzivní insercí a delecí v kódující oblasti vedoucí k frameshiftovým mutacím (Převzato ze Sinicrope, 2018).

Existuje také MMR systém, kam se řadí geny, které jsou zodpovědné za opravu chybně spárovaných bázi v DNA v dceřiných buňkách. Aby mohla být zahájena oprava, musí se nová DNA syntetizovat z předlohy (rodičovská DNA). Během kumulace mutací těchto genů mohou vznikat adenomatózní polypy, které se vyvíjí v endoteliálních buňkách tenkého střeva. Systém MMR se také podílí na regulaci buněčného kontrolního G2/M bodu mitózy a ztráta tohoto bodu umožňuje právě neinhibovanou mitotickou aktivitu, tudíž i střádání mutací (Boland, 2018).

1.4. Predispoziční geny v etiopatogenezi Lynchova syndromu

LS je definován jako predispozice k nádorovému onemocnění, primárně ke karcinomu kolorekta a endometria, které jsou způsobeny poškozením MMR aktivity. Tato nádorová predispozice je způsobena autozomálně dominantní zárodečnou heterozygotní mutací v jednom z klíčových MMR genů (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* a *EPCAM*).

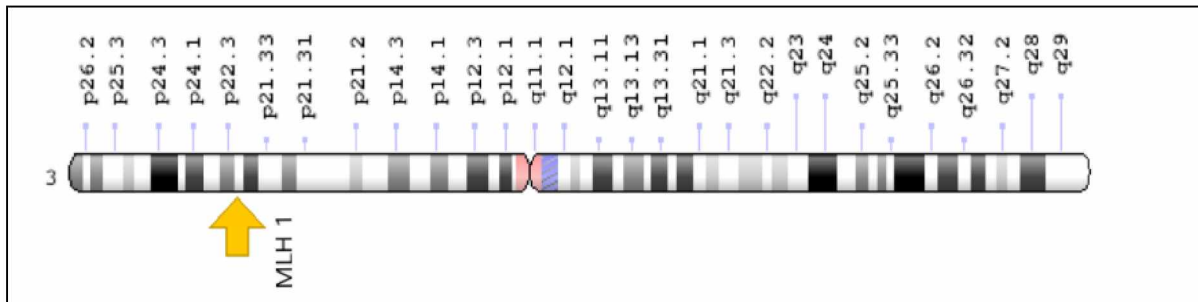
V následujících kapitolách uvádím geny, které nacházíme při onemocnění Lynchova syndromu.

1.4.1. *MLH1* gen

Jedná se o jeden z klíčových genů, který je odpovědný za rozpoznání a opravu chybně spárovaných bázi. Společně s genem *PMS2* vytváří komplex (heterodimer MutL α), který usměrňuje aktivitu proteinů opravující chyby, ke kterým dochází při replikaci DNA v přípravě buněčného dělení. Opravy se provádějí odstraněním části DNA, která obsahuje chybu a nahrazením opravenou sekvencí (Kufe et al., 2003). Gen *MLH1* je jedním ze skupiny genů, tzv. MMR geny (geny opravného párování bázi).

MutL α obsahuje endonukleázu a je aktivována v přítomnosti MutS α , proliferujícího jaderného antigenu a replikačního faktoru a zajišťuje oboustrannou opravu při replikaci DNA (Andersen, 2012).

Gen *MLH1* je umístěn na třetím chromozomu krátkého ramena v pozici 22.2 (Peltomäki, 2004).



Obrázek 6: Označení polohy *MLH1* genu na 3. chromozomu v poloze p22.2 (Převzato z U. S. National Library of Medicine, 2020)

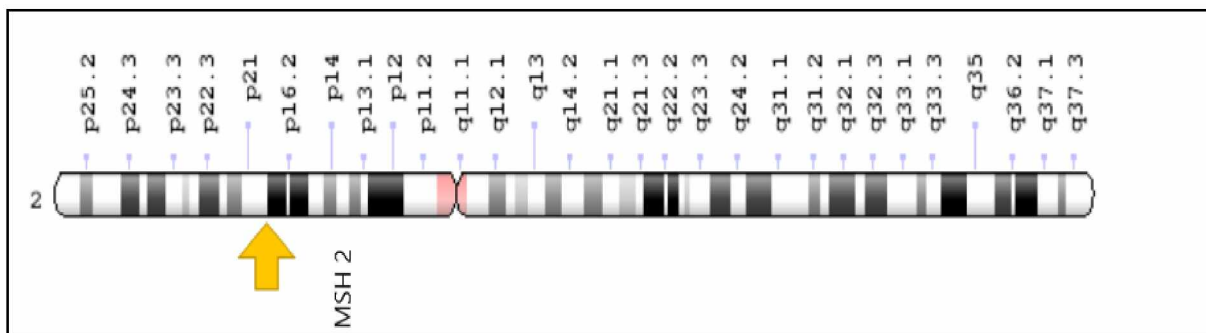
Nedostatek exprese tohoto genu může být způsobeno i jeho umlčením díky hypermethylaci. Ověření tohoto jevu je možné stanovit i pomocí mutace V600E v genu *BRAF*, která je přítomná v 60 % případů nádorového onemocnění (Hajirawala, 2019).

Kromě germinálních mutací v genu *MLH1* se mohou vyskytovat i konstituční epimutace, které způsobí transkripční inaktivaci genu. Konstituční epimutace jsou primární a sekundární. Primární epimutace jsou charakterizovány hustou methylací ve všech somatických tkáních a může být reversibilní mezi generacemi. Neuplatňuje se mendelovský vzor dědičnosti, a tedy u těchto epimutací je obtížné předvídat fenotyp v následujících generacích. Sekundární epimutace jsou způsobeny prostřednictvím cis-změny DNA sekvence, jsou děděny dle mendelovského vzoru a fenotyp nemoci je více předvídatelný (Chintalacheruvu, 2017). Tento typ mutace je vyznačován somatickým hypermozaicismem mezi tkáněmi, ale také mezi rodinami, což může vést k variabilnímu fenotypu (Ward, 2013).

1.4.2. *MSH2* gen

Gen *MSH2* také řadíme do skupiny genů, které jsou odpovědné za opravu nesprávného párování bází DNA. Spolu s *MSH6* tvoří heterodimer, který je zodpovědný za opravu špatně napárovaných bází ve dvoušroubovnici DNA. Zatímco malé inserce jsou rozpoznány pomocí heterodimeru *MSH2-MSH3* (Rath, 2019).

Gen *MSH2* je umístěn na chromozomu 2 krátkého ramene v pozici p21-p16.3 (Peltomäki, 2004).

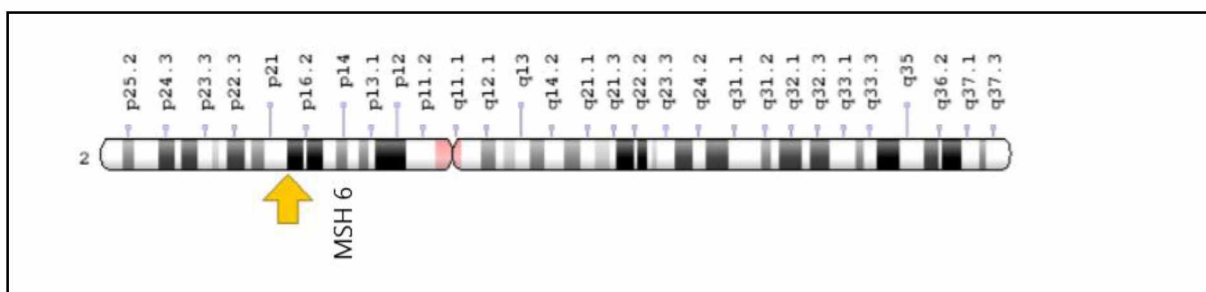


Obrázek 7: Označení polohy *MSH2* genu na 2. chromozomu v pozici p21-p16.3 (Převzato z U. S. National Library of Medicine, 2020)

1.4.3. *MSH6* gen

Stejně jako geny *MSH2* a *MLH1* se řadí mezi skupinu genů, které jsou zodpovědné za opravu chybného párování bází v DNA. Protein kódovaný genem *MSH6* pomáhá opravit chyby při replikaci DNA. Tento protein se váže například s proteinem vytvořeným genem *MSH2* za vzniku heterodimeru (Stembalska, 2019).

Gen *MSH6* je umístěn na krátkém rameni v pozici 16.3 druhého chromozomu (Peltomäki, 2004).



Obrázek 8: Označení polohy *MSH6* genu na 2. chromozomu v pozici p16.3 (Převzato z U. S. National Library of Medicine, 2020)

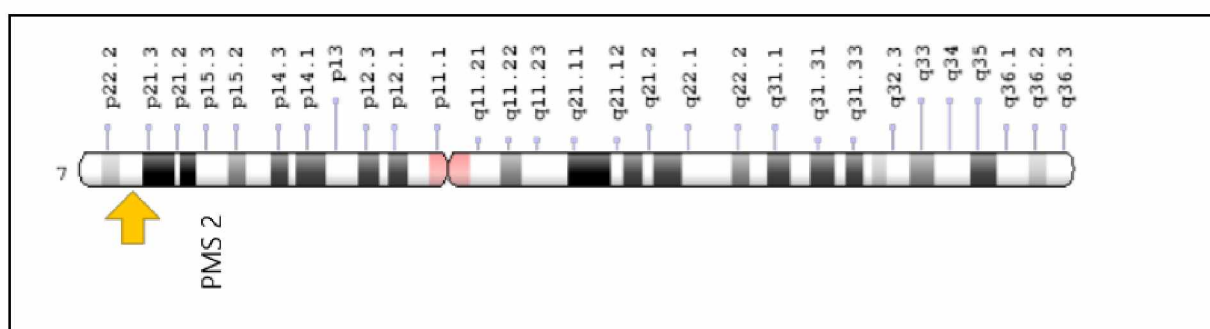
Mutace tohoto genu způsobují vznik velmi krátkého nefunkčního proteinu a tím se zvyšuje počet chyb, které se hromadí a způsobují abnormální fungování buněk a tím se zvyšuje riziko tvorby nádoru. Tento mechanismus je stejný, jako u již výše zmíněných genů (Alberts, 2002).

Kromě karcinomu tlustého střeva a konečníku způsobují mutace genu *MSH6* také Muir-Torreův syndrom, variantu Lynchova syndromu, který je charakterizován kožní lézí nebo mazovými nádory (Alberts, 2002).

1.4.4. *PMS2* gen

Gen *PMS2* vytváří protein, který hraje důležitou roli v opravě DNA, pomáhá reparovat její chyby při replikaci. Protein *PMS2* se spojuje s proteinem *MLH1* ze vzniku komplexu. Tento vzniklý komplex usměrňuje aktivitu jiných proteinů, jež opravují chyby způsobené při replikaci DNA. Z tohoto důvodu patří i tento gen do skupiny genů *MMS* (Alberts, 2002).

Gen *PMS2* je umístěn na 7. chromozomu krátkého ramena v lokusu 22.1 (Peltomäki, 2004).



Obrázek 9: Označení polohy *PMS2* genu na 7. chromozomu v pozici p22.1 (Převzato z U. S. National Library of Medicine, 2020)

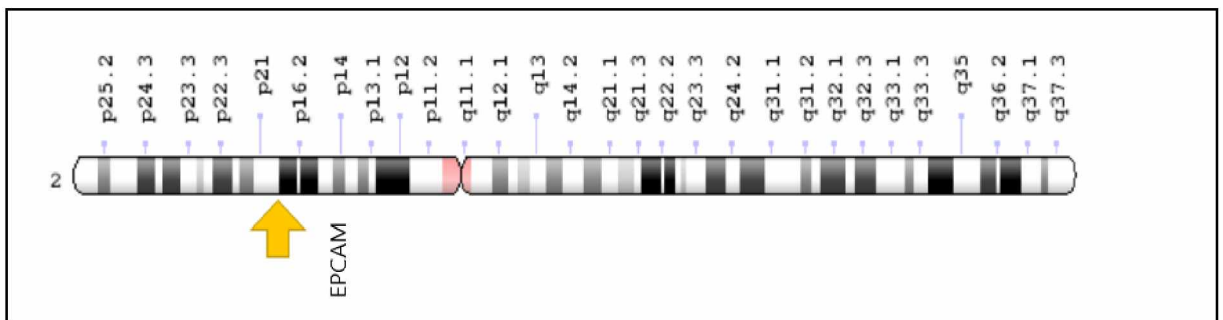
Mutace v genu *PMS2* byla prokázána přibližně u 2 % rodin s potvrzenou diagnostikou Lynchova syndromu. Funkce je stejná, jako u předešlých příkladů. Pokud dojde k mutaci, začnou se hromadit chyby, které vedou k tvorbě zkráceného či nefunkčního proteinu, který nedokáže napravit způsobenou škodu vytvořenou během replikace DNA. Celý mechanismus opět vede k abnormálnímu fungování buněk a zvyšuje se riziko výskytu nádoru (Alberts, 2002).

