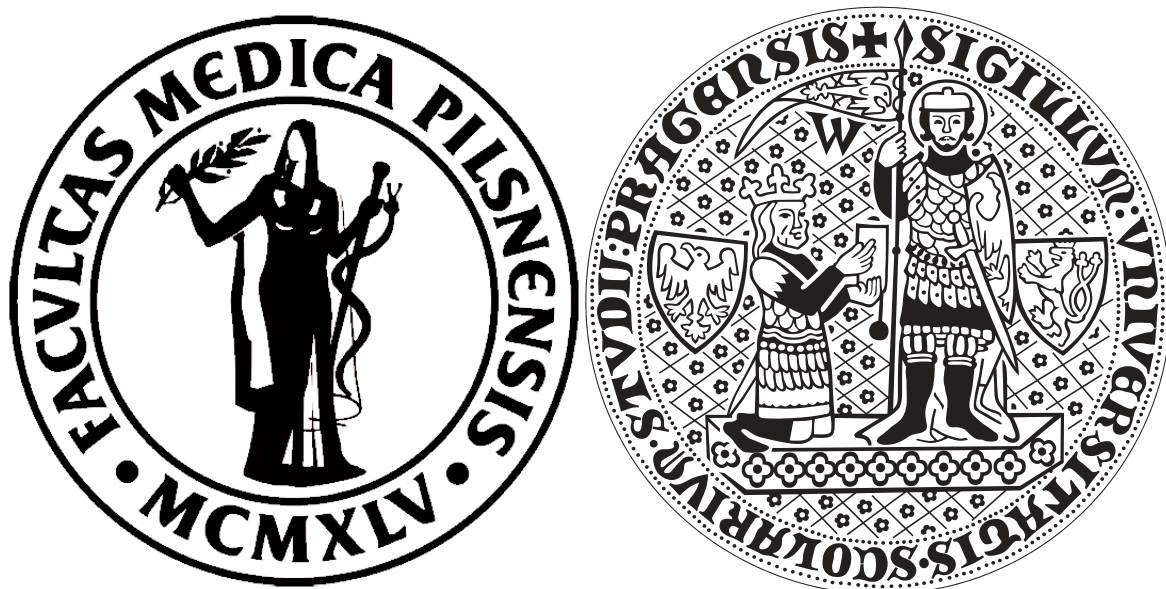


**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE,
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI**

ŠIKLŮV ÚSTAV PATOLOGIE



**Management morfoloické diagnostiky molekulárně-geneticky
definovaných tumorů trávicího traktu**

MUDr. BOHUSLAVA VAŇKOVÁ

Doktorská disertační práce

Plzeň 2021

Obor: Patologie

Školitel: prof. MUDr. Ondřej Daum, Ph.D.

Abstrakt

Disertační práce „Management morfologické diagnostiky molekulárně-geneticky definovaných tumorů trávicího traktu“ je komentovaným souborem celkem osmi publikovaných prací (čtyři původní práce uveřejněné v anglické literatuře v časopisu s impact factorem, jeden dopis editorovi v anglickém jazyce, též v časopisu s impact factorem, a tři práce v českém jazyce publikované v tuzemských recenzovaných periodikách, z čehož dvě práce přehledové a jedna práce původní).

V současnosti do klasifikací různých nádorových jednotek výrazně vstupuje molekulární genetika, která se u některých dokonce stává neodmyslitelnou integrální součástí diagnostického algoritmu a molekulárně-genetické rysy jednotlivých nádorů tak lze jen obtížně pominout. V patologii proto vedle sebe nacházíme klasifikace založené čistě na morfologických znacích, klasifikace naopak využívající především molekulárně-genetické znaky (např. klasifikace centrálního nervového systému, hematologických malignit), ale i klasifikace oba rysy kombinující (část renálních neoplázií). Pro praktickou medicínu je však vždy nutné najít průsečík obou přístupů tak, aby byla zajištěna správná a kompletní diagnóza u pacienta.

Většina nádorů gastrointestinálního traktu (GIT) je klasifikována na podkladě morfologie, část za přispění imunohistochemického profilu, zatímco léze a nádory GIT definované čistě molekulárně-geneticky jsou absolutní raritou. Molekulárně-genetické vyšetření je tak u nádorů GIT využíváno celkem ve třech oblastech: 1) pro určení diagnózy (vzácně), 2) v prediktivní diagnostice, 3) k diagnostice hereditárních nádorových onemocnění. Je evidentní, že velký rozmach molekulární genetiky v nejbližší době nenahradí klasický morfologický přístup a molekulární genetika se tak stane pouze integrální součástí jak diagnostického, tak prediktivního přístupu k jednotlivým lézím. Nádorové jednotky definované pouze na podkladě molekulárně-genetických znaků jsou a nejspíše i budou vzácné a čistě genetický přístup k diagnostice, alespoň v nejbližších letech, nebude ten hlavní.

Abstract

The dissertation called “Management of morphological diagnostics of molecularly-genetically defined tumors of the digestive tract” is an annotated file of a total of eight published works (four original works published in an English literature in an impact-factor journal, one letter to an editor in English language also having an impact factor, and three works in Czech language published in domestic reviewed journals: two of these are reviews of the literature, one is an original work).

Currently, molecular genetics is significantly entering the classifications of different tumor units and in some units it is undoubtedly becoming an integral part of the diagnostic algorithm; as a result molecular genetic traits of individual tumors are hardly to be ignored. In contemporary pathology, at the same time you may find the classifications based exclusively on morphological traits, but also the classifications mostly using molecularly-genetic traits (e.g. the classification of the central nervous system or hematological malignancies), as well as the classifications combining the both traits (part of renal neoplasia). For practical medicine it is however always necessary to find an intersection of the both approaches to ensure the correct and complete diagnosis for a patient.

Most tumors, especially those of gastrointestinal tract (GIT), are classified on the basis of morphology, another part with the help of immunohistochemical profile of the lesion, but GIT-tumors defined exclusively on the basis of molecular genetics are rather rare. And so the molecularly-genetic examination regarding GIT-tumors is used in total in three areas: 1) to determine the diagnosis (rarely), 2) for predictive diagnostics, 3) to diagnose hereditary tumors. It is however evident that in the near future, despite the great boom of the molecular genetics, the classical morphological approach will not be replaced, and the molecular genetics will become a mere integral part of both the diagnostic and the predictive approach to individual lesions. Based on the molecular-genetic traits, the defined tumor units are and probably will be rare, and an exclusive genetic approach to the diagnostics, at least in the years to come, will not be the main one.

Předmluva

Doktorská disertační práce je komentovaným souborem publikovaných prací, které se zaobírají implementací molekulární genetiky do diagnostiky lézí gastrointestinálního traktu, na kterých se autorka podílela buď jako hlavní autor či jako členka autorských kolektivů. Práce je psána z pohledu patologa, tedy oboru specializace autorky, čímž však autorka nechce upozadovat ostatní odbornosti ani si přivlastňovat zásluhy a myšlenky spoluautorů. V práci jsou zahrnuty celkem čtyři původní práce v anglickém jazyce (publikované v časopisech s impact factorem) a dvě přehledové a jedna původní práce v českém jazyce (práce publikovány v recenzovaných českých a slovenských periodikách). Práce jsou krátce představeny úvodem v českém jazyce, následuje vložený reprint v jazyce publikace. Závěrem je komentován význam provádění molekulárně-genetických vyšetření v rámci patologické diagnostiky gastrointestinálního traktu.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi UK LF Plzeň.

V Plzni, 21. června 2021

Bohuslava Vaňková

Poděkování

Prof. MUDr. Ondřeji Daumovi, Ph.D. - svému školiteli, za odborné vedení.

Prof. MUDr. Michalu Michalovi – za podporu a poskytnuté zázemí.

Kolektivu Šiklova Ústavu Patologie a Bioptické laboratoře s.r.o. za poskytnuté zázemí.

Obsah

1	Úvod	8
1.1	Incidence nádorů trávicího traktu a základní statistická data	8
1.2	Klasifikace nádorů trávicího traktu	9
1.3	Přímé využití molekulárně-genetických metod pro určení diagnózy	10
1.3.1	Gastrointestinální stromální tumor	10
1.3.2	Gastroblastom	11
1.3.3	Fibrolamelární hepatocelulární karcinom	12
1.4	Molekulárně genetické metody a prediktivní diagnostika	12
1.5	Molekulárně-genetické metody využívané ke screeningu hereditárních nádorových onemocnění	14
1.5.1	Lynchův syndrom (Lynch Syndrome/LS)	15
1.5.2	Familiální adenomatózní polypóza (Familial Adenomatous Polyposis / FAP)	16
1.5.3	<i>MUTYH</i> -asociovaná polypóza (<i>MUTYH</i> -Associated Polyposis/MAP)	16
1.5.4	<i>NTHL1</i> -asociovaná polypóza (<i>NTHL1</i> -associated polyposis/NAP)	17
1.5.5	Polypóza spojená s opravnou funkcí polymerázy (Polymerase proofreading-associated polyposis/PPAP)	17
1.5.6	Peutz-Jeghersův syndrom (Peutz-Jeghers Syndrome/PJS)	17
1.5.7	Syndrom juvenilní polypózy (Juvenile Polyposis Syndrome/JPS)	18
1.5.8	Syndrom Cowdenové (Cowden syndrome/CS)	18
1.5.9	Hereditární difúzní karcinom žaludku (hereditary diffuse gastric cancer/HDGC)	18
1.5.10	Adenokarcinom žaludku a proximální polypóza (Gastric adenocarcinoma and proximal polyposis/GAPPS)	19
2	Cíle prací	20
3	Výsledky	21
3.1	Thread-like bridging strands in the adenomatoid tumor of the small intestine	21
3.2	Utility of immunohistochemical investigation of SDHB and molecular genetic analysis of SDH genes in the differential diagnosis of mesenchymal tumors of GIT	23
3.3	Nonsyndromic intestinal lipomas are probably not associated with mutations of <i>PDGFRA</i>	34
3.4	Morphological features useful in the differential diagnosis between undifferentiated carcinoma and gastrointestinal stromal tumor	39
3.5	Targeted next generation sequencing of <i>MLH1</i> -deficient, <i>MLH1</i> promoter hypermethylated, and <i>BRAF/RAS</i> -wild-type colorectal adenocarcinomas is effective in detecting tumors with actionable oncogenic gene fusions	46
3.6	Moderní diagnostika Lynchova syndromu	54
3.7	Výsledky morfologické depistáže Lynchova syndromu v období 2013-2016	64
3.8	Diagnóza Lynchova syndromu od patologa	72
4	Závěr	80
5	Seznam použité literatury	82
6	Publikace	88
6.1	Publikace autorky, které jsou podkladem disertační práce	88
6.2	Publikace autorky se vztahem k tématu disertační práce	89
6.3	Publikace autorky bez vztahu k tématu disertační práce	90
6.4	Prezentace na vědeckých konferencích	92

Seznam použitých zkratek

AFAP	Atenuovaná forma familiální adenomatózní polypózy (attenuated Familial Adenomatous Polyposis)
CS	Syndrom Cowdenové (Cowden syndrome)
GAPPS	Syndrom adenokarcinomu žaludku a proximální polypózy (Gastric adenocarcinoma and proximal polyposis syndrome)
FAP	Familiální adenomatózní polypóza (Familial Adenomatous Polyposis)
ESS	Endometriální stromální sarkom
GIST	Gastrointestinální stromální tumor
GIT	Gastrointestinální trakt
GS	Schwannom žaludku (gastric schwannoma)
HDGC	Hereditární difúzní karcinom žaludku (hereditary diffuse gastric cancer)
IMT	Inflamatorní myofibroblastický tumor
JPS	Syndrom juvenilní polypózy (Juvenile Polyposis Syndrome)
LM	Leiomyom
LMS	Leiomyosarkom
NAP	<i>NTHL1</i> -asociovaná polypóza (<i>NTHL1</i> -associated polyposis)
MAP	<i>MUTYH</i> -asociovaná polypóza (<i>MUTYH</i> -Associated Polyposis)
PJS	Peutz-Jeghersův syndrom (Peutz-Jeghers Syndrome)
PPAP	Polypóza spojená s opravnou funkcí polymerázy (Polymerase proofreading-associated polyposis)
SDH	Sukcinát dehydrogenáza
SDHx	Souhrnné vyjádření pro geny kódující jednotlivé podjednotky SDH
SFT	Solitární fibrózní tumor
SS	Synoviální sarkom
ÚZIS	Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR

1 Úvod

1.1 Incidence nádorů trávicího traktu a základní statistická data

Tumory trávicího traktu jsou relativně heterogenní skupinou neoplázií, což je dáno jak postižením celé řady různých orgánů, tak i vlastním histologickým spektrem v rámci jednotlivých orgánů. Ve statistikách pak nádory trávicího traktu (a zejména gastrointestinálního traktu/GIT) představují výrazný činitel, jedná se o nádory v našich zeměpisných šířkách postihující relativně velké množství pacientů – zhoubné novotvary tlustého střeva a konečníku řadí Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR (ÚZIS) společně se zhoubnými nádory prostaty, prsu u žen a průdušnice, průdušky a plic k nejčastěji se v naší populaci vyskytujícím maligním nádorům. Zhoubné nádory tlustého střeva a konečníku (C18-C20) představují druhou nejčastější nově diagnostikovanou malignitu u mužů i žen (v roce 2017 dle ÚZIS v ČR 12,5 % všech nových případů), incidence zhoubných novotvarů tlustého střeva a konečníku je vysoká (69,3/100 000 osob) s převahou pacientů ve věku nad 60 let. (1).

V rámci celorepublikových statistik jsou však významnými činiteli i další neoplázie vyskytující se v trávicím systému. Kompletní statistická data týkající se současných epidemiologických trendů v rámci novotvarů v ČR jsou dostupná na webových stránkách ÚZIS (1), zde prezentujeme neoplázie trávicího systému pouze v krátkém přehledu. Zhoubný novotvar jícnu (C15) je nádor s převažujícím postižením mužů a prokázanou incidencí 6,2/100 000 osob a 16. nejčastější příčinou úmrtí v roce 2017. Zhoubné novotvary žaludku (C16) mají v populaci incidenci 13,2/100 000 osob a v rámci onkologických diagnóz jsou 7. nejčastější příčinou úmrtí. U zhoubných novotvarů jater a intrahepatálních žlučových cest (C22) je udávána incidence 9,1/100 000 osob, převládají pacienti nad 60 let a křivka úmrtnosti kopíruje křivku incidence, v rámci onkologických diagnóz představují 9. nejčastější příčinou úmrtí v roce 2017. Zhoubný novotvar žlučníku a žlučových cest (C23, C24) se v ČR vyskytuje s incidencí 7,2/100 000 osob (2017), jedná se o nádorové onemocnění, které bylo v roce 2017 13. nejčastější příčinou úmrtí. Zhoubný novotvar slinivky břišní (C25) má dlouhodobě narůstající incidenci a v roce 2017 bylo toto onemocnění 7. nejčastěji diagnostikovaným novotvarem s incidencí 21,0/100 000 osob, mortalita v rámci onkologických diagnóz činní zhoubný novotvar slinivky 3. nejčastější příčinou úmrtí v roce 2017.

1.2 Klasifikace nádorů trávicího traktu

Klasifikace nádorů trávicího traktu se stejně jako u všech orgánových soustav opírá o WHO klasifikaci. Vznik každé WHO klasifikace předchází publikace četných dílčích studií, jejich validace následnými studiemi, komparativní metaanalýzy a hlavně dosažení širšího konsenzu mezi autory jednotlivých kapitol. V současné době využíváme pro klasifikaci nádorů GIT 5. edici WHO klasifikací (tzv. „Blue books“). 5. edice je v mnohých aspektech odlišná od edicí předcházejících, avšak základní koncept zůstává, je obohacen o data z molekulární genetiky.

Obecně lze říci, že do moderních klasifikací různých nádorových jednotek vstupuje v současné době velmi často a výrazně molekulární genetika, která se u některých jednotek stává neodmyslitelnou integrální součástí diagnostického algoritmu a molekulárně-genetické rysy jednotlivých nádorů tak lze jen obtížně pominout. V současné patologii tak nacházíme vedle sebe klasifikace založené čistě na morfologických znacích, klasifikace naopak využívající především molekulárně-genetické znaky (např. klasifikace centrálního nervového systému, hematologických malignit), ale i klasifikace oba rysy kombinující (část renálních neoplázií). Pro praktickou medicínu je však vždy nutné najít průsečík obou přístupů tak, aby v nutných případech a v případech, kdy má aplikace obou charakteristik své opodstatnění, bylo možné využít nejlépe kombinace obou přístupů a tím byla zajištěna správná a kompletní diagnóza u pacienta.

Ve všech odvětvích patologie se každý rok nově setkáváme s řadou jednotek/variant neoplázií definovaných zejména molekulárně-geneticky, současně však není možné tento přístup, aplikaci a diagnostiku pouze na podkladě molekulárně-genetických výsledků, beze zbytku přijmout, ale je třeba hledat optimální kombinaci všech dostupných diagnostických prostředků. Vždy při indikaci jakéhokoli vyšetření patologem je nutné vzít v úvahu časovou náročnost, cenu vyšetření, reprodukovatelnost vyšetření, korelaci s klinickým chováním a léčebné možnosti současné medicíny.

Vlastní klasifikace nádorů trávicího traktu je heterogenní, což je především dáno spektrem orgánů, ve kterých nádory vznikají. Tím se pak klasifikace může zdát komplikovanou. Zjednodušeně lze však říci, že většina nádorů trávicího traktu je klasifikována na podkladě morfologie, část za přispění imunohistochemického profilu léze, zatímco nádory GIT definované molekulárně-geneticky jsou spíše raritou.

Z praktického pohledu lze metodiku klasifikace nádorů trávicího traktu, kde molekulárně-genetické metody hrají zásadní roli, rozdělit do několika skupin:

Přímé využití molekulárně-genetických metod pro určení diagnózy
Molekulárně-genetické metody a prediktivní diagnostika
Molekulárně-genetické metody využívané ke screeningu hereditárních nádorových onemocnění

Je jasné, že diagnostická molekulární genetika se často překrývá s molekulární genetikou prediktivní. Zvláštní skupinou jsou pak nádory hereditární a jejich depistáž.

1.3 Přímé využití molekulárně-genetických metod pro určení diagnózy

1.3.1 Gastrointestinální stromální tumor

Gastrointestinální stromální tumor (GIST) je do jisté míry heterogenní skupinou nádorů s poměrně širokým spektrem morfologických obrazů a relativně typickým imunohistochemickým a molekulárně-genetickým profilem. Význam provedení molekulárně-genetických analýz u GIST v sobě snoubí potřeby diagnózy, predikce a detekce syndromových pacientů.

V rámci histologické diagnostiky dokáže morfologie GIST být často značně matoucí (spektrum morfologických obrazů zahrnuje vřetenobuněčné tumory, nádory spíše s epiteloidním vzhledem buněk i smíšené formy). Zhruba 5 % GISTů je imunohistochemicky CD117/DOG1 negativních (při užití obou markerů je negativních cca. 2,6 % GISTů (2)), u pacientů s morfologicky a imunohistochemicky nejistou diagnózou je pak pro správné zařazení neoplázie genetická analýza absolutně nevyhnutelná (3). Více jak 99 % všech GISTů vykazuje genetickou či epigenetickou alteraci, jen malé množství případů zůstává geneticky nezařazeno (4). Nejčastější genetickou alterací je „gain-of-function“ mutace genu *KIT*, která byla v různých studiích detekována v 80-85 % případů (3, 5, 6).

Z klinického hlediska je hlavním účelem molekulárně-genetického vyšetření GIST predikce odpovědi na cílenou léčbu inhibitory receptorových tyrozinkináz, respektive snaha detekovat případnou přítomnost mutací asociovaných s rezistencí vůči cílené terapii (7). Objevení aktivační *KIT* mutace v GIST v roce 1998 (5) spustilo novou éru v možnostech využití molekulárně-genetické diagnostiky pro řízení cílené léčby u postižených pacientů (4). Mutace *KIT* a *PDGFRA* představují změny detekovatelné u 85-90 % GISTů (8), avšak 12-15 % GISTů u adultních pacientů a 90 % pediatrických GISTů nevykazuje abnormality ani v *KIT* ani v *PDGFRA* (9) (tzv. GIST wild type (10)). Rozsáhlé genetické studie pak vedly k objevení abnormalit i v jiných genech (*SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *BRAF*, *NF1* atd.). Významnou informací je též fakt, že imunohistochemická pozitivita CD117 a DOG1 je independentní na mutačním statutu *KIT* a *PDGFRA* (11, 12), což jen dále potvrzuje nutnost provádění molekulárně-genetického vyšetření u těchto tumorů (10).

Současná klasifikace rozděluje GISTy do dvou základních skupin (na podkladě imunohistochemické reaktivity s protilátkou proti beta podjednotce enzymu sukcinátdehydrogenázy - SDHB): SDH kompetentní/pozitivní a SDH deficientní. SDH deficientní GISTy bývají syndromatické či familiární u více jak 90 % pacientů a imatinib

vykazuje u těchto nádorů limitovaný efekt (4). SDH deficiencie bývá podmíněna mutacemi genů některé z podjednotek sukcinátdehydrogenázy či hypermetylací promotoru genu *SDHC*. Mezi syndromy asociované s SDH deficientními GISTy je řazen hereditární Carney-Stratakis syndrom charakterizovaný germinální mutací některé z podjednotek SDH enzymatického komplexu. Klinicky se manifestuje diádou sestávající z familiárního paragangliomu a GISTu. Hypermetylace promotoru genu *SDHC* (jen v limitovaném množství případů byla též popsána germinální mutace genů *SDHx* (13)) je molekulárním podkladem non-hereditárního syndromu Carneyho triády (4, 10), který je asociován s rozvojem GISTu, pulmonárního chondromu a paragangliomu. Hypermetylace promotoru genu *SDHC* je též přítomna u většiny pediatrických wild-type GISTů (4). Celkově však molekulárně-genetické vyšetření *SDHx* nemá prediktivní či diagnostický význam a proto i imunohistochemické vyšetření protilátkou SDHB v současné době zcela nepatří do rutinního diagnostického algoritmu GIST. Vzhledem k časté syndromologické asociaci však má význam pro genetické poradenství a proto ho lze využít jako screeningový test u případů, kde klinicko-morfologické znaky svědčí pro možnou SDHB deficienci (7).

SDH kompetentní/pozitivní GISTy se na základě molekulárně genetického pozadí ještě dále dělí, a právě výsledky molekulárně genetického vyšetření mohou hrát významnou roli při plánování neoadjuvantní/adjuvantní/paliativní léčby.

1.3.2 Gastroblastom

Gastroblastom je vzácný tumor vycházející z muscularis propria žaludku s prokázanou *MALAT1-GLII* genovou fúzí (14), jejíž průkaz je dle současné WHO klasifikace vyžadován pro stanovení diagnózy gastroblastomu (8). V anglické literatuře bylo popsáno celkem celkem 13 případů těchto tumorů (14-23), ve většině se jedná o tumory mladých pacientů. Konzistentní nález *MALAT1-GLII* genové fúze pak poskytuje užitečný diagnostický nástroj při diferenciální diagnostice s jinými bifazickými tumory (např. synoviální sarkom, karcinosarkom, teratom a jiné) (23).

Identická genová fúze byla též popsána u odlišného gastrického tumoru – plexiformního fibromyxomu (24), recentně byl též publikován případ maligní neoplázie jejunu s touto fúzí (25) a skupina autorů v čele s Antonescu publikovali práci, v níž popsali celkem šest extragastrických tumorů s *GLII* abnormalitami a fokální pozitivitou cytokeratinů (autoři navrhli rozlišovat entitu „maligní epiteloidní neoplázie s *GLII* fúzí“) (26).

1.3.3 Fibrolamelární hepatocelulární karcinom

Fibrolamelární hepatocelulární karcinom je vzácná varianta hepatocelulárního karcinomu vznikající vždy v terénu necirhotických jater a postihující typicky mladé pacienty. Tumor má typický molekulárně genetický podklad v translokaci *DNAJB1-PRKACA*. Tento molekulárně genetický znak s vysokou specificitou a senzitivitou právě pro fibrolamelární hepatocelulární karcinom může být používán pro potvrzení diagnózy (některými autory je pak toto velmi doporučováno (27)).

1.4 Molekulárně genetické metody a prediktivní diagnostika

Ve snaze o co nejefektivnější nádorovou terapii začíná sílit snaha efektivně nacházet prediktivní a prognostické faktory. Molekulárně genetické vyšetření nádoru v době stanovení diagnózy primárního tumoru či při rozvoji metastatického onemocnění může ovlivnit volbu vhodného léčebného postupu jak v první linii, tak i umožní plánovat léčbu v dalších liniích. Možností systémové léčby je vždy více, univerzální jednoduchý a levný klíč pro volbu nejvhodnější léčby v současné době neexistuje, a kromě celkového stavu, komorbidit, léčebného záměru a preferencí by právě molekulárně-genetický podklad nádoru měl mít potenciál rozhodnout o nejadekvátnější možné léčbě. Tento fakt tak otevřel novou éru onkologie, éru velmi atraktivní personalizované medicíny a cílené terapie.

Cílená terapie je však nákladnou záležitostí, a to nejen její vlastní léčebná část, ale též diagnostický začátek, tedy právě počáteční vyšetření molekulárně-genetickými metodami za účelem detekce potenciálně léčebně zasažitelných cílů. Vzhledem k finančním nákladům na vyšetření nelze genetickou analýzu provádět rutinně u každého případu. Z hlediska patologie a rutinního užití je evidentní velká snaha různých autorských skupin najít adekvátní zástupné markery pro výběr tumorů vhodných pro genetická vyšetření (tj. nádorů, u kterých je potenciál zastihnout některou z léčebně cílitelných alterací). Proto se četné skupiny autorů snaží popsat různé morfologické znaky charakteristické pro určité abnormality genomu a analyzují potenciálně použitelné imunohistochemické protilátky ve snaze najít marker s vysokou senzitivitou a specificitou pro vybrané genetické alterace.

Indikace molekulárně-genetického vyšetření je v současné době ve většině případů v rukách onkologa, který vybírá pacienty, u nichž je žádáno o molekulárně-genetické vyšetření (zejména na podkladě klinického stavu). O provedení vyšetření tak ve většině případů nerozhodujeme na podkladě suspektních morfologických znaků při diagnostice nádoru, ale na podkladě rozhodnutí klinického lékaře o podání léčby u motivovaných pacientů s tzv. compliance. To je možná často škoda, neboť u některých nádorů by s největší pravděpodobností při rutinním zavedení molekulárně genetického vyšetření mohly být odhaleny léčebně postižitelné cíle, které však bez provedení testování zůstávají skryté. Neselektivní vyšetřování všech nádorů by zase znamenalo velmi drahou diagnostiku a významnou finanční zátěž pro celý systém. Navíc by z takového přístupu

profitovala jen neadekvátně malá část pacientů, což by vedlo jen k neadekvátní finanční zátěži celého diagnostického systému.

Je třeba si uvědomit, že v rámci primárního nádoru existuje výrazná molekulárně-genetická heterogenita, významné jsou však i molekulárně-genetické rozdíly mezi primárním nádorem a metastázou (dané vznikem sekundárních mutací v nádoru). To komplikuje predikci léčebné odpovědi.

Z hlediska prediktivního vyšetřování je vzhledem k incidenci nejvýznamnější hledání potenciálně zasažitelných léčebných cílů u kolorektálního adenokarcinomu. U metastatického kolorektálního adenokarcinomu je tak na žádost onkologa často prováděno molekulárně-genetické vyšetření nádoru se zaměřením na geny *RAS* a *BRAF*, někdy i vyšetření nestability mikrosatelitů, případně imunohistochemická detekce deficiencie a MMR proteinů. Vyšetření ostatních potenciálně cílenou léčbou postižitelných biomarkerů (*PIK3CA*, *PTEN*, overexprese/amplifikace *HER2*, overexprese *MET*) není v současnosti doporučováno k rutinnímu použití.

RAS mutace v rámci kolorektálních adenokarcinomů fungují jako negativní prediktor. Molekulární testování nádorů na aktivační mutace v *KRAS* a *NRAS* před zvažováním anti-EGFR terapie (např. cetuximab) u metastatického kolorektálního adenokarcinomu je zcela zásadní pro výběr skupiny pacientů vhodných k této léčbě (28). *RAS* geny patří do skupiny protoonkogenů, kódujících proteiny schopné na sebe vázat GTP (tzv. G proteiny) (29), které jsou významným hráčem v procesu buněčné signalizace. Proteiny *RAS* jsou součástí signální cesty MAPK (mitogen-activated protein kinases). Fyziologicky jsou aktivovány vazbou ligandu (např. EGF, epidermal growth factor) na receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR), který je součástí rodiny ErbB/HER receptorových komplexů, regulujících proliferaci, apoptózu a migraci buněk. Za normálních okolností (tj. u nemutované formy - *RAS* wild type/*wt-RAS*) je tak aktivita signální cesty MAPK funkčně kontrolována EGFR, kdy navázáním ligandu na receptor dojde k dimerizaci receptoru, jeho autofosforylaci a posunu signálu do dalších etází. Anti-EGFR protilátky brání navázání ligandu na EGFR, což způsobí blokádu celé dráhy, zároveň se podílí na aktivaci imunitního systému (30, 31). Aktivační mutace *RAS* však má za následek konstitutivní expresi a trvalou aktivitu *RAS*, vedoucí k vysílání stimulačních signálů směrem k jádru neoplastické buňky, bez ohledu na aktivaci EGFR, takže tuto aktivitu nelze ovlivnit navázáním anti-EGFR protilátky na receptor. Mutaci *KRAS* lze detekovat u 30 – 60 % pacientů se sporadickým kolorektálním adenokarcinomem (32), mutace *NRAS* se vyskytuje cca u 4-6 % kolorektálních adenokarcinomů (33).

BRAF gen je protoonkogen, kódující protein patřící k rodině serin/threonin kináz, který je součástí signalizační cesty *RAS*/MAPK a svou funkcí se podílí na kontrole buněčného růstu, dělení buněk, buněčné diferenciaci, migraci a apoptóze. Mutace *BRAF* vede ke konstitutivní aktivaci *BRAF* proteinu. U kolorektálního adenokarcinomu je mutace *BRAF* nacházena s frekvencí cca 10 % (většinou tzv. hotspot mutace V600E) (34). Mutace *BRAF* a *RAS* se zdají být vzájemně se vylučující, proto je vyšetření *BRAF* přínosné pouze u nádorů s *wt-RAS*. *BRAF* mutace u metastatického CRC jsou od roku 2010 považovány za negativní prognostický marker (28). Většina nádorů s mutací *BRAF* se chová velmi

agresivně a prognóza pacientů je nepříznivá bez ohledu na typ použité léčby (34, 35). Léčba pomocí anti-EGFR protilátek tak může být využita pouze u pacientů *wt-RAS*, *wt-BRAF*.

Nestabilita mikrosatelitů, respektive její vysoký stupeň (MSI-H, microsatellite instability-high), může být asociován s hereditárním syndromem (Lynchův syndrom – viz níže), MSI-H však lze zastihnout i u přibližně 15 % sporadických kolorektálních karcinomů (převážně jako důsledek epigenetických změn typu hypermethylace promotoru *MLH1*). Mikrosatelitní nestabilita u tumorů vede k neustálému selektování nových klonů nádorových buněk s rozdílnými molekulárními alteracemi. Sporadické MSI-H kolorektální karcinomy jsou také často nositeli somatické mutace v genu *BRAF*. Pacienti II. klinického stadia s MSI-H nemají prospěch z adjuvantní chemoterapie na bázi 5- fluorouracilu.

U kolorektálního adenokarcinomu byly zaznamenány i jiné genetické alterace. Mutace *APC* hraje důležitou roli v rámci hereditárně podmíněného kolorektálního karcinomu (viz níže), podílí se však i na vzniku sporadických forem kolorektálního karcinomu. Mutace *TP53*, která bývá přítomna v pozdějších stádiích rozvoje neoplázie, je přítomna až u 60 % kolorektálních adenokarcinomů a pacienti s touto mutací patrně více profitují z chemoterapie (36). Mutace *PI3K* se vyskytují přibližně v 15-18 % kolorektálních adenokarcinomů. U kolorektálního adenokarcinomu byla ovšem popsána opravdu široká škála genetických aberací, krásný přehled publikovali autoři Danielsen a kol. ve své práci (37), detekce těchto změn se však v současnosti rutinně neužívá.

Dalším nádorem, u něhož je molekulárně genetické vyšetření důležité pro plánování další léčby je GIST, problematika prediktivního testování byla shrnuta v předchozí kapitole, proto zde již není dále komentována.

V rámci rutinní praxe se též na žádost onkologa setkáváme s prediktivním testováním adenokarcinomů žaludku. Jedná se o vyšetření overexprese *HER2* a případně i amplifikace genu *HER2* u indikovaných pacientů. *HER2* je protoonkogen kódující transmembránový protein s tyrosinkinázovou aktivitou, který je zahrnut v signální cestě vedoucí k buněčnému růstu a diferenciaci (38). Udávaná frekvence *HER2* overexprese u adenokarcinomů žaludku a gastroezofageální junkce se v různých studiích liší, v průměru se pohybuje okolo 18 % (39). Pacienti profitují z léčby monoklonálními protilátkami proti *HER2* (trastuzumab).

1.5 Molekulárně-genetické metody využívané ke screeningu hereditárních nádorových onemocnění

Možnost identifikovat pacienty s významně vyšším rizikem rozvoje nádorového onemocnění než v běžné populaci má výrazný vliv na možnosti prevence a tím na prognózu postižených pacientů. U pacientů s vrozenou syndromovou predispozicí nedokážeme zasáhnout do rozvoje onemocnění v rámci primární prevence, avšak znalost rizikového pacienta nám umožní adekvátně využít nástroje sekundární prevence, jež vedou

ke včasnému odhalení a odstranění rozvíjejícího se nádorového onemocnění. Rychlý rozvoj molekulární genetiky a její stále častější využívání v diagnostice vede k odhalování stále vyššího počtu pacientů indikovaných k dalším vyšetřením a klinickému screeningu.

Aktivní hledání hereditárních syndromů v rámci rutinní praxe patologa se v současné době zaměřuje především na Lynchův syndrom, a to kvůli jeho relativně vysoké incidenci v rámci populace a výrazně zvýšenému riziku rozvoje (nejen) kolorektálního adenokarcinomu. Hereditární příčiny (především germinální mutace) jsou pravděpodobně podkladem 5-10 % všech kolorektálních karcinomů. Různé hereditární nádorové syndromy jsou asociovány s 60-100% rizikem rozvoje nádorového onemocnění v průběhu života, v závislosti na typu syndromu.

1.5.1 Lynchův syndrom (Lynch Syndrome/LS)

Lynchův syndrom, též známý pod názvem hereditární nepolypomatózní kolorektální karcinom (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer/HNPCC), je autozomálně dominantně dědičné onemocnění predisponující postižené jedince zejména k rozvoji kolorektálního karcinomu, karcinomu endometria a uroteliálního karcinomu horních cest močových, ale i širokému spektru dalších malignit (40). Jedná se o hereditární nádorovou predispozici s vysokou frekvencí výskytu v populaci, která typicky vede k rozvoji nádorového onemocnění již v mladém a středním věku. U onemocnění není přítomen premorbidní fenotyp a syndrom tedy bývá (bez aplikace molekulární depistáže) odhalen až s rozvojem karcinomu.

Genetickým podkladem LS je germinální inaktivační mutace některého z DNA mismatch repair genů (*MMR*), které vedou ke ztrátě či nedostatečné funkci některých z DNA mismatch repair proteinů (*MLH1*, *PMS2*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1*, *MSH3*, *MLH3*) (41). Defektní *MMR* geny vedou k MSI-H, která je detekována až u 85 % nádorů vznikajících na podkladě LS (42). U LS bývají nejčastěji postiženými geny *MLH1* a *MSH2* (až 80 %) (41), ale vzácně může mít LS genetický podklad i v germinální metylaci promotoru *MLH1* nebo germinální inaktivační mutaci genu *ECPAM* (43, 44).

Diagnostika LS se opírá jednak o klinická kritéria založená především na anamnestických údajích, z nichž vycházejí Amsterdamská kritéria I a II a Bethesda guidelines, jen některé pak inkorporují kromě klinických dat i některé morfologické rysy nádoru (revidovaná Bethesda guidelines). Klinická kritéria však nejsou příliš úspěšná. Lynchův syndrom je ovšem krásným příkladem syndromu, u nějž v posledních desetiletích vidíme velkou snahu najít ideální zástupný marker/vyšetření, s vysokou specificitou a sensitivitou k vytipování pacientů, u nichž má být provedeno molekulárně-genetické vyšetření k definitivnímu potvrzení diagnózy LS. Toto hledání zástupných markerů vyústilo do zavedení rutinního imunohistochemického screeningu *MMR* proteinů (*MHL1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) ve velké části patologických laboratoří, a to nikoliv pouze na

vzorky kolorektálních karcinomů, ale též na endometriální karcinomy a uroteliální karcinomy horních močových cest.

1.5.2 Familiální adenomatózní polypóza (Familial Adenomatous Polyposis / FAP)

Familiální adenomatózní polypóza je autozomálně dominantně dědičný syndrom predisponující postižené pacienty v průběhu života k rozvoji stovek až tisíců kolonických polypů, které, pokud nejsou včas odstraněny, vedou k rozvoji kolorektálního adenokarcinomu až ve 100 % případů (45). Mnohočetné polypy mohou u FAP vznikat i v jiných částech GIT (žaludek, duodenum). Kromě familiálního výskytu až 30 % případů FAP je způsobeno *de novo* vzniklou *APC* mutací u pacientů s negativní rodinnou anamnézou (46). FAP s sebou nese též zvýšené riziko rozvoje i jiných nádorů, např. žaludku, duodena, pankreatu a štítné žlázy (46). Existuje i mírnější forma FAP, tzv. attenuated FAP (AFAP) s pozdějším nástupem, menším množstvím polypů a nižším rizikem progresu do kolorektálního karcinomu, AFAP též představuje zvýšené riziko pro rozvoj karcinomu duodena a štítné žlázy (46). U AFAP je spíše sklon k rozvoji polypů v proximální části tlustého střeva.

Genetickým podkladem FAP i AFAP je germinální mutace genu *APC* (lokalizovaného na chromozomu 5q21-q22), který je součástí Wnt signalizační cesty (47). U některých pacientů však byly popsány i jiné abnormality než standardní germinální mutace exonů *APC*, jako např. mutace v intronové části regulační komponenty genu, somatický mosaicismus, interstitiální delece celého genu či části chromosomu 5q, kde se gen nachází (48-54).

1.5.3 *MUTYH*-asociovaná polypóza (*MUTYH*-Associated Polyposis/MAP)

Jedná se o autozomálně recesivně dědičné onemocnění podmíněné bíalelickou germinální inaktivací *MUTYH* genu (gen kódující protein, podílející se na opravě oxidačního poškození DNA – tzv. base excision repair gene). U heterozygotních nosičů zůstává riziko rozvoje karcinomu stále kontroverzním a otazným tématem (46).

Onemocnění má překryvný fenotyp s AFAP s možným rozvojem méně než 100 kolonických polypů, běžné je též postižení duodena. Vzhledem k fenotypické podobnosti s AFAP je doporučováno u pacientů s podezřením na tento syndrom provádět konkurentně rovnou molekulárně-genetické vyšetření obou genů (*APC* i *MUTYH*) (55), neboť bylo prokázáno, že až 18 % pacientů s polypózou, kteří jsou bez abnormality v *APC*, mají právě bíalelickou mutaci genu *MUTYH* (46).

1.5.4 *NTHL1*-asociovaná polypóza (*NTHL1*-associated polyposis/NAP)

Jde o recentně popsaný autozomálně recesivně dědičný syndrom asociovaný s adenomatózní polypózou a kolorektálním adenokarcinomem (56). U pacientů je zvýšené riziko i extrakolonických malignit (nádory prsu, endometria, kůže, hematologické malignity a jiné). Podkladem onemocnění je mutace genu *NTHL1* (8), jímž kódovaný protein se podílí na excizních opravách nukleotidových bazí.

1.5.5 Polypóza spojená s opravnou funkcí polymerázy (Polymerase proofreading-associated polyposis/PPAP)

Jedná se o dominantně dědičný syndrom podmíněný mutacemi v exonukleázové doméně genů *POLD1* a *POLE* (57). Klinicky je syndrom asociován se střevní polypózou a rizikem rozvoje kolorektálního karcinomu, může mít též souvislost se zvýšeným rizikem rozvoje nádorů mozku, endometria, prsu (58, 59).

1.5.6 Peutz-Jeghersův syndrom (Peutz-Jeghers Syndrome/PJS)

Peutz-Jeghersův syndrom je vzácné hereditární onemocnění s autozomálně dominantním vzorcem dědičnosti, asociované s výskytem pigmentových melaninových skvrn v typických lokalizacích (rty, bukální mukóza, konečky prstů na ruce i nohou) a mnohočetnými hamartomatózními polypy zejména tenkého střeva, méně polypy tlustého střeva a žaludku (60). Polypy jsou typického morfologického vzhledu a identické hamartomatózní polypy mohou být jak sporadické, tak součástí tohoto familiálního syndromu. Kromě postižení GIT je u pacientů s PJS popisováno vyšší riziko rozvoje nádorů prsu, dělohy či ovária a varlat (61).

Peutz-Jeghersův syndrom je nejčastěji asociován s mutací v genu pro serin/threoninovou kinázu 11 (*STK11/LKB1*), lokalizovaném na krátkém raménku 19. chromozomu (19p13.3) (62). *STK11/LKB1* mutace byla v různých studiích popsána u 10-94 % pacientů v závislosti na použité metodě detekce (61). Většina mutací jsou tzv. frameshift či nonsense mutace, resultující v abnormálně zkrácený protein a ztrátu kinázové aktivity. U syndromu byly však popsány i genetické změny vedoucí k alternativnímu sestřihu (63, 64). Ojedinelé práce zabývající se korelací mezi genotypem a fenotypem PJS došly k závěru, že pacienti s missense mutací vykazují signifikantněji pozdější začátek PJS (65).

1.5.7 Syndrom juvenilní polypózy (Juvenile Polyposis Syndrome/JPS)

Syndrom juvenilní polypózy je hereditární nádorový syndrom, který je asociovaný se zvýšeným rizikem rozvoje nádorů žaludku a kolorektálního karcinomu. Syndrom je spojen s rozvojem specifického typu polypů v GIT, tzv. juvenilních polypů (zejména v tlustém střevě, někdy i v žaludku, méně v tenkém střevě). Juvenilní polypy jsou tvořeny hlenem vyplněnými cystickými prostory, lemovány cylindrickým epitelem, ve stromatu s inflamatorním infiltrátem. Tyto benigní léze mohou posloužit jako prekurzor pro rozvoj maligního onemocnění, karcinomy však vznikají i mimo tyto polypy. Riziko rozvoje malignity u JPS je 40 % (66). Ačkoliv JPS představuje hereditární onemocnění, zhruba 67 % případů s diagnostikovaným JPS nevykazuje pozitivní rodinou anamnézu a může tak být následkem *de novo* vzniklé mutace (67).

Molekulárně-genetickým podkladem onemocnění mohou být mutace *SMAD4/DPC4* genu, *BMPRIA* genu či *PTEN* genu (67-69). Pacienti s totožnou genetickou mutací mohou mít odlišnou fenotypickou manifestaci (66). Zároveň bylo prokázáno, že pacienti s mutací *SMAD4* genu jsou predisponováni k rozvoji velkých gastrických polypů, naopak pacienti s mutací *BMPRIA* mají nižší výskyt gastrických polypů (ve srovnání s předchozí skupinou), stejně tak riziko rozvoje kolorektálního karcinomu je u pacientů s mutací genu *SMAD4* lehce vyšší.

1.5.8 Syndrom Cowdenové (Cowden syndrome/CS)

Syndrom Cowdenové, hlavní zástupce tzv. PTEN-hamartomatózního syndromu, je autozomálně dominantně dědičné onemocnění s širokým fenotypickým spektrem, typicky se manifestující mukokutánními lézemi. Kromě zvýšeného rizika vzniku kolorektálního adenokarcinomu a přítomnosti benigních hamartomatózních lézí v různých lokalizacích (včetně GIT) jsou postižení pacienti ohroženi i rozvojem nádorů prsu, štítné žlázy, endometriálního karcinomu, melanomu a jiných (70).

Syndrom Cowdenové má genetický podklad v germinální mutaci genu *PTEN* (10q23.3) ve většině případů (8), ojediněle byla u syndromu popsána i germinální mutace *SDHx* (71).

1.5.9 Hereditární difúzní karcinom žaludku (hereditary diffuse gastric cancer/HDGC)

Hereditární difúzní karcinom žaludku je syndromové autozomálně dominantně dědičné onemocnění, které, jak z názvu jasně vyplývá, predisponuje postižené jedince k rozvoji difúzního adenokarcinomu žaludku a to často multicentricky. Odhadované kumulativní riziko rozvoje karcinomu je vyšší u žen než u mužů (odhaduje se 83% riziko u

žen a 67% riziko u mužů) (72). U geneticky potvrzených pacientů je proto často doporučována profylaktická gastrektomie (73). Lobulární karcinom prsu je další karcinom významně asociovaný s tímto syndromem.

Geneticky je syndrom nejčastěji podmíněn zárodečnou mutací genu *CDHI* (74), který kóduje transmembránový protein E-cadherin, v rámci tohoto syndromu však byly popsány i jiné alterace (např. zárodečná mutace *CTNNA1* genu) (75).

1.5.10 Adenokarcinom žaludku a proximální polypóza (Gastric adenocarcinoma and proximal polyposis/GAPPS)

Jde o autozomálně dominantně dědičné onemocnění, de facto variantu FAP, spojené s masivní polypózou žaludku (fundus a tělo) a predispozicí k rozvoji adenokarcinomu žaludku (76). Onemocnění je způsobeno bodovou mutací YY1 v oblasti vazebného místa promotoru 1B genu *APC* (77, 78) (totožná mutace může být velmi zřídka zastížena i u některých pacientů s FAP).

2 Cíle prací

V rámci zde prezentovaných prací byla společným jmenovatelem snaha detailně se zaměřit na morfologické diagnostické znaky některých neoplázií, ve vzácných případech na diagnostické molekulárně-genetické a imunohistochemické charakteristiky a provést jejich detailní analýzu a vzájemnou korelaci, zejména pak:

1. Připomenout typický morfologický diagnostický znak adenomatoidního tumoru.
2. Zhodnotit možný diagnostický přínos imunohistochemického vyšetření SDHB v diferenciální diagnostice mezenchymálních tumorů gastrointestinálního traktu.
3. Zjistit, zda mutace *PDGFRA* hraje roli při rozvoji sporadických střevních lipomů.
4. Vyhodnotit a shrnout morfologické znaky užitečné v diferenciální diagnostice mezi nediferencovaným karcinomem a gastrointestinálním stromálním tumorem.
5. Zhodnotit vhodný a efektivní algoritmus pro detekci kolorektálních karcinomů s potenciálně léčebně ovlivnitelnými onkogeními genovými fúzemi.
6. Zhodnotit výtěžnost na našem pracovišti používaného diagnostického algoritmu pro detekci pacientů s Lynchovým syndromem.

3 Výsledky

3.1 Thread-like bridging strands in the adenomatoid tumor of the small intestine

Dopis editorovi komentující původní práci autorů Lao a Wang s názvem „Adenomatoidní tumor tenkého střeva: první popsany případ a review v literatuře“.

Autoři ve své původní práci poukazují na morfologický vzhled, ale zejména na imunohistochemický fenotyp adenomatoidního tumoru v porovnání s více běžnými typy nádorů tenkého střeva s různým biologickým chováním, zejména adenokarcinomů. Imunohistochemický model použitý autory zahrnuje pozitivní „mezoteliální“ markery AE1/AE3, CK7, HBME-1, CK5/6, calretinin, D2-40 and WT1, negativní „adenokarcinomové“ markery Ber-EP4 a MOC-31, negativní markery „střevního epitelu“ CK20, CDX2 a CEA, a dále negativní „endotelové“ markery CD31 and CD34.

V původní práci však postrádáme popis histologických znaků v základním barvení hematoxylinem a eosinem, které jsou u všech adenomatoidních tumorů stejné i v neobvyklých lokalizacích. Tento jednoduchý, senzitivní i specifický histologický znak adenomatoidního tumoru byl zobrazen již v roce 1962. Jedná se o fenomén „nitkovitých můstků“, jenž byl detailně studován o 41 let později Hesem a kolektivem. Ultrastrukturálně se tyto můstky skládají ze ztenčené, membránou obalené cytoplazmy 2 sousedních mezoteliálních buněk. Přítomnost těchto můstků je typickým znakem adenomatoidních tumorů, které jsou nezávislé na pohlaví a lokalizaci tumoru. Důrazně se zasazujeme o uznání „nitkovitých můstků“ jako prvního diagnostického kritéria.

Thread-Like Bridging Strands in the Adenomatoid Tumor of the Small Intestine

Bohuslava Kokoskova, MD^{1,2} and Ondrej Daum, MD, PhD¹

International Journal of Surgical Pathology
2015, Vol. 23(1) 94
© The Author(s) 2014
Reprints and permissions:
sagepub.com/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/1066896914545396
ijs.sagepub.com



Dear Editor,

We read with great interest the current article by Lao and Wang titled “Adenomatoid Tumor of the Small Intestine: The First Case Report and Review of the Literature.”¹ They described a case of a 44-year-old woman affected by an adenomatoid tumor arising primarily in the small intestine. The tumor involved all layers of the intestinal wall, and it was composed of variably sized tubules and gland-like spaces lined by bland cuboidal to flattened epithelioid cells with eosinophilic cytoplasm and small inconspicuous nucleoli.¹

The authors correctly emphasize the importance of “familiarity with the morphology and immunophenotype” of this type of tumor to differentiate it from more common neoplasms with different behavior, in the intestinal location mainly adenocarcinomas. Although the immunohistochemical model used by the authors (positive “mesothelial” markers AE1/AE3, CK7, HBME-1, CK5/6, calretinin, D2-40 and WT1, negative “adenocarcinomatous” markers Ber-EP4 and MOC-31, negative “intestinal epithelial” markers CK20, CDX2 and CEA, and negative “endothelial” markers CD31 and CD34) is indubitable, we miss description of basic hematoxylin and eosin histological pattern that should prompt a pathologist to consider the diagnosis of adenomatoid tumor even in the intestinal or other unusual locations, which is a condition necessary for targeting the immunohistochemical investigation.

