



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

제주도 린치 증후군 환자의 새로운
MLH1과 MSH2 생식 계열 변이
(germline mutation) 연구

제주대학교 대학원

의과대학교

최 장 규

2011 년 6 월

濟州島 린치 症候群 患者의 새로운
MLH1과 MSH2 生殖 系列 變異 研
究

指導教授 조 문제

崔 莊 圭

이 論文을 醫學 碩士學位 論文으로 提出함

2010 年 6 月

崔莊圭의 醫學 碩士學位 論文을 認准함

심사위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

濟州大學校 大學院

2011 年 6 月

New germline mutation of MLH1 and MSH2 in Lynch Syndrome in Jeju Island

Chang Gyu Choe
(Supervised by professor Moon Jae Cho)

A thesis submitted in partial fulfillment of the
requirement for the degree of Master of Medicine

2011. 6.

This thesis has been examined and approved.

.....
Thesis director, Moon Jae Cho, Prof. of Medicine
.....

(Name and signature)

.....
Date

Department of Medicine

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

요약

린치 증후군은 대장암을 포함한 여러 가지 암이 조기 발병되는 특징을 가진 임상적 진단명이다. 이 증후군은 MLH1, MSH2, MSH6, PMS1, PMS2 등의 mismatch 수리 유전자(mismatch repair gene)의 이형접합체(heterozygous) 변이가 원인이라 알려져 있다. 우리는 대장암으로 진단되어 수술까지 받은 56명의 환자 중 린치 증후군으로 의심되는 11명의 서로 관련 없는 환자들을 대상으로 MLH1 과 MSH2 유전자를 분석하였다. 그 결과 5명에서 MLH1이나 MSH2 유전자에 변이가 발견되었고, 이 중 2개는 MLH1에서의 알려진 변이였다: 엑손 10의 삭제(deletion)와 점 변이(V384D). 나머지 세 명의 환자에서 새로운 변이가 발견되었다: MLH1에서의 중복(937_942dupGAAGTT); 엑손, 8, 9, 10의 삭제; MLH1에서의 점변이(F296I)과 MSH2에서 다발성 미스센스 변이(D295G, K808E, Q855P, I884T).

Abstract

Hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) is an autosomal dominant syndrome characterized by predisposition to early-onset cancers. HNPCC is caused by heterozygous loss-of-function mutations within the mismatch repair genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1*, and *PMS2*. We genotyped the *MLH1* and *MSH2* genes in patients suffering from Lynch syndrome and in 11 unrelated patients who were diagnosed with colorectal cancer and had subsequently undergone surgery. Five Lynch syndrome patients carried germline mutations in *MLH1* or *MSH2*. Two of these were identified as known mutations in *MLH1*: deletion of exon 10 and a point mutation(V384D). The remaining three patients exhibited novel mutations: a duplication (937_942dupGAAGTT) in *MLH1* deletion of exons 8, 9, and 10; and a point mutation in *MLH1* (F396I) combined with multiple missense mutations in *MSH2* (D295G, K808E, Q855P, and I884T). The findings underline the importance of efficient pre-screening of conspicuous cases.

Part 1. 린치 증후군에 대한 총설



서론

린치 증후군은 암 발생의 소인을 갖는 상염색체 우성의 증후군으로 DNA mismatch repair(MMR) 유전자의 변이로 발생 한다(1,2). 이 증후군은 평균 45세의 이른 나이에 주로 오른쪽에 국한된 대장 직장암이 발병하는 것을 가장 큰 특징으로 하고 특징적인 조직학적 특성을 갖는다. 그리고 자궁 내막, 위, 소장, 난소, 신장, 요도, 뇌, 피부 등 다양한 대장 외 종양의 위험성도 증가된다. MMR 유전자에 변이가 생기면 microsatellite instability(MSI)가 발생하여 암이 발생한다는 것이 가장 핵심적인 병태 생리이다.

세계적으로 모든 대장 직장암은 매년 1,023,152명에서 발병하고(3), 그 중 린치 증후군은 30,700명 정도로 전체의 3% 정도를 차지한다. Hampel et al.의 연구에서 총 1566명의 대장 직장암 환자에서 44명이 린치 증후군 환자였고 이는 대장 직장암 35명 중에 1명 꼴로 린치 증후군이 진단되었다는 것이다(4).

용어 정리

1985년에 Lynch는 Familial Adenomatous Polyposis(FAP)와 비교하여 넓게 퍼진 용종증이 없고 대장직장암의 유전적 소인을 강조하면서 '유전성 비용종성 대장 직장암'(Hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC)이라는 용어를 처음으로 사용하였고 그 후 널리 사용되었다(1,5,6). 1984년에 Boland와 Troncale이 처음으로 '린치 증후군'(Lynch syndrome, LS)이라는 용어를 언급하였고(7) 이들은 동의어로서 혼용되어왔다.

그러나 HNPCC라는 용어에 대해서 문제가 있다고 지적되기 시작하고 린치 증후군이라는 용어를 권장하기 시작하였다(8). 비용종성이란 말이 마치 이 질환에는 용종이 발생하지 않는 듯이 오해 될 여지가 많다. 앞서 언급했듯이 FAP와 같이 다수로 군집하는 용종이 없을 뿐 용종의 발생 빈도는 일반인과 차이가 없다(9). 그리고 린치 증후군에서는 자궁 내막, 위, 소장, 난소 등 대장 외 여러 부위에서의 암 위험성이 증대되는데 HNPCC라는 용어는 이를 반영하지 못한다. 또한 이 용어는 Amsterdam Criteria(AC)를 충족시키는 군과 Mismatch Repair

유전자 결함과 같이 임상병리학적 또는 분자학적인 특징을 가진 군이 중첩됨으로써 혼란을 야기한다.

Lindor et al.이 AC-I을 충족시키는 161개의 가계부를 분석하였을 때 40% 이상이 MMR 결함이 없다고 밝혔다(8). 그리하여 AC를 충족하는 사람들도 두 개의 군으로 나뉘야 한다고 주장하였는데, 하나는 린치가 기술한 증후군의 임상적 특징을 가지고 MMR 결함이 밝혀진 군이고 또 다른 하나는 MMR 결함이 밝혀지지 않은 군이다. 전자의 경우 “린치 증후군”이라는 용어를 사용하고 후자의 경우 “familial colorectal cancer type X”라는 용어로 정의하였다(8).

역사적 배경

1931년 Warthin은 위암 및 자궁암 등을 동반한 대장 직장암 환자가 많이 분포한 가족을 발견하여 'Family G' 로 명명하였다(10)(22). 1966년에 Lynch는 Warthin이 발견한 'Family G'와 암의 구성이 매우 비슷한 2개의 가족을 발견하였고 이를 각각 Family N과 M으로 명명하였다(11). 이러한 사례들과 비슷한 가족들이 그 후 많이 발견되었고 연구자들은 이들의 임상적 특징을 표와 같이 기술하였다(표 1. 참조).

1991년에 HNPCC를 진단하기 위하여 Amsterdam Criteria(AC)로 불리우는 진단 기준에 합의를 도출하였다(12). 그 후 대장 외 종양에 대한 진단을 보완하기 위하여 Amsterdam Criteria II(AC-II)가 제정되었고(13) 이어서 조기 검진을 받아야 하는 대장직장암 환자의 선별을 위하여 Bethesda Guidline이 제정되었다(14).

Peltomäki et al. 이 유전자 범위 검사와 연관 분석으로 2번 단완 염색체에서 린치 증후군을 발병시키는 염색체 부위를 발견하였고(15), 그 후 Lindblom이 3번 단완 염색체에서 두 번째 발병 염색체 부위를 발견하였다(16).

린치 증후군 환자에서 발생하는 종양은 특징적인 분자 변형이 발견되었는데 초기에 "ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences"(17) 또는 "replication error"(18) 등으로 불리다 현재는 microsatellite instability(MSI)로 불린다. MSI는 DNA 복제 오류 수정 기능과 DNA 합성 후 검토 기능에 결함이

생겨서 발생하였고 이를 연구 하여 2번 단완과 3번 단완 염색체에서 린치 증후군을 발병시키는 MSH2와 MLH1라 명명된 유전자를 발견하기에 이른다. 이들 유전자는 DNA mismatch error를 인지하고 복구하는 기능을 가진 단백질에 대한 정보를 가지고 있다(19-22). 그 후 MSH6(23), PMS2(24) 등의 mismatch repair(MMR) 유전자를 더 발견하게 된다.

AC-I (24)

- At least three relatives with histologically verified colorectal cancer:
 1. One is a first-degree relative of the other two;
 2. At least two successive generations affected;
 3. At least one of the relatives with colorectal cancer diagnosed at <50 years of age;
 4. Familial adenomatous polyposis (FAP) has been excluded.

AC-II (25)

- At least three relatives with an hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)-associated cancer [colorectal cancer, endometrial, stomach, ovary, ureter/renal pelvis, brain, small bowel, hepatobiliary tract, and skin (sebaceous tumors)]:
 1. One is a first-degree relative of the other two;
 2. At least two successive generations affected;
 3. At least one of the syndrome-associated cancers should be diagnosed at <50 years of age;
 4. FAP should be excluded in any colorectal cancer cases;
 5. Tumors should be verified whenever possible.

Bethesda Guidelines for testing of colorectal tumors for microsatellite instability (MSI) (145)

1. Colorectal cancer diagnosed in a patient who is <50 years of age.
2. Presence of synchronous or metachronous colorectal, or other syndrome-associated tumors^a regardless of age.
3. Colorectal cancer with microsatellite instability-high (MSI-H)^b histology^c diagnosed in a patient who is <60 years of age^d.
4. Colorectal cancer or syndrome-associated tumor^a diagnosed under age 50 years in at least one first-degree relative^e.
5. Colorectal cancer or syndrome-associated tumor^a diagnosed at any age in two first- or second-degree relatives^e.

^aSyndrome-associated tumors include colorectal, endometrial, stomach, ovarian, pancreas, ureter or renal pelvis, biliary tract, and brain (usually glioblastoma as seen in Turcot syndrome) tumors, sebaceous gland adenomas and keratoacanthomas in Muir-Torre syndrome, and carcinoma of the small bowel.

^bMSI-H = microsatellite instability-high in tumors refers to changes in two or more of the five National Cancer Institute-recommended panels of microsatellite markers.

^cPresence of tumor infiltrating lymphocytes, Crohn disease-like lymphocytic reaction, mucinous/signet-ring differentiation, or medullary growth pattern.

^dThere was no consensus among the Workshop participants on whether to include the age criteria in guideline 3 above; participants voted to keep <60 years of age in the guidelines.

^eCriteria 4 and 5 have been reworded to clarify the Revised Bethesda Guidelines.

표1. Amsterdam Criteria I and II (AC-I and II) and Bethesda Guidelines (From HT Lynch, PM Lynch, SJ Lanspa, CL Snyder, JF Lynch, CR Boland, Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications, Clin Genet. 2009 July; 76(1): 1-18. DOI:10.1111)

미스매치 수리(MISMATCH REPAIR, MMR)

DNA는 담배, 석면, 자외선, 방사능 등의 외부의 화학물질이나 물리적인 요소로 인해 손상받는다. 또한 체내 대사물인 산소 라디칼 등에 의해서도 손상 받기도 한다. 이러한 요인들 외에 DNA 대사과정이나 DNA 복제, 재조합, 수정 등의 처리 과정에서의 오류로 인해 DNA 손상이 야기되기도 하는데 이러한 손상은 체세포나 생식 세포에 변이를 유발하여 세포 형질을 변형시키거나 질환을 유발하기도 한다. 특히 염기가 잘못 짝지어져서 생기는 mismatch가 주요한 오류인데 이러한 오류를 방지하기 위해서 신체에는 여러 가지 기전의 오류 방지 및 수정 역할을 하는 방식들이 존재한다. 이 중 가장 중요하게 여겨지는 것이 DNA mismatch repair(이하 MMR) 라는 과정이다. MMR은 DNA 손상 반응에 중요한 역할을 하여 심하게 손상된 세포 발생을 막고, 변이 형성을 억제하며 더 나아가서는 암의 발생도 억제한다. 반대로 MMR 과정에 문제가 생겼을 때는 각종 질환 및 암이 발생 할 수 있다는 의미이며, 우리의 주요 관심사인 린치 증후군을 포함한 선천성 암 뿐만 아니라 다양한 산발성 암의 주요 기전으로 연구되고 있다(25-27) 이 과정은 처음에 E. coli의 연구를 통해서 많이 알려졌다. 사람의 MMR 과정과 관련되는 단백질은 E. coli와 유사한 기능을 수행하는 경우가 경우가 많다. (표2)

린치 증후군과 관련이 있다고 여겨지는 주요 유전자는 mutL homolog 1(MLH1), mutS homolog 2(MSH2), postmeiotic segregation increased 1(PMS1), mutS homolog 6(MSH6), mutL homolog 3(MLH3) 등이 있다(28,29). 이들은 heterodimer를 이루어 E. coli의 mutS와 mutH와 비슷한 역할을 수행하여 homolog라 명명되었다. 이들 중 MLH1과 MSH2의 germline 변이가 전체 린치 증후군의 각각 50%, 40% 정도로 대부분을 차지했고 나머지 gene의 변이가 10% 정도 차지하였다(30).

MLH1 gene(MIM#120436)은 염색체 3p21의 57.36Kb 중 19번째 exon에 위치한다. 현재까지 린치 신드롬과 관련한 250여개의 gene 변이가 알려져 있으나 MLH1 변이에 의한 것이 가장 많고 중요하게 여겨진다(31). MLH1 변이의 분포와 변이에 따른 임상양상은 지역별로 차이가 있다는 연구가 있는데, 북미나 유럽

에서는 위암이 드물지만 일본과 한국과 같은 아시아 국가와 브라질 등에서는 변이에 따른 위암 발병률이 높은 것으로 보고되었다(32,33). MLH1 변이는 대부분 missense, nonsense, frameshift, splice junction 변이다(33). nonsense 변이는 염기 치환으로 종결코돈이 만들어져 단백질 합성이 완전히 끊기는 것이고 missense 변이는 염기 치환이 되나 합성 과정은 계속 진행되어 다른 아미노산이 합성 되는 것을 의미한다. 대다수의 변이는 nonsense나 frameshift 변이라서 결과적으로 불안정한 단백질을 만들게 된다. Missense 변이 또한 mRNA 나 단백질을 불안정하게 만들고 단백질 간의 상호작용을 방해하기도 한다(34).

MSH2 gene(MIM#120435)은 염색체 2p16의 80.10Kb 중 16번째 exon에 위치한다. MSH2 변이는 MLH1 변이와 더불어 린치 증후군의 대다수를 차지한다.

MLH6 gene(MIM#600678)은 염색체 2p15의 10번째 exon에 위치한다. MLH6는 최근에 소위 '비전형적 린치 증후군'의 흔한 원인으로 알려져 있다. 이 비전형적 린치 증후군은 MLH1이나 MSH2 변이로 인한 전형적 린치 증후군 환자와 임상적인 특징이 다르다고 보고되고 있는데, 즉 침투력은 덜 하고, 대장암보다 여성의 자궁내막암의 발병률이 더 높으며, MSI 양성의 비율이 전형적 린치 증후군보다 낮다고 한다(35-39).

PMS1(MIM#600258)과 PMS2(MIM#600259) gene은 각각 염색체 2q31-33과 7p22의 16Kb와 15번째 exon에 위치하고 이들 gene의 변이는 전체 린치 증후군 환자 중 5% 정도를 차지한다(40). PMS2 gene은 MMR 체계에 중요한 역할을 수행하지만 린치 증후군의 병인으로서는 드물게 보고되어 암 발생 기전으로써는 논란의 여지가 있다(40).