1.4.5. *EPCAM* gen

V tomto případě se jedná o gen, který vytváří transmembránový glykoprotein EpCAM, složený z 314 aminokyselin, jež přispívá k biologickým procesům, jako jsou buněčná adheze, migrace a proliferace. Tento protein se nachází v epiteliálních buňkách, které ohraničují povrchy a dutiny těla. EpCAM pomáhá buňkám přilnout k sobě (buněčná adheze), nebo také může být odštěpen na specifickém místě a uvolnit EpICD, který pomáhá přenášet signály z vnější strany buňky do jádra buňky (migrace). EpICD se dále spojuje s dalšími proteiny

a vytváří komplex, který reguluje dělení buněk (proliferace). EpCAM také obsahuje extracelulární část značenou EpEX. Tyto procesy jsou důležité pro správný vývoj tkání, udržení morfologie orgánů a buněk především (Huang, 2018).

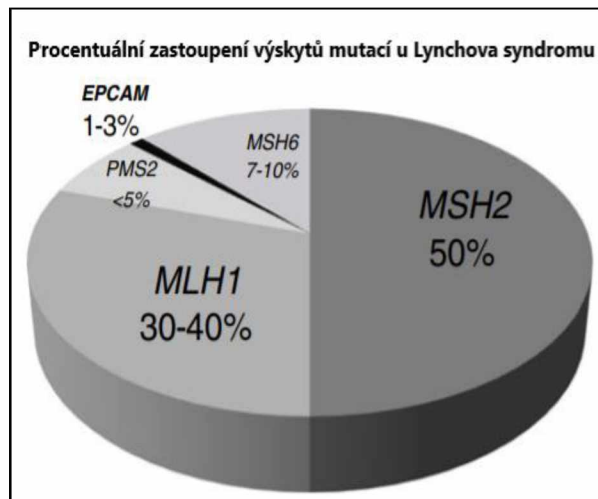
Gen *EPCAM* se nachází na 2. chromozomu krátkého ramene v pozici p21 (Tutlewska, 2013).



Obrázek 10 Označení polohy *EPCAM* genu na 2. chromozomu v pozici p21 (Převzato z U. S. National Library of Medicine, 2020)

Jak je patrné z předešlých obrázků, gen *MSH2* je umístěn několik kilobází za genem *EPCAM*. U pacientů s Lynchovým syndromem byla detekována delece genu *EPCAM*, což narušovalo 3' konec genu, a tedy inaktivaci sousedního *MSH2* genu. Inaktivace je omezena pouze na buňky, které exprimují gen *EPCAM*, a proto pacienti, kteří mají deleci v *EPCAM* genu vykazují umlčení genu *MSH2* a mohou mít i jinou lokalizaci výskytu nádoru oproti pacientům s mutací genu *MSH2* (Tutlewska, 2013).

Pacienti s delecí v genu *EPCAM* mají zvýšené riziko výskytu karcinomu tlustého střeva, ale oproti tomu je snížený výskyt nádoru endometria než u pacientů s mutací v genech *MLH1*, *MSH2* nebo *MSH6* – MMS genech. Gen *EPCAM* má také nejmenší zastoupení mutací, které tvoří 1 – 3 %, v souboru pacientů s diagnostikovaným Lynchovým syndromem (Tutlewska, 2013).

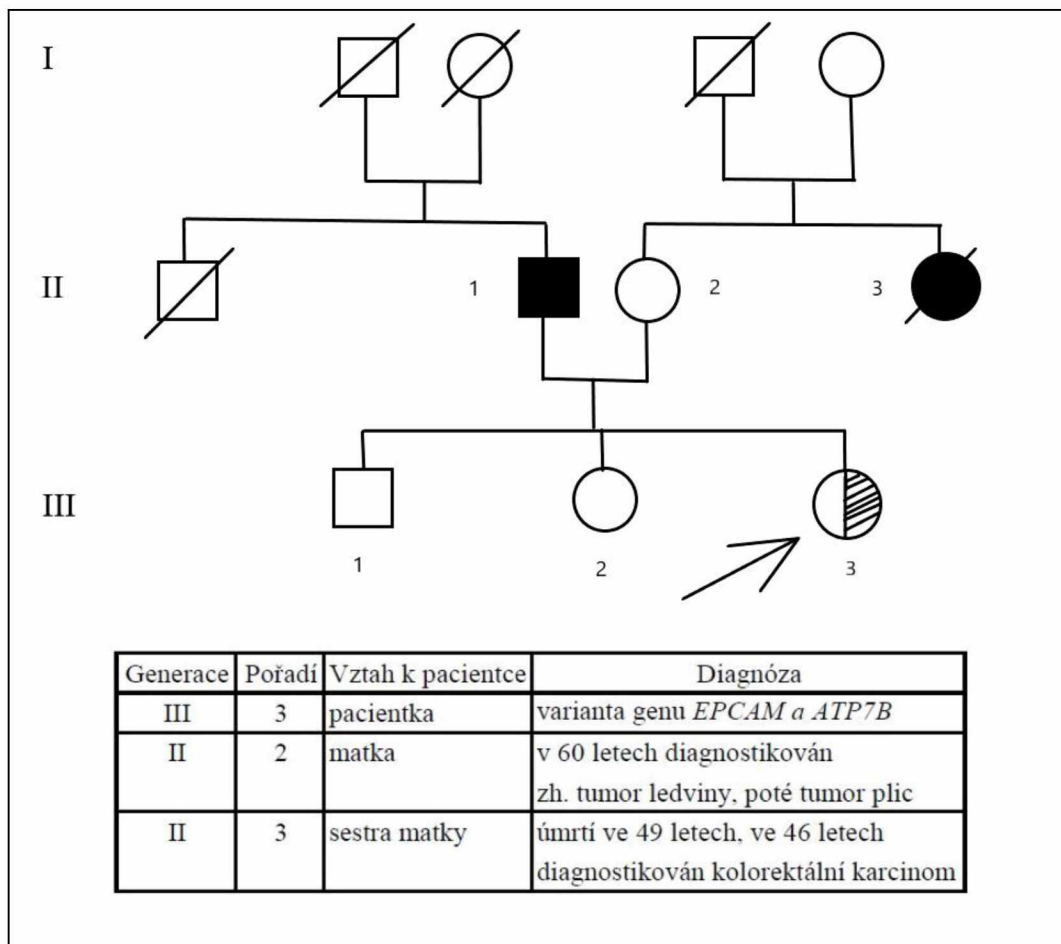


Obrázek 11 Procentuální zastoupení výskytu mutací u Lynchova syndromu. V grafu si můžeme všimnout, že nejmenší zastoupení v diagnóze Lynchova syndromu má výskyt mutace v genu *EPCAM*, a to 1-3 %. Zatímco největší zastoupení mutací je nalézáno v genu *MSH2*, kde se výskyt mutací pohybuje okolo 50 % (Převzato a upraveno z Tutlewska, 2013).

1.5. Dědičnost

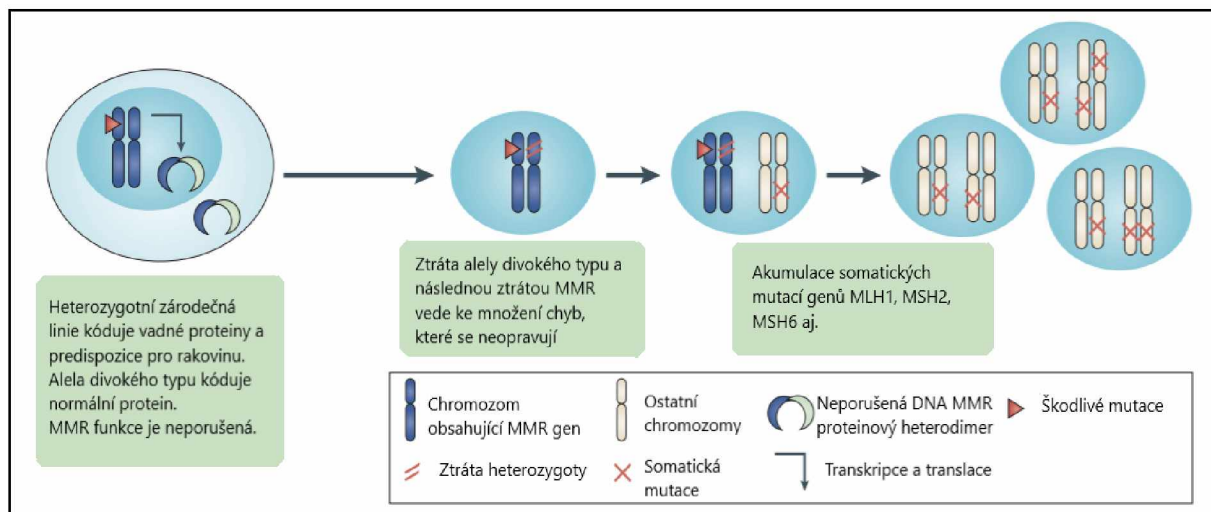
Hereditární nádory jsou výsledkem specifických dědičných genetických mutací, které přispívají k celoživotnímu riziku vzniku rakoviny u člověka. Zděděné mutace vedou také k syndromům predisponujícím k nádorovým syndromům (Chintalacheruvu, 2017).

Lynchův syndrom je zděděn autozomálně dominantním způsobem. Většina jedinců zdělila mutaci od svého rodiče, avšak díky screeningu a včasné diagnostice ne všichni jedinci mají rodiče s Lynchovým syndromem (Win, 2013). Jako genealogický příklad zde uvádím rodokmen pacientky, které byl diagnostikován Lynchův syndrom s variantou genu *EPCAM* a *ATP7B*. Pacientka splnila kritéria Amsterodam II. V její rodině byly diagnostikovány například tumor ledviny, tumor plic nebo kolorektální karcinom.



Obrázek 12 Genealogie Lynchova syndromu. Ukázka rodokmenu pacientky splňující indikační kritéria k mutační analýze hlavních predispozičních genů zahrnutých v etiopatogenezi HNPCC (Použito se souhlasem Laboratoře lékařské genetiky s.r.o., Pardubice).

Každé dítě rodiče s Lynchovým syndromem má 50 % riziko, že zdědí patogenní variantu v genu. Prenatální diagnostika v těhotenství možná je, s rizikem invazivního zásahu, pokud je známá rodinná anamnéza a výskyt patogenní varianty v rodině (Win, 2013).



Obrázek 13 Schéma prezentuje vývoj mechanismu pacientů s Lynchovým syndromem. Na začátku se nachází heterozygotní zárodečná mutace, která kóduje vadné proteiny. Oproti tomu alela divokého typu (tzn. normální alela) produkuje protein normální, bez mutací a funkce MMR je neporušená. Po ztrátě alely divokého typu dochází ke ztrátě MMR a chyby, které se tvoří při replikaci DNA, nejsou opravovány. Díky této kumulaci chyb dochází k somatickým mutacím (Převzato a přeloženo z: Lynch, Nature Review Cancer, 2015).

Pro verifikaci diagnózy LS je indikováno genetické vyšetření hlavních predispozičních genů, resp. hledání patogenních zárodečných variant v genech pro opravu chybného párování bází *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* a *EPCAM*. Jakmile je potvrzena diagnóza Lynchova syndromu, doporučuje se testování nalezené varianty u přímých příbuzných v riziku. Prediktivní testování by mělo začínat u příbuzných prvního stupně (Sinicrope, 2018).

Předpokládá se, že přibližně 30 % pacientů s klinickou diagnózou Lynchova syndromu nevykazuje zárodečnou mutaci v genech MMR. Tito pacienti nesou epimutaci *MLH1* nebo *MSH2* genech. To znamená, že nedochází k transkripční inaktivaci genu. Riziko dědičnosti nádoru se liší v tom, zda se jedná o zárodečnou mutaci nebo epimutaci (Chintalacheruvu, 2017).

2. KRITÉRIA PRO URČENÍ LYNCHOVA SYNDROMU

V roce 1991 Mezinárodní skupina *The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer* navrhla standardizovaná klinická kritéria pro diagnostiku LS s názvem Amsterdam I (Vasen, 1991). Tato kritéria vznikla především jako snaha pomoci multicentrickým výzkumným studiím při stratifikaci pacientů a jejich zařazení do studií, které byly zaměřeny na odhalení etiologie a patogeneze LS (Lynch, 2015). Amsterdamská kritéria I byla následně rozšířena v roce 1999 pod názvem Amsterdamská kritéria II (Vasen, 1999). V reakci na nové poznatky o MSI v etiopatogenezi LS byla skupinou *US National Cancer Institute* v roce 1996 vytvořena kritéria Bethesda, která doporučovala u pacientů s CRC testování MSI (Rodriguez-Bigas, 1997; Borland, 1998). V roce 2004 byla i tato Bethesda kritéria revidována (Umar, 2004).