Such a simple, sensitive, and specific histological sign of adenomatoid tumor was depicted as early as in 1962, although inaccurately recognized.² This phenomenon, regarded as “thread-like bridging strands” (and referred to as the Hes’s bridges by some pathologists), was studied in detail 41 years later by Hes et al.³ It consists of thready strands bridging the lumina of numerous tubular and slit-like structures and frequently forming a fine, inconspicuous network (Figure 1). Ultrastructurally, they are formed by apposition of attenuated cytoplasm of 2 adjacent mesothelial cells. As the presence of thin intraluminal thread-like bridging strands within adenomatoid tumor was found to be a constant morphologic feature independent on gender and localization, we strongly advocate recognition of the Hes’s bridges as a major diagnostic criterion for the

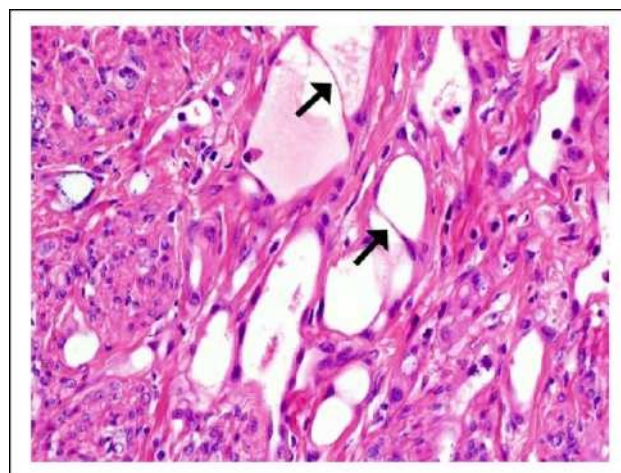


Figure 1. Thread-like bridging strands (arrows) are highly sensitive and specific signs of adenomatoid tumor (hematoxylin and eosin, original magnification 240*). Courtesy Prof Ondrej Hes, MD, PhD.

inclusion of adenomatoid tumor in the differential diagnostic considerations.

References

1. Lao IW, Wang J. Adenomatoid tumor of the small intestine: the first case report and review of the literature [published online June 2, 2014]. *Int J Surg Pathol*. doi:10.1177/1066896914537680.
2. Plaut A. Locally invasive lymphangioma of adrenal gland. *Cancer*. 1962;15:1165-1169.
3. Hes O, Perez-Montiel DM, Alvarado Cabrero I, et al. Thread-like bridging strands: a morphologic feature present in all adenomatoid tumors. *Ann Diagn Pathol*. 2003;7:273-277.

¹ Department of Pathology, Medical Faculty Hospital, Charles University in Prague, Medical Faculty in Plzen, Plzen, Czech Republic

²Biopsticka laborator s.r.o., Plzen, Czech Republic

Corresponding Author:

Ondrej Daum, Department of Pathology, Medical Faculty Hospital, Edvarda Benese 13, Plzen, 305 99, Czech Republic.
Email: daum@fnplzen.cz

3.2 Utility of immunohistochemical investigation of SDHB and molecular genetic analysis of SDH genes in the differential diagnosis of mesenchymal tumors of GIT

Ztráta exprese beta podjednotky sukcinát dehydrogenázy (SDHB) je přítomna v podskupině *KIT/PDGFR* wt gastrointestinálních stromálních tumorů (GISTů). V rámci prezentované studie byly hodnoceny možnosti využití imunohistochemického vyšetření SDHB v diferenciální diagnostice mezenchymálních tumorů GIT.

Do studie bylo zahrnuto 11 případů *KIT/PDGFR* wt GISTů, 12 schwannomů žaludku (GS), 20 solitárních fibrózních tumorů (SFT), 4 leiomyomy (LM), 16 leiomyosarkomů (LMS), 5 synoviálních sarkomů (SS), 3 endometrioidní stromální sarkomy (ESS) a 1 inflamatorní myofibroblastický tumor (IMT) ilea. Jako kontrolní skupina byly využity 3 případy *KIT/PDGFR* mutovaných GISTů. U případů byla hodnocena exprese imunohistochemického barvení SDHB společně s molekulárně genetickou analýzou genů kódujících sukcinát dehydrogenázu (SDH).

Celkem 6 z 11 *KIT/PDGFR* wt GISTů exprimovalo SDHB, z nichž 1 wt GIST měl geneticky detekovanou abnormalitu genu *SDHD*. Všechny SDHB negativní případy byly SDHB-D wt. V 1 ze 3 kontrolních *KIT/PDGFR* mutovaných GISTů molekulárně genetická analýza odhalila kromě mutace *KIT* (exon 11) i změnu sekvence *SDHD*. Žádný SFT neprokázal ztrátu exprese SDHB, u 2 však nebylo možné barvení analyzovat. Navíc jeden SFT vykazoval abnormalitu *SDHB* a dále jeden SFT pak mutaci *SDHD*. Všechny zbylé analyzované tumory (GS, LM, LMS, SS, ESS a IMT) byly buď imunohistochemicky SDHB pozitivní nebo neanalyzovatelné a *SDHB-D* wt.

V regulaci exprese SDHB patrně mohou hrát roli i další faktory. Imunohistochemické vyšetření SDHB při diferenciální diagnostice GISTů oproti jiným *KIT/PDGFR* wt mezenchymálních nádorům GIT (zejména SFT) může být zavádějící.

Utility of immunohistochemical investigation of SDHB and molecular genetic analysis of *SDH* genes in the differential diagnosis of mesenchymal tumors of GIT

M. Dubova¹, M. Sedivcova², M. Michal¹, B. Kokoskova^{1,2}, A. Ryska³, D. Smid⁴ and O. Daum^{1,2}

¹ Siki's Department of Pathology, Medical Faculty Hospital, Charles University, Plzen, ²Biopticka laborator s.r.o., Plzen, ³The Fingerland Department of Pathology, University Hospital, Hradec Kralove and ⁴Surgical Clinic, Medical Faculty Hospital, Charles University, Plzen, Czech Republic

Summary. Loss of expression of beta subunit of succinate dehydrogenase (SDHB) was proved to be present in a subgroup of *KIT/PDGFR* wt gastrointestinal stromal tumors (GISTs). To evaluate possible diagnostic utility of SDHB immunohistochemistry in the differential diagnostics of mesenchymal tumors of gastrointestinal tract (GIT), 11 cases of *KIT/PDGFR* wt GISTs, 12 gastric schwannomas (GSs), 20 solitary fibrous tumors (SFTs), 4 leiomyomas (LMs), 16 leiomyosarcomas (LMSs), 5 synovial sarcomas (SSs), 3 endometrioid stromal sarcomas (ESSs), and 1 ileal inflammatory myofibroblastic tumor (IMT) were investigated for SDHB immunoreactivity together with molecular genetic analysis of genes encoding succinate dehydrogenase (*SDH*). Three recent cases of *KIT/PDGFR* mutant GISTs were used as controls. Among the 11 *KIT/PDGFR* wt GISTs, 6 expressed SDHB, 1 of them harboring a sequence change of *SDHD*. All SDHB-negative cases were *SDHB-D* wt. In 1 of the control GIST cases molecular genetic analysis revealed an *SDHD* sequence change in addition to a mutation in *KIT* exon 11. No SFT was truly SDHB-negative, but in 2 of them the staining was impossible to analyze. Furthermore, 1 SFT carried an *SDHB* and another 1 *SDHD* sequence change. All GSs, LMs, LMSs, SSs, ESSs, and IMT were SDHB-positive or non-analyzable, and *SDHB-D* wt.

Additional factors may play a role in regulating expression of SDHB. Furthermore, SDHB immuno-

histochemistry alone may be misleading in excluding tumors other than GIST (especially SFT) in the differential diagnosis of *KIT/PDGFR* wt mesenchymal tumors of GIT.

Key words: GIST, Stromal tumor, KIT, PDGFR, SDH

Introduction

Succinate dehydrogenase (SDH), also known as mitochondrial complex II, is an enzyme complex located in the inner mitochondrial membrane, which consists of four main subunits (SDHA, SDHB, SDHC, and SDHD), assembly factors (SDHAF1, SDHAF2), iron-sulphur centers, and ubiquinone. It participates in the electron transport chain and Krebs cycle by catalyzing oxidative dehydrogenation of succinate to fumarate (Gottlieb and Tomlinson, 2005). As immunoreactivity of SDHB is dependent on complete assembly of the whole SDH complex, the immunohistochemical investigation of SDHB represents an important source of information on function of the enzyme complex. The SDHB protein is normally ubiquitously expressed, whereas its loss reflects dysfunction of the SDH complex. Such a dysfunction caused by loss-of-function mutations of the genes encoding individual subunits of SDH (i.e. *SDHx* genes) was first described in familial paraganglioma/pheochromocytoma syndrome (Baysal et al., 2000; Niemann and Muller, 2000; Astuti et al., 2001a,b; van Nederveen et al., 2009).

In 2007, germline mutations of *SDHx* and loss of SDHB expression were identified in gastrointestinal

stromal tumors (GISTs) in patients with Carney-Stratakis syndrome (McWhinney et al., 2007; Pasini et al., 2008). Since then, loss of SDHB expression was reported to occur also in other GISTs lacking mutations of genes encoding receptor tyrosine kinases KIT and platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFRA), i. e. so-called *KIT* and *PDGFRA* wild-type (*KIT/PDGFRA* wt) GISTs, and immunoeexpression of SDHB became a standard tool used to discriminate between SDHB-positive GISTs driven by activation of *KIT/PDGFRA* pathway, and SDHB-deficient GISTs which represent a different clinical, genetical and therapeutical entity (Agaimy et al., 2009; Gill et al., 2010, 2011a; Gaal et al., 2011; Miettinen et al., 2011; Rege et al., 2011; Barletta and Hornick, 2012; Doyle et al., 2012).

However, little is known about expression of SDHB in other *KIT/PDGFRA* wt mesenchymal tumors of gastrointestinal tract (GIT). Therefore, we performed the study on expression of SDHB in GISTs and their mimics. Furthermore, we correlated SDHB-status with molecular genetic profile of the tumors.

Materials and methods

Eleven cases of *KIT/PDGFRA* wt GISTs (7 gastric, 4 intestinal), 12 gastric schwannomas (GSs), 20 solitary fibrous tumors (SFTs), 4 leiomyomas (LMs), 16 leiomyosarcomas (LMSs), 5 synovial sarcomas (SSs), 3 endometrioid stromal sarcomas (ESSs), and 1 ileal inflammatory myofibroblastic tumor (IMT) were retrieved from our archives. Three recent cases of *KIT* or *PDGFRA* mut GISTs were used as control cases.

Tissue for light microscopy was fixed in 4% formaldehyde and embedded in paraffin using routine procedures. Five micrometer-thick sections were cut from the tissue blocks and stained with hematoxylin and eosin.

For immunohistochemical investigations the following primary antibodies were used: SDHB (polyclonal, 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), SDHB (21A11, 1:100, Abcam, Cambridge, MA), DOG-1 (K9, RTU, Novocastra, Newcastle, UK), Stat6 (S20, polyclonal, 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). No special pretreatment was used. The primary antibodies were visualized using the supersensitive streptavidin-biotin-peroxidase complex (Biogenex, San Ramon, CA). Appropriate positive and negative control slides were employed. Furthermore, non-neoplastic mucosal epithelial or endothelial cells were used as internal positive control. Samples negative in staining with the polyclonal anti-SDHB antibody by Santa Cruz were then stained with the monoclonal antibody by Abcam. Only those samples that did not stain with any of the antibodies, but showed indubitable granular cytoplasmic positivity of intratumoral endothelial cells with at least one of the antibodies, were regarded as SDHB-negative. In the absence of endothelial staining, the sample was labeled as non-analyzable (NA). The diagnosis of SFT was then

proved by immunoeexpression of Stat6 and absence of staining with DOG-1 antibody in SDHB- cases.

DNA for molecular genetic investigation was extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Several 5 μ m thick sections were placed on the slides. Hematoxylin and eosin stained slides were examined for determination of area of tumor tissue. Then, tumor tissue from unstained slides was scraped and DNA was isolated by the NucleoSpin® Tissue Kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Duren, Germany) according to the manufacturer's protocol. Mutational analysis of coding sequence, including exon-intron junctions of *SDHB*, *SDHC*, and *SDHD* genes was performed by PCR and direct sequencing. In GIST cases, analysis of exons 9, 11, 13 and 17 of the *KIT* gene (accession number U63834), exons 12, 14 and 18 of the *PDGFRA* gene (accession number D5001 7) was performed as well.

In GIST cases, their pattern (spindled, mixed, epithelioid) was compared with previous markers.

Results

GISTs

All GIST cases used in the study were previously defined on the basis of their morphology and pattern of immunoeexpression of KIT (CD117), desmin, and S-100 protein, either during routine daily service or in consultation practice. Basic clinical and morphological features of the investigated GISTs are summarized in Table 1. SDHB status was investigated in two steps. In the first step, the Santa Cruz anti-SDHB antibody was used in all cases. As the second step, all SDHB-negative or questionable cases were stained with the Abcam monoclonal anti-SDHB antibody.

Immunohistochemical and molecular genetic

Table 1. Clinicopathologic features of GISTs.

No.	Localization	Gender and age	Pattern	Size (cm)	MI
1	stomach	F, 47	mixed	14	1
2	stomach	F, 63	spindle	?	10
3	stomach	F, 43	mixed	7	5
4	stomach	F, 76	mixed	2	2
5	stomach	F, 70	spindle	10	2
6	stomach	M, 62	spindle	7	0
7	stomach	F, 48	epithelioid	6	2
8	stomach	F, 12	mixed	?	10
9	small intestine	M, 75	epithelioid	6	133
10	small intestine	F, 30	epithelioid	7	0
11	small intestine	M, 46	spindle	5	5
12	small intestine	F, 51	mixed	2	4
13	small intestine	M, 60	mixed	2.5	0
14	mediastinum	M, 52	epithelioid	15	25

M, male; F, female; MI, mitotic index (number of mitoses per 5 mm²); ?, unknown

SDHB in the differential diagnostics of GIST

features of the tumors are summarized in Table 2. Briefly, of the 11 GIST *KIT/PDGFR* wt cases, 6 tumors were SDHB+ and 5 were SDHB- when stained with the Santa Cruz antibody. Three of the SDHB- tumors were localized in stomach, 2 of those showed mixed pattern and 1 displayed epithelioid morphology. Two SDHB-GISTs were located in the small intestine, 1 of them being of mixed, the other one of epithelioid cell morphology (Fig. 1). SDHB negativity was confirmed by the Abcam antibody in only one female pediatric gastric GIST of mixed morphology, which was found to be *SDHB-D* wt (Fig. 2). On the contrary, one of the SDHB+ gastric GISTs harbored an SDHB sequence

change in exon 1 (G12S). Other tumors showed no SDHB-D genetic changes.

Of the three *KIT* or *PDGFRA* mut GISTs, which were used as control cases, only 1 was SDHB-negative (Fig. 3), although this case was also shown to bear G12S change in exon 1 of *SDHD* gene in addition to W557_K558 deletion in exon 11 of *KIT* gene.

All cases were KIT-positive, regardless of their SDHB-status. Membranous pattern was more prominent in tumors composed of spindle-shaped cells (Cases 2, 5, 6 and 11), whereas in epithelioid tumors or epithelioid cells of mixed tumors the dot-like cytoplasmic pattern was more eye-catching. There was no significant difference in KIT staining between SDHB- cases 8 and 14 and other cases.

Table 2. Immunohistochemical and molecular genetic features of GISTs.

No	Mutational profile	SDHB	
		Santa Cruz	Abcam
1	<i>KIT</i> wt, <i>PDGFRA</i> wt, <i>SDHD</i> p.G12S	+	
2	<i>KIT</i> wt, <i>PDGFRA</i> wt, <i>SDHB-D</i> NA	+	
3	<i>KIT</i> wt, <i>PDGFRA</i> wt, <i>SDHB-D</i> NA	NA	NA
4	<i>KIT</i> wt, <i>PDGFRA</i> p.D842V, <i>SDHB-D</i> wt	+	
5	<i>KIT</i> wt, <i>PDGFRA</i> wt, <i>SDHB-D</i> wt	+	
6	<i>KIT</i> wt, <i>PDGFRA</i> wt, <i>SDHB-D</i> NA	+	
7	<i>KIT</i> wt, <i>PDGFRA</i> wt, <i>SDHB-D</i> NA	NA	NA
8	<i>KIT</i> wt, <i>PDGFRA</i> wt, <i>SDHB-D</i> wt	-	-
9	<i>KIT</i> wt, <i>PDGFRA</i> wt, <i>SDHB-D</i> NA	+	
10	<i>KIT</i> wt, <i>PDGFRA</i> wt, <i>SDHx</i> wt	+	
11	<i>KIT</i> wt, <i>PDGFRA</i> wt, <i>SDHB-D</i> NA	NA	NA
12	<i>KIT</i> p.W557_E561 del, <i>PDGFRA</i> wt, <i>SDHB-D</i> wt -		+
13	<i>KIT</i> wt, <i>PDGFRA</i> wt, <i>SDHB-D</i> NA	NA	NA
14	<i>KIT</i> p. W557_K558del, <i>PDGFRA</i> wt, <i>SDHD</i> p.G12S -		-

NA, not analyzable; *SDHB-D*, genes *SDHB*, *SDHC*, and *SDHD*; wt, wild type

Table 3. Schwannomas.

No.	Sex and age	Size (cm)	<i>SDHB-D</i>	<i>SDHB</i>	<i>SDHB</i>
			status	Santa Cruz	Abcam
1	F, 77	4.5	wt	+	
2	F, 74	7	wt	+	
3	M, 16	?	NA	+	
4	F, 88	2.5	wt	+	
5	F, 64	4	wt	+	
6	M, 82	3	wt	+	
7	F, 46	3.5	wt	+	
8	F, 80	?	wt	+	
9	M, 47	?	wt	+	
10	M, 43	3.5	wt	+	
11	F, 26	?	wt	NA	NA
12	M, 63	?	wt	NA	NA

M, male; F, female; ?, unknown; NA, not analyzable; *SDHB-D*, genes *SDHB*, *SDHC*, and *SDHD*; wt, wild type

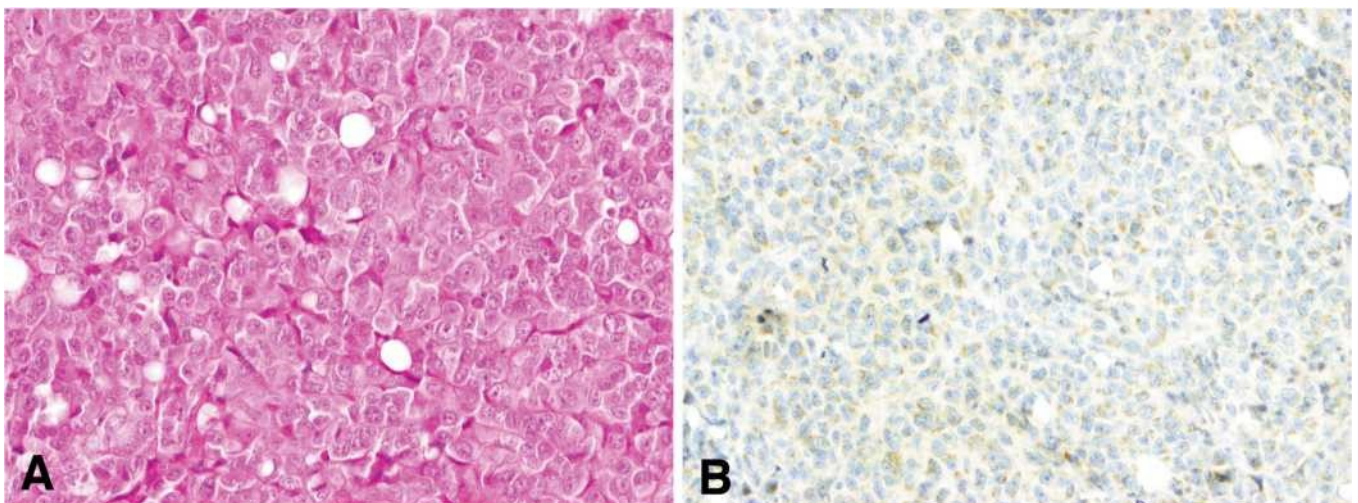


Fig. 1. GIST Case 9 was located in the small intestine, composed of epithelioid cells, with numerous mitoses (A, H&E), and with striking granular SDHB positivity (B, SDHB Santa Cruz). x 200

SDHB in the differential diagnostics of GIST

Gastric schwannomas

Of the 12 GSs used in the study, 10 showed at least focal granular staining of neoplastic cells with at least one anti-SDHB antibody (Fig. 4). The 2 remaining cases were found to be impossible to analyze due to the lack of staining of endothelial cells. Eleven tumors were *SDHB-D* wt, only 1 sample was non-analyzable due to poor quality of DNA (Table 3).

Table 4. Solitary fibrous tumors.

No.	Sex and age	Size (cm)	<i>SDHB-D</i> status	SDHB Santa Cruz	SDHB Abcam
1	M, 33	?	wt	+	
2	M, 59	?	wt	+	
3	F, 45	2	wt	-	+
4	F, 80	"large"	wt	+	
5	M, 74	21	wt	+	
6	F, 55	2.2	wt	+	
7	F, 59	5.5	wt	+	
8	M, 51	6.7	wt	+	
9	M, 77	11	<i>SDHB</i> p.S163P	-	+
10	M, 70	7	wt	+	
11	M, 66	17	wt	+	
12	F, 48	?	NA	-	+
13	F, 73	7	NA	NA	NA
14	M, 48	12	<i>SDHD</i> p.G12S	+	
15	F, 71	19	wt	+	
16	F, 74	?	wt	+	
17	F, 55	?	wt	NA	NA
18	F, 29	17	wt	+	
19	F, 28	"large"	wt	+	
20	F, 67	4	wt	+	

M, male; F, female; ?, unknown; NA, not analyzable; *SDHB-D*, genes *SDHB*, *SDHC*, and *SDHD*, wt, wild type

Solitary fibrous tumors

Clinicopathological, immunohistochemical and molecular genetic data are shown in Table 4. In summary, none of the cases was proved to be SDHB-, although 2 cases had to be categorized as non-analyzable due to the lack of staining of endothelial cells. However, it has to be stressed that interpretation of SDHB staining was extremely difficult in some cases because of small

Table 5. Smooth muscle tumors.

No.	Sex and age	Diagnosis	Size (cm)	<i>SDHB-D</i> status	SDHB Santa Cruz	SDHB Abcam
1	F, 69	LM	4.7	wt	+	
2	M, 36	LM	10	wt	-	+
3	M, 61	LM	7	wt	+	
4	F, 58	LM	1.2	NA	+	
5	F, 35	LMS	4	wt	+	
6	F, 38	LMS	3.5	wt	-	+
7	F, 60	LMS	12	wt	+	
8	F, 56	LMS	?	wt	+	
9	F, 65	LMS	?	NA	+	
10	F, 77	LMS	?	wt	+	
11	F, 49	LMS	9	wt	+	
12	F, 75	LMS	12	wt	+	
13	M, 41	LMS	?	wt	+	
14	M, 74	LMS	?	wt	-	+
15	M, 71	LMS	7.5	wt	+	
16	M, 59	LMS	2	NA	+	
17	F, 69	LMS	3.5	wt	+	
18	M, 65	LMS	?	NA	+	
19	F, 77	LMS	?	NA	+	
20	F, 66	LMS	5	wt	+	

M, male; F, female; LM, leiomyoma; LMS, leiomyosarcoma; ?, unknown; NA, not analyzable; *SDHB-D*, genes *SDHB*, *SDHC*, and *SDHD*, wt, wild type

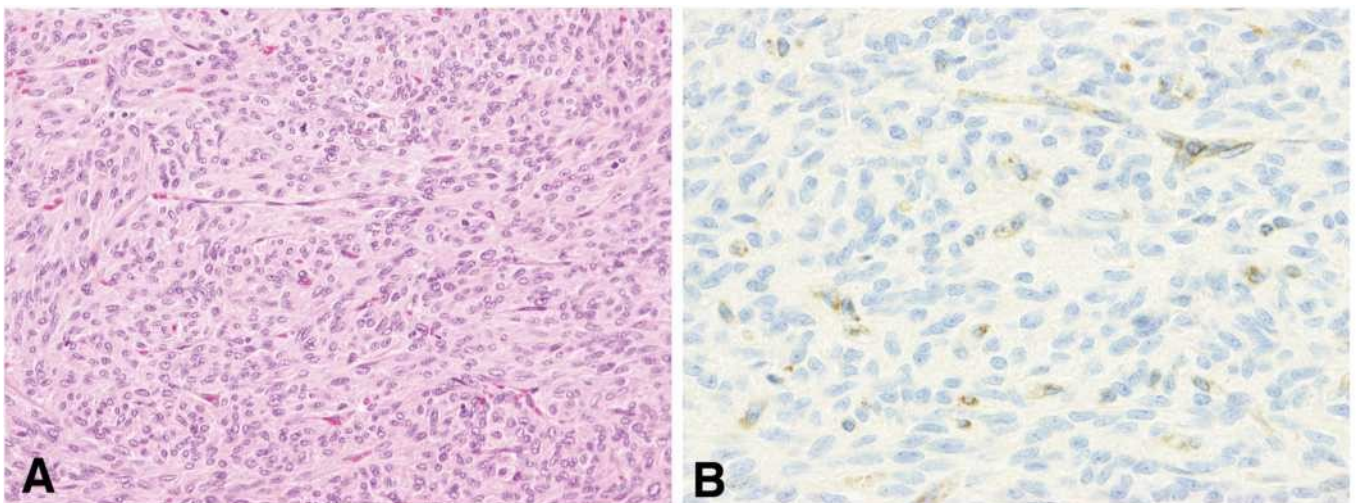


Fig. 2. Gastric pediatric GIST Case 8 displayed mixed cellular morphology (A, H&E), with the neoplastic cells showing no SDHB staining in contrast to positive endothelial cells and scattered infiltrating leucocytes (B, SDHB Abcam). A, x 100; B, x 200

SDHB in the differential diagnostics of GIST

volume of the cytoplasm of neoplastic cells. DNA quality was sufficient for *SDHB-D* analysis in 18 cases. Of those, 2 showed gene sequence changes, namely G12S change in *SDHD* (Fig. 5) and S163P in *SDHB*. Both cases were SDHB-positive.

Smooth muscle tumors

LMs and LMSs are grouped together in Table 5. Generally, all tumors were SDHB-positive, although usually the staining was difficult to interpret, mainly in slender spindle shaped cells. All samples with sufficient quality of DNA were *SDHB-D* wt.

Synovial sarcomas, endometrial stromal sarcomas, and inflammatory myofibroblastic tumor

Due to the low number of cases, all 5 SSs, 3 ESSs, and 1 IMT are lumped together in Table 6. Briefly, expression of SDHB was difficult to evaluate as all tumors were composed of short spindled cells with diminutive amount of cytoplasm, although on thorough investigation all were finally found to be at least focally SDHB+. All but 1 SS and 1 ESS were successfully tested for *SDHB-D* mutations, with negative results in all tested SSs, ESSs and IMT.

Discussion

The majority of GISTs harbor mutations in *KIT* or *PDGFRA* leading to ligand-independent activation of the respective receptor tyrosine kinases (Hirota et al., 1998, 2003; Heinrich et al., 2003). However, about 15% of GISTs occurring in adults and 90% of GISTs in children lack *KIT* and *PDGFRA* mutations (Corless et al., 2004;

Agaram et al., 2008). A considerable number of such cases is associated with SDH complex dysfunction. It is estimated that 7.5% of all GISTs belong to this category, which is characterized by lack of SDHB-immunostaining, and thus referred to as SDHB-deficient GISTs (previously also type 2 GISTs and pediatric type GISTs) (Miettinen et al., 2011). SDHB-deficient GISTs can be further divided according to their clinical and molecular genetic features into several groups. Carney-Stratakis syndrome is a dyad of gastric GIST and paraganglioma inherited in an autosomal dominant trait, caused by a germ-line mutation of *SDHx* (Carney and Stratakis, 2002; Pasini et al., 2008). It affects mainly young people with no sex predilection. On the other hand, Carney triad lacks familial occurrence, shows striking female predominance, and despite its SDHB-

Table 6. Synovial sarcomas, endometrial stromal sarcomas, and inflammatory myofibroblastic tumors.

No.	Sex and age	Diagnosis	Size (cm)	<i>SDHB-D</i> status	SDHB Santa Cruz	SDHB Abcam
1	M, 30	biphasic SS	?	wt	+	
2	M, 34	monophasic SS	3	NA	+	
3	M, 41	monophasic SS	?	wt	+	
4	M, 29	biphasic SS	?	wt	-	+
5	M, 32	monophasic SS	7	wt	+	
6	F, 63	ESS	5	wt	+	
7	F, 38	ESS	2	NA	+	
8	F, 61	ESS	8.5	wt	+	
9	F, 7	IMT	?	wt	+	

M, male; F, female; SS, synovial sarcoma; ESS, endometrial stromal sarcoma; IMT, inflammatory myofibroblastic tumor; ?, unknown; NA, not analyzable; *SDHB-D*, genes *SDHB*, *SDHC*, and *SDHD*; wt, wild type

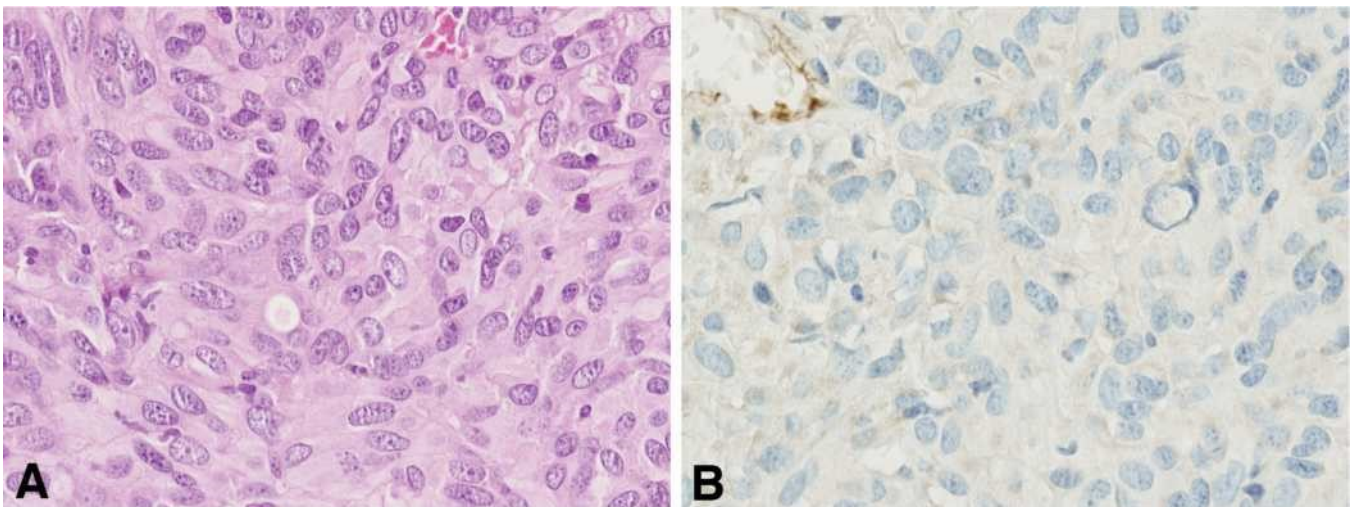
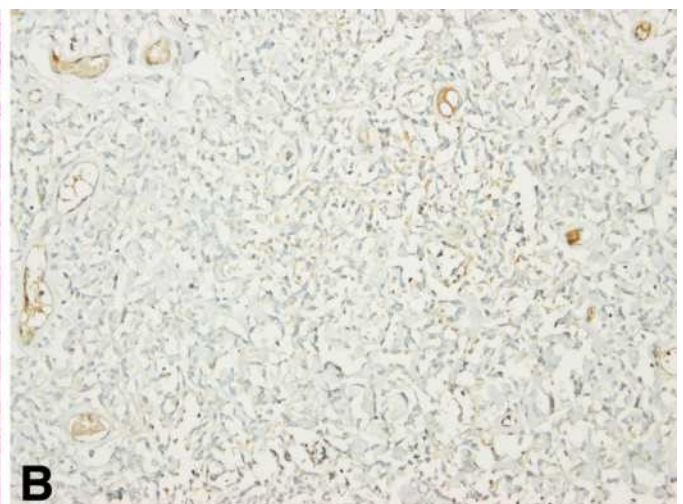
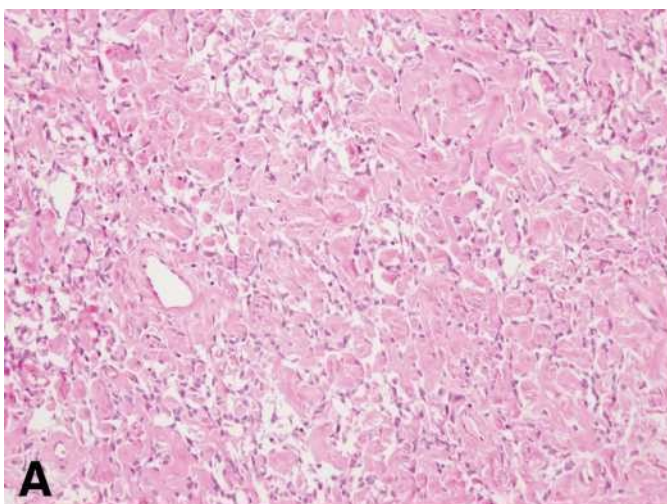
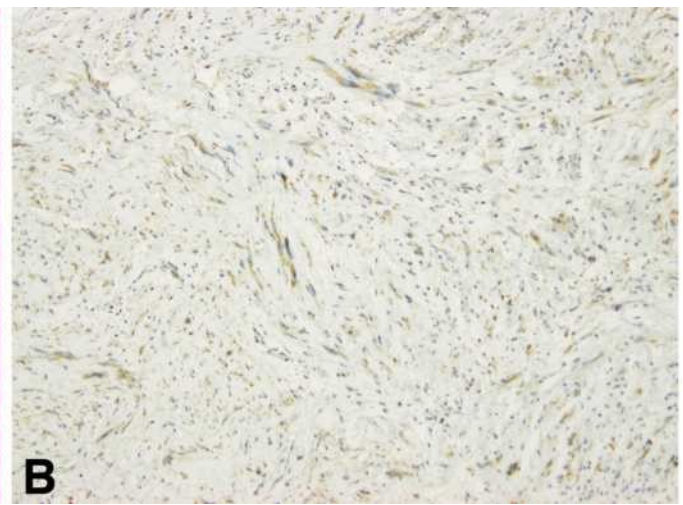
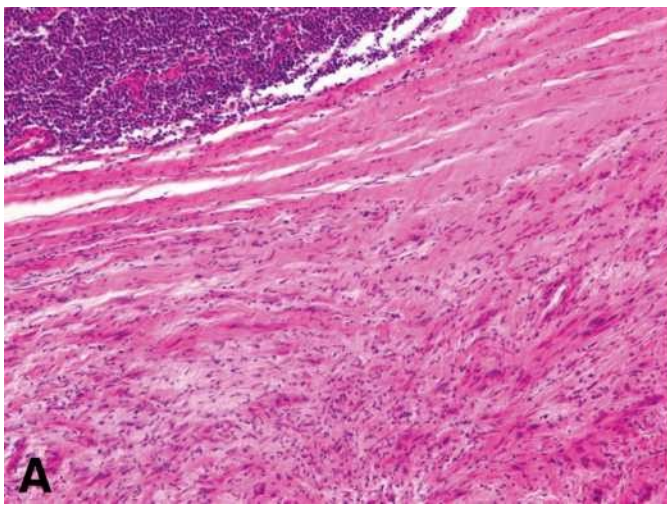


Fig. 3. Mediastinal GIST Case 14, which served as a *KIT*-mutated control case, was composed of epithelioid finely granular oncocyte-like cells (A, H&E). The cells showed only faint non-granular SDHB staining much less intensive than in intratumoral endothelial cells or in GIST Case 9 (B, SDHB Abcam), x 200

deficiency, all Carney triad-related tumors were reported to be *SDHx* wt (Carney et al., 1977; Carney, 1979, 1983; Matyakhina et al., 2007). The tumors traditionally associated with Carney triad are gastric GIST, pulmonary chondroma and paraganglioma, but esophageal leiomyoma and adrenocortical adenoma may also be related to this syndrome (Carney, 2009). Furthermore, a subset of apparently non-syndromic sporadic *KIT/PDGFR*A wt GISTs is also associated with SDH complex dysfunction (Gill et al., 2010, 2011a; Rege et al., 2011). Such tumors occur mainly in children and despite their sporadic nature they are more commonly caused by a germ-line rather than somatic

SDHx mutation (Janeway et al., 2011; Pantaleo et al., 2011a,b). However, even this category of SDHB-deficient GISTs contains *SDHx* wt tumors, in which the mechanism of their SDH-deficiency remains to be explained (Miettinen et al., 2011; Doyle et al., 2012). Regardless of the exact category of SDHB-deficient GISTs, all such tumors share common clinicopathological characteristics: gastric localization, epithelioid or mixed cell morphology, multinodular and/or plexiform arrangement, positive KIT immunostaining (but lack of *KIT/PDGFR*A mutations), frequent lymph node metastases, and relatively indolent clinical behavior (Gill et al., 2010).



SDHB in the differential diagnostics of GIST

Despite the current focus on SDHB-deficient GIST, it is not the only tumor type associated with SDH complex dysfunction. In addition to paraganglioma/pheochromocytoma, which is also well known to occur in an SDHB-deficient form, either in familial or sporadic setting (Gimm et al., 2000; Amar et al., 2005; Mannelli et al., 2009), several other tumors were recently reported to display signs of SDH dysfunction, namely rare renal cell carcinomas (Vanharanta et al., 2004; Ricketts et al., 2008; Gill et al., 2011b,c), pituitary adenoma (Xekouki et al., 2012), and seminoma (Galera-Ruiz et al., 2008). Besides that, neuroblastoma (Schimke et al., 2010), papillary thyroid carcinoma (Neumann et al., 2004), and renal oncocytoma (Henderson et al., 2009) were suggested to be also possible candidates for SDH-deficient tumors, although with no direct immunohistochemical or molecular genetic support.

As we were unaware of any study on SDHB immunoeexpression and/or SDHx mutational analysis of mesenchymal tumors which come into the differential diagnosis of GIST, we collected a short series of the most important GIST mimickers, namely 12 GSs, 20 SFTs, 4 LMs, 16 LMSs, 5 SSs, 3 ESSs, and 1 IMT. For comparison, 11 cases of *KIT/PDGFR α* wt GISTs (7 gastric, 4 intestinal) were studied as well. Moreover, 3 recent cases of *KIT* or *PDGFR α* mut GISTs were used as control cases.

Originally, we classified tumors as SDHB-negative if they showed a lack of staining of neoplastic cells by the Santa Cruz antibody despite positive staining of epithelial cells on the mucosal surface. Using this approach, the category of SDHB-negative tumors included: 7 GISTs (3 gastric, 3 intestinal, and 1 mediastinal), 2 GSs, 5 SFTs, 1 LM, 2 LMSs, and 1 SS. However, on closer inspection in some cases it was found out that intratumoral endothelial cells were also negative. This prompted us to stain the negative cases with monoclonal Abcam antibody. In this setting, endothelial cells were used as internal control. This second round of immunohistochemical investigation reduced the group of SDHB-deficient tumors to 2 GISTs (1 gastric, 1 mediastinal). Others tumors were either reclassified as SDHB-positive or signed out as non-analyzable due to the lack of endothelial staining.

The gastric case, which was SDHB-deficient (GIST Case 8, Fig. 2), occurred in a 12-year old girl with no familial history of a GIST or paraganglioma. At the time of diagnosis, there were no signs of a possible pulmonary chondroma or paraganglioma on record. Molecular genetic analysis ruled out mutations in the hot spots of *KIT*, *PDGFR α* , *SDHB*, *SDHC*, and *SDHD*. According to our current state of knowledge, the tumor should be then ruled out to harbor *SDHA* mutations, either indirectly by SDHA immunohistochemistry or directly by mutational analysis (Pantaleo et al., 2011a,b; Wagner et al., 2013). However, as the issue of SDHA status was beyond the scope of this study (SDHB expression in gastrointestinal mesenchymal tumors), the cost/benefit ratio of such an analysis was found to be

unreasonably high.

The other SDHB-deficient tumor was already published as a case report (Daum et al., 2012). Briefly, GIST Case 14 presented as a mass measuring 13.9x7.6x10.4 cm located in the posterior mediastinum of a 52-year-old white man. The tumor consisted of epithelioid cells with abundant finely granular cytoplasm (Fig. 3). Immunohistochemically, the cells were strikingly immunoreactive with CD117 and antimitochondrial antibody. SDHB staining was only focal and faint, without the characteristic granular pattern. Surprisingly, molecular genetic analysis revealed not only p.W557-K558 deletion in exon 11 of the *KIT* gene but also p.G12S sequence change in exon 1 of the *SDHD* gene. Although this *SDHD* sequence change is currently of questionable pathogenicity, its prevalence is slightly higher in GISTs or paragangliomas than in the control population (Janeway et al., 2011). Neither existing genetic databases nor current literature provides information on the impact of this sequence change. However, the finely granular appearance of the cytoplasm of the neoplastic cells resembling oncocytes, together with striking contrast between faint immunohistochemical positivity of SDHB and strong granular positivity of antimitochondrial antigen antibody, may mirror pseudohypoxia resulting from partial destabilization of the SDH complex due to the *SDHD* G12S sequence change. The incomplete nature of such destabilization might be also responsible for the residual faint focal staining which differs from both typical positive and negative cases. Thus, it is possible that at least some sequence changes in *SDHx* genes and *KIT/PDGFR α* mutations are not necessarily mutually exclusive and that they may even cooperate in tumor progression. Nevertheless, the fact that GIST Case 1, which was undoubtedly SDHB-positive, harbored the same *SDHD* sequence, casts doubt on this theory, although the additional effect of several minor factors cannot be ruled out. Furthermore, the striking oncocyte-like appearance was not observed in other *SDHx* sequence change-positive GIST and SFTs.

No other intraabdominal mesenchymal tumor (namely GS, SFT, LM, LMS, SS, ESS, IMT) was found to be SDHB-deficient if strict criteria (negative reaction of neoplastic cells with two antibodies and positive granular intracytoplasmic staining of endothelial cells) were applied. In spite of SDHB-positivity, 2 SFTs revealed SDHB-D sequence changes. SFT Case 9 showed p.S163P of *SDHB*, and SFT Case 14 harbored p.G12S of *SDHD*.

The significance of *SDHB* and *SDHD* sequence changes detected in 2 GISTs and 2 SFTs remains unclear. As 3 of the tumors were SDHB-positive, and 1 GIST harbored concurrent *KIT* mutation, they can hardly be viewed as "real" oncogenic mutations. The non-neoplastic tissue in GIST Case 14 was proven to contain the same gene sequence as the neoplastic cells did, which, in that setting, speaks more for the possibility of polymorphism than for germ-line mutation. But even

this circumstance does not rule out the possible role of detected changes with certainty. Unfortunately, the other *SDHx* sequence change-positive cases were consultation cases and no non-neoplastic tissue was available for analysis. The precise mechanisms by which SDH complex dysfunction leads to tumor formation have not yet been fully elucidated. An important role is believed to be played by succinate accumulation leading to stabilization of HIF1- α , overexpression of VEGF (Burnichon et al., 2010), and alteration of DNA methylation profiles (Killian et al., 2013; Mason and Hornick, 2013), resulting in angiogenesis and cell proliferation. Although SDH dysregulation is currently viewed as a consequence of an *SDHx* mutation leading to disruption of the whole complex with resultant loss of SDHB expression, the effects of “immunohistochemically silent” sequence changes have not been sufficiently studied yet. Even those subtle structural changes that do not lead to disruption of the enzyme complex may result in a minor decrease of enzyme activity, which may promote tumor growth initiated by another (e. g. *KIT* or *PDGFRA*) mutation. Although the S DHB - tumors are not driven by gain of function mutations of *KIT* or *PDGFRA*, they invariably show immunohistochemical staining for *KIT* protein, a phenomenon which is currently not fully understood (Miettinen et al., 2011). Our study showed no significant difference in *KIT* staining between the SDHB-positive and SDHB-deficient GISTs.

In summary, our study found no intraabdominal mesenchymal tumor other than GIST to be SDHB-deficient. However, analysis of SDHB immun-expression must be performed with caution due to the small amount of cytoplasm in neoplastic cells, mainly in SFTs, smooth muscle tumors, and monophasic SSs. Only intratumoral endothelial cells should be used as internal control because the mucosal epithelium, located usually at the edge of the specimen, may differ in its antigen quality from the more distant neoplastic tissue. In the differential diagnostics, attention also should be paid to other morphological features, as SDHB-deficient GIST should be localized in the stomach, arranged in multinodular/plexiform pattern, composed of epithelioid cells, or mixed in cellular composition. Last but not least, our results raise the suspicion of a possible role of *SDHx* sequence changes of questionable pathogenicity, which may promote tumor growth initiated by another genetic event.

Acknowledgements. This project has been supported by Ministry of Health grant number IGA NT14227.

