Özgün Araştırma / *Original Article*

DOI: 10.4274/haseki.galenos.2020.6258
Med Bull Haseki 2021;59:17-24

Kalıtsal Kolorektal Kanser Tanılı Hastaların APC, MLH1 ve MSH2 Mutasyonlarının Araştırılması: Tek Merkez Deneyimi

Investigation of APC, MLH1 and MSH2 Mutations in Patients with Hereditary Colorectal Carcinoma: A Single Center Experience

Mehmet Buğrahan Düz

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Genetik Tanı Merkezi, İstanbul, Türkiye

Öz

Amaç: Kolorektal kanser (KRK) dünyada en sık görülen üçüncü kanserdir. Tüm KRK'lerin yaklaşık %5-6'sı germline mutasyonlar sonucunda ortaya çıkmaktadır. Ailesel KRK'lerin daha etkin yönetilebilmesi için gen panelleri ile mutasyon taraması yapılmaktadır. Bu çalışmada herediter polipozis koli tanılı hastalarda APC ve herediter non-polipozis koli tanılı hastaların MLH1/MSH2 genlerinde mutasyon taraması yapılmış, tespit edilen mutasyon dağılımları ve özellikleri incelenmiştir.

Yöntemler: Çalışmaya Türkiye genelinden 152 polipozis koli, 123 non-polipozis koli hastası dahil edilmiş olup, APC, MLH1 ve MSH2 gen analizleri değerlendirilmiştir.

Bulgular: Ailesel polipozis koli tanılı hastaların 39'unda (%25) *APC* geninde, herediter non-polipozis koli tanılı hastaların 24'ünde (%18,8) MLH1 ya da MSH2 genin de mutasyon tespit edilmiştir. Tespit edilen mutasyonlardan APC genindeki 5, MLH1 geninde 2, MSH2 genindeki 2 varyant patojenik/olası patojenik değerlendirilmiş olup literatürde daha önce bildirilmemiş varyantlardır.

Sonuç: Bu çalışma ülkemizde ailesel KRK'lerin moleküler genetik etiyolojilerinin ortaya konulduğu en kapsamlı çalışmadır. Ailesel KRK etiyolojisinin ortaya konulması ile mutasyon tespit edilen ailelerde kapsamlı genetik danışma alabilmesine ve hasta/asemptomatik bireylerin ailesel kanser yönetim rehberlerine uygun takip edilebilmesine imkân sağlayacaktır.

Anahtar Sözcükler: Herediter kolon kanseri, *APC, MLH1, MSH2,* mutasyon

Abstract

Aim: Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer in the world. About 5-6% of all CRCs have a hereditary inheritance related with germline mutations. Mutation screening is carried out with gene panels for CRCs to manage family against to CRCs more effectively. In this study, mutation screening was performed by sequencing of APC in patients with hereditary polyposis coli and of MLH1/MSH2 in patients with hereditary non-polyposis coli and the detected mutation distributions and their properties were investigated.

Methods: One hundred-fifty two patients with hereditary polyposis coli and 123 patients with hereditary non-polyposis coli were included to the study from Turkey and APC, MLH1 and MSH2 analysis were performed.

Results: Thirty nine (25%) patients with hereditary polyposis coli and 24 (18.8%) patients with hereditary non-polyposis coli had mutation in APC and MLH/MSH2, respectively. Among the evaluated as pathogenic/likely pathogenic variants, 5 of them in APC, 2 of them in MLH1 and 2 of them in MSH2 have not been previously reported in the literature.

Conclusion: This study is the most comprehensive study demonstrated that molecular genetic etiology of familial CRC in Turkey. With the explanation of familial CRC etiology, it will enable comprehensive genetic counseling and follow-up of patients/asymptomatic individuals in accordance with familial cancer management guidelines.

Keywords: Hereditary colorectal cancer, APC, MLH, MSH2, mutation

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Mehmet Buğrahan Düz, Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Genetik, İstanbul, Türkiye
E-posta: bugrahanduz@hotmail.com ORCID: orcid.org/0000-0003-2140-5456
Geliş Tarihi/Received: 11.06.2020 **Kabul Tarihi/Accepted:** 19.11.2020

©Telif Hakkı 2021 İstanbul Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Haseki Tıp Bülteni, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.
©Copyright 2021 by The Medical Bulletin of İstanbul Haseki Training and Research Hospital The Medical Bulletin of Haseki published by Galenos Yayınevi.

Giriş

Kolorektal kanser (KRK) dünyada en sık görülen üçüncü kanserdir. Her sene ABD'de 100.000'den fazla olgu KRK tanısı almaktadır. Tedavi seçeneklerinin çoğalması, yeni tedavi yaklaşımları ve tarama programlarının rutine girmesiyle KRK ölüm oranları %54'lere kadar gerilemiştir (1). KRK'lerin yaklaşık %5-6'sı germline mutasyonlar sonucunda ortaya çıkar ve bu grup herediter KRK sendromları olarak adlandırılır (2). Bu grubun içerisinde antigen-presenting (APC) ile ilişkili ailesel adenomatöz polipozis koli (FAP, MIM: 175100), zayıflamış FAP, lynch sendromu (LS, MIM: 120435), *MUTYH* ile ilişkili adenomatöz polipozis koli sendromları (MAP, MIM: 608456) bulunmaktadır.