2.1. Amsterodamská kritéria I a II

Protože rodiny s diagnózou Lynchova syndromu mají zvýšené riziko kolorektálního karcinomu a screening těchto jedinců může snížit úmrtnost, bylo v roce 1990 navrženo několik kritérií k určení Lynchova syndromu (Samadder, 2017). Nejdříve byla pro HNPCC uveřejněna Amsterdamská kritéria I, ve kterých bylo doporučeno vyšetření genů *MLH1*, *MSH2* a *MSH6* u pacientů s CRC. Později byla uveřejněna i Amsterdamská kritéria II, která doporučovala vyšetření i u pacientů s nádory mimo CRC, které byly sdružené s HNPCC. Kritéria byla vyvinuta jako nástroje výzkumu, jak identifikovat vysoce rizikové rodiny s úspěšností 70 % (Tiwari, 2015). Jiné zdroje uvádějí, že je pomocí Amsterdamských kritérií zachyceno 40 % případů HNPCC. Tato kritéria se používají především pro molekulárně genetické vyšetření (Plevová, 2009).

Klinicko-patologická kritéria pro identifikaci HNPCC/LS
Kritéria Amsterdam I
1. Tři nebo více příbuzných s histologicky potvrzeným nálezem kolorektálního karcinomu.
2. Jeden z nich je příbuzný prvního stupně ostatních dvou.
3. Je vyloučena familiární adenomatózní polypóza (FAP).
4. Jsou postiženy minimálně 2 generace.
5. Aspoň jednomu pacientovi byl diagnostikován CRC před dosažením věku 50 let.

Tabulka 1 Kritéria Amsterdam I pro diagnostiku HNPCC/LS. V tabulce nalezneme základní body, které slouží jako doporučení pro potvrzení diagnostiky Lynchova syndromu. (Přeloženo a upraveno z Tiwari, 2015 a Plevová, 2009)

O něco přesnější jsou kritéria Amsterdam II. Oproti Amsterdam I se jedná hlavně o rozšíření prvního bodu, který lépe charakterizuje podmínky HNPCC. Používají se kvůli své jednoduchosti, ale nejsou příliš specifické (61 %), ale mají o něco větší citlivost než kritéria Bethesda (78 %) (Coffin, 2019).

Klinicko-patologická kritéria pro identifikaci HNPCC/LS
Kritéria Amsterdam II
1. Tři nebo více příbuzných s histologicky potvrzeným HNPCC (kolorektální karcinom, karcinomem endometria, močovodu či ledvinové pánvičky) s tím, že jeden je příbuzný prvního stupně ostatních dvou.
2. Je vyloučena familiární adenomatózní polypóza (FAP).
3. Jsou postiženy minimálně 2 generace
4. Jeden nebo více druhů rakoviny bylo diagnostikováno před dosažením věku 50 let

Tabulka 2 Kritéria Amsterdam II pro diagnostiku HNPCC/LS. V této tabulce nalezneme o něco podrobnější verzi tabulky 1 a kritérii Amsterdam I. Jedná se hlavně o rozšíření prvního bodu. (Převzato a přeloženo z Tiwari, 2015)

2.2. Kritéria Bethesda

Bethesdská kritéria představují druhou diagnostickou metodu a byly vyvinuty za účelem dosáhnout větší citlivosti v diagnostice, která by přesáhla kritéria Amsterdam II. Toto zlepšení se projevilo ve zlepšení citlivosti na 94 %, ale to na úkor specifity, která je 25 % (Coffin, 2019).

Například v roce 2017 bylo z 89 pacientů, kterým byl diagnostikován kolorektální karcinom, identifikováno 34 pacientů s Lynchovým syndromem. Při diagnóze byly použity právě Bethesda kritéria a interval spolehlivosti diagnózy Lynchova syndromu představoval 95 %. Věk pacientů se pohyboval v rozmezí 20 až 57 let (Poaty, 2017).

Revidovaná kritéria pro Bethesda
1. Kolorektální karcinom byl diagnostikován pacientovi před dosažením 50 let.
2. Bez ohledu na věk je potvrzena přítomnost synchronního nebo metachronního CRC nebo jiných nádorů sdružených s Lynchovým syndromem (karcinom kolorekta, endometria, žaludku, vaječníků, tenkého střeva, pankreatu, ureteru a ledvinné pánvičky, biliárního traktu, mozku -gangliom, nádor kůže – adenomy sebaceozních žláz a keratoakanthomy).
3. CRC s histologií odpovídající vysokému stupni MSI (MSI-H) diagnostikovaný u pacienta mladšího 60 let (přítomnost tumor-infiltrujících lymfocytů, lymfocytární reakce podobná Crohnově chorobě, acinózní charakter, medulární růst, prstencové buňky v nádoru).
4. CRC diagnostikovaný alespoň u jednoho příbuzného prvního stupně s nádorem charakteristickým pro LS, jeden z nádorů byl diagnostikován před 50. rokem života
5. Bez ohledu na věk je CRC diagnostikovaný u dvou nebo více příbuzných prvního nebo druhého stupně s nádory sdruženými s LS

Tabulka 3 Revidovaná kritéria pro Bethesda. V tabulce jsou vyčteny body, kterými se posuzuje diagnostika Lynchova syndromu. (Použito a přeloženo z Tiwari, 2015 a Pléková, 2009).

Odhady četnosti Lynchova syndromu jsou takové, že touto nemocí trpí 1 člověk z 370 osob. Je důležité, aby si pacienti uvědomili, že oni a jejich rodiny nejsou sami. Bohužel, povědomí o Lynchově syndromu je mezi veřejností nízké. Rodinná anamnéza je tedy nezbytným

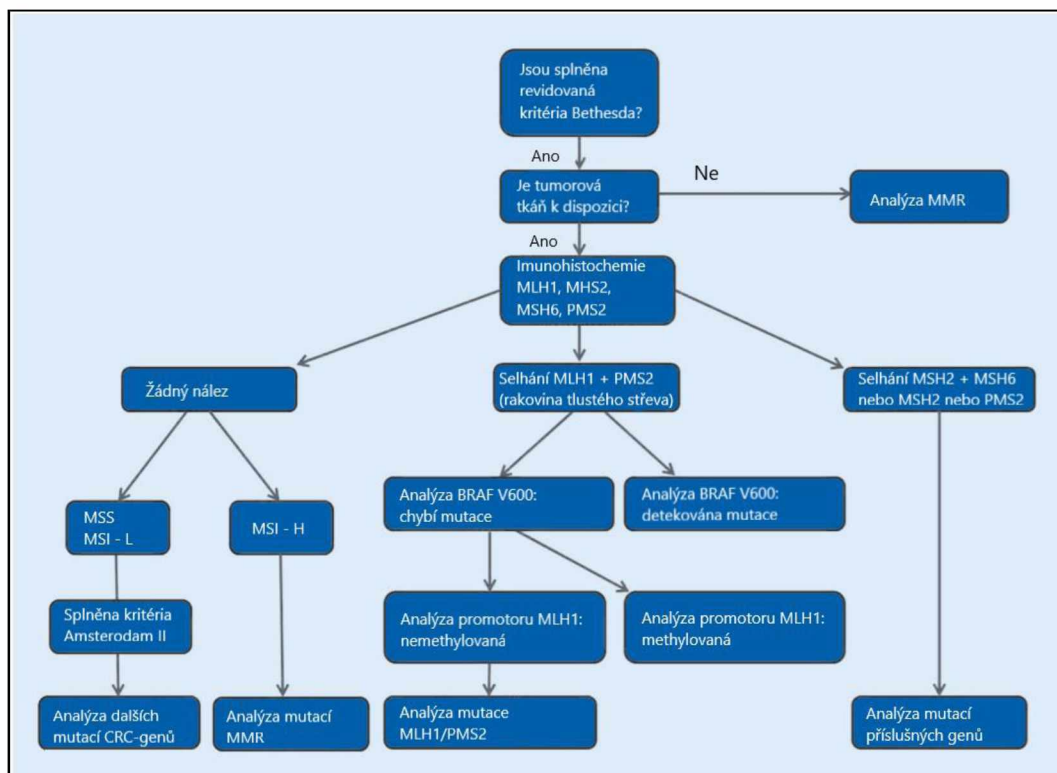
nástrojem k určení, zda genetický deficit může být příčinou nově diagnostikované rakoviny. Bohužel, pacienti nemusí znát svou anamnézu, nebo si neuvědomují závažnost onemocnění, anebo jejich rodinní příslušníci zemřeli bez nálezů příčiny smrti. Toto může ohrozit Bethesda kritéria, která se, mimo jiné, zaměřují právě na rodinnou anamnézu. Nicméně jsou tato kritéria i přesto velmi citlivá na detekci Lynchova syndromu (Seppen, 2013).

Tyto problémy s kritérii vedly k použití alternativní cesty, která spočívá v univerzálním screeningu, při kterém všichni pacienti, kterým byl nově diagnostikován Lynchův syndrom, podstoupili test stability mikrosatelitů nebo imunohistochemii (Takeda, 2018).

3. LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA LYNCHOVA SYNDROMU

Diagnóza Lynchova syndromu se opírá o důkaz přítomnosti mutace v jednom z MMR genů (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *EPCAM*). Pro výběr rodin k testování instability nebo k imunochemické analýze HNPCC by měla být použita revidovaná kritéria z Bethesdy, pro molekulárně genetické testování Amsterdamská kritéria II (Plevová, 2009). Několik institucí se také poslední dobou rozhoduje o genetickém testování všech CRC nádorů bez ohledu na věk pacienta, ve snaze zesílení detekce Lynchova syndromu (Tiwari, 2015).

V uplynulém desetiletí došlo právě k posunu hodnocení jedinců s podezřením na dědičnou formu nádorového onemocnění z důvodu dostupnosti masivně paralelního sekvenování (z ang. Next Generation Sequencing, NGS) pro testování zárodečných mutací ve vybraných genech, jako alternativa k tradičnímu genetickému testování pro určitý syndrom. Takové panely zahrnují desítky genů, které jsou kauzální v etiopatogenetzi nádorových onemocnění. To platí například pro jedince, u kterých se vyskytují patogenní varianty v genech *BRCA1* nebo *BRCA2*, spojených s karcinomem prsu, a zároveň nesplňují Amsterodamská a Bethesda kritéria (Boland, 2018). Vzhledem k pozoruhodným genotypovým a fenotypovým projevům HNPCC je diferenciální diagnostika poměrně široká (Le, 2017).



Obrázek 14 Postup při testování mutací při Lynchově syndromu. Testují se stabilita mikrosatelitů, nebo nesoulad MMR opravných genů (Použito a přeloženo z: Büttner, 2019).

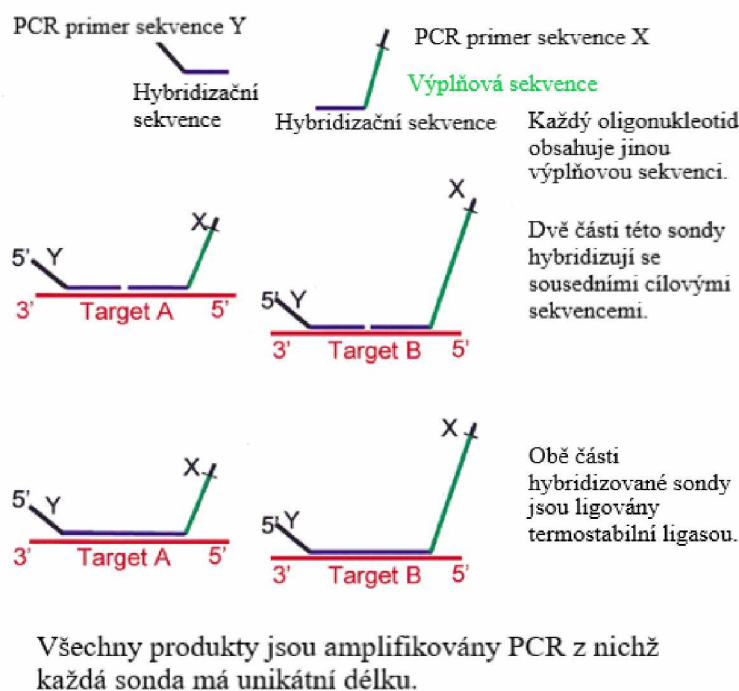
V posledních letech bývá také často zavedena imunohistochemie. Testuje se proteinová exprese genů v nádorovém materiálu. Preferuje se vyšetření tkáně kolorektálního karcinomu, není-li k dispozici, lze vyšetřit endometriální karcinom nebo adenomatózní polyp s vědomím, že citlivost obou metod je v těchto tkáních nižší oproti kolorektálnímu karcinomu. Citlivost vyšetření instability mikrosatelitů je udávána 98 % oproti citlivosti imunohistochemického vyšetření, u kterého je citlivost stanovena na 94 % (Vasen, 2007).

Na základě zvýšeného rizika výskytu karcinomu u zdravých nosičů se zintenzivnil program včasné detekce, která se zaměřuje na kolonoskopii jako prevenci pro kolorektální karcinom. Bylo zjištěno, že tato včasná diagnostika zvyšuje možnost přežití u pacientů s Lynchovým syndromem, u kterých byl diagnostikován kolorektální karcinom, až na 10 let. Citlivost diagnostiky tím stoupla na 93 %, oproti identifikaci nádorů střeva pouze podle symptomů, které činí 68 % (Schneider, 2012).

