

Г.А. Раскин¹, Г.А. Янус^{2,3}, А.В. Корнилов^{2,3}, Р.В. Орлова⁴, С.В. Петров⁵, А.Э. Протасова⁴,
К.М. Пожарисский¹, Е.Н. Имянитов^{2,3}

Иммуногистохимическое исследование MSH2, PMS2, MLH1, MSH6 в сопоставлении с анализом микросателлитной нестабильности в аденокарциноме толстой кишки

¹Российский научный центр радиологии и хирургических технологий, Санкт-Петербург,

²ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург,

³Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет,

⁴Санкт-Петербургский государственный университет,

⁵Казанский государственный медицинский университет

Аденокарцинома толстой кишки, по данным литературы, в 10-20% случаев связана с микросателлитной нестабильностью, которая может наблюдаться как в спорадических раках, так и в наследственном неполипозном раке толстой кишки. При собственном анализе 196 случаев аденокарцином толстой кишки пациентов микросателлитная нестабильность (MSI-H) была выявлена только у 1,5% пациентов. Последующий прицельный выбор больных с подозрением на наследственный синдром Линча позволил отобрать еще 17 пациентов с микросателлитной нестабильностью. У них был выполнен анализ генов системы репарации неспаренных нуклеотидов ДНК. Исследование показало, что иммуногистохимическое окрашивание MSH2, MSH6, MLH1, PMS2 позволяет эффективно проводить предварительный скрининг синдрома Линча, однако неспособно разделить случаи спорадического и наследственного MSI-H рака толстой кишки.

Ключевые слова: MSH2, MSH6, MLH1, PMS2, микросателлитная нестабильность

Наследственный неполипозный рак толстой кишки (синдром Линча) впервые был описан A.S. Warthin и соавт. [29] как первично-множественный рак толстой кишки (РТК), эндометрия и желудка с тенденцией к проявлению у ближайших родственников. Причиной синдрома Линча является наследственная мутация одного из генов, отвечающих за репарацию неспаренных нуклеотидов ДНК: MLH1 (mutL, гомолог 1), MSH2 (mutS, гомолог 2), MSH6 (mutS, гомолог 6), PMS2 (post-meiotic recombination 2) [13,19,26]. Опухоли подобных пациентов характеризуются нестабильностью коротких нуклеотидных повторов — микросателлитов [8]. Большинство микросателлитных последовательностей генома располагаются в некодирующих областях генома, и их мутация не приводит к каким-либо последствиям. Однако в ряде генов микросател-

литы находятся в экзонах и их мутация может привести к злокачественной трансформации. Это трансформирующий фактор роста бета тип 2 [16], инсулино-подобный фактор роста, тип 2 [24], регуляторы клеточного цикла [28] и апоптоза [22]. Мутации в генах системы репарации неспаренных нуклеотидов ДНК наследуются по аутосомно-доминантному типу, таким образом, важной задачей является выявление таких пациентов с целью предупреждения развития синхронных раков, а кроме того более тщательное наблюдение в отношении здоровых носителей мутаций, у которых еще синдром Линча не проявился клинически.

Материал и методика

В исследование были включены две группы пациентов. 1-ая — 212 случаев аденокарциномы толстой кишки (РТК), которые находились на лечении в НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова (С.-Петербург) в 2005-2006 гг. Данная группа больных исследовалась на микросателлитную нестабильность с целью выявления её частоты при РТК. Вторая группа пациентов из 17 человек выбрана в результате анализа 1500 историй болезни пациентов с аденокарциномой толстой кишки, возраст которых не превышал 60 лет, а семейный анамнез онкологических заболеваний включал Линч-ассоциированные новообразования — опухоли эндометрия, желудка, почки, яичника и кожи [26]. Парафиновые блоки для иммуногистохимического исследования оказались доступными у 10 больных.

Выделение ДНК осуществлялось по методике, описанной в более ранних работах [27]. Последовательности праймеров для выявления микросателлитной нестабильности были получены из публикаций [1,6,15,18,25]. Опухоль считалась MSI-негативной, когда все 3 маркера из основной панели (BAT26, BAT25 и BAT40) не выявляли изменений. Для подтверждения статуса MSI-H использовались 3 дополнительных праймера (CAT25, NR22 и NR27).