MMR 과정을 시작하기 위해서는 우선 주형 가닥과 복제 가닥을 구분하여야 한다. E. coli에서는 주형의 d(GATC) site에는 adenine methylation이 되어있으나, 복제되는 가닥에는 methylation이 되어 있지 않다. 이런 hemi-methylation 상태가 주형 가닥과 복제 가닥을 구분하게 하고 복제 과정에 생기는 nick(틈새)를 인식하여 MMR 과정을 시작하게 한다(41). 그러나 인간을 포함한 원생 동물에서는 d(GATC) site의 hemi-methylation 과정이 발견되지 않아서 복제 가닥 인식과정이 아직 확실하게 알려지지 않았다. 대신 복제 과정에 자연스럽게 생기는 nick이 복제 가닥으로 인식 된다고 생각되는데 leading strand에서는 3'

termini, lagging strand에서는 3', 5' termini 모두가 nick이 되고 MMR 과정이 nick이 더 많은 lagging strand에서 효율적으로 일어난다는 것은 이를 뒷받침하는 근거가 된다(42).

*E. coli*는 MutS와 MutL이 homo-oligomer의 형태로 존재하여 MutS는 mismatch를 인식하는 기능을 하며 MutL을 mismatch가 발생한 위치까지 유도하는 역할을 하고, MutL은 그 이후 과정을 개시시키는 역할을 한다(42-44). 반면 사람에서는 두 개의 MutS가 heterodimer를 이뤄서 작용하는데 MSH2-MSH6 복합체는 MutS α 라 하고 MSH2-MSH3 복합체는 MutS β 라 한다(44). 현재까지 6가지 MutS homologue가 밝혀졌다(43).

MSH2-MSH6 복합체인 MutS α 는 MSH2의 세포 형태 중 80-90%를 차지하고, 주로 염기-염기의 삽입이나 삭제에 의한 mismatch와 짝지어지지 않은 1-2개의 nucleotide를 인식하나 더 많은 삭제, 삽입을 인식할 수도 있다(45).

MSH2-MSH3 복합체인 MutS β 2-8개의 다수의 nucleotide에 대한 삽입, 삭제를 인식하고 수정하는 역할을 한다. 실험연구에서 린치 증후군과의 연관성을 발견하지는 못하였지만, 다른 종양에서 MSH3의 체세포 변이가 빈번히 발견되고, MSH3의 불활성화는 다른 MMR gene의 변이를 증가시킨다(46,47).



<i>E. coli</i>	Human	Function
(MutS) ₂	hMutS α (MSH2-MSH6) ^a hMutS β (MSH2-MSH3)	DNA mismatch/damage recognition
(MutL) ₂	hMutL α (MLH1-PMS2) ^a hMutL β (MLH1-PMS1) hMutL γ (MLH1-MLH3)	Molecular matchmaker; endonuclease, termination of mismatch-provoked excision
MutH	? ^b	Strand discrimination
UvrD	? ^b	DNA helicase
ExoI, ExoVII, ExoX, RecJ	ExoI	DNA excision; mismatch excision
Pol III holoenzyme	Pol δ PCNA	DNA re-synthesis Initiation of MMR, DNA re-synthesis
SSB	RPA HMGB1 RFC	ssDNA binding/protection; stimulating mismatch excision; termination of DNA excision; promoting DNA resynthesis Mismatch-provoked excision PCNA loading; 3' nick-directed repair; activation of MutL α endonuclease
DNA Ligase	DNA ligase I	Nick ligation

^aMajor components in cells.

^bNot yet identified.

표2. *E. coli*와 그와 유사한 기능을 하는 사람의 MMR gene과 기능(adapted from Mechanisms and functions of DNA mismatch repair, Guo-Min Li, Cell Research (2008) 18:85-98. doi: 10.1038/cr.2007.115; published online 24 December 2007)

MSH는 온전히 짝지어진 DNA보다 mismatch에 10배에서 1500배 까지 높은 binding affinity를 지니며, mismatch된 염기의 종류에 따라 affinity가 다른데, 가장 흔한 G-T mismatch와 하나의 삽입, 삭제에 가장 높은 affinity를 가지며 가장 드문 C-C mismatch에 가장 낮은 affinity를 지닌다(48,49). 사람의 MutS 단백질은 E. coli와 마찬가지로 5개의 domain으로 구성되고 PCNA(proliferating cellular nuclear antigen)와 작용을 하는 부위를 가진 N-terminal region이 존재한다(그림 1). 1번과 4번 domain은 DNA에 결합하고 5번 domain은 dimerization interface와 nucleotide-binding site를 가지고 있다. DNA와 결합하는 1, 4번 domain과 nucleotide-binding site를 지닌 5번 domain은 멀리 떨어져 있으나 3번 domain을 통해서 연결되어 있다(50).

사람에서는 최소 4개에 MutL homologue(MLH1, MLH3, PMS1, PMS2)가 알려져있다(51-54). MLH1은 PMS2, PMS1, MLH3와 heterodimer를 이뤄 각각 MutLa, MutL β , MutLy 복합체를 형성한다(55). MutLa는 MMR에 중요한 역할을 하고 MutLy는 감수 분열에 역할을 하나 아직까지 MutL β 의 역할은 알려진게 없다(55). MutLa는 ATPase 기능을 가지고 있으며 이 기능에 결함이 생기면 인간 세포에서 MMR 과정이 작동되지 않는다. MutLa의 주요기능은 mismatch에 의한 절단(mismatch-provoked excision)의 종료를 조정하는 것이다(56).

또한 3' nick 방향의 MMR에 중요한 역할을 하고 PCNA와 replication factor C(RFC)에 의해서 활성화 되는 endonuclease 역할을 하는 것으로 알려져있다(57).

PCNA는 MSH2와 MLH1와 상호 작용하여 MMR의 개시와 DNA 재합성 과정에 역할을 하는 것으로 알려져있다(58,59). 또한 MutSa와 MutS β 를 새로 합성된 DNA의 mispair를 찾아가는 것을 도와 준다고 알려져있다(60,61). PCNA는 3' nick 방향의 MMR에는 필수적이지만 5' nick 방향의 MMR에는 필수적이지는 않다(62). 이는 EXO1의 기능을 살펴보면 설명가능하다. EXO1은 5'→3' exonuclease이고 5', 3' nick 방향 MMR에 모두 관여하고 PCNA와 마찬가지로 MSH2와 MLH1과 상호 작용을 한다(63-68). EXO1은 3' 방향으로 절제(excision)를 하기 때문에 MutSa나 MutS β 와 RPA의 도움만으로 손쉽게 5' nick 방향 MMR을 처리 할 수 있으나 3' nick 방향 MMR 처리 위해서는 MutLa

endonuclease가 필요한데, 이는 앞서 언급했듯이 PCNA와 RFC에 의해 활성화 된다(57,69). 최근의 연구에 따른 3' nick 방향의 MMR 과정을 살펴보면 3' nick 과 mismatch를 인식하면 MutLa가 PCNA와 RFC의 도움으로 mismatch로부터 5' 쪽을 절단(incision)을 한다. 그러면 EXO1이 MutLa가 절단한 지점부터 5'→3' 방향으로 절제를 하여 mismatch 부위를 제거 한다(그림 3).

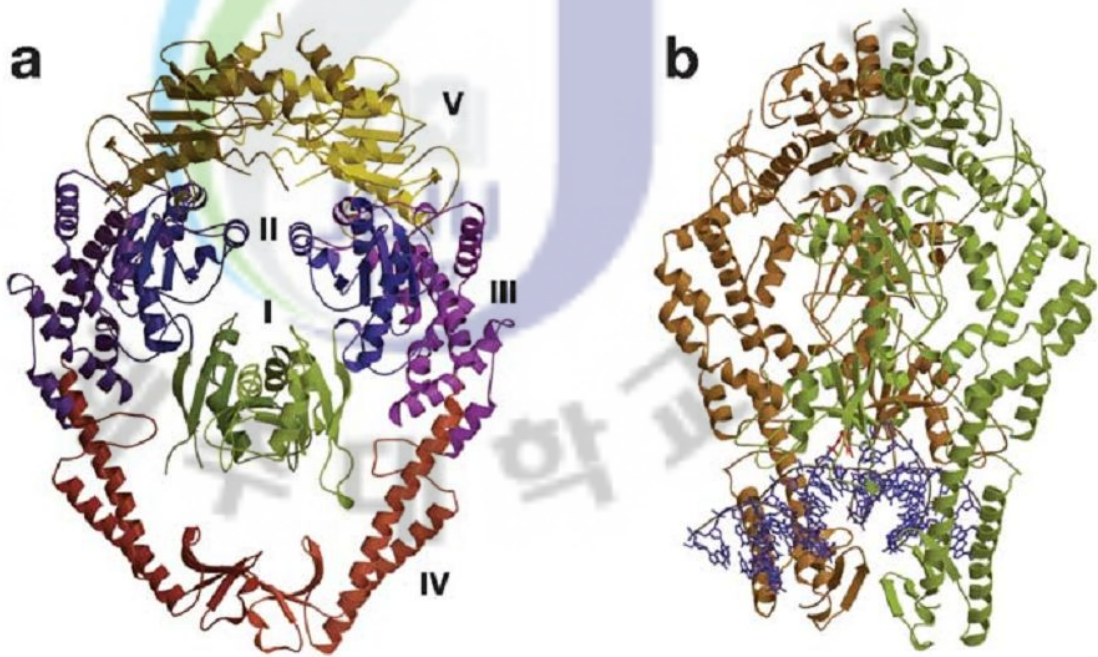


그림 1. Structures of bacterial MutS and model formismatch recognition. (a) Structure of Taq MutS homodimer comprised of five domains that form an upper and lower channel. (b) Structure of Taq MutS containing kinked DNA (blue) with a one-base IDL mismatch, i.e., an extra T (red) bound to the lower channel.

MMR과정에 참여하는 다른 구성요소들로는 single strand DNA(ssDNA)에 결합하는 RPA, RFC, high mobility group box 1 protein(HMGB1), DNA pol δ 등이 있다. RPA는 DNA nick에 결합하여 절제를 유도하고 절제 과정에 생기는 ssDNA의 공백을 매워서 보호하는 기능을 하고, DNA 재합성을 촉진시킨다(69,70-72). RPA는 pol δ 가 절제 후에 ssDNA 공백에 도착하면 phosphorylation 되는데 phosphorylation 된 RPA는 DNA와의 affinity가 떨어진다. phosphorylation되기 전의 RPA는 DNA 절제를 더 효율적으로 촉진시키고 phosphorylation 된 RPA는 DNA 재합성을 더 효율적으로 촉진시킨다. (72).

MMR의 과정 중 mismatch 부위와 새로이 합성되는 부위를 판별할 수 있는 nick과의 거리가 상당히 떨어져있는데 이들이 어떻게 상호 작용 하는지에 대해서는 아직 확실하게 알려진 것은 없고 몇 가지 모델이 있다.

첫 번째로 제시 된 것은 'stationary' 모델인데, 이는 MMR에 관여하는 단백질 DNA를 구부리거나 말아서 두 부위를 가까이 붙이는 것이다. 이때 MSH는 mismatch 부위에 머물러 남아 있으면서 ATPase 작용으로 mismatch를 확인하고 다음 절제 작용을 유도한다.(73,74)(그림 2).

또 하나는 'moving' 모델이라 불리는데 이는 MSH-MLH 복합체가 nick을 찾아 mismatch 부위에서부터 이동하여 인식한 후, exonuclease가 절제를 개시한다는 개념이다. 이 'moving' 모델에는 또 다시 두 가지 가능한 모델이 있는데, 하나는 'translocation' 모델이고, 또 하나는 'sliding clamp' 모델이다.

'Translocation' 모델은 ATP가 MSH와 mismatch의 결합 affinity를 떨어뜨려 ATP hydrolysis가 일어나면 MSH는 DNA helix를 따라 단방향 이동이 일어난다는 개념이다(75). 그렇게 하여 nick에 도달 할 때까지 이동하게 되고 DNA는 MSH 복합체에 꿰어지면서 DNA 고리를 형성하게 된다. 'sliding clamp' 모델에서는 MSH는 ADP와 결합된 형태로 mismatch에 결합한다. mismatch와의 결합이 MSH의 구조의 변화를 유도시켜 ADP가 ATP로 교체 가능한 형태로 만들고, ATP와 결합된 MSH 복합체는 이동가능한 조임쇠(sliding clamp) 형태로 이차적 구조 변화가 일어난다(76-79). 이렇게 변형된 MSH 복합체는 nick을 발견할 때까지 이동하고 nick을 발견하면 절제가 시작되고 MSH가 떠난 mismatch 부위에는 또 다른 MSH 복합체가 결합한다. 사람의 MMR 과정에서 하나의 mismatch

를 처리하기 위해서 여러개의 MSH-MLH 복합체가 필요하다는 실험은 sliding clamp 모델을 지지하고 있다(71)(그림 2).



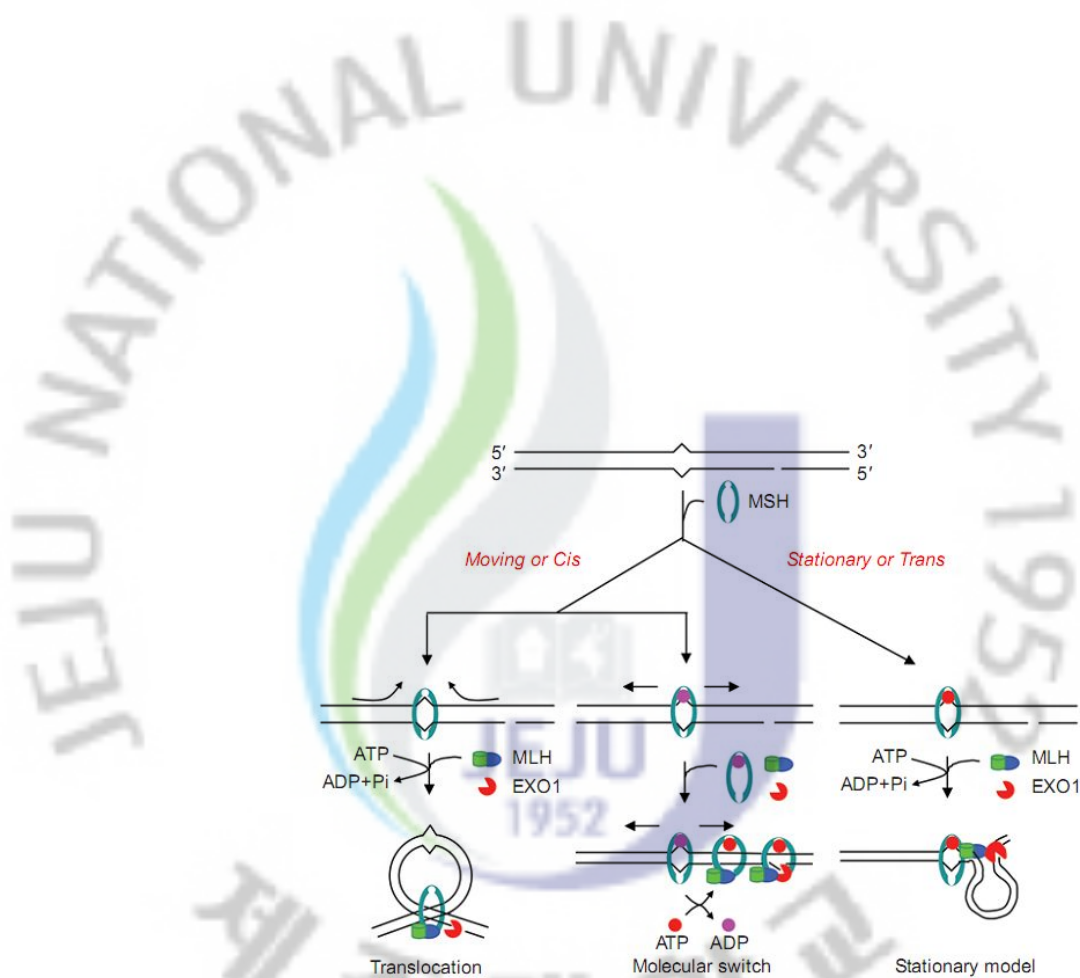


그림. 2 Models for signaling downstream MMR events following mismatch recognition. A schematic diagram for signaling between the mismatch and the strand discrimination signal is shown. Here, a 5' nick is the strand discrimination signal. Similar models apply for 3' nick-directed MMR. The “stationary” or “trans” model (right) emphasizes that MutS or its homolog (MSH) proteins remain bound at the mismatch. It is the protein-protein interactions that induce DNA bending or looping that brings the two distant sites together. The two DNA sites can cooperate in a “trans” configuration. In two “cis” or “moving” models, one called the “translocation” model (left) and the other called the “molecular switch” or “sliding clamp” model (middle), it is hypothesized that the MSH proteins bind to the mismatch and then move away from the site to search for the strand discrimination signal. The translocation model suggests that ATP hydrolysis drives unidirectional movement of the MSH proteins, resulting in the formation of an α -like loop. In the molecular switch model (center), binding of an MSH protein (in its ADP-bound state) to the mismatch triggers an ADP to ATP exchange that promotes bi-directional sliding of the protein away from the mismatch, thereby emptying the mismatch site for an incoming MSH protein. Mismatch excision begins when an MSH protein reaches the strand break.