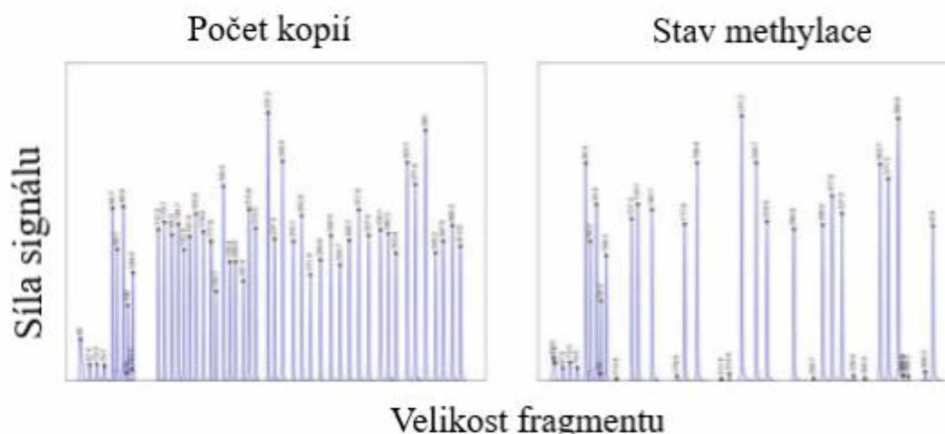
3.1. Metoda MLPA

Tato metoda byla poprvé popsána v roce 2002 (Schouten, 2002). MLPA (z angl. *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification*) je metoda sloužící k detekci delecí a duplikací vybraných exonů genů. Využití nachází i při analýzách změn metylace DNA. Metoda slouží k identifikaci až 60 prób pro specifickou část DNA (Moelans, 2010).

V této metodě se používá komerčně dodávané sondy. Sondy pro detekci změny počtu kopií vybraných úseků genů (z ang. copy number variants, CNVs) se skládají ze dvou oligonukleotidů (levý oligonukleotid LPO a pravý oligonukleotid RPO), které jsou navrženy tak, aby hybridizovaly vedle sebe na cílové sekvence DNA. Po ligaci jsou sondy amplifikovány jedním PCR primerem, z nichž jeden je fluorescenčně značen. Všechny amplikony mají unikátní délku, která se pohybuje v rozmezí od 90 do 500 nukleotidů a mohou být vizualizovány pomocí kapilární elektroforézy. Sondy MLPA, které nenasednou na cílovou sekvenci, nemohou být amplifikovány klasickou cestou, tedy PCR (Moleans 2017, Schouten, 2002).



Obrázek 15 Princíp MLPA reakce. Výsledné amplifikační produkty jsou separovány kapilární elektroforézou. Množství produktů odráží relativní množství počtu kopií cílových sekvencí. (Použito ze Schouten, 2002).



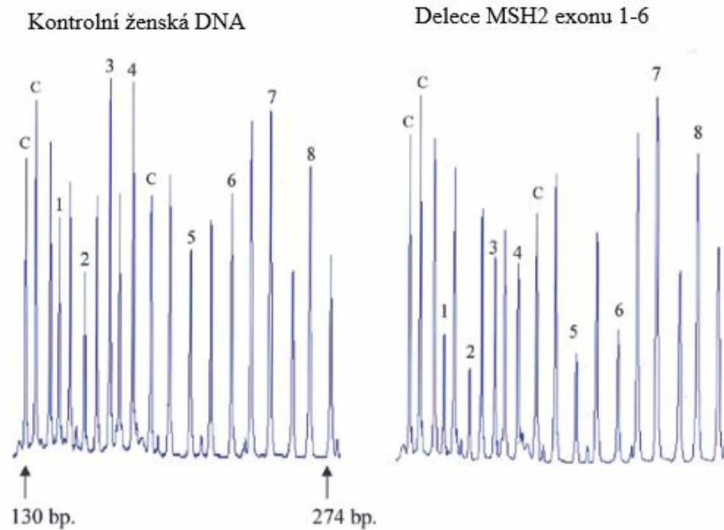
Obrázek 16 Výsledek analýzy MLPA při určení stavu metylace . Pokud je cílená sekvence sondy methylována, je neštěpená během PCR amplifikována, což vede ke tvorbě signálu, který je vyjádřen formou píku. Pokud nevznikne žádný produkt, nevznikne také žádný vrcholový signál. Obrázek 15 ukazuje porovnání vzniklých kopií, které mohou odhalit metylaci DNA cílové sekvence. Výsledek analýzy se nazývá elektroforeogram (Použito ze Schouten, 2019).

Hybridizující části sond jsou navrženy tak, aby detekovaly lidské sekvence, které jsou přítomny v jediné kopii. Relativní plocha píku každého produktu amplifikace sondy není stejná. Mezi hlavní faktory, které ovlivňují sílu signálu MLPA sond je množství polymerázy použité v PCR a povaha nukleotidu (Schouten, 2002).

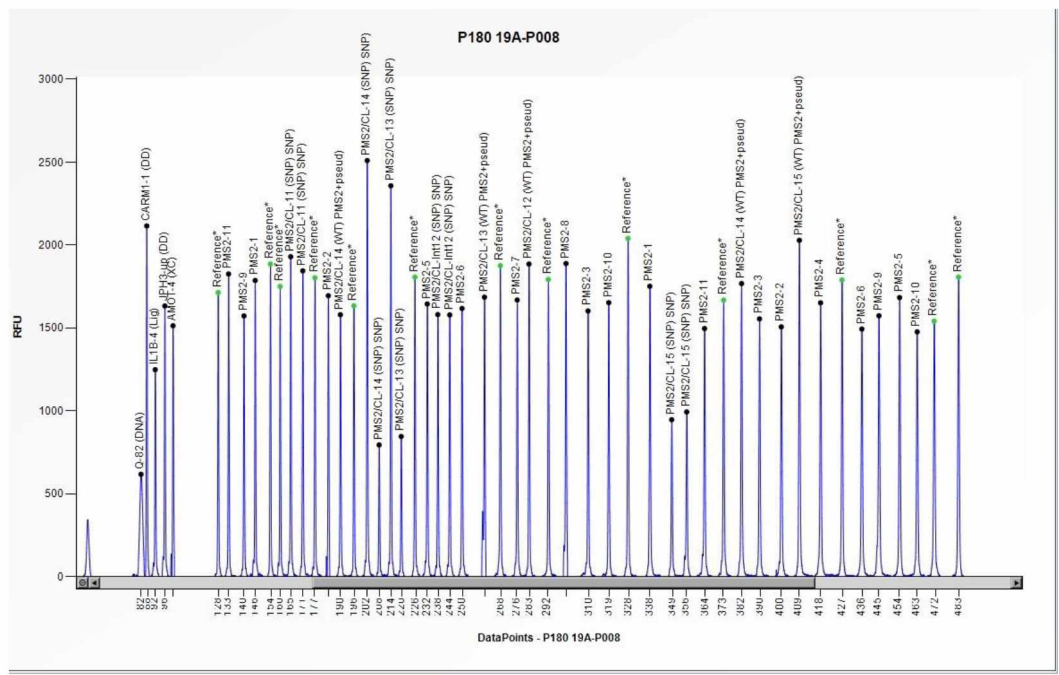
3.1.1. Využití metody MLPA

Metoda MLPA se využívá například pro detekci delecí či duplikací exonů genů, které jsou zahrnuty v etiopatogenezi nádorového onemocnění, např. delece 1 či více exonů genu *BRCA1* způsobuje hreditární karcinom prsu a ovarií (HBOC). Známé delece mohou být testovány pomocí PCR při použití MLPA sondy pro každý exon *BRCA1*. Mezi nejčastěji detekované rozsáhlé delece v genu *BRCA1* u nemocných s HBOC v České republice patří delece zahrnující exony 5 až 14 (Schouten, 2002).

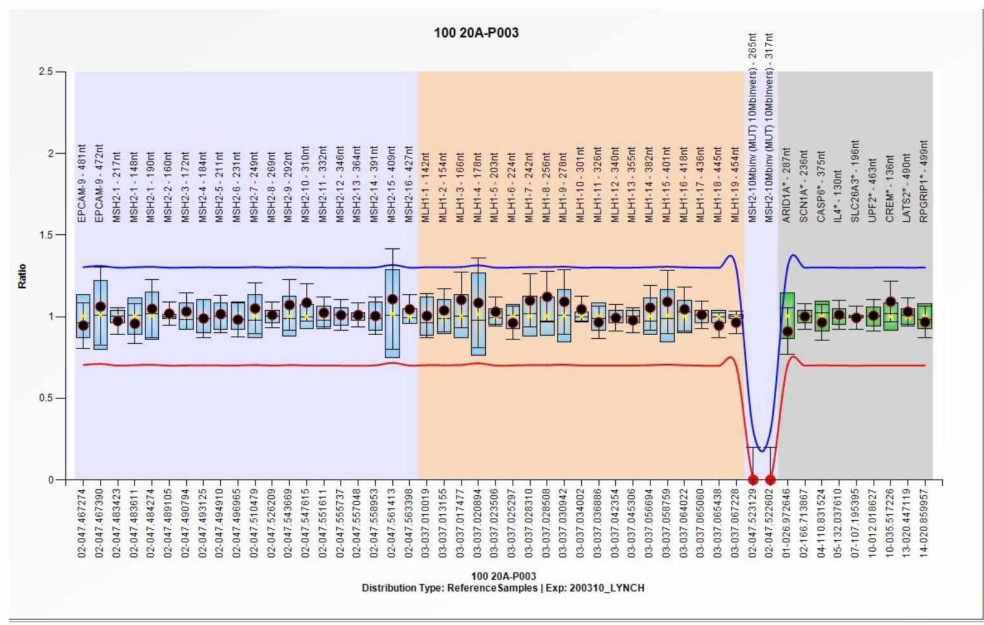
Dále se využívá pro detekci delece *MLH1* a *MSH2* genů, které jsou častou příčinou HNPCC. K identifikaci delece je využit probemix sond, který obsahuje 50 MLPA prób s amplifikačním produktem mezi 130 a 499 nukleotidů. Sondy jsou navrženy pro každý exon genu *MLH1* a *MSH2* a dvě próby pro exon 9 v *EPCAM* genu (Schouten, 2002).



Obrázek 17 Detekce delecí *MSH2* pomocí metody MLPA. Byla použita směs sond P003 pro detekci delecí exonu *MSH2*. Na obrázku vlevo je výsledek ženské kontrolní DNA. Vpravo je výsledek analýzy DNA získané od jedince s prokázanou delecí exonů 1 až 6 genu *MSH2*. V místech delece exonů jsou patrné redukce plochy píku specifických sond, které se snížily zhruba o 50 % (Použito ze Schouten, 2002).



Obrázek 18 Další příklad elektroforeogramu s použitím probemixu sond P008. Zde je analýza *PMS2* genu. (Elektroforeogram u pacientky splňující indikační kritéria pro testování predispozičních genů u HNPCC, Laboratoře lékařské genetiky s.r.o., Pardubice)

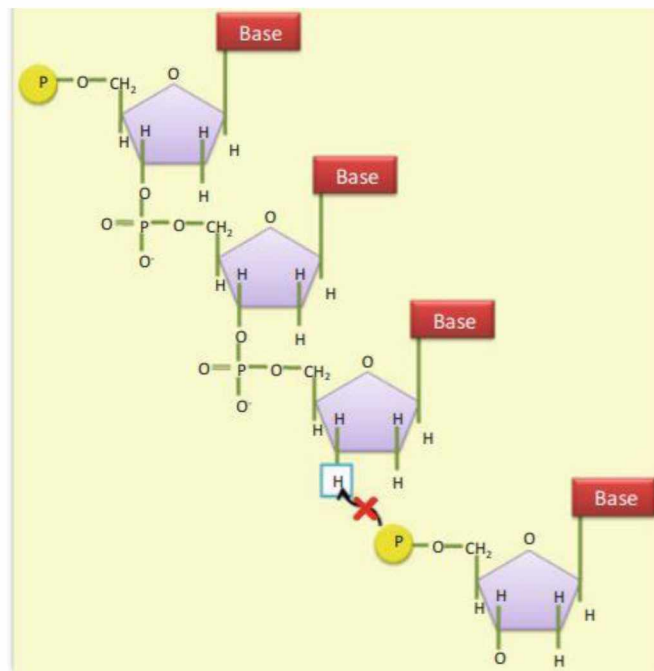


Obrázek 19 Analýza pomocí P003. Jedná se o normální nález, tedy nebyla prokázána delece ani duplikace ve vyšetřovaných genech. Snížený signál pro mutaci v genu *MSH2* poukazuje na nepřítomnost této mutace. (Analýza u pacientky splňující indikační kritéria k vyšetření predispozičních genů u HNPCC, použito se souhlasem Laboratoře lékařské genetiky s.r.o., Pardubice)