Выполнение иммуногистохимического исследования проводилось по стандартному протоколу: срезы с парафиновых блоков наносились на поли-L-лизинные стекла с последующей инкубацией их в термостате при температуре 35-37°C с целью плотного их прикрепления. Затем проводилась депарафинизация материала в ксилоле, отмывка в 96% и 70% этиловых спиртах, дистиллированной воде с последующей демаскировкой антигенов при температуре 96 °C в буфере Antigen Retrieval Solution (DAKO) pH9,0.

Последовательно выполнялись ингибирование эндогенной пероксидазы 3% перекисью водорода, инкубация первых антител к MSH2, MSH6, PMS2, MLH1, выявление связывания антиген-антитело при помощи системы визуализации Dako EnVision и диаминбензидином в качестве хромогена. Докрашивание ядер проводили гематоксилином Майера.

Результаты

При исследовании первой группы пациентов, состоящей из 196 лиц с РТК, микросателлитная нестабильность была выявлена лишь у 3 больных (1,5%). В 12 опухолях наблюдалось изменение длины фрагмента по одному из маркеров основной панели (1: BAT25; 11: BAT40), однако, использование дополнительной панели маркеров (CAT25, NR22, NR27) не подтвердило статуса MSI-H. По данным литературы, MSI-H встречается в 10-15% sporadических РТК [4, 5, 12]. Так при проспективном исследовании 257 случаев колоректального рака в клинике Mayo Clinic с использованием иммуногистохимии к 4 основным маркерам (MSH2, MSH6, MLH1, PMS2) и ПЦР с 6 динуклеотидными маркерами, 20% случаев показали микросателлитную нестабильность [14]. В основном в данных случаях MSI-H была связана с потерей экспрессии MLH1 вследствие гиперметилирования. В дополнение в 2% случаев были выявлены мутации MLH1 и 1% — MSH2. Однако в литературе имеются данные о различии встречаемости MSI-H в РТК различных этнических групп [10].

Помимо этого, в исследование были включены пациенты с клиническими признаками синдрома Линча. Для выявления таких больных было просмотрено 1500 историй болезни пациентов с аденокарциномой толстой кишки. В результате этого были отобраны 17 пациентов, у родственников которых были выявлены опухоли, наиболее часто встречаемые при синдроме Линча (табл. 1).

Таблица 1.
Исследование MSI, генов MMR (ИГХ и ПЦР) у пациентов с клиническими признаками синдрома Линча

	Всего	ИГХ не- гатив MLH1/ PMS2	ИГХ не- гатив MSH2/ MSH6	Экспрес- сия всех генов MMR
MSI-H	12 (71%)	3 (60%)	3 (100%)	1 (50%)
MSI-L	3 (18%)	2 (40%)	0	1 (50%)
Нет MSI	2 (11%)	0	0	0
Мутация гена MMR	10 (63%)	4 (80%)	2 (66%)	0
Гены MMR дикого типа	6 (37%)	1 (20%)	1 (33%)	2 (100%)
Всего	17 (100%)	5 (50%)	3 (30%)	2 (20%)

Как видно из табл. 1 в двух случаях с сохранной экспрессией MSH2,6, MLH1, PMS2 гены MMR были дикого типа (рис. 1а). В боль-

шинстве случаев выпадение экспрессии (рис. 1б) сопровождалось мутацией соответствующих генов, однако в 2-х случаях MMR гены также были дикого типа.

