

Disertační práce

**Mikrosatelitová nestabilita u pacientů
s hereditárním nepolypózním kolorektálním
karcinomem**

Mgr. Martina Sekovská

**Školitel: MUDr. Anna Křepelová, CSc., Ústav biologie a lékařské genetiky
2.LF UK v Praze**

**Studijní obor: Molekulární biologie, genetik a virologie
1. lékařská fakulta UK v Praze, Ústav biologie a lékařské genetiky**

Praha 2007

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury.

V práci jsou použity i výsledky mutační analýzy genů MLH1, MSH2 a MSH6 prováděné MUDr. Annou Křepelovou, CSc., a imunohistochemické analýzy genů MLH1 a MSH2 prováděné MUDr. Pavlínou Plevovou, PhD.

V Praze 29.5.2007

Mgr. Martina Sekowská

PODĚKOVÁNÍ

Tato práce byla vypracována v letech 1999-2005 v Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy.

Děkuji své školitelce MUDr. Anně Křepelové, CSc., za odborné vedení, Ing. Věře Kebrdlové za zpracování vzorků na genetickém analyzátoru ABI Prism 310, kolektivu laborantek za izolaci DNA z krve a přípravu elektroforetických gelů. Za zapůjčení parafinových bločků děkuji MUDr. Pavlíně Plevové, PhD, z Laboratoře molekulární patologie Univerzity Palackého v Olomouci a MUDr. Lence Foretové, PhD, z Oddělení genetiky nádorů Masarykova onkologického ústavu v Brně.

Práci bylo možno vypracovat díky těmto finančním zdrojům: IGA MZ ČR 4225-3, IGA MZ ČR 8294-3, IGA MZ ČR NC6741-3, GA UK 17/2001, VZ 1.LF UK 0021620808.

OBSAH

1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	5
2. TEORETICKÝ ÚVOD	6
2.1 Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom.....	6
2.2 Mapování genů HNPCC.....	6
2.3 Mismatch repair systém	9
2.3.1 Prokaryota.....	9
2.3.2 Eukaryota.....	11
2.4 Mikrosatelitová nestabilita.....	14
2.4.1 Repetitivní sekvence v genomu.....	14
2.4.2 Mikrosatelitová nestabilita.....	15
2.4.3 Hodnocení mikrosatelitové nestability.....	17
2.5 Alternativní strategie.....	21
3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	22
4. MATERIÁL A METODY	23
4.1 Soubor vyšetřovaných pacientů.....	23
4.2 Izolace DNA.....	23
4.3 Polymerázová řetězová reakce.....	23
4.4 Fragmentační analýza.....	25
5. VÝSLEDKY	26
5.1 Mikrosatelitová nestabilita.....	26
5.1.1 Ztráta heterozygosity.....	30
5.1.2 Nízká míra nestability.....	31
5.1.3 Mononukleotidové x dinukleotidové markery.....	31
5.2 Srovnání citlivosti použitých metod.....	34
5.3 Mutační analýza a imunohistochemické vyšetření.....	37
6. DISKUZE	38
7. SOUHRN	43
8. PŘEHLED LITERATURY	44
9. PŘEHLED PUBLIKACÍ AUTORKY	53
10. PŘÍLOHY	56

1. Seznam použitých zkratek

APC	adenomatous polyposis coli
BAX	BCL2-associated X protein
bp	base pair
CRC	colorectal cancer
DCC	deleted in colon cancer
DNA	deoxyribonucleic acid
GTBP	G-T binding protein
hMLH1	human Mut L homologue 1
hMLH3	human Mut L homologue 3
hMSH2	human Mut S homologue 2
hMSH4	human Mut S homologue 4
MSH6	human Mut S homologue 6
hPMS1	human postmeiotic segregation 1
hPMS2	human postmeiotic segregation 2
HNPCC	hereditary nonpolyposis colorectal cancer
ICG	International Collaborative Group on HNPCC
IHC	immunohistochemistry
IGF2R	inzulin-like growth factor 2 receptor
LOH	loss of heterozygosity
MBD4	methyl-CpG binding endonuclease 1
MSI	microsatellite instability
MSI-H	microsatellite instability - high
MSI-L	microsatellite instability – low
MSS	microsatellite stability
MMR	mismatch repair
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	polymerase chain reaction
SSB	single strand binding (protein)
TGF- β RII	transforming growth factor β receptor II