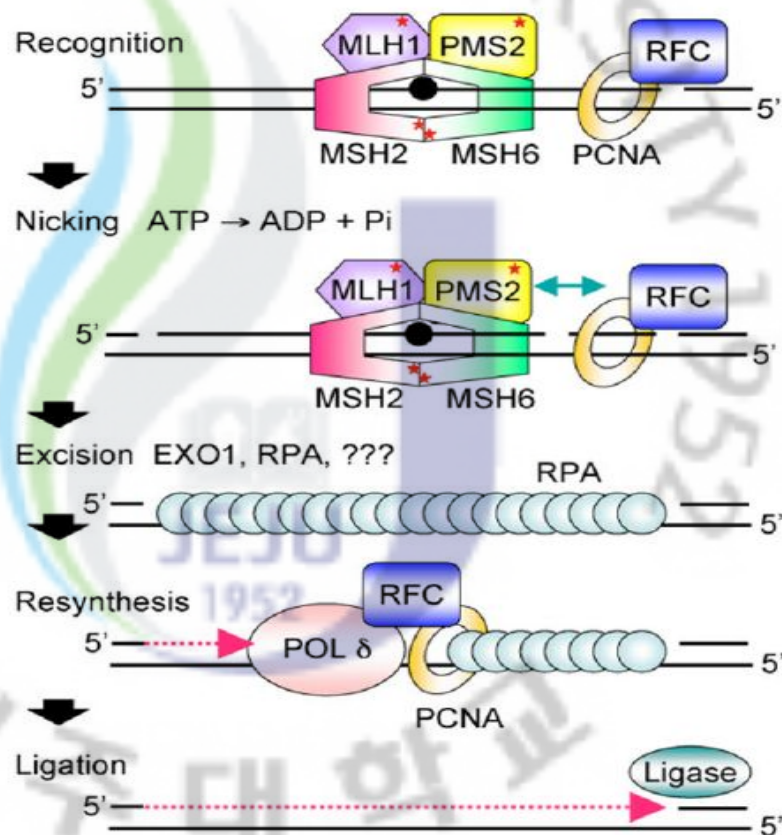


그림 3. Cartoon scheme for 3'-directed eukaryotic MMR. Recognition of a mismatch by MutSa

(MSH2-MSH6) or MutSβ (MSH2-MSH3, not shown) and MutLa (MLH1-PMS2) results in the formation of a ternary complex whose protein-protein and protein-DNA interactions are modulated by ATP/ADP cofactors bound by MutSa and MutLa (indicated by red *). PCNA may play an important role in the recruitment of MMR proteins to the vicinity of the replication fork via a PIP motif on MSH6 and MSH3. Nicking by the endonuclease function of PMS2 stimulated by ATP, PCNA, and RFC and relevant protein-protein interactions (indicated by green arrow) may establish strand discrimination targeting repair to the newly synthesized strand. MMR is bidirectional and can be 5'-directed as well; this is not shown. HMGB1, a nonhistone chromatin protein that bends DNA also facilitates MMR in vitro at or before the excision step (not shown). Excision by EXO1 and possibly other as yet unidentified exonucleases leads to the formation of an RPA-coated single-strand gap. Resynthesis by replicative polδ and ligation restore the integrity of the duplex. figure from DNA mismatch repair: Molecular mechanism, cancer, and ageing by Peggy Hsieh and Kazuhiko Yamane)

린치 증후군의 진단

린치 증후군은 DNA MMR 유전자의 생식 세포 수준의 돌연변이를 가진 것으로 정의된다(80). 그러나 모든 대장 직장암 환자를 대상으로 MMR 유전자 검사를 하는 것은 비용 효율적이지 않다. 린치 증후군 환자에서의 대장 직장암은 특정 표현형을 가지지 않기 때문에 마찬가지로 가족력을 가진 가족성 선암성 용종증 등 여러 유사 질환과 감별하여야 한다.

린치 증후군의 진단에는 가장 먼저 가족력이 고려되어야 한다. 대장 직장암 뿐만 아닌 다른 모든 암에 대한 가족력을 추적하여 유전 패턴의 유무와 종류를 판단하여야 한다. 그리고 발병의 시기, 암의 위치 등 린치 증후군의 임상적 특성(표 3)을 고려하여 환자를 선별 한 후 MSI 검사, 면역조직화학 검사 등으로 진행한다. 각 진단 기법과 세부적인 진단 알고리즘은 아래 각론으로 설명한다.

미소부수체 불안정성(Microsatellite Instability, MSI) 검사

MSI 검사는 MMR 변이 종양을 예측하기 위해 사용된 첫 번째 검사법이다. 검사는 5가지의 표준화 되고 선별된 microsatellite marker를 사용한다. 이 3개의 dinucleotide 반복체와 2개의 mononucleotide 반복체를 이용하여 정상 조직의 DNA와 종양의 DNA와 비교하여 2개 이상에서 차이를 보일 때 이를 MSI-high(MSI-H)로 분류한다. MSI가 린치 증후군 종양의 특징이긴 하지만 MSI-H는 전체 대장 직장암 환자의 15%에서 발견되고 이 중 20-25% 만이 린치 증후군으로 진단되고 나머지 75-80%는 MLH1 유전자의 methylation-induced silencing에 의해 발생하는 산발성 MSI로 분류된다. (81-83) 또 전체 대장 직장암 환자의 20% 정도는 5개의 marker 중 1개 만이 불일치 하는데 이를 MSI-low(MSI-L)로 명명한다. MSI-L은 MSI-H 암 과 임상적, 병리적 특징이 유사하지 않으며 DNA MMR 유전자의 변이와도 상관없다. 즉 MSI-L은 린치 증후군의 선별이나 진단과 관계가 없다. 이는 MSH3 유전자의 비변이성 down regulation에 의한 것으로 생각된다(84). 최근에는 새로운 microsatellite marker가 개발되어 한번에 pentaplex polymerase chain

reaction(PCR)로 분석할 수 있게 되었으며 원래 marker보다 민감도와 특이도가 더 증대되었으며, 정상 조직을 분석 할 필요도 없어졌다. MSI 검사는 림치 증후군을 선별하는데 유용할 뿐만 아니라 MSI-H로 분류될 경우 전체 및 병기 별 예후가 좋으며(85), 2기와 3기 암일 때 보조적 화학요법에 대한 반응이 떨어진다고 알려져(86) 임상적으로도 중요하다.

일반적으로 임상적으로 의심되는 환자가 있을 경우 MSI 검사로 선별을 하고 MSI-H로 판명되었을 때 유전자 변이 검사로 이어지는 과정으로 진단하게 된다. 어떤 이유든 MSI 검사가 불가능 할 경우에는 곧 바로 유전자 변이 검사를 시행하여야 한다.

-
- Autosomal dominant inheritance pattern seen for syndrome cancers in the family pedigree
 - Earlier average age of colorectal cancer (CRC) onset than in the general population
Average age of 45 years in LS vs 69 years in the general population
 - Proximal (right-sided) colonic cancer predilection
~70% of LS CRCs are proximal to the splenic flexure
 - Accelerated carcinogenesis (tiny adenomas can develop into carcinomas more quickly)
Within 2–3 years in LS vs 8–10 years in the general population
 - High risk of additional CRCs
25–30% of patients having surgery for a LS-associated CRC will have a second primary CRC within 10 years of surgical resection if the surgery was less than a subtotal colectomy
 - Increased risk for malignancy at certain extracolonic sites (143, 144)
 - Endometrium (40–60% lifetime risk for female mutation carriers)
 - Ovary (12–15% lifetime risk for female mutation carriers)
 - Stomach (higher risk in families indigenous to the Orient, reason unknown at this time)
 - Small bowel
 - Hepatobiliary tract
 - Pancreas
 - Upper uro-epithelial tract (transitional cell carcinoma of the ureter and renal pelvis), especially in males with LS-*MSH2* type (143)
 - Brain (in the Turcot's syndrome variant of the LS)
 - Multiple sebaceous adenomas, sebaceous carcinomas, and keratoacanthomas in the Muir–Torre syndrome variant of LS
 - Pathology of CRCs is more often poorly differentiated, with an excess of mucoid and signet-cell features, a Crohn's-like reaction, and a significant excess of tumor-infiltrating lymphocytes within the tumor
 - Increased survival from CRC
 - The *sine qua non* for diagnosis is the identification of a germline mutation in a mismatch repair gene (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, or *PMS2*) that segregates in the family: i.e., members who carry the mutation show a much higher rate of syndrome-related cancers than those who do not carry the mutation
-

표 3. Cardinal features of Lynch syndrome (From HT Lynch, PM Lynch, SJ Lanspa, CL Snyder, JF Lynch, CR Boland, Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications, Clin Genet. 2009 July; 76(1): 1–18. DOI:10.1111)

면역조직화학(Immunohistochemistry) 검사

MSI 검사는 민감한 검사법이긴 하지만 MSI-H 종양 중 20~25%만이 DNA MMR 유전자 변이와 관련되어 특이적이지는 못한 검사이다. 민감도에 있어서도 전체 림치 증후군 환자의 5% 정도를 선별하지 못하며 특히 MSH6 변이의 경우 민감도가 86%밖에 되지 않는다(23). 그리하여 면역조직화학(Immunohistochemistry, IHC) 검사로 MSI를 보완 할 수 있다.

림치 증후군 환자 진단을 위한 MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 단백 항체를 시중에서 구할 수 있으며 현재 여러 병원 및 연구소에서 사용되어 진다. IHC의 민감도는 95% 정도 이지만 판단하기 힘든 애매한 염색도 있어 숙련된 병리학자가 시행하여야 정확한 해석을 할 수 있다(88).

MSH2 변이의 경우 IHC 상에서 완전히 유전자 표현이 소실되고 대부분의 MSH2 변이 림치 증후군 환자는 MLH6 단백 표현도 동반하여 소실된다. 이에 반해 MLH1 변이 림치 증후군 환자는 미스센스(missense) 변이를 일으키는 경우도 있는데, 이는 유전자가 변이되어 다르거나 기능을 못하는 단백질을 생성시키나 IHC 검사 상 잘 나타나지 않는 것을 의미한다. 따라서 IHC 검사 상 MLH1 단백질은 정상이거나 약하게 표현되었고 PMS2 변이가 있을 때는 MLH1의 미스센스 변이도 고려해보아야 한다. 따라서 MLH 단백질의 기능적 분석 기술이 개발 중이다(89-91).

Lindor et al. 이 수행한 대규모 연구에서 818개의 림치 증후군 환자의 종양 중 27개는 MSI-H이지만 IHC 검사에서 MLH1과 MSH2이 염색되었다(음성). 결과적으로 IHC는 높은 특이도(100%)를 가지고 있고 꽤 높은 민감도(92.3%)를 가진 선별 검사법이나 IHC 단독으로 수행 할 경우 일부 MSI-H 종양을 놓칠 수도 있다(92). 500례로 MSI와 IHC를 비교한 연구에서 IHC는 선별 목적으로 검사 할 때 MSI와 거의 동등한 민감도를 지니고 있을 뿐만 아니라 수행하기가 더 수월하고 변이가 생긴 특정 유전자를 찾아 낼 수도 있는 장점을 가지고 있다(4) (표 4).



	IHC	MSI	Advantage
Cost	Variable	Variable	Neither
Training to perform	Necessary	Necessary	Neither
Analyte	Protein	DNA	Neither
Laboratory	Most pathology labs	Need molecular lab	IHC
No. tumor cells needed	Very few required	Need certain % depending on marker	IHC
Sample	Tumor only	Tumor and normal	IHC
“Contamination” by normal may interfere	No	Yes	IHC
Suggests mismatch repair gene involved	Yes	No	IHC
Turnaround time	Next day	2-7 days	IHC
“Genetic” debate*	Yes	No	MSI
Distinguishes MSI-H, MSI-L, MSS	No (MSI-L and MSS similar)	Yes	MSI (does not matter to identify Lynch, but may for prognosis)
Variable results because of tissue fixation	Yes	No	MSI

*We do not believe mismatch repair IHC represents genetic testing, but this has been argued by a small number of individuals. IHC indicates immunohistochemistry; MSI, microsatellite instability; MSI-H, high-level MSI; MSI-L, low-level MSI.

표 4. Comparison of IHC for the Mismatch Repair Proteins and MSI Testing (From Andrew M. Bellizzi, MD and Wendy L. Frankel, MD, Colorectal Cancer Due to Deficiency in DNA Mismatch Repair Function, A Review, Adv Anat Pathol. Volume 16, Number 6, November 2009)

BRAF V600E 변이 검사

MLH1 단백질 표현이 소실되어 있다면 MLH1 promoter methylation 검사나 BRAF V600E 분석 검사를 수행하는 것이 유용 할 수 있다. MLH1 promoter가 methylation에 의한 단백질 표현 소실은 린치 증후군이 아니라 산발성 대장 직장암임을 의미하여 MLH1 유전자 분석을 할 필요가 없어서 비용 효율적인 측면에서 효율적이다. 그러나 promoter의 methylation 여부를 직접 분석하는 것은 BRAF 분석보다 비싸고 기술적으로 힘들 뿐만 아니라 드문 경우에 MLH1 promoter methylation 양성임에도 린치 증후군으로 진단될 수도 있다(93, 94).

Ras/Faf/MAP kinase pathway의 일부인 BRAF 유전자의 변이는 다양한 인간 종양에서 발견되며 전체 대장 직장암의 15%에서 발견된다(95). 린치 증후군이 아닌 산발성 MSI-H 종양의 경우 75%정도가 BRAF 변이를 가지고 있으며 이중 codon 600에서 glutamic acid가 valine으로 치환된 점 변이는 이러한 BRAF 변이의 95%를 차지하고(96) 이를 BRAF V600E 변이라고 명명한다. BRAF V600E 변이는 환자에 역시 MLH1 promoter methylation을 일으키는 missense 변이를 발생시켜 MLH1 단백질이 소실된 것으로 나오는 것이다. 따라서 MLH1 단백질 소실이 있어서 BRAF V600E 검사를 하였을 때 양성으로 나올 경우 산발성 종양일 가능성이 매우 높고 MLH1 유전자 검사까지는 대부분 필요치 않는다. 전체 유전자를 sequencing 하는 것보다 점 변이 검사를 하는 것이 훨씬 저렴하므로 비용 효율적인 면에서 권장된다(97).

임상 검사 알고리즘

앞서 살펴본 검사법들을 이용하여 실제 린치 증후군 의심 환자를 검사하는 임상 검사 알고리즘을 소개한다. 이는 Ohio State University Medical Center에서 사용하는 알고리즘인데 최초 선별 검사 시 유용성을 고려하여 MSI 보다 IHC 검사를 선택하였다. 앞으로 MSI 상태가 예후나 치료 선택에 영향을 줄 수 있다는 더 많은 증거들이 채택되면 이 진단 알고리즘은 바뀔지 모른다고 덧붙였다(그림 4).