References

- Agaimy A., Haller F., Gunawan B., Wunsch P.H. and Fuzesi L. (2009). Distinct biphasic histomorphological pattern in gastrointestinal stromal tumours (GISTs) with common primary mutations but divergent molecular cytogenetic progression. *Histopathology* 54, 295-302.
- Agaram N.P., Laquaglia M.P., Ustun B., Guo T., Wong G.C., Socci N.D., Maki R.G., DeMatteo R.P., Besmer P. and Antonescu C.R. (2008). Molecular characterization of pediatric gastrointestinal stromal tumors. *Clin. Cancer Res.* 14, 3204-3215.
- Amar L., Bertherat J., Baudin E., Ajzenberg C., Bressac-de Paillerets B., Chabre O., Chamontin B., Delemer B., Giraud S., Murat A., Niccoli-Sire P., Richard S., Rohmer V., Sadoul J.L., Stropf L., Schlumberger M., Bertagna X., Plouin P.F., Jeunemaitre X. and Gimenez-Roqueplo A.P. (2005). Genetic testing in pheochromocytoma or functional paraganglioma. *J. Clin. Oncol.* 23, 8812-8818.
- Astuti D., Douglas F., Lennard T.W., Aligianis I.A., Woodward E.R., Evans D.G., Eng C., Latif F. and Maher E.R. (2001a). Germline SDHD mutation in familial pheochromocytoma. *Lancet* 357, 1181-1182.
- Astuti D., Latif F., Dallol A., Dahia P.L., Douglas F., George E., Skoldberg F., Husebye E.S., Eng C. and Maher E.R. (2001b). Gene mutations in the succinate dehydrogenase subunit SDHB cause susceptibility to familial pheochromocytoma and to familial paraganglioma. *Am. J. Hum. Genet.* 69, 49-54.
- Barletta J.A. and Hornick J.L. (2012). Succinate dehydrogenase-deficient tumors: diagnostic advances and clinical implications. *Adv. Anat. Pathol.* 19, 193-203.
- Baysal B.E., Ferrell R.E., Willett-Brozick J.E., Lawrence E.C., Myssiorek D., Bosch A., van der Mey A., Taschner P.E., Rubinstein W.S., Myers E.N., Richard C.W. 3rd, Cornelisse C.J., Devilee P. and Devlin B. (2000). Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science* 287, 848-851.
- Burnichon N., Briere J.J., Libe R., Vescovo L., Riviere J., Tissier F., Jouanno E., Jeunemaitre X., Benit P., Tzagoloff A., Rustin P., Bertherat J., Favier J. and Gimenez-Roqueplo A.P. (2010). SDHA is a tumor suppressor gene causing paraganglioma. *Hum. Mol. Genet.* 19, 3011-3020.
- Carney J.A. (1979). The triad of gastric epithelioid leiomyosarcoma, functioning extra-adrenal paraganglioma, and pulmonary chondroma. *Cancer* 43, 374-382.
- Carney J.A. (1983). The triad of gastric epithelioid leiomyosarcoma, pulmonary chondroma, and functioning extra-adrenal paraganglioma: a five-year review. *Medicine (Baltimore)*. 62, 159-169.
- Carney J.A. (2009). Carney triad: a syndrome featuring paraganglionic, adrenocortical, and possibly other endocrine tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 3656-3662.
- Carney J.A. and Stratakis C.A. (2002). Familial paraganglioma and gastric stromal sarcoma: a new syndrome distinct from the Carney triad. *Am. J. Med. Genet.* 108, 132-139.
- Carney J.A., Sheps S. G., Go V.L. and Gordon H. (1977). The triad of gastric leiomyosarcoma, functioning extra-adrenal paraganglioma and pulmonary chondroma. *N. Engl. J. Med.* 296, 1517-1518.
- Corless C.L., Fletcher J.A. and Heinrich M.C. (2004). Biology of gastrointestinal stromal tumors. *J. Clin. Oncol.* 22, 3813-3825.
- Daum O., Sedivcova M., Dubova M. and Michal M. (2012). *KIT* mutations and sequence changes in genes encoding SDH complex possibly need not be mutually exclusive in gastrointestinal stromal tumors. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 20, 523-524.
- Doyle L.A., Nelson D., Heinrich M.C., Corless C.L. and Hornick J.L. (2012). Loss of succinate dehydrogenase subunit B (SDHB) expression is limited to a distinctive subset of gastric wild-type

SDHB in the differential diagnostics of GIST

- gastrointestinal stromal tumours: a comprehensive genotype-phenotype correlation study. *Histopathology* 61, 801-809.
- Gaal J., Stratakis C.A., Carney J.A., Ball E.R., Korpershoek E., Lodish M.B., Levy I., Xekouki P., van Nederveen F.H., den Bakker M.A., O'Sullivan M., Dinjens W.N. and de Krijger R.R. (2011). SDHB immunohistochemistry: a useful tool in the diagnosis of Carney-Stratakis and Carney triad gastrointestinal stromal tumors. *Mod. Pathol.* 24, 147-151.
- Galera-Ruiz H., Gonzalez-Campora R., Rey-Barrera M., Rollon-Mayordomo A., Garcia-Escudero A., Fernandez-Santos J.M., DeMiguel M. and Galera-Davidson H. (2008). W43X SDHD mutation in sporadic head and neck paraganglioma. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 30, 119-123.
- Gill A.J., Chou A., Vilain R., Clarkson A., Lui M., Jin R., Tobias V., Samra J., Goldstein D., Smith C., Sioson L., Parker N., Smith R.C., Sywak M., Sidhu S.B., Wyatt J.M., Robinson B.G., Eckstein R.P., Benn D.E. and Clifton-Bligh R.J. (2010). Immunohistochemistry for SDHB divides gastrointestinal stromal tumors (GISTs) into 2 distinct types. *Am. J. Surg. Pathol.* 34, 636-644.
- Gill A.J., Chou A., Vilain R.E. and Clifton-Bligh R.J. (2011a). "Pediatric-type" gastrointestinal stromal tumors are SDHB negative ("type 2") GISTs. *Am. J. Surg. Pathol.* 35, 1245-1247; author reply 1247-1248.
- Gill A.J., Pachter N.S., Clarkson A., Tucker K.M., Winship I.M., Benn D. E., Robinson B.G. and Clifton-Bligh R. J. (2011b). Renal tumors and hereditary pheochromocytoma-paraganglioma syndrome type 4. *N. Engl. J. Med.* 364, 885-886.
- Gill A.J., Pachter N.S., Chou A., Young B., Clarkson A., Tucker K.M., Winship I.M., Earls P., Benn D.E., Robinson B.G., Fleming S. and Clifton-Bligh R.J. (2011c). Renal tumors associated with germline SDHB mutation show distinctive morphology. *Am. J. Surg. Pathol.* 35, 1578-1585.
- Gimm O., Armanios M., Dziema H., Neumann H.P. and Eng C. (2000). Somatic and occult germ-line mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in nonfamilial pheochromocytoma. *Cancer Res.* 60, 6822-6825.
- Gottlieb E. and Tomlinson I.P. (2005). Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update. *Nat. Rev. Cancer* 5, 857-866.
- Heinrich M.C., Corless C.L., Duensing A., McGreevey L., Chen C.J., Joseph N., Singer S., Griffith D.J., Haley A., Town A., Demetri G.D., Fletcher C.D. and Fletcher J.A. (2003). PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 299, 708-710.
- Henderson A., Douglas F., Perros P., Morgan C. and Maher E.R. (2009). SDHB-associated renal oncocytoma suggests a broadening of the renal phenotype in hereditary paragangliomatosis. *Fam. Cancer* 8, 257-260.
- Hirota S., Isozaki K., Moriyama Y., Hashimoto K., Nishida T., Ishiguro S., Kawano K., Hanada M., Kurata A., Takeda M., Muhammad Tunio G., Matsuzawa Y., Kanakura Y., Shinomura Y. and Kitamura Y. (1998). Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 279, 577-580.
- Hirota S., Ohashi A., Nishida T., Isozaki K., Kinoshita K., Shinomura Y. and Kitamura Y. (2003). Gain-of-function mutations of platelet-derived growth factor receptor alpha gene in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology* 125, 660-667.
- Janeway K.A., Kim S.Y., Lodish M., Nose V., Rustin P., Gaal J., Dahia P.L., Liegl B., Ball E.R., Raygada M., Lai A.H., Kelly L., Hornick J.L., O'Sullivan M., de Krijger R.R., Dinjens W.N., Demetri G.D., Antonescu C.R., Fletcher J.A., Helman L. and Stratakis C.A. (2011). Defects in succinate dehydrogenase in gastrointestinal stromal tumors lacking KIT and PDGFRA mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 314-318.
- Killian J.K., Kim S.Y., Miettinen M., Smith C., Merino M., Tsokos M., Quezado M., Smith W.I. Jr, Jahromi M.S., Xekouki P., Szarek E., Walker R.L., Lasota J., Raffeld M., Klotzle B., Wang Z., Jones L., Zhu Y., Wang Y., Waterfall J.J., O'Sullivan M.J., Bibikova M., Pacak K., Stratakis C., Janeway K.A., Schiffman J.D., Fan J.B., Helman L. and Meltzer P.S. (2013). Succinate dehydrogenase mutation underlies global epigenomic divergence in gastrointestinal stromal tumor. *Cancer discov.* 3, 648-657.
- Mannelli M., Castellano M., Schiavi F., Filetti S., Giacche M., Mori L., Pignataro V., Bernini G., Giache V., Bacca A., Biondi B., Corona G., Di Trapani G., Grossrubatscher E., Reimondo G., Arnaldi G., Giacchetti G., Veglio F., Loli P., Colao A., Ambrosio M.R., Terzolo M., Letizia C., Ercolino T. and Opocher G. (2009). Clinically guided genetic screening in a large cohort of italian patients with pheochromocytomas and/or functional or nonfunctional paragangliomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 1541-1547.
- Mason E.F. and Hornick J.L. (2013). Succinate dehydrogenase deficiency is associated with decreased 5-hydroxymethylcytosine production in gastrointestinal stromal tumors: implications for mechanisms of tumorigenesis. *Mod. Pathol.* 26, 1492-1497.
- Matyakhina L., Bei T.A., McWhinney S.R., Pasini B., Cameron S., Gunawan B., Stergiopoulos S.G., Boikos S., Muchow M., Dutra A., Pak E., Campo E., Cid M.C., Gomez F., Gaillard R.C., Assie G., Fuzesi L., Baysal B.E., Eng C., Carney J.A. and Stratakis C.A. (2007). Genetics of carney triad: recurrent losses at chromosome 1 but lack of germline mutations in genes associated with paragangliomas and gastrointestinal stromal tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 2938-2943.
- McWhinney S.R., Pasini B. and Stratakis C.A. (2007). Familial gastrointestinal stromal tumors and germ-line mutations. *N. Engl. J. Med.* 357, 1054-1056.
- Miettinen M., Wang Z.F., Sarlomo-Rikala M., Osuch C., Rutkowski P. and Lasota J. (2011). Succinate dehydrogenase-deficient GISTs: A clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 66 gastric GISTs with predilection to young age. *Am. J. Surg. Pathol.* 35, 1712-1721.
- Neumann H.P., Pawlu C., Peczkowska M., Bausch B., McWhinney S.R., Muresan M., Buchta M., Franke G., Klisch J., Bley T.A., Hoegerle S., Boedeker C.C., Opocher G., Schipper J., Januszewicz A. and Eng C. (2004). Distinct clinical features of paraganglioma syndromes associated with SDHB and SDHD gene mutations. *JAMA* 292, 943-951.
- Nieman S. and Muller U. (2000). Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3. *Nat. Genet.* 26, 268-270.
- Pantaleo M.A., Astolfi A., Indio V., Moore R., Thiessen N., Heinrich M.C., Gnocchi C., Santini D., Catena F., Formica S., Martelli P.L., Casadio R., Pession A. and Biasco G. (2011a). SDHA loss-of-function mutations in KIT-PDGFRA wild-type gastrointestinal stromal tumors identified by massively parallel sequencing. *J. Natl. Cancer Inst.* 103, 983-987.
- Pantaleo M.A., Nannini M., Astolfi A. and Biasco G. (2011b). A distinct pediatric-type gastrointestinal stromal tumor in adults: Potential role of succinate dehydrogenase subunit A mutations. *Am. J. Surg. Pathol.* 35, 1750-1752.
- Pasini B., McWhinney S.R., Bei T., Matyakhina L., Stergiopoulos S., Muchow M., Boikos S.A., Ferrando B., Pacak K., Assie G., Baudin

SDHB in the differential diagnostics of GIST

- E. , Chompret A., Ellison J.W., Briere J.J., Rustin P., Gimenez-Roqueplo A.P., Eng C., Carney J.A. and Stratakis C.A. (2008). Clinical and molecular genetics of patients with the Carney-Stratakis syndrome and germline mutations of the genes coding for the succinate dehydrogenase subunits SDHB, SDHC, and SDHD. *Eur. J. Hum. Genet.* 16, 79-88.
- Rege T.A., Wagner A.J., Corless C.L., Heinrich M.C. and Hornick J.L. (2011). "Pediatric-type" gastrointestinal stromal tumors in adults: distinctive histology predicts genotype and clinical behavior. *Am. J. Surg. Pathol.* 35, 495-504.
- Ricketts C., Woodward E.R., Killick P., Morris M.R., Astuti D., Latif F. and Maher E.R. (2008). Germline SDHB mutations and familial renal cell carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 100, 1260-1262.
- Schimke R.N., Collins D.L. and Stolle C.A. (2010). Paraganglioma, neuroblastoma, and a SDHB mutation: Resolution of a 30-year-old mystery. *Am. J. Med. Genet. A* 152A, 1531-1535.
- van Nederveen F.H., Gaal J., Favier J., Korpershoek E., Oldenburg R.A., de Bruyn E.M., Sleddens H.F., Derckx P., Riviere J., Dannenberg H., Petri B.J., Komminoth P., Pacak K., Hop W.C., Pollard P.J., Mannelli M., Bayley J.P., Perren A., Niemann S., Verhofstad A.A., de Bruine A.P., Maher E.R., Tissier F., Meatchi T., Badoual C., Bertherat J., Amar L., Alataki D., Van Marck E., Ferrau F. , Francois J., de Herder W.W., Peeters M.P., van Linge A., Lenders J.W., Gimenez-Roqueplo A.P., de Krijger R.R. and Dinjens W.N. (2009). An immunohistochemical procedure to detect patients with paraganglioma and pheochromocytoma with germline SDHB, SDHC, or SDHD gene mutations: a retrospective and prospective analysis. *Lancet Oncol.* 10, 764-771.
- Vanharanta S., Buchta M., McWhinney S.R., Virta S.K., Peczkowska M., Morrison C.D., Lehtonen R., Januszewicz A., Jarvinen H., Juhola M., Mecklin J.P., Pukkala E., Herva R., Kiuru M., Nupponen N.N., Aaltonen L.A., Neumann H.P. and Eng C. (2004). Early-onset renal cell carcinoma as a novel extraparaganglial component of SDHB-associated heritable paraganglioma. *Am. J. Hum. Genet.* 74, 153-159.
- Wagner A.J., Remillard S.P., Zhang Y.X., Doyle L.A., George S. and Hornick J.L. (2013). Loss of expression of SDHA predicts SDHA mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Mod. Pathol.* 26, 289-294.
- Xekouki P., Pacak K., Almeida M., Wassif C.A., Rustin P., Nesterova M., de la Luz Sierra M., Matro J., Ball E., Azevedo M., Horvath A., Lyssikatos C., Quezado M., Patronas N., Ferrando B., Pasini B., Lytras A., Tolis G. and Stratakis C.A. (2012). Succinate dehydrogenase (SDH) D subunit (SDHD) inactivation in a growth-hormone-producing pituitary tumor: a new association for SDH? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, E357-366.

Accepted September 10, 2014

3.3 Nonsyndromic intestinal lipomas are probably not associated with mutations of *PDGFRA*

Cílem této práce byla snaha zjistit, zda střevní lipomy vyskytující se u pacientů bez známek tzv. *PDGFRA* mutačního syndromu mohou reprezentovat sporadické protějšky familiálních lipomatózních tumorů, které se vyskytují ve spektru tumorů asociovaných s germinální mutací *PDGFRA*, tedy s *PDGFRA* mutačním syndromem. *PDGFRA* mutační syndrom se může manifestovat gastrointestinálními stromálními tumory, Vaňkovými tumory, fibrózními tumory a submukózními střevními lipomy. Až do naší studie nebyla ve světové literatuře žádná zmínka o molekulárně-genetické analýze mutací *PDGFRA* ve střevních lipomech.

V práci jsme provedli mutační analýzu exonu 12,14 a 18 genu *PDGFRA* ve skupině 20 nádorů od 17 pacientů. Žádný z 16 analyzovatelných vzorků nevykazoval mutaci *PDGFRA*, tato mutace tak s vysokou pravděpodobností nebude hrát důležitou roli v rozvoji sporadických střevních lipomů.

Nonsyndromic Intestinal Lipomas are Probably not Associated With Mutations of *PDGFRA*

Magdalena Dubova, MD,* Monika Sedivcova, MSc,f Bohuslava Saskova, MD,*f
Sarka Hadravska, MD,*f and Ondrej Daum, MD, PhD*f

Abstract: The purpose of this study was to test the hypothesis that intestinal lipomas occurring in patients devoid of signs of *PDGFRA*-mutant syndrome might represent sporadic counterparts of familial lipomatous tumors occurring in the spectrum of tumors associated with *PDGFRA* mutations. *PDGFRA* -mutant syndrome may manifest with gastrointestinal stromal tumors, Vanek tumors, fibrous tumors, and lipomatous tumors. Until now there has been no molecular genetic study of *PDGFRA* mutations in intestinal lipomas published in the world literature. A series of 20 intestinal lipomas were obtained from 17 patients, and mutational analysis of exons 12, 14, and 18 of the *PDGFRA* gene was performed. None of the 16 analyzable tumors showed mutations in *PDGFRA*. Thus, *PDGFRA* mutations probably do not play an important role in the development of sporadic lipomas of the intestines.

Key Words: sporadic, intestinal lipoma, *PDGFRA*-mutant syndrome, *PDGFRA*, familial GIST syndrome

(*Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2017;25:664-667)

Intestinal lipomas are relatively common benign mesenchymal tumors of the gastrointestinal tract that can be encountered particularly in the large intestine.¹ In most cases, they arise from the submucosa and only occasionally extend into the muscularis propria and subserosa. Histologically, they do not differ significantly from lipomas located in soft tissues. Small tumors are mostly asymptomatic and may be discovered incidentally at colonoscopy, through radiologic examination, or at autopsy. Larger intestinal lipomas (usually >2 cm in diameter) are more likely to cause various symptoms, for example,

abdominal pain, intestinal obstruction, hemorrhage, or intussusception.²⁻⁴

Intestinal lipomas can occur either in a sporadic setting or as a component of a familial tumor syndrome, which is associated with germline mutations of the *PDGFRA* gene, so-called *PDGFRA*-mutant syndrome.^{5,6} *PDGFRA*-mutant syndrome is a condition inherited in autosomal dominant trait, formerly termed intestinal neurofibromatosis (neurofibromatosis 3b) and later recognized as a subtype of familial GIST syndrome.^{5,7-9} Tumors found in this syndrome encompass stomach-restricted gastrointestinal stromal tumors (GISTs) without accompanying Cajal cell hyperplasia, Vanek tumors (inflammatory fibroid polyps), fibrous tumors, and intestinal lipomas.⁶

Although *PDGFRA* -mutated GISTs, Vanek tumors, and fibrous tumors are known to occur also sporadically in a nonsyndromic setting,^{7,8,10-12} sporadic *PDGFRA* -mutated lipomas have not been recorded yet. We aimed to find out whether mutations of *PDGFRA* gene could take part in the development of sporadic intestinal lipomas. Therefore, we performed this study of 20 sporadic intestinal lipomas, in which we analyzed their molecular-genetic profile.

MATERIALS AND METHODS

A series of 20 intestinal lipomas obtained from 17 patients were retrieved from our archives. All tumors used in this study were previously defined on the basis of their morphology during routine daily service and reviewed by 2 authors (S. H. and O. D.). As the second step, molecular genetic analysis of exons 12, 14, and 18 was performed in all cases.

Tissue for light microscopy was fixed in 4% formaldehyde and embedded in paraffin using routine procedures. DNA for molecular genetic investigation was extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissues. Several 5-mm-thick sections were placed on the slides. Hematoxylin and eosin-stained slides were examined for determination of the area of tumor tissue. Then, tumor tissue from unstained slides was scraped and DNA from FFPE tumor tissue was extracted using the QIA-symphony DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) on the automated extraction system (QIASymphony SP; Qiagen) according to the manufacturer's supplementary protocol for FFPE samples (purification of genomic DNA

Received for publication January 10, 2016; accepted February 8, 2016.

From the *Sikl's Department of Pathology, Medical Faculty Hospital, Medical Faculty in Plzen, Charles University in Prague; and fBiopsticka Laborator s.r.o., Plzen, Czech Republic.

The study has been partially supported by Ministry of Health grant number IGA NT14227 and the Charles University Research Fund SVV 260171/2015.

The authors declare no conflict of interest.

Reprints: Magdalena Dubova, MD, Sikl's Department of Pathology, Medical Faculty Hospital, Medical Faculty in Plzen, Charles University in Prague, Edvarda Benese 13, Plzen 305 99, Czech Republic (e-mail: dubovam@fnplzen.cz).

Copyright © 2016 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

from FFPE tissue using the QIAamp DNA FFPE tissue kit and deparaffinization solution). Concentration and purity of isolated DNA was measured using NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE). DNA integrity was examined by amplification of control genes in a multiplex PCR.

Mutational analysis of exons 12, 14, and 18 of the *PDGFRA* gene (accession number D50017) was performed using PCR and direct sequencing.

PCR was carried out using primers shown in Table 1. The reaction conditions were as follows: 12.5 mL of Hot-Start Taq PCR Master Mix (Qiagen), 10 pmol of each primer, 100 ng of template DNA, and distilled water up to 25 mL. The amplification program consisted of denaturation at 95°C for 15 minutes and then 40 cycles of denaturation at 95°C for 1 minute, annealing at 55°C for 1 minute, and extension at 72°C for 1.5 minutes for all amplicons. The program was completed by 72°C incubation for 7 minutes. The PCR products were separated by electrophoresis through a 2% agarose gel.

Successfully amplified PCR products were purified with magnetic particles Agencourt AMPure (Agencourt Bioscience Corporation, A Beckman Coulter Company, Beverly, MA), both side sequenced using Big Dye Terminator Sequencing kit (PE/Applied Biosystems, Foster City, CA) and purified with magnetic particles Agencourt CleanSEQ (Agencourt Bioscience Corporation, A Beckman Coulter Company), all according to the manufacturer's protocol, and then they were run on an automated sequencer ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems) at a constant voltage of 13.2 kV for 20 minutes.

RESULTS

Details on the patients and tumors are shown in Table 2. Briefly, the M/F ratio was 8/9; age of the patients ranged from 45 to 84 years (average: 64.7 y); lipomas were situated in the small intestine (n = 1), ileocecal valve (n = 3), cecum (n = 3), ascending colon (n = 4), hepatic flexure (n = 2), transverse colon (n = 1), lineal flexure (n = 1), sigmoid colon (n = 3), and rectum (n = 2); and the maximum size of the tumors ranged from 0.3 to 6 cm (average: 1.76 cm). One patient presented with 3 lipomas, another one with 2 lipomas, and 15 patients each had only 1 lipoma detected. In most cases there were additional pathologic findings present, which are summarized in Table 2.

DNA of 4 tumors was nonanalyzable; all remaining 16 tumors with sufficient quality of DNA were found to bear wild-type alleles of exons 12, 14, and 18 of the *PDGFRA* gene.

DISCUSSION

PDGFRA, the gene encoding platelet-derived growth factor receptor- α (PDGFR α), is located in the long arm of chromosome 4 in close vicinity of the *KIT* gene, another member of the PDGFR family of receptor tyrosine kinases.¹³ In human pathology, activating mutations of *PDGFRA* are mostly known to be associated with a subset of GIST.^{13,14} Activating mutations of *PDGFRA* were reported to be responsible for 30% to 60% of KIT-immunonegative and/or *KIT*-wild-type tumors fulfilling histologic criteria of GIST. The *PDGFRA*-mutated GISTs are predominantly located in the stomach,¹⁵⁻¹⁸ are composed of epithelioid cells,¹⁵⁻²² and contain admixture of multinucleated giant cells,²¹ myxoid stroma, and infiltrates of mast cells.^{22,23}

Notably, activating mutations of *PDGFRA* were also detected in Vanek tumors (also called inflammatory fibroid polyps)^{10,11,24} and peculiar fibrous stromal tumors.^{7,12}

All the aforementioned tumors can also occur in a setting of familial tumor syndrome caused by germline mutations of *PDGFRA*, currently termed PDGFR α -mutant syndrome.⁶ This condition inherited in the autosomal dominant trait is a subtype of familial GIST syndrome formerly designated intestinal neurofibromatosis (neurofibromatosis 3b).^{5,7-9} Unlike KIT-dependent familial GIST syndrome, multiple GISTs occurring in the setting of *PDGFRA*-mutant syndrome may be accompanied by multiple Vanek tumors (inflammatory fibroid polyps) and gastrointestinal CD34-positive fibrous tumors of uncertain classification, which we term "fibrous stromal tumors." Furthermore, in contrast to KIT-dependent familial GIST syndrome, if present, GISTs are limited to the gastric area and diffuse Cajal cell hyperplasia is not observed.^{6,25} Apart from these 3 classic PDGFR α -mutated tumor types, in individual families additional lesions were described, namely abnormally large hands²⁶ and multiple intestinal lipomas (or "fatty tumors").^{5,8}

Intestinal lipomas are relatively common tumors of the gastrointestinal tract. In overwhelming majority of cases, they occur in a sporadic setting; however, recent studies reported on multiple occurrence of intestinal lipomas in the setting of PDGFR α -mutant syndrome.^{5,6} Even though there is a well-known occurrence of *PDGFRA*-mutated gastrointestinal mesenchymal tumors, such as GISTs and Vanek tumors, in sporadic non-syndromic setting, until now, no study on *PDGFRA*-mutant status of intestinal lipomas has been published.

As we were unaware of any study on *PDGFRA* mutational analysis of intestinal fatty tumors, we collected a series of 20 intestinal lipomas obtained from

TABLE 1. Primers Used for PCR Amplification and Sequencing of *PDGFRA* Gene

<i>PDGFRA</i> Exon	Forward Primer Sequence 5'-3'	Reverse Primer Sequence 5'-3'
12	TCCAGTCACTGTGCTGCTTC	GGAGGTTACCCCATGGAAC
14	TCACAGGATTAGTCAT ATTCTTGGTT	TGAAAATCCTCACTCCAGGTC
18	GCTACAGATGGCTTGATCCTG	GACCAGTGAGGGAAGTGAGG

TABLE 2. Clinicopathologic Features and PDGFRA Status

Patient No.	Sex	Age (y)	Size	Localization	PDGFRA	Other Findings
1	F	78	Max. dim. 0.5 cm	Cecum	wt	Adenocarcinoma of the sigmoid colon
2	F	69	2 × 2.1 × 1.2 cm. 1.5 × 1.1 × 0.4 cm. 2 × 2.5 × 0.6 cm	Hepatic flexure (2), sigmoid colon (1) Rectum	wt	2 tubular adenomas, 2 uterine leiomyomas, meningioma
3	F	45	1.5 × 1 × 0.7 cm	Cecum	wt	
4	M	75	Max. dim. 2 cm	Cecum	wt	Hepatocellular carcinoma
5	M	45	Max. dim. 0.3 cm	Sigmoid colon	wt	Cutaneous basaloma
6	F	72	1.7 × 1.4 × 1 cm	Sigmoid colon	wt	Nuchal lipoma
7	M	56	6 × 4 × 3 cm	Ileal flexure	wt	Nonalcoholic fatty liver disease
8	F	55	5 × 4.5 × 3.8 cm	Ascending colon	wt	Preperitoneal lipoma
9	F	61	Max. dim. 1 cm	Cecum	wt	Manually invasive ductal adenocarcinoma
10	M	68	Max. dim. 2.2 cm	Small intestine	wt	Intussusception
11	M	58	Max. dim. 0.6 cm	Transverse colon	wt	
12	F	80	1.5 × 0.5 × 1 cm	Ileocecal valve	wt	Several tubular and tubulovillous adenomas
13	M	65	3.3 × 2.5 × 1 cm	Ileocecal valve	NA	Adenocarcinoma of the hepatic flexure
14	M	71	Max. dim. 0.9 cm	Ascending colon	NA	Vulgar verruca, ganglion
15	F	63	Max. dim. 0.6 cm	Rectum	NA	
16	F	56	Max. dim. 0.3 cm	Ileocecal valve	NA	
17	M	84	Max. dim. 1.2 cm and 0.5 cm	Ascending colon (2)	wt	Tubulovillous adenoma

F indicates female; M, male; max. dim., maximum dimension; NA, nonanalyzable; wt, PDGFRA wild-type.

patients devoid of signs of PDGFRA-mutant syndrome and carried out molecular genetic investigation to test the hypothesis that sporadic intestinal lipomas may represent sporadic counterparts of the “fatty tumors” described in association with PDGFRA-mutant syndrome. Our study did not reveal any mutations in PDGFRA exons 12, 14, and 18 in any of the 16 analyzable tumors.

Thus, we suggest that PDGFRA mutations probably do not play an important role in the development of sporadic intestinal lipomas, and their pathogenesis, as well as relation to the syndromic fatty tumors, is currently still questionable.

In conclusion, our study is the first study investigating PDGFRA status in sporadic nonsyndromic intestinal lipomas. In contrast to lipomas occurring in the setting of PDGFRA-mutant syndrome, their sporadic counterparts do not harbor mutations in any of the hot spots of PDGFRA gene.

REFERENCES

1. Atila K, Terzi C, Obuz F, et al. Symptomatic intestinal lipomas requiring surgical interventions secondary to ileal intussusception and colonic obstruction: report of two cases. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2007;13:227-231.
2. Presti ME, Flynn MF, Schuval DM, et al. Colonic lipoma with gastrointestinal bleeding and intussusception. *ACG Case Rep J.* 2015;2:135-136.
3. Tascilar O, Cakmak GK, Gun BD, et al. Clinical evaluation of submucosal colonic lipomas: decision making. *World J Gastroenterol.* 2006;12:5075-5077.
4. Mouaqit O, Hasnai H, Chbani L, et al. Pedunculated lipoma causing colo-colonic intussusception: a rare case report. *BMC Surg.* 2013;13:51.
5. Carney JA, Stratakis CA. Stromal, fibrous, and fatty gastrointestinal tumors in a patient with a PDGFRA gene mutation. *Am J Surg Pathol.* 2008;32:1412-1420.
6. Ricci R, Martini M, Cenci T, et al. PDGFRA-mutant syndrome. *Mod Pathol.* 2015;28:954-964.
7. Liu T, Willmore-Payne C, Layfield LJ, et al. A gastrointestinal stromal tumor of the stomach morphologically resembling a neurofibroma: demonstration of a novel platelet-derived growth factor receptor alpha exon 18 mutation. *Hum Pathol.* 2008;39:1849-1853.
8. Pasini B, Matyakhina L, Bei T, et al. Multiple gastrointestinal stromal and other tumors caused by platelet-derived growth factor receptor alpha gene mutations: a case associated with a germline V561D defect. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:3728-3732.
9. De Raedt T, Cools J, Debicq-Rychter M, et al. Intestinal neurofibromatosis is a subtype of familial GIST and results from a dominant activating mutation in PDGFRA. *Gastroenterology.* 2006;131:1907-1912.
10. Schildhaus HU, Cavlar T, Binot E, et al. Inflammatory fibroid polyps harbour mutations in the platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFRA) gene. *J Pathol.* 2008;216:176-182.
11. Lasota J, Wang ZF, Sobin LH, et al. Gain-of-function PDGFRA mutations, earlier reported in gastrointestinal stromal tumors, are common in small intestinal inflammatory fibroid polyps. A study of 60 cases. *Mod Pathol.* 2009;22:1049-1056.
12. Daum O, Zalud R, Grossmann P, et al. A case of imatinib-naive ileal fibrous stromal tumor with unusual morphology and double PDGFRA mutation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2010;18:484-485.
13. Kawagishi J, Kumabe T, Yoshimoto T, et al. Structure, organization, and transcription units of the human alpha-platelet-derived growth factor receptor gene, PDGFRA. *Genomics.* 1995;30:224-232.
14. Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, et al. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science.* 2003;299:708-710.

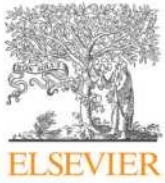
15. Lasota J, Dansonka-Mieszkowska A, Sobin LH, et al. A great majority of GISTs with PDGFRA mutations represent gastric tumors of low or no malignant potential. *Lab Invest.* 2004;84:874-883.
16. Debiec-Rychter M, Wasag B, Stul M, et al. Gastrointestinal stromal tumours (GISTs) negative for KIT (CD117 antigen) immunoreactivity. *J Pathol.* 2004;202:430-438.
17. Wardelmann E, Hrychuk A, Merkelbach-Bruse S, et al. Association of platelet-derived growth factor receptor alpha mutations with gastric primary site and epithelioid or mixed cell morphology in gastrointestinal stromal tumors. *J Mol Diagn.* 2004;6:197-204.
18. Penzel R, Aulmann S, Moock M, et al. The location of KIT and PDGFRA gene mutations in gastrointestinal stromal tumours is site and phenotype associated. *J Clin Pathol.* 2005;58:634-639.
19. Yamamoto H, Oda Y, Kawaguchi K, et al. c-kit and PDGFRA mutations in extragastrointestinal stromal tumor (gastrointestinal stromal tumor of the soft tissue). *Am J Surg Pathol.* 2004;28:479-488.
20. Yi ES, Strong CR, Piao Z, et al. Epithelioid gastrointestinal stromal tumor with PDGFRA activating mutation and immunoreactivity. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2005;13:157-161.
21. Pauls K, Merkelbach-Bruse S, Thal D, et al. PDGFRA and c-kit-mutated gastrointestinal stromal tumours (GISTs) are characterized by distinctive histological and immunohistochemical features. *Histopathology.* 2005;46:166-175.
22. Sakurai S, Hasegawa T, Sakuma Y, et al. Myxoid epithelioid gastrointestinal stromal tumor (GIST) with mast cell infiltrations: a subtype of GIST with mutations of platelet-derived growth factor receptor alpha gene. *Hum Pathol.* 2004;35:1223-1230.
23. Daum O, Grossmann P, Vanecek T, et al. Diagnostic morphological features of PDGFRA-mutated gastrointestinal stromal tumors: molecular genetic and histologic analysis of 60 cases of gastric gastrointestinal stromal tumors. *Ann Diagn Pathol.* 2007;11:27-33.
24. Daum O, Hatlova J, Mandys V, et al. Comparison of morphological, immunohistochemical, and molecular genetic features of inflammatory fibroid polyps (Vanek's tumors). *Virchows Arch.* 2010;456:491-497.
25. Antonescu CR, Viale A, Sarran L, et al. Gene expression in gastrointestinal stromal tumors is distinguished by KIT genotype and anatomic site. *Clin Cancer Res.* 2004;10:3282-3290.
26. Chompret A, Kannengiesser C, Barrois M, et al. PDGFRA germline mutation in a family with multiple cases of gastrointestinal stromal tumor. *Gastroenterology.* 2004;126:318-321.

3.4 Morphological features useful in the differential diagnosis between undifferentiated carcinoma and gastrointestinal stromal tumor

Nediferencované (sarkomatoidní) karcinomy mohou vykazovat překryvné morfologické rysy s gastrointestinálním stromálním tumorem (GIST). Za účelem zefektivnění diagnostiky těchto tumorů (bez nadbytečného využívání imunohistochemie a molekulárně-genetických testů) by bylo vhodné definovat jednoznačně užitečné morfologické znaky využitelné pro histologickou diferenciální diagnostiku u těchto lézí.

V rámci multiinstitucionální spolupráce bylo vyhledáno a do studie zařazeno celkem 5 tumorů klasifikovaných jako nediferencované (sarkomatoidní) karcinomy s jednoznačným důkazem správné diagnózy (tedy s přítomností diferencované karcinomové složky). Jako kontrolní skupina (pro srovnání) sloužila skupina 84 případů GIST s prokázanou mutací v genu *KIT* nebo *PDGFRA*. Všechny tumory byly podrobeny detailní morfologické analýze. Na podkladě našich pozorování byl nález lymfatické invaze a mezi nádorovými buňkami zachycené nenádorové tukové tkáně silně podporující diagnózu nediferencovaného karcinomu. Dále u všech 5 případů nediferencovaných karcinomů bylo detekováno střídání low-grade a high-grade oblastí, tvorba „angiosarcomatous-like“ prostor a přítomnost „yolk sac-like“ oblastí, naopak tyto morfologické znaky byly vyjádřeny pouze u 1,2 %, 2,4 %, resp. 7,2 % GISTů. Imunohistochemický průkaz DOG1 byl negativní ve všech případech nediferencovaného karcinomu.

Na podkladě této studie lze konstatovat, že přítomnost výše uvedených histologických znaků by měla vést k extenzivnímu samplingu léze za účelem detekce diferencované karcinomové složky tumoru. Vzhledem k malému počtu případů nediferencovaného karcinomu, které jsou v naší studii k dispozici, je však pro definitivní stanovení závěrů nutná další větší multiinstitucionální studie.



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Annals of Diagnostic Pathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/anndiagpath



Original Contribution

Morphological features useful in the differential diagnosis between undifferentiated carcinoma and gastrointestinal stromal tumor

Bohuslava Vankova^{a,b}, Kristyna Behenska^a, Meret Bauer^a, Monika Sedivcova^b, Magdalena Daumova^{a,b}, Abbas Agaimy^c, Michal Michal^a, Ondrej Daum^{a,b,s}

^a Siki's Institute of Pathology, Faculty of Medicine and Teaching Hospital in Plzen, Charles University, Plzen, Czech Republic

^b Bioptical Laboratory, Ltd., Plzen, Czech Republic

^c Institute of Pathology, University Hospital, Friedrich-Alexander University Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Gastrointestinal stromal tumor
GIST
Undifferentiated carcinoma
Sarcomatoid carcinoma
Differential diagnostics

ABSTRACT

Undifferentiated (sarcomatoid) carcinomas may closely mimic gastrointestinal stromal tumors (GISTs) due to possible histological and immunohistochemical overlap between these two entities. To avoid unnecessary employment of a wide spectrum of immunohistochemical stainings and molecular genetics and thus decrease costs, finding simple morphological features to target further investigation of such neoplasms of the gastrointestinal tract would be helpful.

Five cases classified as undifferentiated (sarcomatoid) carcinomas with a definite proof of the diagnosis, i. e. the presence of a differentiated carcinomatous component, were retrieved from archives of several institutions. For comparison, 84 cases of GIST mutated in *KIT* or *PDGFRA* genes served as the control group. Hematoxylin and eosin stained slides were evaluated for the presence of patterns which might discriminate between sarcomatoid carcinoma and GIST.

Lymphatic invasion and entrapment of fat tissue strongly favor the diagnosis of undifferentiated carcinoma, as it was found in all or almost all cases of undifferentiated carcinoma, but in no GIST. Alternation of low- and high- grade areas, formation of angiosarcomatous-like spaces, and the presence of yolk sac-like areas were also detected in all cases of undifferentiated carcinoma, but only in 1.2%, 2.4% and 7.2% of the GISTs, respectively. Furthermore, DOG1 was negative in all cases of undifferentiated carcinoma.

According to this study, the presence of the histological findings listed above should prompt extensive tumor sampling in order to find a differentiated carcinomatous component. However, due to the small number of cases of undifferentiated carcinoma available for the study, a larger multi-institutional study is warranted.

1. Introduction

Gastrointestinal stromal tumor (GIST) is the most common mesenchymal tumor of the digestive system [1,2]. The overwhelming majority of GISTs harbor mutations in the *KIT* or *PDGFRA* genes [3-5], less commonly they may show genetic or epigenetic alterations of genes encoding subunits of mitochondrial succinate dehydrogenase [6-8]. A small subset of GISTs harbors mutations of *NF1* [9], *RAS*, *BRAF* [10,11], *EGFR* [12], or oncogenic fusions of genes encoding receptor tyrosine kinases *FGFR1* or *NTRK3* [13,14]. Typical GISTs are composed of spindle shaped and/or epithelioid cells, which are usually immunohistochemically positive for CD117 (*KIT*) and/or DOG1 (anocytamin-1, *ANO1*) [15-17].

Undifferentiated carcinoma lacks morphological,

immunohistochemical, and molecular evidence of differentiation beyond that of epithelial tumor. It is also regarded as anaplastic carcinoma and divided into various morphological subtypes, e.g. sarcomatoid carcinoma, pleomorphic carcinoma, large cell carcinoma with rhabdoid phenotype, carcinoma with osteoclast-like giant cells or carcinoma with sarcomatoid components. Although some definitions require the complete absence of any differentiated epithelial component, less stringent criteria are advisable, because those minor components may serve as the only reliable proof of the presumed "carcinomatous nature" of the tumor, as other definitive positive diagnostic markers are lacking. Especially the sarcomatoid subtype composed of spindle shaped cells may closely mimic a GIST, as it may even show aberrant expression of CD117 [18,19].

We encountered a case of colonic tumor closely resembling a GIST

* Corresponding author at: Siki's Institute of Pathology, Teaching Hospital in Plzen, Edvarda Benese 13, Plzen 305 99, Czech Republic.

E-mail address: DAUM@fnplzen.cz (O. Daum).

<https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2020.151527>

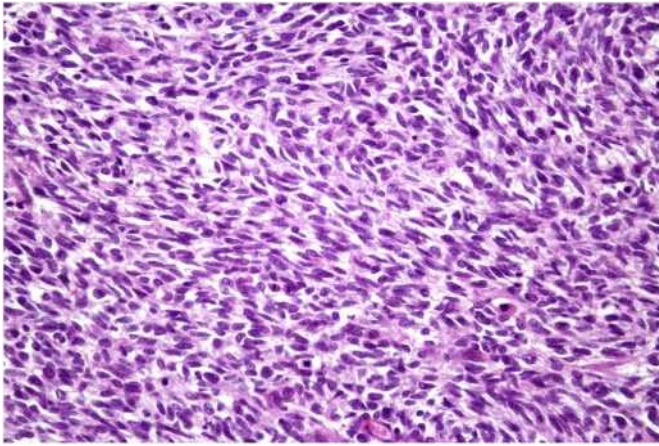


Fig. 1. The index case of undifferentiated carcinoma composed of plump spindle cells (H&E, 200x).

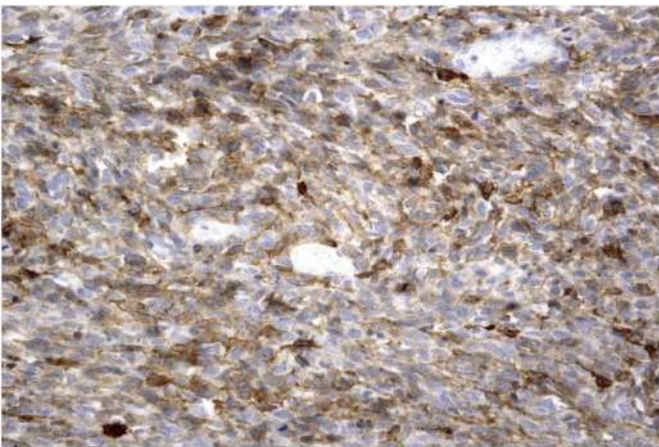


Fig. 2. The neoplastic cells in the index case expressed KIT protein (CD117, 200x).

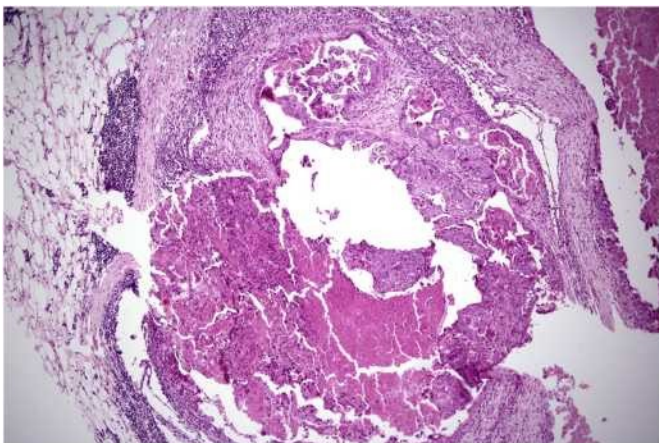


Fig. 3. Mesocolic lymph node of the index case infiltrated by adenocarcinoma (H&E, 100x).

(Fig. 1), including immunoreexpression of CD117 (Fig. 2) and lack of expression of cytokeratins in the initial regular slides of the tumor. However, due to the finding of a metastasis of adenocarcinoma in one of the mesocolic lymph nodes (Fig. 3), the entire mass of the tumor was eventually submitted to paraffin blocks. This finally led to the finding of a component of differentiated adenocarcinoma in four blocks (out of 88) (Fig. 4). Furthermore, molecular genetic analysis, performed to rule

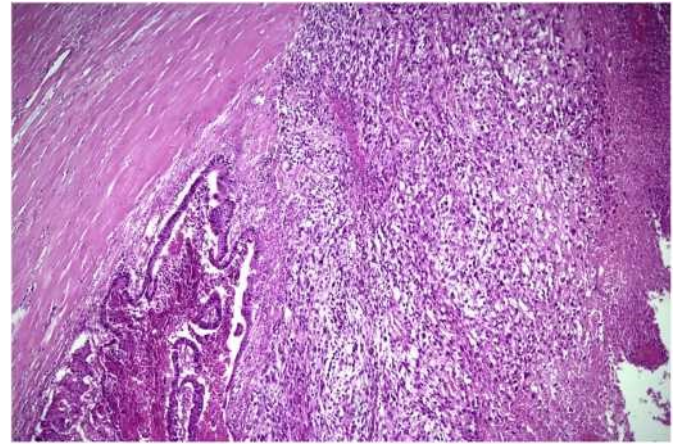


Fig. 4. A minor component of adenocarcinomatous differentiation found in the index tumor after its complete sampling (H&E, 100x).

out the possibility of a collision tumor, revealed that the sarcomatoid component was *KIT* and *PDGFRA* wild type.

This index case prompted us to perform a retrospective study to compare morphological features of GISTs and GIST-mimicking sarcomatoid carcinomas of the digestive tract.

1. Material and methods

Eighty-four cases of GIST with proven mutation in *KIT* or *PDGFRA* were retrieved from the authors' archives. Upon request, we collected 14 cases of gastrointestinal undifferentiated carcinoma from several institutions, but 9 of them had to be discarded from the study group because of the lack of definite proof of diagnosis, i. e. a differentiated carcinomatous component, and/or small specimen size (e.g. endoscopic biopsies) precluding representability of histomorphological studies of such samples.

In all cases, the tissue was fixed in 10% formalin, routinely processed and embedded in paraffin, and 4 μ m thick sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E).

1.1. Histological evaluation of selected morphological features

Selection of histological signs for analysis was based on initial scanning review of samples of H&E stained slides of the index case. The selected features included: mitotic index counted as in GIST (number of mitoses per 5 mm²), presence of rhabdoid cells, multinucleated cells, lymphatic invasion, vesicular nuclei, entrapped fat, skeinoid fibers, angiosarcomatous-like spaces, yolk sac-like areas, alternation of low- and high-grade areas, glassy cells, and perinuclear vacuoles. Rhabdoid cells, multinucleated cells, lymphatic invasion, vesicular nuclei, entrapped fat, angiosarcomatous-like spaces, and yolk sac-like areas were evaluated only as present or absent. Skeinoid fibers and perinuclear vacuoles were scored in 4 grades (0-negative; 1-scarce, found at high magnification; 2-few, found at medium power; 3-numerous, easily seen at scanning magnification). Evaluation of alternation of low- and high-grade areas was not based on specific grading of GIST, which is derived from the mitotic index, but on a general pattern consisting of cellular crowding, nucleocytoplasmic ratio, cellular and nuclear pleomorphism, and abnormalities of chromatin texture. It was then expressed in 3 grades (0-only low-grade; 1-only high-grade; 2-alternation of low- and high-grade). Yolk sac-like areas were specifically defined as being reminiscent of the microcystic/reticular pattern of yolk sac tumors. Glassy cells were recognized as polygonal cells with voluminous pale eosinophilic cytoplasm of ground glass appearance.

Five of the authors were involved in independent and blinded review of all slides after initial tutorial. At the end of this process, final

scores were assigned based on consensus review.

1.2. Immunohistochemistry

For immunohistochemical investigations, the following primary antibodies were used: Anti-Pan Keratin (AE1/AE3/PCK26, RTU, Ventana, Tucson, AZ), anti-Cytokeratin (CAM 5.2, RTU, Ventana, Tucson, AZ), CD117, c-kit (polyclonal, 1:800, Dako, Glostrup, Denmark), DOG1 (SP31, RTU, Cell Marque, Rocklin, CA), Anti-Human Chromogranin A (DAK-A3, 1:400, Dako, Glostrup, Denmark), Synaptophysin Ab-4 (polyclonal, 1:350, NeoMarkers, Fremont, CA), INSM1 (A8, 1:1000, Santa Cruz, Heidelberg, Germany), TLE1 (M-101, 1:100, Santa Cruz, Heidelberg, Germany), Anti-SALL4 (6E3, 1:800, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), CD31, Endothelial Cell (JC70A, 1:40, Dako, Glostrup, Denmark), and Ki-67 (30-9, RTU, Ventana, Tucson, AZ). No special pre-treatment was used. The immunohistochemical analysis was performed using a Ventana BenchMark ULTRA (Ventana Medical System, Inc., Tucson, Arizona). Appropriate positive and negative control slides were employed. While AE1/3, CAM5.2, CD117 and Ki-67 were studied in all samples, only the cases of undifferentiated carcinoma were stained for TLE1, DOG1, chromogranin, synaptophysin, INSM1, SALL4, and CD31.

Stained slides were independently and blindly reviewed by three of the authors. Afterwards, final results were obtained upon consensus.

1.3. Molecular genetics

DNA from FFPE tissue was extracted using a QIASymphony DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) on an automated extraction system (QIASymphony SP, Qiagen) according to the manufacturer's supplementary protocol for FFPE samples.

Mutational analysis of coding sequences, including exons 9, 11, 13 and 17 of the *KIT* gene (accession number U63834), and exons 12, 14 and 18 of the *PDGFRA* gene (accession number D50017) was performed.

2. Results

2.1. General clinicopathological data

In total, 84 cases of GIST and 5 cases of undifferentiated carcinoma were collected. The number of paraffin blocks available for each case ranged from 1 to 88.

2.1.1. GIST group

The mean age of patients in this group was 64.5 (range: 29-92). M:F ratio was 1:1. Gastric location was the most common ($n = 66$), followed by the small intestine ($n = 12$). Three cases occurred in the colorectum, 1 in the mediastinum (possibly representing extramural growth of a lower esophageal or upper gastric tumor), and 2 cases were liver metastases of suspected primary gastric tumors. The average largest dimension of the tumors was 6.2 cm (range: 0.5-20 cm). All tumors were imatinib-naive.

2.1.2. Undifferentiated carcinoma group

The mean age of patients in this group was 69.2 (range: 50-78). M:F ratio was 2:3. The large intestine was the most common site of occurrence ($n = 3$), the small intestine and pancreas each hosted 1 tumor. Data on tumor size was available in 4 cases (the fifth case was only described as "large" in the original report). The average largest dimension of the 4 tumors was 11.75 cm (range: 3-17 cm). After exclusion of a case, which was later found to represent an intestinal metastasis of pulmonary carcinoma, the average largest dimension of the 3 tumors was 14.7 cm (range: 12-17 cm).

2.2. Immunohistochemistry

2.2.1. GIST group

CD117 was positive in 67 cases of GIST. Of the CD117-negative tumors 2 harbored mutations in exon 11 of *KIT* gene, 2 were mutated in *PDGFRA* exon 12, and 13 harbored mutations in exon 18 of *PDGFRA* gene. Fifteen of the CD117-negative tumors were of mixed or epithelioid pattern.

Only 7 GISTs were positive for AE1/3, five of them mutated in exon 11 of *KIT* gene and 2 in *PDGFRA* exon 18. Four of the AE1/3-positive tumors showed mixed or epithelioid pattern.

CAM5.2 was positive in 2 cases of GIST, one harboring mutation in exon 11 of *KIT* gene and the other one in exon 18 of *PDGFRA*.

2.2.2. Undifferentiated carcinoma group

All 5 cases of undifferentiated carcinoma were immunohistochemically negative for DOG1, chromogranin, synaptophysin, INSM-1, and cytokeratins stained with antibody CAM5.2. None of the cases stained with antibody against TLE1, which was used to rule out the possibility of synovial sarcoma. SALL4 was negative in all cases. The cells lining angiosarcomatous-like spaces were not decorated by the antibody against CD31 in any of the tumors. Only the index case showed positive staining for CD117. Conversely, only the index case was negative in an immunohistochemical reaction with the Anti-Pan Keratin antibody (AE1/3).

2.3. Molecular genetics

Sixty-one cases of GIST harbored mutations in *KIT*, specifically exon 9 ($n = 4$), exon 11 ($n = 56$) and exon 13 ($n = 1$). Mutations of *PDGFRA* were proved in 23 cases, involving exon 12 ($n = 4$), exon 14 ($n = 1$) and exon 18 ($n = 18$). All cases of undifferentiated carcinoma were *KIT* and *PDGFRA* wild type.

2.4. Analysis of selected morphological features

Comparison of histological features selected to be studied in terms of their occurrence in GISTs and undifferentiated carcinomas is summarized in Table 1.