2. TEORETICKÝ ÚVOD

2.1 Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom

Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC, Lynchův syndrom) je relativně častou formou vrozené predispozice k nádorům střeva (Hampel a Peltomaki, 2000). Historii tohoto syndromu popsal Lynch. První rodinu popsal již roku 1895 Dr. Warthin, probandem byla nešťastná žena, která věděla, že zemře na gynekologický nebo gastrointestinální nádor, stejně jako mnoho jejích příbuzných (Lynch et al., 1994). Genealogické studie postižených rodin prokázaly autozomálně dominantní dědičnost nádorové predispozice s 80 % penetrancí (Lynch a Chapelle, 1999; Tinley a Lynch, 1999; Krutílková et al., 2002; Umar et al. 2004).

HNPCC je charakteristický četným výskytem kolorektálního karcinomu (CRC) u osob v rodině minimálně ve dvou generacích, typický je časný vznik nádoru (přibližně 45 let), u 70 % případů v proximální části střeva, synchronně (mnohočetné nádory do šesti měsíců po resekci) i metachronně (po šesti měsících od resekce) (Lynch et al., 1997; Burt 2000). Taktéž je popsán nadbytek extrakolonických nádorů, zejména karcinomu endometria (druhý nejčastější po CRC), ovaria, žaludku (částečně v Asijských zemích jako jsou Japonsko a Korea), tenkého střeva, pankreatu, jater a žlučníku, mozku a vylučovacího ústrojí. Je prokázán i statisticky významný výskyt karcinomu plic a kožních lézí, jako jsou adenoma sebaceum, karcinom nebo mnohočetný keratoakantom (Lynch a Chapelle, 2003). Podle výskytu nádorů v rodině se potom dělí na Lynchův syndrom I (pouze CRC) a Lynchův syndrom II (CRC a extrakolonické nádory) (Lynch 1999).

2.2 Mapování genů HNPCC

Rodinná anamnéza je často klíčová pro diagnostiku HNPCC (1-6 % všech CRC). Pro potřeby molekulárně genetické analýzy HNPCC byla stanovena roku 1991 v Amsterdamu skupinou ICG (International Collaborative Group on HNPCC) následující klinická kritéria:

Amsterodamská kritéria I (Vasen et al., 1991):

- minimálně tři příbuzní musí mít histologicky ověřený CRC, jeden musí být příbuzný prvního stupně ostatních dvou
- musí být postiženi dvě po sobě jdoucí generace
- minimálně jednomu z příbuzných s CRC musí být prokázána diagnóza do 50 let věku
- musí být vyloučena familiární adenomatózní polypóza (FAP)

Amsterodamská kritéria byla později revidována následujícím způsobem:

Amsterodamská kritéria II (Vasen et al., 1999):

- minimálně tři příbuzní musí mít nádor spojený s HNPCC (CRC, karcinom endometria, žaludku, ovaria, ureteru nebo renální pánvičky, mozku, tenkého střeva, jater, žlučníku, kůže), jeden musí být příbuzný prvního stupně ostatních dvou
- musí být postiženi dvě po sobě jdoucí generace
- minimálně jednomu z příbuzných s nádorem spojeným s HNPCC musí být prokázána diagnóza do 50 let věku
- musí být vyloučena familiární adenomatózní polypóza u všech příbuzných s CRC
- nádor musí být ověřen, kdykoliv je to možné

Roku 1993 po vazebné analýze 345 mikrosatelitních markerů našla skupina de la Chapella a Vogelsteina u dvou rozsáhlých rodokmenů vazebné místo na chromozomu 2p16 (Peltomäki et al., 1993), půl roku později bylo toto místo potvrzeno, přesněji lokalizováno a gen byl označen jako **hMSH2** (Fishel et al., 1993).