우선 새롭게 진단된 모든 대장 직장암 환자를 대상으로 MMR IHC(MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) 검사를 시행한다. 대부분은 이 4개의 단백질 표현이 정상적으로 나타난다(약 80%). 발병시기가 45세 미만이고 직계 가족 중 대장암 환자가 있으며 다른 원발 종양이 있는 등의 린치 증후군의 매우 특이적인 임상 특성이 없는 경우에는 여기서 검사가 종료된다. 15~20%를 차지하여 두 번째로 많은 결과는 MLH1과 PMS2 단백질의 동반 소실인데, 이 경우에는 MLH1 promoter hypermethylation 등으로 단백질 소실로 결과만 나왔을 뿐 실제 기능에는 이상이 없는 missense 변이일 가능성이 높다. 그럴 땐 바로 MLH1 유전자 분석을 하는 것 보다는 먼저 BRAF V600E 변이 검사로 선별을 하는 것이 더 비용 효율적이다. BRAF V600E 검사와 MLH1 유전자 분석에서 모두 음성으로 나왔을 때는 MLH1 methylation 검사나 PMS2 유전자 검사를 고려 할 수 있다. MSH2와 MSH6 단백질이 동반 소실되었을 때나 MSH6, PMS2 단백질이 단독 소실되었을 때는 각각의 단백질 분석을 시행하면 된다.(98)

린치 증후군의 임상적 특징과 환자 관리

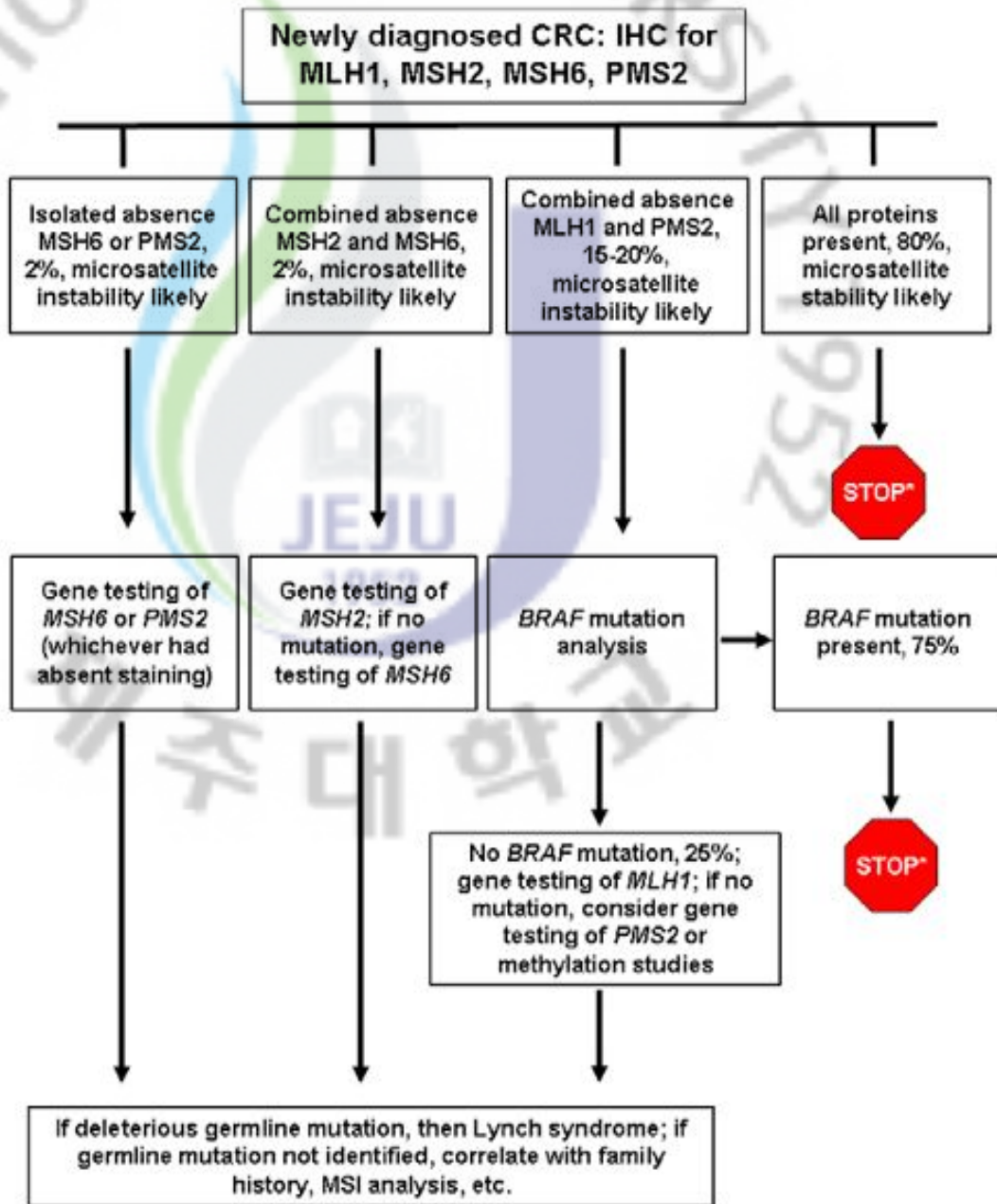
Watson et al.은 린치 증후군 환자와 산발성 대장 직장암 환자의 병기와 생존률에 대하여 비교하였는데, 린치 증후군 환자군에서 진단 당시 더 낮은 병기를 지니고 전이가 덜 되어 있었다(99). 린치 증후군 환자가 더 어린 나이에 진단되므로 나이를 보정하여 생존률을 분석하였을 때 위험률 0.67($p < 0.0012$)로 린치 증후군 환자군에서 확연히 생존률이 높았다. 이런 높은 생존률은 린치 증후군이

아닌 MSI 증양에서도 나타나나(100-102) 이를 설명할 근거는 아직까지 불확실하다.

DNA MMR 기능이 소실된 생물은 alkylating 계열 항암제와 같이 DNA에 손상을 줘서 작용하는 약물에 상대적으로 저항력을 갖는다. 따라서 린치 증후군과 같이 DNA MMR 유전자의 소실이 있는 대장 직장암 환자에서는 cisplatin이나 5-fluorouracil(5-FU)와 같은 항암제의 작용이 저하 될 수 있다(103,104). 5-FU를 이용한 보조 항암요법과 단순 관찰 혹은 위약을 비교한 전향적 무작위 연구에서 대부분의 연구에서는 이득이 없다고 보고하였고(105-108), 2기와 3기의 환자에서는 사망률이 오히려 2~3배 높아진다는 보고도 있다(109). 따라서 린치 증후군 환자나 일부 형태의 MSI 증양 환자는 5-FU 보조 항암요법이 권장되지 않는다.

추적 관찰 및 관리

린치 증후군 환자를 대상으로 대장 내시경으로 선별 검사를 하는 것은 생존률을 확연히 올려주는 것으로 보고되었다(110, 111). Lindor et. al에 따르면 20~25세 사이에 시작하여 1~2년 마다 대장 내시경으로 검사하는 것을 추천한다고 하였다. MLH6 변이 환자의 경우 30세에 시작하는 것을 권하였다(112). 이 기준은 린치 증후군 환자들의 발병 특징에 기초하였는데, 평균 45세의 젊은 나이에 발병하는 것은 선별 검사를 일찍 하게 하였고, 선종에서 암으로 발전되는 기간이 일반 인구 8~10년 보다 훨씬 짧은 2~3년 이므로 1~2년 간격의 잦은 검사를 권하였으며, 70% 정도가 오른쪽(근위) 대장에 발병하므로 sigmoidoscopy 보다 대장 내시경을 권하였다(113,114). 일단 암의 발생이 확인 되면 아전대장절제술을 하는 것이 일반적이다.



*consider further workup/referral to Clinical Cancer Genetics if clinically suspicious (e.g., CRC diagnosed < 45 yr, first-degree relative with CRC, multiple primary tumors)

그림 4. Clinical Testing Algorithm Used at Ohio State University Medical Center. Notes: Percentages refer to the likelihood of each result at that point in the algorithm. See text for further details. CRC indicates colorectal cancer; IHC, immunohistochemistry; MSI, microsatellite instability. (From Andrew M. Bellizzi, MD and Wendy L. Frankel, MD, Colorectal Cancer Due to Deficiency in DNA Mismatch Repair Function, A Review, Adv Anat Pathol. Volume 16, Number 6, November 2009)

린치 증후군 환자에서 대장 외 종양 관리

대장 외 종양의 위험성

린치 증후군 환자는 대장암 뿐만 아니라 자궁내막, 위, 소장, 췌장, 담도, 난소, 요로, 뇌, 피부 등에서의 암의 발병 위험이 높은 것으로 알려져 있다. 이러한 대장 외 종양의 감시는 이들 종양의 평균적인 발병 일시와 전 생애에 걸친 발병 가능성을 고려하여 계획되어야 한다. 발병 위험성은 식이와 생활습관 등의 외적 요인과 유전적인 특성 등의 내적 요인에 따라 달라진다.(115)

각 대장 외 종양 발병 위험성은 어떠한 mismatch repair gene이 변이 되었나 따라 달라진다. 즉, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 중 어떤 gene의 변이에 따라 특정 암이 발병 위험성이 높아진다. 그러나 대부분의 환자들은 MLH1이나 MSH2 gene 변이를 가지고 있고 다른 gene의 변이에 따른 대장 외 종양의 위험성에 대한 연구는 많지가 않아서 임상적으로 큰 의미는 없어 보인다.

각 종양에 대한 역학과 감시는 각론으로 다룬다. 치료는 각 종양의 일반적인 치료와 다르지 않으므로 다루지 않는다.

부인과 종양

여성 린치 증후군 환자의 자궁내막암 평생 발병률은 직장대장암보다 오히려 높다. 일반인의 평생 발병률은 3% 정도인 것에 비해 린치 증후군 환자는 27%에서 71%에 이른다. MLH1과 MSH2 변이 환자는 27%에서 60%의 발병률을 보이는 것에 반해 MSH6 변이 환자는 60%에서 71%의 높은 발병률을 보인다(115). 40세 이상의 환자에서 연간 발생률은 2~5%이다. MLH1과 MSH2 변이 환자의 진단 평균 나이는 59세인 반면 MSH6 변이 환자는 54세이다(116-119).

여성 린치 증후군 환자의 난소암 평생 발병률은 7% 정도(3~14%)로 일반인의 1~4%보다 높다(115). MSH2 변이 환자가 MSH1 변이 환자보다 발병률이 두 배 정도 높았고 40~55세에 가장 많이 발병하였다(120).

앞서 살펴봤듯, 린치 증후군에서 자궁내막암의 위험도는 일반인에 비하여 월등

히 높고 암의 조기 진단이 어렵지 않다는 것이 정기 검사의 타당성에 힘을 실어 준다. 린치 증후군 여성 환자들은 대장암에 비해 자궁내막암의 위험성에 대해 크게 인지 못하는 경우가 많아, 대장 내시경보다 검사를 자주 하지 않는다.(121). 자궁내막암은 증상이 생긴 후 진단 받아 치료하는 것 보다 증상이 생기기 전 조기 진단하여 치료를 받는 것이 더 예후가 좋으므로(122) 정기 검사가 환자에게 도움이 된다. 정기 검사는 초음파 검사 단독으로 보다는 외래에서 마취없이 간단히 할 수 있는 자궁 내막 생검과 같이 하는 것이 권장된다(123)

난소암에 대한 정기 검사는 유전 난소암 중 최고의 발병율을 보이는 BRCA1, BRCA2 변이 환자에서조차 효과가 없다(124). 린치 증후군에서 정기 검사가 실효성은 없다고 여겨지나 자료가 아직 미비하고 주로 자궁내막암에 대한 연구에 집중되어 있기 때문에 더 많은 연구가 필요하다.

경구 피임제를 복용 하는 여성에서 그렇지 않은 여성보다 자궁 내막암과 난소암의 발병 위험을 줄여 준다는 연구가 있다(125). 이는 월경과 배란 작용이 내막과 난소에 손상을 주어 발암에 위험을 높인다는 가설에 기초한다. 게다가 경구 피임제의 복용 기간이 길어질수록 위험도가 감소한다는 보고도 있다. 린치 증후군 환자에 경구 피임제를 복용 시켰을 때 부인과 종양이 감소한다는 명확한 증거는 없어 아직 권고 사항은 아니지만, 복용이 금기 또한 아니므로 향후 연구 결과에 따라 화학적 예방법으로 고려될 수 있다.

대장 절제술을 요하는 여성 린치 증후군 환자에게 자궁 내막암과 난소암의 위험을 없애기 위하여 예방적 자궁 절제술 및 양측 나팔관-난소 절제술의 선택을 제안하여야 한다. 315명의 린치 증후군 환자를 대상으로 한 연구에서 33%의 여성이 예방적 자궁 절제술 및 양측 나팔관-난소 절제술을 받았고 10년의 추적 관찰 결과 절제술을 받지 않은 환자의 33%에서 자궁 내막암이 발생하였고 5%에서 난소암이 발생한 반면 절제술을 받은 환자의 그 누구도 자궁 내막암 및 난소암이 발생하지 않았다(126). 예방적 절제술을 고려 할 때는 린치 증후군 진단 당시 이미 자궁 내막암이 존재하고 있을 수도 있으므로 자궁 내막 생검을 하여 병기를 평가하고 수술의 범위를 결정한다(127).

현재 가이드라인에는 자궁 내막 생검과 초음파 검사를 30~35세에 매년 정기 검사를 하기를 권장하고 있으나(128, 129), 자궁 내막암의 발병 나이 분포를 봤

을 때 35~40세에 시작하기 권한다는 연구도 있다(115). 더 이상 아이를 원하지 않는 환자에게 특히, 대장 절제술이 예정 되었을 경우, 자궁 절제술 및 양측 나팔관-난소 절제술을 권장 할 수 있다. 폐경 전 여성이 절제술을 받았을 경우 안명 홍조, 성욕 감퇴, 질 건조 등의 부작용을 줄이기 위해 호르몬 대체 요법을 고려 할 수 있다.

위암

린치 증후군 환자에서 위암 평생 발병률은 2%(네덜란드, 130)에서부터 30%(한국, 131)까지 지역 별로 다양하다. 일반인의 위암 발병률이 높은 한국 등 아시아 국가의 린치 증후군 환자가 위암 발병률 또 높다(131). 일반인 위암 환자의 90%는 55세 이후에 진단된 것에 비해, 린치 증후군 환자에서 위암이 발병한 환자들은 평균적으로 50세 정도에 진단되었다(131). 각 Mismatch repair gene 의 변이에 따른 발병률 차이는 없는 것으로 보인다(132, 120).

린치 증후군 환자에서의 위암은 대개 intestinal-type이고, 고도의 microsatellite instability를 가졌다(133). Intestinal-type 위암의 원인으로는 Helicobacter pylori 감염에 인한 것이고(134) 그 이외, 만성 위축성 위염, 장화생 및 이형성 등으로 발생한다. 전암 병변이 생기기 이전에 H pylori 박멸 치료를 하는 것이 위암의 위험성을 줄일 수 있다.

모든 환자에게 정기 검진을 해야 한다는 합의는 없지만, 가족 중 위암 환자가 있는 경우와 위암 발병률이 높은 지역의 경우 정기적인 위-십이지장 내시경을 시행하는 것이 도움이 되는 것으로 보인다(119). 또한 H. pylori 감염이 있는 경우 박멸 치료를 권한다(115). 특히 한국의 경우 일반인의 위암 발병률이 타 지역 보다 월등히 높고 H. pylori 감염율도 높으므로 위암 정기 검진 및 H.pylori 박멸 치료를 권장한다.

소장암

린치 증후군 환자의 평생 소장암 발병률은 4%로 일반인에 비해 100배 이상 높

다(135). 평균 진단 나이는 39세에서 53세로 일반인 보다 10~20년 이르고 여성보다 남성에서 위험성이 약간 높다는 보고가 있다(135). 종양은 주로 십이지장과 공장에 분포하고 MLH1과 MSH2 변이 환자는 비슷한 수로 발생하였고 MLH6, PMS2 변이 환자에는 드물었으며 조직학적으로 microsatellite instability가 높은 선암이었다(136).