The low number of cases in the undifferentiated carcinoma group did not enable us to carry out a valid statistical analysis, but it can be hypothesized that the presence of lymphatic invasion (Fig. 5) strongly favors the diagnosis of undifferentiated carcinoma, as it was found in all

Table 1
Comparison of morphological features of GIST and undifferentiated carcinoma.

	GIST	Undifferentiated carcinoma
Rhabdoid cells	24/84 (28.6%)	5/5 (100%)
Multinucleated cells	21/84 (25%)	4/5 (80%)
Lymphatic invasion	0/84 (0%)	5/5 (100%)
Vesicular nuclei	10/84 (11.9%)	5/5 (100%)
Entrapped fat	0/84 (0%)	4/5 (80%)
Skeinoid fibers (score)	Mean: 0.3 Median: 0	Mean: 0 Median: 0
Angiosarcomatous-like spaces	2/84 (2.4%)	5/5 (100%)
Alteration of low- and high-grade areas	1/84 (1.2%)	5/5 (100%)
Yolk sac-like areas	6/84 (7.1%)	5/5 (100%)
Glassy cells	0/84 (0%)	3/5 (60%)
Perinuclear vacuoles (score)	Mean: 0.9 Median: 1	Mean: 0.9 Median: 0
Mitotic index (per 5 mm ²)	mean: 3.8 range: 0-45	mean: 34 range: 28-39
Ki-67 proliferation index	mean: 7.6% range: 0-58%	mean: 56.4% range: 48-77%

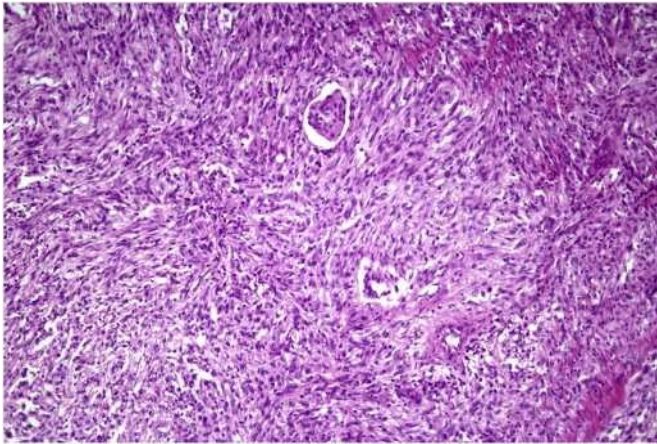


Fig. 5. Lymphatic invasion in a case of undifferentiated carcinoma (H&E, 200x).

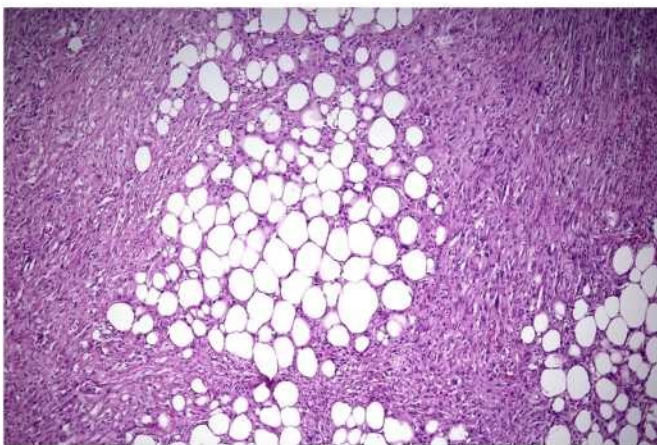


Fig. 6. Entrapment of fat is a common finding in undifferentiated carcinomas (H&E, 200x).

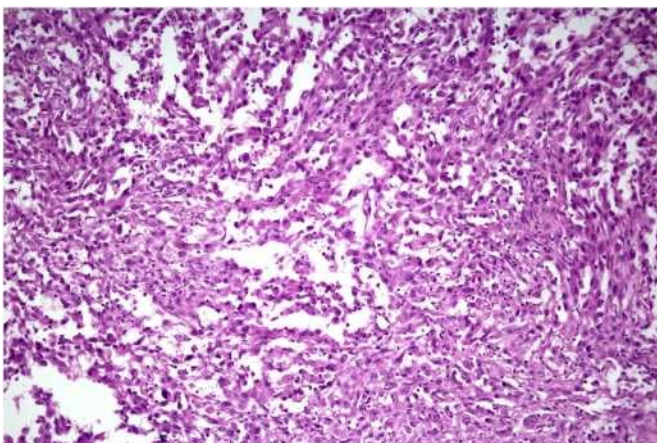


Fig. 7. Angiosarcomatous-like spaces probably represent abortive formation of glands in undifferentiated carcinomas (H&E, 200x).

5 cases of undifferentiated carcinoma, but in no cases of GIST. Similarly, no case of GIST showed entrapment of fat tissue in the tumor (Fig. 6) in contrast to all cases of undifferentiated carcinoma except for one, which was shown to represent an intestinal metastasis of pulmonary origin and was also found to be the smallest of the undifferentiated carcinoma cases (3 cm in largest dimension). Further promising markers seemed to be the alternation of low- and high- grade

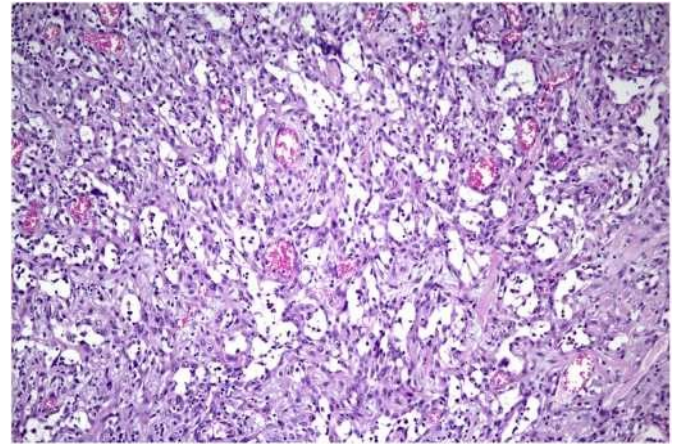


Fig. 8. Yolk sac-like areas are reminiscent of a microcystic/reticular subtype of the yolk sac tumor, but are SALL4-negative (H&E, 200x).

areas, angiosarcomatous-like spaces (Fig. 7) and yolk sac-like areas (Fig. 8), as they were detected in all cases of undifferentiated carcinoma, but only in 1.2%, 2.4% and 7.2% of GISTs, respectively. Glassy cells were not found in any cases of GIST in our series, however, they were identified in only 60% of undifferentiated carcinomas, so the relevance of this connection is uncertain.

Other markers, namely rhabdoid cells, multinucleated cells and vesicular nuclei, appear to be less useful, because they were found in a relatively significant proportion of the GISTs; rhabdoid cells and multinucleated cells typically in those mutated in the *PDGFRA* gene (rhabdoid cells were present in 19 of 23 *PDGFRA* mutated GISTs and in 5 of 61 *KIT* mutated GISTs; multinucleated cells in 15 of 23 *PDGFRA* mutated GISTs and in 6 of 61 *KIT* mutated GISTs). As for the multinucleated cells in undifferentiated carcinomas, they tend to differ from typical multinucleated floret-like cells in *PDGFRA* mutated GISTs, in that they are more high-grade or even anaplastic. Conversely, perinuclear vacuoles and skeinoid fibers, although rare or absent in undifferentiated carcinomas, were also commonly absent or poorly developed in a significant number of GISTs, which is mirrored by their median score values.

Although the differences in mean values of mitotic index and proliferative index between GIST and undifferentiated carcinoma groups seem to be significant, the overlap in ranges of values, mainly in the zone of higher values, precludes these indices from being useful in differential diagnostics.

3. Discussion

Differential diagnosis of GIST is broad, encompassing mainly mesenchymal tumors, most commonly smooth muscle tumors, schwannoma, intraabdominal fibromatosis or solitary fibrous tumor. Less commonly, germ cell tumors and malignant melanoma may mimic GIST, especially due to their expression of CD117. On the other hand, differential diagnosis between GIST and (adeno)carcinoma of the gastrointestinal tract is not an issue in the majority of cases, due to easily recognizable characteristic morphological patterns of both conditions and their immunohistochemical profile (GISTs are usually CD117 and/or DOG1 positive, whereas carcinomas are stained with antibodies against cytokeratins). However, undifferentiated tumors do not show usual morphological diagnostic features and typical patterns of immunorexpression may become altered in them. It has already been recognized, that 22% of pulmonary adenocarcinomas and 13% of pulmonary squamous cell carcinomas may express CD117 [20]. In the gastrointestinal tract, CD117 expression was reported to occur in 15% and 29.9% of esophageal squamous cell carcinomas in two case series [21,22]. A case of CD117-positive esophageal carcinosarcoma was

published by Martland et al. [18]. Furthermore, Mori et al. reported on expression of CD117 in a case of gastric undifferentiated carcinoma with focal neuroendocrine differentiation [19], and hypothesized that the CD117 expression was attributable to neuroendocrine differentiation, because of multiple cases of CD117-positive neuroendocrine carcinomas on record [23-30]. Nevertheless, the diagnosis of Mori et al. was questioned by Hewer et al., due to the lack of molecular genetic analysis of *PDGFRA* in the reported case [31]. Conversely, rare case reports of cytokeratin positivity in GISTs have been published [31-36]. According to larger studies of case series, the positivity of cytokeratins occurs in 3% to 18% of GISTs [37-39]. Cytokeratin expression in GIST may also result from transdifferentiation induced by imatinib treatment [40,41].

Despite the reported possibility of immunohistochemical overlap between GIST and carcinoma, there is no study on morphological differences between GIST and undifferentiated (sarcomatoid) carcinoma in the world literature. To identify such features, which could potentially be useful for differential diagnostics, we collected a series of 84 *KIT* or *PDGFRA* mutated imatinib-naive GISTs and 5 undifferentiated (sarcomatoid) carcinomas. The histological signs studied in both groups included: mitotic index (number of mitoses per 5 mm²), presence of rhabdoid cells, multinucleated cells, lymphatic invasion, vesicular nuclei, entrapped fat, skeinoid fibers, angiosarcomatous-like spaces, yolk sac-like areas, alternation of low- and high-grade areas, glassy cells, and perinuclear vacuoles. The possibility of neuroendocrine differentiation of the carcinomas was ruled out by negative staining with antibodies against chromogranin, synaptophysin and INSM-1.

Lymphatic invasion was shown to be the most promising marker of possible carcinomatous nature in the aforementioned differential diagnostic scenario. This can easily be explained by the fact that SDHB-positive GISTs do not tend to give rise to lymphatic metastases [42,43], which is in striking contrast to high-grade carcinomas. One can argue, that SDHB-deficient GISTs, which can present with lymphatic metastases, should also have been included in the study, however, they are quite rare and usually present with characteristic clinicopathologic features [43,44].

Fat entrapment, which reflects an infiltrative growth pattern of the tumor, was found to be discriminatory between GIST and undifferentiated carcinoma, as had been expected, having been found in 4 of the 5 undifferentiated carcinoma cases, but in no GISTs. In fact, the case of undifferentiated carcinoma devoid of fat entrapment was discovered to be an intestinal metastasis of non-small cell lung carcinoma. Thus, the relatively common pushing pattern of metastatic tumors, together with its small size (3 cm in the largest dimension), may explain the absence of fat entrapment in this case.

Alternation of low- and high-grade areas, angiosarcomatous-like spaces and yolk sac-like areas also seem to be good candidates for discriminatory markers, as they were detected in all cases of undifferentiated carcinoma, but only in a small number of GISTs. Alternation of low- and high-grade areas probably mirrors the heterogeneity of cellular population of high-grade cancers composed of subclones with a variable degree of dedifferentiation. In contrast, GISTs are usually homogenous tumors, although cases with histological dedifferentiation, especially in imatinib-treated tumors have been reported [40,45,46]. Angiosarcomatous-like spaces, lined by CD31-negative plump spindle to epithelioid atypical cells, and areas reminiscent of a microcystic/reticular subtype of the yolk sac tumor in undifferentiated carcinomas probably represent focal abortive attempts to form glands. However, stromal edema with focal separation of cells may also lead to similar patterns appearing in a small number of GISTs.

DOG1 is a proved marker of GIST with high sensitivity and specificity. Sensitivity is higher than 90% in most studies, which makes the combination of CD117 and DOG1 very effective in immunohistochemical confirmation of GIST [17,47,48]. Nevertheless, DOG1 can also stain other tumors, including differentiated carcinomas in various locations [48-50], gastrointestinal carcinomas being no

exception [51]. However, cases of undifferentiated sarcomatoid carcinoma of the gastrointestinal tract were found to be negative [51,52]. Our results seem to be in accordance with these findings as none of our 5 cases of undifferentiated carcinoma was DOG1-positive, which makes DOG1 immunohistochemistry one of the markers in the spectrum of features possibly leading pathologist to consider undifferentiated carcinoma in making differential diagnosis.

The main drawback of the study is the low number of cases of undifferentiated carcinoma, which precludes valid statistical analysis. Thus, a large multi-institutional study of representative age, sex, site and size matched cohorts is warranted.

In conclusion, we identified lymphatic invasion, fat entrapment, alternation of low- and high-grade areas, angiosarcomatous-like spaces, yolk sac-like areas, and absence of DOG1 staining in a gastrointestinal neoplasm of mesenchymal appearance lacking specific histological features of other tumors in the differential diagnosis, as indicative of the possibility of the correct diagnosis being undifferentiated (sarcomatoid) carcinoma. Although these morphological signs cannot be used to confirm the diagnosis, their presence may warrant complete or at least more extensive sampling of the tumor to find diagnostic differentiated carcinomatous areas. This attitude may prevent a pathologist from unnecessary overuse of molecular genetic analysis, which by itself may also not prove decisive in such a differential diagnostic dilemma.

Funding

This study was supported by the Ministry of education, youth and sports grant SVV-2020-2022 No. 260 539. The funding source had no involvement in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication.

Declaration of competing interest

None.

References

- [1] Ducimetiere F, Lurkin A, Ranchere-Vince D, et al. Incidence of sarcoma histotypes and molecular subtypes in a prospective epidemiological study with central pathology review and molecular testing. *PLoS One* 2011;6:e20294 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020294>.
- [2] Soreide K, Sandvik OM, Soreide JA, et al. Global epidemiology of gastrointestinal stromal tumours (GIST): a systematic review of population-based cohort studies. *Cancer Epidemiol* 2016;40:39-46. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2015.10.031>.
- [3] Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998;279:577-80. <https://doi.org/10.1126/science.279.5350.577>.
- [4] Hirota S, Ohashi A, Nishida T, et al. Gain-of-function mutations of platelet-derived growth factor receptor alpha gene in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology* 2003;125:660-7. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(03\)01046-1](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(03)01046-1).
- [5] Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, et al. *PDGFRA* activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 2003;299:708-10. <https://doi.org/10.1126/science.1079666>.
- [6] Janeway KA, Kim SY, Lodish M, et al. Defects in succinate dehydrogenase in gastrointestinal stromal tumors lacking *KIT* and *PDGFRA* mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:314-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009199108>.
- [7] Haller F, Moskalev EA, Fauz FR, et al. Aberrant DNA hypermethylation of *SDHC*: a novel mechanism of tumor development in Carney triad. *Endocr Relat Cancer* 2014;21:567-77. <https://doi.org/10.1530/ERC-14-0254>.
- [8] Killian JK, Miettinen M, Walker RL, et al. Recurrent epimutation of *SDHC* in gastrointestinal stromal tumors. *Sci Transl Med* 2014;6:268ra177. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009961>.
- [9] Maertens O, Prenen H, Debicq-Rychter M, et al. Molecular pathogenesis of multiple gastrointestinal stromal tumors in NF1 patients. *Hum Mol Genet* 2006;15:1015-23. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi016>.
- [10] Agaram NP, Wong GC, Guo T, et al. Novel V600E *BRAF* mutations in imatinib-naive and imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2008;47:853-9. <https://doi.org/10.1002/gcc.20589>.
- [11] Miranda C, Nucifora M, Molinari F, et al. *KRAS* and *BRAF* mutations predict primary resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2012;18:1769-76. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2230>.
- [12] Shi SS, Wu N, He Y, et al. *EGFR* gene mutation in gastrointestinal stromal tumours.

- Histopathology 2017;71:553-61. <https://doi.org/10.1111/his.13251>.
- [13] Brenca M, Rossi S, Polano M, et al. Transcriptome sequencing identifies ETV6-NTRK3 as a gene fusion involved in GIST. *J Pathol* 2016;238:543-9. <https://doi.org/10.1002/path.4677>.
- [14] Shi E, Chmielecki J, Tang CM, et al. FGFR1 and NTRK3 actionable alterations in "wild-type" gastrointestinal stromal tumors. *J Transl Med* 2016;14:339. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1075-6>.
- [15] Sarlomo-Rikala M, Kovatich AJ, Barusevicius A, et al. CD117: a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34. *Mod Pathol* 1998;11:728-34.
- [16] Kindblom LG, Remotti HE, Aldenborg F, et al. Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol* 1998;152:1259-69.
- [17] Novelli M, Rossi S, Rodriguez-Justo M, et al. DOG1 and CD117 are the antibodies of choice in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology* 2010;57:259-70. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2010.03624.x>.
- [18] Martland GT, Goodman AJ, Shepherd NA. CD117 expression in oesophageal carcinoma: a potential diagnostic pitfall. *Histopathology* 2004;44:77-80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2004.01770.x>.
- [19] Mori D, Akashi M, Baba K, et al. Gastric undifferentiated carcinoma with diffuse c-kit overexpression and focal neuroendocrine differentiation. *Pathol Res Pract* 2013;209:132-4. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2012.12.004>.
- [20] Pelosi G, Barisella M, Pasini F, et al. CD117 immunoreactivity in stage I adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung: relevance to prognosis in a subset of adenocarcinoma patients. *Mod Pathol* 2004;17:711-21. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800110>.
- [21] Fan H, Yuan Y, Wang J, et al. CD117 expression in operable oesophageal squamous cell carcinomas predicts worse clinical outcome. *Histopathology* 2013;62:1028-37. <https://doi.org/10.1111/his.12111>.
- [22] Moreira LF, Maino MM, Garbin HI, et al. CD117 expression in squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Anticancer Res* 2018;38:3929-33. <https://doi.org/10.21873/anticancer.12678>.
- [23] Naem M, Dahiya M, Clark JI, et al. Analysis of c-kit protein expression in small-cell lung carcinoma and its implication for prognosis. *Hum Pathol* 2002;33:1182-7. <https://doi.org/10.1053/hupa.2002.129199>.
- [24] Crafa P, Milione M, Azzoni C, et al. Pleomorph poorly differentiated endocrine carcinoma of the rectum. *Virchows Arch* 2003;442:605-10. <https://doi.org/10.1007/s00428-003-0807-1>.
- [25] Akintola-Ogunremi O, Pfeifer JD, Tan BR, et al. Analysis of protein expression and gene mutation of c-kit in colorectal neuroendocrine carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2003;27:1551-8. <https://doi.org/10.1097/0000478-200312000-00008>.
- [26] Araki K, Ishii G, Yokose T, et al. Frequent overexpression of the c-kit protein in large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Lung Cancer* 2003;40:173-80. [https://doi.org/10.1016/s0169-5002\(03\)00034-5](https://doi.org/10.1016/s0169-5002(03)00034-5).
- [27] Boldrini L, Ursino S, Gisfredi S, et al. Expression and mutational status of c-kit in small-cell lung cancer: prognostic relevance. *Clin Cancer Res* 2004;10:4101-8. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0664>.
- [28] Pelosi G, Masullo M, Leon ME, et al. CD117 immunoreactivity in high-grade neuroendocrine tumors of the lung: a comparative study of 39 large-cell neuroendocrine carcinomas and 27 surgically resected small-cell carcinomas. *Virchows Arch* 2004;445:449-55. <https://doi.org/10.1007/s00428-004-1106-1>.
- [29] Ishikubo T, Akagi K, Kurosuni M, et al. Immunohistochemical and mutational analysis of c-kit in gastrointestinal neuroendocrine cell carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2006;36:494-8. <https://doi.org/10.1093/jcco/hyl061>.
- [30] Giannopoulos A, Papaconstantinou I, Alexandrou P, et al. Poorly differentiated carcinoma of the rectum with aberrant immunophenotype: a case report. *World J Gastroenterol* 2007;13:5951-3. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i44.5951>.
- [31] Hewer E, Genitsch V, Schafer SC, et al. Cytokeratin-positive epithelioid gastrointestinal stromal tumor of the stomach - a comment on "gastric undifferentiated carcinoma with diffuse c-kit overexpression and focal neuroendocrine differentiation". *Pathol Res Pract* 2013;209:467-8. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2013.04.015>.
- [32] Nga ME, Wong AS, Wee A, et al. Cytokeratin expression in gastrointestinal stromal tumours: a word of caution. *Histopathology* 2002;40:480-1. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.2002.01402.x>.
- [33] Rossi G, Sartori G, Valli R, et al. The value of c-kit mutational analysis in a cytokeratin positive gastrointestinal stromal tumour. *J Clin Pathol* 2005;58:991-3. <https://doi.org/10.1136/jcp.2004.024364>.
- [34] Lippai N, Fule T, Nemeth T, et al. Keratin-positive gastrointestinal stromal tumor of the stomach mimicking gastric carcinoma: diagnosis confirmed by c-kit mutation analysis. *Diagn Mol Pathol* 2008;17:241-4. <https://doi.org/10.1097/PDM.0b013e31816184c6>.
- [35] Mourra N, Dehni N. Cytokeratin expression in GIST: a diagnostic pitfall in gastric biopsy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2010;18:486-8. <https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e3181e36221>.
- [36] Baniak N, Lee L, Zhou C, et al. An epithelioid gastrointestinal stromal tumor of the stomach with strong expression of keratin: clinicopathologic correlation and follow-up post-imatinib therapy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2019;27:e85-90. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000493>.
- [37] Miettinen M, Furlong M, Sarlomo-Rikala M, et al. Gastrointestinal stromal tumors, intramural leiomyomas, and leiomyosarcomas in the rectum and anus: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 144 cases. *Am J Surg Pathol* 2001;25:1121-33. <https://doi.org/10.1097/00000478-200109000-00002>.
- [38] Sarlomo-Rikala M, Tsujimura T, Lendahl U, et al. Patterns of nestin and other intermediate filament expression distinguish between gastrointestinal stromal tumors, leiomyomas and schwannomas. *APMIS* 2002;110:499-507. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0463.2002.100608.x>.
- [39] Lopes LF, Bacchi CE. Cytokeratin expression in gastrointestinal stromal tumor: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 687 cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2012;20:8-12. <https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e31821b4b53>.
- [40] Vassos N, Agaimy A, Schlabrakowski A, et al. An unusual and potentially misleading phenotypic change in a primary gastrointestinal stromal tumour (GIST) under imatinib mesylate therapy. *Virchows Arch* 2011;458:363-9. <https://doi.org/10.1007/s00428-010-1034-1>.
- [41] Canzonieri V, Gasparotto D, Alessandrini L, et al. Morphologic shift associated with aberrant cytokeratin expression in a GIST patient after tyrosine kinase inhibitors therapy. A case report with a brief review of the literature. *Pathol Res Pract* 2016;212:63-7. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2015.11.004>.
- [42] Agaimy A, Wunsch PH. Lymph node metastasis in gastrointestinal stromal tumours (GIST) occurs preferentially in young patients <or =40 years: an overview based on our case material and the literature. *Langenbecks Arch Surg* 2009;394:375-81. <https://doi.org/10.1007/s00423-008-0449-5>.
- [43] Rege TA, Wagner AJ, Corless CL, et al. "Pediatric-type" gastrointestinal stromal tumors in adults: distinctive histology predicts genotype and clinical behavior. *Am J Surg Pathol* 2011;35:495-504. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e31820e5f7d>.
- [44] Doyle LA, Nelson D, Heinrich MC, et al. Loss of succinate dehydrogenase subunit B (SDHB) expression is limited to a distinctive subset of gastric wild-type gastrointestinal stromal tumours: a comprehensive genotype-phenotype correlation study. *Histopathology* 2012;61:801-9. <https://doi.org/10.1111/jm365-2559.2012.04300.x>.
- [45] Bickenbach K, Wilcox R, Veerapong J, et al. A review of resistance patterns and phenotypic changes in gastrointestinal stromal tumors following imatinib mesylate therapy. *J Gastrointest Surg* 2007;11:758-66. <https://doi.org/10.1007/s11605-007-0150-y>.
- [46] Liegl B, Kepten I, Le C, et al. Heterogeneity of kinase inhibitor resistance mechanisms in GIST. *J Pathol* 2008;216:64-74. <https://doi.org/10.1002/path.2382>.
- [47] West RB, Corless CL, Chen X, et al. The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status. *Am J Pathol* 2004;165:107-13. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63279-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63279-8).
- [48] Espinosa I, Lee CH, Kim MK, et al. A novel monoclonal antibody against DOG1 is a sensitive and specific marker for gastrointestinal stromal tumors. *Am J Surg Pathol* 2008;32:210-8. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3181238ccc>.
- [49] Andreasen S, Skalova A, Agaimy A, et al. ETV6 gene rearrangements characterize a morphologically distinct subset of sinonasal low-grade non-intestinal-type adenocarcinoma: a novel translocation-associated carcinoma restricted to the sinonasal tract. *Am J Surg Pathol* 2017;41:1552-60. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000912>.
- [50] Bae JS, Park JY, Park SH, et al. Expression of ANO1/DOG1 is associated with shorter survival and progression of breast carcinomas. *Oncotarget* 2018;9:607-21. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23078>.
- [51] Miettinen M, Wang ZF, Lasota J. DOG1 antibody in the differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a study of 1840 cases. *Am J Surg Pathol* 2009;33:1401-8. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3181a90e1a>.
- [52] Wong NA, Shelley-Fraser G. Specificity of DOG1 (K9 clone) and protein kinase C theta (clone 27) as immunohistochemical markers of gastrointestinal stromal tumour. *Histopathology* 2010;57:250-8. <https://doi.org/10.1111/jm365-2559.2010.03622.x>.

3.5 Targeted next generation sequencing of MLH1-deficient, *MLH1* promoter hypermethylated, and *BRAF/RAS*-wild-type colorectal adenocarcinomas is effective in detecting tumors with actionable oncogenic gene fusions

Onkogenní genové fúze představují atraktivní cíle pro léčbu maligních nádorových onemocnění. Nicméně, frekvence funkčních genomických přestaveb u kolorektálních karcinomů (CRC) je velmi nízká a univerzální screening těchto změn se tedy zdá být nepraktický a nákladný. Několik rozsáhlých studií retrospektivně ukázalo, že CRC s genovými fúzemi se často vyskytuje ve skupinách nádorů definovaných deficitem MLH1 DNA mismatch repair proteinu (MLH1d), hypermetylací promotoru *MLH1* (*MLH1ph*), přítomností nestability mikrosatelitů a *BRAF/RAS* wild-type nádorového genotypu (*BRAFwt/RASwt*). V této studii jsme použili metodu paralelního sekvenování (NGS) k analýze výskytu potenciálně cílitelných genových fúzí v neselektované sérii případů *BRAFwt/RASwt* kolorektálních karcinomů, které vykazovaly MLH1d/*MLH1ph*.

Z původně identifikované skupiny 173 MLH1d CRC případů vykazovalo 141 případů (81,5 %) *MLH1ph*. Genotyp *BRAFwt/RASwt* byl potvrzen u 23 ze 141 případů (16 %) MLH1d/*MLH1ph*. Cílené vyšetření NGS těchto 23 případů identifikovalo genové fúze celkem u 9 tumorů (39,1 %; interval spolehlivosti při konfidenční hladině 95 %: 20,5 %-61,2 %). Zjištěné fúze zahrnovaly geny *NTRK* (4 případy), *ALK* (2 případy) a *BRAF* (3 případy). Z námi detekovaných fúzí zasluhuje zvláštní zmínku fúze *MAP7-BRAF*, která nebyla dosud v předchozích studiích publikována. Jako sekundární výsledek testování NGS jsme identifikovali změny dráhy *PIK3K-AKT-mTOR* ve 2 případech CRC, které vykazovaly mutaci *PIK3CA*. Celkem 11 z 23 případů (48 %) *MLH1d/MLH1ph* a *BRAFwt/RASwt* tak vykazovalo genetické změny, které by mohly vyvolat rezistenci na anti-EGFR terapii.

Naše studie potvrzuje, že cílená metoda NGS se zaměřením na *MLH1d/MLH1ph* a *BRAFwt/RASwt* kolorektálních karcinomů by mohla být nákladově efektivní strategií k detekci pacientů s potenciálně léčitelnými onkogenními kinázovými fúzemi.



RESEARCH ARTICLE

WILEY

Targeted next generation sequencing of MLH1-deficient, MLH1 promoter hypermethylated, and BRAF/RAS-wild-type colorectal adenocarcinomas is effective in detecting tumors with actionable oncogenic gene fusions

Bohuslava Vaňková^{1,2} | Tomáš Vaněček^{1,2} | Nikola Ptáková^{2,3} |
Veronika Hájková² | Martin Dušek^{1,2} | Michael Michal^{1,2,4} | Peter Švajdler⁵ |
Ondřej Daum^{1,2} | Magdaléna Daumová^{1,2} | Michal Michal^{1,2} |
Roman Mezencev⁶ | Marián Švajdler^{1,2} 

¹Sikl's Department of Pathology, The Faculty of Medicine and Faculty Hospital in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic

²Bioptická Laborator, s.r.o, Pilsen, Czech Republic

³Second Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

⁴Biomedical Center, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic

⁵Cytopathos s.r.o, Bratislava, Slovakia

⁶School of Biological Sciences, Georgia Institute of Technology, Atlanta, Georgia

Correspondence

Marian Svajdler, Bioptická Laborator, s.r.o., Mikulasske nam. 4, Pilsen 326 00, Czech Republic.

Email: svajdler@biopticka.cz

Funding information

Institutional Research Fund of University Hospital Plzen; Charles University Research Fund

Abstract

Oncogenic gene fusions represent attractive targets for therapy of cancer. However, the frequency of actionable genomic rearrangements in colorectal cancer (CRC) is very low, and universal screening for these alterations seems to be impractical and costly. To address this problem, several large scale studies retrospectively showed that CRC with gene fusions are highly enriched in groups of tumors defined by MLH1 DNA mismatch repair protein deficiency (MLH1d), and hypermethylation of MLH1 promoter (MLH1ph), and/or the presence of microsatellite instability, and BRAF/KRAS wild-type status (*BRAF*^w/*KRAS*^w). In this study, we used targeted next generation sequencing (NGS) to explore the occurrence of potentially therapeutically targetable gene fusions in an unselected series of *BRAF*^w/*KRAS*^w CRC cases that displayed MLH1d/MLH1ph. From the initially identified group of 173 MLH1d CRC cases, 141 cases (81.5%) displayed MLH1ph. *BRAF*^w/*RAS*^w genotype was confirmed in 23 of 141 (~16%) of MLH1d/MLH1ph cases. Targeted NGS of these 23 cases identified oncogenic gene fusions in nine patients (39.1%; CI95: 20.5%-61.2%). Detected fusions involved *NTRK* (four cases), *ALK* (two cases), and *BRAF* genes (three cases). As a secondary outcome of NGS testing, we identified PIK3K-AKT-mTOR pathway alterations in two CRC cases, which displayed *PIK3CA* mutation. Altogether, 11 of 23 (~48%) MLH1d/MLH1ph/*BRAF*^w/*RAS*^w tumors showed genetic alterations that could induce resistance to anti-EGFR therapy. Our study confirms that targeted NGS of MLH1d/MLH1ph and *BRAF*^w/*RAS*^w CRCs could be a cost-effective strategy in detecting patients with potentially druggable oncogenic kinase fusions.

KEYWORDS

ALK, BRAF, colorectal cancer, gene fusions, NTRK

1 | INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is the second most common malignant disease in women and the third in men, with an estimated total number of ~1.8 million new cases and ~890 000 deaths in 2018 worldwide.¹ Remarkable advances in the CRC therapy and improvements in patients' prognosis have been achieved in recent years by the introduction of targeted therapy, including agents targeting epidermal growth factor receptor (EGFR) pathway and angiogenesis.^{2,3} The selection for optimal treatment is actually based on negative, rather than positive molecular criteria. Specifically, patients with any known KRAS or NRAS exon 2, 3, or 4 mutation are not recommended for treatment with either cetuximab or panitumumab. Likewise, the presence of BRAF V600E mutation makes response to these anti-EGFR agents highly unlikely, unless used in combination with a BRAF inhibitor and cytotoxic agent irinotecan.^{4,6} Therefore, testing of these biomarkers is currently recommended in all patients with metastatic CRC being considered for anti-EGFR therapy.^{4,6} However, in spite of this molecular profile-driven patient selection, only a fraction of patients responds to anti-EGFR therapy, and even the patients with objective clinical responses almost inevitably develop secondary resistance.³ It should be noted that less prevalent alterations in the RAS-MAPK or PIK3K-AKT-mTOR pathways, such as mutations in the HRAS, MAP2K1, RAF1, PTPN11, PIK3CA, or PTEN genes, could be also responsible for resistance to the EGFR inhibitors, and detection of these mutations may have potential implications for more refined treatment selection in the future.^{5,7} This is supported by analysis of the mutational status of RAS-MAPK pathway expanded beyond the KRAS and NRAS genes, which demonstrated that up to 56% of CRCs have pathway alterations that can make the patients ineligible for anti-EGFR treatment.⁷

Patients with tumors showing certain oncogenic gene fusions represent another small but potentially important group of the CRC patients with poor prognosis and unlikely benefit from conventional anti-EGFR therapy.⁸ In a study by Kloosterman et al, up to 2.5% of CRCs harbored recurrent gene fusions affecting expression and function of relevant oncogenes. This also included 1.8% cases with a potentially druggable receptor kinase fusions.⁹ Other studies reported fusions involving NTRK, ALK, ROS1, RET, or BRAF genes in 0.2% to 2.4% of CRC cases.^{8,10-17} Because the frequency of gene fusions in CRC is very low, the screening for these alterations in general CRC patients population seems to be impractical and costly. To address this problem, several large scale studies retrospectively showed that CRCs with gene fusions are highly enriched among groups of tumors characterized by the loss of expression of MLH1/PMS2 DNA mismatch repair proteins and hypermethylation of MLH1 promoter, with or without the presence of microsatellite instability, while presenting BRAF/KRAS wild-type status (BRAFWt/KRASwt).^{11,18-20}

In this study, we used targeted next generation sequencing to explore the occurrence of potentially targetable gene fusions NTRK, ALK, ROS1, RET, or BRAF in BRAFWt/KRASwt CRC cases that displayed IHC confirmed loss of expression of PMS2 and MLH1 proteins, and genetically proven MLH1 gene promoter hypermethylation (MLH1d/MLH1ph).

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Patients and tissue specimens

The study was performed following the rules of the Ethics Committee of the Faculty Hospital in Pilsen. Resection specimens from 173 unselected consecutive CRC patients from a 3-year period (2016-2019) with immunohistochemically confirmed loss of expression of PMS2 and MLH1 proteins (MLH1-deficient; MLH1d) were initially retrieved from the files at the Siki's Department of Pathology, Faculty of Medicine in Plzen, and Biopsticka Laboratory, Ltd, Pilsen, Czech Republic. All MLH1d tumors underwent MLH1 gene promoter hypermethylation and BRAF gene testing as a routine procedure, in order to identify potential patients with Lynch syndrome (LS). In a subset of cases, RAS gene testing was performed on a clinical request in patients considered for anti-EGFR therapy; in the remaining cases, RAS gene testing was performed only for the purpose of this study.

All MLH1d/MLH1ph/BRAFWt/RASwt cases underwent next generation sequencing. Demographic and clinical data, including tumor localization and pTNM stage were retrieved from medical records.

2.2 | Immunohistochemistry

For the immunohistochemistry (IHC), 4 μ m sections were initially stained with PMS2 (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, A16-4, RTU) and MSH6 (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, SP93, RTU) antibodies, as a routine procedure in LS screening, using the BenchMark ULTRA automated stainer (Ventana Medical Systems), according to the manufacturer's protocol with appropriate positive and negative control slides. In the second step, MLH1 (Ventana Medical Systems, M1, RTU) staining was performed in all PMS2-negative cases. Visualization was performed using the OptiView Dab Detection Kit (Roche).

2.3 | Bisulfite DNA conversion MLH1ph testing

Bisulfite conversion of DNA was carried out using EZ DNA Methylation-Gold Kit (DNA input 500 ng) (Zymo Research, Orange, California). Detection of promoter methylation was carried out via methylationspecific PCR as described by Hermanet al²¹ Briefly, 100 ng of DNA or 2 μ L of converted DNA was added to reaction consisted of 12.5 μ L of HotStar Taq PCR Master Mix (Qiagen), 10 pmol of specific primers and distilled water up to 25 μ L. The amplification program was composed of denaturation at 95°C for 14 minutes and then 40 cycles of denaturation at 95°C for 1 minute, annealing at 60°C for 1 minute, and extension at 72°C for 1 minute. The program was finished by incubation at 72°C for 7 minutes.

2.4 | RAS/BRAF testing

Hotspot mutations in the genes BRAF, KRAS, and NRAS were analysed using the BENkit (4Bases, Switzerland, CH). The libraries were

prepared following the BENkit protocol for Illumina sequencing. Final libraries were multiplexed, spiked with 20% PhiX control and sequenced on a NextSeq 550 (Illumina, San Diego, California) to achieve at least 150 000 reads per sample. The analysis of the sequencing results was performed using the Amplicon Suite software (version 2.0.1; SmartSeq, IT). Parameters for variant reporting were set to a minimum coverage per amplicon 100 and allelic frequency over 5%.

2.5 | Next generation sequencing (NGS)

For NGS, up to three FFPE sections (10 μ m thick) were macro-dissected and total nucleic acid (NA) was extracted using Maxwell RSC DNA FFPE Kit on Maxwell RSC 48 Instrument (Promega, Madison, Wisconsin). Both, RNA and DNA components of the total NA were quantified using the Qubit Broad Range RNA Assay Kit/Qubit Broad Range DNA Assay (Thermo Fisher Scientific) and 2 μ L of sample. Fusion Plex Comprehensive Thyroid and Lung (CTL) Kit (ArcherDX Inc., Boulder, Colorado) was used to construct cDNA library for detection of genetic abnormalities in 36 genes, including the detection of fusion transcripts of ALK, AXL, BRAF, *CCND1*, FGFR1, FGFR2, FGFR3, MET, NRG1, *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3*, *PPARG*, RAF1, *RET*, *ROS1*, and *THADA* genes. All steps were performed according to the manufacturer's protocol (version of the protocol LA135.F), and the library was sequenced on an Illumina platform as described previously.²²

2.6 | Microsatellite instability (MSI) testing

The MSI Analysis System v.1.2 (Promega) based on fluorescent multiplex PCR followed by capillary electrophoresis using an ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) was used for detection of MSI. Data were analyzed using the GeneMapper Software (Applied Biosystems). All steps were done according to manufacturer's protocol.

2.7 | Statistics

Ninety-five percent-confidence intervals for prevalences (CI95) were determined using Wilson procedure with correction for continuity.²³ Significance of differences between proportions and between continuous data were determined by Fisher's exact test and Welch's corrected *t*-test, respectively, implemented in Prism 5 for Windows, version 5.02 (GraphPad Software, Inc.). Differences were considered statistically significant for two-sided *P*-values <.05.

3 | RESULTS

From the initially identified group of 173 MLH1d CRC cases (46 male and 127 female patients; median age: 72 years; range 36-92 years

(Table 1), 141 cases (81.5%) displayed hypermethylation of the *MLH1* gene promoter (MLH1d/MLH1ph). BRAFwt/RASwt genotype was confirmed in 23 of 141 (~16%) of MLH1d/MLH1ph cases (10 males and 13 females; median age: 68 years; range 45-87 years). Remaining 117 MLH1d/MLH1ph cases showed mutations in BRAF or RAS genes. All BRAF mutations were represented by V600E substitution. The KRAS gene codon 12/13 mutations occurred in nine cases, whereas five cases showed KRAS codon 61 substitution, one case KRAS codon 117 substitution and one case showed NRAS gene codon 12 mutation. Interestingly, one case displayed a rare co-occurrence of KRAS (G12V) and BRAF (V600E) mutations.

BRAF V600E mutation was found in 103 MLH1d/MLH1ph cases. This mutation was more prevalent in female than in male cases (75.9% vs 63.6%; *P* = .1825) and associated with older age (mean age 73.26 years in BRAF-mutant vs 69.26 years in BRAFwt; *P* = .0863) and

TABLE 1 Baseline patient and tumor characteristics of 173 MLH1-deficient colorectal cancers

Gender	
Female	127 (73.4%)
Male	46 (26.6%)
Age	
Females	Median: 72 years (range 36-92 years)
Males	Median: 71.5 years (range 36-88 years)
pT stage	
T1	4 (2.3%)
T2	29 (16.8%)
T3	103 (59.5%)
T4a	17 (9.8%)
T4b	11 (6.4%)
Unknown	9 (5.2%)
pN stage	
N0	109 (63.0%)
N1a	18 (10.4%)
N1b	16 (9.2%)
N1c	4 (2.3%)
N2a	4 (2.3%)
N2b	13 (7.5%)
Unknown	9 (5.2%)
Histological grade	
Low grade	89 (51.4%)
High grade	83 (48%)
Unknown	1 (0.6%)
Location	
Left colon	24 (13.9%)
Right colon	148 (85.5%)
Unknown	1 (0.6%)
BRAF mutation	109 (not available in 3 cases)
RAS mutation	16 (not available in 128 cases)

high grade (80% vs 65.2%; $P = .0586$), although the differences did not reach statistical significance. *RAS* mutations were found in 16 CRC cases and showed no significant association with sex (11.9% in F vs 8.8% in M; $P = .7623$), grade (11.3% low grade vs 11.1% high grade; $P = 1.00$) or age (mean age 72.5 years in mutant vs 69.3 years in wild-type cases; $P = .3691$).

All 23 *MLH1d/MLH1ph/BRAFwt/RASwt* cases showed MSI-high status. Targeted NGS of these 23 cases identified oncogenic gene fusions in nine patients (39.1%; CI95: 20.5-61.2%) that involved (a) *NTRK* genes in four cases (*LMNA-NTRK1*, *ETV6-NTRK3*, and *TPR-NTRK1* in two cases), (b) *ALK* gene in two cases (both *EML4-ALK*), (c) *BRAF* gene in three cases (*CUL1-BRAF*, *GTF2IRD1-BRAF*, and *MAP7-BRAF*), and (d) a suspicious gene fusion in *RAF1* gene in a single case (*NLGN3-RAF1*) (Table 2). However, *NLGN3-RAF1* rearrangement resulted into joining untranslated region of the *NLGN3* gene transcript and intronic sequence of *RAF1*, with unclear impact on *RAF1* kinase activity, because no open reading frame has been found. Although possible transcription starts sites were found upstream of fusion, and translation initiation codon was predicted in exon 7 of *RAF1* gene (p. M265) using Promoter 2.0 and NetStart 1.0 prediction tools,^{24,25} passenger event is more probable rather than oncogenic character for this fusion. All other fusion variants were found to be in-frame, with retained functional kinase domains.

To the best of our knowledge, *MAP7-BRAF* fusion variant has not been previously reported.

No significant differences in sex (Fisher's exact test, P -value = .68), age (Mann-Whitney test, $P = .47$), pathologic stage (Fisher's exact test, $P = 1.0$, tested for difference among all stages), grade (low grade vs high grade, Fisher's exact test, $P = 1.0$) or tumor location (left vs right side, Fisher's exact test, $P = 1.0$) were found between the fusion positive and fusion-negative groups.

As a secondary outcome of our NGS testing, which primarily aimed at the detection of targetable gene fusions, we identified *PIK3K-AKT-mTOR* pathway alterations in two CRC cases, which displayed *PIK3CA* mutation. In addition, one tumor was found to have *GNAS* mutation and three CRCs harbored *CTNNB1* mutations (Table 3). All identified mutations have been annotated by COSMIC

database²⁶ as previously confirmed somatic in CRC or other cancers,²⁷⁻³² and all substitutions have been predicted by FATHMM predictor³³ as cancer-promoting/driver mutations (Table 3).

Altogether, 12 of 23 (52%) *MLH1d/MLH1ph/BRAFwt/RASwt* tumors showed genetic alterations that could induce resistance to anti-EGFR therapy. Nevertheless, previous studies demonstrated that CRCs with downstream *RAS-MAPK* or *PIK3K-AKT-mTOR* pathway alterations are not always resistant to the EGFR inhibitor cetuximab.³⁴

4 | DISCUSSION

About 10% to 15% of sporadic CRCs have MSI-high phenotype (MSI-H) caused by the *MLH1ph*. Most of these CRCs show CpG Island Methylator Phenotype (CIMP), caused by *BRAF* V600E mutation and subsequent up-regulation of the transcriptional repressor *MAFG*.^{35,36} We found *BRAF* V600E status in ~73% of *MLH1d/MLH1ph* CRC cases. Our results support previously reported association of this mutation with older age, female sex and poor differentiation.³⁷

A smaller subset of *MLH1ph* CRCs harbor *KRAS* mutations instead of *BRAF* V600E.^{35,38} Altogether, *BRAF* and *KRAS* mutated tumors may represent ~80% of MSI-H/*MLH1ph* CRCs, leaving approximately 20% of cases without a known *RAS-MAPK* pathway alteration.¹⁹ In the present study, we found that ~16% of *MLH1d/MLH1ph* CRCs showed *RAS/BRAF* wild-type status, and ~40% of these CRCs showed the presence of potentially targetable oncogenic kinase fusions. This result is comparable with several studies recently reported by other investigators. In a study by Cocco et al, 21 of 2314 CRCs tested by NGS harbored kinase fusions and 12 fusion-positive cases (57%) were MSI-H/*MLH1d*. Methylation of the *MLH1* gene promoter was confirmed in all cases with available material. Altogether, the fusions were reportedly present in 5% of MSI-H/*MLH1d* CRCs and 15% of MSI-H/DNA mismatch repair-deficient/*BRAFwt/RASwt*, but only in 0.4% of microsatellite stable/DNA mismatch repair proteins proficient tumors. Furthermore, the prevalence of fusions reportedly reached 42% in *MLH1d/MLH1ph/RASwt/BRAFwt* CRCs,¹⁹ which is consistent with our result. Sato et al. performed MSI analysis of over 2800 surgically

TABLE 2 Clinical characteristics of 10 colorectal adenocarcinomas with gene fusions

Age	Sex	Site	Grade	pTNM	Fusion gene (exon/intron #)	Frame	Kinase domain
58	F	Left colon	Low grade	pT3 N0	TPR(e21)-NTRK1(e10)	In-frame	Preserved
68	M	Right colon	Low grade	pT3 N1b M1	EML4(e6)-ALK(e20)	In-frame	Preserved
78	F	Right colon	Low grade	pT2 N0	CUL1(e7)-BRAF(e9)	In-frame	Preserved
74	F	Right colon	Low grade	pT3 N0	EML4(e21)-ALK(e20)	In-frame	Preserved
81	M	Right colon	High grade	pT4a N2a	LMNA(e4)-NTRK1(e11)	In-frame	Preserved
68	M	Right colon	High grade	pT3 N0	NLGN3(e8)-RAF1(i6)	Unclear ^a	Unclear ^a
71	M	Right colon	High grade	pT4a N1a	ETV6(e5)-NTRK3(e15)	In-frame	Preserved
70	F	Right colon	Low grade	pT4a N1b	GTF2IRD1(e22)-BRAF(e10)	In-frame	Preserved
78	M	Right colon	Low grade	pT3 N0	MAP7(e7)-BRAF(e10)	In-frame	Preserved
53	F	Right colon	Low grade	pT3 N1a	TPR(e21)-NTRK1(e10)	In-frame	Preserved

^aSee text for explanation.

TABLE 3 Characteristics of five colorectal adenocarcinomas without gene fusions with other potentially significant NGS findings

Age Sex Site	Grade	pTNM	Other NGS findings				Somatic status in score ^c cancers ^d (reference)	
			Gene coding AF ^b	DNAchange	(protein change)	COSV ^a		
60 F Left colon	High grade	pT4b N1a M1b	CTNNB1 c.101G>A (p.Gly34Glu)	COSV62688267	-7.7	AF = 0.26	Yes (27,28)	
80 F Right colon	Low grade	pT3 N0	CTNNB1 c.134_136del	p.(Ser45del)		COSV62693334	N/A	Yes (29)
57 M Right colon	High grade	pT4a N1b	GNAS c.602G>T (p.Arg201Leu)	COSV55671845	-4.41	AF = 0.34	Yes (30)	
84 M Right colon	Low grade	pT3 N0	PIK3CA c.3140A>G, (p.His1047Arg)	COSV55873195	AF = 0.25		-2.53	Yes (31)
45 M Right colon	Low grade	pT3 N1b	PIK3CA c.3140A>G, (p.His1047Arg)	COSV55873195	AF = 0.11		-2.53	Yes (31)
			CTNNB1 c.121A>G, p.(Thr41Ala)	COSV62687862	-6.95	AF = 0.37		Yes (32)

^aGenomic mutation identifier (COSMIC)²⁶

^bAllele frequency.

^cPrediction of cancer driver status using FATHMM predictor.³³ Score < 2.5 predicts association with cancer with specificity >98%.