LS; mikrosatellit instabilite KRK'ye eşlik eden gastrik kanser, kadınlarda endometrium kanseri ile karakterize otozomal dominant bir kalıtsal kanser sendromudur (3). FAP ise kolon ve rektumda binlerce adenömatöz polip ile karakterize otozomal dominant geçişli bir hastalıktır. FAP'de KRK dışında ekstrakolonik klinik bulgularda görülebilir. Özellikle gastrik veya duodenal polipler, desmoid tümörler, tiroid ve beyin tümörleri, retina pigment epitelinin hipertrofisi, fazla diş, osteoma ve epidermoid kistler görülmektedir (4). LS, tüm KRK olguların yaklaşık %2-3'ünü oluştururken FAP ise yaklaşık %1'ini oluşturmaktadır (2). LS'de monoallelik germline mutasyonlar mismatch (yanlış eşleşme) tamir (*MMR*) genlerinde (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* ve *EPCAM/TACSTD1*) görülmektedir. FAP kliniğine ise germline monoallelik APC mutasyonları neden olmaktadır (5). Günümüzde National Comprehensive Cancer Network'un (NCCN) yayımladığı kriterlere göre hastaların klinik, aile öyküsü ve histopatolojik bulguları değerlendirilerek yukarıda ifade edilen genler ve bunların yanında bu hastalığa neden olabileceği düşünülen aday genlere yönelik analizler yapılmaktadır (6).

Kalıtsal KRK sendromların tanı, tedavi ve takibinde birçok branşın yer aldığı multidisipliner yaklaşımlar gerekmektedir. Bu sendromların tespit edilebilmesi, hastalık ortaya çıkan bireylerde uygun tedavinin ve takiplerin planlanmasına, hastalık ortaya çıkmadıysa kanseri önlemek için uygun takip ve asemptomatik dönemde müdahale etme fırsatı sunar. Bunun neticesinde mutasyona sahip ailelerde mortalite ve morbiditenin oranları düşürülür (2,3).

Bugüne kadar Türkiye'de herediter polipozis koli ve non-polipozis koli tanılı hastaların tanılarının moleküler genetik yöntemlerle doğrulandığı geniş çalışmalar yapılmamış olup belirtilen genlerdeki mutasyon sıklığı, dağılım bölgeleri ve özellikleri hakkında literatürde yeterli veri bulunmamaktadır. Bu çalışmada ülkemizde herediter polipozis koli ile takip edilen hastalarda *APC* geninde mutasyon sıklığı ve mutasyon çeşitlerinin dağılımı; herediter non-polipozis koli ile takip edilen hastalarda ise *MLH1* ve *MSH2* genlerinde mutasyon sıklığı ve mutasyon çeşitlerinin dağılımını saptamak ve bunların klinik takipleri üzerindeki etkilerini tartışmak ve bu bilgilerin literatüre kazandırılması amaçlanmıştır.

Yöntemler

2018-2020 yılları arasında Sağlık Bilimleri Üniversitesi Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu, Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi'ne *APC*, *MLH1* ve *MSH2* genlerinin dizi analizlerini yaptırmak amacıyla yönlendirilen hastaların dosyaları incelenmiş olup, sonuçları retrospektif olarak düzenlenmiştir. Bu çalışma Sağlık Bilimleri Üniversitesi Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (tarih: 10.06.2020) (dosya numarası: 2020-75). Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi'ne numunesi yönlendirilen hastaların tamamından onam formu alınmıştır. *APC* geni analizi 152 herediter polipozis tanılı hastada, *MLH1/MSH2* gen analizleri ise 127 herediter non-polipozis koli tanılı hastada yapılmıştır. Tüm hastalardan üretici firmanın önerileri göz önüne alınarak DNA izolasyonu yapılmıştır (QIAamp DNA blood Maxi kit, Qiagen, Hilden, Almanya). *APC*, *MLH1* ve *MSH2* genlerinin amplifikasyonu amacıyla Primer 3 programında tasarlanan primerler (talep olması halinde dizileri paylaşılacaktır), PrimerBlast programının önerilerine göre amplifikasyon gerçekleştirildi. Sekans reaksiyonlarında BigDye 3.1 (Life Technologies, CA, ABD) kullanıldı, ardından ABI-3730xl kapiller dizi cihazında (Life Technologies, CA, ABD) yürütüldü. Sonuçlar SeqScape V3 programında analiz edildi (Applied Biosystems, Foster City, CA).

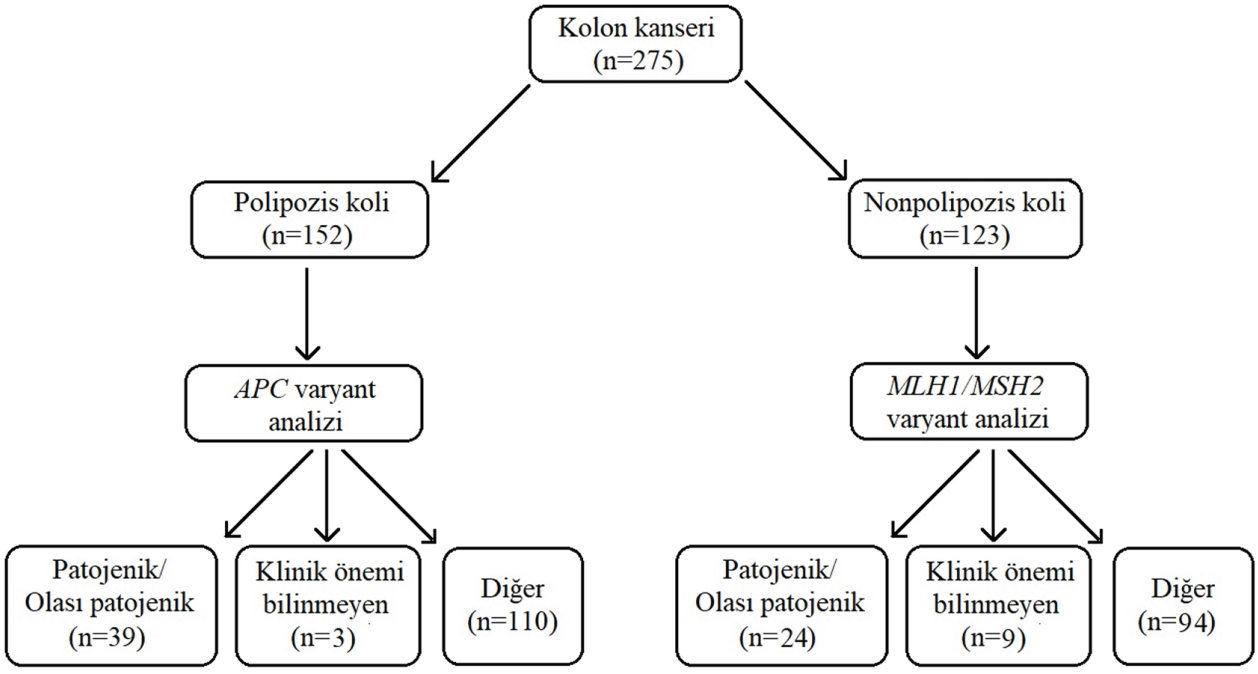
Elde edilen varyantlar ACMG 2015 kriterleri ışığında benign, muhtemel benign, klinik önemi bilinmeyen, muhtemel patojenik ve patojenik olmak üzere 5 başlıkta sınıflandırıldı (7). Herhangi varyant bulunamayan veya benign ve/veya muhtemel benign olarak sınıflandırılan varyantlar bu çalışma içerisinde tartışılmadı ve diğer varyantlar olarak adlandırılan havuzunun içinde değerlendirilerek istatistikler yapıldı.