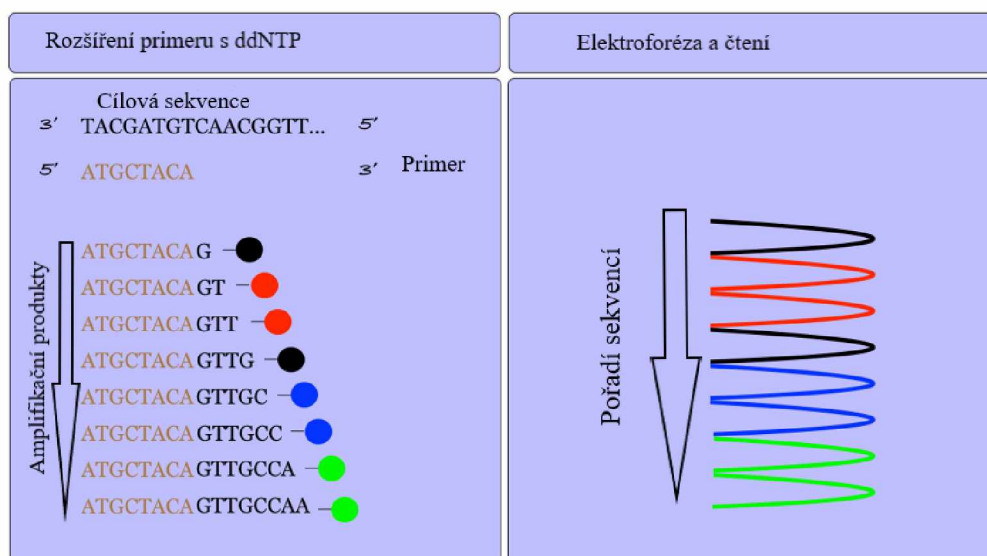
3.2. Sangerovo sekvenování

Metoda Sangerova sekvenování byla poprvé popsána v roce 1977 Frederickem Sangerem, který za tento objev obdržel Nobelovu cenu. Metoda sekvenování DNA umožňuje čtení dlouhých řetězců a to až 1000 bází v jedné sekvenční reakci. Nejdříve probíhalo sekvenování bakteriofága Phi-X174, následně analýza lidské DNA až po sestavení celého lidského genomu. Tato metoda je založená na použití dideoxynukleotidů (ddNTP), které blokují polymeraci DNA. ddNTP postrádají hydroxylovou skupinu na třetím uhlíku ribózy, a to je důvodem zastavení polymerace molekuly, protože enzym není schopen najít chemickou skupinu pro připojení dalšího nukleotidu. V praxi se využívá reakce DNA katalyzované polymerázou se směsí dNTP (deoxyribonukleotidů) a ddNTP, přičemž je opakovaně syntetizován nový řetězec DNA dle stejného templátu, avšak při každé syntéze nového řetězce dochází k jejímu přerušení tím, že je náhodně začleněn přidávaný modifikovaný nukleotid (ddNTP). Tento přidávaný nukleotid nedovolí DNA polymeráze pokračovat v syntéze nového řetězce. Náhodným procesem ukončení nově syntetizovaných kopií DNA vznikají různě dlouhé fragmenty molekul, které jsou fluorescenčně značené. Pro detekci a čtení

zařazených nukleotidů v sekvenci DNA se využívá kapilární elektroforéza. Amplikony jsou separovány podle jejich délky a jednotlivé barevné píky představují použitou fluorescenční sondu. Sekvenování se uplatnilo především v projektu *Human Genome Project* - čtení lidského genomu (Garrido-Cardenas, 2017; Mullikin, 1999; Karger, 1991).



Obrázek 20 Syntéza DNA po přidání dNTP do syntetizujícího řetězce. Jakmile je ddNTP začleněn, syntéza vlákna se zastaví, protože molekula neobsahuje další -OH skupinu, nutnou k vytvoření vazby (Použito z: Verma, 2017)



Obrázek 20 Sangerova metoda. Fluorescenčně značené ddNTP blokují amplifikaci DNA. Po odpovídajícím počtu cyklů amplifikace a provedení elektroforézy se molekuly separují kapilární elektroforézou a každá z nich je identifikována pomocí použitého fluorochromu v ddNTP (Použito z Garrido-Cardenas, 2017).

Detekce pomocí možné provádět např. pomocí spektrálního detektoru Charge-Coupled Device (CCD) (Lamture, 1994). Hlavní výhodou této metody spočívá ve větší přesnosti a rychlosti (Verma, 2017).

3.3. Metoda NGS

Další postupy ve vývoji Sangerova sekvenování dal vznik novým metodám, tzv. sekvenování nové generace (z *angl. Next Generation Sequencing*, NGS). Jedná se o metodu masivního paralelního sekvenování a čtení několika tisíců sekvencí současně s délkami v rozsahu od 50 do 800 párů bází. V současné době existují velké sekvenční platformy, které se od sebe odlišují způsobem přípravy templátů, sekvenční reakcí a použitými detekčními systémy. Kromě toho každá z používaných platform může mít různou úroveň výkonu s různými ekonomickými náklady sekvenování (Garrido-Cardenas, 2017; Erguner, 2015; Horn, 2019).

Metoda NGS umožňuje sekvenční analýzu několika pacientů a několika desítek až stovek genů v jednom sekvenčním běhu. Přes některé rozdíly se do jisté míry řídí třemi základními kroky: příprava vzorku, sekvenování připravených knihoven templátů nukleových kyselin a analýza dat (Kumar, 2019; Goodwin, 2016). Díky této metodě se také v analýze odstranily těžkopádné a časově náročné techniky (Hui, 2014).

4. PROJEVY ONEMOCNĚNÍ

Lynchův syndrom se klasicky projevuje v tlustém střevě především nálezem kolorektálního karcinomu bez polypózy. Avšak u pacientů s mutací v genu *MSH2* mohou být přítomny i jiné malignity. Oproti tomu například mutace v genu *MSH6* vytvářejí karcinomy především v oblasti endometria. Kombinace poruch genů způsobujících Lynchův syndrom, daly vzniku dalším novým klinickým syndromům, jež představují nové varianty Lynchova syndromu (Dušek, 2016).

U obou pohlaví se mohou vyskytovat mozkové, kostní nebo i plicní malignity, ale výskyt těchto nádorů není vyšší než v běžné populaci (Le, 2017).

4.1. Kolorektální karcinom

Jak už jsem uvedla výše, Lynchův syndrom se genotypicky manifestuje především karcinomem kolorekta. Riziko CRC je spojené s patogenními variantami v genech *MLH1* a *MSH2*. Průměrný věk pro manifestaci CRC spojený s patogenní variantou v genech *MLH1* a *MSH2* je mezi 53 a 63 rokem. Oproti tomu až 8 % CRC s patogenní variantou v genu *PMS2* se vyskytuje před 30. rokem života. U všech patologických nálezů v genech způsobující Lynchův syndrom se doporučuje každoroční screening (Kohlmann, 2004).

4.2. Rakovina horních močových cest

Jako nejčastější urologická malignita spojená s Lynchovým syndromem se uvádí karcinom horních močových cest. Jedná se o třetí nejčastější rakovinu po CRC a endometriálním karcinomem. U pacientů s Lynchovým syndromem existuje 14 – 22 krát vyšší riziko vývoje tohoto nádoru oproti běžné populaci. Protože Amsterodamská kritéria I/II jsou především zaměřena na výskyt kolorektálního karcinomu, byl proveden výzkum, zda tato kritéria stačí i k průkazu HNPCC u nádorového onemocnění horních močových cest spojených s Lynchovým syndromem (Lim, 2019).

Z celkového počtu 115 pacientů bylo u šestnácti (13,9 %) pacientů klasifikován potenciální LS. Z těchto pacientů 7 % splnilo Amsterodamská kritéria II, 11,3 % pacientů mělo ztrátu aspoň jednoho proteinu z MMR genů a v 6 % případů byla prokázána vysoká mikrosatelitová nestabilita. Všech těchto 16 pacientů s pravděpodobnou diagnózou LS bylo doporučeno k testování germinálních mutací, přičemž u 6 (5,2 %) pacientů byl potvrzen Lynchův syndrom. Tato studie má důležité výsledky pro univerzální screening karcinomů močových

cest a představuje jeden z nejvyšších podílů nediagnostikovaného genetického nádorového onemocnění urologických cest (Metcalf, 2018).

4.3. Rakovina kůže

Karcinom kůže způsobují mutace nebo ztráty exprese genů *MSH2* a *MSH6* tedy opět defekt systému oprav chybného párování bází vedoucí k mikrosatelitové instabilitě DNA v nádoru. Benigní nebo maligní sebaceozní nádory kůže v kombinaci s interními malignitami bývají charakterizovány jako klinický obraz Muir-Torreové syndrom, který je podtyp HNPCC. Kromě mazových nádorů mohou v tomto případě vznikat i keratoakantomy (Vaisfeld, 2019). V současné době pacienti, u kterých jsou nalezeny mazové karcinomy, jsou předáni do péče dermatologovi (Adan, 2018).

Gen	počet pacientů. (%)
MLH1	74 (22.4)
MSH2/EPCAM	118 (35.6)
MSH6	92 (27.8)
PMS2	47 (14.2)

Tabulka 4 Zastoupení genových mutací MMR u pacientů s rakovinou kůže. V levé části tabulky jsou vypsány hlavní geny, jejichž mutace způsobuje Lynchův syndrom. V pravé části tabulky jsou uvedeny počty pacientů s výskytem mutace v testovaných genech, přičemž v závorce je vyčteno procentuální zastoupení. U všech těchto pacientů bylo nalezeno nádorové onemocnění kůže (Převzato a přeloženo z: Adan, 2018).

4.4. Karcinom žaludku

Nejčastější je uváděná patologie Lynchova syndromu, která se histologicky liší od difúzního karcinomu žaludku, kde se vyskytuje patogenními variantami v genu *CDH1*. Riziko karcinomu žaludku je vyšší u jedinců s Lynchovým syndromem v zemích, ve kterých je vysoký výskyt infekce způsobené *Helicobacter pylori* (Kohlmann, 2004).

4.5. Karcinom varlat

Rakovina varlat je nejčastějším maligním onemocněním u mužů, které se obvykle manifestuje ve věku 15-44 let, nicméně v současné době není považována za součást nádorového spektra LS. Studie se zaměřují na přítomnost ztráty proteinů MMR a MSI u tohoto typu nádoru.

Literatura se v názorech liší, některé publikace prokázaly pravděpodobnost recidivy, jiné neprokázaly žádnou spojitost. Doporučuje se tedy dále prozkoumat pacienty s karcinomem varlat, zda jsou spojeny s výskytem Lynchova syndromu (Lim, 2019).

4.6. Nádor endometria a ovariální karcinom

Kromě CRC se u žen vyskytuje riziko karcinomu endometria a vaječnicků, které jsou spojené s celoživotním rizikem v rozsahu 28–60 %. Nebezpečí spočívá u žen s mutací v genu *MSH6* s rizikem 36 % do věku 60 let a 71 % do věku 70 let. Oproti tomu ženy s mutací v genech *MLH1* nebo *MSH2* mají nižší celoživotní riziko, a to pouze 24 % do věku 70 let. Stále ale platí, že riziko vzniku nádoru endometria je významně vyšší, než se dříve předpokládalo, a že se jedná o druhou nejběžnější komplikaci při Lynchově syndromu (Schneider, 2015).

U ovariálních karcinomů se předpokládá celoživotní riziko 6-7 %, kdy incidence je dvakrát vyšší u mutace v genu *MHS2* než u mutace v genu *MLH1*. Průměrný věk vzniku ovariálního karcinomu je ve věku mezi 40 a 55 lety (Schneider, 2015).

I přes to, že rakovina vaječnicků je celosvětově pátá nejčastější příčina smrti u žen, slabý poměr přežití k incidenci odráží skutečnost, že většina případů karcinomů je diagnostikovaná v pokročilém stádiu. Například u žen s pokročilým stádiem je 30 % šance přežití. Tyto nádory rostou a vykazují mutace v *KRAS/BRAF* a také nestabilitu mikrosatelitů (MSI) (Niskakoski, 2013).

4.7. Karcinom prsu

Win a kolektiv (2013) povedli systematickou rešerši relevantních studií karcinomu prsu asociovaného s LS, které byly publikovány do prosince 2012. Identifikovali 15 molekulárních studií, které kombinovaly pozorování 62 ze 122 nádorů prsu u pacientů s mutací v MMR genech a MMR-deficientních. Výsledky studií na zvýšené riziko rozvoje nádoru prsu nebyly jednotné. Z počtu 21 studií 13 z nich nepozorovalo statistický průkaz rizika rozvoje karcinomu prsu v asociaci s LS, zatímco 8 studií prokázalo v rozmezí 2 až 18 krát vyšší riziko rozvoje karcinomu prsu v porovnání s běžnou populací (tzv. nepřenašečů).

Kromě mutací v jednom z genů pro opravu chybného párování bází DNA (MMR) může nastat problém se zárodečnými mutacemi, které predisponují k nádoru prsu a to v genech *BRCA1* nebo *BRCA2* (Yurgelun, 2015).

5. LÉČBA

Přestože mají jednotlivé fáze CRC spojeného s Lynchovým syndromem lepší prognózy, u některých jednotlivců se bohužel vyvíjí opakující se metastazující kolorektální karcinom nebo jiné formy pokročilých a nevléčitelných nádorů spojených s LS. K těmto jevům dochází především u pacientů s poruchami v oblasti mikrosatelitů, která se vyznačuje právě delecí v opakování úseků DNA (Yurgelun, 2018).