Přibližně ve stejnou dobu byl mapován i druhý lokus na chromozomu 3p u tří švédských rodin, a mutační analýzou prokázán gen **hMLH1** (Lindblom et al., 1993; Bronner et al., 1994). Přestože vazebné analýzy prokázaly, že většina rodokmenů sdílí mutace v genech 2p a 3p, u některých rodokmenů nebyla prokázána vazba v těchto lokusech, což bylo podnětem k hledání dalších genů zodpovědných za HNPCC (Nyström-Lahti et al., 1994).

V roce 1994 byly lokalizovány a sekvenovány další dva homology prokaryotického mut L genu, **hPMS1** a **hMPS2** (Nicolaidis et al., 1994). O rok později skupiny

Drummonda (Drummond et al., 1995), Palomba (Palombo et al., 1995) a Papadopoulose (Papadopoulos et al., 1995) identifikovaly gen označený jako **GTBP/MSH6** (Berends et al., 2002) (Tabulka č. 1).

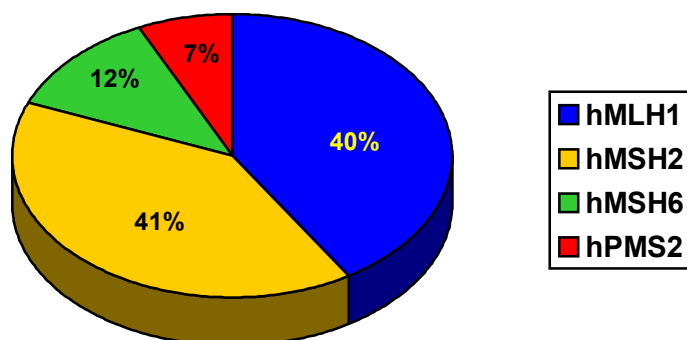
Tabulka č. 1: Základní charakteristika mismatch repairových genů

Gen	Lokus	Počet exonů	mRNA (bp)	Protein (aa)
hMLH1	3p21.3-23	19	2524	756
hMSH2	2p22-p21	16	3145	934
hMSH6	2p16	10	4264	1360
hPMS2	7q22.2	15	2836	862
hPMS1	2q31.1	13	3239	932

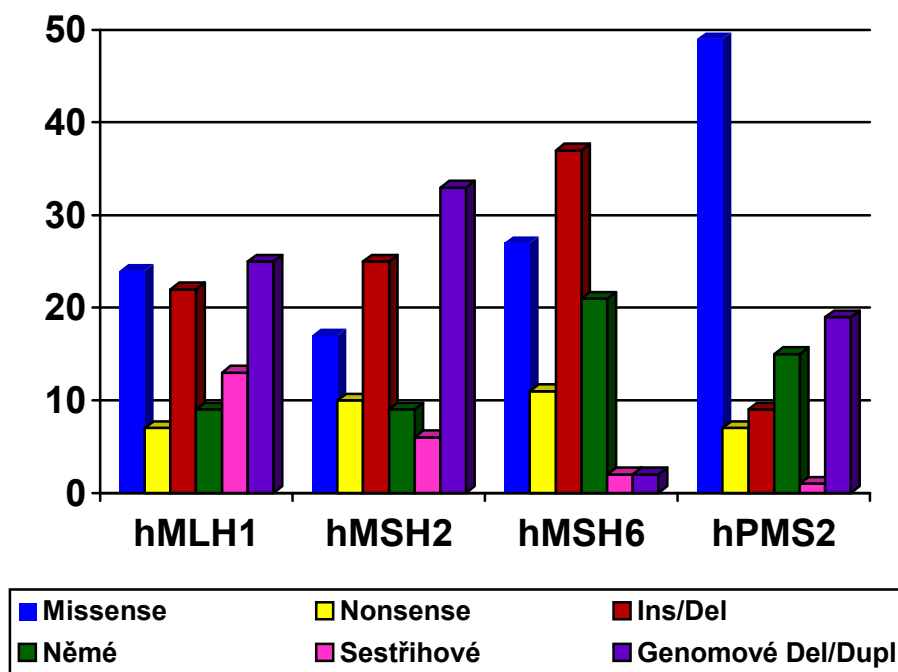
Později byly objeveny i další geny hrající roli v systému oprav souvisejících s HNPCC *TGF-βRII* (Wang et al., 1995; Lu et al., 1995; Dieumegard et al., 2000), *BAX* (Rampino et al., 1997), *IGF2R* (Souza et al., 1996), *MBD4(MED1)* (Riccio et al. 1999), *hMLH3* a *hMSH4* (Lipkin et al. 2000, 2001; Santucci-Darmanin et al., 2002). V současnosti je popsáno asi 130 reparačních genů (Wood et al., 2001). Většina popsaných mutací je zejména v genech hMLH1 a hMSH2 (Graf č. 1). Typy jednotlivých mutací jsou popsány v Grafu č. 2.