최근까지 소장을 살펴볼 수 있는 방법이 별로 없었으나 최근에 캡슐 내시경과 2 풍선 내시경으로 관찰이 가능하게 되었다. 캡슐 내시경은 환자가 조그만 영상장치를 삼켜(137) 비침습적이고 부작용 없이 소장 내부를 촬영 하여 소장암 진단에 도움이 되나(138) 조직학적 진단을 하기 위한 생검은 불가능하다는 단점이 있다. 2 풍선 내시경은 병변까지 접근하여 방검 등을 할 수 있다는 장점이 있다(139). 이 두 가지 방법이 소장암의 진단에 도움이 되는 것엔 이견이 없으나 정기 검사의 실효성과 가격대비 효율성은 더 많은 연구가 필요하다.

췌장 및 담도암

Geary et. al(140) 은 최근에 319명의 린치 증후군 환자를 대상으로 한 연구에서 췌장암의 발병률이 일반인보다 7배 가량 높다고 보고하였다. 대부분은 평균적으로 60세 이전에 진단되었고 가족력의 증거도 보였다. 린치 증후군 환자에서 담도암은 드물었고(140) 간세포암에 대해 연구한 자료는 아직까지 없다.

현재까지 내시경적 초음파가 초기 췌장암을 진단하기 위하여 가장 예민한 검사법이지만 아직까지 치료할 수 있는 초기에 발견할 수 있는 정기 검진법은 없다(141). 담도암의 조기 발견은 췌장암보다 더 어렵다. 린치 증후군 환자에서 췌장 및 담도암 정기 검진은 권장되지 않는다.

요로계 암

린치 증후군 환자에서 신우, 요도와 같은 요로계 암의 발병율은 12% 이상이다(142). 2683명의 MLH1, MSH2 변이 환자를 대상으로 조사한 결과 방광암을 포함하였을 70세 까지 누적 발생률은 8%이었다. MLH1 변이 여성 환자인 경우에

는 1%, 남성 환자인 경우에는 4%의 발생률을 보였고 MSH2 변이 여성환자는 12%, 남성 환자는 28%를 보였다(120). 이같은 결과에서 MSH2 변이 환자에서 더 많은 요로계 암이 발생한 다는 것을 알 수 있다.

요로계 암과 방광암 또한 다른 암과 비슷하게 증상이 없는 시기에 조기 발견하여 신장 기능이 남아 있을 때 치료 할 때 더 나은 결과를 기대할 수 있다. 그러나 현재까지 린치 증후군 환자에서 요로계 암 정기 검진의 실효성을 보여준 연구는 많이 없다. 소변의 세포학적 검사의 민감도는 29%에 불과하고(143), 면역 화학적 검사, β -glucuronidase 검사 등은 민감도를 더 높여주긴 하나 여전히 낮다(144,145). 그 외 fluorescence in-situ hybridisation assay, 소변의 microsatellite instability 검사 등의 방법이 도움이 될 수 있지만 너무 침습적이거나 아직 데이터가 부족하다(146,147). 요로 초음파 검사는 비침습적이고 간단하게 시행 할 수 있지만 민감도가 높지 않고(148), 요로 조영 CT는 초음파보다 민감도가 높기는 하나(149) 가격이 비싸고 여러 차례의 방사선 노출이 문제가 될 수 있다.

최근 권장되는 정기 검진 방법으로 매년 소변 검사 스틱으로 혈뇨 검사를 하는 것이다. 혈뇨가 발견 될 때에는 방광경 검사와 복부 요로계 초음파를 실시하고 초음파 검사에서 음성으로 나올 경우에 요로 조영 CT 검사를 하는 것이다. 정기 검진은 45~50세에 시작하는 것이 권장되고 요로계 암의 가족력이 있는 환자에서는 45세 이전에 검사를 시작하는 것이 권장된다(115).

피부암

린치 증후군 환자에서는 피지샘종(선종, 상피종, 암종)과 각시각질세포종 등의 피부암이 호발하고 이를 Muir-Torre 증후군이라고 부른다. 약 10%의 린치 증후군 환자에서 이 증후군이 발견된다(150). 피부 병변은 얼굴에서 주로 발견되나 신체 어디서나 발생 할 수 있고 대부분의 환자들은 린치 증후군 관련 타 종양의 진단 후 발견된다. 린치 증후군과 별개로 최근 한 연구에서는 피지 암종 환자는 대장암, 췌장암, 자궁내막암 등의 다른 악성 종양이 발생될 확률이 일반인들보다 43% 높다고 보고하였다(151).

정기 검진에 대한 명확한 기준은 없으나 특히 Muir-Torre 증후군의 가족력이 있는 환자는 피부과적 검진을 받는 것이 좋다. 피부 병변이 뚜렷한 경우가 많으므로 환자와 의사 모두 주의깊게 관찰하여 필요한 경우 생검 등으로 진단 하여야 한다.

그 외 암들

린치 증후군 환자에서 뇌종양은 일반인에 비해 많이 발생하고(116, 149,152), 70세 미만의 누적 발생률이 2% 정도이고 MLH1 변이 환자는 1.7%, MSH2 변이 환자에서는 2.5% 정도에서 발생한다(120). 또 일반인에 비하여 진단되는 평균나이가 적은데 26%정도가 25세 미만에 진단된다(120) 가장 흔한 종류는 아교모세포종(glioblastoma)과 별아교세포종(astrocytoma)이다. 발생률이 낮고 효과적인 조기 검진법이 없어 정기 검진은 권장되지 않는다.

유방암, 전립선암, 후두암, 폐암, 갑상선암, 고환암, 흑색종 등이 린치 증후군 환자에서 보고되고 있고(120,153) 이들은 mismatch repair gene의 변이가 이들 암의 발생에 영향을 준 것으로 보인다(153,154). 이들 암은 효과적인 조기 검진 방법이 있더라도 정기 검진을 정당화 하기에는 발생률이 너무 낮다. 린치 증후군 환자에서 흑색종에 대한 정기 검진을 주장하는 이들도 있으나 아직까지 그 효용성을 불명확하다(153).

Type of intervention	Recommendation	regarding intervention	Strength of recommendation*
Screening colonoscopy	Every 1–2 yr beginning at age 20–25 yr (age 30 yr in <i>MSH6</i> families), or 10 yr younger than the youngest age at diagnosis in the family, whichever comes first	Evidence includes consistent results from well-designed, well-conducted studies in representative populations that directly assess effects on health outcomes†	Strongly recommended There is good evidence that the guideline improves important health outcomes and concludes that benefits substantially outweigh harms
Endometrial sampling	Every year beginning at age 30–35 yr	Evidence is insufficient to assess the effects on health outcomes‡	Insufficient evidence to recommend for or against Evidence is lacking, of poor quality, or conflicting, and the balance of benefits and harms cannot be determined
Transvaginal ultrasound for endometrial and ovarian cancer	Every year beginning at age 30–35 yr	Evidence is insufficient to assess the effects on health outcomes‡	Insufficient evidence to recommend for or against Evidence is lacking, of poor quality, or conflicting, and the balance of benefits and harms cannot be determined
Urinalysis with cytology	Every 1–2 yr beginning at age 25–35 yr	Evidence is insufficient to assess the effects on health outcomes‡	Insufficient evidence to recommend for or against Evidence is lacking, of poor quality, or conflicting, and the balance of benefits and harms cannot be determined
History and examination with detailed review of systems, education, and counselling regarding Lynch syndrome	Every year beginning at age 21 yr	Evidence is insufficient to assess the effects on health outcomes‡	Insufficient evidence to recommend for or against Evidence is lacking, of poor quality, or conflicting, and the balance of benefits and harms cannot be determined
Prophylactic surgery Colorectal resection (segmental v. subtotal colectomy v. complete proctocolectomy)	For at-risk persons without colorectal neoplasia: generally not recommended, discuss as alternative to regular colonoscopy, with preferences of well-informed patient actively elicited For persons with a diagnosed cancer or polyp not resectable by colonoscopy, § subtotal colectomy favoured with preferences of well-informed patient actively elicited	Evidence is insufficient to assess the effects on health outcomes‡	Insufficient evidence to recommend for or against Evidence is lacking, of poor quality, or conflicting, and the balance of benefits and harms cannot be determined
Hysterectomy or oophorectomy	Discuss as option after childbearing completed	Good–fair¶	No recommendation for or against There is at least fair evidence that the guideline can improve health outcomes but the balance of benefits and harms is too close to justify a general recommendation

표 5. *Adapted from the US Preventive Services Task Force's 2-tier system to assess the quality of evidence and to assign strength of recommendations in support of each guideline. †While the quality of evidence supporting colon examination is good, the optimal frequency and initiation age have not been adequately studied. ‡Because of limited number or power of studies, important flaws in their design or conduct, gaps in the chain of evidence, or lack of information on important health outcomes. §Resection of a colon neoplasm is therapeutic, not prophylactic. At issue is the extent of resection — if greater than otherwise required by usual surgical considerations, then it carries an element of prophylaxis. Because all persons in this group will be undergoing surgery, there is opportunity to consider prophylactic removal of much or all of the colon. For women, the discussion should include option of having a hysterectomy or oophorectomy at the same time. ¶Defined as evidence that includes consistent results from well-designed, well-conducted studies in representative populations that directly assess effects on health outcomes but the strength of the evidence is limited by the number, quality, or consistency of the individual studies, generalizability to routine practice, or indirect nature of the evidence on health outcomes.

Biallelic DNA MMR genes

린치 증후군은 상염색체 우성 유전으로 대개 heterozygous 변이이다. 그러나 아주 일부의 경우 부모 모두가 린치 증후군일 경우, 그 자손은 biallelic DNA MMR 변이를 일으키게 되고 임상양상이 린치 증후군과 차이가 난다. 2007년까지 30 가족에서 최소 50명의 환자가 MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 gene이 homozygous나 다른 2 gene이 합쳐 compound heterozygous로 유전되었다고 보고되었다. 이들은 대개 생후 10년 이내에 glioma, astrocytoma, medulloblastoma, oligodendroglioma 등의 뇌종양과 혈액학적 종양이 발생하였으며, 환자의 단백질 기능이 남아 있을 경우도 이런 종양이 20대에서 40대에서는 발생하였다. 특히 대장 직장암도 심한 경우에 9세에 발병하는 등 매우 이른 시기에 발병하였다.

린치 증후군과 가장 큰 차이가 나는 부분은 neurofibromatosis type-1(NF1)과 유사한 표현형이 나타난다는 것이다. Cafe-au-lait macule이 다발성으로 발생하고 겨드랑이와 서혜부에 주근깨가 있고 혀와 피부에 neurofibroma가 발생하며, iris Lisch nodule이 발견되기도 한다(154). 이런 현상은 Felton et al.이 두 가지 가설로 정리하였는데, 하나는 이런 NF1 유사 임상양상이 neurofibromin gene과 관련이 없고 MMR 결함과 관련된 이차적 이벤트라는 것이고 또 한가지는 NF1 발현에 영향을 주는 변이가 존재하나 아직까지 밝혀지지 않았다는 것이다(155)

가족성 대장직장암 증후군 X(Familial Colorectal Cancer Syndrome X)

앞서 언급했듯이 AC-1을 충족하나 MMR gene 결함이 없는 환자군을 familial colorectal cancer syndrome X(이하 syndrome X)라 명명한다. 즉, 유전적 소인을 가지고 있으면서 gene defect는 없는 환자 군으로 AM-1 충족 환자의 무려 45%(156)를 차지하며 임상 양상도 린치 증후군과 차이가 있다. Lindor et al.(156)이 161 가족, 3422명의 AC-1 충족 군을 대상으로 한 연구에서 71가족, 1567명이 syndrome X로 분류되었다. 이들의 대장직장암 발병률은 standard incidence ratio 2.3으로 린치 증후군 환자들에 비해서는 위험도가 낮았으며 평

균 발병 연령도 61세로 49세인 린치 증후군 환자들에 비해 늦게 발병하였다. 그리고 린치 증후군에서 발생하는 대장 외 종양의 위험성이 syndrome X에서는 증가되지 않는다고 보고하였다. Syndrome X 환자군에서 좌측 대장에 종양이 있는 경우가 더 많았고 lymphocytic infiltration은 발견되지 않았다(157).

Syndrome X의 원인에 대해서는 여러 가지 가설이 있으나 제대로 밝혀진 것은 없다. 특정 가족의 공통된 환경에 인해서 일 가능성도 있고, 아직 밝혀지지 않은 유전자 변이가 있을 수도 있다. 그 중 한 가설은 강도가 약한 대장직장암 유발 대립형질들이 결합되어서 syndrome X를 일으킨다는 것인데, 최근 whole genome association(WGA) 스캔법으로 많은 연구가 되고 있다(158). 또한 syndrome x 환자군에서 CpG island methylation이 일어나긴 하나 높은 수준으로 일어나는 경우는 전혀 없었으며, global methylation의 표지자인 LINE-1(long interspersed nucleotide element-1)이 다른 대장암(림치 증후군이나 산발성 대장암)보다 현저히 낮은 수준으로 나타나는 것으로 보아 암 발생에 중요한 기전일 수도 있다는 연구도 있다(159).

Part. 2

대한민국 제주도에 거주하는 린치 증후군 환자 가족에서 발견된 3개의 새로운 MLH1과 MSH2 생식 계열 변이(germline mutation)

우리는 대한민국 제주도에 거주하는 린치 증후군 환자 다섯 가족을 연구 관찰하여 MLH1과 MSH2 유전자의 변이와 분자학적, 임상적 특징을 기술하였다.

대상 및 방법

환자

이 연구에 참여한 환자들은 모두 제주 국립 대학병원에서 모집하였다. 2009년에 대장암으로 진단 받고 수술 한 56명의 환자 중, 11명의 린치 증후군 의심 환자(베세다 가이드라인(Betheda guideline) 7에 근거하여 40세 이전에 최소한 하나의 adenoma를 가진 환자)가 이 연구에 참여하였다. 이 연구는 제주 국립 대학병원 임상시험 심사위원회(Institutional Review Board)의 승인을 받았으며 모든 환자 또는 그 부모로부터 유전자 분석에 관한 사전 동의를 받았다.

Total RNA의 분리와 RT-PCR

Total RNA는 RNeasy® Mini Kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)을 이용하여 제조사의 설명서를 따라 백혈구로부터 추출하였다. First-strand cDNA는 25 ng/ml의 oligo (dT)(Promega, Madison, WI, USA)와 0.5 mM dNTP mix, 0.2 U/μl의 Omniscript(Qiagen), 0.5 U/μl의 RNase를 이용하여 2 μg의 RNA로부터 합성하였다. 생산된 cDNA는 0.2 mM dNTP mix, 0.4 μM primer, 1.25 U/ml Taq polymerase(Promega)를 포함한 50 μl PCR 반응으로 증폭되었고 MLH1 cDNA 분석에 이용되었던 시발체(primer)를 사용하였다;

Forward (1)-ATTGGCTGAAGGCACTTCCGTTG, Forward
(2) - T G G C T T T C G A G G T G A G G C T T T G , F o r w a r d
(3) - A C T A C C C A A T G C C T C A A C C G T G G , F o r w a r d
(4) - A G A G C A A G C T C C T G G G C T C C A A T , F o r w a r d
(5) - G G A T T A C C C C T T C T G A T T G A C A A C , R e v e r s e
(1) - A C A G C A T T T C C A A A G A T G G A G C G , R e v e r s e
(2)-CTTCCACCATTTCACATCAGAA, Reverse (3)-CTGGCT
CCGATAACCTGAGAACA, Reverse (4)-CCGGAATACTATCAGAAGGCAA,

MSH2 분석에 이용된 시발체(primer)는 다음과 같다; Forward (1)-GGCGGAAACAGCTTAGTGGGTG, Forward (2)-T C C C T G A T A A T G A T C A G T T C TCC, Forward (3)-AGATTGTTACCGACTCTATCAGGG, Forward (4) - C T T C A G G C T A T G T A G A A C C A A T G C , Forward (5) - G C C C T G G A A C T T G A G G A G T T T C A , Reverse (1) - C C A T G A G A G G C T G C T T A A T C C A C , Reverse (2) - A C T C G G G C T A A G A T G C A G T C C A C , Reverse (3)-GTGTAACTGTCAGTGCCCA TGGG, Reverse (4)-TGCA AACAGT CCTCAGTTACAGC. 다음과 같은 온도 조건이 적용되었다: 10초 동안 94℃로 35 주기의 변성(denaturation), 1분 동안 72℃로의 extension. PCR 결과물은 2% agarose gel로 분리 하였고, ethidium bromide를 이용하여 시각화하였다.