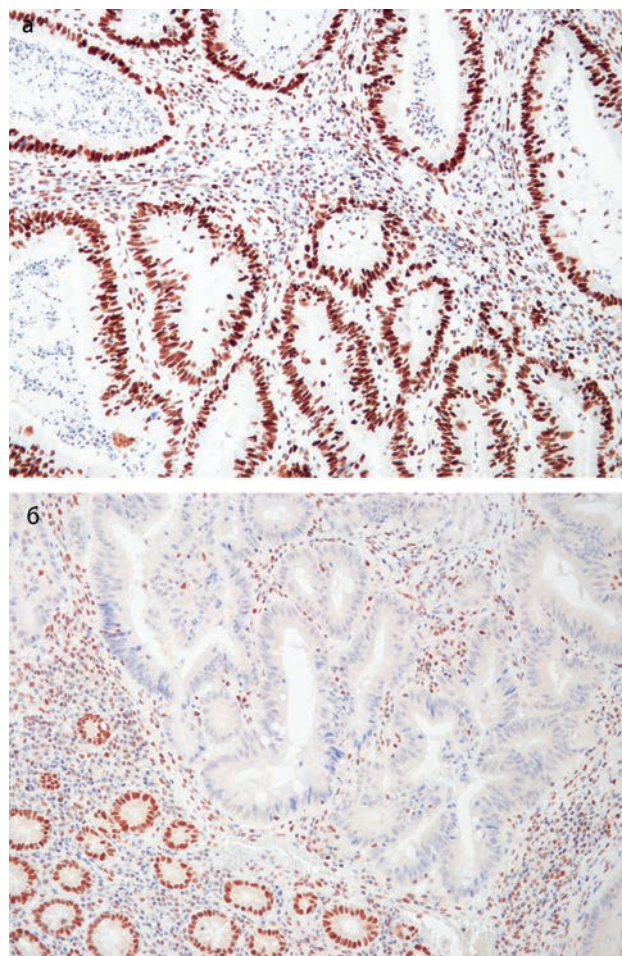


Рис. 1. Иммуногистохимическое исследование MSH6, MLH1 в аденокарциноме толстой кишки. а) Интенсивная ядерная реакция на MSH6 в клетках аденокарциномы, б) Выпадение экспрессии MLH1 в аденокарциноме (верхняя часть фотографии) в сравнении с сохранной ядерной реакцией в нормальной слизистой оболочке (нижняя часть снимка), X 200.

По данным N.M. Lindor и соавт. [14] при проведении аналогичного исследования с использованием иммуногистохимии и ПЦР для исследования MSI и MMR потеря экспрессии MSH2 и MLH1 в 100% случаев сопровождается микросателлитной нестабильностью высокой степени. В наших же исследованиях была выявлена аденокарцинома толстой кишки с негативной иммуногистохимической реакцией на PMS2 и MLH1, в которой микросателлитная нестабильность была низкой. С другой стороны автор допускает возможность сохранения экспрессии генов MSH2, PMS2, MLH1, MSH6 при микросателлитной нестабильности высокой степени (у нас также имеется одно наблюдение с данным противоречием). Правда, при детальном его исследовании видна фокальная потеря экспрессии MSH2 и MSH6 генов (рис. 2).

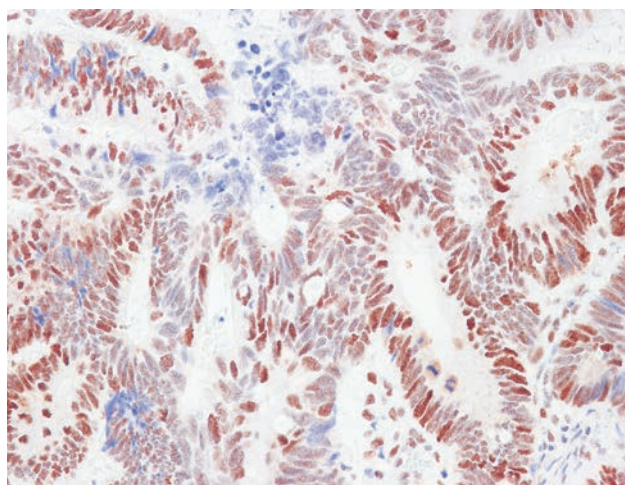


Рис. 2. Иммуногистохимическое исследование MSH2. Потеря экспрессии в части опухолевых клеток (ядра, окрашенные синим цветом), X 400

В 2002–2003 годах было доложено, что мутация V600E в BRAF гене связана с микросателлитной нестабильностью в опухоли [2, 14, 17]. Мутация BRAF (V600E) часто выявляется в спорадических колоректальных раках с гиперметилированным MLH1, но не бывает при наследуемом неполипозном колоректальном раке (синдроме Линча) [21]. BRAF (V600E) мутация не выявлялась в 4/4 MSI-H клеточных линиях с мутацией MLH1 и в 20/20 MSI-H аденокарцином толстой кишки с синдромом Линча [3]. Исходя из этих данных, а также результатов других исследований [4, 5, 11], авторы делают вывод об эффективности использования мутации BRAF(V600E) для разделения случаев аденокарциномы толстой кишки с MSI на спорадические и наследуемые (синдром Линча).

В наших 17-и случаях с выявленной микросателлитной нестабильностью мутация BRAF (V600E) не выявлялась. Из них в 6-и случаях гены MMR были дикого типа с сохранной экспрессией MSH2, MSH6, MLH1, PMS2 в 2-х наблюдениях (табл. 1, в 2-х случаях материал для ИГХ был недоступен).