Graf č. 1: Zastoupení MMR genů podle počtu jejich alterací (březen 2007)

(<http://www.med.mun.ca/MMRvariants/statistics.aspx>)



Graf č. 2: Rozdělení zárodečných mutací jednotlivých MMR genů podle jejich typu v %
 (podle <http://www.med.mun.ca/MMRvariants/statistics.aspx>)



2.3 Mismatch repair systém

Mismatch repair, chybné párování bází, zahrnuje rozpoznání a opravu nesprávně spárovaných nukleotidů. To může být výsledkem chybného zařazení nukleotidu během replikace DNA, fyzikálními nebo chemickými změnami DNA (např. deaminace 5-metylcytosinu, oxidace, alkylace, depurinace) a nebo tvorbou heteroduplexu během homologní rekombinace mezi vlákny DNA (Guerrette et al., 1998). Relativní stabilita sekvencí DNA u všech organismů je tak výsledkem systému proteinů opravujících chyby v DNA.

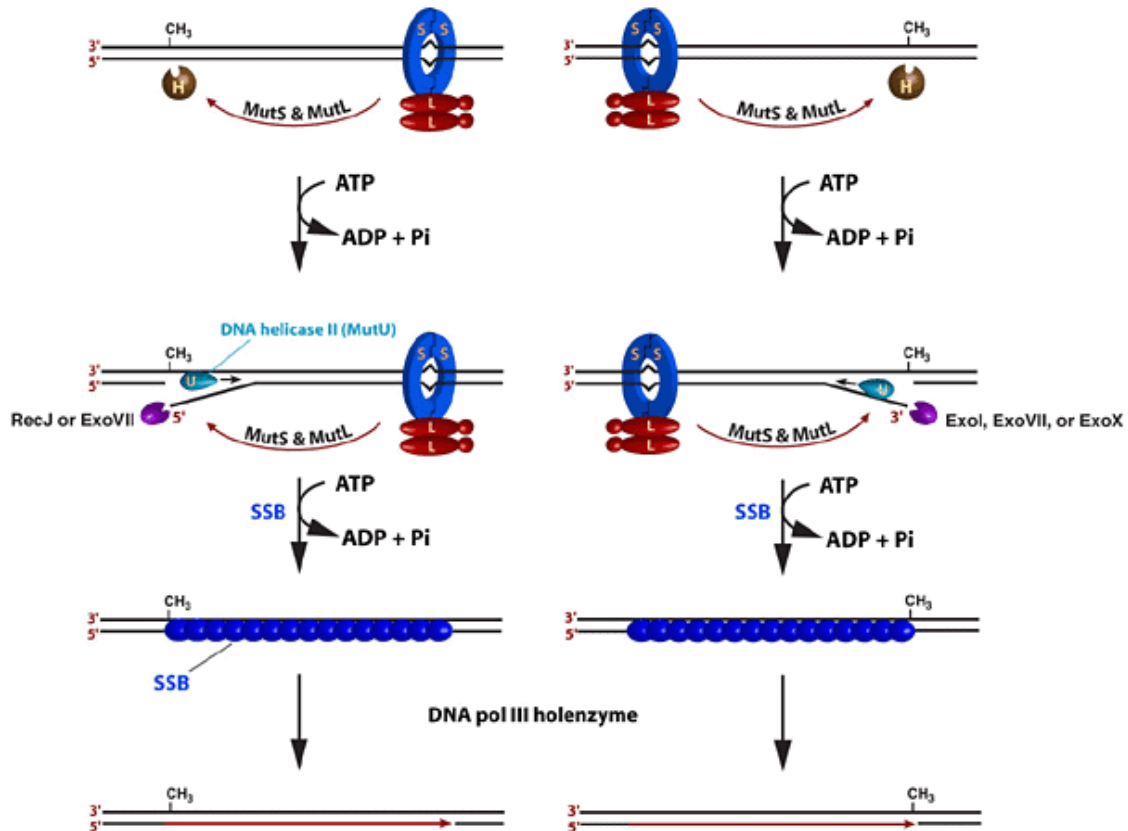
2.3.1 Prokaryota

Nejlépe definovaným mismatch repair systémem je metylačně závislý reparační systém *Escherichie coli*. Oprava je řízena sekundárními signály, které mohou být vzdáleny od chybného místa. Excizní může obsáhnout i 100 bází, proto je tento systém nazýván „long path repair“ (Cama et al., 1996). Tento systém opravuje chyby v párování a malé