Pacienti s LS mají celoživotní riziko rozvoje několika typů nádorů. Je zřejmé, že životní styl je důležitým faktorem při určování rizika nádorového onemocnění u pacientů a ten musí být zohledněn i při poradenství (Seppen, 2013).

5.1. Využití 5-fluorouracilu

Léčba CRC spočívá v chirurgickém odstranění nádoru a na základě charakteristiky onemocnění následuje chemoterapie nebo radioterapie. Lék 5-fluoracyl je široce používaný lék první volby v léčbě CRC. Po podání dávky je více než 80 % degradováno a pouze 1-3 % přeměněno na jeho aktivní metabolit thymidylátovou syntetázou (TYMS), která pak blokuje syntézu deoxythymidin trifosfátu (dTTP). TYMS je považován za potenciální prognostický marker v léčbě CRC. Probíhala i studie ohledně množství jeho exprese, která měla předpovídat, pokud se TYMS vyskytoval ve větším množství, špatnou prognózu pro pacienta s kolorektálním karcinomem (Kunická, 2016).

5.2. Kolonoskopie

Screening Lynchova syndromu se zvyšuje od roku 2000 a ukázal se jako velmi efektivní při identifikaci rizikových rodin a následné prevenci koloniálních a extrakoloniálních nádorů (Chintalacheruvu, 2017).

Jako základem pro pacienty s Lynchovým syndromem je každoroční kolonoskopický dohled, který začíná mezi 20-25 lety. Frekvence a počáteční věk pro sledování může být přehodnocena u nosičů mutace *MSH6* a *PMS2*. Kolonoskopie má diagnostické a terapeutické účinky (Cox, 2018).

Pro pacienty bez Lynchova syndromu, kteří mají zvýšené riziko kolorektálního karcinomu, se doporučují rutinní intervaly sledování, obvykle v rozsahu každých 5 let, v závislosti na okolnostech. Tento rozdíl je z důvodu výskytu neoplastických lézí, které byly

identifikovány u pacientů s Lynchovým syndromem. Tyto léze mohou vznikat do 2 let po vyšetření, které se zdálo být bez problémů (Boland, 2018).

Jako vylepšením kolonoskopie může být použita chromoendoskopie. Jedná se o metodu detekce lézí v tlustém střevě. Využívá se směsi methylenové modře a indigokarmínu rozprášeného na sliznici tlustého střeva. Lékař pak pomocí zavedené kamery může lépe zhodnotit lépe stav sliznice, popřípadě poslat vzorek odebrané sliznice na histologické vyšetření (Healy, 2019)

5.3. Studie v pokroku léčby rakoviny konečníku

Byla uvedena i studia s názvem CAPP (Colorectal Adenoma/carcinoma Prevention Program), která tvrdí, že riziko nádoru střev a konečníku snižuje denní užívání aspirinu. Tyto studie probíhaly ve dvou formách, kde se pacientům podávaly dávky aspirinu. Ve studii CAPP2 byla použita vyšší dávka než ve studii CAPP. Byly však zjištěny nežádoucí účinky jako je krvácení u požívání vyšší denní dávky (Seppen, 2013).

Další analýza, která probíhala ve studii CAPP2 byla pro manifestaci CRC významným rizikovým faktorem hodnota BMI. U pacientů byla zjištěna hodnota $BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$. Pacienti, kteří během studie snižovali svou hodnotu BMI, snížili riziko vzniku kolorektálního karcinomu (Biller, 2019).

5.4. Strategie detekce rakoviny endometria a vaječníků

Strategie screeningu karcinomu ovarií bývá problémová u pacientek. Kritéria Amsterdam II nezahrnují nádorové onemocnění vaječníků a revidovaná Bethesda kritéria se zaměřují na CRC a nejsou užitečná pro výběr pacientů s ovariálním karcinomem, u kterých je vysoké riziko LS. Proto nemusí být některé karcinomy včas podchyceny (Takeda, 2018).

U nádorů vaječníků a endometria se využívá antikoncepčních tablet, což bývá spojeno se snížením rizika vzniku tohoto nádoru u žen. Použití antikoncepčních tablet s obsahem progestinu bylo spojeno se snížením rizika karcinomu už v roce 2006 a od tohoto roku se jeví použití progestinu u žen s LS jako rozumné (Stoffel, 2013).

V poslední době se využívá univerzální screening nově diagnostikovaných žen s LS. Screeningem prochází jak tlusté střevo, tak i endometrium (Ryan, 2018).

Celkové přežití pacientek s karcinomem endometria v asociaci s LS není jiné než u pacientů se sporadickým výskytem nádoru. Celkově je přežití udáváno na 5 let, ale někteří autoři uvádějí, že nestabilní endometriální karcinom s různou hloubkou invaze a fází nádorového onemocnění může mít horší prognózu (Bats, 2017).

5.4.1. Profylaktická chirurgie

Jedná se o operativní léčbu gynekologických nádorů. O profylaktické chirurgii při Lynchově syndromu nebylo publikováno mnoho studií, nicméně zákrok ukazuje, že odstranění všechna rizika rakoviny endometria a vaječnicků. Operace se skládá z kompletní hysterektomie a bilaterální adnexektomie, prováděné laparoskopicky (tzn. chirurgické odstranění vejcovodů a obou vaječnicků). Tento zákrok by měl být nabízen všem vysoce rizikovým pacientkám obvykle mezi 40-45 lety po ukončení screeningových testů. O tom, zda by tento zákrok měla pacientka podstoupit, rozhoduje multidisciplinární komise, kterého se účastní gynekolog, onkogenetik a psychiatr, přičemž pacientka musí podstoupit konzultaci (Bats, 2017).

6. PREVENCE

Celkově se zlepšila diagnostika Lynchova syndromu, což nabízí několik výhod. První z nich je zvýšený lékařský dohled včetně kolonoskopie. Koloskopické sledování pacientů s HNPCC vede k detekci kolorektálního karcinomu v časném stádiu, k 63% snížení rizika výskytu kolorektálního karcinomu a signifikantnímu snížení mortality spojené s LS (Plevová, 2009). Druhou je zlepšení detekční rychlosti kolorektálního karcinomu a tím se zlepšuje i přežití pacientů. Třetí výhodou je požadavek na testování tzv. “nenosičů“ mutací, protože tím se lépe kontroluje frekvence variant v MMR genech v běžné populaci (Seppälä, 2017).

Kromě kolonoskopického vyšetření a pravidelných screeningů je jako možný preventivní účinek uvedeno užívání multivitaminů a vápníku jako doplňku stravy pro pacienty s LS (Boland, 2018).

Jako příklad databáze pro veřejnost, a také pro lepší povědomí zdravotních pracovníků, evropská skupina Maorca a ústav Mezinárodní společnosti pro gastrointestinální dědičné nádory vyvinuly databázi přenašečů mutací v predispozičních genech u Lynchova syndromu, kde charakterizují rizika vzniku karcinomu a účinky mutací na lidské tělo. Databáze zahrnuje také například postup pro laboratorní testování, anebo rizikové faktory pro rozvoj nádorového onemocnění (Møller, 2017).

6.1. Rizikové faktory

Při sledování několika pacientů s Lynchovým syndromem, kteří absolvovali operaci tlustého střeva, bylo zjištěno, že největší vliv, kromě kouření a příjmu alkoholu, má obezita, a to i bez ohledu na to, zda měli pacienti adenomy při zařazení do studie. Dále bylo pozorováno, že vztah mezi rizikem adenomu a BMI nemá u žen takový význam, za to u mužů záleží na vztahu BMI a rizikem rozvoje adenomu. Při zařazení do této studie byla klasifikace BMI s nadváhou spojena se zvýšeným rizikem vzniku adenomu a to až 8,7 krát (Coletta, 2019).

Dalším rizikovým faktorem je onemocnění diabetes mellitus 2. typu. Byla provedena studie, do které bylo z databáze Colon Cancer Family Registry, vybráno 802 pacientů s karcinomem tlustého střeva a konečníku s průměrným věkem 42 let. Vyšší riziko karcinomu byl pozorován u osob s diabetes mellitus 2. typu a s vysokou hladinou cholesterolu oproti těm, kteří tyto projevy neměli (Dashti, 2019).

6.2. Důležitost rodinné anamnézy

Do léčby je také zapojena rodinná anamnéza, která je jedním z nejdůležitějších bodů při diagnostice a léčbě. Určení syndromu dědičného nádorového onemocnění v rodině představuje výzvu ke komunikaci mezi příbuznými. Vzdálení příbuzní jsou ne vždy vyšetřováni a informace přichází pouze hlavním postiženým jedincům či přímým, jednostupňovým příbuzným (Lynch, 2015).

Pouze 30-52 % příbuzných probandů absolvuje genetické poradenství, i když četnost genetického testování je 95 %. Hlavním problémem je neurčení statusu nositele, což nevede k účinnému genetickému poradenství. V průměru na jednoho nositele kauzální varianty v genu jsou testováni tři příbuzní. Tato pozorování naznačují, že většina nositelů onemocnění LS není identifikována a je tedy vynechána i prevence před rakovinou. Proto se začal více provádět preventivní screening (Seppälä, 2017).

6.3. Prognóza

Posledních 5 let studií přineslo obrovský pokrok v chápání LS, především s ohledem na jeho genetiku, epidemiologii, klinický fenotyp a jeho variabilitu, diagnostiku, terapii a prevenci. Řada nezodpovězených otázek zahrnuje nejistotu ohledně hodnocení a řízení rizik pro kandidátní geny, identifikaci Lynchova syndromu bez karcinomu a znalosti o tom, jak využít imunobiologii pro další léčbu (Biller, 2019). Výskyt Lynchova syndromu přinesl také pokrok v porozumění imunitního systému rozpoznat a zachytit toto onemocnění (Yurgelun, 2018).

ZÁVĚR

Kolorektální karcinom je v současné době jedním z nejčastějších nádorových onemocnění. Mortalita na CRC se díky včasné diagnostice snižuje, přesto stále dosahuje 8 % všech úmrtí na nádorové onemocnění. Pochopení molekulárních principů jeho vzniku patří v poslední době mezi priority v oblasti okogenetického výzkumu.

Důvodem vzniku Lynchova syndromu jsou mutace v hlavních predispozičních genech, kterými jsou *MSH2*, *MSH6*, *MLH1*, *PMS2* a *EPCAM*. Při těchto mutacích vzniká mikrosatelitní nestabilita a dochází tedy k chybným opravám při párování DNA bází. Kumulací chyb mohou vznikat adenomatózní polypy v endometriálních buňkách nejčastěji v tlustém střevě. Avšak Lynchův syndrom může mít i jiné podoby, například jako karcinom žaludku, močových cest, u žen karcinom ovarií a u mužů může manifestovat jako nádorové onemocnění prostaty. Jelikož se jedná o autozomálně dominantně dědičné onemocnění, je důležitý včasný screening a diagnostika choroby. V první části se podle Bethesda a Amsterdamských kritérií II. určí, zda pacient splňuje podmínky pro indikaci k vyšetření, a tedy diagnózu kolorektálního karcinomu.

Po prověření, zda pacient splňuje výše uvedená kritéria, nastupuje laboratorní diagnostika. V současné době se nejvíce využívají tři základní metody: MLPA, Sangerovo sekvenování a metoda sekvenování nové generace (z angl. Next Generation Sequencing, NGS) v odborné genetické společnosti se vžil název metody masivně paralelního sekvenování (MPS). Díky technologii MPS je možné v jedné reakci vyšetřit naráz několik pacientů a několik desítek až stovek genů, které jsou zahrnuty v etiopatogenezi nádorových dědičných syndromů. Díky těmto novým trendům se zvyšuje pravděpodobnost identifikace kauzální varianty (mutace) způsobující onemocnění, ale i záchyt nositelů s alterací, kterou je poté možné prediktivně testovat u přímých příbuzných v riziku a případně zabezpečit včasnou prevenci či léčbu těchto jedinců.

Jako hlavní možnost léčby je zvolena kolonoskopie, pokud se jedná o tlusté střevo. U žen, které mají karcinom ovarií a dělohy, se přistupuje k profylaktické chirurgii. Při tomto zákroku je vyjmuta celá děloha i s ovarií. Jedná se sice o invazivní operaci, avšak nejúčinnější. Mluví se také o kladných účincích antikoncepce jako prevence proti karcinomům endometria. Dále je doporučován pravidelný screening, který musí pacient absolvovat jednou ročně. Důležitým krokem je také dodržování správné životosprávy, a především informovanost pacientů o jejich

onemocnění. V současné době je například využívána léčba pomocí 5-fluorouracilu, který je využíván jako lék první volby při kolorektálních karcinomech. Další léčiva a možnosti diagnostiky jsou dále ve studiích, důležité však je, že se zvyšuje povědomí o tomto závažném onemocnění.

SEZNAM LITERATURY

ADAN F., CRIJNS M. B., ZANDSTRA W. S. E., BEKKENK M. W., BLEEKER F. E., DEKKER E., VAN LEERDAM M. E., *Cumulative risk of skin tumours in patients with Lynch syndrome*. British Journal of Dermatology. [online]. 2018; 179(2): 522-523. [cit.2020-05-10].