Bulgular

Çalışmaya dahil edilen toplam 275 hastadan, 112'si kadın 163'ü erkekti. Bu hastalardan 152'sine *APC* analizi, kalan 127 hastaya ise *MLH1* ve *MSH2* analizi yapıldı. 38 herediter polipozis tanılı hastalarda klinik tabloyu açıklayabilecek *APC* mutasyonu saptanırken, 24 herediter non-polipozis koli tanılı hastada klinik tabloyu açıklayabilecek *MLH1/MSH2* mutasyonu saptandı. Çalışmanın tasarımı ve bulguların özeti Şekil 1'de gösterilmiştir.

Herediter polipozis koli hastaları ve *APC* analizi

APC ile ilişkili polipozis koli sendromu tanısı alan hastaların 12'si erkek, 26'sı kadındı. Erkek hastaların yaş ortalaması 38,33±6,24 iken kadınlarda bu ortalama



Şekil 1. Çalışmanın tasarımı, dahil edilen hastalar ve sonuçlarının özeti

34,26±2,95 idi. Herediter polipozis koli tanılı 152 hastadan yapılan *APC* analizinde hastaların 41'inde hastalıkla ilişkisi olabilecek varyant bulundu. Bunların 38'inde (%25,6) patojenik/olası patojenik, 3'ünde (%0,01) klinik önemi belirsiz varyant saptandı. Kalan 110 (%72,3) hastada ise herhangi bir varyant saptanmadı ya da saptanan varyant benign olarak değerlendirildi. Herediter polipozis koli tanılı hastaların demografik özellikleri ve APC mutasyonlarının analizi sonuçları Tablo 1'de gösterildi.

Herediter non-polipozis koli hastaları ve *MLH1/MSH2* analizi

Herediter non-polipozis koli tanısı alan erkek hastaların yaş ortalaması 38,33±6,24 iken kadınlarda bu ortalama 34,26±2,95 idi. Herediter non-polipozis koli tanılı 127 hastadan yapılan *MLH1* ve *MSH2* analizinde hastaların 24'ünde (%18,8) patojenik/olası patojenik, 9'unda (%0,07) klinik önemi belirsiz varyant saptandı. Kalan 94 (%74) hastada ise herhangi bir varyant saptanmadı ya da saptanan varyant benign olarak değerlendirildi. Herediter non-polipozis koli tanısı alan hastaların 17'si erkek, 16'sı kadındı. *MLH1* geninde 10 patojenik/olası patojenik, 3 klinik önemi bilinmeyen varyant tespit edilirken, *MSH2* geninde 13 patojenik/olası patojenik, 5 klinik önemi bilinmeyen varyant tespit edildi. Herediter non-polipozis koli tanılı hastaların demografik özellikleri ve *MLH1* gen analizi sonuçları Tablo 2'de, *MSH2* gen analizi sonuçları Tablo 3'te gösterildi.

Tartışma

A. Herediter polipozis koli ve *APC* analizi

Tümör süpresör gen olarak işlev gören *APC* genindeki monoallelik mutasyonlar hastalığın ortaya çıkmasına neden olur. Mutasyon taşıyıcısı bir bireyde sıklıkla ergenlik veya erken erişkin dönemde polipler ortaya çıkmaya başlar. Cerrahi yapılmadığı durumlarda kolonda binler hatta on binlerce polipten oluşan ciddi bir yük meydana gelir ki bu durumda %90 ve üzerinde KRK tablosu oluşur (3). FAP hastalarının en sık ölüm sebebi KRK olup bunu duodenal ve ampuller adenokarsinomalar takip etmektedir (8). Bu nedenle FAP tanılı bir hastaya total kolektomi yapılmış olsa bile hayat boyunca gastrointestinal sistem endoskopisi ile takip edilmelidir (9).

APC geni 5q22.2'de yer alan, primer transkribi NM_000038.5 olan 15 ekzondan ve 2.843 amino asitten oluşmaktadır. Gen ürünü *APC* proteini ise 311,8 kd'lik bir büyüklüğe sahiptir. Son ekzonu en büyük ekzon olup kodlanan toplam bölgenin 3/4'ünden fazlasını oluşturmaktadır (10). Şu ana kadar *APC*'de 1200'den fazla hastalıkla ilişkilendirilmiş patojenik/olası patojenik varyant bildirilmiştir. Patojenik varyantlar gen boyunca dağılmış olarak bulunurken, bunlar ağırlıklı olarak genin 5 ucunda bulunur (11).