delece a inserce vznikající při replikaci DNA. Jeho účinnost je dána typem záměny; G-T, A-C, A-A a G-G jsou opravovány výborně, A-G, T-C a T-T s menší účinností a C-C systém nezachytí. Reparační komplex je složen z deseti proteinů MutS, MutH, MutL, DNA helikázy II, SSB proteinů, Exonukleázy I, Exonukleázy VII, RecJ exonukleázy, DNA polymerázy III a DNA ligázy. Druhým reparačním systémem je „very short path“ (VSP) opravující G-T v nereplikující se DNA, způsobené deaminací 5-metylcytosinu (Peltomäki, 1997).

Oprava je inicializována navázáním homodiméru mutS na chybné místo a následným navázáním homodiméru mutL. Tento komplex aktivuje mutH, který svou endonukleázovou aktivitou rozštěpí vazbu v GATC místě s nemetylovaným adeninem. Úsek s chybou (1-2 kb) je vystřižen 3'-5' nebo 5'-3' exonukleázou a nově nasyntetizován holoenzymem DNA polymerázou III (Obrázek č. 1).

Obrázek č. 1: Model reparačního systému bakterie *Escherichia coli*, nalevo varianta pro 5'-3' exonukleázu, napravo 3'-5' exonukleázu (Modrich, 2006)