Dostupné z: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29542113/?from_term=lynch+syndrome+skin+cancer&from_page=2&from_pos=4

ALBERTS B., JOHNSON A., LEWIS J., et al. *Molecular Biology of the Cell. 4th edition*. New York: Garland Science. [online]. 2002. [cit.2020-04-11]. ISBN10: 0-8153-4072-9, Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26902/#A4345>

ANDERSEN S. D., LIBERTI S. E., et al. *Functional cgaracterization of MLH1 missense variants identified in Lynch syndrome patients*. Human Genome Variation Society [online]. 2012; 33(12): 1647-1655. [cit. 2020-02-22].

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22753075>

BATS A. S., ROSSI L., LE FRERE-BELDA M. A., NARJOZ C., COURNOU C., GOSSET M., LECURU F., *Syndrome de Lynch et cancer de l'endomètre*. Bulletin Du Cancer. [online]. 2017; 104(12), 1013–1021. [cit.2020-05-11].

Dostupné z: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29061399/?from_term=lynch+syndrome+risk+factors&from_filter=years.2015-2020&from_pos=4

BERNSTEIN-MOLHO R., LATMAN Y., SCHAYEK H., IOMDIN S., FRIEDMAN E., *The rate of the recurrent MSH6 mutations in Ashkenazi Jewish brest cancer patients*. Cancer Causes and Control [online]. 2019; 30(1), 97-101. [cit. 2020-04-25].

Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30498870/>

BILLER L. H., SYNGAL S., YURGELUN M. B., *Recent advances in Lynch syndrome. Familiar cancer*. [online]. 2019; 18(2): 211-219. [cit. 2020-05-10].
Dostupné z: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30627969/?from_term=screening+lynch+syndrome&from_filter=years.2014-2020&from_pos=4

BOLAND P. M., YURGELUN M. B., BOLAND C. R., *Recent progress in Lynch syndrome and other familial colorectal cancer syndromes*. CA: A Cancer Journal for Clinicians [online]. 2018; 68(3), 217-231. [cit. 2020-05-02].
Dostupné z: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29485237/?from_term=lynch+syndrome+colonoscopy&from_filter=years.2014-2020&from_pos=1

BOLAND C. R., TRONCALE F. J., *Familial colonic cancer without antecedent polyposis*. Annals of internal medicine. [online]. 1984; 100(5): 700-701. [cit. 2020-06-21].
Dostupné z: <https://www.acpjournals.org/doi/abs/10.7326/0003-4819-100-5-700?journalCode=aim>

BOLAND C. R. 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. [online]. 1998; 58(22): 5248-5257. [cit. 2020-07-10].
Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9823339/>

BRONNER C. E., BAKER S. M., MORRISON P. T., et al. *Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary nonpolyposis colon cancer*. Nature [online]. 1994; 368: 258–61. [cit. 2020-06-22].
Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8145827/>

BÜTTNER R., FRIEDRICHS N., *Erblicher Darmkrebs bei Lynch-/HNPCC- Syndrom in Deutschland*. Der Pathologe. [online]. 2019; 40(6): 584-591. [cit. 2020-04-25].
Dostupné z https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31372733/?from_term=lynch+syndrome&from_filter=years.2013-2020&from_page=4&from_pos=1

CARETHERS J. M., STOFFEL E. M., *Lynch syndrome and Lynch syndrome mimics: The growing complex landscape of hereditary colon cancer*. World Journal of Gastroenterology [online]. 2015; 21(31): 9253-9261. [cit. 2020-04-25].

Dostupné z: <https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v21/i31/9253.htm>

CHINTALACHERUVU L. M., SHAW T., BUDDAM A., DIAB O., KASSIM T. et al., *Major Hereditary Gastrointestinal Cancer Syndromes: A Narrative Review*. J Gastrointestin Liver Dis. [online]. 2017; 26(2): 157-163. [cit.2020-05-10].

Dostupné z: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28617886/?from_term=lynch+syndrome+skin+cancer&from_page=2&from_pos=5

COLETTA A. M., PETERON S. K., GATUS L. A., KRAUSE K. J., SCHEMBRE S. M., GILCHRIST S. C., BASEN-EQUQUIST K., *Energy Balance Related Lifestyle Factors and Risk of Endometrial and Colorectal Cancer Among Individuals with Lynch Syndrome: A Systematic Review*. Familial Cancer. [online]. 2019; 18(4): 399-420. [cit.2020-05-11].

Dostupné z: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31236808/?from_term=lynch+syndrome+risk+factors&from_filter=years.2015-2020&from_pos=5

COX V. L., SAEED BAMASHMOS A. A., FOO W. C., GUPTA S., YENDURUDI S., GARG N., KANG H. C., *Lynch syndrome: Genomics Update and Imaging Review*. RadioGraphics. [online]. 2018; 38(2), 483-499. [cit.2020-04-16].

Dostupné z: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29528821/?from_term=lynch+syndrome&from_filter=years.2007-2020&from_pos=4

COFFIN E., DHOOGHE M., ABOU ALE E., DERMINE S., LAVOLE J., PALMIERI L. J., CORIAT R., *Syndrom de LYNCH identification et prise en charge*. La Presse Médicale. [online]. 2019 [cit.2020-04-18].

Dostupné z: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31561847/?from_term=bethesda+lynch+syndrome&from_pos=3

DASHTI G. S., LI Y. W., BUCHANAN D.D., CLENDENNING M., ROSTY CH., WINSHIP I. M., et al., *Type 2 diabetes mellitus, blood cholesterol, triglyceride and colorectal cancer risk in Lynch syndrome*. British Journal of Cancer. [online]. 2019; 121: 869-876. [cit.2020-05-17]. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/s41416-019-0580-9>

DAUM O. et al. *Lynchův syndrom v rukách patologa*. Cesk Patol. 2014; 50(1): 18-24 [cit.2020-06-21].

DUŠEK M., HADRAVSKÝ L., ČERNÁ K., STEHLÍK M., ŠVAJDLER M., KOKOŠKOVÁ B., DUBOVÁ M., MICHAL M., DAUM O., *Diagnóza Lynchova syndromu od patologa*. Klinická onkologie. [online]. 2016; 29(3): 180-186. [cit.2020-04-18]. Dostupné z: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27296402/?from_term=lynch+syndrome+diagnosis&from_filter=years.2015-2020&from_page=2&from_pos=6

ERGUNER B., USTEK D., SARGIROGLU M. S., *Performance comparison of Next Generation sequencing platforms*. 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. [online]. 2015; 2015:6453-6456. [cit.2020-06-29]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26737770/>

FISHEL R., LESCOE M. K., RAO M. R., et al. *The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer*. Cell. [online]. 1993; 75:1027-38. [cit.2020-06-22]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8252616/>

GARRIDO-CARDENAS J. A., GARCIA-MAROTO F., ALVAREZ-BERMEJO J. A., MANZANO-AGUGLIARO F., *DNA Sequencing Sensors: An Overview*. Sensors. [online]. 2017; 14;17(3):588. [cit.2020-06-29]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28335417/>

GIARDIELLO F. M., ALLEN J. I., AXILBUND J. E., BOLAND C. R., BURKE C. A., BURT R. W., et al. *Guidelines on genetic evaluation and management of Lynch syndrome: a consensus statement by the US Multi-Society Task Force on colorectal cancer.*

Gastroenterology. [online]. 2014; 147(2): 502-526. [cit.2020-06-21].

Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25003300/>

GOODWIN S., MCPHERSON J. D., MCCOMBIE W. R., Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet.* 2016; 17(06):333–351. [cit.2020-06-30].

HAJIRAWALA L., BARTIN J. S., *Diagnosis and Management of Lynch Syndrome.*

Department of Surgery New Orleans. [online]. 2019; 62: 403-407. [cit.2020-05-10].

Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30844969/>

HEALY M. A., THIRUMURTHI S., YOU N. Y., *Screening high-risk populations for colon and rectal cancers.* *Journal of Surgical Oncology.* [online]. 2019; 120(5): 1-6.

[cit.2020-05-17]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jso.25648>

HEATH J. A., REECE J. C., BUCHANAN D. D., CASEY G., DURNO C. A., GALLINGER S., WIN A. K., *Childhood cancers in families with and without Lynch syndrome.* *Familial Cancer.* [online]. 2015; 14(4): 545-551. [cit.2020-05-11].

Dostupné z: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25963852/?from_term=lynch+syndrome+nervous+system&from_filter=years.2011-2020&from_pos=2

HORN C., SALZMAN J., *Molecular sampling at logarithmic rates for next-generation sequencing.* *PLoS Comput Biol.* [online]. 2019; 15(12):e10007537. [cit.2020-06-29].

Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31830035/>

HUANG L., YANG Y., YANG F., LIU S., ZHU Z., & GUO J., *Functions of EpCAM in physiological processes and diseases.* *International Journal of Molecular medicine.* [online]. 2018; 42: 1771-1785. [cit.2020-04-12].

Dostupné z: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30015855/?from_term=EPCAM+gene&from_filter=years.2014-2020&from_pos=1

HUI P., *Next-generation sequencing: chemistry, technology and application*. Top Curr Chem 2014; 336:1–18, [cit.2020-04-12].

KARGER A. E., HARRIS J. M., GESTELAND R. F., *Multiwavelength Fluorescence Detection for DNA Sequencing Using Capillary Electrophoresis*. Nucleic Acids Res. [online]. 1991; 25;19(18): 4955-4962. [cit.2020-06-29].

Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1923763/>

KOHLMANN W., GRUBER S. B., *Lynch Syndrome*, GeneReviews. [online]. 2004. [cit.2020-05-11]. ISSN: 2372-0697.

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK1116/>

KUFE D. W., POLLOCK R. E., W. et al. *Holland-Frei Cancer Medicine, 6 th edition*. BC Decker [online]. 2003; 266-271. [cit. 2020-02-18]. ISBN: 1-55009-213-8.

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12469/#>

KUMAR K. R., COWLEY M. J., DAVIS R. L., *Newt-Generation Sequencing and Emerging Technologies*. Semin Thromb Hemost. [online]. 2019; 45:661-673. [cit. 2020-06-30].

Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31096307/>

KUNICKÁ T., PROCHÁZKA P., KRUS I. et al., *Molecular profile of 5-fluoroacil pathway genes in colorectal carcinoma.*, BMC Cancer. [online]. 2016, 16:795. [cit.2020-06-13].

Dostupné z: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-016-2826-8>

LAMTURE J.B., LBEATTIE K., BURKE B. E., EGGERS M. D., et al. Direct detection of nucleic acid hybridization on the surface of a charge coupled device. Nucleic Acids. [online]. 1994; 22(11): 2121–2125. [cit.2020-06-29].

Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8029021/>

LE S., ANSARI U., MUMTAZ A., MALIK K., PATEL P., DOYLE A., KHACHEMOUNE A., *Lynch Syndrome and Muir-Torre Syndrome: An update and review on the genetics, epidemiology, and management of two related disorders*. *Dermatology Online Journal*. [online]. 2017; 23(11): 1-9. [cit. 2020-05-10].

Dostupné z: <https://escholarship.org/uc/item/8sg5w98j>

LIM A., RAO P., MATIN S. F., *Lynch syndrome and urologic malignancies: a contemporary review*. *Wolters Kluwer Health* [online]. 2019; 29(4): 357-363. [cit. 2020-05-03].

Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31045926/>

LYNCH T., HENRY M.D., DE LA CHAPELLE A. M. D. *Hereditary Colorectal Cancer*. *Genomic Medicine*. [online]. 2003; 919-932 [cit. 2020-02-08].

Dostupné z: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra012242>

LYNCH T., HENRY M.D., LYNCH F. JANE BSN, ATTARD A. THOMAS MD. *Diagnosis and management of hereditary colorectal cancer syndromes: Lynch syndrome as a model*.

CMAJ [online]. 2009; 181(5): 273–280 [cit. 2020-02-08]. Dostupné z:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2734205/>

LYNCH T., SNYDER C. L., SHAW T. G., HEINEN C. D., HITCHINS M. P., *Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015*. *Nature Reviews Cancer*. [online]. 2015; 15(3), 181-194.

[cit. 2020-04-28].

Dostupné z: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25673086/?from_term=lynch+syndrome&from_filter=years.2012-2020&from_pos=2

METCALFE M. J., PETROS G. F., RAO P., MORK E. M., XIAO L., BROADDUS R. R., MATIN F. S., *Universal Point of Care Testing for Lynch syndrome in Patients with Upper Tract Urothelial Carcinoma*. *Journal of Urology*. [online]. 2018; 199(1): 60-65.

[cit. 2020-02-20]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28797715/>

MITCHELL R. J., FARRINGTON SM, DUNLOP MG, *Campbell H. Mismatch Repair Genes nMLH1 and hMSH2 and Colorectal Cancer*. American Journal of Epidemiology [online]. 2002; 156(10): 885-902. [cit. 2020-02-20].