^dPreviously reported as somatic mutation in colorectal and/or other cancers. Information retrieved from COSMIC²⁶ datasets and other publications.

resected CRCs and performed whole exome, transcriptome and methylation analyses on 149 of 162 tumors showing MSI-H status. In-frame fusion transcripts encoding fusion-type kinases were found in ~10% of MSI-H tumors and ~55% of MSI-H/KRASwt/BRAFwt CRCs.³⁹ Wang et al identified 11 tumors with gene fusions among 125 consecutive mismatch repair-deficient (MMRd) and 238 randomly selected mismatch repair-proficient CRCs (3%). All tumors that harbored fusions were MMRd with *MLH1*ph and wild-type *BRAF* and *KRAS*, comprising 55% (11/20) of this subgroup.²⁰ Moreover, they used 227 PMS2/MLH1 deficient CRCs as an independent validation cohort. *MLH1*ph was confirmed in 137/227 cases (60%) and 44/137 (32%) patients lacked *BRAF* V600E or *KRAS/NRAS* mutations. Targeted NGS showed that 32% (14/44) of patients displayed oncogenic fusions.²⁰ Taken together, approximately 30% to 55% of CRCs with *MLH1*ph status, wild-type *BRAF* and wild-type RAS have oncogenic fusions.

Based on the results of the above mentioned studies and present study, colon cancers with kinase fusions are highly represented among MSI-H CRCs. Generally, MSI-H CRCs have a more favorable prognosis than microsatellite stable CRCs,⁴⁰⁻⁴² although this may be controversial for advanced (stage III and IV) CRCs.⁴³ The National Comprehensive Cancer Network guidelines recommend MSI testing for all patients with stage II CRC, to inform adjuvant therapy decisions, based on the assumption that MSI-H status in MMRd CRCs predicts poor efficacy of the standard 5-fluorouracil (5-FU) based adjuvant chemotherapy.^{4,44,45} The data from several meta-analyses about the potential value of MSI status and 5-FU chemotherapy response remain contradictory, however, mostly because of the high inter-study heterogeneity in the MSI-H groups.^{42,46-49} Importantly, MSI-H CRCs have high tumor mutation burden, which results in the generation of neoantigens recognized by the patient's immune system and

modulation of this response with immune checkpoint inhibitors is an attractive therapeutic option (reviewed by Thomas et al⁵⁰). Pembrolizumab, nivolumab, and combination of nivolumab and ipilimumab already received US Food and Drug Administration (FDA) approval for the use in advanced MMRd CRCs progressing after standard therapies, and clinical studies are underway to find out the role of immune checkpoint inhibition in the first-line and neoadjuvant settings.⁵⁰ Nevertheless, a significant proportion of MMRd patients do not respond or develop resistance to immune checkpoint inhibition (progressive disease rate 21%-41%), or experience serious adverse reactions.⁵⁰ As a result, oncogenic fusions can provide new opportunity for targeted therapy in this subset of MMRd CRC patients who otherwise would be candidates for an orthodox therapy with anti-EGFR agents, which would likely be ineffective due to alternative RAS-MAPK pathway activation.

A summary of possibly actionable gene fusions already detected in CRCs was recently provided in a review by Pagani et al.⁸ Potential targets for therapy included *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3*, *ALK*, *ROS*, *RET*, *BRAF*, *FGFR2*, *FGFR3*, and *ERBB2* gene fusions. Even though only a limited number of patients were treated with kinase inhibitors so far, some encouraging results with objective clinical responses were obtained in a few NTRK-rearranged CRCs treated with larotrectinib or entrectinib.⁸ Our results confirm findings from previous studies as we have also detected these actionable gene fusions, mostly those involving *NTRK*, *ALK*, and *BRAF* genes, and we detected one novel *MAP7-BRAF* fusion variant.

In the present study, a fraction of RASwt/BRAFwt CRC patients who underwent NGS testing, and who lacked any oncogenic fusions, was found to harbor *PIK3CA* mutations, with potentially negative impact on the outcome of the anti-EGFR therapy. Overall, *PIK3CA* mutations are thought to predict resistance to anti-EGFR therapies⁵

and patients with PI3KCA-mutant CRC may be potential candidates for a targeted therapy with selective *PIK3CA* inhibitors.⁵¹

In conclusion, we found that potentially actionable oncogenic kinase fusions are highly enriched in CRCs with *MLH1d/MLH1ph* and *BRAFwt/RASwt* status. When anti-EGFR treatment is considered in patients with advanced CRC, targeted NGS of tumors with *MLH1d/MLH1ph* and *BRAF* wild-type status could be a cost-effective strategy in detecting patients with common and less common RAS gene mutations, rare downstream mutations in RAS-MAPK and PIK3K-AKT-mTOR pathway genes, and, eventually, potentially druggable gene fusions.

ACKNOWLEDGMENTS

The study was supported by the Charles University Research Fund (project number Q39) and by the project Institutional Research Fund of University Hospital Plzeň (Faculty Hospital in Plzeň-FNP I00669806).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Marian Svajdler <https://orcid.org/0000-0001-8052-4741>

REFERENCES

- International Agency for Research on Cancer. Global cancer observatory. <https://gco.iarc.fr/>. Accessed February 12, 2020.
- Piawah S, Venook AP. Targeted therapy for colorectal cancer metastases: a review of current methods of molecularly targeted therapy and the use of tumor biomarkers in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Cancer*. 2019;125(23):4139-4147.
- Khan K, Valeri N, Dearman C, et al. Targeting EGFR pathway in metastatic colorectal cancer- tumour heterogeneity and convergent evolution. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2019;143:153-163.
- Bensen AB, Venook AP, Al-Hawary MM, et al. NCCN Clinical Practice Guidelines in oncology: colon cancer. Version 1.2020. [NCCN.org](http://www.nccn.org). Accessed February 12, 2020.
- Therkildsen C, Bergmann TK, Henrichsen-Schnack T, Ladelund S, Nilbert M. The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Acta Oncol*. 2014;53(7):852-864.
- Sepulveda AR, Hamilton SR, Allegra CJ, et al. Molecular biomarkers for the evaluation of colorectal cancer: guideline from the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol*. 2017;35:1453-1486.
- Costigan DC, Dong F. The extended spectrum of RAS-MAPK pathway mutations in colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2020;59(3):152-159.
- Pagani F, Randon G, Guarini V, et al. The landscape of actionable gene fusions in colorectal cancer. *Int J Mol Sci*. 2019;20(21):5319.
- Kloosterman WP, van den Braak RJC, Pieterse M, et al. A systematic analysis of oncogenic gene fusions in primary colon cancer. *Cancer Res*. 2017;77(14):3814-3822.
- Gatalica Z, Xiu J, Swensen J, Vranic S. Molecular characterization of cancers with NTRK gene fusions. *Mod Pathol*. 2019;32(1):147-153.
- Lasota J, Chtopek M, Lamoureux J, et al. Colonic adenocarcinomas harboring NTRK fusion genes: a clinicopathologic and molecular genetic study of 16 cases and review of the literature. *Am J Surg Pathol*. 2020;44(2):162-173.
- Solomon JP, Linkov I, Rosado A, et al. NTRK fusion detection across multiple assays and 33,997 cases: diagnostic implications and pitfalls. *Mod Pathol*. 2020;33(1):38-46.
- Aisner DL, Nguyen TT, Paskulin DD, et al. ROS1 and ALK fusions in colorectal cancer, with evidence of intratumoral heterogeneity for molecular drivers. *Mol Cancer Res*. 2014;12(1):111-118.
- Pietrantonio F, Di Nicolantonio F, Schrock AB, et al. ALK, ROS1, and NTRK rearrangements in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2017;109(12):10.
- Pietrantonio F, Di Nicolantonio F, Schrock AB, et al. RET fusions in a small subset of advanced colorectal cancers at risk of being neglected. *Ann Oncol*. 2018;29(6):1394-1401.
- Li AY, McCusker MG, Russo A, et al. RET fusions in solid tumors. *Cancer Treat Rev*. 2019;81:101911.
- Ross JS, Wang K, Chmielecki J, et al. The distribution of BRAF gene fusions in solid tumors and response to targeted therapy. *Int J Cancer*. 2016;138(4):881-890.
- Chou A, Fraser T, Ahadi M, et al. NTRK gene rearrangements are highly enriched in *MLH1/PMS2* deficient, *BRAF* wild-type colorectal carcinomas-a study of 4569 cases. *Mod Pathol*. 2019;33(5):924-932.
- Cocco E, Benhamida J, Middha S, et al. Colorectal carcinomas containing hypermethylated *MLH1* promoter and wild-type *BRAF/KRAS* are enriched for targetable kinase fusions. *Cancer Res*. 2019;79(6):1047-1053.
- Wang J, Yi Y, Xiao Y, et al. Prevalence of recurrent oncogenic fusion in mismatch repair-deficient colorectal carcinoma with hypermethylated *MLH1* and wild-type *BRAF* and *KRAS*. *Mod Pathol*. 2019;32(7):1053-1064.
- Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:9821-9826.
- Skalova A, Vanecek T, Martinek P, et al. Molecular profiling of mammary analog secretory carcinoma revealed a subset of tumors harboring a novel *ETV6-RET* translocation: report of 10 cases. *Am J Surg Pathol*. 2018;42(2):234-246.
- Newcombe RG. Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods. *Stat Med*. 1998;17(8):857-872.
- Knudsen S. Promoter2.0: for the recognition of PolII promoter sequences. *Bioinformatics*. 1999;15(5):356-361.
- Pedersen AG, Nielsen H. Neural network prediction of translation initiation sites in eukaryotes: perspectives for EST and genome analysis. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*. 1997;5:226-233.
- Tate JG, Bamford S, Jubb HC, et al. COSMIC: the catalogue of somatic mutations in cancer. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D941-D947.
- Gao C, Wang Y, Broaddus R, Sun L, Xue F, Zhang W. Exon 3 mutations of *CTNNB1* drive tumorigenesis: a review. *Oncotarget*. 2017;9(4):5492-5508.
- Ikenoue T, Ijichi H, Kato N, et al. Analysis of the beta-catenin/T cell factor signaling pathway in 36 gastrointestinal and liver cancer cells. *Jpn J Cancer Res*. 2002;93(11):1213-1220.
- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, et al. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science*. 1997;275(5307):1787-1790.
- Jour G, Oultache A, Sadowska J, et al. GNAS mutations in fibrous dysplasia: a comparative study of standard sequencing and locked nucleic acid PCR sequencing on decalcified and nondecalcified formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2016;24(9):660-667.
- Madsen RR, Vanhaesebroeck B, Semple RK. Cancer-associated *PIK3CA* mutations in overgrowth disorders. *Trends Mol Med*. 2018;24(10):856-870.

32. Johnson V, Volikos E, Halford SE, et al. Exon 3 beta-catenin mutations are specifically associated with colorectal carcinomas in hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome. *Gut*. 2005;54(2):264-267.
33. Shihab HA, Gough J, Cooper DN, Day IN, Gaunt TR. Predicting the functional consequences of cancer-associated amino acid substitutions. *Bioinformatics*. 2013;29(12):1504-1510.
34. Bray SM, Lee J, Kim ST, et al. Genomic characterization of intrinsic and acquired resistance to cetuximab in colorectal cancer patients. *Sci Rep*. 2019;9(1):15365.
35. Puccini A, Berger MD, Naseem M, et al. Colorectal cancer: epigenetic alterations and their clinical implications. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2017;1868(2):439-448.
36. Fang M, Ou J, Hutchinson L, Green MR. The BRAF oncoprotein functions through the transcriptional repressor MAFG to mediate the CpG Island Methylator phenotype. *Mol Cell*. 2014;55(6):904-915.
37. Bond CE, Whitehall VJ. How the BRAF V600E mutation defines a distinct subgroup of colorectal cancer: molecular and clinical implications. *Gastroenterol Res Pract*. 2018;2018:9250757.
38. Farchoukh L, Kuan SF, Dudley B, Brand R, Nikiforova M, Pai RK. MLH1-deficient colorectal carcinoma with wild-type BRAF and MLH1 promoter hypermethylation harbor KRAS mutations and arise from conventional adenomas. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(10):1390-1399.
39. Sato K, Kawazu M, Yamamoto Y, et al. Fusion kinases identified by genomic analyses of sporadic microsatellite instability-high colorectal cancers. *Clin Cancer Res*. 2019;25(1):378-389.
40. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol*. 2005;23(3):609-618.
41. Petrelli F, Ghidini M, Cabiddu M, et al. Microsatellite instability and survival in stage II colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Anticancer Res*. 2019;39(12):6431-6441.
42. Copija A, Waniczek D, Witkos A, Walkiewicz K, Nowakowska-Zajdel E. Clinical significance and prognostic relevance of microsatellite instability in sporadic colorectal cancer patients. *Int J Mol Sci*. 2017;18(1):107.
43. Wang B, Li F, Zhou X, Ma Y, Fu W. Is microsatellite instability-high really a favorable prognostic factor for advanced colorectal cancer? A meta-analysis. *World J Surg Oncol*. 2019;17(1):169.
44. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(20):3219-3226.
45. Sinicrope FA, Foster NR, Thibodeau SN, et al. DNA mismatch repair status and colon cancer recurrence and survival in clinical trials of 5-fluorouracil-based adjuvant therapy. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(11):863-875.
46. Guastadisegni C, Colafranceschi M, Ottini L, Dogliotti E. Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: a meta-analysis of colorectal cancer survival data. *Eur J Cancer*. 2010;46(15):2788-2798.
47. Webber EM, Kauffman TL, O'Connor E, Goddard KA. Systematic review of the predictive effect of MSI status in colorectal cancer patients undergoing 5FU-based chemotherapy. *BMC Cancer*. 2015;15:156.
48. Des Guetz G, Schischmanoff O, Nicolas P, Perret GY, Morere JF, Uzzan B. Does microsatellite instability predict the efficacy of adjuvant chemotherapy in colorectal cancer? A systematic review with meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2009;45(10):1890-1896.
49. Des Guetz G, Uzzan B, Nicolas P, Schischmanoff O, Perret GY, Morere JF. Microsatellite instability does not predict the efficacy of chemotherapy in metastatic colorectal cancer. A systematic review and meta-analysis. *Anticancer Res*. 2009;29(5):1615-1620.
50. Thomas J, Leal A, Overman MJ. Clinical development of immunotherapy for deficient mismatch repair colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2020; In Press.
51. Juric D, Rodon J, Taberero J, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase a-selective inhibition with Alpelisib (BYL719) in PIK3CA-altered solid tumors: results from the first-in-human study. *J Clin Oncol*. 2018;36(13):1291-1299.

How to cite this article: Vankova B, Vanecek T, Ptakova N, et al. Targeted next generation sequencing of MLH1-deficient, MLH1 promoter hypermethylated, and BRAF/RAS-wild-type colorectal adenocarcinomas is effective in detecting tumors with actionable oncogenic gene fusions. *Genes Chromosomes Cancer*. 2020;1-7. <https://doi.org/10.1002/gcc.22861>

3.6 Moderní diagnostika Lynchova syndromu

Článek shrnuje problematiku Lynchova syndromu a představuje vhodný diagnostický algoritmus pro detekci pacientů, jež by měli podstoupit další testování pro průkaz germinální mutace z periferní krve (k definitivnímu potvrzení diagnózy LS).

Naprostá většina případů LS je způsobena zárodečnou mutací některého z MMR genů. Pomocí imunohistochemických barvení hlavních MMR proteinů (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6) můžeme dostat zprostředkovanou informaci o funkci MMR komplexu. Na našem pracovišti byl zaveden „komplexní diagnostický management“, kdy je v případě přítomnosti tzv. MSI-H histologie (tj. v Semi PREDICT skóre přítomny dva a více hodnocených znaků - hodnocení přítomnosti mucinu disekujícího stroma, tumor-infiltrujících lymfocytů, peritumorálního lymfoidního lemu a přítomnosti plazmatických buněk ve stromatu převyšujících 25 %), proveden imunohistochemický screening (vyšetření exprese MLH1, PMS2, MSH2, MSH6), jehož cílem je potvrdit přítomnost MSI-H, vyloučit možnost sporadického MSI-H karcinomu a určit pravděpodobně postižený gen k detekci zárodečné mutace.

Moderní diagnostika Lynchova syndromu

Modern diagnostics of Lynch syndrome

B. Kokošková^{1,2}, O. Daum¹, Z. Beneš³, M. Dušek^{1,2}, J. Stehlík², K. Černá², L. Hadravský¹, M. Michal¹

¹Šiklův ústav patologie, LFUK a FN Plzeň

²Bioptická laboratoř, s. r. o., Plzeň

³Interní oddělení Fakultní Thomayerovy nemocnice, Praha

Souhrn: Lynchův syndrom (dříve zvaný hereditární nepolypózní kolorektální karcinom – HNPCC) je nejčastější genetickou příčinou familiárního výskytu kolorektálního karcinomu. Příčinou je zárodečná mutace některého z MMR genů, které jsou zodpovědné za opravy chyb ve struktuře DNA vznikající při její replikaci. Tyto mutace způsobují dysfunkci opravného komplexu, která vede k rozvoji nestability mikrosatelitů (MSI) a ke vzniku a progresi nádorů, zejména kolorektálního karcinomu. V současné době se odhaduje, že až 5 % kolorektálních karcinomů vzniká v asociaci s Lynchovým syndromem. Vzhledem k této poměrně vysoké četnosti, absenci premorbidního fenotypu, familiárnímu výskytu a prezentaci maligních nádorů v produktivním věku je včasná diagnostika Lynchova syndromu důležitá nejen z etického, ale i ekonomického hlediska. Bohužel, Bethesda guidelines, natož Amsterdamská kritéria, nejsou dostatečně senzitivní. Vyšší senzitivitu vykazuje detekce morfologických znaků asociovaných s MSI při histologickém vyšetření vzorků kolorektálních karcinomů. Přibližně jedna pětina karcinomů s MSI je geneticky podmíněna Lynchovým syndromem, zbytek tvoří sporadické MSI-H karcinomy způsobené epigenetickou inaktivací MMR genu. K vyloučení těchto sporadických případů z dalšího testování slouží vyšetření genu *BRAF* a analýza metylace promotoru genu *MLH1*. Podezření na Lynchův syndrom vyplývající z výsledků výše uvedeného komplexu vyšetření by mělo být nakonec potvrzeno detekcí zárodečné mutace některého z MMR genů v periferní krvi pacienta s následným vyšetřením rodinných příslušníků pro zajištění účinné prevence.

Klíčová slova: kolorektální karcinom – Lynchův syndrom – HNPCC – nestabilita mikrosatelitů

Summary: Lynch syndrome (formerly known as hereditary non-polyposis colorectal cancer – HNPCC) is the most common hereditary colorectal cancer syndrome. The syndrome is caused by a germline mutation of one of the mismatch repair (MMR) genes which are responsible for DNA replication error repair. Impaired function of the proteins encoded by these genes leads to microsatellite instability (MSI) and forms a suitable background for development and progression of tumours, mainly colorectal cancer. According to recent estimates up to 5% of all cases of colorectal cancer are associated with Lynch syndrome. Due to this relatively high frequency, familial occurrence, absence of premorbid phenotype and development of malignant tumors in productive age, correct diagnosis is important not only from the ethical but also the economical point of view. Unfortunately, clinical means of diagnostics of Lynch syndrome (like the Amsterdam criteria and Bethesda guidelines) lacks sensitivity. It was shown that predictive models based on histological signs of MSI are more sensitive than the clinical criteria used to detect patients with suspected Lynch syndrome. Of all MSI-H colorectal cancers, 1/5 is caused by Lynch syndrome, while the rest are sporadic cancers caused by epigenetic inactivation of an MMR gene. To rule out the sporadic cases, molecular genetic investigation of the *BRAF* gene and methylation analysis of the *MLH1* promoter is used in the diagnostic workup of Lynch syndrome. The suspicion of Lynch syndrome, based on the results of the complex of diagnostic methods mentioned above, should be proved by detection of a germline mutation of an MMR gene in peripheral blood, and followed by screening of family members, which is a necessary condition for efficient prevention.

Key words: colorectal cancer – Lynch syndrome – HNPCC – microsatellite instability

Lynchův syndrom – historie a současnost

V současné době je Lynchův syndrom (LS) definován jako autozomálně dominantně dědičné onemocnění vytvářející predispozici ke vzniku maligních nádorů, jehož podkladem je zárodečná mutace některého z genů odpovědných za

opravy replikačních chyb v DNA, tzv. mismatch repair (MMR) genů. Nejčastějším karcinomem vznikajícím při LS je kolorektální karcinom (CRC), je však zvýšené riziko vzniku i dalších malignit, zejména karcinomů endometria, žaludku, tenkého střeva, ovaria, ledvinné pánvičky a močovodu, nádorů mozku a kůže.

Navzdory svému názvu je první literární zpráva o LS obsažena v publikaci Prof. Warthina z roku 1913, v níž je popsána „karcinomová rodina G“ [1]. Obdobné pozorování rodinného výskytu kolorektálního karcinomu při absenci polypózy [2] přivedlo dr. Lynche k návratu ke „karcinomové rodině G“,

aktualizaci informací a rozpoznání základních znaků tohoto syndromu, kterými jsou [3]:

1. zvýšená incidence adenokarcinomů, zejména kolorektálních a endometriálních,
2. zvýšené riziko multiplicity nádorů,
3. autozomálně dominantní dědičnost,
4. vznik karcinomů v mladším věku.

Onemocnění bylo zpočátku označováno jako „syndrom karcinomové rodiny“, později „hereditární nepolypózní kolorektální karcinom“ (HNPCC) [4]. Zároveň se však začalo synonymně používat označení „Lynchův syndrom“ [5]. Z důvodu možnosti výskytu extrakolonických malignit se v současné době upouští od zavádějícího termínu HNPCC, přičemž označení „Lynchův syndrom“ se používá pro případy způsobené germinální mutací některého z MMR genů, zatímco pro případy splňující Amsterdamská kritéria, ale bez prokazatelné zárodečné mutace některého z MMR genů, se doporučuje termín „familiární kolorektální karcinom typu X“ [6].

Na podkladě LS vzniká podle současných odhadů až 5 % CRC. Důvodem, proč přesto stále zůstává ve stínu méně časté familiární adenomatózní polypózy (FAP, cca 1 %) je, že tyto nádory nevznikají v terénu polypózy (definované jako > 100 polypů), což však neznamená, že nemohou být přítomny žádné polypy. Absence „premorbidního fenotypu“, tedy přítomnosti benigních změn, které by umožňovaly diagnostikovat tento syndrom ještě před vznikem maligního tumoru (jako je tomu třeba v případě FAP, neurofibromatózy 1. typu a dalších familiárních karcinomových syndromů) výrazně ztěžuje jeho včasnou klinickou diagnostiku. Výjimkou z tohoto pravidla je fenotypická varianta LS projevující se vznikem kožních sebaceózních nádorů, označovaná jako Muir-Torrehova syndrom (MTS) [7]. V ostatních případech může být LS diagnostikován prakticky až při nálezu maligního tu-

moru, případně při genetickém vyšetření rodinných příslušníků již diagnostikovaného probanda.

Lynchův syndrom z pohledu molekulární genetiky

MMR geny a MMR proteiny

Naprostá většina případů LS je způsobena zárodečnou mutací některého z genů odpovědných za opravy replikačních chyb v DNA (replication error repair, RER), které jsou označovány jako mismatch repair (MMR) geny [8,9]. Fyziologicky se MMR proteiny kódované těmito geny spojují do funkčních komplexů, především v heterodimery MLH1-PMS2 a MSH2-MSH6 (příp. MSH2-MSH3). Zatímco druhý jmenovaný dimer se uplatňuje v rozpoznávání chyb (především nespárovaných nebo špatně spárovaných nukleotidů) v DNA, první heterodimer slouží k opravě těchto nalezených chyb. Inaktivace obou alel některého ze jmenovaných genů vede k dysfunkci celého komplexu a ke vzniku nádorů charakteristických vysokým stupněm tzv. nestability mikrosatelitů [10,11].

Mikrosatelity a MSI

Mikrosatelity jsou úseky DNA tvořené několikanásobným opakováním jednoho až čtyř, vzácněji i více nukleotidů. Tyto krátké repetitivní sekvence se vyskytují v genomu poměrně hojně, přičemž délky jednotlivých mikrosatelitů (tedy počty opakování těchto sekvencí) jsou za normálních okolností v rámci jedince stejné, ale mohou se lišit mezi jednotlivci. Sekvence mikrosatelitů jsou snadno zranitelné při replikaci DNA, protože DNA polymeráza v oblasti repetice „sklouzává“ a v důsledku toho dochází ke vzniku delších či kratších úseků. Jestliže nedochází ke korekci těchto chyb, potom může délka mikrosatelitů v rámci jednoho jedince kolísat, což je stav označovaný jako nestabilita mikrosatelitů (microsatellite instability, MSI). MSI však není jednoznačně daným stavem, který by přímo způsoboval vznik nádorů. Jde

spíše o semikvantitativní vyjádření genetického poškození DNA uvedeným mechanismem. Stanovení stupně MSI je tedy arbitrární a spočívá ve stanovení nestability mezinárodně kodifikovaných markerů, přičemž na základě počtu postižených markerů se rozlišují stavy (hlavně nádory) se stabilními mikrosatelity (microsatellite stable, MSS), s nízkým stupněm nestability (microsatellite instability – low, MSI-L) a s vysokým stupněm nestability mikrosatelitů (microsatellite instability – high, MSI-H) [12].

MMR geny a MSI-H tumory

Tumory s MSI-H vznikají dvěma různými mechanismy, a to buď jako sporadické nádory vyvolané genetickými a/nebo epigenetickými změnami v somatické buňce, nebo jako familiárně se vyskytující nádory v rámci LS způsobené zárodečnou mutací některého z MMR genů. Ačkoli je mutovaná alela děděna autozomálně dominantně, k vlastnímu vzniku nádoru dochází až somatickou inaktivací druhé alely téhož genu, což je dáno tím, že MMR geny patří mezi typické tumor supresorové geny s recesivním charakterem účinku [13]. Teprve tehdy, je-li u osob nesoucích jednu zárodečně mutovanou alelu MMR genu během jejich života inaktivována i alela druhá, dochází ke vzniku maligních tumorů. Příčinou této inaktivace může být somatická mutace v druhé alele genu, ztráta heterozygosity (LOH) nebo metylace promotoru, jak tomu bývá u genu *MLH1* [14].

Nejčastěji postiženými geny při LS jsou *MLH1* a *MSH2* (dohromady více než 80 %) [15], dále následuje *MSH6* (10 %) a zbylé případy představují vzácná zárodečná postižení dalších MMR genů (*PMS2*, *PMS1*, *MSH3*, *MLH3*).

Vzácné příčiny Lynchova syndromu

Ačkoli je LS obecně vnímán jako důsledek zárodečné mutace MMR genů, vzácně může vést ke stejné dysfunkci MMR proteinů, a tím i ke stejnému klinickému postižení, odlišný mechaniz-

mus, jehož neznalost může mít za následek diagnostické rozpaky. V případě genu *MLH1* byly například popsány zárodečné hypermetylace promotoru vedoucí k jeho epigenetické inaktivaci [16,17]. V nedávné době byly popsány i zárodečné delece 3' konce genu *EPCAM (TACSTD1)*, které zase vedou k epigenetické inaktivaci *MSH2* [18,19]. Navíc dosud u řady mutací a polymorfizmů MMR genů nebyl objasněn jejich klinický význam.

Klinické a genetické varianty Lynchova syndromu

Klinické projevy LS se mohou lišit podle postiženého genu, případně i podle konkrétního typu mutace. Například u nosičů zárodečné mutace *MLH1* často bývá kolorektální karcinom jedinou diagnostikovanou malignitou na rozdíl od pacientů se zárodečnou mutací v *MSH2*, u nichž se častěji vyskytují i extrakolonické nádory [20]. Mutace v *MSH6* mají jednak nízkou penetranci, dále jsou šestkrát častěji asociovány s karcinomy endometria než s nádory kolorekta, a navíc jsou u těchto pacientů kolorektální karcinomy (v porovnání s LS způsobeným mutacemi jiných MMR genů) častěji levostranné. Důležité také je, že mutace v *MSH6* nevedou vždy k MSI-H, pravděpodobně díky tvorbě alternativního heterodimeru MSH2-MSH3, což může ovlivnit jejich diagnostiku [21,22]. Naopak mutace v *PMS2* vedou většinou ke vzniku MSI-H tumorů a jsou asociovány jak s časným kolorektálním, tak endometriálním karcinomem, avšak ani zde penetrance není příliš vysoká [23–25]. Nádory pacientů s LS a MTS jsou v 89 %, resp. 70 % MSI-H, na rozdíl od sporadických kolorektálních karcinomů, kde se MSI-H status vyskytuje pouze u 15 % pacientů a v naprosté většině případů bývá asociován s hypermetylací promotoru genu *MLH1*, nikoli se somatickými mutacemi MMR genů [10,26,27]. V některých případech je kombinace klinických znaků natolik výrazná, že dala vznik novým klinickým syndro-

mům, které ve skutečnosti představují pouze varianty LS.

Muir-Torrehova syndrom

MTS zahrnuje kombinaci nejméně jednoho kožního nádoru se sebaceózní diferenciací a minimálně jednoho viscerálního tumoru. Byl to právě „otec“ LS Henry Lynch, kdo v roce 1981 poukázal na společnou možnou etiologii MTS a LS, poté co identifikoval pacienty s fenotypem MTS v rodině postižené LS [28]. MTS jako varianta LS je unikátní v tom, že jako jediná představuje premorbidní fenotyp, tedy vykazuje znaky umožňující diagnózu LS ještě před rozvojem CRC.

Mezi kožní léze asociované s MTS patří sebaceózní adenom, sebaceom a extraokulární sebaceózní karcinom (naopak výskyt periokulárních sebaceózních tumorů je u MTS vzácný). Kožní tumory jsou většinou mnohočetné, ale byly popsány i případy solitárních lézí [29]. Klinický obraz se neliší od jejich sporadických protějšků, které jsou statisticky častější. Ve většině případů se jedná o nenápadné papuly a noduly hladkého povrchu, nažloutlé či růžové barvy anebo zbarvení kůže, velikosti od několika mm do 5 cm. U sebaceózních karcinomů mohou léze dosahovat větších rozměrů, vyznačují se nepřesným ohraničením, rychlým růstem a možnou ulcerací jejich povrchu. Přítomna může být také hyperplazie mazových žlázek [30]. Ta se jeví jako žlutobělavé papulky velikosti několika milimetrů, s typickou centrální vkleslinou. Obecně lze shrnout, že mnohočetné kožní nádory se sebaceózní diferenciací vyskytující se u jedinců před 50. rokem života nebo postihující tělní partie mimo obličej jsou silným indikátorem MTS [31]. Podobně i mnohočetné keratoakantomy vznikající na místech chráněných před sluncem u mladých osob slouží jako vodítko pro správnou diagnózu. Tyto se nejprve manifestují jako narůžovělé noduly s rychlým růstem, později na vrcholu s rohovatěním, případně i ulcerací.

Na vzniku MTS se podílí především zárodečné mutace v genech *MLH1* a *MSH2*, přičemž mutace v genu *MSH2* je převažující [32,33].

Turcotův syndrom 1. typu

Turcotův syndrom (TS) je klasicky charakterizován společným výskytem nádorů mozku a CRC. Podtyp označovaný jako TS 1. typu je blíže specifikován vazbou mozkového nádoru (hlavně gliomu) s CRC bez polypózy, přičemž může být také způsoben zárodečnou mutací některého z MMR genů; mutace byly detekovány zejména v *MLH1* a *PMS2* [34]. Za těchto podmínek se TS 1. typu jeví ve většině případů jako fenotypická varianta LS.

Syndrom konstitučního mismatch repair deficitu

Syndrom konstitučního mismatch repair deficitu (constitutional mismatch repair deficiency, CMMRD) je velmi vzácně se vyskytující zárodečná bi-alelická mutace genů MMR. Vzhledem k tomu, že jde o onemocnění dědičné autozomálně recesivně, vyskytuje se zejména jako následek incestu. Tento stav je charakteristický vznikem CRC již v mladém věku, hematologickými malignitami a fenotypickým obrazem připomínajícím neurofibromatózu 1. typu, zejména skvrnami café-au-lait [35,36]. Z diagnostického hlediska je také důležité, že imunohistochemicky stanovený deficit MMR proteinu má vyšší senzitivitu než vyšetření MSI [37]. V některých pramenech se tento syndrom označuje jako Turcotův syndrom. Přestože je i v tomto případě přítomna koincidence mozkového nádoru s CRC, celková odlišnost fenotypového obrazu i genetického podkladu je jasným argumentem proti zaměňování těchto dvou syndromů.

Tradiční diagnostika Lynchova syndromu

Ke klinické diagnostice HNPCC sloužila Amsterdamská kritéria [38], která byla pro zvýšení senzitivity, zejména

s přihlédnutím k možnosti prezentace syndromu extrakolonickou malignitou (tzv. LS 2. typu), v roce 1998 revidována na Amsterdamská kritéria II [39]. Nicméně protože se postupně zlatým standardem diagnózy LS stávalo molekulárně genetické vyšetření, prioritou se stal záchyt co největšího množství pacientů pro toto vyšetření, nikoli samotná klinická diagnóza LS.

Bethesda guidelines

K identifikaci pacientů s CRC, u kterých by měla být vyšetřena nestabilita mikrosatelitů (MSI), případně provedeno molekulárně genetické vyšetření, byla v roce 1996 vypracována a v roce 2002 revidována tzv. Bethesda guidelines (BG, resp. RBG), která berou v potaz nejen klinická kritéria, ale i morfologické znaky tumoru [40]. Bohužel ani tato širší kritéria nezachytí všechny případy LS [41], zejména v případě postižení *MSH6* a *PMS2* [24,42–45]. Podle současných odhadů není až 25 % pacientů s LS zachyceno systémem kritérií RBG. Vzhledem k tomu, že falešná negativita v případě LS nemá za následek nerozpoznání tohoto syndromu pouze u vyšetřovaného pacienta, ale i u jeho případných příbuzných, nelze senzitivitu RBG pokládat za dostatečnou.

Moderní diagnostika Lynchova syndromu

Výše uvedená nedostatečná senzitivita RBG, případně další klinická kritéria sloužící k záchytu pacientů s LS, je příčinou současné snahy o zavedení senzitivnějšího systému depistáže, byť i za cenu snížení specifity. V tomto případě je možné familiární tendence ke vzniku maligních nádorů ospravedlnit jak z hlediska etického, tak ekonomického.

Mezi hlavní argumenty pro zvýšení senzitivity systému depistáže patří fakt, že 1 ze 660 lidí je nositelem germinální mutace některého z MMR genů [46], riziko vzniku CRC u LS je 60–80 % [47,48], dále že k progresi

z adenomu do karcinomu pravděpodobně dochází během 2–3 let na rozdíl od 8–10 let u sporadických případů [49,50], a zejména že průměrný věk v době diagnózy je 45 let, tedy asi o 20 let méně než u sporadického CRC, navíc se zvýšeným rizikem synchronního a metachronního CRC [49].

V současné době jsou k dispozici tři základní senzitivní modely vyhledávání pacientů s podezřením na LS, přičemž každý z nich má své výhody a své nevýhody. Všechny tři mají společné, že detekují tumory s MSI-H, a to buď přímo (tedy molekulárně genetickým stanovením MSI), nebo zprostředkovaně. Do druhé skupiny patří jednak imunohistochemická detekce exprese MMR proteinů, jednak histologický průkaz morfologických znaků asociovaných s MSI.

Nicméně čtyři z pěti MSI-H CRC jsou sporadické tumory způsobené somatickou epigenetickou inaktivací MMR genu (zdaleka nejčastěji metylací promotoru *MLH1*). Tyto sporadické nádory je třeba odlišit před nákladnou analýzou jednotlivých MMR genů. V současné době umožňuje rozlišení sporadických a LS-asociovaných MSI-H karcinomů zapojení dvou metod molekulární patologie do managementu CRC. První z nich je analýza genu *BRAF*, konkrétně průkaz mutace V600E, která je přítomna až u poloviny sporadických MSI-HCRC, ale (téměř) nikdy u LS. Druhou metodu představuje průkaz hypermetylace promotoru *MLH1*, která je markerem sporadických MSI-H CRC a naopak až na výjimky nebývá přítomna u LS [51]. S vědomím určitého statistického zjednodušení lze tedy tyto dvě metody využít k vyřazení pacientů z dalšího (nákladného) diagnostického managementu, pokud tomu nebrání jiné okolnosti (např. nízký věk, výrazné familiární postižení, multiplicita nádorů).

Stanovení MSI

Rozlišení tumorů na MSS, MSI-L a MSI-H na základě stanovení nestabi-

lity mezinárodně kodifikovaných markerů se samozřejmě v diagnostice Lynchova syndromu využívalo již dříve, ale cíleně, nikoli plošně. Plošné využití stanovení MSI k depistáži Lynchova syndromu je založeno na vyšetření všech CRC touto metodou. Mezi nevýhody systému patří výrazný nárůst zátěže laboratoří molekulární genetiky, absence informace o postiženém genu a konečně i fakt, že (navzdory obecnému přesvědčení) ne všechny LS-asociované nádory musí vykazovat MSI-H. Praktické využití plošného vyšetřování MSI naráží též na nezbytnost porovnání stavu markerů ve tkáni nádoru s tkání nenádorovou. To vyžaduje buď přítomnost nenádorové tkáně v materiálu (např. chirurgický okraj střevního resektátu), nebo odběr periferní krve pacienta (zejména v případě endoskopicky získaných vzorků).

Imunohistochemická detekce MMR proteinů

Zprostředkovanou informaci o funkci MMR komplexu lze získat pomocí imunohistochemického vyšetření exprese hlavních MMR proteinů (tedy *MLH1*, *PMS2*, *MSH2* a *MSH6*). Ačkoliv zpočátku, kdy byla imunohistochemicky stanovována pouze exprese *MLH1* a *MSH2*, bylo preferováno stanovení MSI, po zavedení protilátek proti jejich dvěma partnerům pro tvorbu heterodimerů (*PMS2* a *MSH6*) je senzitivita imunohistochemického vyšetření a stanovení MSI srovnatelná [52]. V současné době jsou obě metody (stanovení MSI a imunohistochemické vyšetření) vnímány jako komplementární, protože v kombinaci mají vyšší senzitivitu než při samostatném použití [53,54]. Typickým příkladem přínosu imunohistochemie jsou případy s mutací *MSH6*, které mohou uniknout při detekci MSI pomocí PCR, protože *MSH2* může také tvořit komplex s *MSH3*, a tím nemusí nutně vést ke stavu MSI-H [52,55]. Imunohistochemická detekce MMR proteinů navíc (na rozdíl od stanovení MSI) umožňuje

predikovat postižený gen pro molekulárně genetické vyšetření, což výrazně sníží náklady při následné detekci případné zárodečné mutace. Nicméně, názory na prioritu stanovení MSI nebo imunohistochemického vyšetření nejsou jednotné a různí autoři prosazují plošný screening pomocí MSI nebo pomocí imunohistochemie.

Detekce morfologických znaků MSI konvenční histologií

Histologické vyšetření představuje finančně nejméně náročnou metodu plošné depistáže. Je založeno na detekci histologických znaků charakteristických pro CRC s vysokým stupněm nestability mikrosatelitů, tedy tzv. MSI-H histologii, která samotná má vyšší senzitivitu než souhrn zbývajících čtyř kritérií RBG [56]. Ačkoli byly morfologické znaky pozorovatelné v MSI-H CRC popsány již v RBG (konkrétně byly uváděny karcinomy se špatnou diferenciací, karcinomy mucinózní, medulární nebo „z buněk pečetního prstenu“, přítomnost Crohn-like lymfoidních nodulů a tumor-infiltrujících lymfocytů (TIL)), nebyla dostatečně známa ani prediktivní hodnota jednotlivých znaků ani jejich reprodukovatelná kvantitativní definice, která by byla použitelná v rutinní praxi [40,57]. Z různých studií, jejichž cílem bylo nalézt racionální algoritmus detekce MSI-H karcinomů [58], se v současné době jako nejužitečnější jeví model Model PREDICT (Pathological Role in the Determination of Instability in Colorectal Tumors) [56], zejména ve své zjednodušené formě jako Semi PREDICT skóre (tab. 1). Histologickými znaky, na nichž je tento model založen, jsou: přítomnost mucinu disekujícího stroma v jakémkoli množství, přítomnost tumor-infiltrujících lymfocytů (TIL), peritumorální lymfoidní lem a zastoupení plazmatických buněk mezi leukocyty ve stromatu převyšující 25 % (obr. 1).

Mezi výhody histologického vyšetření patří i možnost levného, rychlého

Tab. 1. Model PREDICT.

Tab. 1. Model PREDICT.

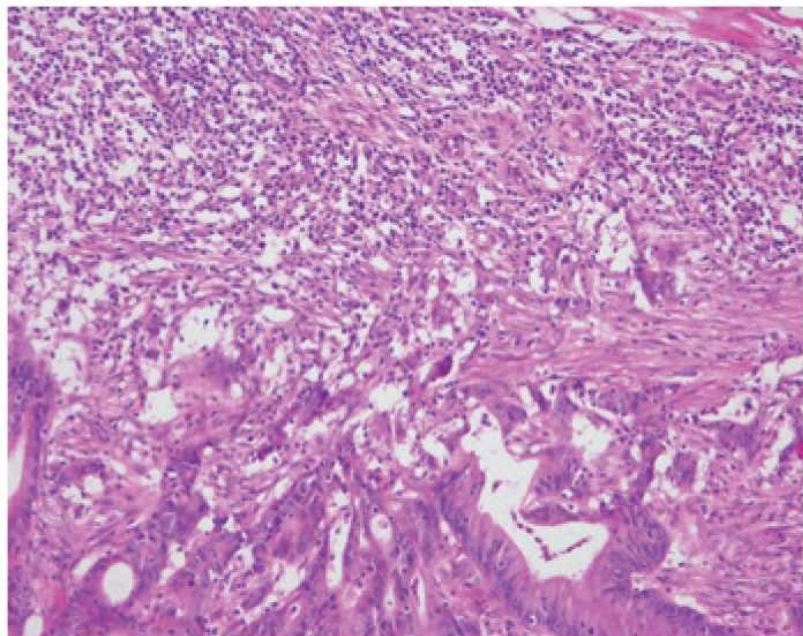
Znak	Skóre
pravostranná lokalizace	1,6
jakékoli množství disekujícího mucinu	1,6
věk pod 50 let	1,3
tumor infiltrující lymfocyty	1,3
peritumorální lymfoidní lem	0,7
plazmocyty tvoří > 25 % stromálních leukocytů	0,7

PREDICT skóre:

Maximální možné skóre: 7,8

Suspekce na MSI-H: skóre $\geq 2,5$

Semi PREDICT skóre: přítomny dva a více znaků \rightarrow MSI-H susp.



Obr. 1. Příklad „MSI-H histologie“. Jeden z typických obrazů MSI-H CRC, zde představovaný zejména intraepiteliální lymfocytózou vytvářející v dolní části obrázku „posypání“ nádorových žlázek lymfocyty obklopenými světlými halo a souvislým lymfoidním lemem v horní části snímku (HE, původní objektiv 10 \times).

Fig. 1. Example of "MSI-H histology". One of the typical images of MSI-H CRC is represented in particular by intraepithelial lymphocytosis forming the "sprinkling" of cancer glandular cells with lymphocytes surrounded by bright halos at the bottom of the picture and continuous lymphoid band in the upper part of the image (HE, original lens 10 \times).

a jednoduchého vyloučení sporadických MSI-H karcinomů podmíněných většinou somatickou metylací promotoru genu *MLH1*. Zatímco tyto vznikají z tzv. „sesilních serrated adenomů“ (do češtiny někdy nešťastně

překládaných jako „přisedlé pilovité adenomy“), prekursorovou lézí karcinomů v terénu LS je „konvenční“ (tubulární, tubulovilózní nebo vilózní) adenom. Jsou-li tedy v periférii tumoru zbytky prekursorového

sesilního serrated adenomu, jde s největší pravděpodobností o sporadický MSI-H karcinom [59]. Nicméně tento jednoduchý diagnostický znak vylučující LS nemusí být vždy dostupný, ať již z důvodu nedostatečného samplingu nebo destrukce adenomu pokročilým adenokarcinomem.

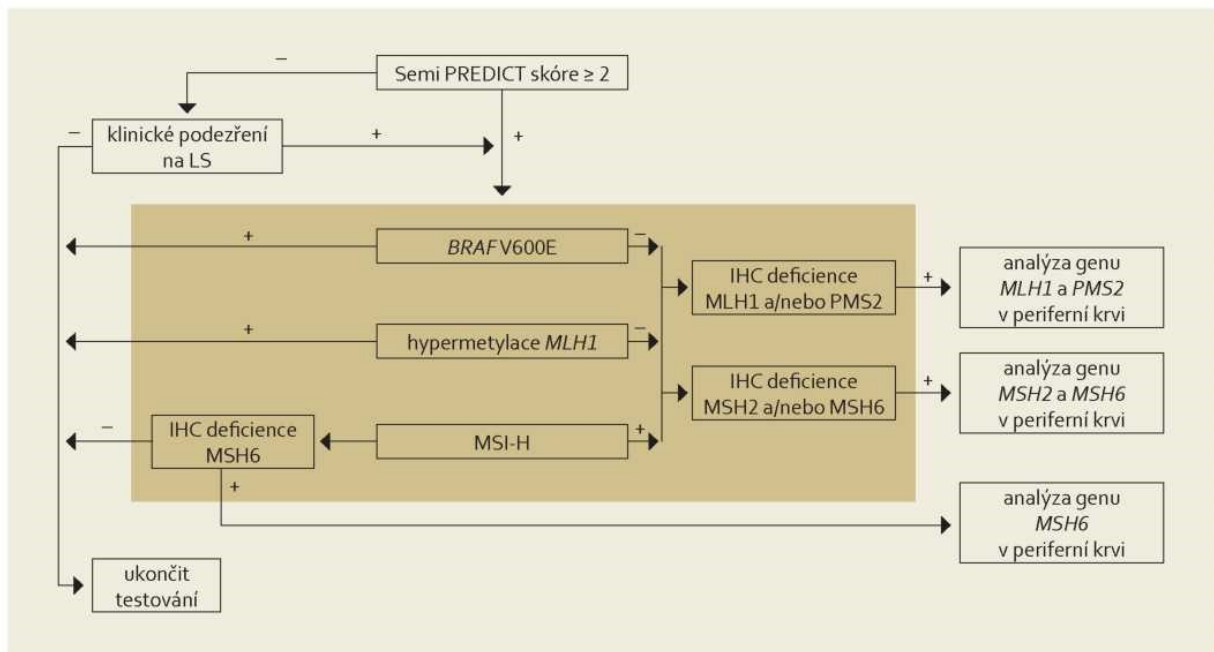
Protože informace, kterou poskytuje histologické vyšetření o MSI, je značně zprostředkovaná, nemůže samozřejmě plnit roli samostatné metody depistáže. Pro svou finanční nenáročnost je však velmi vhodná jako první linie plošného vyšetřování CRC v rámci komplexního diagnostického managementu.

Komplexní diagnostický management CRC

Efektivní algoritmus diagnostiky LS by měl být vysoce senzitivní, dostatečně specifický, (relativně) levný a logisticky jednoduchý. Z hlediska senzitivity a specifity se ukázalo zcela nedostatečným spoléhat se na klinická kritéria (zejména rodinnou anamnézu). Proto se současné postupy zaměřují na detekci MSI-H tumorů, a to buď přímo, zprostředkovaně pomocí imunohistochemie, nebo na základě histologického průkazu morfologických znaků specifických pro MSI-H karcinomy.

Vzhledem k současným možnostem systému zdravotnictví a zvažování

poměru ceny a užítku jsme na našem pracovišti místo plošného vyšetřování MSI či exprese MMR proteinů k vyhledávání pacientů s LS zavedli „komplexní diagnostický management“, na jehož počátku stojí mikroskopické vyšetření histologických řezů obarvených hematoxylinem a eozinem, na něž v případě přítomnosti znaků „MSI-H histologie“ navazuje sada metod imunohistochemických a molekulárně patologických, jejichž cílem je potvrdit přítomnost MSI-H, vyloučit možnost sporadického MSI-H karcinomu a určit pravděpodobně postižený gen k detekci zárodečné mutace.



Obr. 2. Komplexní management diagnostiky Lynchova syndromu. Na základě mikroskopického nálezu MSI-H histologie (nebo klinické žádosti) je proveden komplex vyšetření situovaný do hnědého obdélníku, který sestává z imunohistochemického vyšetření exprese MMR proteinů, analýzy MSI, metylace promotoru *MLH1* a stavu genu *BRAF*. Tyto metody jsou v současné době na našem pracovišti z časových důvodů prováděny simultánně. K dalšímu genetickému vyšetření zárodečných mutací MMR genů jsou primárně vybráni pacienti s MSI-H tumory bez mutace *BRAF* a bez hypermetylace promotoru genu *MLH1*. Za zvláštních okolností (zejména při ztrátě imunoexpres *MSH6*) je však vhodné testovat i MSS karcinomy (převzato z webu <http://www.lynych.cz>).

Fig. 2. Comprehensive management of Lynch syndrome diagnosis. Based on the microscopic finding of MSI-H histology (or clinical request), a complex of examinations is made (situated in the brown rectangle), which consist of immunohistochemical examination of the expression of MMR proteins, MSI analysis, methylation of the *MLH1* promoter, and *BRAF* gene status. These methods are currently performed simultaneously in our department because of the time conditions. Further genetic testing of germ-line mutations of MMR genes is primarily made in patients with MSI-H tumors without *BRAF* mutations and without *MLH1* gene promoter hypermethylation. Under special circumstances (especially the loss of *MSH6* immunorexpression) it is appropriate to test also MSS carcinoma (taken from website <http://www.lynych.cz>).