APC analizinin yapıldığı geniş kohortlara bakıldığı zaman mutasyonların çoğunlukla çerçeve kaymasına neden olduğu görülmüştür. Nagase ve ark. (12) 176 mutasyonun

tanımladığı çalışmada olguların 106'sında çerçeve kayması bildirilirken 68'in de nokta mutasyonu tespit edilmiştir. Nokta mutasyonlara ise kendi içinde bakıldığında 57'sinin non-sense (anlamsız) mutasyon, 6'sında missense (yanlış anlamlı) mutasyon ve kalan 5'inde ise splicing (kırpılma) mutasyonları tanımlanmıştır. Çerçeve kayması ve non-sense mutasyonları ACMG 2015 kriterlerine göre PVS1 (pathogenic very strong) patojenik olarak sınıflandırılması bu mutasyonların patojenik veya olası patojenik olarak değerlendirilmesi açısından önemlidir. Bu çalışmada

Tablo 1. Herediter polipozis koli tanılı hastaların demografik özellikleri ve APC mutasyonlarının analizi

Olgu	Yaş	Cinsiyet	Nükleotid değişimi	Protein etkisi	Yerleşim	ACMG	Referans
APC1	68	E	c.450_453delAGAA	p.Glu151Lysfs*18	Ekzon 5	P	(26)
APC2	64	K	c.531+1 G>A	-	İntron 5	MP	(27)
APC3	44	E	c.531+1 G>A	-	İntron 5	MP	(27)
APC4	58	K	c.667 delC	p.Gln223Lysfs*70	Ekzon 7	MP	Yeni mutasyon
APC5	45	K	c.847C>T	p.Arg283*	Ekzon 9	P	(28)
APC6	82	E	c.994 C>T	p.Arg332*	Ekzon 9	P	(29)
APC7	16	K	c.1269 G>A	p.Trp423*	Ekzon 10	P	(30)
APC8	27	K	c.1312+1 G>T	-	İntron 10	MP	(31)
APC9	41	E	c.1312+3 A>G	-	İntron 10	P	(32)
APC10	42	K	c.1660 C>T	p.Arg554*	Ekzon 14	P	(33)
APC11	41	K	c.1690C>T	p.Arg564*	Ekzon 14	P	(32)
APC12	31	K	c.1690C>T	p.Arg564*	Ekzon 14	P	(32)
APC13	66	K	c.1743+1 G>T	-	İntron 14	MP	(34)
APC14	58	E	c.1743+1 G>T	-	İntron 14	LP	(34)
APC15	25	K	c.1748 C>A	p.Ser583*	Ekzon 15	LP	(35)
APC16	30	K	c.1748 C>A	p.Ser583*	Ekzon 15	LP	(35)
APC17	31	K	c.1748 C>A	p.Ser583*	Ekzon 16	LP	(35)
APC18	17	E	c.2222A>G	p.Asn741Ser	Ekzon 16	KÖB	(36)
APC19	50	K	c.2249insC	p.Ser751Ilefs*5	Ekzon 16	MP	Yeni mutasyon
APC20	28	E	c.2249insC	p.Ser751Ilefs*5	Ekzon 16	MP	Yeni mutasyon
APC21	24	K	c.2896dupA	p.Ser966Lysfs*	Ekzon 16	MP	Yeni mutasyon
APC22	24	K	c.2896dupA	p.Ser966Lysfs*	Ekzon 16	MP	Yeni mutasyon
APC23	52	E	c.3220A>G	p.Thr1074Ala	Ekzon 16	KÖB	(32)
APC24	40	E	c.3324_3325insAA	p.Gly1109Lysfs*18	Ekzon 16	MP	Yeni mutasyon
APC25	29	K	c.3340 C>T	p.Arg1114*	Ekzon 16	P	(37)
APC26	22	K	c.3927_3931del AAAGA	p.Glu1309Aspfs*4	Ekzon 16	P	(38)
APC27	51	E	c.3927_3931del AAAGA	p.Glu1309Aspfs*4	Ekzon 16	P	(38)
APC28	29	E	c.3927_3931del AAAGA	p.Glu1309Aspfs*4	Ekzon 16	P	(38)
APC29	6	E	c.3927_3931del AAAGA	p.Glu1309Aspfs*4	Ekzon 16	P	(38)
APC30	30	K	c.3927_3931del AAAGA	p.Glu1309Aspfs*4	Ekzon 16	P	(38)
APC31	14	K	c.3927_3931del AAAGA	p.Glu1309Aspfs*4	Ekzon 16	P	(38)
APC32	20	E	c.3927_3931del AAAGA	p.Glu1309Aspfs*4	Ekzon 16	P	(38)
APC33	16	K	c.3927_3931del AAAGA	p.Glu1309Aspfs*4	Ekzon 16	P	(38)
APC34	33	K	c.3927_3931del AAAGA	p.Glu1309Aspfs*4	Ekzon 16	P	(38)
APC35	30	K	c.3927_3931del AAAGA	p.Glu1309Aspfs*4	Ekzon 16	P	(38)
APC36	15	K	c.4391_4394 delAGAG	p.Glu1464Valfs*8	Ekzon 16	P	(39)
APC37	19	E	c.4391_4394 delAGAG	p.Glu1464Valfs*8	Ekzon 16	P	(39)
APC38	20	E	c.4688 delT	p.Leu1563Hisfs*2	Ekzon 16	MP	Yeni mutasyon
APC39	24	K	c.4688 delT	p.Leu1563Hisfs*2	Ekzon 16	MP	Yeni mutasyon
APC40	62	K	c.4688delT	p.Leu1563Hisfs*2	Ekzon 16	MP	Yeni mutasyon
APC41	42	K	c.7399C>A	p.Pro2467Thr	Ekzon 16	KÖB	(40)