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12419761>

MLKVÁ I. *Genetika tumorigenézy nádorov kolorekta (možnosti testovania a screeningovej predikcie dedičnej formy ochorenia – Lynchovho syndrómu)*. Klinická onkologie, Supplementum [online]. 2016; 55-61. [cit. 2020-02-08].

Dostupné z: <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/200/4879.pdf>

MOELANS C. B., DE WEGER R. A., VAN BLOKLAND M. T., et al. *Simultaneous detection of TOP2A and HER2 gene amplification by multiplex ligation-dependent probe amplification in breast cancer*. Mod Pathrol. [online]. 2010; 23:62-70. [cit. 2020-06-28].

Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19767729/>

MOELANS C. B., ATANESYAN L., SAVOLA S. P., VAN DIEST, P. J. *Methylation-Specific Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MS-MLPA)*. DNA Methylation Protocols. [online]. 2017; 537–549. [cit. 2020-06-28].

Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29224162/>

MOREIRA L., BALAGUER F., LINDOR N., et al. *Identification of Lynch syndrome among patients with colorectal cancer*. JAMA. [online]. 2012; 308: 1555–65. [cit. 2020-06-21].

Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23073952/>

MULLIKIN J. C., MCMURRAGY A. A., *Techview: DNA Sequencing the Genome, Fast*. Science. [online]. 1999; 19;283(5409): 1867-1869. [cit. 2020-02-29].

Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10206892/>

MØLLER P., SEPPÄLÄ T., BERNSTEIN I., et al., *Cancer incidence and survival in Lynch syndrome patients receiving colonoscopic and gynecological surveillance: first report from the prospective Lynch syndrome database*. Gut. [online]. 2017; 66: 464-472. [cit. 2020-02-08].

Dostupné z: <https://gut.bmj.com/content/66/3/464>

NISKAKOSKI A., KAUR S., RENKONEN-SINISALO L., LASSUS H., JÄRVINEN H., MECKLIN J. P., BÜTZOW R., PELTOMÄKI P., *Distinct molecular profiles in Lynch syndrome-associated abd sporadic ovarian carcinomas*. International Journal of Cancer. [online]. 2013; 133: 2596-2608. [cit. 2020-05-04].

Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23716351/?dopt=Abstract>

NOJADEH N. J., SHARIF S. B., SAKHINIA E., *Microsatellite instability in colorectal cancer*, Excli Journal [online]. 2018; 17: 159-168 [cit. 2020-02-22].

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5938532/>

Oncology - Lynch Syndrome; Researchers from German Cancer Research Center Describe Findings in Lynch Syndrome (Prevalence of Lynch syndrome in unselected patients with endometrial or ovarian cancer). Women's Health Weekly [online]. 2016; 4201.

[cit. 2020-02-08]. ProQuest Central. ISSN 10787240.

PELLAT A., NETTER J., PERKINS G., COHEN R., COULET F., PARC Y. et al. *Syndrom de Lynch: quoi de neuf?* Bulletin Du Cancer. [online]. 2018. [cit.2020-04-18].

Dostupné z: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30527816/?from_term=amsterdam+lynch+syndrome&from_filter=years.2013-2020&from_pos=3

PELTMÄKI P., VASEN H., *Mutations associated with HNPCC predisposition - Update of ICG-HNPCC/INSiGHT mutation database*. Dis Markers [online]. 2004; 20: 269–76.

[cit.2020-02-14]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3839397/>

PLEVOVÁ P., NOVOTNÝ J., ŠACHLOVÁ M., KŘEPELOVÁ A., FORETOVÁ L. *Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom*. Klinická onkologie, Supplementum [online]. 2009; 12-15 [cit. 2020-02-08].

Dostupné z: <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/149/3443.pdf>

PLEVOVÁ P. *Nové poznatky o geneticky podmíněných nádorech tlustého střeva a polypózách gastrointersticionálního traktu*. Klinická onkologie, Supplementum [online].

2019; 97-108 [cit. 2020-02-08]. Dostupné z <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/459.pdf>

POATY H., ABA GANDZION C., SOUBEYRAN I., GASSAYE D., PEKO J. F., NKOUBON J. B., GOMBÉ MBALAWA C., *The identification of Lynch syndrome in Colongolese colorectal cancer patients*. Bulletin Du Cancer. [online]. 2017; 104(10), 831-839.

[cit. 2020-04-19].

Dostupné z: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28988047/?from_term=bethesda+lynch+syndrome&from_pos=9

RATH A., MISHRA A., FERREIRA V.D., HU C., OMERZA G., *Functional Interrogation of Lynch Syndrome Associated MSH2 Missense Variants via CRISPR-Cas9 Gene Editing in Human Embryonic Stem Cells*. Wiley Periodicals [online]. 2019; 40: 2044–2056.

[cit.2020-04-11]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31237724>

RODRIGUEZ-BIGAS M. A. et al. *A National Cancer Institute workshop on hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: meeting highlights and Bethesda Guidelines*.

J. Natl Cancer Inst. [online]. 1997; 89(23): 1758-1762. [cit.2020-07-10].

Dostupné z: <https://academic.oup.com/jnci/article/89/23/1758/2526544>

RYAN N. A. J., BLAKE D., CABRERA-DANDY M., GLAIRE M. A., EVANS D. G., CROSBIE E. I., *The prevalence of Lynch syndrome in women with endometrial cancer: a systematic review protocol*. Systematic Reviews. [online]. 2018; 7(121): 1-6.

[cit.2020-05-07].

Dostupné z: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30115102/?from_term=lynch+syndrome+diagnosis&from_filter=years.2015-2020&from_page=3&from_pos=2

RYAN S., JENKINS M. A., WIN A. K., *Risk of prostate cancer in Lynch syndrome: a systematic review and meta-analysis*. Cancer Epidemiol Biomark Prev. [online]. 2014; 23(3):437–449 [cit.2020-06-21].

Dostupné z: <https://cebp.aacrjournals.org/content/23/3/437>

SCHNEIDER R., FURST, A., & MOSLEIN, G., *Das Lynch-Syndrom – Epidemiologie, Klinik, Genetik, Screening, Therapie*. Zeitschrift Für Gastroenterologie. [online]. 2012; 50(02), 217–225. [cit.2020-04-27].

Dostupné z: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22298102/?from_term=lynch+syndrome+manifestation&from_filter=years.2012-2020&from_pos=8

SCHNEIDER R., FURST, A., & MOSLEIN, G., *Genderspezifische Aspekte des Lynch-Syndroms- Ein Update*. Zeitschrift Für Gastroenterologie. [online]. 2015; 53(08), 789-793. [cit. 2020-04-27].

Dostupné z: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0035-1553343>

SCHNITZLER M., WARUSAVITARNE J. *The role of chemotherapy in microsatellite unstable (MSI-H) colorectal cancer*. Int J Colorectal. [online]. 2007; 22: 739-748. [cit. 2020-02-22]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17109103>

SCHOUTEN J. P., MCELGUNN C. J., WAAJIER R., et al. *Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligationdependent probe amplification*. Nucleic Acids. [online]. 2002; 30(12): e57. [cit. 2020-06-28].

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC117299/>

SCHOUTEN J., VAN VUGHT P., GALJAARD R. J., *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) for Prenatal Diagnosis of Common Aneuploides*. Methods of Molecular Biology. [online]. 2019; 1885: 161-170. [cit. 2020-06-28].

Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30506197/>

SEPPÄLÄ T. T., PYLVÄNÄINEN K., MECKLIN J.-P., *Uptake of genetic testing by the children of Lynch syndrome variant carriers across three generations*. European Journal of Human Genetics. [online]. 2017; 25(11): 1237-1245. [cit. 2020-05-10].

Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/ejhg2017132.pdf?origin=ppub>

SEPPEN J., BRUZZONE L., *Lynch syndrome: the patients perspective*. Familial Cancer. [online]. 2013; 12(2), 341-345. [cit. 2020-04-27].
Dostupné z: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23532831/?from_term=lynch+syndrome+manifestation&from_filter=years.2012-2020&from_pos=4

SETAFFY L., LANGNER C., *Microsatellite instability in colorectal cancer: clinicopathological significance*. Pol J Pathol. 2015; 66:203–218. [cit. 2020-06-22].
Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26619098/>

SINICROPE A. F. *Lynch Syndrome – Associated Colorectal Cancer*. The New England Journal of Medicine. [online]. 2018, 379(8): 764-773 [cit. 2020-02-10].
Dostupné z: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMcp1714533>

STEMBALSKA A., KLAPECKI J., KARPINSKI P., *In-silico analysis of Thr767Ile pathogenic variant in the MSH6 gene in family with endometrial cancer*. European Journal Of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. [online]. 2019; 238: 54-57.[cit.2020-04-11]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31100584>

STOFFEL E. M., WALSH C., *Chemoprevention of Endometrial Cancer in Lynch Syndrome: A Stop Forward*. Cancer Prevention Research. [online]. 2013; 6(8), 755-759.[cit.2020-04-28].
Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23842794/>

STRAND M., PROLLA T. A., LISKAY R. M., et al. *Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair*. Nature [online]. 1993; 365:274–6. [cit.2020-06-21].
Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8371783/>

TAKEDA T., TSUJI K., BANNO K., YANOKURA M., KOBAYASHI Y., TOMINAGA E., AOKO D., *Screening for Lynch syndrome using risk assessment criteria in patients with ovarian cancer*. Journal of Gynecologic Oncology. [online]. 2018; 29(3), 1-12. [cit.2020-04-30].

Dostupné z: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29400022/?from_term=lynch+syndrome&from_filter=years.2011-2020&from_page=3&from_pos=8

TUTLEWSKA K., LUBINSKI J., KURZAWSKI G., *Germline deletions in the EPCAM gene as a cause of Lynch syndrome – literature review*. Hereditary Cancer in Clinical Practice. [online]. 2013; 11(1): 1-6. [cit.2020-04-12].

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3765447/>

UMAR A., BOLAND C. R., TERDIMAN J. P. et al. *Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability*. J Natl Cancer Inst. [online]. 2004; 96(4): 261–268. [cit.2020-06-21].

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2933058/>

VAINSFELD A., CALICCHIA M., POMPONI M. G., LUCCI-CORDISCO E., REGGIANI-BONETTI L., GENUARDI M., *Lynch syndrome with exclusive skin involvement: time to consider a molecular definition?* Familiar Cancer. [online]. 2019; 18(4): 421-427. [cit.2020-05-10].

Dostupné z: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31292797/?from_term=lynch+syndrome+skin+cancer&from_pos=7

VASEN H. F., MECKLIN J. P., KHAN P. M. et al. *The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC)*. Dis Colon Rectum. [online]. 1991; 34(5): 424-425. [cit.2020-07-15].

Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2022152/>

VASEN H. F., WATSON P., MECKLIN J. P. et al. *New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPSS, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC*. *Gastroenterology*. [online]. 1999; 116(6): 1453-1456. [cit.2020-07-10].

Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10348829/>

VASEN H. F. et al. *Guidelines for the clinical management of familiar adenomatous polyposis (FAP)*. *Practice Guideline*. [online]. 2008; 57(5): 704-713. [cit.2020-07-10].

Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18194984/>

VERMA M., KILSHRESTHA S., PURI A., *Genome Sequencing*. *Methods Mol Biol*. [online]. 2017; 1525: 3-33. [cit.2020-06-30].

Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27896715/>

WARD R. L., DOBBINS T., LINDOR N. M., RAPKINS R. W., HITCHINS M. P., *Identification of constitutional MLH1 epimutations and promoter variants in colorectal cancer patients from the Colon Cancer Family Registry*. *Genet Med*. [online]. 2013; 15:25–35. [cit.2020-06-30].

Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22878509/>

WARTHIN, A. S. *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.* [online]. 1913; 12: 546–555. [cit.2020-06-21].

Dostupné z: <https://jamanetwork.com/journals/jamainternalmedicine/article-abstract/653640>

WIN K. A., LINDOR M. N., JENKIS M. A., *Risk of breast cancer in Lynch syndrome: a systematic review*. *Breast Cancer Research*. [online]. 2013; 15(2): 1-9. [cit.2020-05-04].

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3672741/>

YAMAMOTO H., IMAI K., *Microsatellite instability: An update*. *Arch Toxicol*. [online]. 2015; 89:899–921. [cit.2020-06-22].

Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25701956/>

YURGELUN M. B., HAMPEL H., *Recent Advances in Lynch Syndrome: Diagnosis, Treatment and Cancer Prevention*. American Society of Clinical Oncology Education Book. [online]. 2018; 38, 101-109. [cit.2020-04-25].

Dostupné z: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30231390/?from_term=lynch+syndrome&from_filter=years.2013-2020&from_pos=7

YURGELUN M. B., ALLEN B. et. al., *Identification of a Variety of Mutations in Cancer Predisposition Genes in Patients with Suspected Lynch Syndrome*. *Gastroenterology*. [online]. 2015; 149(3): 604-613. [cit.2020-05-03].

Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25980754/>

YURGELUN M. B., KULKE MH, FUCHS CS, et al. *Cancer susceptibility gene mutations in individuals with colorectal cancer*. *J Clin Oncol*. [online]. 2017; 35:1086–95. [cit.2020-05-03].

Dostupné z: http://oncocrc.org/assets/pdf/volume1/06Syllabus_4.pdf