Nádory, jejichž Semi PREDICT skóre vzbuzuje podezření na MSI-H, vykazují ztrátu exprese některého (nebo některých) z MMR proteinů, nemají hypermetylevaný promotor genu *MLH1* a nebyla u nich prokázána substituce V600E genu *BRAF*, jsou určeny k detekci germinální mutace MMR genu určeného na základě imunohistochemického vyšetření (obr. 2). Podobně jako již bylo uvedeno u vyšetřování MSI, i stanovení hypermetylace promotoru *MLH1* vyžaduje srovnání s nenádorovou tkání. Tato sice bývá běžně dostupná v případech chirurgických resekátů, většinou však není k dispozici při vyšetřování endoskopických biopsií. V těchto případech je nutná domluva se zainteresovaným gastroenterologem, aby zajistil kontrolní tkáň, ať už v podobě endoskopického vzorku z nenádorové sliznice nebo nesrážlivé periferní krve. Pokud jde o finální analýzu MMR genů, zde je optimálním materiálem nesrážlivá periferní krev, protože průkaz mutace mimo nádorovou tkáň potvrzuje její zárodečnou povahu, přičemž z důvodu technické náročnosti analýzy těchto genů je výtěžnost z krve výrazně vyšší než z nenádorové tkáně fixované ve formolu.

Ať už je konkrétní uspořádání tohoto algoritmu jakékoli, plnohodnotný postup by každopádně měl zahrnovat všechny uvedené diagnostické modality. Důvodem je jejich vzájemná komplementárnost. Kupříkladu samotné vyšetření MSI bez analýzy genu *BRAF* a stavu metylace promotoru *MLH1* nedokáže odlišit sporadické CRC od syndromových, dále značná část karcinomů s mutací *MSH6* nemusí vykazovat MSI-H a konečně bez imunohistochemického vyšetření nelze zúžit spektrum MMR genů, jejichž stav má být analyzován.

Závěr

Lynchův syndrom (LS) je familiární karcinomový syndrom způsobený zárodečnou mutací některého z genů,

jehož proteinový produkt se účastní opravy chyb v DNA vzniklých při replikaci. Vzhledem k tomu, že se nyní vyskyt LS v populaci odhaduje až na 5 % a vede ke vzniku maligních nádorů již v produktivním věku, sílí v současné době tlak na zvýšení senzitivity jeho detekce. Protože klinická kritéria jeho diagnostiky nedosahují dostatečné senzitivity, klade se dnes stále větší důraz na morfologickou a molekulárně patologickou diagnostiku. Podle našich zkušeností je nezbytné zavést jasný algoritmus, aby se diagnostika LS stala rutinní záležitostí a její management se co nejvíce automatizoval. Bohužel se dosud nepodařilo v našich podmínkách vytvořit spolehlivě fungující systém zpětné vazby s klinickými lékaři, kteří by měli organizovat další průběh vyšetření rodiny nemocného s LS. V nejbližších letech je tedy nezbytné zainteresovat do diagnostiky LS i klinické lékaře, bez jejichž aktivní účasti není možná ani kompletní diagnostika pacienta ani další vyšetření jeho rodinných příslušníků.

Literatura

1. Warthin AS. 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* 1913; 12(5): 546–555.
2. Lynch HT, Shaw MW, Magnuson CW et al. Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds. *Arch Intern Med* 1966; 117(2): 206–212.
3. Lynch HT, Krush AJ. Cancer family "G" revisited: 1895–1970. *Cancer* 1971; 27(6): 1505–1511.
4. Lynch HT, Drouhard TJ, Schuelke GS et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer in a Navajo Indian family. *Cancer Genet Cytogenet* 1985; 15(3–4): 209–213.
5. Boland CR, Troncale FJ. Familial colonic cancer without antecedent polyposis. *Ann Intern Med* 1984; 100(5): 700–701.
6. Lindor NM, Rabe K, Petersen GM et al. Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. *JAMA* 2005; 293(16): 1979–1985.
7. Kacerovská D, Kazakov DV, Černá K et al. Muir-Torre syndrom – a phenotypic va-

riant of Lynch syndrome. *Cesk Patol* 2010; 46(4): 86–94.

8. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993; 75(5): 1027–1038.
9. Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993; 75(6): 1215–1225.
10. Peltomäki P, Lothe RA, Aaltonen LA et al. Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res* 1993; 53(24): 5853–5855.
11. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260(5109): 816–819.
12. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR 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* 1998; 58(22): 5248–5257.
13. Yuen ST, Chan TL, Ho JW et al. Germline, somatic and epigenetic events underlying mismatch repair deficiency in colorectal and HNPCC-related cancers. *Oncogene* 2002; 21(49): 7585–7592.
14. Kruse R, Rütten A, Hosseiny-Malayeri HR et al. "Second hit" in sebaceous tumors from Muir-Torre patients with germline mutations in MSH2: allele loss is not the preferred mode of inactivation. *J Invest Dermatol* 2001; 116(3): 463–465.
15. Nyström-Lahti M, Wu Y, Moisio AL et al. DNA mismatch repair gene mutations in 55 kindreds with verified or putative hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 1996; 5(6): 763–769.
16. Gazzoli I, Loda M, Garber J et al. A hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma case associated with hypermethylation of the *MLH1* gene in normal tissue and loss of heterozygosity of the unmethylated allele in the resulting microsatellite instability-high tumor. *Cancer Res* 2002; 62(14): 3925–3928.
17. Hitchins MP, Wong JJ, Suthers G et al. Inheritance of a cancer-associated *MLH1* germ-line epimutation. *N Engl J Med* 2007; 356(7): 697–705.
18. Ligtenberg MJ, Kuiper RP, Chan TL et al. Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat Genet* 2009; 41(1): 112–117. doi: 10.1038/ng.283.
19. Kovacs ME, Papp J, Szentirmay Z et al. Deletions removing the last exon of TA-

- CSTD1 constitute a distinct class of mutations predisposing to Lynch syndrome. *Hum Mutat* 2009; 30(2): 197–203. doi: 10.1002/humu.20942.
20. Kastrinos F, Stoffel EM, Balmana J et al. Phenotype comparison of MLH1 and MSH2 mutation carriers in a cohort of 1,914 individuals undergoing clinical genetic testing in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17(8): 2044–2051. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0301.
21. Hampel H, Frankel W, Panescu J et al. Screening for Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) among endometrial cancer patients. *Cancer Res* 2006; 66(15): 7810–7817.
22. Berends MJ, Wu Y, Sijmons RH et al. Molecular and clinical characteristics of MSH6 variants: an analysis of 25 index carriers of a germline variant. *Am J Hum Genet* 2002; 70(1): 26–37.
23. Nakagawa H, Lockman JC, Frankel WL et al. Mismatch repair gene PMS2: disease-causing germline mutations are frequent in patients whose tumors stain negative for PMS2 protein, but paralogous genes obscure mutation detection and interpretation. *Cancer Res* 2004; 64(14): 4721–4727.
24. Hendriks YM, Jagmohan-Changur S, van der Klift HM et al. Heterozygous mutations in PMS2 cause hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome). *Gastroenterology* 2006; 130(2): 312–322.
25. Truninger K, Menigatti M, Luz J et al. Immunohistochemical analysis reveals high frequency of PMS2 defects in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2005; 128(5): 1160–1171.
26. Kámory E, Kolacsek O, Ottó S et al. HMLH1 and hMSH2 somatic inactivation mechanisms in sporadic colorectal cancer patients. *Pathol Oncol Res* 2003; 9(4): 236–241.
27. Entius MM, Keller JJ, Drillenburger P et al. Microsatellite instability and expression of hMLH-1 and hMSH-2 in sebaceous gland carcinomas as markers for Muir-Torre syndrome. *Clin Cancer Res* 2000; 6(5): 1784–1789.
28. Lynch HT, Fusaro RM, Roberts L et al. Muir-Torre syndrome in several members of a family with a variant of the Cancer Family Syndrome. *Br J Dermatol* 1985; 113(3): 295–301.
29. Graham R, McKee P, McGibbon D et al. Torre-Muir syndrome. An association with isolated sebaceous carcinoma. *Cancer* 1985; 55(12): 2868–2873.
30. Esche C, Kruse R, Lamberti C et al. Muir-Torre syndrome: clinical features and molecular genetic analysis. *Br J Dermatol* 1997; 136(6): 913–917.
31. Schwartz RA, Torre DP. The Muir-Torre syndrome: a 25-year retrospect. *J Am Acad Dermatol* 1995; 33(1): 90–104.
32. Mathiak M, Rütten A, Mangold E et al. Loss of DNA mismatch repair proteins in skin tumors from patients with Muir-Torre syndrome and MSH2 or MLH1 germline mutations: establishment of immunohistochemical analysis as a screening test. *Am J Surg Pathol* 2002; 26(3): 338–343.
33. Mangold E, Pagenstecher C, Leister M et al. A genotype-phenotype correlation in HNPCC: strong predominance of msh2 mutations in 41 patients with Muir-Torre syndrome. *J Med Genet* 2004; 41(7): 567–572.
34. De Rosa M, Fasano C, Panariello L et al. Evidence for a recessive inheritance of Turcot's syndrome caused by compound heterozygous mutations within the PMS2 gene. *Oncogene* 2000; 19(13): 1719–1723.
35. Gallinger S, Aronson M, Shayan K et al. Gastrointestinal cancers and neurofibromatosis type 1 features in children with a germline homozygous MLH1 mutation. *Gastroenterology* 2004; 126(2): 576–585.
36. Bandipalliam P. Syndrome of early onset colon cancers, hematologic malignancies & features of neurofibromatosis in HNPCC families with homozygous mismatch repair gene mutations. *Fam Cancer* 2005; 4(4): 323–333.
37. Bakry D, Aronson M, Durno C et al. Genetic and clinical determinants of constitutional mismatch repair deficiency syndrome: Report from the constitutional mismatch repair deficiency consortium. *Eur J Cancer* 2014; 50(5): 987–996. doi:10.1016/j.ejca.2013.12.005.
38. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM et al. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991; 34(5): 424–425.
39. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP et al. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999; 116(6): 1453–1456.
40. Umar A, Boland CR, Terdiman JP et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(4): 261–268.
41. Hampel H, Frankel WL, Martin E et al. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med* 2005; 352(18): 1851–1860.
42. Liu T, Yan H, Kuismanen S et al. The role of hPMS1 and hPMS2 in predisposing to colorectal cancer. *Cancer Res* 2001; 61(21): 7798–7802.
43. Van der Klift H, Wijnen J, Wagner A et al. Molecular characterization of the spectrum of genomic deletions in the mismatch repair genes MSH2, MLH1, MSH6, and PMS2 responsible for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 44(2): 123–138.
44. Dovrat S, Figer A, Fidler HH et al. Mutational analysis of hMsh6 in Israeli HNPCC and HNPCC-like families. *Fam Cancer* 2005; 4(4): 291–294.
45. Hegde MR, Chong B, Blazo ME et al. A homozygous mutation in MSH6 causes Turcot syndrome. *Clin Cancer Res* 2005; 11(13): 4689–4693.
46. De la Chapelle A. The incidence of Lynch syndrome. *Fam Cancer* 2005; 4(3): 233–237.
47. Jenkins MA, Baglietto L, Dowty JG et al. Cancer risks for mismatch repair gene mutation carriers: a population-based early onset case-family study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4(4): 489–498.
48. Quehenberger F, Vasen HF, van Houwelingen HC. Risk of colorectal and endometrial cancer for carriers of mutations of the hMLH1 and hMSH2 gene: correction for ascertainment. *J Med Genet* 2005; 42(6): 491–496.
49. Lynch HT, de la Chapelle A. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 1999; 36(11): 801–818.
50. Jass JR, Stewart SM. Evolution of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut* 1992; 33(6): 783–786.
51. Domingo E, Laiho P, Ollikainen M et al. BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. *J Med Genet* 2004; 41(9): 664–668.
52. Shia J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I. The utility of immunohistochemistry. *J Mol Diagn* 2008; 10(4): 293–300. doi: 10.2353/jmoldx.2008.080031.
53. Funkhouser WK Jr, Lubin IM, Monzon FA et al. Relevance, pathogenesis, and testing algorithm for mismatch repair-defective colorectal carcinomas: a report of the association for molecular pathology. *J Mol Diagn* 2012; 14(2): 91–103. doi: 10.1016/j.jmoldx.2011.11.001.
54. Halvarsson B, Lindblom A, Rambech E et al. Microsatellite instability analysis and/or immunostaining for the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer? *Virchows Arch* 2004; 444(2): 135–141.
55. Boland CR, Koi M, Chang DK et al. The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome:

from bench to bedside. *Fam Cancer* 2008; 7(1): 41–52.

56. Hyde A, Fontaine D, Stuckless S et al. A histology-based model for predicting microsatellite instability in colorectal cancers. *Am J Surg Pathol* 2010; 34(12): 1820–1829. doi: 10.1097/PAS.0b013e3181f6a912.

57. Jenkins MA, Hayashi S, O'Shea AM et al. Pathology features in Bethesda guidelines predict colorectal cancer microsatellite instability: a population-based study. *Gastroenterology* 2007; 133(1): 48–56.

58. Román R, Verdú M, Calvo M et al. Microsatellite instability of the colorectal carcinoma can be predicted in the conventional pathologic examination. A prospective

multicentric study and the statistical analysis of 615 cases consolidate our previously proposed logistic regression model. *Virchows Arch* 2010; 456(5): 533–541. doi: 10.1007/s00428-010-0896-6.

59. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007; 50(1): 113–130.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy. The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

Doručeno/Submitted: 9. 2. 2014

Přijato/Accepted: 31. 3. 2014

*doc. MUDr. Ondřej Daum, Ph.D.
Šiklův ústav patologie LFUK a FN Plzeň
Edvarda Beneše 13, 305 99 Plzeň
DAUM@fnplzen.cz*

Správná odpověď na kvíz

Neuroendokrinní hyperplazie – žaludeční karcinoid

Karcinoid žaludku je nutné rozdělit do třech skupin, které mají odlišnou závažnost, klinické projevy a také biologické chování. Popsaný případ nemocné zapadá do prvního typu, při kterém je karcinoid lokalizován v žaludku ve vícečetných drobných ložiscích postihujících fundus a tělo žaludku. Endoskopicky mají nádory vzhled drobných několikamilimetrových polypoidních prominencí. Vznik tumoru je spojen s hypergastrinemií, ke které dochází v rámci chronické autoimunitní gastritidy typu A. Chování nádoru je obvykle benigní, nezakládá vzdálené metastázy (max. do 10 % případů), prakticky nikdy není endokrinně aktivní a roste velmi pomalu. Tento typ žaludečního karcinoidu představuje cca 75 % všech karcinoidů žaludku [1]. Doporučuje se endoskopická léčba (odstraněním nádoru z fundu nebo těla žaludku) s následnou chirurgickou terapií a provedením antrektomie s cílem snížit hladinu gastrinu. Alternativou tohoto kombinovaného postupu je subtotální gastrektomie s odstraněním karcinoidových

ložisek z gastrotomie. V našem písemnictví upozornil Hyrdel na příznivý vliv acidifikace žaludečního obsahu vedoucí k regresi karcinoidových nádorů žaludku I. typu [2]. Důvodem příznivého účinku je pokles sérové koncentrace gastrinu a snížení jeho stimulační aktivity na ECL buňky žaludku. Druhý typ představuje karcinoid žaludku, který je spojen s hypergastrinemií v rámci Zollinger-Elisonova syndromu. Tento nádor se prezentuje komplikacemi, jako jsou krvácení z horní části GIT, penetrace nebo perforace vředu. Při endoskopii je zjištěn různě velký, solitární vředovitý defekt. Chová se vysloveně maligně, recidivuje a zakládá vzdálené metastázy asi ve 25 % případů. Bývá sdružen se syndromem endokrinní mnohočetné adenomatózy I. typu. Endokrinní aktivita tohoto nádoru je neobvyklá. Třetí typ žaludečního karcinoidu je sporadicky vzniklý nádor, který bývá větších rozměrů, častěji exulceruje, chová se vysoce maligně, metastázuje velmi často a reprezentuje asi 25 % všech karcinoidů žaludku. Diagnostika žaludeč-

ních karcinoidů se opírá o gastroscopický nálezný a histologické vyšetření. Při stagingu onemocnění je vedle zobrazovacích metod (CT, MR) nutné provedení endoskopické ultrasonografie, která posoudí invazi nádoru do stěny žaludku a umožňuje rozhodnutí o volbě další terapie (endoskopická resekce nebo chirurgická léčba). Posouzení laboratorních známek endokrinní aktivity je součástí diagnostického programu, stejně jako pátrání po současně se vyskytujících jiných nádorech (příštítná tělíska, hypofýza).

Literatura

1. Lukáš M, Louthan O. Neuroendokrinní nádory trávicího traktu. Praha: Maxdorf 2006.
2. Hyrdel R, Beseda A, Slávik P et al. Karcinoidové nádory žaludku – endoskopická terapie diagnostika a léčba. *Endoskopie* 2001; 10: 67–71.

*prof. MUDr. Milan Lukáš, CSc.
Klinické a výzkumné centrum
pro střevní záněty ISCARE I.V.F. a.s.
Jankovcova 1569/2c, 170 00 Praha 7
milan.lukas@email.cz*

3.7 Výsledky morfologické depistáže Lynchova syndromu v období 2013-2016

Článek shrnující naše zkušenosti s depistáží Lynchova syndromu a zavedením imunohistochemických barvení MMR proteinů do rutinní praxe.

Z celkového počtu 5814 vyšetřených pacientů v období 2013-2016, byla u 24 pacientů prokázána přítomnost LS (u 20 pacientů byl LS diagnostikován na podkladě kolorektálního karcinomu, u 3 pacientek na podkladě endometriálního karcinomu a u jedné pacientky se LS prezentoval adenokarcinomem duodena), u dalších 26 vytipovaných pacientů se doposud nepodařilo provést analýzu germinálních mutací. U 8 případů byly nalezeny nové patogenní mutace *MMR* genů.

Práce prokazuje nespornou výhodu centralizovaného screeningu pacientů s vybranými diagnózami a užití univerzálního imunohistochemického screeningu MMR proteinů při vyšetřování kolorektálních a endometriálních adenokarcinomů v rámci depistáže LS.

Výsledky morfologické depistáže Lynchova syndromu v období 2013-2016

Martin Dušek^{1,2}, Ladislav Hadravský³, Jan Stehlík², Kateřina Černá², Radmila Čurčíková^{2,4}, Marián Švajdler^{1,2},
Bohuslava Šašková^{1,2}, Magdaléna Dubová^{1,2}, Michal Michal¹, Tomáš Jirásek^{3,4}, Ondřej Daum^{1,2}

¹Šiklův ústav patologie LF UK v Plzni a FN Plzeň

²Biopstická laboratoř, s.r.o., Plzeň

³Ústav patologie 3. LF UK a FN Královské Vinohrady Praha

⁴Oddělení patologie Krajské nemocnice Liberec, a.s.

SOUHRN

Zavedení systému depistáže Lynchova syndromu na pracovištích patologie v Plzni vedlo v letech 2013-2016 k diagnóze 24 případů, z toho 20 prezentujících se kolorektálním karcinomem. V 8 z těchto 24 případů byly detekovány germinální mutace MMR genů, které předtím nebyly v databázích evidovány jako patogenní. V celkovém souhrnu byla sice četnost Lynchova syndromu u pacientů s kolorektálním karcinomem pouze 0,34 %, po zavedení systému univerzálního imunohistochemického vyšetřování exprese MMR (mismatch repair) proteinů ve všech kolorektálních karcinomech diagnostikovaných v Šiklův ústavu patologie však četnost případů Lynchova syndromu za rok na tomto pracovišti dosáhla až 2,4 %. Naše výsledky svědčí ve prospěch univerzálního imunohistochemického screeningu Lynchova syndromu v případech kolorektálního a endometriálního karcinomu oproti výběrovým depistážním metodám založeným především na klinických, méně i morfologických znacích. Vyšší efektivita univerzálního screeningu nespočívá pouze ve vyšší senzitivě imunohistochemického vyšetření, ale i v možné automatizaci procesu a tím zvýšení adherence k depistáži i patologů přímo nezainteresovaných v managementu Lynchova syndromu. Plošné zavedení národního univerzálního depistážního systému však vyžaduje podporu ze strany státní správy a zdravotních pojišťoven.

Klíčová slova: depistáž – endometriální karcinom – imunohistochemie – kolorektální karcinom – Lynchův syndrom – MMR

Results of morphological screening for Lynch syndrome during the period 2013-2016

SUMMARY

The introduction of a screening system for Lynch syndrome in pathology laboratories in Plzen yielded 24 diagnoses of Lynch syndrome during the period of 2013-2016, 20 of them presenting with colorectal cancer. In 8 of those 24 cases germline mutations of MMR genes, previously not recognized as pathogenic with certainty, were detected. Although the frequency of Lynch syndrome in patients with colorectal cancer was only 0.34 % in total, following introduction of the universal immunohistochemical investigation of MMR (mismatch repair) proteins expression in all colorectal cancers examined in Šikl's Institute of Pathology the frequency per year in this department reached 2.4 %. The results favor universal immunohistochemical screening for Lynch syndrome in colorectal and endometrial cancer cases over a selective approach based on a combination of clinical and morphological criteria. Increased effectiveness of the universal approach is not brought about only by higher sensitivity of the immunohistochemical examination per se, but also by the possibility of automation of the process leading to increased adherence even of pathologists not directly engaged in Lynch syndrome management. However, the introduction of a nation-wide universal screening system requires support from the government and health insurance companies.

Keywords: colorectal cancer – endometrial cancer – immunohistochemistry – Lynch syndrome – MMR – screening

Cesk Patol 2018; 54(2): 86-92

SEZNAM ZKRATEK

BL:	Biopstická laboratoř s.r.o., Plzeň
CMMRD:	constitutional mismatch repair deficiency, syndrom konstitučního deficitu MMR genů
CRC:	colorectal carcinoma, kolorektální karcinom
EPCAM:	epithelial cell adhesion molecule
FAP:	familiární adenomatózní polypóza
HNPCC:	hereditary non-polyposis colorectal cancer, hereditární nepolypózní kolorektální karcinom
LS:	Lynchův syndrom
MLH1:	mut L homolog 1

MMR:	mismatch repair
MSH2:	mut S homolog 2
MSH6:	mut S homolog 6
MSI:	microsatellite instability, nestabilita mikrosatelitů
MSI-H:	microsatellite instability – high, vysoký stupeň nestability mikrosatelitů
MSS:	microsatellite stable, stabilní mikrosatelity
MTS:	Muir – Torreho syndrom
MUTYH:	mutY homolog
PMS2:	postmeiotic segregation increased 2
RBG:	revidovaná Bethesda guidelines
ŠÚP:	Šiklův ústav patologie Fakultní nemocnice Plzeň a Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni

✉ Adresa pro korespondenci:

Doc. MUDr. Ondřej Daum, Ph.D.
Šiklův ústav patologie LF UK a FN Plzeň
Edvarda Beneše 13, 305 99 Plzeň
tel.: +420377402523
e-mail: DAUM@fnplzen.cz

Lynchův syndrom (LS) je autozomálně dominantně dědičný familiární karcinomový syndrom v současné době definovaný průkazem germinální inaktivační mutace některého z MMR genů, genu *EPCAM* nebo germinální metylace promotoru genu *MLH1* (tab. 1)(1). Nejčastěji postiženými MMR geny při LS jsou *MLH1* a *MSH2* (dohromady více než 80 %)(2), dále následuje *MSH6* (10 %). Vzácněji mohou dysfunkci MMR proteinů, a tím

Tabulka č. 1. Současná definice Lynchova syndromu a příbuzných jednotek.

TERMÍN	DEFINICE
Lynchův syndrom	Přítomnost některé z germinálních (epi)genetických změn: 1. germinální mutace MMR genů <i>MLH1</i> , <i>PMS2</i> , <i>MSH2</i> nebo <i>MSH6</i> 2. inaktivace <i>MSH2</i> při delecii konce 3' genu <i>EPCAM</i> 3. germinální metylace promotoru genu <i>MLH1</i>
Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC)	Klinický termín používaný pro pacienty splňující kritéria Amsterdam I nebo II
Familiární CRC typu X	Klinický termín pro pacienty splňující kritéria Amsterdam I, ale s nádory bez MMR-deficience a bez germinálních alterací MMR genů a genu <i>EPCAM</i>
Lynch-like syndrom	Pacienti s MMR-deficientním nádorem, ale bez germinálních alterací MMR genů a genu <i>EPCAM</i> , v případě <i>MLH1</i> -deficientních nádorů i bez mutace genu <i>BRAF</i> a metylace promotoru <i>MLH1</i> Možné příčiny: 1. Somatická bialelická mutace MMR genu 2. Metodické příčiny nemožnosti detekovat germinální mutaci MMR genu 3. Nesprávná interpretace výsledků imunohistochemického vyšetření MMR proteinů 4. Germinální alterace jiných genů (např. <i>MUTYH</i>)
Syndrom konstitučního deficitu MMR genů (CMMRD)	Přítomnost bialelické germinální mutace některého z MMR genů
Sporadický deficit <i>MLH1</i> v CRC	Somatická inaktivace exprese <i>MLH1</i> způsobená nejčastěji metylací jeho promotoru

Volně podle (1).

pádem i LS, způsobovat zárodečná hypermetylace promotoru genu *MLH1* vedoucí k jeho epigenetické inaktivaci (3,4) nebo zárodečné delece 3' konce genu *EPCAM*, které zase vedou k epigenetické inaktivaci *MSH2* (5,6).

Nejčastějším karcinomem vznikajícím při LS je kolorektální karcinom (CRC), je však zvýšené riziko vzniku i dalších malignit, zejména karcinomů endometria, tenkého střeva, ovaria, ledvinné pánvičky a močovodu, nádorů mozku a kůže. Na podkladě LS vzniká podle současných dat asi 2,8 % CRC (1). Na rozdíl od familiárních karcinomových syndromů s premorbidním fenotypem (např. familiární adenomatózní polypózy, FAP) může být LS diagnostikován prakticky až při nálezu maligního nádoru, případně při genetickém vyšetření rodinných příslušníků již diagnostikovaného probanda. Výjimkou z tohoto pravidla je fenotypická varianta LS projevující se vznikem kožních sebaceózních nádorů, označovaná jako Muir-Torresho syndrom (MTS)(7).

Argumentů pro zavedení co nejsenzitivnějšího systému depistáže je několik. V první řadě je to četnost germinálních mutací MMR genů (a tedy LS) v populaci, která se podle odhadů pohybuje v rozmezí 1/370 – 1/400 (8,9). Dále je to vysoké riziko vzniku maligních nádorů u těchto pacientů, které v případě CRC u obou pohlaví a endometriálního karcinomu u žen s LS dosahuje v závislosti na typu mutace až 80 % (10-14). K progresi z adenomu do CRC navíc údajně dochází již během 2-3 let, na rozdíl od 8-10 let u sporadických případů (15,16). V neposlední řadě je důležitým faktorem i vznik maligních nádorů v poměrně nízkém věku, podle literárních údajů je průměrný věk v době diagnózy CRC 44-61 let, tedy až o 20 let méně než u sporadického CRC, a samozřejmě i zvýšené riziko vzniku synchronních a metachronních maligních nádorů (15,17).

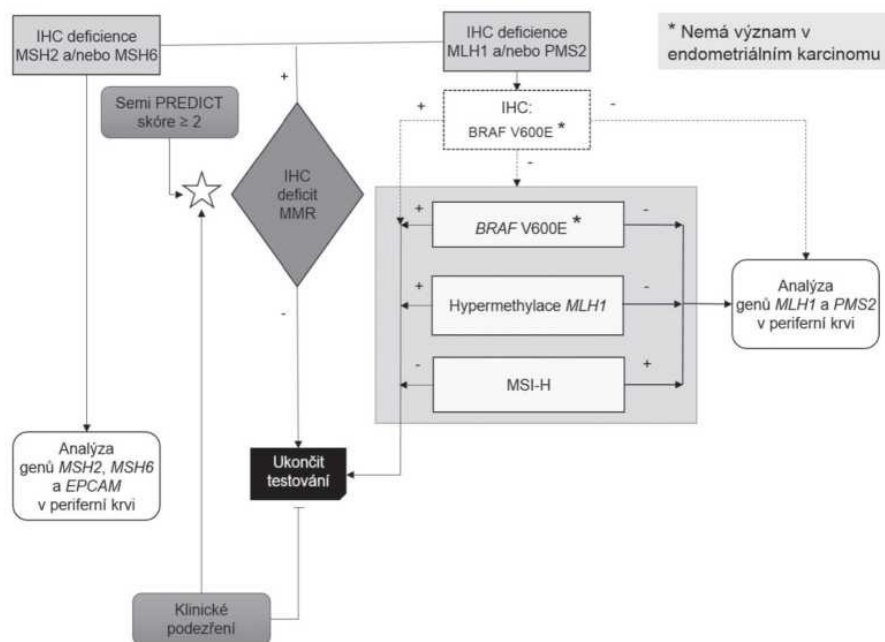
Původně byl LS, tehdy dosud nazývaný hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC) diagnostikován na podkladě klinických Amsterdamských kritérií (18), respektive pro zohlednění případné extrakolonické prezentace Amsterdamských kritérií II (19). K záchytu pacientů suspektních z molekulárně geneticky definovaného LS slouží na klinické úrovni revidovaná Bethesda guidelines (RBG)(20), která však také nezachytí všechny případy LS (21), zejména v případě postižení *MSH6* a *PMS2* (22-26). Podle současných odhadů až 25 % pacientů s LS není při aplikaci těchto guidelines zachyceno. Z toho důvodu se v posledních letech obrací pozornost k možností morfologické diagnostiky LS spočívající ve vyšetření nádorů statisticky významně asociovaných s LS, zejména CRC, metodami moderní

patologie, které byly detailně popsány v přehledových článcích v českém písemnictví (27-29). Tyto morfologické metody lze využít v depistáži buď výběrově, anebo univerzálně. V druhém případě je záchytnost signifikantně vyšší (30). I studie poměru nákladů a efektivity prokázala nejen sociálně-zdravotní, ale i ekonomickou výhodnost univerzálního systému vyšetřování LS (31). V letech 2013-2016 jsme se proto pokusili v Šiklově ústavu patologie (ŠÚP) a Biopoptické laboratoři s.r.o. (BL) postupně zavést model univerzální depistáže směřující k plošnému vyšetřování imunoexpresy MMR proteinů ve všech CRC a následně i v endometriálních adenokarcinomech, protože bylo prokázáno, že endometriální prezentace u žen s LS může dosahovat i 3-5 % a často předchází kolorektální prezentaci (12,32,33).

MATERIÁL A METODIKA

Algoritmus výběru pacientů

Metodika výběru pacientů pro genetické vyšetření se v průběhu sledovaného období s ohledem na vývoj poznatků a technologických možností měnila, jak dokumentují průběžně publikované přehledové články (27-29). Až do poloviny roku 2014 byla vstupní metodou na obou pracovištích analýza morfologie asociované s nestabilitou mikrosatelitů (MSI), takzvaná MSI-H morfologie, všech CRC prostřednictvím Semi PREDICT skóre (27,34), při jejímž pozitivním výsledku byl indikován komplex vyšetření somatického genomu sestávající z molekulárně genetické analýzy MSI, hypermetylace promotoru genu *MLH1* a mutace V600E genu *BRAF*. Byla-li takto v nádoru potvrzena MSI a zároveň nebyla vyloučena možnost LS průkazem hypermetylace promotoru *MLH1* a/nebo mutace *BRAF*, byl pacient, po bližším určení dysfunkčního MMR proteinu na základě imunohistochemického vyšetření, indikován k analýze germinálních mutací MMR genů (27,28). Od poloviny roku 2014 začaly být v ŠÚP všechny CRC vyšetřovány imunohistochemicky (v případě resektátů se zjevným nádorem byl automaticky jeden řez pro imunohistochemické vyšetření MMR proteinů zablokován již při přikrojení, v případě endoskopických vzorků bylo vyšetření indikováno až na základě histologického nálezu), navíc začaly být imunohistochemicky vyšetřovány i všechny endometriální karcinomy (na základě histologického nálezu). V téže době však naopak musela být, s výjimkou konzultačních biopsií, prakticky ukončena depistáž LS v BL z důvodu finančního zatížení klientů na podkladě indukované péče. Vyšetřovány imunohisto-



Obr. 1. Algoritmus diagnostiky Lynchova syndromu.

V ŠÚP začíná diagnostika LS vyšetřením všech CRC a endometriálních karcinomů monoklonálními protilátkami proti jednotlivým MMR proteinům. V případě průkazu deficiencie MSH2 a/nebo MSH6 je kontaktován kliník s požadavkem na odeslání pacienta na oddělení lékařské genetiky k zajištění nesrážlivé periferní krve spolu s Informovaným souhlasem pacienta k molekulárně genetickému vyšetření zárodečných mutací příslušných genů. Je-li prokázána deficiencie proteinů MLH1 a/nebo PMS2, následuje komplex vyšetření obsažený v šedém obdélníku, jehož cílem je vyloučit z dalšího vyšetřování případy sporadických MSI-H karcinomů, případně MSS karcinomy s falešnou negativitou IHC průkazu MMR proteinů. Volitelně lze místo těchto molekulárně genetických metod (nebo spolu s nimi) k vyloučení sporadického MSI-H karcinomu využít IHC vyšetření exprese proteinu mutované formy BRAF (bílý obdélník a přerušované šípky). MSI-H tumory bez mutace genu *BRAF* a hypermetylace promotoru *MLH1* jsou indikovány k molekulárně genetickému vyšetření zárodečných mutací příslušných genů (opět je nutné získat vzorek periferní krve a Informovaný souhlas). V případě, že jsou výsledky imunohistochemického vyšetření nepochybné, s jasně pozitivní vnitřní kontrolou, je možné molekulárně genetický test MSI vynechat, protože za těchto okolností nepřináší zásadní informaci. Pacienti s prokázanou mutací V600E genu *BRAF* nebo hypermetylací *MLH1* lze s velkou pravděpodobností vyřadit z dalšího diagnostického managementu, pokud tomu nebrání jiné okolnosti (např. nízký věk, výrazné familiární postižení, multiplicita nádorů).

Není-li místní pracoviště patologie vybaveno laboratorii disponující možností imunohistochemických a molekulárně genetických vyšetření uvedených výše, měl by patolog provést histologické vyšetření znaků „MSI-H histologie“ v každém CRC. V případě suspektního SemipREDICT skóre pak odeslat vzorek karcinomu (a optimálně i nenádorové tkáni pro možnost komparace) na specializované pracoviště provádějící výše uvedená imunohistochemická a molekulárně genetická vyšetření. Alternativně může být indikací k tomuto odeslání na specializované pracoviště žádost klinika v případě klinické suspekce na LS. Pozn.: v nádorech dělohy se analýza *BRAF* neprovádí.

chemicky tak byly pouze vzorky zaslané do BL z jiného pracoviště na základě pozitivního SemipREDICT skóre. Po zhodnocení výsledků imunohistochemického vyšetření bylo poté indikováno vyšetření somatického genomu nádorových buněk jako výše, případně analýza germinálních mutací MMR genů (obr. 1)(29).

Histologické a imunohistochemické vyšetření

Vzorky tkáně fixované v 10% formolu a zpracované klasickou parafinovou technikou byly obarveny hematoxylinem a eozinem při tloušťce řezů 4 μm . Pro imunohistochemické vyšetření byly řezy odparafinovány a rehydratovány v jednom kroku na přístroji BenchMark ULTRA (Ventana). Následně byla skla pokryta Tris-EDTA pufrém (pH 8,6) a zahřáta na 95°C po dobu 64 minut pro odmaskování antigenu. Skla byla poté inkubována při 37°C po dobu 40 minut se 100 μl primární protilátky proti MLH1 (MutL Protein Homolog 1, M1, RTU, Ventana), MSH2 (MutS Protein Homolog 2, G219-1129, RTU, Cell Marque), MSH6 (MutS Protein Homolog 6, 44, RTU, Ventana) a PMS2 (Postmeiotic Segregation Increased 2, EPR3947, RTU, Cell Marque). Poté byla skla omyta TBS (Tris-buffered saline) pro odstranění reagentů. Detekce byla zprostředkována alkalickou fosfatázou s amplifikací (ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red detection Kit, Ventana) nebo inkubací s 200 μl DAB (3,3 - diaminobenzidine) substrate/chromogen po dobu 3 minut. Kvalita barvení byla verifikována jak použitím adekvátní vnější kontroly, tak zejména vnitřní kontrolou, kterou představují nenádorové lym-

focyty. Jako ztráta exprese byla označena absence barvení jader nádorových buněk při zachované barvitelnosti vnitřní kontroly.

Analýza somatického genomu

Nejprve byly z bloků nakrájeny 20 μm silné řezy do mikrozkumavky a po odparafinování byla extrahována DNA dle manuálu výrobce (QIA-symphony DSP DNA kit). Na spektrofotometru Nanodrop byla změřena koncentrace a čistota DNA a za použití PCR s primery k vybraným „housekeeping“ genům i její kvalita.

Pro vyšetření nestability mikrosatelitních markerů (MSI) ve tkáni byla využita multiplexní PCR s následnou fragmentační analýzou pěti monukleotidových (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24, MONO-27) a dvou pentanukleotidových repetičí (Penta C and Penta D) kitem Promega MSI Analysis System.

Exon 15 genu *BRAF* se zaměřením na detekci mutací v kodonech V600 a K601 byl analyzován metodou PCR a reverzní hybridizace kitem BRAF 600/601 StripAssay (Viennalab), nebo metodou real-time PCR kitem cobas 4800 BRAF V600 Mutation Test (Roche).

Analýza metylace promotoru genu *MLH1* byla prováděna pomocí metody bisulfidické konverze a metylačně specifické PCR (35).

Analýza germinálních mutací

DNA z krve odebrané do EDTA zkumavky, respektive PAX zkumavky (PAXgene blood RNA tubes IVD) byla extrahová-

na dle manuálu výrobce (QIASymphony DSP DNA kit a PAXgene blood RNA kit IVD).

Detekce mutací celé kódující oblasti genu *MLH1* byla provedena pomocí metody PCR (s primery amplifikujícími všech 19 exonů, včetně exon-intronových spojů) a přímého sekvenování. Analýza strukturálních aberací byla provedena pomocí MLPA-mP003 kitu.

Detekce případné germinální metylace promotoru genu *MLH1* byla provedena pomocí MLPA-ME011 kitu.

Detekce mutací celé kódující oblasti genu *PMS2* byla provedena pomocí metody RT-PCR (mRNA byla přepsána na cDNA, a ta použita jako templát pro PCR) a přímého sekvenování všech 15 exonů. Analýza strukturálních aberací byla provedena pomocí MLPA-mP008 kitu.

Detekce mutací celé kódující oblasti genu *MSH2* byla provedena pomocí metody PCR (s primery amplifikujícími všech 16 exonů, včetně exon-intronových spojů) a přímého sekvenování. Analýza strukturálních aberací byla provedena pomocí MLPA-mP003 kitu.

Detekce mutací celé kódující oblasti genu *MSH6* byla provedena pomocí metody PCR (s primery amplifikujícími všech 10 exonů, včetně exon-intronových spojů) a přímého sekvenování. Analýza strukturálních aberací byla provedena pomocí MLPA-mP072 kitu.

Hodnocení významu detekovaných genetických změn

Patogenní význam variant MMR genů zjištěných molekulárně genetickou analýzou byl stanoven srovnáním s databázemi HGMD (Human Gene Mutation Database, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>)(36), MMRGVD (Mismatch Repair Genes Variant Database, <http://www.med.mun.ca/mmrvariants>)(37), InSIGHT (<https://www.insight-group.org/variants/databases>)(38), dbSNP NCBI (Database of Single Nucleotide Polymor-

phisms, National Cancer for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) a IGSR (International Genome Sample Resource, <http://www.internationalgenome.org>) vycházející z dat získaných v rámci projektu sekvenování „1000 Genomes Project“ (39). V případě neznámé patogenicity byl také využit predikční program Provean (Protein Variation Effect Analyzer, <http://provean.jcvi.org>)(40).

VÝSLEDKY

V roce 2013 bylo na pracovištích ŠÚP a BL vyšetřeno celkem 1382 pacientů (unikátních rodných čísel) s diagnózou C18-20 (z toho 1006 případů v BL a 376 v ŠÚP). Na základě Semi PREDICT skóre bylo u 84 pacientů (6,1 %) vysloveno podezření na MSI a byla provedena další analýza, na jejímž základě bylo pro analýzu germinálních mutací MMR genů vybráno 20 případů. U 7 pacientů (0,5 %) byla prokázána zárodečná mutace některého z MMR genů, u 6 pacientů byla vyloučena. Do konce roku 2016 se však nedařilo provést analýzu germinálních mutací u 7 pacientů (0,5 %) suspektních z diagnózy LS. Navíc byl jednou diagnostikován Lynch-like syndrom v materiálu z endometriálního karcinomu (somatická frameshift duplikace c.1597_1600dupCTTC v exonu 10 genu *MSH2*). Z pacientů s CRC diagnostikovaných v ŠÚP se ve 4 (1,06 %) případech jednalo o LS, v 10 (2,66 %) o MSI-H sporadický karcinom a v 1 (0,27 %) o nedovyšetřený suspektní LS.

V roce 2014 bylo vyšetřeno celkem 1568 pacientů s diagnózou C18-20 (z toho 1181 v BL a 387 v ŠÚP). Pro další analýzu bylo na základě morfologie a IHC vyšetření určeno 67 pacientů (4,3 %), z toho 39 (10,1 %) diagnostikovaných v ŠÚP. U 3 pacientů (0,2 %) byl molekulárně geneticky potvrzen LS, ve 36 případech (2,3 %) se jednalo o sporadický MSI-H karcinom, u 2 pacientů (0,1 %) se jednalo o Lynch-like syndrom v důsledku somatické jednobázové

Tabulka č. 2. Diagnostikované případy Lynchova syndromu s kolorektálním karcinomem.

Číslo	Pohlaví	Věk	Lokalizace tumoru	Germinální mutace	Význam mutace
1	Muž	51	Cékum	frameshift delece c.1210_1211delCT v exonu 12 genu <i>MLH1</i>	Patogenní
2	Žena	44	Colon sigmoideum	duplikace c.1282dupC v exonu 8 genu <i>MSH2</i>	Patogenní
3	Muž	60	Colon ascendens	jednobázová substituce c.366+1G>A první hraniční báze intronu 2 v genu <i>MSH2</i>	Pravděpodobně patogenní
4	Žena	52	Cékum	frameshift delece c.402delT v exonu 2 genu <i>MSH6</i>	Patogenní
5	Muž	70	Colon transversum	in-frame delece dvanácti bází c.170_181del v exonu 2 genu <i>MLH1</i>	Nejasná
6	Žena	42	Cékum	frameshift duplikace c.741dupA v exonu 4 genu <i>MSH6</i>	Patogenní
7	Muž	39	Neuvedena	delece exonů 9 až 16 v genu <i>MSH2</i>	Patogenní
8	Žena	65	Colon transversum	hemizygotní delece exonů 12, 13 a 14 genu <i>PMS2</i>	Patogenní
9	Žena	72	Cékum	frameshift duplikace c.1489dupC v exonu 13 genu <i>MLH1</i>	Patogenní
10	Muž	72	Neuvedena	inframe delece c.1153_1155delAGG v exonu 4 genu <i>MSH6</i>	Pravděpodobně patogenní
11	Muž	46	Cékum	jednobázová substituce c.2086C>A v exonu 13 genu <i>MSH2</i>	Patogenní
12	Muž	68	Colon ascendens	frameshift delece c.2062_2063delGT v exonu 4 genu <i>MSH6</i>	Patogenní
13	Muž	73	Colon descendens	jednobázová nonsense substituce c.1572C>G v exonu 4 genu <i>MSH6</i>	Patogenní
14	Muž	26	Hepatální flexura	jednobázová nonsense substituce c.1939A>T v exonu 11 genu <i>PMS2</i>	Patogenní
15	Žena	40	Rektosigma	jednobázová substituce c.2086C>A v exonu 13 genu <i>MSH2</i>	Patogenní
16	Muž	80	Hepatální flexura	dvoubázová substituce c.1852_1853delAAinsGC v exonu 16 genu <i>MLH1</i>	Patogenní
17	Žena	38	Neuvedena	frameshift delece c.3573delT v exonu 7 genu <i>MSH6</i>	Pravděpodobně patogenní
18	Žena	60	Cékum	frameshift duplikace c.2252_2253dupAA v exonu 19 genu <i>MLH1</i>	Nejasná
19	Žena	56	Cékum	jednobázová nonsense substituce c.1687C>T v exonu 11 genu <i>PMS2</i>	Patogenní
20	Žena	78	Colon transversum	germinální metylace promotoru genu <i>MLH1</i>	Patogenní

Tabulka č. 3. Diagnostikované případy Lynchova syndromu s extrakolonickou prezentací.

Číslo	Pohlaví	Věk	Lokalizace tumoru	Germinální mutace	Význam mutace
1	Žena	68	duodenum	jednobázová nonsense substituce c.856G>T v exonu 4 genu <i>MSH6</i>	pravděpodobně patogenní
2	Žena	55	endometrium	jednobázová nonsense substituce c.1691C>A v exonu 4 genu <i>MSH6</i>	pravděpodobně patogenní
3	Žena	49	endometrium	frameshift duplikace c.1862dupT v exonu 4 genu <i>MSH6</i>	pravděpodobně patogenní
4	Žena	38	endometrium	duplikace c.1500dupC v exonu 12 genu <i>MSH2</i>	patogenní

Tabulka č. 4. Frekvence LS u pacientů s CRC diagnostikovaných v ŠÚP.

Rok	LS	Nedovyšetřené suspektní LS	Celkový potenciální počet LS
2013	4 (1,06 %)	1 (0,27 %)	5 (1,33 %)
2014	0	0	0
2015	2 (0,61 %)	5 (1,54 %)	7 (2,05 %)
2016	4 (1,2 %)	4 (1,2 %)	8 (2,4 %)
celkem	10 (0,71 %)	10 (0,71 %)	20 (1,42 %)

substituce c.942+3A>T třetí hraniční base intronu 5 v genu *MSH2*, a v důsledku somatické mutace c.1252delA v exonu 7 genu *MSH2*. 4 případy (0,3 %) se suspektním LS zůstávají dosud nevyšetřeny. Navíc byl LS diagnostikován u 2 pacientek s endometriálním karcinomem a u 1 pacientky s adenokarcinomem duodena. Tyto 3 případy LS s extrakolonickou prezentací byly diagnostikovány v ŠÚP. Naopak u žádného pacienta s CRC diagnostikovaným v ŠÚP nebyl prokázán LS.

V roce 2015 mělo diagnózu C18-20 celkem 1441 pacientů (z toho 1118 v BL a 323 v ŠÚP). 32 (2,2 %) nádorů bylo MMR-deficientních, z toho 20 (6,19 %) diagnostikovaných v ŠÚP. Molekulárně genetická analýza prokázala LS u 5 pacientů (0,35 %). Ve 20 případech (1,4 %) se jednalo o sporadický MSI-H karcinom, 7 pacientů (0,49 %) se suspektním LS nebylo dosud geneticky vyšetřeno. Z toho u pacientů diagnostikovaných v ŠÚP se ve 2 (0,61 %) případech jednalo o LS, ve 14 (4,33 %) o MSI-H sporadický karcinom a v 5 (1,54 %) o nedovyšetřené suspektní LS.

V roce 2016 bylo celkem vyšetřeno 1423 pacientů s diagnózou C18-20 (v BL 1092 a v ŠÚP 331). Jako MMR-deficientní bylo určeno 42 případů (3 %), z toho v ŠÚP 34 (10,3 %). LS byl molekulárně geneticky prokázán u 5 pacientů (0,35 %), ve 27 případech (1,9 %) šlo o sporadický MSI-H tumor. U 1 pacienta (0,1 %) byl diagnostikován Lynch-like syndrom se somatickou frameshift delecí c.1670_1677delAAGAAGCTG v exonu 15 genu *MLH1*. Dále byl LS diagnostikován u jedné pacientky s endometriálním karcinomem. Osm pacientů (0,56 %) velmi suspektních z diagnózy LS však dosud nemá provedenu analýzu germinálních mutací. Z pacientů s CRC diagnostikovaných v ŠÚP se ve 4 (1,2 %) případech jednalo o LS, ve 24 (7,25 %) o MSI-H sporadický karcinom a ve 4 (1,2 %) o nedovyšetřené suspektní LS.

Celkem tedy bylo v letech 2013-2016 vyšetřeno 5814 pacientů s diagnózou C18-20 (4397 pacientů v BL a 1417 v ŠÚP). Suspektní MSI-H morfologie a/nebo IHC deficit MMR proteinů byl popsán u 225 případů. LS byl molekulárně geneticky potvrzen u 20 pacientů (0,34 %) s CRC (tab. 2). Z toho v BL bylo diagnostikováno 10 případů (0,22 %), v ŠÚP také 10 případů (0,71 %). Navíc byl u 3 pacientek LS diagnostikován na podkladě endometriálního karcinomu a u jedné pacientky prezentující se adenokarcinomem duodena (tab. 3). U 4 pacientů (0,07 %) byl diagnostikován Lynch-like syndrom. U 26 pacientů (0,45 %) se dosud nepodařilo provést analýzu germinálních mutací. Celkem by tedy mohl být LS teoreticky podkladem až 0,79 % případů CRC. Při omezení statistického zhodnocení na CRC vyšetřované v ŠÚP, které představují skupinu s kontrolovaným vstupem a poměrně homogenním složením, do-

sahuje potenciální frekvence LS u pacientů s CRC za celé sledované období až 1,42 %, v roce 2016 až 2,4 % (tab. 4).

Celkový poměr M/Ž byl 10/14, v případě CRC asociovaného s LS byl tento poměr 10/10, zatímco všichni 4 pacienti s extrakolonickou prezentací byly ženy. Věkové rozpětí bylo 26-80 let (průměrný věk: 55,9 roku, při omezení na CRC 56,6 roku, v případě extrakolonických malignit 52,5 roku). 5 pacientům (21,7 %) bylo v době diagnózy více než 70 let. Germinální mutace (nebo epimutace) v genu *MLH1* byla zaznamenána v 6 případech CRC (25 %), v genu *PMS2* ve 3 případech CRC (12,5 %), v genu *MSH2* v 5 případech CRC a 1 endometriálního karcinomu (celkem 25 %) a v genu *MSH6* v 6 případech CRC, 1 duodenálního adenokarcinomu a 1 endometriálního karcinomu (celkem 37,5 %).