Tablo 2. Herediter non-polipozis koli tanılı hastaların demografik özellikleri ve *MLH1* (NM_000249) mutasyonlarının analizi

Olgu	Yaş	Cinsiyet	Nükleotid değişimi	Protein etkisi	Yerleşim	ACMG	Referans
ML1	39	K	c.289 T>G	p.Tyr97Asp	Ekzon 3	KÖB	(18)
ML2	26	E	c.289 T>G	p.Tyr97Asp	Ekzon 3	KÖB	(18)
ML3	32	K	c.293 G>C	p.Gly98Ala	Ekzon 3	KÖB	(17)
ML4	45	K	c.589 C>T	p.Gln197*	Ekzon 8	P	Yeni mutasyon
ML5	41	K	c.676 C>T	p.Arg226*	Ekzon 8	P	(41)
ML6	44	K	c.677G>A	p.Arg226Gln	Ekzon 8	P	(23)
ML7	55	E	c.677G>A	p.Arg226Gln	Ekzon 8	P	(23)
ML8	63	E	c.728A>G	p.Asn243Ser	Ekzon 9	KÖB	(19)
ML9	23	K	c.790+1G>A	-	İntron 9	P	(32)
ML10	54	K	c.1649 T>C	p.Leu550Pro	Ekzon 14	P	(42)
ML11	28	K	c.1690_1693 delCTCA	p.Leu564Phefs*26	Ekzon 15	P	(23)
ML12	45	E	c.1752_1765 del14	p.Ala586Argfs*2	Ekzon 16	MP	Yeni mutasyon
ML13	32	E	c.1852_1854 delAAG	p.Lys618del	Ekzon 16	P	(43)
ML14	63	E	c.1852_1854delAAG	p.Lys618del	Ekzon 16	P	(43)
ML15	51	E	c.1852_1854delAAG	p.Lys618del	Ekzon 16	P	(43)

Tablo 3. Herediter non-polipozis koli tanılı hastaların demografik özellikleri ve *MSH2* (NM_000251) mutasyonlarının analizi

Olgu	Yaş	Cinsiyet	Nükleotid değişimi	Protein etkisi	Yerleşim	ACMG	Referans
MS1	26	K	c.244A>T	p.Lys82*	Ekzon 2	P	(44)
MS2	45	E	c.433A>G	p.Ile145Val	Ekzon 3	KÖB	(24)
MS3	46	E	c.435T>G	p.Ile145Met	Ekzon 3	KÖB	(23)
MS4	41	E	c.435T>G	p.Ile145Met	Ekzon 3	KÖB	(23)
MS5	44	E	c.801_802delTT	p.Ser268Ilefs*15	Ekzon 5	MP	Yeni mutasyon
MS6	16	E	c.970 C>G	p.Gln324Glu	Ekzon 6	KÖB	Yeni mutasyon
MS7	40	E	c.1165 C>T	p.Arg389X	Ekzon 7	P	(45)
MS8	53	K	c.1565_1568delACTT	p.Tyr522Phefs*3	Ekzon 10	P	(46)
MS9	43	E	c.1565_1568delACTT	p.Tyr522Phefs*3	Ekzon 10	P	(46)
MS10	24	K	c.1609delA	p.Asn538Thrfs*5	Ekzon 10	MP	Yeni mutasyon
MS11	23	E	c.1787A>G	p.Asn596Ser	Ekzon 12	KÖB	(25)
MS12	16	E	c.2074 G>A	p.Gly692Arg	Ekzon 13	P	(47)
MS13	28	E	c.2074 G>A	p.Gly692Arg	Ekzon 13	P	(47)
MS14	26	K	c.2074 G>A	p.Gly692Arg	Ekzon 13	P	(47)
MS15	37	K	c.2131 C>T	p.Arg711X	Ekzon 13	P	(48)
MS16	50	K	c.2362dupA	p.Thr788Asnfs*11	Ekzon 14	P	(49)
MS17	10	K	c.2634+5G>C	-	İntron 15	P	(50)
MS18	39	K	c.2634+5 G>C	-	İntron 15	P	(50)

saptadığımız 38 varyanttan 22'si çerçeve kaymasına neden olurken, 13'ü nokta mutasyonu kalan 6'sı ise splicing mutasyonuydu. Nokta mutasyonlarının içerisinde 10 mutasyon ile non-sense en sık görülendi. Elde ettiğimiz veriler literatür bilgi ise ile birebir örtüşmekteydi. *APC* geninde en sık görülen patojenik varyant ise 16. ekzonda bulunan c.3927_3931delAAAGA, p.Glu1309AspfsTer4 çalışmamızda mutasyon tespit edilen 38 hastadan 10'unda (%26,3) mevcut olup en sık tespit edilmiş mutasyondur (3).

Çalışmada en az görülen mutasyon çeşidi missense mutasyonlar olup bunların tamamı ACMG 2015 kriterlerine göre klinik önemi bilinmeyen olarak sınıflandırılmıştır. Elde edilecek daha geniş aile hikayesi, varsa KRK pozitif olgularda APC analizi, tespit edilen mutasyonlara ilişkin fonksiyonel çalışmalar yapılması ve varyantların benign ya da patojenite açısından değerlendirilmesi daha sağlıklı sınıflama yapılmasına katkı sağlayacaktır. Bu mutasyonlardan *in silico* algoritmalara göre c.3220A>G polimorfizm olarak değerlendirilirken c.2222A>G ve

c.7399C>A hastalık yapıcı olarak değerlendirilmiştir (13).