Использование иммуногистохимии для исследования системы репарации неспаренных нуклеотидов имеет свои особенности и ограничения. В основном мутация MMR генов сопровождается деградацией соответствующего белка и отрицательной иммуногистохимической реакцией. Иммуногистохимия однако не способна дифференцировать между белком с миссенс-мутацией и диким типом белка. Около 30% случаев мутаций в MLH1 носят характер миссенс, которые приводят к потере его функции, но сохраняют антигенные свойства [20]. Однако MMR протеины функционируют в виде гетеродимеров [9]. MSH2 димеризуется с MSH6, образуя функциональный комплекс MutSa38, а MLH1 диме-

ризуется с PMS2, формируя MutLa [7]. MLH1 облигатный партнер PMS2, соответственно нарушение структуры MLH1 приводит к разрушению димера и потере экспрессии второго белка. Однако мутации PMS2 и MSH6 не обязательно приводят к деградации их партнеров, потому что MLH1 и MSH2 могут альтернативно связываться с MSH3, MLH3, и PMS1. Тем не менее, иммуногистохимическое исследование PMS2 позволяет выявлять миссенс мутации MLH1 даже в условиях его антигенной сохранности [23].

Таким образом, исследование микросателлитной нестабильности и экспрессии генов системы репарации неспаренных нуклеотидов (MSH2, MSH6, MLH1, PMS2) при аденокарциноме толстой кишки позволяет выявлять неполипозный наследуемый рак толстой кишки (синдром Линча), а следовательно, способствует ранней диагностике и увеличению выживаемости пациентов и их родственников. Иммуногистохимическое исследование MSH2, MSH6, MLH1, PMS2 позволяет проводить скрининг синдрома Линча с высокой чувствительностью, превышающей 95%, однако неспособно разделить случаи спорадического рака с микросателлитной нестабильностью и наследуемого неполипозного рака толстой кишки. Кроме того, позитивная реакция при иммуногистохимическом исследовании не позволяет полностью исключить микросателлитную нестабильность в спорадических случаях.

Работа поддержана грантом РФФИ 12-04-0035.

ЛИТЕРАТУРА

1. Buhard O., Suraweera N., Lectard A. et al. Quasimonomorphic mononucleotide repeats for high level microsatellite instability analysis // Dis Markers. – 2004. – Vol. 20. – P. 251–257.
2. Davies H, Bignell GR, Cox C et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer // Nature. – 2002. – Vol. 417. – P. 949–954.
3. Deng G., Bell I., Crawley S. et al. BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer // Clin Cancer Res. – 2004. — Vol. 10. – P. 191–195.
4. 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. – Vol. 41. – P. 664–668.
5. Domingo E., Niessen R.C., Oliveira C. et al. BRAF-V600E is not involved in the colorectal tumorigenesis of HNPCC in patients with functional MLH1 and MSH2 genes // Oncogene. – 2005. – Vol. 24. – P. 3995–3998.
6. Findeisen P., Kloor M., Merx S. et al. T25 repeat in the 3' untranslated region of the CASP2 gene: a sensitive and specific marker for microsatellite instability in colorectal cancer // Cancer Res. – 2005. – Vol. 65. – P. 8072–8078.