MLH1의 Exon 11 부분의 유전체(genomic) DNA 분리와 증폭

유전체 DNA는 Wizard Genomic DNA purification Kit(Promega)를 이용하여 제조사의 설명서에 따라 말초혈액에서부터 추출하였다. MLH1의 exon 11 부위의 유전체 DNA는 10pM의 forward, reverse 시발체(forward, C A C A G C T C T T A A G T A G C A G T G C C ; r e v e r s e , CCTAGGAACAACAGCACAATACC), 0.2mM dNTPs, 100mM TrisHCL(pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂ 2U의 Taq polymerase(Promega)를 함유한 50 ml의 reaction mixture로 PCR 증폭하였다. 1분 동안 95℃로 35 주기, 1분 동안 59℃, 또 1분 동안 72℃, 마지막으로 5분 동안 72℃로 extension 하였다. PCR 결과물은 1.5% agarose gel로 분리하였고 ethidium bromide를 이용하여 시각화 하였다.

Sequence 분석

PCR 증폭 결과물은 QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)을 이용하여 정제하였고, ABI-Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction

Kit와 ABI Prism 3130 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 양 방향으로 직접 sequencing 하여 분석하였다. Sequencing 반응에 이용한 시발체는 PCR 분석에 이용한 것과 동일하다(표 6). 린치 증후군 환자군과 건강 통제군의 sequence는 BLAST 분석법으로 GenBank database의 리스트와 비교하였다.

결과

연구에 참가한 모든 환자는 대장암으로 진단받았고 린치 증후군으로 의심 되었으므로(베세다 가이드라인(Betheda guideline) 7에 근거하여 40세 이전에 최소한 하나의 adenoma를 가진 환자), MLH1과 MSH2 유전자를 직접 시퀀싱 하였다. 11명의 서로 연관 없는 환자들로부터 5개의 생식 계열 변이를 발견하였고(표 6), 그 중 3개의 변이는 린치 증후군에 대한 International Collaborative Group (<http://www.insight-group.org>)나 Human Gene Mutation Database (<http://hgmd.cf.ac.uk/ac/search.html>)에 등록되어 있지 않은 새로운 변이었다.

Patient number	Gene	Exon (intron)	Mutation	Type
1	MLH1	11	937_942dupGAAGTT Glu313_Val314dup	Insertion of two amino acids
2	MLH1	11	c.912T > C	Polymorphism
		12	c.1185T > A (Phe396Ile)	missense
		17	c.1958G > A	Polymorphism
	MSH2	5	c.884A > G (Asp295Gly)	Missense
		11	c.1666T > C (Lys808Glu)	Missense
		15	c.2564A > C (Gln855Phe)	Missense
		16	c.2651T > C (Ile883Thr)	Missense
3	MLH1	8-10	c.677G > A (Arg226Gln) c.884+386delCTGAGGTG	Deletion of exons 8-10
4	MLH1	10	c.884+4A > G	Deletion
5	MLH1	12	c.1151T > A (Val384Asp)	Missense

표 6. Mutations detected in Lynch syndrome patients

환자 1

환자의 모친과 두 명의 자손들에도 MLH1과 MSH2의 코딩 시퀀스를 분석하였다. 이들은 모두 MLH1에 새롭게 발견된 GAAGTT 중복(duplication) (937_942dupGAAGTT)을 가지고 있어 Glu313와 Val314의 중복을 야기시켰다 (그림 5). MSH2에는 변이가 발견되지 않았다.

환자 2

MLH1의 시퀀스 분석을 한 결과 3개의 single-base 변이를 발견하였다. 두 개의 변이는 불현성인 반면, 새로이 발견된 1185 nucleotide T>A substitution은 396번 코돈에서 phenylalanine을 코딩하고 있던 코돈을 isoleucine을 코딩하는 코돈으로 바꿨다(ATT > AAT)(그림 6A). 반면 MSH2에서는 네 개의 단 아미노산(single-amino acid) 변화가 발견되었다: D295G, K808E, Q855P, I883T (그림 6B). 이중 세 개(D295G, Q855P, I883T)는 SNP(Single nucleotide polymorphism)으로 보고 되었으나, 영향력은 아직 알려지지 않았다. 이 세 가지 변이가 한 환자에서 발견된 것은 처음이다.

환자 3

MLH1 cDNA 시퀀스 분석 결과 exon 8-10가 삭제된 새로운 변이를 발견하였다. Genomic DNA 분석 결과 두 가지 유전적 이상을 발견하였다: 스플라이싱 시퀀스(splicing sequence)를 교란시키는 Exon 8과 Intron 8 사이의 단 염기 교체(single-base substitution)(그림 7B)와 intron 10 가운데 삭제(c.884 + 386delICTGAGGTG) (그림 7C). 다른 MSH2 유전자는 변이를 보이지 않았다.

환자 4

MLH1 유전자의 intron 10에서 c.884+4A > G 변이가 발견되었다. 이 변이는 스플라이싱 결함(splicing defect)를 야기시켜 exon 10이 발견되지 않았고 해독(translation)이 조기 종료되었다. MSH2에는 변이가 발견되지 않았다.

환자 5

MLH1 시퀀스 분석 결과 1151 nucleotide T > A 교체가 발견되었고, 이는 aspartate 코딩 코돈을 valine 코딩 코돈으로 바꾸어 놓은 것이다(GTT > GAT). 이러한 V384D 변이는 아미노산 전하(charge)를 변화시켰고(중성인 valine이 산성이 aspartate로 교체), 이로 인해 단백질 구조 변화가 일어났을 가능성도 있다. 그러나 코돈 384는 유전자에서 열악하게 보존된(poorly conserved) 부위에 있어서 아미노산 교체가 어떤 기능적 중요성을 갖는지 평가하기는 어렵다. 반면, MSH2에서는 변이가 발견되지 않았다.

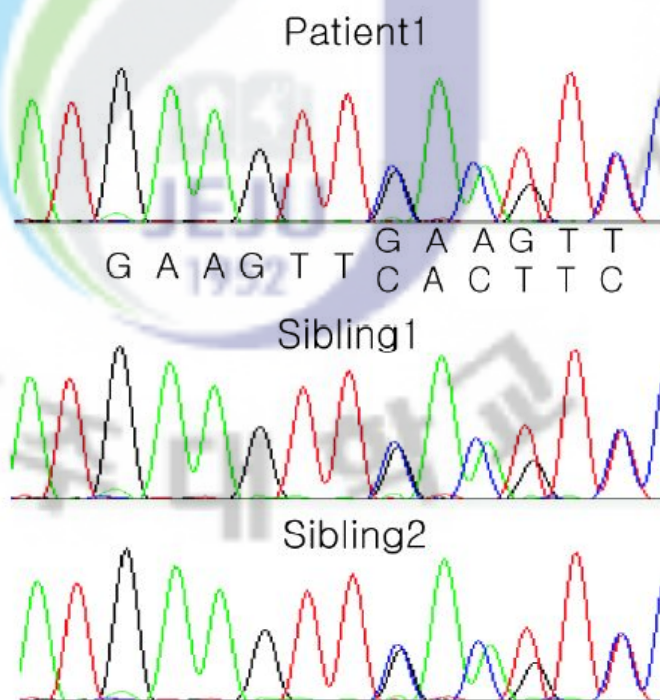
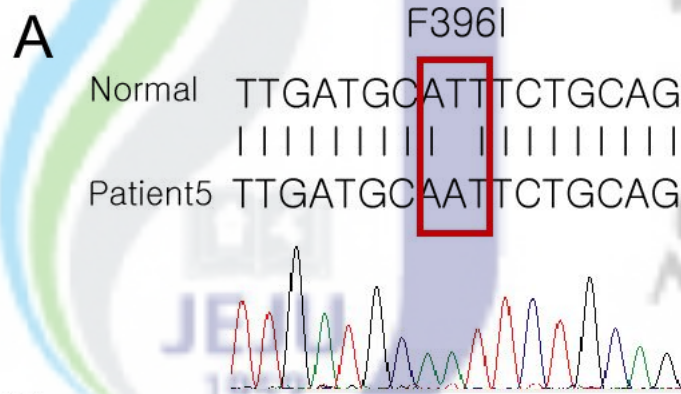
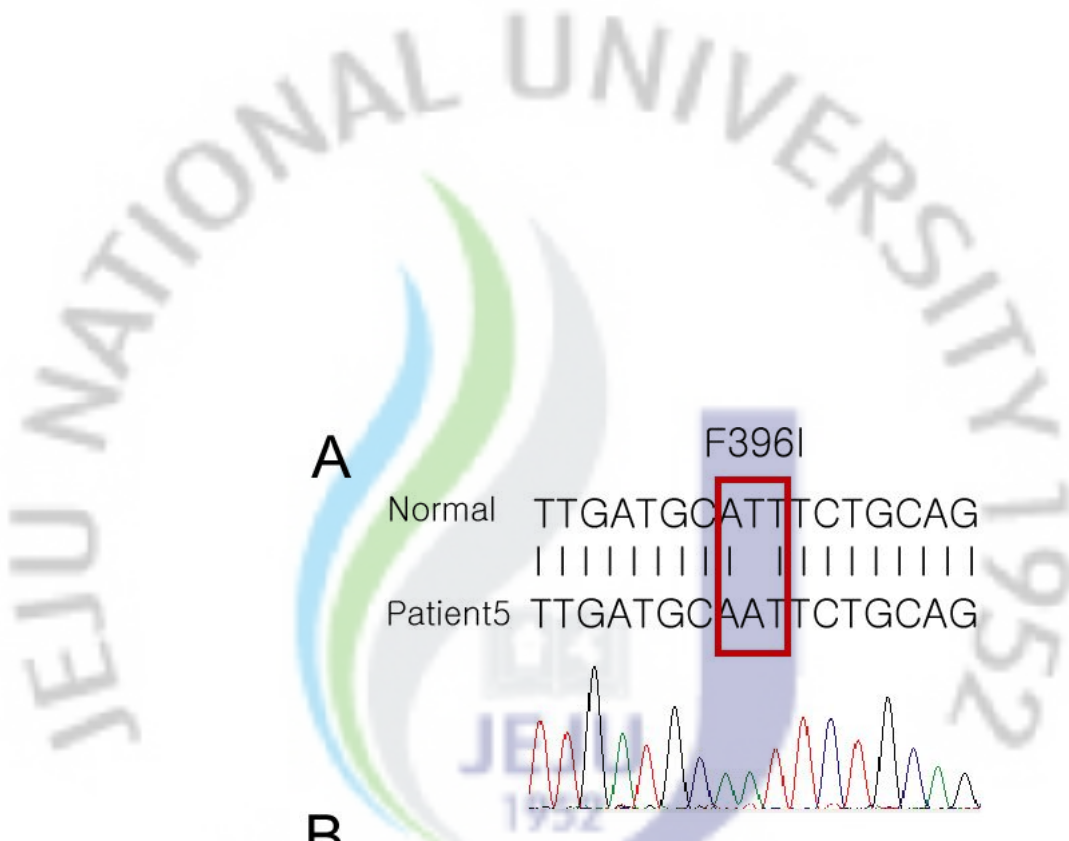


그림 5. Novel six-base duplication in *MLH1* in the family of patient 1. *MLH1* cDNA sequencing patterns in patient 1 and two siblings.



B

266 VAVSSLSAVIKFLELLSDDSNFGQFELTTFDFSQYM 300
 VAVSSLSAVIKFLELLSDDSNFGQFELTTF FSQYM
 266 VAVSSLSAVIKFLELLSDDSNFGQFELTTFGFSQYM 300

806 TTEETLTMLYQVKKGVCDQSFGIHVAELANFPKHV 840
 TTEETLTMLYQV+KGVCDQSFGIHVAELANFPKHV
 806 TTEETLTMLYQVEKGVCDQSFGIHVAELANFPKHV 840

852 EEFQYGESQGYDIMEPAAKKCYLEREQGENITQF 886
 EEF YGESQGYDIMEPAAKKCYLEREQGENI QF
 852 EEFPYGESQGYDIMEPAAKKCYLEREQGENITQF 886

그림 6. Characterization of *MLH1* and *MSH2* in patient 2. Sequence analysis of *MLH1* (A) and *MSH2* (B) in patient 2. A single-base substitution (T > A) in *MLH1* caused a Phe residue to be replaced with an Ile (A). Four single-base substitutions were detected in *MSH2* (B).

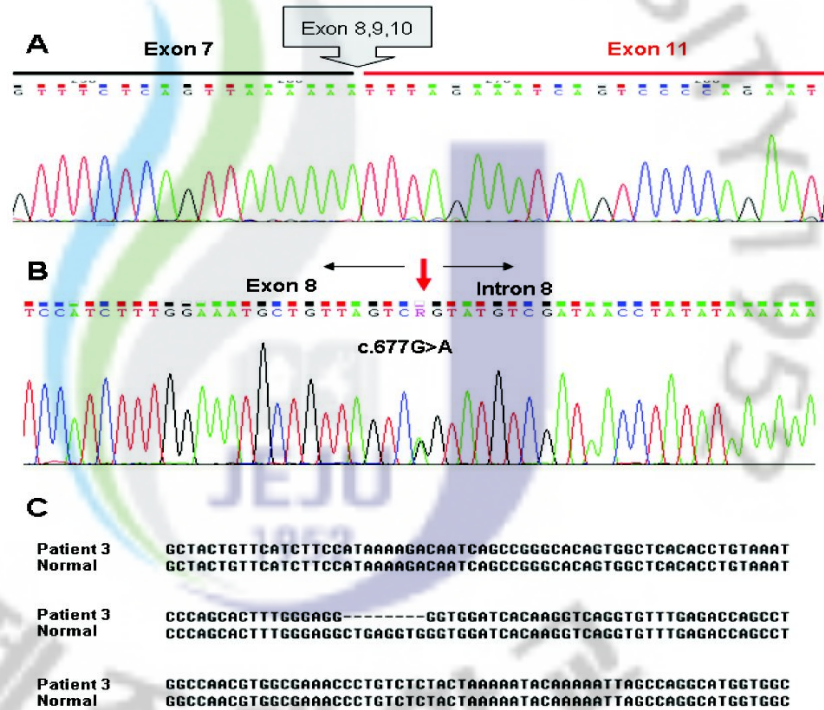


그림 7. Characterization of *MLH1* in patient 3. Sequencing pattern of the region from exon 7 to exon 11 of the *MLH1* gene in patient 3 by RT-PCR revealed the deletion of exons 8, 9, and 10 (A). Partial sequencing pattern of exon 8 and intron 8 of the *MLH1* gene in patient 3 (B). Deleted sequence in intron 10 of the *MLH1* gene in patient 3 (C). Partial genomic DNA was amplified by PCR, cloned into a TA cloning vector, and then sequenced.

고찰

이 연구에서 대한민국 제주도에 살고 있는 린치 증후군 의심 환자와 그 가족들에 대해 조사하였다. 환자 1에서 새롭게 발견된 6개의 염기 삽입으로 인해 두 개의 아미노산 중복(Glu313, Val 314)이 새로운 관찰되었다. 이 변이는 전사(transcription)나 해독(translation)의 절단(truncation)이나 조기 종료는 일으키지 않았다. ATP-binding 도메인에 위치한 이 변이의 중요성은 아직 밝혀지지 않았다. 그러나 Drost et al.(160)에 따르면 ATP binding 도메인에 위치한 모든 점 변이(point mutation) (31, 37, 38, 44, 67, 93, 109, 111, 265)는 MMR(mismatch repair) 활동성의 지대한 손실을 유발하여 질환을 유발 할 수 있다.