Bu çalışmada saptanan 5 varyant daha önce literatürde bildirilmemişti. ACMG 2015 kriterleri ışığında bu varyantlar değerlendirildiğinde tümü muhtemel patojenik olarak sınıflandırıldı. Beş varyanttan 2'si ≤2 baz insersiyonu, 2'si tek baz delesyonu kalan bir mutasyon ise tek baz duplikasyonu olup bu mutasyonların tamamı çerçeve kaymasına neden olmaktadır. *In silico* analizlerde hasar verici ve tolerans düzeyinin düşük olması, mutasyonların genin yüksek korunmuş bölgesinde yer alması benzer şekilde fenotipe yol açmasını destekleyici faktörlerdendir (13).

Herediter polipozis koli ön tanılı 110 hastada *APC* geninde kliniği açıklayabilecek herhangi bir varyant tespit edilememiştir. *APC* geninin dizi analizinde hastaların %90'ına tanı konulurken, büyük delesyon/duplikasyon analizleri neticesinde yaklaşık %8-12 oranında tanı konulmaktadır. Bu çalışmada dizileme yapılmış olup *APC* genini ilgilendiren büyük delesyon/duplikasyonların tespit edilebilmesi mümkün değildir. Bu nedenle klinik şüphesi kuvvetli olan olgulara MLPA ya da yüksek çözünürlüklü array ile analiz yapılmalıdır (3). Bunun dışında literatürde herediter polipozis ile takip edilen hastaların %20-30'unda *APC* geninde mutasyon tespit edilememektedir. Bu bir kısmında *MUTYH* geninde mutasyonlar bildirilmiş olup *MUTYH* ilişkili polipozis koli (MAP) tanısı almışlardır (14).

B. Herediter Non-polipozis Koli ve *MLH1/MSH2* analizi

LS, herediter KRK sendromları içerisinde en sık görülen alt tip olup tüm KRK olguların yaklaşık %2-3'ünü oluşturmaktadır (14). Bu sendrom otozomal dominant kalıtım modeline sahiptir. KRK yanı sıra endometrium kanseri, mide kanseri, over kanserleri de ortaya çıkabilmektedir. Germline mutasyonlar mismatch tamir (MMR) genlerinde *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* ve *EPCAM/TACSTD1'de* görülmektedir (3).

MLH1

3p22.2 bölgesinde yer alan *MLH1* geni yaklaşık 57 kb büyüklüğünde olup kodlanan 19 ekzon toplam 756 amino asitten oluşmaktadır (15). Bugüne kadar 700'den fazla germline mutasyon bildirilmiştir. Bunlardan yaklaşık %5-10'u delesyon/duplikasyonlardan oluşmaktadır (16). Ayrıca dokularda *MLH1*'in metilasyonu ile somatik heterozigosite kaybı da olguların yaklaşık %0,6'sında gösterilmiştir. Mlh1 proteini *PMS2* gen ürünü ile birlikte dimerize olarak DNA polimeraz, tek zincir DNA bağlanma proteini (RPA), hücre proliferasyonu nükleer antijen (PCNA), helikaz gibi MMR'de görevli proteinlerin bağlanmasını koordine eder (3). Bu çalışmada herediter non-polipozis koli ile takip edilen hastalardan 15'inde *MLH1* geninde varyant bulunmuştur. Bu varyantlardan 11'i patojenik/olası patojenik, kalan 4'ü ise klinik önemi bilinmeyen olarak sınıflandırılmıştır. Tespit edilen 2 patojenik varyant ise daha önce literatürde bildirilmemiştir.

MLH1 geninde 4 hastada toplam 3 farklı missense klinik önemi belirsiz varyant saptanmıştır. Dominguez-Valentin ve ark. (17) c.289 T>G değişimini ve Tunca ve ark. (18) c.293 G>C değişimini *in silico* analiz programlarına dayanarak hastalık yapıcı etkileri olduğunu öne sürmüştür. Ancak ACMG 2015 kriterlerine göre hastalık yapıcı etkileri lehine yeterli kanıt bulunamamıştır. *MLH1* geninde saptanan c.728A>G değişimi ise daha önce ClinVar veri tabanında bildirilmiş olup hasta veya değişiminin etkileri hakkında yeterli veri paylaşılmadığından klinik önemi belirsiz varyant olarak sınıflandırıldı (19).

c.589 C>T ve c.1752_1765 del14 varyantları literatürde daha önce bildirilmemiş olup ACMG 2015 kriterlerine göre muhtemel patojenik olarak sınıflandırılmıştır. İlk mutasyon neticesinde erken durdurma kodonu, ikinci mutasyonda çerçeve kayması buna bağlı olarak iki kodon sonrasında erken durdurma kodonu meydana gelmesi nedeniyle güdük protein ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bunun yanı sıra bu bölge evrimsel süreçte yüksek derecede korunmuş bir bölge olması nedeniyle bu noktalarda olabilecek mutasyonların tolere edilme ihtimali oldukça düşüktür (13).

MSH2

MSH2 geni 2p21p16 yer alır, kodlanan 16 ekzonu olup gen ürünü toplam 934 aminoasitten meydana gelir (20). Bu gende literatürde bildirilmiş 170'den fazla mutasyon bulunur ve bunların yaklaşık %20'si ekzonik/multiekzonik delesyonlardır (11). *MSH2* gen ürünü MSH2 MMR proteinlerinden MSH6 veya MSH3 ile heterodimer oluşturarak yanlış eşleşmeleri tespit eder. Bu çalışmada herediter non-polipozis koli ile takip edilen hastalardan 18'inde *MSH2* geninde varyant bulunmuştur (3). Bu varyantlardan 14'ü patojenik/olası patojenik, kalan 4'ü ise klinik önemi bilinmeyen olarak sınıflandırılmıştır. Tespit edilen 2 olası patojenik ve klinik önemi bilinmeyen bir varyant ise daha önce literatürde bildirilmemiştir.

c.433A>G ve c.435T>G değişimleri sonucunda 145. pozisyondaki izolösin amino asidinin sırasıyla valin ve metiyoninde değişmesine neden olmaktadır. Literatürde bu varyantın *MLH1* geni üzerinde fonksiyon bozucu bir etkisi gösterilememekle beraber herediter non-polipozis koli hastada gösterilmiştir (21-24). c.1787A>G değişikliği LS ön tanılı hastalarda saptanmış ancak benzer klinik bulguları olan diğer aile bireylerinde bu varyant tespit edilememiş, bu nedenle aile içi segregasyon uyumsuzluğu sebebiyle klinik önemi belirsiz olarak sınıflanmıştır (25).