7. Harfe B.D., Minesinger B.K., Jinks-Robertson S. Discrete in vivo roles for the MutL homologs Mlh2p and Mlh3p in the removal of frameshift intermediates in budding yeast // *Curr Biol.* – 2000. – Vol. 10. – P. 145–148.
8. Haydon A.M., Jass J.R. Emerging pathways in colorectal-cancer development // *Lancet Oncol.* – 2002. – Vol. 3. – P. 83–88.
9. Kadyrov F.A., Dzantiev L., Constantin N., Modrich P. Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair // *Cell.* – 2006. – Vol. 126. – P. 297–308.
10. Kamat N., Khidhir M.A., Alashari M.M., Rannug U. Microsatellite instability and loss of heterozygosity detected in middle-aged patients with sporadic colon cancer: A retrospective study // *Oncol Lett.* – 2013. – Vol. 6. – P. 1413–1420.
11. Kambara T., Simms L.A., Whitehall V.L. et al. BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum // *Gut.* – 2004. – Vol. 53. – P. 1137–1144.
12. Kheirleisid E.A., Miller N., Chang K.H. et al. Mismatch repair protein expression in colorectal cancer // *J Gastrointest Oncol.* – 2013. – Vol. 4. – P. 397–408.
13. Kinzler K.W., Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer // *Cell.* – 1996. – Vol. 87. – P. 159–170.
14. Lindor N.M., Burgart L.J., Leontovich O. et al. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors // *J Clin Oncol.* – 2002. – Vol. 20. – P. 1043–1048.
15. Liu B., Parsons R., Papadopoulos N. et al. Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients // *Nat Med.* – 1996. – Vol. 2. – P. 169–174.
16. Markowitz S., Wang J., Myeroff L. et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability // *Science.* – 1995. – Vol. 268. – P. 1336–1338.
17. Oliveira C., Pinto M., Duval A. et al. BRAF mutations characterize colon but not gastric cancer with mismatch repair deficiency // *Oncogene.* – 2003. – Vol. 22. – P. 9192–9196.
18. Parsons R., Myeroff L.L., Liu B. et al. Microsatellite instability and mutations of the Transforming Growth Factor Type II Receptor gene in colorectal cancer // *Cancer Res.* – 1995. – Vol. 55. – P. 5548–5550.
19. Peltomaki P., Vasen H.F. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study: The international Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology* // *Gastroenterology.* – 1997. – Vol. 113. – P. 1146–1158.
20. Peltomaki P., Vasen H. Mutations associated with HNPCC predisposition—update of ICG-HNPCC/INSIGHT mutation database // *Dis Markers.* – 2004. – Vol. 20. – P. 269–276.
21. Rajagopalan H., Bardelli A., Lengauer C. et al. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status // *Nature.* – 2002. – Vol. 418. – P. 934.
22. Rampino N., Yamamoto H., Ionov Y. et al. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype // *Science.* – 1997. – Vol. 275. – P. 967–969.
23. Shia J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome // *J MolDiagn.* – 2008. – Vol. 10. – P. 293–300.
24. Souza R.F., Appel R., Yin J. et al. Microsatellite instability in the insulin-like growth factor II receptor gene in gastrointestinal tumours // *Nat Genet.* – 1996. – Vol. 14. – P. 255–257.
25. Suraweera N., Duval A., Reperant M. et al. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR // *Gastroenterology.* – 2002. – Vol. 123. – P. 1804–1811.
26. Umar A., Boland C.R., Terdiman J.P. et al. Revised Bethesda Guidelines for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability // *J Natl Cancer Inst.* – 2004. – Vol. 96. – P. 261–268.
27. Yanus G.A., Belyaeva A.V., Ivantsov A.O. et al. Pattern of clinically relevant mutations in consecutive series of Russian colorectal cancer patients // *Med Oncol.* – 2013. – Vol. 30. – P. 686.
28. Yoshitaka T., Matsubara N., Ikeda M. et al. Mutations of E2F-4 trinucleotide repeats in colorectal cancer with microsatellite instability // *BiochemBiophys Res Commun.* – 1996. – Vol. 227. – P. 553–557.
29. Warthin A.S. Heredity with reference to carcinoma // *Arch Intern Med.* – 1913. – Vol. 12. – P. 546–55.

*G.A. Raskin¹, G.A. Yanus^{2,3}, A.V. Kornilov^{2,3},
R.V. Orlova⁴, S.V. Petrov⁵, A.E. Protasova⁴,
K.M. Pozharisski¹, E.N. Imyaninov^{2,3}*

Immunohistochemical examination of MSH2, PMS2, MLH1, MSH6 compared with the analysis of microsatellite instability in colon adenocarcinoma

¹Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies, St. Petersburg

²N.N. Petrov Research Institute of Oncology, St. Petersburg

³State Pediatric Medical University, St. Petersburg

⁴State University, St. Petersburg

⁵State Medical University, Kazan

Adenocarcinoma of the colon in 10-20% is associated with microsatellite instability, which can occur both in sporadic cancers and in hereditary nonpolyposis colon cancer. Our analysis of 195 cases of adenocarcinoma of the colon showed that microsatellite instability (MSI-H) was found only in 1.5% of patients. Subsequent choice of patients with suspected hereditary Lynch syndrome led to the identification of additional 17 patients with microsatellite instability. They passed an analysis of genes of repair system of unpaired nucleotides of DNA. The study showed that immunohistochemical staining of MSH2, MSH6, MLH1, PMS2 could effectively conduct a preliminary screening of the Lynch syndrome but was unable to divide cases of sporadic and hereditary MSI-H colon cancer.

Key words: MSH2, MSH6, MLH1, PMS2, microsatellite instability

Поступила в редакцию 06.03.2014 г.