DISKUZE

Během let 2013-2016 byl postupně vypracován algoritmus morfologické diagnostiky Lynchova syndromu a zaveden do rutinní praxe. V současné době jsou v ŠÚP vyšetřovány všechny CRC a endometriální karcinomy, v BL vzhledem ke způsobu financování zdravotnictví pouze případy zaslané ke konzultaci cíleně na diagnostiku LS. V uvedeném intervalu bylo na našich pracovištích diagnostikováno 24 případů LS, z toho 20 s CRC. Četnost LS ve skupině pacientů s CRC za celé sledované období souhrnně činí 0,34 %, z toho v BL 0,22 %, v ŠÚP 0,71 %. Relativně nízký počet případů a změna metodiky v průběhu roku 2014 znemožňuje validní souhrnné statistické zhodnocení. S určitou rezervou lze hodnotit výsledky za roky 2015 a 2016, během kterých probíhala na obou pracovištích depistáž konstantním, byť vzájemně odlišným způsobem. V obou těchto letech byla frekvence LS u pacientů s CRC detekovaná metodou plošného imunohistochemického vyšetřování dvakrát vyšší než celková frekvence v obou souborech. Frekvence LS v souboru CRC diagnostikovaných v ŠÚP dosáhla až 1,54 %, při společném hodnocení s dosud nedovyšetřeny případy suspektního LS až 2,4 %. Fakt, že jsou výsledky nižší než podle literárních údajů, může mít několik vysvětlení.

V prvé řadě může mít vliv „problém malých čísel“, protože vzhledem k náhodné distribuci patogenních alel v populaci mohou být tyto v malých souborech nehomogenně rozděleny. Tento faktor se mohl (v asociaci s dalšími vlivy) uplatnit zejména v anomálním roce 2014, kdy v ŠÚP nebyl detekován žádný LS u pacienta s CRC, přestože v témže roce zde byly diagnostikovány 2 případy LS s endometriálním karcinomem a 1 s duodenálním adenokarcinomem.

Druhou možností je vliv zevních faktorů, které by mohly zvyšovat výskyt sporadických CRC, čímž by došlo k relativnímu snížení četnosti LS v populaci pacientů s CRC. V souvislosti se statistickými údaji o signifikantně vyšší incidenci CRC v Plzeňském kraji nelze vyloučit působení neznámého exogenního faktoru zvyšujícího výskyt sporadického CRC (<http://www.svod.cz/analyse.php?modul=regionprehled#>, ÚZIS ČR). I nižší frekvence MMR-deficientních nádorů ve skupině CRC diagnostikovaných v ŠÚP v roce 2015 a 2016 (6,19 % a 10,3 %) v porovnání s literárními údaji by mohla svědčit pro hypotézu o regionálním působení exogenního faktoru zvyšujícího incidenci sporadického MSS-CRC (30,41,42). Na druhou stranu, nízká frekvence MSI-H (respektive MMR-deficientních) karcinomů také může být vysvětlena falešnou pozitivitou exprese MMR proteinů. Tato diskordance mezi výsledkem hodnocení exprese MMR proteinů na základě imunohistochemického vyšetření a jejich funkcí může být dána jednak charakterem mutace umožňující syntézu proteinu zachovávajícího antigenicitu, ale postrádajícího funkci, jednak chybným hodnocením imunohistochemické reakce. Druhá možnost přichází v úvahu zejména v případě komplexu MLH1/PMS2. Je totiž známo, že tyto proteiny jsou velmi citlivé na autolýzu, a proto zejména ve větších resekátech je jejich antigenicita často snížena v důsledku pomalého a/nebo nedostatečného průniku fixativa do tkáně. Z toho vyplývající adaptivní snížení nároků na intenzitu hodnocené imunohistochemické reakce pak může mít za následek mylnou interpretaci slabého zbarvení v důsledku abnormální struktury proteinu jako následek neadekvátní fixace. Pro tuto možnost by mohl svědčit fakt, že v našem souboru převažovaly případy LS asociované s germinální mutací *MSH6* nad případy způsobenými germinální mutací *MLH1*, které dle literatury představují největší skupinu pacientů s LS. Ani v tomto ohledu však současný nedostatečný stav poznatků o výskytu patogenních variant MMR genů v české populaci neumožňuje vyloučit, že námi detekovaný vysoký výskyt germinálních mutací *MSH6* neodráží skutečnou regionální anomálii relativně geneticky homogenní populace ČR. Konečně nelze ani vyloučit, že literární údaje o četnosti LS jsou nadhodnocené. Ne všechny literární zdroje udávající incidenci, prevalence nebo četnost LS v rámci CRC mají totiž jasné definovaná kritéria diagnózy LS, tedy podle dnešní definice průkaz germinálních mutací MMR genů, germinálních mutací genu *EPCAM* nebo germinální metylace promotoru genu *MLH1*. Některé zdroje tedy mohou zahrnovat i případy Lynch-like syndromu, případně, byla-li použita pouze klinická kritéria, i jiné familiární syndromy asociované s CRC.

Ačkoli je problematika nízké frekvence LS v našem souboru zajímavá a důležitá a vyžaduje hlubší analýzu většího souboru v delším časovém období, aktuálně se jako zásadnější jeví vysoký počet nedovyšetřených případů suspektních z LS. Vzhledem k tomu, že analýzy germinálních mutací může dle platné legislativy indikovat pouze lékařský genetik, k němuž může pacienta odeslat pouze jiný klinický lékař, je evidentní, že mezioborová spolupráce s aktivní účastí zainteresovaných klinických lékařů je v současnosti jedním z nejkritičtějších momentů v diagnostice LS, stejně jako v následném genetickém vyšetření příbuzných pacientů s LS a v organizaci navazujících screeningových metod. Několik let snahy o zavedení plošného screeningového systému nás přesvědčilo i o tom, že výše uvedené nebude možné bez politické podpory a bez finanční účasti zdravotních pojišťoven.

Zajímavým vedlejším výsledkem depistáže LS byla identifikace 8 variant MMR genů, které předtím v genetických databázích nebyly evidovány jako patogenní. Jmenovitě jde o jednobázovou substituci c.366+1G>A první hraniční báze intronu 2 v genu *MSH2* (dosud hodnocena pouze jako pravděpodobně patogenní), in-frame delecí dvanácti bází c.170_181del v exonu 2 genu *MLH1* (dosud hodnocena jako nejasná), inframe delecí c.1153_1155delAGG v exonu 4 genu *MSH6* (dosud hodnocena pouze jako pravděpodobně patogenní), frameshift delecí c.3573delT v exonu 7 genu *MSH6* (dosud hodnocena pouze jako pravděpodobně patogenní), frameshift duplikací c.2252_2253dupAA v exonu 19 genu *MLH1* (dosud hodnocena jako nejasná), jednobázovou nonsense substitucí c.856G>T v exonu 4 genu *MSH6* (dosud hodnocena pouze jako pravděpodobně patogenní), jednobázovou nonsense substitucí c.1691C>A v exonu 4 genu *MSH6* (dosud hodnocena pouze jako pravděpodobně patogenní) a frameshift duplikací c.1862dupT v exonu 4 genu *MSH6* (dosud hodnocena pouze jako pravděpodobně patogenní)(tab. 2 a 3).

V neposlední řadě je zajímavým zjištěním, že 5 pacientům s LS (21,7 %) bylo v době diagnózy více než 70 let, což ve shodě s jinými studii zpochybňuje efektivitu těchto systémů depistáže, mezi jejichž vstupní kritéria patří věk pacienta (30). Ačkoli by se mohlo zdát, že v této věkové kategorii nemá smysl rozlišovat mezi LS a sporadickým CRC, tak vzhledem ke skutečnosti, že LS jako autozomálně dominantně dědičné onemocnění je charakterizován variabilní expresivitou (tedy i různým věkem vzniku maligního nádoru) v rámci rodiny, na osud dosud zdravých rodinných příslušníků může mít výrazný dopad i diagnóza LS v netypických věkových kategoriích.

ZÁVĚR

Naše zkušenosti jednoznačně potvrzují prospěšnost univerzálního imunohistochemického vyšetřování MMR proteinů všech CRC a endometriálních karcinomů v rámci depistáže LS. Zvýšení efektivity záchytu pacientů s LS lze v rámci specializovaných center dále dosáhnout soustředěním interpretace imunohistochemického zbarvení a následně molekulárně genetické analýzy na omezený počet patologů obeznámených s jejími úskalími. V současné době se perspektivně také jeví možnost imunohistochemické analýzy exprese MMR proteinů ve všech endometrioidních a světlolobných karcinomech ovaria, které mohou být s LS dle literatury asociovány až ve 20 % případů (12,32,33,43). Špatně ovlivnitelným prvkem depistážního systému je účast klinických lékařů a lékařských genetiků a vzájemná koordinace nezbytné preventivní péče, která v současné době není dostatečně podporována aktuálním nastavením systému zdravotnictví v ČR.

PODĚKOVÁNÍ

Tento výstup vznikl v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu 2017–260 391.

The work was supported by the grant SVV 2017–260 391.

PROHLÁŠENÍ

Autor práce prohlašuje, že v souvislosti s tématem, vznikem a publikací tohoto článku není ve střetu zájmů a vznik ani publikace článku nebyly podpořeny žádnou farmaceutickou firmou. Toto prohlášení se týká i všech spoluautorů.

LITERATURA

1. **Pai RK.** A practical approach to the evaluation of gastrointestinal tract carcinomas for Lynch syndrome. *Am J Surg Pathol* 2016; 40(4): e17–34.
2. **Nystrom-Lahti M, Wu Y, Moisio AL, et al.** DNA mismatch repair gene mutations in 55 kindreds with verified or putative hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 1996; 5(6): 763–769.
3. **Gazzoli I, Loda M, Garber J, Syngal S, Kolodner RD.** A hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma case associated with hypermethylation of the MLH1 gene in normal tissue and loss of heterozygosity of the unmethylated allele in the resulting microsatellite instability-high tumor. *Cancer Res* 2002; 62(14): 3925–3928.
4. **Hitchins MP, Wong JJ, Suthers G, et al.** Inheritance of a cancer-associated MLH1 germ-line epimutation. *N Engl J Med* 2007; 356(7): 697–705.

5. **Ligtenberg MJ, Kuiper RP, Chan TL, et al.** Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat Genet* 2009; 41(1): 112-117.
6. **Kovacs ME, Papp J, Szentirmay Z, Otto S, Olah E.** Deletions removing the last exon of TACSTD1 constitute a distinct class of mutations predisposing to Lynch syndrome. *Hum Mutat* 2009; 30(2): 197-203.
7. **Kacerovská D, Kazakov DV, Černá K, et al.** Muir-Torre syndrom - fenotypická varianta Lynchova syndromu. *Cesk Patol* 2010; 46(4): 86-94.
8. **Hampel H, de la Chapelle A.** The search for unaffected individuals with Lynch syndrome: do the ends justify the means? *Cancer Prev Res (Phila)* 2011; 4(1): 1-5.
9. **Chen S, Wang W, Lee S, et al.** Prediction of germline mutations and cancer risk in the Lynch syndrome. *JAMA* 2006; 296(12): 1479-1487.
10. **Jenkins MA, Baglietto L, Dowty JG, et al.** Cancer risks for mismatch repair gene mutation carriers: a population-based early onset case-family study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4(4): 489-498.
11. **Quehenberger F, Vasen HF, van Houtelingen HC.** Risk of colorectal and endometrial cancer for carriers of mutations of the hMLH1 and hMSH2 gene: correction for ascertainment. *Journal of Medical Genetics* 2005; 42(6): 491-496.
12. **Zeimet AG, Mori H, Petru E, et al.** AGO Austria recommendation on screening and diagnosis of Lynch syndrome (LS). *Arch Gynecol Obstet* 2017; 296(1): 123-127.
13. **Sehgal R, Sheahan K, O'Connell PR, Hanly AM, Martin ST, Winter DC.** Lynch syndrome: an updated review. *Genes (Basel)* 2014; 5(3): 497-507.
14. **Barrow E, Hill J, Evans DG.** Cancer risk in Lynch Syndrome. *Fam Cancer* 2013; 12(2): 229-240.
15. **Lynch HT, de la Chapelle A.** Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 1999; 36(11): 801-818.
16. **Jass JR, Stewart SM.** Evolution of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut* 1992; 33(6): 783-786.
17. **Giardiello FM, Allen JI, Axilbund JE, et al.** Guidelines on genetic evaluation and management of Lynch syndrome: a consensus statement by the US Multi-society Task Force on colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 2014; 109(8): 1159-1179.
18. **Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT.** The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991; 34(5): 424-425.
19. **Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT.** New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999; 116(6): 1453-1456.
20. **Umar A, Boland CR, Terdiman JP, et al.** Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(4): 261-268.
21. **Hampel H, Frankel WL, Martin E, et al.** Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med* 2005; 352(18): 1851-1860.
22. **Liu T, Yan H, Kuismanen S, et al.** The role of hPMS1 and hPMS2 in predisposing to colorectal cancer. *Cancer Res* 2001; 61(21): 7798-7802.
23. **van der Klift H, Wijnen J, Wagner A, et al.** Molecular characterization of the spectrum of genomic deletions in the mismatch repair genes MSH2, MLH1, MSH6, and PMS2 responsible for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 44(2): 123-138.
24. **Dovrat S, Figer A, Fidler HH, et al.** Mutational analysis of hMsh6 in Israeli HNPCC and HNPCC-like families. *Fam Cancer* 2005; 4(4): 291-294.
25. **Hegde MR, Chong B, Blazo ME, et al.** A homozygous mutation in MSH6 causes Turcot syndrome. *Clin Cancer Res* 2005; 11(13): 4689-4693.
26. **Hendriks YM, Jagmohan-Changur S, van der Klift HM, et al.** Heterozygous mutations in PMS2 cause hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome). *Gastroenterology* 2006; 130(2): 312-322.
27. **Daum O, Beneš Z, Hadravský L, et al.** Lynchův syndrom v rukách patologa. *Cesk Patol* 2014; 50(1): 18-24.
28. **Kokošková B, Daum O, Beneš Z, et al.** Moderní diagnostika Lynchova syndromu. *Gastroent a Hepatol* 2014; 68(2): 157-165.
29. **Dušek M, Hadravský L, Černá K, et al.** Diagnostika Lynchova syndromu od patologa. *Klin Onkol* 2016; 29(3): 180-186.
30. **Hartman DJ, Brand RE, Hu H, et al.** Lynch syndrome-associated colorectal carcinoma: frequent involvement of the left colon and rectum and late-onset presentation supports a universal screening approach. *Hum Pathol* 2013; 44(11): 2518-2528.
31. **Mvudura M, Grosse SD, Hampel H, Palomaki GE.** The cost-effectiveness of genetic testing strategies for Lynch syndrome among newly diagnosed patients with colorectal cancer. *Genet Med* 2010; 12(2): 93-104.
32. **Mills AM, Liou S, Ford JM, Berek JS, Pai RK, Longacre TA.** Lynch syndrome screening should be considered for all patients with newly diagnosed endometrial cancer. *Am J Surg Pathol* 2014; 38(11): 1501-1509.
33. **Mills AM, Longacre TA.** Lynch syndrome screening in the gynecologic tract: current state of the art. *Am J Surg Pathol* 2016; 40(4): e35-44.
34. **Hyde A, Fontaine D, Stuckless S, et al.** A histology-based model for predicting microsatellite instability in colorectal cancers. *Am J Surg Pathol* 2010; 34(12): 1820-1829.
35. **Chan AO, Broaddus RR, Houlihan PS, Issa JP, Hamilton SR, Rashid A.** CpG island methylation in aberrant crypt foci of the colorectum. *Am J Pathol* 2002; 160(5): 1823-1830.
36. **Stenson PD, Mort M, Ball EV, et al.** The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Hum Genet* 2017; 136(6): 665-677.
37. **Woods MO, Williams P, Careen A, et al.** A new variant database for mismatch repair genes associated with Lynch syndrome. *Hum Mutat* 2007; 28(7): 669-673.
38. **Thompson BA, Spurdle AB, Plazzer JP, et al.** Application of a 5-tiered scheme for standardized classification of 2,360 unique mismatch repair gene variants in the InSIGHT locus-specific database. *Nat Genet* 2014; 46(2): 107-115.
39. **Birney E, Soranzo N.** Human genomics: The end of the start for population sequencing. *Nature* 2015; 526(7571): 52-53.
40. **Choi Y, Chan AP.** PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics* 2015; 31(16): 2745-2747.
41. **Mas-Moya J, Dudley B, Brand RE, et al.** Clinicopathological comparison of colorectal and endometrial carcinomas in patients with Lynch-like syndrome versus patients with Lynch syndrome. *Hum Pathol* 2015; 46(11): 1616-1625.
42. **Boland CR, Goel A.** Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010; 138(6): 2073-2087 e2073.
43. **Vierkoetter KR, Ayabe AR, VanDrunen M, Ahn HJ, Shimizu DM, Terada KY.** Lynch Syndrome in patients with clear cell and endometrioid cancers of the ovary. *Gynecol Oncol* 2014; 135(1): 81-84.

3.8 Diagnóza Lynchova syndromu od patologa

Přehledová publikace pojednávající o základních charakteristikách Lynchova syndromu a jeho diagnostice. Práce zdůrazňuje komplexní diagnostický přístup zahrnující znaky morfologické a rutinně prováděný imunohistochemický screening podpořený molekulárně-genetickým vyšetřením.

Diagnóza Lynchova syndromu od patologa

Lynch Syndrome – the Pathologist's Diagnosis

Dušek M.^{1,2}, Hadravský L.¹, Černá K.², Stehlík J.², Švajdler M.^{1,2}, Kokošková B.^{1,2}, Dubová M.¹, Michal M.¹, Daum O.^{1,2}

¹Šiklův ústav patologie, LF UK a FN Plzeň

²Biopstická laboratoř, s.r.o., Plzeň

Souhrn

Lynchův syndrom (dříve nazývaný hereditární nepolypózní kolorektální karcinom) je nejčastější genetickou příčinou familiárního výskytu kolorektálního karcinomu. Způsobuje jej zárodečná mutace některého z genů, které jsou zodpovědné za opravy chyb ve struktuře DNA vznikající při její replikaci. V důsledku toho dochází k dysfunkci opravného komplexu způsobující rozvoj nestability mikrosatelitů (MSI), která je asociována se zvýšením rizika vzniku nádorů, zejména kolorektálního karcinomu. V současné době se odhaduje, že až 5 % kolorektálních karcinomů vzniká v souvislosti s Lynchovým syndromem. Vzhledem k této poměrně vysoké četnosti, absenci premorbidního fenotypu, familiárnímu výskytu a prezentaci maligních nádorů v produktivním věku je včasná diagnostika Lynchova syndromu důležitá nejen z etického, ale i ekonomického hlediska. Klinická kritéria představovaná zejména revidovanými Bethesda guidelines, která byla navržena pro detekci pacientů vhodných ke genetickému vyšetření možnosti Lynchova syndromu, nejsou však dostatečně senzitivní. Vyšší senzitivity lze dosáhnout aplikací metod moderní patologie. Tato diagnostika je založena na přímém nebo nepřímém průkazu MSI. Mezi metody nepřímého průkazu MSI patří jednak detekce morfologických znaků asociovaných s MSI při histologickém vyšetření vzorků kolorektálních karcinomů, jednak imunohistochemické vyšetření exprese MMR proteinů, které navíc umožní i identifikaci dysfunkčního proteinu. K vyloučení sporadických MSI-H karcinomů způsobených somatickou epigenetickou inaktivací MMR genu z dalšího testování slouží hlavně vyšetření genu *BRAF* a analýza metylace promotoru genu *MLH1*. Podezření na Lynchův syndrom vyplývající z výsledků těchto vyšetření by mělo být nakonec potvrzeno detekcí zárodečné mutace některého z MMR genů v periferní krvi pacienta.

Klíčová slova

kolorektální karcinom – Lynchův syndrom – HNPCC – MSI – nestabilita mikrosatelitů

Summary

Lynch syndrome (formerly known as hereditary non-polyposis colorectal cancer) is the most common hereditary colorectal cancer syndrome. The syndrome is caused by a germline mutation of one of the mismatch repair (MMR) genes responsible for DNA replication error repair. Impaired function of the proteins encoded by these genes leads to microsatellite instability (MSI), which is associated with increased incidence of neoplasms: mainly colorectal cancer. According to recent estimates, up to 5% of all colorectal cancers are associated with Lynch syndrome. Due to this relatively high frequency, familial occurrence, absence of premorbid phenotype, and development of malignant tumors at a reproductive age, a correct diagnosis is important not only from an ethical but also from an economical point of view. Unfortunately, clinical means of diagnosis, namely, the revised Bethesda guidelines designed to detect patients suitable for genetic testing for Lynch syndrome, lack sufficient sensitivity. The methods associated with modern pathology are more sensitive than the clinical criteria used to detect patients suspected of having Lynch syndrome. Pathological diagnostics are based on direct or indirect detection of MSI. Indirect methods include analysis of morphological signs associated with MSI in histological samples from colorectal carcinoma patients and immunohistochemical investigation of MMR protein expression. To rule out sporadic cases caused by epigenetic inactivation of an MMR gene, molecular genetic investigation of the *BRAF* gene and methylation analysis of the *MLH1* promoter are performed during diagnostic workup. A suspicion of Lynch syndrome based on the results of the methods mentioned above should be proven by detection of a germline mutation in an MMR gene in peripheral blood leukocytes.

Key words

colorectal cancer – Lynch syndrome – HNPCC – MSI – microsatellite instability

Práce byla realizována za podpory Interní grantové agentury MZ ČR (IGA MZ ČR) pod grantovým číslem IGA NT14227 a s přispěním SVV 260171/2015.

This work was supported by IGA NT14227 with contribution of SVV 260171/2015.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



doc. MUDr. Ondřej Daum, Ph.D.
Šiklův ústav patologie
LF UK a FN Plzeň
Dr. E. Beneše 13
305 99 Plzeň
e-mail: daum@fnplzen.cz

Obdrženo/Submitted: 9. 6. 2015

Přijato/Accepted: 20. 3. 2016

<http://dx.doi.org/10.14735/amko2016180>

Lynchův syndrom – definice

Lynchův syndrom (LS) je autozomálně dominantně dědičné onemocnění vytvářející predispozici ke vzniku maligních nádorů, patří tedy mezi familiární karcinové syndromy. Nejčastějším karcinomem vznikajícím při LS je kolorektální karcinom (colorectal cancer – CRC), je však zvýšené riziko vzniku i dalších malignit, zejména karcinomů endometria, tenkého střeva, ovaria, ledvinné pánvičky a močovodu, nádorů mozku a kůže. Na podkladě LS vzniká podle současných odhadů až 5 % CRC. Fakt, že je dosud do značné míry přehlížen, zejména v porovnání s méně častou familiární adenomatózní polypózou (FAP), která je zodpovědná pouze za 1 % CRC, je způsoben tím, že karcinomy při LS nevíznají v terénu polypózy (definované jako > 100 polypů), což však neznamená, že nemohou být přítomny žádné polypy. Absence polypózy nebo jiného premorbidního fenotypu, tedy benigních změn, které by umožňovaly diagnostikovat tento syndrom ještě před vznikem maligního tumoru (jako je tomu třeba v případě FAP nebo neurofibromatózy 1. typu) výrazně ztěžuje jeho včasnou klinickou diagnostiku. Na rozdíl od familiárních karcinomových syndromů s premorbidním fenotypem tak může být LS diagnostikován prakticky až při nálezu maligního tumoru, případně při genetickém vyšetření rodinných příslušníků již diagnostikovaného probanda. Výjimkou z tohoto pravidla je fenotypická varianta LS projevující se vznikem kožních sebaceózních nádorů, označovaná jako Muir-Torrehova syndrom (MTS) [1].

Základní klinické charakteristiky syndromu karcinomové rodiny byly definovány dr. Lynchem takto [2]:

1. zvýšená incidence adenokarcinomů, zejména kolorektálních a endometriálních,
2. zvýšené riziko multiplicity nádorů,
3. autozomálně dominantní dědičnost,
4. vznik karcinomů v mladším věku.

Ačkoli byl LS dlouhou dobu znám spíše pod pojmem hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (hereditary non-polyposis colorectal cancer – HNPCC) [3], v současné době se od tohoto označení upouští a preferuje se

eponymon Lynchův syndrom, a to jednak z důvodu možnosti výskytu extrakolonických malignit, jednak kvůli příliš zakořeněné asociaci diagnózy HNPCC s Amsterdamskými kritérii, která je ve světle dnešních poznatků již neudržitelná, a konečně i jako vyjádření úcty otci Lynchova syndromu.

V současnosti je tedy diagnóza LS založena především na molekulárně genetickém vyšetření (viz následující kapitola), přičemž pro případy splňující Amsterdamská kritéria, ale bez prokazatelného genetického poškození definujícího LS, se doporučuje termín familiární kolorektální karcinom typu X [4].

Molekulární biologie LS

Detailně je molekulárně biologický podklad LS popsán v textu určeném primárně patologům [5], pro pochopení dále uváděných diagnostických algoritmů je zde však třeba alespoň stručně vysvětlit základní pojmy.

MMR (mismatch repair)

MMR (neboli mismatch repair) proteiny jsou odpovědné za opravy v DNA vznikajících při replikaci (replication error repair – RER). Nejdůležitější z nich se spojují do funkčních heterodimerů MLH1-PMS2 a MSH2-MSH6. Naprostá většina případů LS je způsobena zárodečnou mutací genů kódujících tyto proteiny, tedy tzv. mismatch repair (MMR) genů [6,7]. Inaktivace obou alel některého z MMR genů vede k dysfunkci celého komplexu a ke vzniku tzv. MSI-H tumorů, tedy nádorů charakteristických vysokým stupněm tzv. nestability mikrosatelitů (microsatellite instability – MSI) [8,9].

Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou v genomu hojně se vyskytující úseky DNA tvořené několikanásobným opakováním jednoho až čtyř, vzácněji i více nukleotidů. Tyto krátké repetitivní sekvence jsou snadno zranitelné při replikaci DNA, protože DNA polymeráza v oblasti repetitivní „sklouzává“ a v důsledku toho dochází ke vzniku delších či kratších úseků. Ve „zdravé“ buňce s funkčním MMR systémem jsou však tyto alterace ihned detekovány a opraveny.

MSI

Délky jednotlivých mikrosatelitů (tedy počty opakování těchto sekvencí) jsou u zdravých jedinců ve všech buňkách stejné (mezi jedinci se však liší). Pokud ovšem nedochází ke korekci chyb vznikajících při replikaci, potom může délka mikrosatelitů v rámci jednoho jedince kolísat, což je stav označovaný jako nestabilita mikrosatelitů (MSI). MSI není však jednoznačně daným stavem, který by přímo způsoboval vznik nádorů. Jde spíše o semikvantitativní vyjádření genetického poškození DNA uvedeným mechanismem. Stanovení stupně MSI je tedy arbitrární a spočívá ve stanovení nestability mezinárodně kodifikovaných markerů, přičemž na základě počtu postižených markerů se rozlišují stavy (hlavně nádory) se stabilními mikrosatelity (microsatellite stable – MSS), s nízkým stupněm nestability (microsatellite instability, low – MSI-L) a s vysokým stupněm nestability mikrosatelitů (microsatellite instability, high – MSI-H) [10].

MSI-H tumory

Tumory s MSI-H vznikají dvěma různými mechanismy, a to buď jako sporadické nádory vyvolané genetickými a/nebo epigenetickými změnami v somatické buňce, nebo jako familiárně se vyskytující nádory v rámci LS způsobené zárodečnou mutací některého z MMR genů. Teprve tehdy, je-li u osob nesoucích jednu zárodečně mutovanou alelu MMR genu během jejich života inaktivována i alela druhá, dochází ke vzniku maligních tumorů. Příčinou této inaktivace může být somatická mutace v druhé alele genu, ztráta heterozygoty (LOH) nebo metylace promotoru, jak tomu bývá u genu *MLH1* [11].

Nejčastěji postiženými geny při LS jsou *MLH1* a *MSH2* (dohromady více než 80 %) [12], dále následuje *MSH6* (10 %), a zbylé případy představují vzácná zárodečná postižení dalších MMR genů (*PMS2*, *PMS1*, *MSH3*, *MLH3*).

Vzácně mohou dysfunkci MMR proteinů a tím pádem i LS způsobovat komplikovanější mechanismy, jako zárodečná hypermetylace promotoru genu *MLH1* vedoucí k jeho epigenetické inaktivaci [13,14] nebo zárodečné delece 3' konce genu *EPCAM* (*TACSTD1*), které

zase vedou k epigenetické inaktivaci *MSH2* [15,16].

Variabilita klinických projevů LS

Klasický typ LS se prezentuje především CRC vznikajícím v tlustém střevě bez polypózy (tedy hereditárním nepolypózním CRC). Mohou však být přítomny i extrakolonické malignity, a to relativně častěji u pacientů se zárodečnou mutací v *MSH2* než *MLH1* [17]. Mutace v *MSH6* jsou zodpovědné za poněkud atypické prezentace LS, neboť mají jednak nízkou penetranci, dále jsou 6krát častěji asociovány s karcinomy endometria než s nádory kolorekta, a navíc jsou u těchto pacientů CRC (v porovnání s LS způsobeným mutacemi jiných MMR genů) častěji levostranné. Důležité také je, že mutace v *MSH6* nevedou vždy k MSI-H, pravděpodobně díky tvorbě alternativního heterodimeru *MSH2-MSH3*, což může negativně ovlivnit jejich diagnostiku [18,19]. V některých případech je kombinace klinických znaků natolik výrazná, že dala vznik novým klinickým syndromům, které ve skutečnosti představují pouze varianty LS.

Muir-Torrehova syndrom

MTS zahrnuje kombinaci nejméně jednoho kožního nádoru se sebaceózní diferenciací a minimálně jednoho viscerálního tumoru. Již v roce 1981 dr. Henry Lynch poukázal na společnou možnou etiologii MTS a LS, když identifikoval pacienty s fenotypem MTS v rodině postižené LS [20]. MTS jako varianta LS je unikátní v tom, že jako jediná představuje premorbidní fenotyp, tedy vykazuje znaky umožňující diagnózu LS ještě před rozvojem CRC.

Kožní léze asociované s MTS jsou detailně popsány v textech určených primárně patologům [1] a gastroenterologům [21], obecně lze shrnout, že mnohočetné kožní nádory se sebaceózní diferenciací vyskytující se u jedinců před 50. rokem života nebo postihující tělní partie mimo obličej jsou silným indikátorem MTS [22].

Turcotův syndrom 1. typu

Turcotův syndrom (TS) je klasicky charakterizován společným výskytem nádorů mozku a CRC. Podtyp označovaný

jako TS 1. typu je blíže specifikován vzhledem k mozkovému nádoru (hlavně gliomu) s CRC bez polypózy, přičemž může být také způsoben zárodečnou mutací některého z MMR genů, mutace byly detekovány zejména v *MLH1* a *PMS2* [23]. Za těchto podmínek se TS 1. typu jeví ve většině případů jako fenotypická varianta LS, zejména u dětských a mladistvých pacientů pak ještě spíše bývá součástí syndromu bialelického mismatch repair deficitu.

Syndrom bialelického mismatch repair deficitu

Syndrom bialelického mismatch repair deficitu (biallelic mismatch repair deficiency – BMMR-D, také constitutional mismatch repair deficiency – CMMRD) je velmi vzácně se vyskytující zárodečná bialelická mutace genů MMR. Vzhledem k tomu, že jde o onemocnění dědičné autozomálně recesivně, vyskytuje se zejména jako následek incestu. Tento stav je charakteristický fenotypickým obrazem připomínajícím neurofibromatózu 1. typu, zejména skvrnami café-au-lait, vznikem CRC již v mladém věku (průměrný věk v době diagnózy 16 let), mozkovými nádory, především glioblastomy vznikajícími již v prvních dvou dekádách života, a hematologickými malignitami (hlavně T lymfomy) [24,25].

Z diagnostického hlediska je důležité, že imunohistochemicky stanovený deficit MMR proteinu má vyšší senzitivitu než vyšetření MSI [26], přičemž tento imunohistochemický test lze provést i v nenádorové tkáni, např. v kožní biopsii [27].

Možnosti diagnostiky LS

Tradiční klinická diagnostika LS

Ke klinické diagnostice HNPCC primárně sloužila Amsterdamská kritéria [28], která byla pro zvýšení senzitivity, zejména s přihlédnutím k možnosti prezentace syndromu extrakolonickou malignitou, v roce 1998 revidována na Amsterdamská kritéria II [29]. Ale protože se zlatým standardem diagnózy LS stalo molekulárně genetické vyšetření, v popředí zájmu se ocitl záchyt co největšího množství pacientů pro toto vyšetření, nikoli samotná klinická diagnóza LS.

K identifikaci pacientů s CRC, u kterých by měla být vyšetřena nestabilita mikrosatelitů (MSI), případně provedeno molekulárně genetické vyšetření, byla v roce 1996 vypracována a v roce 2002 revidována tzv. Bethesda guidelines (BG, resp. RBG), která berou v potaz nejen klinická kritéria, ale (v případě RBG) i morfologické znaky tumoru [30]. Bohužel ani tato širší kritéria nezachytí všechny případy LS [31], zejména v případě postižení *MSH6* a *PMS2* [32–36]. Podle současných odhadů až 25 % pacientů s LS není zachyceno systémem kritérií RBG. Jednou z velkých slabín jak Amsterdamských kritérií, tak (R)BG je důraz na údaje získané rodinou anamnézou, které mohou trpět značnými nedostatky, ať už kvůli nedostatečné informovanosti pacienta, nezájmu vyšetřujícího lékaře, časté nejistotě ohledně biologického otcovství nebo i nízké penetranci zárodečné mutace (zejména v případě genu *MSH6*).

Moderní patologická diagnostika LS

Mezi hlavní argumenty pro současné snahy o zavedení senzitivnějšího systému depistáže, byť i za cenu snížení specifity, které je v tomto případě možné familiární tendence ke vzniku maligních nádorů ospravedlnitelné jak z hlediska etického, tak ekonomického, patří tato fakta:

1. falešná negativita v případě LS nemá za následek nerozpoznání tohoto syndromu pouze u vyšetřovaného pacienta, ale i u jeho případných příbuzných;
2. přibližně 1 ze 660 lidí je nositelem germinální mutace některého z MMR genů [37];
3. riziko vzniku CRC u LS je 60–80 % [38,39];
4. k progresi z adenomu do karcinomu pravděpodobně dochází během 2–3 let, na rozdíl od 8–10 let u sporadických případů [40,41];
5. průměrný věk v době diagnózy je 45 let, tedy asi o 20 let méně než u sporadického CRC, navíc se zvýšeným rizikem synchronního a metachronního CRC [40].

V současné době jsou k dispozici tři základní modely vyhledávání pacientů s podezřením na LS, přičemž všechny mají

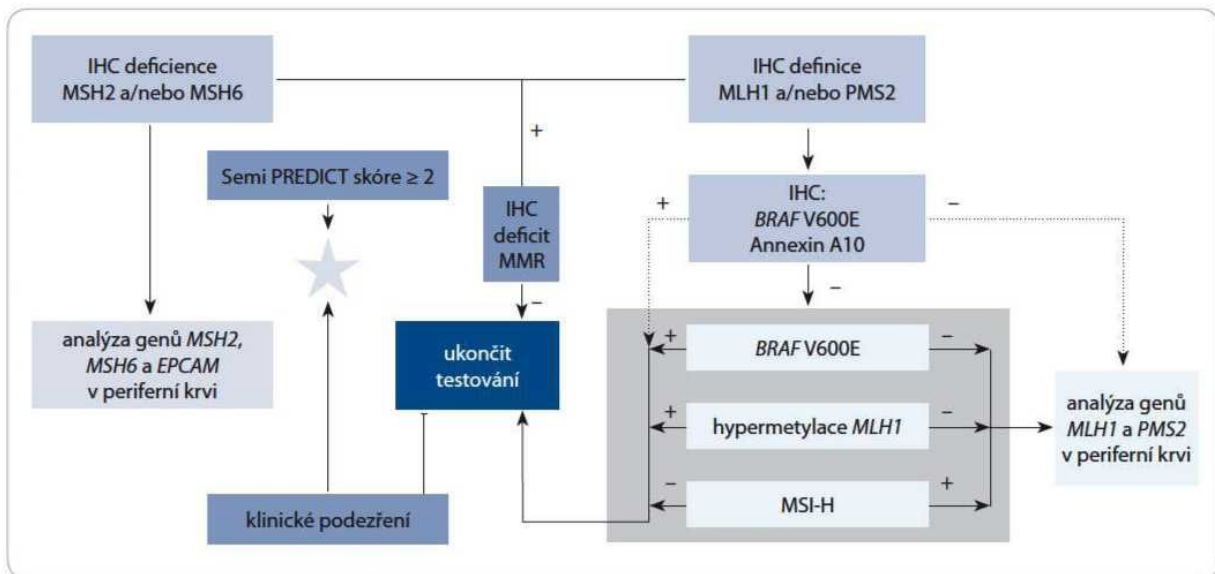


Schéma 1. Management diagnostiky LS.

Na pracovištích vyššího typu zapojených do depistáže LS diagnostika začíná vyšetřením všech CRC monoklonálními protilátkami proti jednotlivým MMR proteinům (hvězda). V případě průkazu deficece MSH2 a/nebo MSH6 je kontaktován klinik s požadavkem na zaslání nesrážlivé periferní krve spolu s Informovaným souhlasem pacienta k molekulárně genetickému vyšetření zárodečných mutací příslušných genů. Je-li prokázána deficece proteinů MLH1 a/nebo PMS2, následuje komplex vyšetření obsažený v šedém obdélníku, jehož cílem je vyloučit z dalšího vyšetřování případy sporadických MSI-H karcinomů, případně MSS karcinomy s falešnou negativitou IHC průkazu MMR proteinů. Volitelně lze místo těchto molekulárně genetických metod (nebo spolu s nimi) k vyloučení sporadického MSI-H karcinomu využít IHC vyšetření exprese annexinu A10 a/nebo mutované formy proteinu BRAF (bílý obdélník a přerušované šipky). Pouze MSI-H tumory bez mutace genu *BRAF*, hypermetylace promotoru *MLH1* a případně bez exprese annexinu A10 jsou indikovány k molekulárně genetickému vyšetření zárodečných mutací příslušných genů (opět je nutné získat vzorek periferní krve a Informovaný souhlas).

Není-li místní pracoviště patologie vybaveno laboratorii disponující možností imunohistochemických a molekulárně genetických vyšetření uvedených výše, měl by patolog provést histologické vyšetření znaků „MSI-H histologie“ podle modelu PREDICT. V případě suspektního Semi PREDICT skóre pak odeslat vzorek karcinomu (a optimálně i nenádorové tkáně pro možnost komparace) na specializované pracoviště provádějící výše uvedená imunohistochemická a molekulárně genetická vyšetření. Alternativně může být indikací k tomuto odeslání na specializované pracoviště žádost gastroenterologa či onkologa v případě klinické suspekce na LS (např. na podkladě RBG). Klinické podezření na hereditární podklad onemocnění může být stimulem i pro další pokračování vyšetřování pacientů, u nichž byl LS běžným algoritmem vyloučen (např. může být dále vyšetřována možnost MAP).

společně, že detekují MSI-H tumory, a to buď přímo (tedy molekulárně genetickým stanovením MSI), nebo zprostředkovaně. Do této druhé skupiny patří jednak imunohistochemická detekce MMR proteinů, jednak histologický průkaz morfologických znaků asociovaných s MSI.

V každém z modelů diagnostikujících MSI-H tumory je ale nutné před samotnou finančně nákladnou detekcí germinálních mutací MMR genů vyloučit možnost sporadických forem, protože čtyři z pěti MSI-H CRC jsou sporadické nádory způsobené zdaleka nejčastěji metylací promotoru *MLH1*. V současné době umožňuje rozlišení sporadických a LS asociovaných MSI-H karcinomů hlavně zapojení dvou metod molekulární pa-

tologie do managementu CRC. První z nich je analýza genu *BRAF*, konkrétně průkaz substituce V600E, která je přítomna až u 1/2 sporadických MSI-H CRC, ale (téměř) nikdy u LS. Mutovaný protein navíc může být v nádoru prokázán i monoklonální protilátkou [42]. Druhou metodu představuje průkaz hypermetylace promotoru *MLH1*, která je markerem sporadických MSI-H CRC, a naopak až na výjimky nebývá přítomna u LS [43]. Nověji je také k dispozici protilátka proti annexinu A10 umožňující odlišit sporadické MSI-H karcinomy od LS [44].

1. Stanovení MSI

Rozlišení tumorů na MSS, MSI-L a MSI-H na základě stanovení nestability mezi-

národně kodifikovaných markerů se samozřejmě v diagnostice LS využívalo již dříve, ale cíleně, u pacientů splňujících BG (resp. RBG). Některé laboratoře zavedly plošné vyšetření všech CRC touto metodou k depistáži LS.

Mezi nevýhody tohoto systému patří výrazný nárůst zátěže laboratorii molekulární genetiky, absence informace o tom, který z MMR genů je postižen, a konečně i fakt, že (navzdory obecnému přesvědčení) ne všechny LS asociované nádory musí vykazovat MSI-H (zejména jde o pacienty s germinální mutací genu *MSH6*). Praktické využití plošného vyšetřování MSI naráží též na nezbytnost porovnání stavu markerů ve tkáni nádoru s nenádorovou tkání. To vyžaduje buď

přítomnost nenádorové tkáně v materiálu (např. chirurgický okraj střevního resekatu), nebo odběr periferní krve pacienta (zejména v případě endoskopicky získaných vzorků).

2. Imunohistochemická detekce MMR proteinů

Na našem pracovišti používáme jako vstupní vyšetření pro zařazení pacienta do diagnostického managementu LS imunohistochemické vyšetření exprese hlavních MMR proteinů (tedy MLH1, PMS2, MSH2 a MSH6) u všech CRC a karcinomů endometria.

Senzitivita imunohistochemického vyšetření MMR proteinů a stanovení MSI je srovnatelná [45]. V současné době jsou obě metody (stanovení MSI a imunohistochemické vyšetření) vnímány jako komplementární, protože v kombinaci mají vyšší senzitivitu než při samostatném použití [46,47]. Také Jeruzalémská kritéria, podle nichž by měly být imunohistochemicky vyšetřeny všechny CRC u pacientů mladších 70 let, považují imunohistochemii za vhodnou vstupní diagnostickou metodu [48]. Argumenty pro upřednostnění imunohistochemického vyšetření jako iniciální diagnostické metody jsou tyto:

1. vyšší záchyt případů s mutací *MSH6*, které mohou uniknout při detekci MSI pomocí PCR, protože *MSH2* může také tvořit komplex s *MSH3* a tím pádem nemusí nutně vést ke stavu MSI-H [45,49];
2. imunohistochemická detekce MMR proteinů, na rozdíl od stanovení MSI, umožňuje určit postižený gen pro molekulárně genetické vyšetření, což výrazně sníží náklady při následné detekci případné zárodečné mutace;
3. při iniciálním vyšetření není zapotřebí kontrolní nenádorová tkáň;
4. imunohistochemické vyšetření odhalí i případy BMMR-D, které se často neprojeví nestabilitou mikrosatelitů.

Další kroky diagnostického managementu založeného na iniciální imunohistochemické detekci MMR proteinů demonstruje schéma 1.

3. Histologická detekce morfologických znaků asociovaných s MSI-H

Pro většinu pracovišť patologie, která vyšetřují bioptické vzorky karcinomů

Tab. 1. Model PREDICT.

Znak	Skóre
lokalizace v pravém tračniku	1,6
disekující mucin (jakékoli množství)	1,6
věk < 50 let	1,3
tumor infiltrující lymfocyty (TIL)	1,3
peritumorální lymfoidní lem	0,7
plazmocyty tvoří > 25 % stromálních leukocytů	0,7

PREDICT skóre: maximální možné skóre: 7,8; suspekce na MSI-H: skóre ≥ 2,5
Semi PREDICT skóre: přítomny 2 a více znaků → MSI-H suspektní

tlustého střeva, endometria a dalších nádorů, však nejsou výše uvedené diagnostické metody přímo dostupné. I tato pracoviště se však mohou podílet na depistáži LS, a to detekcí histologických znaků charakteristických pro CRC s vysokým stupněm nestability mikrosatelitů, tedy takzvané „MSI-H histologii“, která samotná má vyšší senzitivitu než souhrn zbývajících čtyř kritérií RBG [50].

Z různých studií, jejichž cílem bylo nalézt racionální histologický algoritmus detekce MSI-H karcinomů [51], se v současné době jako nejužitečnější model jeví Model PREDICT (Pathological Role in the Determination of Instability in Colorectal Tumors) [50], zejména ve své zjednodušené formě jako Semi PREDICT skóre (tab. 1). Histologickými znaky, na nichž je tento model založen, jsou: přítomnost mucinu disekujícího stroma v jakémkoli množství, přítomnost tumor infiltrujících lymfocytů (TIL), peritumorální lymfoidní lem a zastoupení plazmatických buněk mezi leukocyty ve stromatu převyšující 25 %. Detailněji je morfolgie MSI-H CRC popsána v článku určeném patologům [5].

Mezi výhody histologického vyšetření patří i možnost levného, rychlého a jednoduchého vyloučení sporadických MSI-H karcinomů podmíněných většinou somatickou metylací promotoru genu *MLH1*. Zatímco tyto vznikají ze „sesilných serrated adenomů“ (do češtiny někdy překládaných do ještě horší formy „přisedlé pilovité adenomy“), prekurzorovou lézí karcinomů v terénu LS je „konvenční“ (tubulární, tubulovilózní nebo vilózní) adenom. Jsou-li tedy v pe-

řiferii tumoru zbytky prekurzorového sesilného serrated adenomu, jde s největší pravděpodobností o sporadický MSI-H karcinom [52]. Nicméně tento jednoduchý diagnostický znak vylučující LS nemusí být vždy dostupný, ať již z důvodu nedostatečného samplingu, nebo destrukce původního adenomu pokročilým adenokarcinomem.

Histologické vyšetření samo o sobě samozřejmě nemůže vést k diagnóze LS, může pouze vést k suspekci, která by měla vést k odeslání vzorku nádoru (a případně i nenádorové tkáně) na pracoviště patologie vyššího typu zabývající se diagnostikou LS. Zde pak následují kroky popsané ve schématu 1.

Problémy s algoritmy – suspektní LS a Lynch-like syndrom

Tyto dva termíny se obsahově částečně překrývají, bohužel jsou dnes některými autory používány jako synonyma, ač se jejich význam liší.

Termín „suspektní Lynchův syndrom“ (SLS) se dříve používal pro případy, kdy se nepodařilo prokázat molekulární podklad LS u pacienta splňujícího Amsterdamská kritéria a/nebo (R)BG. Zjednodušeně řečeno, většinou se jedná o familiárně se vyskytující často vícečetné karcinomy, zejména CRC, které nevznikají v terénu polypózy. Vysvětlení je samozřejmě řada, od environmentálních vlivů až po jiné familiární karcinomové syndromy, zejména tzv. *MUTYH* asociovanou polypózu (MAP), která se jednak nemusí prezentovat polypózou, jednak CRC vznikající při bialelické mutaci genu *MUTYH* může být také MSI-H [53].

Pojem „Lynch-like syndrom“ (LLS) je užší a lépe definovaný. Do této skupiny patří případy CRC, které vykazují známky dysfunkce MMR systému, tedy imunohistochemicky detekovaný deficit některého z MMR proteinů a/nebo průkaz MSI-H, spolu s vyloučením možnosti sporadického MSI-H tumoru průkazem absence mutace genu *BRAF* a hypermetylace promotoru genu *MLH1*, ale u nichž byly molekulárně genetickým vyšetřením periferní krve vyloučeny zárodečné mutace MMR genů a 3' konce genu *EPCAM*. Kromě možnosti falešně pozitivních výsledků imunohistochemického vyšetření na jedné straně a existencí mutací nedetekovaných současnými metodami může být tento fenomén vysvětlen dvěma stavy prokázanými v posledních dvou letech: somatickým mozaicizmem [54] a somatickými bíalelickými mutacemi MMR genů, jejichž možnost se dříve popírala [54–57].

Závěr

LS je familiární karcinomový syndrom způsobený zárodečnou mutací některého z genů, jehož proteinový produkt se účastní opravy chyb v DNA vzniklých při replikaci. Vzhledem k tomu, že výskyt LS v populaci se nyní odhaduje až na 5 % a vede ke vzniku maligních nádorů již v produktivním věku, sílí v současné době tlak na zvýšení senzitivity jeho detekce.

Efektivní algoritmus diagnostiky LS by měl být vysoce senzitivní, dostatečně specifický, (relativně) levný a logisticky jednoduchý. Z hlediska senzitivity a specificity se ukázalo zcela nedostatečným spoléhat se na klinická kritéria (zejména rodinnou anamnézu). Proto se současné postupy zaměřují na detekci MSI-H tumorů, a to buď přímo, zprostředkovaně pomocí imunohistochemie, nebo na základě histologického průkazu morfologických znaků specifických pro MSI-H karcinomy.

Přestože se již podařilo i v našich podmínkách zavést účinný algoritmus pro diagnostiku LS, nefunguje dosud dostatečně systém zpětné vazby s klinickými lékaři, kteří by měli organizovat další průběh vyšetření rodiny nemocného s LS. Na vině je do značné míry předávání pacienta po kolektomii mezi chirurg-

gem, praktickým lékařem a onkologem, během kterého „zapadne“ žádost laboratoře molekulární genetiky o periferní krev, která je nezbytná k definitivnímu průkazu LS. K optimalizaci diagnostiky LS je tedy nezbytné zainteresovat do diagnostiky LS i klinické lékaře, bez jejichž aktivní účasti není možná ani kompletní diagnostika pacienta ani další vyšetření jeho rodinných příslušníků.