MSH2 geninde tespit edilmiş olan 3 varyant literatürde daha önce bildirilmemiştir. ACMG 2015 sınıflamasına göre bunlardan ikisi (c.801_802delTT ve c.1609delA) muhtemel

patojenik olarak değerlendirilirken diğer varyant (c.970 C>G) ise klinik önemi bilinmeyen olarak sınıflandırılmıştır. Muhtemel patojenik olan her iki varyantta çerçeve kaymasına sebep olarak güdük protein oluşmasıyla sonuçlandığı düşünülmektedir (13).

Herediter non-polipozis koli, herediter KRK tanılı hastalarda *MLH1* ve *MSH2* genlerinin hem dizileme hem de delesyon/duplikasyon analizi ile hastaların yaklaşık %90'ında mutasyon tespit edilebiliyor. Kalan kısım için ise dağılım MSH6'da %7-10, PMS2'de <%5, EPCAM'da <%1 şeklindedir. Bu görülen oranların sadece dizileme teknolojileri ile tespiti mümkün değildir. Bu genlere yönelik büyük delesyon/duplikasyon analizleri önerilmektedir. MLH1'de %5-10, MSH2'de >%20, MSH & <%5, EPCAM %100 oranında bu analizler neticesinde mutasyon saptanabilmektedir (3). Çalışmamızda 94 hastada herhangi bir mutasyon saptanamadığında yukarıda belirtilen bilgiler ışığında kalan genlerin hem dizileme hem de delesyon/duplikasyon açısından analiz edilmesi gerekmektedir.

Sonuç

Gelişen dizileme teknolojileri, tanımlanan yeni genlerin yanı sıra kanser genetiğindeki yeni çalışmalar ve yaklaşımlar tanının moleküler olarak doğrulanması gerekliliğini ortaya koymuştur. Herediter KRK tanısının doğrulanması ve mutasyonun tespit edilebilmesi multidisipliner hasta yönetiminin daha başarılı olması, tıbbi genetik uzmanlarının daha doğru ve kapsayıcı genetik danışma vermesine imkan sağlayacağı ve bu durumunda mortalite ve morbiditenin düşürülmesine katkı sunacağı düşünülmektedir.

Finansal Destek: Yazarlar tarafından finansal destek almadıkları bildirilmiştir.

Kaynaklar

1. https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2020/cancer-facts-and-figures-2020.pdf.
2. Stoffel EM, Mangu PB, Gruber SB, et al. American Society of Clinical Oncology; European Society of Clinical Oncology. Hereditary colorectal cancer syndromes: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline endorsement of the familial risk-colorectal cancer: European Society for Medical Oncology Clinical Practice Guidelines. J Clin Oncol 2015;33:209-17.
3. Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al. Editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2021.
4. Half E, Bercovich D, Rozen P. Familial adenomatous polyposis. Orphanet J Rare Dis 2009;4:22.
5. Kalady MF, Heald B. Diagnostic Approach to Hereditary Colorectal Cancer Syndromes. Clin Colon Rectal Surg 2015;28:205-14.
6. 2014 Ng. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp
7. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med 2015;17:405-24.
8. Galle TS, Juel K, Bülow S. Causes of death in familial adenomatous polyposis. Scand J Gastroenterol 1999;34:808-12.
9. Aihara H, Kumar N, Thompson CC. Diagnosis, surveillance, and treatment strategies for familial adenomatous polyposis: rationale and update. Eur J Gastroenterol Hepatol 2014;26:255-62.
10. https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core; g= ENSG00000134982 ;r=5:112707498-112846239 [Internet]. 2020.
11. http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php
12. Nagase H, Nakamura Y. Mutations of the APC (adenomatous polyposis coli) gene. Hum Mutat 1993;2:425-34.
13. http://www.mutationtaster.org/. Mutation Taster Database 2020
14. Sulová M, Zídková K, Kleibl Z, et al. Mutation analysis of the MYH gene in unrelated Czech APC mutation-negative polyposis patients. Eur J Cancer 2007;43:1617-21.
15. https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core; g=ENSG00000076242; r=3:36993350-37050846 [Internet]. 2020.
16. HGMD [Internet]. 2020.
17. Dominguez-Valentin M, Nilbert M, Wernhoff P,et al. Mutation spectrum in South American Lynch syndrome families. Hered Cancer Clin Pract 2013;11:18.
18. Tunca B, Pedroni M, Cecener G ,? et al. Analysis of mismatch repair gene mutations in Turkish HNPCC patients. Fam Cancer 2010;9:365-76.
19. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/631100/
20. https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000095002;r=2:47403067-47663146 [Internet]. 2020.
21. Piñol V, Castells A, Andreu M, et al. Gastrointestinal Oncology Group of the Spanish Gastroenterological Association. Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. JAMA 2005;293:1986-94.
22. Gammie AE, Erdeniz N, Beaver J, Devlin B, Nanji A, Rose MD. Functional characterization of pathogenic human MSH2 missense mutations in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 2007;177:707-21.

23. Parc Y, Boisson C, Thomas G, Olschwang S. Cancer risk in 348 French MSH2 or MLH1 gene carriers. J Med Genet 2003;40:208-13.

24. Kansikas M, Kariola R, Nyström M. Verification of the three-step model in assessing the pathogenicity of mismatch repair gene variants. Hum Mutat 2011;32:107-15.