환자 2는 MSH2에 다수의 변이를 가지고 있었다(Fig. 2). 이 변이(D295G, Q855P, K808E, I883T)는 MSH2가 MSH3와 MSH6와 상호작용하는 연결 도메인(connector domain)과 helix-turn-helix 도메인에 위치한다. 아미노산에도 큰 변화가 있었다. D295G와 Q855P 교체는 전하를 변화시켰다. 또, aspartic acid가 전하가 있는 아미노산인 반면, proline은 닫힌 고리(closed ring)의 아미노산이므로 peptide chain의 방향을 바뀔 수도 있다. 이 환자에서 발견된 변이가 반드시 MMR 활동성의 상실을 의미하지는 않고, MSH6, PMS1, PMS2의 기능적 변이 가능성도 있으나, 한 환자에서 발생한 다수의 변이는 MMR 활동성을 떨어뜨릴 가능성이 매우 많다.

환자 3은 exon 8-10의 삭제로 인한 조기 종결 코돈이 생성되었고, 잘려진 비기능성 단백질의 생산을 야기하였다. 환자의 DNA에서는 두 가지 변이가 관찰되었는데, 첫째는 exon 8과 intron 8 사이 결합부위의 미스센스(missense) 변이(c.677G > A) 이고, 두번째는 intron 10에서의 8 염기 삭제(c.884+386delCTGAGGTG)이다. c.677G > A 미스센스 변이는 exon 8의 삭제의 원인으로 알려져 있다(161). 우리는 발견된 이 두 가지의 변이가 exon 8-10 삭제를 유발했다고 가정한다. 그러나 exon 9와 intron 9가 왜 이 변이에 의해 영향 받았는지는 설명되지 않는다. 우리는 exonic splicing enhancer(ESEs)가 기능을 못했다든지 exonic splicing silencer가 형성 된 것으로 생각하고 있다.

환자 4는 exon 10의 삭제가 있었다(162). MLH1과 MSH2 내의 틀이동 변이

(frameshift mutation)가 하나의 대립 유전자(allele)을 비활성화 시킨 것이 발병의 원인으로 생각된다. 뒤이은 MMR 자리(locus)의 기능적 장애가 체세포 변이(somatic mutation)을 일으켜 암이 발병된 것으로 보인다.

린치 증후군 환자에서 대다수의 MMR 유전자 변이는 절단으로 인해 변형된 polypeptide의 기능 상실에 의해 발병한다. 이러한 변이 중 아미노산 교체로 인한 변이는 큰 부분을 차지하나(MSH2 ~15%, MLH1 ~30%, MSH6 ~40%), DNA 보수(repair)에 어떤 영향을 미치는지는 확실하지 않다. 단 아미노산 교체는 반드시 기능을 잃은 단백질을 생산하지는 않는다. 그러나 단 아미노산 교체는 각 변이의 특성에 따라 부분적으로 활성이거나, 우성 음성(dominant-negative), 불안정, 또는 기능 상실 단백을 생성할 수 있다. 미스센스 변이에 의한 MMR 결함은 효소 기능의 상실(ATP 결합/가수분해)[1]; 단백질-단백 간 상호작용의 결함(복합체 형성)[2]; 단백질-DNA 결합 결함(mismatch 인식)[3]; MMR 단백질의 세포 내 위치 이상(aberrant MMR protein subcellular localization)[4]; MMR 단백질 표현 변화(MMR 복합체의 화학양론(stoichiometry))[5]; MMR 단백질 안전성의 변화[6] 등을 일으킬 수 있다. 최근 Drost et al.(160)은 MLH1 분석에 세포를 필요치 않는 새로운 검사법을 언급하였다. 이 연구에서 25 명의 VUS(variants of uncertain significance) 사례를 분석한 결과, 그 중 19명은 병인으로 생각될 수 있는 확연한 복구 활동 장애가 있었다.

환자 5에서는 동아시아 인에서만 발견되는 V384D 변이가 발견되었다(163). V384는 NH₂-terminal ATP 결합 도메인과 COOH-terminal PMS2 상호작용 도메인 사이, MLH1 단백질 중심 부위에 위치한다. V384D 변이는 전체적인 전하에 변화를 일으키고(중성, 친수성의 아미노산 valine이 약산성, 음전하의 아미노산인 aspartate로 교체), 구조에도 영향을 끼쳐 결과적으로 MLH1의 안정성에 영향을 준다. 최근의 연구에 따르면 MLH1에 V364D 변이를 가진 경우 시험관 내 실험에서 MMR 활동성이 줄어드는 것으로 보고되었다(정상 활동성 보다 65%정도 감소). 한편, 면역침강분석법(immunoprecipitation analysis)에서 PMS2와의 상호작용이 부분적으로 유지되었음에도 불구하고, 효소단백질잡종 분석(yeast two-hybrid assay) 결과 B-galactosidase 활성도가 감소되어 있었다. 이는 변이가 MLH1과 PMS2의 상호작용을 약화시켰으나, 보고 유전자(reporter gene,

lacZ)가 활성화 될 정도로는 강하지 않기(Gal4 시스템에서) 때문이라 생각된다. 전하와 극성은 단백질의 구조와 기능, 특히 이차 구조를 형성하는데, 중요하다. 따라서 이러한 부위에서의 단백질 교체는 MLH1 나선(helix)간의 상호작용에 영향을 끼쳐 ATP 결합 또는 가수분해 능력에 영향을 끼칠 수 있다.

참고문헌

1. Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, et al. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89:1758-1762.
2. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, et al. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. *Gastroenterology.* 1999;116:1453-1456.
3. International Agency for Research on Cancer. Globocan 2002. Available at: <http://www-dep.iarc.fr/>. 2008: accessed on: 25 November 2008.
4. Hampel H, Frankel WL, Martin E et al. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5783-5788.
5. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, et al. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum.* 1991; 34:424-425.
6. Lynch HT, Drouhard TJ, Schuelke GS, et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer in a Navajo Indian family. *Cancer Genet Cytogenet.* 1985;15:209-213.

7. Boland CR, Troncale FJ. Familial colonic cancer without antecedent polyposis. *Ann Intern Med.* 1984;100:700-701.

8. Lindor NM, Petersen GM, Hadley DW et al. Recommendations for the care of individuals with an inherited predisposition to Lynch syndrome: A systematic review. *JAMA* 2006; 296: 1507-1517.

9. Mecklin JP, Sipponen P, Jarvinen HJ. Histopathology of colorectal carcinomas and adenomas in cancer family syndrome. *Dis Colon Rectum.* 1986;29:849-853.

10. Warthin AS. Heredity with reference to carcinoma as shown by the study of the cases examined in the pathological laboratory of the University of Michigan, 1895-1913. *Arch Intern Med* 1913; 12: 546-555.

11. Lynch HT, Shaw MW, Magnuson CW et al. Hereditary factors in cancer: study of two large Midwestern kindreds. *Arch Intern Med* 1966; 117: 206-212.

12. Vasen HFA, Mecklin J-P, Meera Khan P et al. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991;34: 424-425.

13. Vasen HFA, Watson P, Mecklin J-P. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999;116:1453-1456.

14. 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: 261–268.

15. Peltomäki P, Aaltonen L, Sistonen P. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science* 1993; 260: 810–812.

16. Lindblom A, Tannergard P, Werelius B et al. Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 1993; 5: 279–282.

17. Ionov YM, Peinado MA, Malkhosyan S et al. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993;363: 558–561.

18. Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993;260: 812–816.

19. Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993; 75: 1027–1038.

20. Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993; 75: 1215–1225.

21. Bronner CE, Baker SM, Morrison PT et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 1994; 368: 258–261.

22. Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei Y-F et al. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 1994; 263: 1625-1629.

23. Hendriks YMC, Wagner A, Morreau H et al. Cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer due to MSH6 mutations: impact on counseling and surveillance. *Gastroenterology* 2004; 127: 17-25.

24. Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B et al. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 1994; 371: 75-80.

25. Kolodner RD, Marsischky GT. Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9:89-96.

26. Modrich P, Lahue R. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem* 1996; 65:101-133.

27. Lynch HT, de la Chapelle A. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 1999; 36:801-818.

28. 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):1453-6.

29. Peltomäki P, Vasen HF. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 1997;113(4):1146-58.

30. Papp J, Kovacs ME, Olah E. Germline MLH1 and MSH2 mutational spectrum including frequent large genomic aberrations in Hungarian hereditary non-polyposis colorectal cancer families: implications for genetic testing. *World J Gastroenterol.* 2007;13(19):2727-32

31. Peltomäki P, Vasen H. Mutations associated with HNPCC predisposition -- Update of ICG-HNPCC/INSiGHT mutation database. *Dis Markers.* 2004;20(4-5):269-76.

32. Park YJ, Shin KH, Park JG. Risk of gastric cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer in Korea. *Clin Cancer Res.* 2000;6(8):2994-8.

33. Oliveira Ferreira F, Napoli Ferreira CC, Rossi BM, et al. Frequency of extra-colonic tumors in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) and familial colorectal cancer (FCC) Brazilian families: An analysis by a Brazilian Hereditary Colorectal Cancer Institutional Registry. *Fam Cancer.* 2004;3(1):41-7.

34. Peltomaki P, Vasen H. Mutations associated with HNPCC predisposition—update of ICG-HNPCC/INSiGHT mutation database. *Dis Markers.* 2004;20:269-276.

35. Wu Y, Berends MJ, Mensink RG, et al. Association of hereditary nonpolyposis colorectal cancer-related tumors displaying low microsatellite instability with MSH6 germline mutations. *Am J Hum Genet.* 1999;65(5):1291-8.

36. Wijnen J, de Leeuw W, Vasen H, et al. Familial endometrial cancer in female carriers of MSH6 germline mutations. *Nat Genet.* 1999;23(2):142-4.
37. Akiyama M, Sato H, Yamada T, et al. Germ-line mutation of the hMSH6/GTBP gene in an atypical hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindred. *Cancer Res.* 1997;57(18):3920-3.
38. Plaschke J, Kruppa C, Tischler R, et al. Sequence analysis of the mismatch repair gene hMSH6 in the germline of patients with familial and sporadic colorectal cancer. *Int J Cancer* 2000;85(5):606-13.
39. Kolodner RD, Tytell JD, Schmeits JL, et al. Germ-line msh6 mutations in colorectal cancer families. *Cancer Res.* 1999;59(20):5068-74.
40. Nakagawa H, Lockman JC, Frankel WL, et al. Mismatch repair gene PMS2: disease-causing germline mutations are frequent in patients whose tumors stain negative for PMS2 protein, but paralogous genes obscure mutation detection and interpretation. *Cancer Res.* 2004;64(14):4721-7.
41. Iyer RR, Pluciennik A, Burdett V, Modrich PL. DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem Rev.* 2006;106(2):302-23.
42. Modrich P. Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. *J Biol Chem.* 2006;281(41):30305-9.
43. Peltomäki P. Lynch syndrome genes. *Fam Cancer.* 2005;4(3):227-32.
44. Kolodner RD, Marsischky GT. Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr*

Opin Genet Dev. 1999;9(1):89-96.

45. Jiricny J. Mediating mismatch repair. Nat Genet. 2000;24(1):6-8.

46. Huang J, Kuismanen SA, Liu T, et al. MSH6 and MSH3 are rarely involved in genetic predisposition to nonpolyposis colon cancer. Cancer Res. 2001;61(4):1619-23.

47. Ohmiya N, Matsumoto S, Yamamoto H, Baranovskaya S, Malkhosyan SR, Perucho M. Germline and somatic mutations in hMSH6 and hMSH3 in gastrointestinal cancers of the microsatellite mutator phenotype. Gene. 2001;272(1-2):301-13.

48. Gradia S, Acharya S, Fishel R. 2000. J.Biol. Chem. 275:3922-30

49. Schofield MJ, Brownwell FE, Nayak S, Du C, Kool ET, Hsieh P. 2001. J. Biol. Chem. 276:45505-8

50. Thomas A. Kunkel and Dorothy A. Erie DNA mismatch repair Annu. Rev. Biochem. 2005. 74:681-710

51. Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. Nature 1994; 368:258-261.

52. Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, et al. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. Nature 1994; 371:75-80.

53. Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, et al. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 1994;263:1625-1629.
54. Lipkin SM, Wang V, Jacoby R, et al. MLH3: a DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability. *Nat Genet* 2000; 24:27-35.
55. Kunkel TA, Erie DA. DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem* 2005; 74:681-710.
56. Zhang Y, Yuan F, Presnell SR, et al. Reconstitution of 5'-directed human mismatch repair in a purified system. *Cell* 2005; 122:693-705.
57. Kadyrov FA, Dzantiev L, Constantin N, Modrich P. Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair. *Cell* 2006; 126:297-308.
58. Gu L, Hong Y, McCulloch S, Watanabe H, Li GM. ATP-dependent interaction of human mismatch repair proteins and dual role of PCNA in mismatch repair. *Nucleic Acids Res* 1998;26:1173-1178.
59. Umar A, Buermeier AB, Simon JA, et al. Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. *Cell* 1996; 87:65-73.
60. Lau PJ, Kolodner RD. Transfer of the MSH2.MSH6 complex from proliferating cell nuclear antigen to mispaired bases in DNA. *J Biol Chem* 2003; 278:14-17.

61. Shell SS, Putnam CD, Kolodner RD. The N terminus of *Saccharomyces cerevisiae* Msh6 is an unstructured tether to PCNA. *Mol Cell* 2007; 26:565-578.

62. Guo S, Presnell SR, Yuan F, Zhang Y, Gu L, Li GM. Differential requirement for proliferating cell nuclear antigen in 5' and 3' nick-directed excision in human mismatch repair. *J Biol Chem* 2004; 279:16912-16917.

63. Amin NS, Nguyen MN, Oh S, Kolodner RD. *exo1*-Dependent mutator mutations: model system for studying functional interactions in mismatch repair. *Mol Cell Biol* 2001; 21:5142-5155.

64. Nielsen FC, Jager AC, Lutzen A, Bundgaard JR, Rasmussen LJ. Characterization of human exonuclease 1 in complex with mismatch repair proteins, subcellular localization and association with PCNA. *Oncogene* 2004; 23:1457-1468.

65. Tran PT, Erdeniz N, Symington LS, Liskay RM. EXO1-A multi-tasking eukaryotic nuclease. *DNA Repair (Amst)* 2004;3:1549-1559.

66. Schmutte C, Marinescu RC, Sadoff MM, Guerrette S, Overhauser J, Fishel R. Human exonuclease I interacts with the mismatch repair protein hMSH2. *Cancer Res* 1998; 58:4537-4542.

67. Tishkoff DX, Amin NS, Viars CS, Arden KC, Kolodner RD. Identification of a human gene encoding a homologue of *Saccharomyces cerevisiae* EXO1, an exonuclease implicated in mismatch repair and

recombination. *Cancer Res* 1998; 58:5027-5031.

68. Tishkoff DX, Boerger AL, Bertrand P, et al. Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* EXO1, a gene encoding an exonuclease that interacts with MSH2. *Proc Nat Acad Sci USA* 1997; 94:7487-7492.

69. Dzantiev L, Constantin N, Genschel J, Iyer RR, Burgers PM, Modrich P. A defined human system that supports bidirectional mismatch-provoked excision. *Mol Cell* 2004; 15:31-41.

70. Ramilo C, Gu L, Guo S, et al. Partial reconstitution of human DNA mismatch repair in vitro: characterization of the role of human replication protein A. *Mol Cell Biol* 2002; 22:2037-2046.

71. Zhang Y, Yuan F, Presnell SR, et al. Reconstitution of 5'-directed human mismatch repair in a purified system. *Cell* 2005; 122:693-705.

72. Guo S, Zhang Y, Yuan F, et al. Regulation of replication protein A functions in mismatch repair by phosphorylation. *J Biol Chem*, 2006; 281:21607-21616.

73. Guarne A, Ramon-Maiques S, Wolff EM, et al. Structure of the MutL C-terminal domain: a model of intact MutL and its roles in mismatch repair. *Embo J* 2004; 23:4134-4145.

74. Junop MS, Obmolova G, Rausch K, Hsieh P, Yang W. Composite active site of an ABC ATPase: MutS uses ATP to verify mismatch recognition and authorize DNA repair. *Mol Cell* 2001; 7:1-12.