Literatura

- Kacerovská D, Kazakov DV, Černá K et al. Muir-Torre syndrom – fenotypická varianta Lynchova syndromu. *Cesk Patol* 2010; 46(4): 86–94.
- Lynch HT, Krush AJ. Cancer family „G“ revisited: 1895–1970. *Cancer* 1971; 27(6): 1505–1511.
- Lynch HT, Drouhard TJ, Schuelke GS et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer in a Navajo Indian family. *Cancer Genet Cytogenet* 1985; 15(3–4): 209–213.
- Lindor NM, Rabe K, Petersen GM et al. Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. *JAMA* 2005; 293(16): 1979–1985.
- Daum O, Beneš Z, Hadravský L et al. Lynchův syndrom v rukách patologa. *Cesk Patol* 2014; 50(1): 18–24.
- Fishel R, Lescoe MK, Rao MR et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993; 75(5): 1027–1038.
- Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993; 75(6): 1215–1225.
- Peltomäki P, Lothe RA, Aaltonen LA et al. Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res* 1993; 53(24): 5853–5855.
- Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260(5109): 816–819.
- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR 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* 1998; 58(22): 5248–5257.
- Kruse R, Rutten A, Hosseiny-Malayeri HR et al. „Second hit“ in sebaceous tumors from Muir-Torre patients with germline mutations in MSH2: allele loss is not the preferred mode of inactivation. *J Invest Dermatol* 2001; 116(3): 463–465.
- Nyström-Lahti M, Wu Y, Moisio AL et al. DNA mismatch repair gene mutations in 55 kindreds with verified or putative hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 1996; 5(6): 763–769.
- Gazzoli I, Loda M, Garber J et al. A hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma case associated with hypermethylation of the MLH1 gene in normal tissue and loss of heterozygosity of the unmethylated allele in the resulting microsatellite instability-high tumor. *Cancer Res* 2002; 62(14): 3925–3928.
- Hitchins MP, Wong JJ, Suthers G et al. Inheritance of a cancer-associated MLH1 germ-line epimutation. *N Engl J Med* 2007; 356(7): 697–705.
- Ligtenberg MJ, Kuiper RP, Chan TL et al. Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat Genet* 2009; 41(1): 112–117. doi: 10.1038/ng.283.
- Kovacs ME, Papp J, Szentirmay Z et al. Deletions removing the last exon of TACSTD1 constitute a distinct

- class of mutations predisposing to Lynch syndrome. *Hum Mutat* 2009; 30(2): 197–203. doi: 10.1002/humu.20942.
- Kastrinos F, Stoffel EM, Balmana J et al. Phenotype comparison of MLH1 and MSH2 mutation carriers in a cohort of 1,914 individuals undergoing clinical genetic testing in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17(8): 2044–2051. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0301.
 - Hampel H, Frankel W, Panescu J et al. Screening for Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) among endometrial cancer patients. *Cancer Res* 2006; 66(15): 7810–7817.
 - Berends MJ, Wu Y, Sijmons RH et al. Molecular and clinical characteristics of MSH6 variants: an analysis of 25 index carriers of a germline variant. *Am J Hum Genet* 2002; 70(1): 26–37.
 - Lynch HT, Fusaro RM, Roberts L et al. Muir-Torre syndrome in several members of a family with a variant of the Cancer Family Syndrome. *Br J Dermatol* 1985; 113(3): 295–301.
 - Kokošková B, Daum O, Beneš Z et al. Moderní diagnostika Lynchova syndromu. *Gastroent Hepatol* 2014; 68(2): 157–165.
 - Schwartz RA, Torre DP. The Muir-Torre syndrome: a 25-year retrospect. *J Am Acad Dermatol* 1995; 33(1): 90–104.
 - De Rosa M, Fasano C, Panariello L et al. Evidence for a recessive inheritance of Turcot's syndrome caused by compound heterozygous mutations within the PMS2 gene. *Oncogene* 2000; 19(13): 1719–1723.
 - Gallinger S, Aronson M, Shayan K et al. Gastrointestinal cancers and neurofibromatosis type 1 features in children with a germline homozygous MLH1 mutation. *Gastroenterology* 2004; 126(2): 576–585.
 - Bandipalliam P. Syndrome of early onset colon cancers, hematologic malignancies & features of neurofibromatosis in HNPCC families with homozygous mismatch repair gene mutations. *Fam Cancer* 2005; 4(4): 323–333.
 - Bakry D, Aronson M, Durno C et al. Genetic and clinical determinants of constitutional mismatch repair deficiency syndrome: Report from the constitutional mismatch repair deficiency consortium. *Eur J Cancer* 2014; 50(5): 987–996. doi: 10.1016/j.ejca.2013.12.005.
 - Durno CA, Sherman PM, Aronson M et al. Phenotypic and genotypic characterisation of biallelic mismatch repair deficiency (BMMR-D) syndrome. *Eur J Cancer* 2015; 51(8): 977–983. doi: 10.1016/j.ejca.2015.02.008.
 - Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM et al. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991; 34(5): 424–425.
 - Vasen HF, Watson P, Mecklin JP et al. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999; 116(6): 1453–1456.
 - Umar A, Boland CR, Terdiman JP et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(4): 261–268.
 - Hampel H, Frankel WL, Martin E et al. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med* 2005; 352(18): 1851–1860.
 - Liu T, Yan H, Kuismanen S et al. The role of hPMS1 and hPMS2 in predisposing to colorectal cancer. *Cancer Res* 2001; 61(21): 7798–7802.
 - van der Klift H, Wijnen J, Wagner A et al. Molecular characterization of the spectrum of genomic deletions in the mismatch repair genes MSH2, MLH1, MSH6, and PMS2 responsible for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 44(2): 123–138.
 - Dovrat S, Figer A, Fidder HH et al. Mutational analysis of hMSH6 in Israeli HNPCC and HNPCC-like families. *Fam Cancer* 2005; 4(4): 291–294.

35. Hegde MR, Chong B, Blazo ME et al. A homozygous mutation in MSH6 causes Turcot syndrome. *Clin Cancer Res* 2005; 11(13): 4689–4693.
36. Hendriks YM, Jagmohan-Changur S, van der Klift HM et al. Heterozygous mutations in PMS2 cause hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome). *Gastroenterology* 2006; 130(2): 312–322.
37. de la Chapelle A. The incidence of Lynch syndrome. *Fam Cancer* 2005; 4(3): 233–237.
38. Jenkins MA, Baglietto L, Dowty JG et al. Cancer risks for mismatch repair gene mutation carriers: a population-based early onset case-family study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4(4): 489–498.
39. Quehenberger F, Vasen HF, van Houtwelingen HC. Risk of colorectal and endometrial cancer for carriers of mutations of the hMLH1 and hMSH2 gene: correction for ascertainment. *J Med Genet* 2005; 42(6): 491–496.
40. Lynch HT, de la Chapelle A. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 1999; 36(11): 801–818.
41. Jass JR, Stewart SM. Evolution of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut* 1992; 33(6): 783–786.
42. Kuan SF, Navina S, Cressman KL et al. Immunohistochemical detection of BRAF V600E mutant protein using the VE1 antibody in colorectal carcinoma is highly concordant with molecular testing but requires rigorous antibody optimization. *Hum Pathol* 2014; 45(3): 464–472. doi: 10.1016/j.humpath.2013.10.026.
43. Domingo E, Laiho P, Ollikainen M et al. BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. *J Med Genet* 2004; 41(9): 664–668.
44. Pai RK, Shadrach BL, Carver P et al. Immunohistochemistry for annexin A10 can distinguish sporadic from Lynch syndrome-associated microsatellite-unstable colorectal carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2014; 38(4): 518–525. doi: 10.1097/PAS.0000000000000148.
45. Shia J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I. The utility of immunohistochemistry. *J Mol Diagn* 2008; 10(4): 293–300. doi: 10.2353/jmoldx.2008.080031.
46. Funkhouser WK Jr, Lubin IM, Morzon FA et al. Relevance, pathogenesis, and testing algorithm for mismatch repair-defective colorectal carcinomas: a report of the association for molecular pathology. *J Mol Diagn* 2012; 14(2): 91–103. doi: 10.1016/j.jmoldx.2011.11.001.
47. Halvarsson B, Lindblom A, Rambech E et al. Microsatellite instability analysis and/or immunostaining for the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer? *Virchows Arch* 2004; 444(2): 135–141.
48. Boland CR, Shike M. Report from the Jerusalem workshop on Lynch syndrome-hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010; 138(7): 2197e1–2197e7. doi: 10.1053/j.gastro.2010.04.024.
49. Boland CR, Koi M, Chang DK et al. The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome: from bench to bedside. *Fam Cancer* 2008; 7(1): 41–52.
50. Hyde A, Fontaine D, Stuckless S et al. A histology-based model for predicting microsatellite instability in colorectal cancers. *Am J Surg Pathol* 2010; 34(12): 1820–1829. doi: 10.1097/PAS.0b013e3181f6a912.
51. Roman R, Verdu M, Calvo M et al. Microsatellite instability of the colorectal carcinoma can be predicted in the conventional pathologic examination. A prospective multicentric study and the statistical analysis of 615 cases consolidate our previously proposed logistic regression model. *Virchows Arch* 2010; 456(5): 533–541. doi: 10.1007/s00428-010-0896-6.
52. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007; 50(1): 113–130.
53. Castillejo A, Vargas G, Castillejo MI et al. Prevalence of germline MUTYH mutations among Lynch-like syndrome patients. *Eur J Cancer* 2014; 50(13): 2241–2250. doi: 10.1016/j.ejca.2014.05.022.
54. Sourrouille I, Coulet F, Lefevre JH et al. Somatic mosaicism and double somatic hits can lead to MSI colorectal tumors. *Fam Cancer* 2013; 12(1): 27–33. doi: 10.1007/s10689-012-9568-9.
55. Geurts-Giele WR, Leenen CH, Dubbink HJ et al. Somatic aberrations of mismatch repair genes as a cause of microsatellite-unstable cancers. *J Pathol* 2014; 234(4): 548–559. doi: 10.1002/path.4419.
56. Mensenkamp AR, Vogelaar IP, van Zelst-Stams WA et al. Somatic mutations in MLH1 and MSH2 are a frequent cause of mismatch-repair deficiency in Lynch syndrome-like tumors. *Gastroenterology* 2014; 146(3): 643–646. doi: 10.1053/j.gastro.2013.12.002.
57. Haraldsdottir S, Hampel H, Tomsic J et al. Colon and endometrial cancers with mismatch repair deficiency can arise from somatic, rather than germline, mutations. *Gastroenterology* 2014; 147(6): 1308–1316. doi: 10.1053/j.gastro.2014.08.041.

4 Závěr

Předkládaný soubor publikací zahrnuje poměrně dlouhý časový úsek, po který práce vznikala. V průběhu přípravy disertačního spisu a v době práce na jednotlivých publikacích se stávalo stále zřejmější, že molekulárně-genetická klasifikace nádorů GIT v nejbližší době nenahradí klasický morfologický přístup, ale stane se integrální součástí jak diagnostického, tak prediktivního přístupu k jednotlivým lézím. V aktuální 5. edici klasifikací nádorů Světové zdravotnické organizace (WHO) věnované nádorům trávicího systému je u drtivé většiny jednotek uváděna jako integrální součást popisu celá řada molekulárně-genetických rysů, které se podílejí na etiologii, které lze využít k diagnostice a které eventuálně ovlivňují prognózu daného typu nádoru. Trend je tedy jasně daný a je evidentní, že bez molekulární genetiky nebude možné některé nádorové jednotky diagnostikovat, jiné léčit, a u dalších například stanovit prognózu. Na druhou stranu se zdá, že pouze molekulárně-geneticky definované jednotky budou vzácné a čistě genetický přístup k diagnostice, alespoň v nejbližších letech, nebude ten hlavní (8, 79). Rovněž je evidentní, že díky široce rozšířené a dostupné technologii pro sekvenaci nádorů získáváme stále nová a nová data. Bylo by velkou chybou pevně lpět na dogmatech z let minulých, jelikož molekulárně-genetické poznání jednotlivých nádorů se velmi rychle vyvíjí a názory se rychle stávají zastaralými.

V současné době (2021) v rámci GIT neexistuje nádorová jednotka definovaná čistě na základě molekulárně genetických vlastností. U velké části méně obvyklých nádorových jednotek je nutná korelace morfologie, imunohistochemických vlastností a genetických abnormalit. Na druhou stranu, u velké části lézí GIT pouhá morfologická, byť i imunohistochemicky podložená diagnóza nestačí vyhovět nárokům na stanovení následné onkologické léčby, popř. k detekci familiálních nádorových onemocnění. V rámci predikce se spektrum vyšetřovaných alterací dynamicky mění a je jisté, že molekulárně genetické změny potřebné k diagnostice a léčbě budou popisovány a využívány i nadále v daleko větší míře, než jsme odhadovali před 10 lety.

V současnosti je tedy zřejmé, že molekulární genetiky se uplatňuje jako jeden z nástrojů diagnostiky nádorů GIT, ale zejména je využívána a nepochybně i v budoucnosti bude využívána ke stanovení prediktivních parametrů. Je pravděpodobné, že vybrané parametry bude možno v daleko větší míře využívat napříč spektrem nádorových lézí s přesahem mimo GIT. Taková situace je již skutečností například pro geny *BRAF*, *RAS*, *HER2*, atd. Další vysoce perspektivní molekulární markery jsou spojeny s geny *NTRK*, *ROSI* a jinými. V nadcházející éře sekvenování nové generace (jakožto do budoucna patrně běžné součásti klinické péče) musíme být připraveni na situace, kdy genetické vyšetření odhalí nízké rizikové abnormality genů a různé polymorfismy jednotlivých nukleotidů, a musíme být schopni i tyto možná často ne příliš jasné výsledky inkorporovat do klinického managementu pacienta. Zároveň je třeba jasně nastolit pravidla testování – ne zcela vyřešena zůstává otázka, zda je pro prediktivní testování vhodnější primární

tumor, či metastáza. V současnosti je molekulárně-genetické vyšetření prediktivních markerů prováděno z primárního nádoru. Je však otázkou, zda by pro predikci metastazujícího onemocnění nebylo spíše vhodné vyšetřovat metastázy. Ukazuje se totiž, že metastázy se často velmi podstatně liší od primárního nádoru, a to nejen morfologicky, ale také v některých imunohistochemických a zejména molekulárně-genetických vlastnostech (80). Zůstává pak otázkou, zda není lepší pro léčbu vyšetřit patřičnou metastázu.

Tato disertační práce má celkem široký záběr témat. Konkrétně pak komentuje jednak možnosti využití testování SDHB při detekci familiálních GISTů a z naší práce vcelku jednoznačně vyplynulo, že detekce abnormalit genů *SDHx* je (s určitými omezeními) využitelná jak pro diagnostiku vlastní léze, pro diferenciální diagnostiku GIST a jiných vřetenobuněčných lézí i pro diagnostiku familiálního syndromu. V další recentní práci jsme prokázali, že široké screeningové testování poměrně úzce zvolené skupiny kolorektálních karcinomů dokáže vyselektovat nádory, které kromě zařazení do základní molekulárně-genetické skupiny umožňují modifikovat léčbu další cílenou terapií. Velmi komplexní diagnostický přístup jsme použili v práci popisující hlavní morfologické rozdíly mezi nediferencovanými karcinomy se sarkomatoidní diferenciací a gastrointestinálními stromálními tumory. Infiltrace do tukové tkáně, lymfatická invaze, absence imunoreaktivity s protilátkou DOG1 a další morfologické rysy (změny připomínající nádor ze žloutkového váčku, změny připomínající angiosarkom) ukazovaly významně na diagnózu nediferencovaného karcinomu a nikoliv gastrointestinálního stromálního tumoru. Oproti poměrně komplikované molekulárně-genetické metodice tato jednoduchá vyšetření rychleji a významně levněji odliší tyto skupiny nádorů. Dále jsou představeny tři práce zaměřené na diagnostický algoritmus Lynchova syndromu, kde prokazujeme, že rutinní zavedení univerzálního imunohistochemického screeningu nádorů pomocí imunohistochemického průkazu exprese MMR proteinů má dobrou specificitu a sensitivitu pro záchyt pacientů suspektních z Lynchova syndromu.

Závěrem lze říct, že čistě molekulárně-genetický přístup nemusí nutně vést ke správně a rychle stanovené diagnóze. Tak, jako je tomu u většiny nádorových lézí v lidské patologii, prozatím i v GIT platí, že molekulárně-genetické metody mají být ve většině případů indikovány až na základě prvotní diagnostické práce založené na morfolologii a imunohistochemii. Na druhou stranu soubor našich prací demonstruje roli molekulárně-genetických rozborů v současném moderním diferenciálně diagnostickém přístupu a při stanovení prognózy u vybraných nádorových lézí GIT. Současně ale ukazujeme, že i v moderní patologii je stále kladen důraz na základní morfologické vyšetření, kde morfologie dává impuls k vygenerování dalších speciálních nadstavbových vyšetření. Moderní diagnostický přístup pak klade stále vyšší nároky na pathology, kteří kromě své „klasické“ morfologické práce musí umět správně odhadnout a indikovat molekulárně-genetická vyšetření tam, kde je to nutné pro další management pacienta.

5 Seznam použité literatury

1. Krejčí D, Svobodová I, Pehalová L, Talábová A, Mužík J, Dušek L. Novotvary 2017 Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR; 2017.
2. Miettinen M, Wang ZF, Lasota J. DOG1 antibody in the differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a study of 1840 cases. *The American journal of surgical pathology*. 2009;33(9):1401-8.
3. Wu CE, Tzen CY, Wang SY, Yeh CN. Clinical Diagnosis of Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST): From the Molecular Genetic Point of View. *Cancers (Basel)*. 2019;11(5).
4. Mei L, Smith SC, Faber AC, Trent J, Grossman SR, Stratakis CA, et al. Gastrointestinal Stromal Tumors: The GIST of Precision Medicine. *Trends Cancer*. 2018;4(1):74-91.
5. Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science*. 1998;279(5350):577-80.
6. Rubin BP, Singer S, Tsao C, Duensing A, Lux ML, Ruiz R, et al. KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer research*. 2001;61(22):8118-21.
7. Daum O, Daumová M, Šedivcová M. Doporučený postup pro bioptické vyšetření gastrointestinálního stromálního tumoru (GIST). Společnost českých patologů; 2021.
8. Arends MJ, Fukayama M, Klimstra DS, Lam AKY, Nagtegaal ID, Odze RD, et al. WHO Classification of Tumours. Digestive System Tumours. 5th ed., IARC; 2019.
9. Martin-Broto J, Rubio L, Alemany R, Lopez-Guerrero JA. Clinical implications of KIT and PDGFRA genotyping in GIST. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*. 2010;12(10):670-6.
10. Poveda A, Garcia Del Muro X, Lopez-Guerrero JA, Cubedo R, Martinez V, Romero I, et al. GEIS guidelines for gastrointestinal sarcomas (GIST). *Cancer treatment reviews*. 2017;55:107-19.
11. Lasota J, Miettinen M. Clinical significance of oncogenic KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology*. 2008;53(3):245-66.
12. West RB, Corless CL, Chen X, Rubin BP, Subramanian S, Montgomery K, et al. The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status. *The American journal of pathology*. 2004;165(1):107-13.
13. Boikos SA, Xekouki P, Fumagalli E, Faucz FR, Raygada M, Szarek E, et al. Carney triad can be (rarely) associated with germline succinate dehydrogenase defects. *European journal of human genetics*. 2016;24(4):569-73.

14. Graham RP, Nair AA, Davila JI, Jin L, Jen J, Sukov WR, et al. Gastroblastoma harbors a recurrent somatic MALAT1-GLI1 fusion gene. *Modern pathology*. 2017;30(10):1443-52.
15. Miettinen M, Dow N, Lasota J, Sobin LH. A distinctive novel epitheliomesenchymal biphasic tumor of the stomach in young adults ("gastroblastoma"): a series of 3 cases. *The American journal of surgical pathology*. 2009;33(9):1370-7.
16. Shin DH, Lee JH, Kang HJ, Choi KU, Kim JY, Park DY, et al. Novel epitheliomesenchymal biphasic stomach tumour (gastroblastoma) in a 9-year-old: morphological, ultrastructural and immunohistochemical findings. *Journal of clinical pathology*. 2010;63(3):270-4.
17. Wey EA, Britton AJ, Sferra JJ, Kasunic T, Pepe LR, Appelman HD. Gastroblastoma in a 28-year-old man with nodal metastasis: proof of the malignant potential. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2012;136(8):961-4.
18. Fernandes T, Silva R, Devesa V, Lopes JM, Carneiro F, Viamonte B. AIRP best cases in radiologic-pathologic correlation: gastroblastoma: a rare biphasic gastric tumor. *Radiographics*. 2014;34(7):1929-33.
19. Ma Y, Zheng J, Zhu H, Dong K, Zheng S, Xiao X, et al. Gastroblastoma in a 12-year-old Chinese boy. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2014;7(6):3380-4.
20. Zheng N, Xiao XM, Dong KR, Chen L, Ma YY, Li K. Primary gastric tumors in infants and children: 15 cases of 20-year report. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2016;142(5):1061-7.
21. Toumi O, Ammar H, Korbi I, Ayed M, Gupta R, Nasr M, et al. Gastroblastoma, a biphasic neoplasm of stomach: A case report. *International journal of surgery case reports*. 2017;39:72-6.
22. Centonze G, Mangogna A, Salviato T, Belmonte B, Cattaneo L, Monica MAT, et al. Gastroblastoma in Adulthood-A Rarity among Rare Cancers-A Case Report and Review of the Literature. *Case reports in pathology*. 2019;2019:4084196.
23. Castri F, Ravegnini G, Lodoli C, Fiorentino V, Abatini C, Giustiniani MC, et al. Gastroblastoma in old age. *Histopathology*. 2019;75(5):778-82.
24. Spans L, Fletcher CD, Antonescu CR, Rouquette A, Coindre JM, Sciot R, et al. Recurrent MALAT1-GLI1 oncogenic fusion and GLI1 up-regulation define a subset of plexiform fibromyxoma. *The Journal of pathology*. 2016;239(3):335-43.
25. Prall OWJ, McEvoy CRE, Byrne DJ, Irvani A, Browning J, Choong DY, et al. A Malignant Neoplasm From the Jejunum With a MALAT1-GLI1 Fusion and 26-Year Survival History. *International journal of surgical pathology*. 2020;28(5):553-62.
26. Antonescu CR, Agaram NP, Sung YS, Zhang L, Swanson D, Dickson BC. A Distinct Malignant Epithelioid Neoplasm With GLI1 Gene Rearrangements, Frequent S100 Protein Expression, and Metastatic Potential: Expanding the Spectrum of Pathologic Entities With ACTB/MALAT1/PTCH1-GLI1 Fusions. *The American journal of surgical pathology*. 2018;42(4):553-60.
27. Graham RP, Yeh MM, Lam-Himlin D, Roberts LR, Terracciano L, Cruise MW, et al. Molecular testing for the clinical diagnosis of fibrolamellar carcinoma. *Modern pathology*. 2018;31(1):141-9.

28. Barkmanová J, Staněk L. Význam testování RAS u kolorektálního karcinomu. *Onkologie*. 2015;9:167-70.
29. Colussi D, Brandi G, Bazzoli F, Ricciardiello L. Molecular pathways involved in colorectal cancer: implications for disease behavior and prevention. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(8):16365-85.
30. Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocrine-related cancer*. 2004;11(4):689-708.
31. Spano JP, Fagard R, Soria JC, Rixe O, Khayat D, Milano G. Epidermal growth factor receptor signaling in colorectal cancer: preclinical data and therapeutic perspectives. *Annals of oncology*. 2005;16(2):189-94.
32. Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J. Molecular pathways in colorectal cancer. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2012;27(9):1423-31.
33. Rodriguez-Salas N, Dominguez G, Barderas R, Mendiola M, Garcia-Albeniz X, Maurel J, et al. Clinical relevance of colorectal cancer molecular subtypes. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2017;109:9-19.
34. Ducreux M, Chamseddine A, Laurent-Puig P, Smolenschi C, Hollebecque A, Dartigues P, et al. Molecular targeted therapy of BRAF-mutant colorectal cancer. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. 2019;11:1758835919856494.
35. Ryška A. Novinky v diagnostice prediktivních markerů u kolorektálního karcinomu. *Onkologie*. 2014;8:72-4.
36. Král J, Slyšková J, Vodička P, Špičák J. Molekulární genetika kolorektálního karcinomu. *Klinická onkologie*. 2016;29(6):419-27.
37. Danielsen SA, Eide PW, Nesbakken A, Guren T, Leithe E, Lothe RA. Portrait of the PI3K/AKT pathway in colorectal cancer. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1855(1):104-21.
38. Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, Toyoshima K, Yamamoto T. The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science*. 1986;232(4758):1644-6.
39. Abrahao-Machado LF, Scapulatempo-Neto C. HER2 testing in gastric cancer: An update. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2016;22(19):4619-25.
40. Barrow E, Hill J, Evans DG. Cancer risk in Lynch Syndrome. *Familial cancer*. 2013;12(2):229-40.
41. Nystrom-Lahti M, Wu Y, Moisisio AL, Hofstra RM, Osinga J, Mecklin JP, et al. DNA mismatch repair gene mutations in 55 kindreds with verified or putative hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Human molecular genetics*. 1996;5(6):763-9.
42. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Ruschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004;96(4):261-8.
43. Niessen RC, Hofstra RM, Westers H, Ligtenberg MJ, Kooi K, Jager PO, et al. Germline hypermethylation of MLH1 and EPCAM deletions are a frequent cause of Lynch syndrome. *Genes, chromosomes & cancer*. 2009;48(8):737-44.

44. Huth C, Kloor M, Voigt AY, Bozukova G, Evers C, Gaspar H, et al. The molecular basis of EPCAM expression loss in Lynch syndrome-associated tumors. *Modern pathology*. 2012;25(6):911-6.
45. Talseth-Palmer BA. The genetic basis of colonic adenomatous polyposis syndromes. *Hereditary cancer in clinical practice*. 2017;15:5.
46. Samadder NJ, Baffy N, Giridhar KV, Couch FJ, Riegert-Johnson D. *Hereditary Cancer Syndromes-A Primer on Diagnosis and Management, Part 2: Gastrointestinal Cancer Syndromes*. Mayo Clinic proceedings. 2019;94(6):1099-116.
47. Nielsen M, Hes FJ, Nagengast FM, Weiss MM, Mathus-Vliegen EM, Morreau H, et al. Germline mutations in APC and MUTYH are responsible for the majority of families with attenuated familial adenomatous polyposis. *Clinical genetics*. 2007;71(5):427-33.
48. Pilarski RT, Brothman AR, Benn P, Shulman Rosengren S. Attenuated familial adenomatous polyposis in a man with an interstitial deletion of chromosome arm 5q. *American journal of medical genetics*. 1999;86(4):321-4.
49. Aretz S, Stienen D, Friedrichs N, Stemmler S, Uhlhaas S, Rahner N, et al. Somatic APC mosaicism: a frequent cause of familial adenomatous polyposis (FAP). *Human mutation*. 2007;28(10):985-92.
50. Hes FJ, Nielsen M, Bik EC, Konvalinka D, Wijnen JT, Bakker E, et al. Somatic APC mosaicism: an underestimated cause of polyposis coli. *Gut*. 2008;57(1):71-6.
51. Rohlin A, Engwall Y, Fritzell K, Goransson K, Bergsten A, Einbeigi Z, et al. Inactivation of promoter 1B of APC causes partial gene silencing: evidence for a significant role of the promoter in regulation and causative of familial adenomatous polyposis. *Oncogene*. 2011;30(50):4977-89.
52. Kadiyska TK, Todorov TP, Bichev SN, Vazharova RV, Nossikoff AV, Savov AS, et al. APC promoter 1B deletion in familial polyposis--implications for mutation-negative families. *Clinical genetics*. 2014;85(5):452-7.
53. Kalbfleisch T, Brock P, Snow A, Neklason D, Gowans G, Klein J. Characterization of an APC Promoter 1B deletion in a Patient Diagnosed with Familial Adenomatous Polyposis via Whole Genome Shotgun Sequencing. *F1000Research*. 2015;4:170.
54. Snow AK, Tuohy TM, Sargent NR, Smith LJ, Burt RW, Neklason DW. APC promoter 1B deletion in seven American families with familial adenomatous polyposis. *Clinical genetics*. 2015;88(4):360-5.
55. Sieber OM, Lipton L, Crabtree M, Heinemann K, Fidalgo P, Phillips RK, et al. Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *The New England journal of medicine*. 2003;348(9):791-9.
56. Weren RD, Ligtenberg MJ, Kets CM, de Voer RM, Verwiel ET, Spruijt L, et al. A germline homozygous mutation in the base-excision repair gene NTHL1 causes adenomatous polyposis and colorectal cancer. *Nature genetics*. 2015;47(6):668-71.
57. Church JM. Polymerase proofreading-associated polyposis: a new, dominantly inherited syndrome of hereditary colorectal cancer predisposition. *Diseases of the colon and rectum*. 2014;57(3):396-7.
58. Bellido F, Pineda M, Aiza G, Valdes-Mas R, Navarro M, Puente DA, et al. POLE and POLD1 mutations in 529 kindred with familial colorectal cancer and/or polyposis:

review of reported cases and recommendations for genetic testing and surveillance. *Genetics in medicine*. 2016;18(4):325-32.

59. Palles C, Martin L, Domingo E, Chegwidzen L, McGuire J, Cuthill V, et al. The clinical features of polymerase proof-reading associated polyposis (PPAP) and recommendations for patient management. *Familial cancer*. 2021.
60. Chae HD, Jeon CH. Peutz-Jeghers syndrome with germline mutation of STK11. *Annals of Surgical Treatment and Research*. 2014;86(6):325-30.
61. Hearle N, Schumacher V, Menko FH, Olschwang S, Boardman LA, Gille JJ, et al. Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. *Clinical cancer research*. 2006;12(10):3209-15.
62. Jenne DE, Reimann H, Nezu J, Friedel W, Loff S, Jeschke R, et al. Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nature genetics*. 1998;18(1):38-43.
63. Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, Avizienyte E, Roth S, Loukola A, et al. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature*. 1998;391(6663):184-7.
64. Hearle NC, Rudd MF, Lim W, Murday V, Lim AG, Phillips RK, et al. Exonic STK11 deletions are not a rare cause of Peutz-Jeghers syndrome. *Journal of medical genetics*. 2006;43(4):e15.
65. Amos CI, Keitheri-Cheteri MB, Sabripour M, Wei C, McGarrity TJ, Seldin MF, et al. Genotype-phenotype correlations in Peutz-Jeghers syndrome. *Journal of medical genetics*. 2004;41(5):327-33.
66. Hussain T, Church JM. Juvenile polyposis syndrome. *Clinical Case Reports*. 2020;8(1):92-5.
67. Howe JR, Roth S, Ringold JC, Summers RW, Jarvinen HJ, Sistonen P, et al. Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. *Science*. 1998;280(5366):1086-8.
68. Howe JR, Bair JL, Sayed MG, Anderson ME, Mitros FA, Petersen GM, et al. Germline mutations of the gene encoding bone morphogenetic protein receptor 1A in juvenile polyposis. *Nature genetics*. 2001;28(2):184-7.
69. Lynch ED, Ostermeyer EA, Lee MK, Arena JF, Ji H, Dann J, et al. Inherited mutations in PTEN that are associated with breast cancer, cowden disease, and juvenile polyposis. *American journal of human genetics*. 1997;61(6):1254-60.
70. Pilarski R. Cowden syndrome: a critical review of the clinical literature. *Journal of Genetic Counseling*. 2009;18(1):13-27.
71. Ni Y, Zbuk KM, Sadler T, Patocs A, Lobo G, Edelman E, et al. Germline mutations and variants in the succinate dehydrogenase genes in Cowden and Cowden-like syndromes. *American journal of human genetics*. 2008;83(2):261-8.
72. Berx G, Becker KF, Hofler H, van Roy F. Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene. *Human mutation*. 1998;12(4):226-37.
73. Lynch HT, Lynch JF, Shaw TG. Hereditary gastrointestinal cancer syndromes. *Gastrointestinal Cancer Research*. 2011;4(4 Suppl 1):S9-S17.

74. Guilford P, Hopkins J, Harraway J, McLeod M, McLeod N, Harawira P, et al. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature*. 1998;392(6674):402-5.
75. Majewski IJ, Kluijdt I, Cats A, Scerri TS, de Jong D, Kluin RJ, et al. An alpha-E-catenin (CTNNA1) mutation in hereditary diffuse gastric cancer. *The Journal of pathology*. 2013;229(4):621-9.
76. Worthley DL, Phillips KD, Wayte N, Schrader KA, Healey S, Kaurah P, et al. Gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach (GAPPS): a new autosomal dominant syndrome. *Gut*. 2012;61(5):774-9.
77. Kerr SE, Thomas CB, Thibodeau SN, Ferber MJ, Halling KC. APC germline mutations in individuals being evaluated for familial adenomatous polyposis: a review of the Mayo Clinic experience with 1591 consecutive tests. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2013;15(1):31-43.
78. Li J, Woods SL, Healey S, Beesley J, Chen X, Lee JS, et al. Point Mutations in Exon 1B of APC Reveal Gastric Adenocarcinoma and Proximal Polyposis of the Stomach as a Familial Adenomatous Polyposis Variant. *American journal of human genetics*. 2016;98(5):830-42.
79. Antonescu CR, Blay JY, Bovée JVMG, Bridge JA, Cunha I, Dei Tos AP, et al. WHO Classification of Tumours. Soft Tissue and Bone Tumours. 5th edition. IARC; 2020.
80. Walter D, Harter PN, Battke F, Winkelmann R, Schneider M, Holzer K, et al. Genetic heterogeneity of primary lesion and metastasis in small intestine neuroendocrine tumors. *Scientific reports*. 2018;8(1):3811.

6 Publikace

6.1 Publikace autorky, které jsou podkladem disertační práce

1. **Kokoskova B**, Daum O. Thread-like bridging strands in the adenomatoid tumor of the small intestine. *Int J Surg Pathol*. 2015 Feb;23(1):94.
2. Dubova M, Sedivcova M, Michal M, **Kokoskova B**, Ryska A, Smid D, Daum O. Utility of immunohistochemical investigation of SDHB and molecular genetic analysis of SDH genes in the differential diagnosis of mesenchymal tumors of GIT. Among authors: Kokoskova B. *Histol Histopathol*. 2015 Feb;30(2):223-32.
3. Dubova M, Sedivcova M, **Saskova B**, Hadravská S, Daum O. Nonsyndromic Intestinal Lipomas are Probably not Associated With Mutations of PDGFRA. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2017 Oct;25(9):664-667
4. **Vankova B**, Behenska K, Bauer M, Sedivcova M, Daumova M, Agaimy A, Michal M, Daum O. Morphological features useful in the differential diagnosis between undifferentiated carcinoma and gastrointestinal stromal tumor. *Ann Diagn Pathol*. 2020 May 3;46:151527. doi: 10.1016/j.anndiagpath.2020.151527. Online ahead of print.
5. **Vaňková B**, Vaněček T, Ptáková N, Hájková V, Dušek M, Michal M, Švajdler P, Daum O, Daumová M, Michal M, Mezencev R, Švajdler M. Targeted next generation sequencing of MLH1-deficient, MLH1 promoter hypermethylated, and BRAF/RAS-wild-type colorectal adenocarcinomas is effective in detecting tumors with actionable oncogenic gene fusions. *Genes Chromosomes Cancer*. 2020 Oct;59(10):562-568
6. **Kokošková B**, Daum O, Beneš Z, Dušek M, Stehlík L, Černá K, Hadravský L, Michal M. Moderní dagnostika Lynchova syndromu. *Gastroenterologie a hepatologie*. 2014;68:157-165
7. Dušek M, Hadravský L, Stehlík J, Černá K, Čurčíková R, Švajdler M, **Šašková B**, Dubová M, Michal M, Jirásek T, Daum O. Výsledky morfologické depistáže Lynchova syndromu v období 2013-2016. *Cesk Patol*. 2018 Summer;54(2):86-92
8. Dušek M, Hadravský L, Černá K, Stehlík J, Švajdler M, **Kokošková B**, Dubová M, Michal M, O. Daum O. Diagnóza Lynchova syndromu od patologa. *Klin Onkol* 2016; 29(3): 180-186

6.2 Publikace autorky se vztahem k tématu disertační práce

1. Daum O, Beneš Z, Hadravský L, Stehlík J, Cerná K, Dušek M, **Kokošková B**, Michal M. Lynch syndrome in the hands of pathologists. . Cesk Patol. 2014 Jan;50(1):18-24.
2. **Šašková B**, Daum O, Dubová M, Pivovarčíková K, Švajdler M. Prekurzorové léze adenokarcinomu žaludku. Onkologie 2018;12(2): 56-62.

6.3 Publikace autorky bez vztahu k tématu disertační práce

1. Daum O, **Kokošková B**, Švajdler M. Morfologie gastroezofageálního refluxu. *Cesk Patol.* 2016;52(1):15-22.
2. Petersson F, Sperga M, Bulimbasic S, Martinek P, Svajdler M, Kuroda N, Hora M, Simpson R, Tichy T, Peckova K, Branzovsky J, Pivovarcikova K, Rotterova P, **Kokoskova B**, Bauleth K, Martincok D, Nagy V, Michal M, Hes O. Foamy cell (hibernoma-like) change is a rare histopathological feature in renal cell carcinoma. *Virchows Arch.* 2014 Aug;465(2):215-24.
3. Peckova K, Grossmann P, Bulimbasic S, Sperga M, Perez Montiel D, Daum O, Rotterova P, **Kokoskova B**, Vesela P, Pivovarcikova K, Bauleth K, Branzovsky J, Dubova M, Hora M, Michal M, Hes O. Renal cell carcinoma with leiomyomatous stroma--further immunohistochemical and molecular genetic characteristics of unusual entity. *Ann Diagn Pathol.* 2014 Oct;18(5):291-6.
4. Petersson F, Branzovsky J, Martinek P, Korabecna M, Kruslin B, Hora M, Peckova K, Bauleth K, Pivovarcikova K, Michal M, Svajdler M, Sperga M, Bulimbasic S, Leroy X, Rychly B, Trivunic S, **Kokoskova B**, Rotterova P, Podhola M, Suster S, Hes O. The leiomyomatous stroma in renal cell carcinomas is polyclonal and not part of the neoplastic process. *Virchows Arch.* 2014 Jul;465(1):89-96
5. Hes O, Pivovarcikova K, Stehlik J, Martinek P, Vanecek T, Bauleth K, Dolejsova O, Petersson F, Hora M, Perez Montiel D, Peckova K, Branzovsky J, Slouka D, Vodicka J, **Kokoskova B**, Matej R, Michal M. Choriogonadotropin positive seminoma-a clinicopathological and molecular genetic study of 15 cases. *Ann Diagn Pathol.* 2014 Apr;18(2):89-94.
6. Peckova K, Vanecek T, Martinek P, Spagnolo D, Kuroda N, Brunelli M, Vranic S, Djuricic S, Rotterova P, Daum O, **Kokoskova B**, Vesela P, Pivovarcikova K, Bauleth K, Dubova M, Kalusova K, Hora M, Michal M, Hes O. Aggressive and nonaggressive translocation t(6;11) renal cell carcinoma: comparative study of 6 cases and review of the literature. *Ann Diagn Pathol.* 2014 Dec;18(6):351-7.
7. Hayes M, Peckova K, Martinek P, Hora M, Kalusova K, Straka L, Daum O, **Kokoskova B**, Rotterova P, Pivovarcikova K, Branzovsky J, Dubova M, Vesela P, Michal M, Hes O. Molecular-genetic analysis is essential for accurate classification of renal carcinoma resembling Xp11.2 translocation carcinoma. *Virchows Arch.* 2015 Mar;466(3):313-22.
8. Peckova K, Martinek P, Ohe C, Kuroda N, Bulimbasic S, Condom Mundo E, Perez Montiel D, Lopez JI, Daum O, Rotterova P, **Kokoskova B**, Dubova M, Pivovarcikova K, Bauleth K, Grossmann P, Hora M, Kalusova K, Davidson W, Slouka D, Miroslav S, Buzrla P, Hynek M, Michal M, Hes O. Chromophobe renal cell carcinoma with neuroendocrine and neuroendocrine-like features. Morphologic, immunohistochemical, ultrastructural, and array comparative

genomic hybridization analysis of 18 cases and review of the literature. *Ann Diagn Pathol.* 2015 Aug;19(4):261-8

9. Ulamec M, Skenderi F, Zhou M, Krušlin B, Martínek P, Grossmann P, Peckova K, Alvarado-Cabrero I, Kalusova K, **Kokoskova B**, Rotterova P, Hora M, Daum O, Dubova M, Bauleth K, Slouka D, Sperga M, Davidson W, Rychly B, Perez Montiel D, Michal M, Hes O. Molecular Genetic Alterations in Renal Cell Carcinomas With Tubulocystic Pattern: Tubulocystic Renal Cell Carcinoma, Tubulocystic Renal Cell Carcinoma With Heterogenous Component and Familial Leiomyomatosis-associated Renal Cell Carcinoma. *Clinicopathologic and Molecular Genetic Analysis of 15 Cases. Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2016;24(7):521-30.
10. Skenderi F, Ulamec M, Vranic S, Bilalovic N, Peckova K, Rotterova P, **Kokoskova B**, Trpkov K, Vesela P, Hora M, Kalusova K, Sperga M, Perez Montiel D, Alvarado Cabrero I, Bulimbasic S, Branzovsky J, Michal M, Hes O. Cystic Renal Oncocytoma and Tubulocystic Renal Cell Carcinoma: Morphologic and Immunohistochemical Comparative Study. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2016;24(2):112-9.
11. Svatoň M, Pešek M, Vodička J, Mraček J, Baxa J, **Šašková B**. Znamenají metastázy do mozku u tumoru s ALK translokací vždy selhání terapie crizotinibem? *Studia Pneumologica et Phthiseologica* 2017;77(6):222-226.
12. Švajdler P, Daum O, Dubová M, **Šašková B**, Rychlý B, Švajdler M. Peroperačné vyšetrenie pankreasu, žlčníka, extrahepatálnych žlčových ciest, pečene a gastrointestinálneho traktu. *Cesk Patol.* 2018;54(2):63-71
13. Švajdler M, Mezencev R, Ondič O, **Šašková B**, Mukenšnábl P, Michal M. P16 is a useful supplemental diagnostic marker of pulmonary small cell carcinoma in small biopsies and cytology specimens. *Ann Diagn Pathol.* 2018;33:23-29.
14. Pešek M, Baxa J, Vaněček T, Mukenšnábl P, Svatoň M, Aubrecht J, Bednářová V, Benešová L, Bittenglová R, Blažek J, Boudová L, Brůha F, Burkert J, Dubová V, Dundr P, Dvořák M, Ferda J, Fiala O, Fiala P, Grossmann P, Hajníková Z, Havel D, Hrdá K, Hytych V, Chudáček Z, Jelínek J, Koubková L, Krákorová G, Lischke R, Lysák D, Medová B, Minárik M, Mraček J, Pešek F, Polívka J, Polívka J, Roušalová I, Růžicková Kirchnerová O, Ryška A, Sedláčková E, Slípka J, Slípková D, Slouka D, Stripská D, Syková B, **Šašková B**, Špidlen V, Trhlíková Š, Vaník P, Vodička J, Votruba J, Zemanová M, Zemanová P. *Pneumoonkologie v kazuistikách - úspěchy a kontroverze v hrudní onkologii.* 2018. ISBN 978-80-7345-588-0.
15. Švajdler M, Mezencev R, **Šašková B**, Ondič O, Mukenšnábl P, Michal M. Triple marker composed of p16, CD56, and TTF1 shows higher sensitivity than INSM1 for diagnosis of pulmonary small cell carcinoma: proposal for a rational immunohistochemical algorithm for diagnosis of small cell carcinoma in small biopsy and cytology specimens. *Hum Pathol.* 2019;85:58-64.

6.4 Prezentace na vědeckých konferencích

25th European Congress of Pathology, 31.8.-4.9. 2013, Lisbon, Portugal

Poster: **Kokoskova B.**, Kvicova E., Grossmann P., Michal M., Daum O. One more morphological pattern of gastrointestinal neuroectodermal tumor.

26th European Congress of Pathology, 30.8.-3.9. 2014, London, UK

Poster: **Kokoskova B.**, Daum O., Sedivcova M., Dubova M., Michal M. Undifferentiated carcinoma vs. GIST: morphological patterns useful in the differential diagnosis.

XXXI International Congress of the International Academy of Pathology and the 28th Congress of the European Society of Pathology, 25.9.-29.9. 2016, Cologne, Germany

Poster: Dubova M., Sedivcova M., **Saskova B.**, Michal M., Daum O. Non-syndromic intestinal lipomas are probably not associated with mutations of PDGFRA.

XXXI International Congress of the International Academy of Pathology and the 28th Congress of the European Society of Pathology, 25.9.-29.9. 2016, Cologne, Germany.

Poster: Dubova M., **Saskova B.**, Michal M., Daum O. Utility of immunohistochemical detection of phosphorylated S6 in the diagnosis of squamous cell carcinoma of the esophagus in endoscopic biopsies: a preliminary study.

4th Pannonia Congress of Pathology, 12.5.-14.5. 2016, Osijek, Croatia

Poster: Daum O., Dubova M., **Saskova B.**, Salajka P. GIST morphologically and immunohistochemically mimicking extraabdominal fibromatosis.

106th Annual Meeting of the United States & Canadian Academy of Pathology, 4.-10.3.2017 Henry B. Gonzalez Convention Center, San Antonio, TX, USA

Poster: Isikci OT, He H, Grossmann P, Alaghehbandan R, Ulamec M, Petersson F, Perez Montiel D, Michalova K, Pivovarcikova K, Ondic O, **Saskova B.**, Rotterova P, Hora M, Michal M, Hes O. Low-Grade Spindle Cell Proliferation in Clear Cell Renal Cell Carcinoma Is Unlikely an Initial Step in Sarcomatoid Differentiation 17

29th European Congress of Pathology, 2.-6.9.2017, RAI Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands

Poster: Pivovarcikova K, Sperga M, **Saskova B.**, Grossmann P, Hes O. Xp11 Translocation Renal Cell Carcinoma with *NONO* Fusion Partner: Analysis of 4 Cases.

Poster: **Saskova B**, Pivovarcikova K, Hes O. Morphologic Variability in t(6;11) Translocation Renal Cell Carcinoma: Analysis of 9 Cases.

107th Annual Meeting of the United States & Canadian Academy of Pathology, 17.-23.3.2018 Vancouver Convention Centre, Vancouver, BC, Canada

Poster: Pivovarcikova K, Martinek P, Alaghebandan R, Perez Montiel MD, Alvarado-Cabrero I, Rogala J, Kuroda N, Rychly B, Gasparov S, Michalova K, **Saskova B**, Michal M, Hes O. Primary Renal Well-differentiated Neuroendocrine Tumor (Carcinoid): Next-Generation Sequencing Study of 12 Cases

Poster: Pivovarcikova K, Martinek P, Trpkov K, Alaghebandan R, Magi-Galluzzi C, Condom Mundo E, Comperat EM, Suster S, Michalova K, **Saskova B**, Michal M, Hes o. Fumarate-Hydratase Deficient Renal Cell Carcinoma Does not Demonstrate a Distinct Chromosomal Numerical Aberration Pattern

Poster: Pires-Luís A, Martinek P, Filipovic J, Alaghebandan R, Comperat EM, Perez Montiel MD, Bulimbasic S, Henrique RM, Vanecek T, Pivovarcikova K, Michalova K, **Saskova B**, Michal M, Hes O. Primary Adenocarcinoma of the Urinary Bladder: Next-Generation Sequencing 18 (NGS) of Non-urachal Enteric-type Adenocarcinomas, Urachal Adenocarcinomas, Mucinous Adenocarcinomas, and Colonic Metaplasias/Adenomas

30th European Congress of Pathology, 8. – 12.9. 2018, Bilbao, Spain

Oral free paper sessions: Pivovarcikova K, Trpkov K, Magi-Galluzzi C, Pané Foix M, Ulamec M, **Saskova B**, Hes O. FH deficient renal cell carcinoma and FH deficient-like renal cell carcinoma: Morphologic comparative study of 23 genetically tested cases

Poster: **Saskova B**, Pivovarcikova K, Vanecek T. New fusion gene *PURA-ALK* in patient with non-small cell lung cancer: Case report.

Seminář imunohistochemie a genetiky 2018, 23.-24.11.2018, přednáškový sál – Bioptická laboratoř s.r.o., Plzeň, Czech Republic

Přednáška: Imunohistochemie a genetiky v diagnostické patologii – nádory plic a pleury

Seminář imunohistochemie a genetiky 2018, 26. - 27. 4. 2019, přednáškový sál – Bioptická laboratoř s.r.o., Plzeň, Czech Republic

Přednáška: Imunohistochemie a genetiky v diagnostické patologii – nádory plic a pleury

109th Annual Meeting of the United States & Canadian Academy of Pathology, 29.2.-5.3.2020 Los Angeles Convention Center, Los Angeles, CA, USA

Platform (oral presentation): Pivovarcikova K, Alaghebandan R, Grossmann P, **Vankova B**, Rotterova P, Michalova K, Rogala J, Michal M, Hes O. Oncocytic Papillary Renal Cell Carcinoma: Morphologic and Immunohistochemical Analysis of Three Distinct Genetic Subgroups.

Poster: Pivovarcikova K., Trpkov K., Alaghebandan R., Rogala J.D., Michalova K., Rotterova P., **Vankova B.**, Foix M.P., Michal M., Hes O. Mixed Epithelial and Stromal Tumor Family - Refining the Diagnostic Criteria by Morphologic and Immunohistochemical Study of 36 Cases