

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

²Bioptická 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 senzitivitě 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:	Bioptická 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: <ol style="list-style-type: none"> germinální mutace MMR genů <i>MLH1</i>, <i>PMS2</i>, <i>MSH2</i> nebo <i>MSH6</i> inaktivace <i>MSH2</i> při delecí konce 3' genu <i>EPCAM</i> 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: <ol style="list-style-type: none"> Somatická bílelická mutace MMR genu Metodické příčiny nemožnosti detekovat germinální mutaci MMR genu Nesprávná interpretace výsledků imunohistochemického vyšetření MMR proteinů Germinální alterace jiných genů (např. <i>MUTYH</i>)
Syndrom konstitučního deficitu MMR genů (CMMRD)	Přítomnost bílelické 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-Torrehova 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).

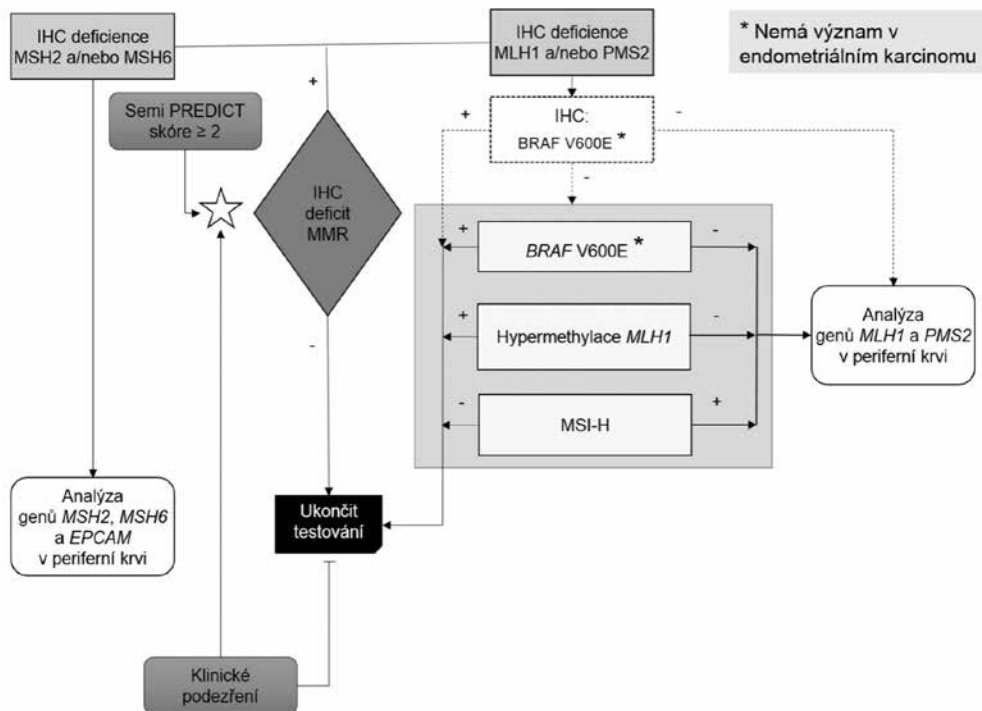
Původně byl LS, tehdy dosud nazývaný hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC) diagnostikován na podkladě klinických Amsterdamských kritérií (18), respektive pro zohlednění případné extrakolonické prezentace Amsterdamských kritérií II (19). K záchytu pacientů suspektních z molekulárně geneticky 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 guideline zachyceno. Z toho důvodu se v posledních letech obrací pozornost k možnostem morfologické diagnostiky LS spočívající ve vyšetření nádorů statisticky významně asociovaných s LS, zejména CRC, metodami moderní

patologie, které byly detailně popsány v přehledových člancích 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 Biopstické 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 resektů se zjevným nádorem byl automaticky jeden řez pro imunohistochemické vyšetření MMR proteinů zablokovan 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 klinik 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 šipky). 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. Pacienty 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 suspekčního 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 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 Semi PREDICT 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 μ m. Pro imunohistochemické vyšetření byly řezy odparafinovány a rehydratovány v jednom kroku na přístroji BenchMark ULTRA (Ventana). Následně byla skla pokryta Tris-EDTA pufrům (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 μ l 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 μ l 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 μ m silné řezy do mikrozku-mavky a po odparafinování byla extrahována DNA dle manuálu výrobce (QIAsymphony 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 repetitací (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 a RNA 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 morfolgie 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 stále 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 funkci 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 antigenita 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, prevalenci nebo četnost LS v rámci CRC mají totiž jasně definována 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 analýzu 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 nejkritičtějích 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 duplikaci c.2252_2253dupAA v exonu 19 genu *MLH1* (dosud hodnocena jako nejasná), jednobázovou nonsense substituci c.856G>T v exonu 4 genu *MSH6* (dosud hodnocena pouze jako pravděpodobně patogenní), jednobázovou nonsense substituci c.1691C>A v exonu 4 genu *MSH6* (dosud hodnocena pouze jako pravděpodobně patogenní) a frameshift duplikaci 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 těch 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 zachytu 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 světlobuněčných 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 Houwelingen 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. **Shegal 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. **Mvundura 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.