75. Allen DJ, Makhov A, Grilley M, et al. MutS mediates hetero-duplex loop formation by a translocation mechanism. *Embo J* 1997; 16:4467-4476.

76. Fishel R. Mismatch repair, molecular switches, and signal transduction. *Genes Dev* 1998; 12:2096-2101.

77. Gradia S, Acharya S, Fishel R. The human mismatch recognition complex hMSH2-hMSH6 functions as a novel molecular switch. *Cell* 1997; 91:995-1005.

78. Jiang J, Bai L, Surtees JA, Gemici Z, Wang MD, Alani E. Detection of high-affinity and sliding clamp modes for MSH2-MSH6 by single-molecule unzipping force analysis. *Mol Cell* 2005; 20:771-781.

79. Mendillo ML, Mazur DJ, Kolodner RD. Analysis of the interaction between the *Saccharomyces cerevisiae* MSH2-MSH6 and MLH1-PMS1 complexes with DNA using a reversible DNA end-blocking system. *J Biol Chem* 2005; 280:22245-22257.

80. Boland CR. Evolution of the nomenclature for the hereditary colorectal cancer syndromes. *Fam Cancer* 2005; 4:211-218.

81. Kane MF, Loda M, Gaida GM et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res* 1997; 57: 808-811.

82. Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ et al. Hyper-methylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res* 1998; 58: 3455-3460.

83. Marcus V, Madlensky L, Gryfe R et al. Immunohistochemistry for hMLH1 and hMSH2: A practical test for DNA mismatch repair-deficient tumors. *Am J Surg Pathol* 1999; 23: 1248-1255.

84. Haugen AC, Goel A, Yamada K et al. Genetic instability caused by loss of MutS homologue 3 in human colorectal cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 8465-8472.

85. Gryfe R, Kim H, Hsieh ETK et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000; 342: 69-77.

86. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003; 349: 247-257.

87. Hendriks YMC, Wagner A, Morreau H et al. Cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer due to MSH6 mutations: impact on counseling and surveillance. *Gastroenterology* 2004; 127: 17-25.

88. Baudhuin LM, Burgart LJ, Leontovich O et al. Use of microsatellite instability and immunohistochemistry testing for the identification of individuals at risk for Lynch syndrome. *Fam Cancer* 2005; 4: 255-265.

89. Raevaara TE, Korhonen MK, Lohi H et al. Functional significance and clinical phenotype of nontruncating mismatch repair variants of MLH1 . Gastroenterology 2005: 129:537–549.

90. Blasi MF, Ventura I, Aquilina G et al. A human cell-based assay to evaluate the effects of alterations in the MLH1 mismatch repair gene. Cancer Res 2006: 66: 9036–9044z.

91. Boland CR, Fishel R. Lynch syndrome: form, function, proteins, and basketball. Gastroenterology 2005: 129:751–755.

92. Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O et al. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. J Clin Oncol 2002: 20:1043–1048.

93. Hemminki A, Peltomaki P, Mecklin JP, et al. Loss of the wild type MLH1 gene is a feature of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Nat Genet. 1994;8:405–410.

94. Liu B, Nicolaides NC, Markowitz S, et al. Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. Nat Genet. 1995;9:48–55.

95. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature. 2002;417:949–954.

96. Wang L, Cunningham JM, Winters JL, et al. BRAF mutations in colon cancer are not likely attributable to defective DNA mismatch repair. Cancer Res. 2003;63:5209–5212.

97. Palomaki GE, McClain MR, Melillo S, et al. EGAPP supplementary evidence review: DNA testing strategies aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome. *Genet Med*. 2009;11:42-.65.

98. Andrew M. Bellizzi, MD and Wendy L. Frankel, MD. Colorectal Cancer Due to Deficiency in DNA Mismatch Repair Function : A Review *Adv Anat Pathol* 2009;16:405-.417

99. Watson P, Lin K, Rodriguez-Bigas MA et al. Colorectal carcinoma survival among hereditary nonpolyposis colorectal cancer family members. *Cancer* 1998: 83: 259--266.

100. Ionov YM, Peinado MA, Malkhosyan S et al. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993;363: 558--561.

101. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993: 260:816--819.

102. Gryfe R, Kim H, Hsieh ETK et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000: 342: 69--77.

103. Aebi S, Kurdi-Haider B, Gordon R et al. Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. *Cancer Res* 1996: 56: 3087--3090.

104.. Carethers JM, Dharam PC, Fink D et al. Mismatch repair proficiency

and in vitro response to 5-fluorouracil. *Gastroenterology* 1999; 117: 123--131.

105. Carethers JM, Smith EJ, Behling CA et al. Use of 5-fluorouracil and survival in patients with microsatelliteunstable colorectal cancer. *Gastroenterology* 2004; 126: 394--401.

106. Benatti P, Gafa R, Barana D et al. Microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 8332--8340.

107. de Vos tot Nederveen Cappel WH, Meulenbeld HJ, Kleibeuker JH et al. Survival after adjuvant 5-FU treatment for stage III colon cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Int J Cancer* 2004; 109: 468--471.

108. Jover R, Zapater P, Castells A et al. Mismatch repair status in the prediction of benefit from adjuvant fluorouracil themotherapy in cholorectal cancer. *Gut* 2006; 55: 848--855.

109. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003; 349: 247--257.

110. Järvinen HJ, Aarnio M, Mustonen H, et al. Controlled 15-year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 2000;118:829-34.

111. Dove-Edwin I, Sasieni P, Adams J, et al. Prevention of colorectal

cancer by colonoscopic surveillance in individuals with a family history of colorectal cancer: 16 year, prospective, follow-up study. *BMJ* 2005;331:1047.

112. Lindor NM, Petersen GM, Hadley DW, et al. Recommendations for the care of individuals with an inherited predisposition to Lynch syndrome: a systematic review. *JAMA* 2006;296:1507-17.

113. Lynch HT, de la Chapelle A. Genomic medicine: hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003;348:919-32.

114. Vasen HFA, Boland CR. Progress in genetic testing, classification, and identification of Lynch syndrome. *JAMA* 2005;293:2028-30.

115. Jan J Koornstra, Marian J E Mourits, Rolf H Sijmons, Annemarie M Leliveld, Harry Hollema, Jan H Kleibeuker Management of extracolonic tumours in patients with Lynch syndrome *Lancet Oncol* 2009; 10: 400-08

116. Vasen HF, Stormorken A, Menko FH, et al. MSH2 mutation carriers are at higher risk of cancer than MLH1 mutation carriers: a study of hereditary nonpolyposis colorectal cancer families. *J Clin Oncol* 2001; 19: 4074-.80.

117 Hendriks YM, Wagner A, Morreau H, et al. Cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer due to MSH6 mutations: impact on counselling and surveillance. *Gastroenterology* 2004; 27: 17-.25.

118 Buttin BM, Powel MA, Mutch DG, et al. Penetrance and expressivity of MSH6 germ line mutations in seven kindreds not ascertained by family

history. *Am J Hum Genet* 2004; 74: 1262–.69.

119 Plaschke J, Engel C, Kruger S, et al. The German Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Consortium. Lower incidence of colorectal cancer and later age of disease onset in 27 families with pathogenic MSH6 germline mutations compared with families with MLH1 or MSH2 mutations. *J Clin Oncol* 2004; 22: 4486–.94.

120. Watson P, Vasen HF, Mecklin JP, et al. The risk of extra-colonic, extra-endometrial cancer in the Lynch syndrome. *Int J Cancer* 2008; 123: 444–.49.

121. Hadley DW, Jenkins JF, Steinberg SM, et al. Perceptions of cancer risks and predictors of colon and endometrial cancer surveillance in women undergoing genetic testing for Lynch syndrome. *J Clin Oncol* 2008; 26: 948–.54.

122. Osmers RG, Osmers M, Kuhn W. Prognostic value of transvaginal sonography in asymptomatic endometrial cancers. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1995; 6: 103–.07.

123. Dijkhuizen FP, Mol BW, Brolmann HA, Heintz AP. The accuracy of endometrial sampling in the diagnosis of patients with endometrial carcinoma and hyperplasia: a meta-analysis. *Cancer* 2000;89: 1765–.72.

124. van der Velde NM, Mourits MJ, Arts HJ, et al. Time to stop ovarian cancer surveillance in women with a BRCA1/2 mutation carriers? *Int J Cancer* 2009; 124: 919–.23.

125. Combination oral contraceptive use and the risk of endometrial cancer. The Cancer and Steroid Hormone Study of the Centers for Disease Control and the National Institute of Child Health and Human Development. JAMA 1987; 257: 796-.800.

126. Schmeler KM, Lynch HT, Chen LM, et al. Prophylactic surgery to reduce the risk of gynecologic cancers in the Lynch syndrome. N Engl J Med 2006; 354: 261-.69.

127. Lu KH. Hereditary gynecologic cancers: differential diagnosis, surveillance, management and surgical prophylaxis. Fam Cancer 2008; 7: 53-.58.

128. Renkonen-Sinisalo L, Butzow R, Leminen A, Lehtovirta P, Mecklin JP, Jarvinen HJ. Surveillance for endometrial cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Int J Cancer 2006; 120 821-.24.

129. Vasen HF, Moslein G, Alonso A, et al. Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). J Med Genet 2007; 44: 353-.62.

130. Vasen HF, Stormorken A, Menko FH, et al. MSH2 mutation carriers are at higher risk of cancer than MLH1 mutation carriers:a study of hereditary nonpolyposis colorectal cancer families. J Clin Oncol 2001; 19: 4074-.80.

131. Park YJ, Shin KH, Park JG. Risk of gastric cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer in Korea. Clin Cancer Res 2000; 6: 2994-.98.

132. Goecke T, Schulmann K, Engel C, et al. Genotype-phenotype comparison of German MLH1 and MSH2 mutation carriers clinically affected with Lynch syndrome: a report by the German HNPCC Consortium. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4285-92.

133. Gylling A, Abdel-Rahman WM, Juhola M, et al. Is gastric cancer part of the tumour spectrum of hereditary non-polyposis colorectal cancer? A molecular genetic study. *Gut* 2007; 56: 926-33.

134. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007; 56: 772-1.

135. Koornstra JJ, Kleibeuker JH, Vasen HF. Small-bowel cancer in Lynch syndrome: is it time for surveillance? *Lancet Oncol* 2008;9: 901-5.

136. Planck M, Ericson K, Piotrowska Z, et al. Microsatellite instability and expression of MLH1 and MSH2 in carcinomas of the small intestine. *Cancer* 2003; 97: 1551-7.

137. Iddan G, Meron G, Glukhovsky A, Swain P. Wireless capsule endoscopy. *Nature* 2000; 405: 417.

57 Westerhof J, Koornstra JJ, Weersma RK. Capsule endoscopy: a review from the clinician's perspectives. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2008; 54: 189-07.

138. Yamamoto H, Sekine Y, Sato Y, et al. Total enteroscopy with a nonsurgical steerable double-balloon method. *Gastrointest Endosc* 2001;

53: 216-0.

139. Geary J, Sasieni P, Houlston R, et al. Gene-related cancer spectrum in families with hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC). *Fam Cancer* 2008; 7: 163-2.

140. Lynch HT, Fusaro RM, Lynch JF, Brand R. Pancreatic cancer and the FAMMM syndrome. *Fam Cancer* 2008; 7: 103-2.

141. Sijmons RH, Kiemeny LA, Witjes JA, Vasen HF. Urinary tract cancer and hereditary nonpolyposis colorectal cancer: risks and surveillance options. *J Urol* 1998; 160: 466-0.

142. Myrhoj T, Andersen MB, Bernstein I. Surveillance for urinary tract cancer with urine cytology in Lynch syndrome and familial colorectal cancer. *Fam Cancer* 2008; 7: 303-7.

143. Lodde M, Mian C, Wiener H, Haitel A, Pycha A, Marberger M. Detection of upper urinary tract transitional cell carcinoma with ImmunoCyt: a preliminary report. *Urology* 2001; 58: 362-6.

144. Ho KJ, Kuo SH. Urinary beta-glucuronidase activity as an initial surveillance test for urinary tract malignancy in high risk patients. Comparison with conventional urine cytologic evaluation. *Cancer* 1995; 76: 473-8.

145. Chen AA, Grasso M. Is there a role for FISH in the management and surveillance of patients with upper tract transitional-cell carcinoma? *J Endourol* 2008; 22: 1371-4.

146. Ho CL, Tzai TS, Chen JC, et al. The molecular signature for urothelial carcinoma of the upper urinary tract. *J Urol* 2008;179: 1155-9.

147. Rodgers M, Nixon J, Hempel S, et al. Diagnostic tests and algorithms used in the investigation of haematuria: systematic reviews and economic evaluation. *Health Technol Assess* 2006;10: 259.

148. Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, et al. Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int J Cancer* 1999;81: 214-8.

149. South CD, Hampel H, Comeras I, Westman JA, Frankel WL, de la Chapelle A. The frequency of Muir-Torre syndrome among Lynch syndrome families. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 277-1.

150. Dores GM, Curtis RE, Toro JR, Devesa SS, Fraumeni JF Jr. Incidence of cutaneous sebaceous carcinoma and risk of associated neoplasms: insight into Muir-Torre syndrome. *Cancer* 2008;113: 3372-1.

151. Vasen HF, Sanders EA, Taal BG, et al. The risk of brain tumours in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC). *Int J Cancer* 1996; 65: 422-.

152. Ponti G, Losi L, Pellacani G, et al. Malignant melanoma in patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Br J Dermatol* 2008;159: 162-8.

153. Pineda M, Castellsague E, Musulen E, et al. Non-Hodgkin lymphoma related to hereditary nonpolyposis colorectal cancer in a patient with a

novel heterozygous complex deletion in the MSH2 gene. *Genes Chromosomes Cancer* 2008; 47: 326–2.

154. Gutmann D, Aylsworth A, Carey J, et al. The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2. *JAMA* 1997;278:51–.

155. Felton K, Gilchrist D, Andrew S. Constitutive deficiency in DNA mismatch repair. *Clin Genet* 2007;71:483–8.

156. Lindor NM, Rabe K, Petersen GM, et al: Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: Familial colorectal cancer type X. *JAMA* 293:1979–1985, 2005

157. Llor X, Pons E, Xicola RM, et al: Differential features of colorectal cancers fulfilling Amsterdam criteria without involvement of the mutator pathway. *Clin Cancer Res* 11:7304–7310, 2005

158. Steven M. Lipkin, Kambiz Afrasiabi Familial Colorectal Cancer Syndrome X *Semin Oncol* 34:425–427

159. Ajay Goel, Rosa M. Xicola, Thuy-Huong Nguyen, Brian J. Doyle, Vanessa R. Sohn Aberrant DNA Methylation in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Without Mismatch Repair Deficiency *Gastroenterology* 2010;138:1854–862

160. Lagerstedt, R., Liu, T., Vandrovcova, J., Halvarsson, B., Clendenning, M., Frebourg, T., Papadopoulos, N., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Peltomäki, P., Kolodner, R.D., Nibert, M. and Lindblom, A. (2007) Lynch

syndrome(hereditary nonpolyposis colorectal cancer) diagnostics. *J. Natl. Cancer Inst.* 99, 291-299.

161. Fan, Y., Wang, W., Zhu, M., Zhou, J., Peng, J., Xu, L., Hua, Z., Gao, X. and Wang, Y. (2007) Analysis of hMLH1 missense mutations in East Asian patients with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 13, 7515-7521.

162. Rahner, N., Friedrichs, N., Wehner, M., Steinke, V., Aretz, S., Friedl, W., Buettner, R., Mangold, E., Propping, P. and Walldorf, C. (2007) Nine novel pathogenic germline mutations in MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 in families with Lynch syndrome. *Acta. Oncol.* 46, 763-769.

163. Pagenstecher, C., Wehner, M., Friedl, W., Rahner, N., Aretz, S., Friedrichs, N., Sengteller, M., Henn, W., Buettner, R., Propping, P. and Mangold, E. (2006) Aberrant splicing in MLH1 and MSH2 due to exonic and intronic variations. *Hum. Genet.* 119, 9-22