25. Genuardi M, Carrara S, Anti M, Ponz de Leòn M, Viel A. Assessment of pathogenicity criteria for constitutional missense mutations of the hereditary nonpolyposis colorectal cancer genes MLH1 and MSH2. Eur J Hum Genet 1999;7:778-82.

26. Friedl W, Caspari R, Sengteller M, et al. Can APC mutation analysis contribute to therapeutic decisions in familial adenomatous polyposis? Experience from 680 FAP families. Gut 2001;48:515-21.

27. Moisio AL, Järvinen H, Peltomäki P. Genetic and clinical characterisation of familial adenomatous polyposis: a population based study. Gut 2002;50:845-50.

28. de Oliveira JC, Viana DV, Zanardo C, et al. Genotype-phenotype correlation in 99 familial adenomatous polyposis patients: A prospective prevention protocol. Cancer Med 2019;8:2114-22.

29. Soravia C, Berk T, Madlensky L, et al. Genotype-phenotype correlations in attenuated adenomatous polyposis coli. Am J Hum Genet 1998;62:1290-301.

30. Gebert JF, Dupon C, Kadmon M, et al. Combined molecular and clinical approaches for the identification of families with familial adenomatous polyposis coli. Ann Surg 1999;229:350-61.

31. Zhang S, Qin H, Lv W, et al. Novel and reported APC germline mutations in Chinese patients with familial adenomatous polyposis. Gene 2016;577:187-92.

32. Nykamp K, Anderson M, Powers M, et al. Sherloc: a comprehensive refinement of the ACMG-AMP variant classification criteria. Genet Med 2017;19:1105-17.

33. Fodde R, van der Luijt R, Wijnen J, et al. Eight novel inactivating germ line mutations at the APC gene identified by denaturing gradient gel electrophoresis. Genomics 1992;13:1162-8.

34. Schwarzová L, Štekrová J, Florianová M, et al. Novel mutations of the APC gene and genetic consequences of splicing mutations in the Czech FAP families. Fam Cancer 2013;12:35-42.

35. Friedl W, Aretz S. Familial adenomatous polyposis: experience from a study of 1164 unrelated german polyposis patients. Hered Cancer Clin Pract 2005;3:95-114.

36. Chubb D, Broderick P, Frampton M, et al. Genetic diagnosis of high-penetrance susceptibility for colorectal cancer (CRC) is achievable for a high proportion of familial CRC by exome sequencing. J Clin Oncol 2015;33:426-32.

37. Nagase H, Miyoshi Y, Horii A, et al. Screening for germ-line mutations in familial adenomatous polyposis patients: 61 new patients and a summary of 150 unrelated patients. Hum Mutat 1992;1:467-73.

38. Kashfi SM, Behboudi Farahbakhsh F, Golmohammadi M, Nazemalhosseini Mojarad E, Azimzadeh P, Asadzadeh Aghdaie H. Frameshift Mutations (Deletion at Codon 1309 and Codon 849) in the APC Gene in Iranian FAP Patients: a Case Series and Review of the Literature. Int J Mol Cell Med 2014;3:196-202.

39. 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. J Mol Diagn 2013;15:31-43.

40. Azzopardi D, Dallosso AR, Eliason K, et al. Multiple rare nonsynonymous variants in the adenomatous polyposis coli gene predispose to colorectal adenomas. Cancer Res 2008;68:358-63.

41. Moslein G, Tester DJ, Lindor NM, et al. Microsatellite instability and mutation analysis of hMSH2 and hMLH1 in patients with sporadic, familial and hereditary colorectal cancer. Hum Mol Genet 1996;5:1245-52.

42. Raevaara TE, Korhonen MK, Lohi H, et al. Functional significance and clinical phenotype of nontruncating mismatch repair variants of MLH1. Gastroenterology 2005;129:537-49.

43. Miyaki M, Konishi M, Muraoka M, et al. Germ line mutations of hMSH2 and hMLH1 genes in Japanese families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC): usefulness of DNA analysis for screening and diagnosis of HNPCC patients. J Mol Med (Berl) 1995;73:515-20.

44. Jóri B, Kamps R, Xanthoulea S, et al. Germ-line variants identified by next generation sequencing in a panel of estrogen and cancer associated genes correlate with poor clinical outcome in Lynch syndrome patients. Oncotarget 2015;6:41108-22.

45. Beck NE, Tomlinson IP, Homfray T, Hodgson SV, Harocopos CJ, Bodmer WF. Genetic testing is important in families with a history suggestive of hereditary non-polyposis colorectal cancer even if the Amsterdam criteria are not fulfilled. Br J Surg 1997;84:233-7.

46. Mangold E, Pagenstecher C, Friedl W, et al. Spectrum and frequencies of mutations in MSH2 and MLH1 identified in 1,721 German families suspected of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Int J Cancer 2005;116:692-702.

47. Raskin L, Guo Y, Du L, et al. Targeted sequencing of established and candidate colorectal cancer genes in the Colon Cancer Family Registry Cohort. Oncotarget 2017;8:93450-63.

48. Kim JC, Kim HC, Roh SA, et al. hMLH1 and hMSH2 mutations in families with familial clustering of gastric cancer and hereditary non-polyposis colorectal cancer. Cancer Detect Prev 2001;25:503-10.

49. de Leon MP, Benatti P, Di Gregorio C, et al. Genotype-phenotype correlations in individuals with a founder mutation in the MLH1 gene and hereditary non-polyposis colorectal cancer. Scand J Gastroenterol 2007;42:746-53.

50. Mork ME, Rodriguez A, Bannon SA, et al. Outcomes of disease-specific next-generation sequencing gene panel testing in adolescents and young adults with colorectal cancer. Cancer Genet 2019;235-236:77-83.