2.3.2 Eukaryota

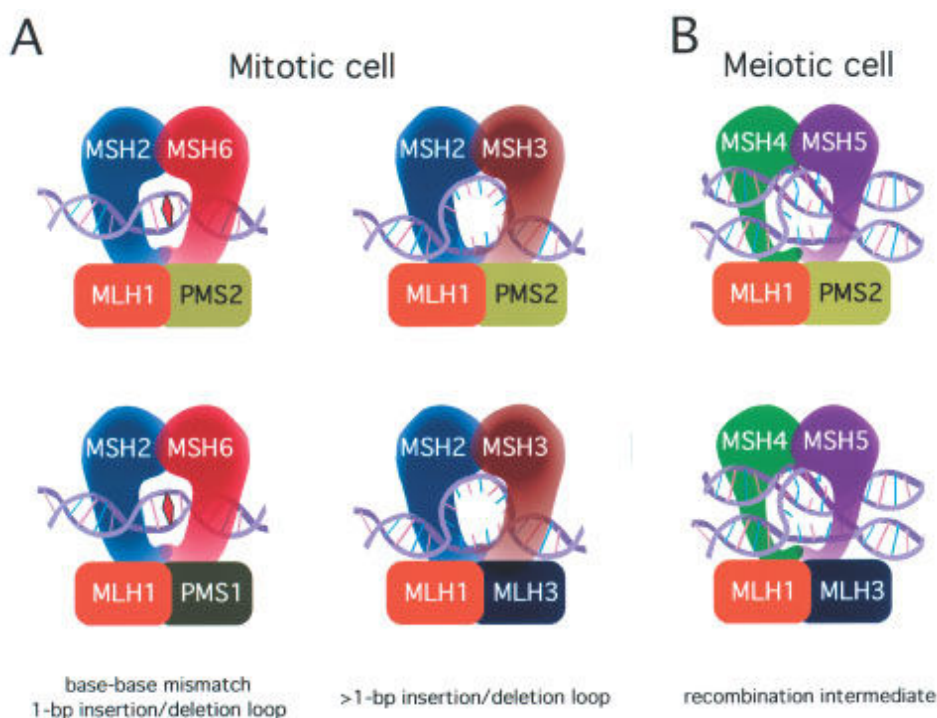
Přestože je MMR systém vysoce konzervativní, situace u eukaryot je komplexnější. Bylo popsáno několik homologů MutS (MSH) i MutL (MLH nebo PMS)(Tabulka č. 2). Většina MutS a MutL podobných lidských proteinů (hMSh2, hMSH3, hMSH6, hMLH1 a hPMS2) se podílí na korekci replikační chyby. Chybu v párování bází rozpoznává hMutS α (hMSH2-hMSH6) nebo hMutS β (hMSH2-hMSH3) heterodimér. hMutS α rozeznává záměnu bází i 1 bp inzerčně deleční smyčky, zatímco hMutS β primárně zprostředkovává opravu až 216 bp inzerčně delečních smyček (Bellacosa 1997, Santucci-Darmanin et al., 2002). Heterodimér hMLH1-hPMS2 je kombinován s hMutS α nebo hMutS β a společně vytváří ternární komplex (Obrázek č. 2A).

Tabulka č. 2: Homology bakteriálních MMR proteinů

(<http://mmr.med.ohio-state.edu/rfishel/RF2.html>; upraveno)

Escherichia coli	Sacharomyces cerevisiae	Homo sapiens (funkce)
MutL	MLH1	hMLH1 (MMR/meióza)
	MLH2	hPMS1 (?)
	PMS1	hPMS2 (MMR/meióza)
	MLH3	hMLH3 (meióza)
MutS	MSH1	není (mitochondrie)
	MSH2	hMSH2 (MMR)
	MSH3	hMSH3 (MMR)
	MSH4	hMSH4 (meióza)
	MSH5	hMSH5 (meióza)
	MSH6	GTBP (MMR)

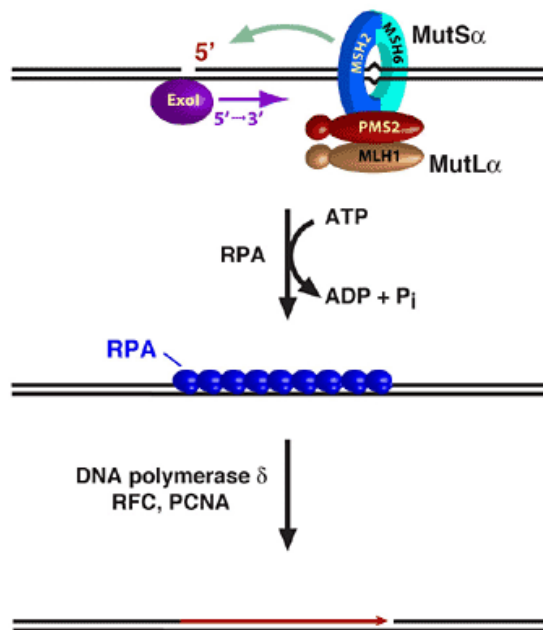
Obrázek č. 2: Ternární komplex rozpoznávající chybné párování nukleotidů v mitotických (A) a meiotických (B) buňkách (Bellacosa, 1997)



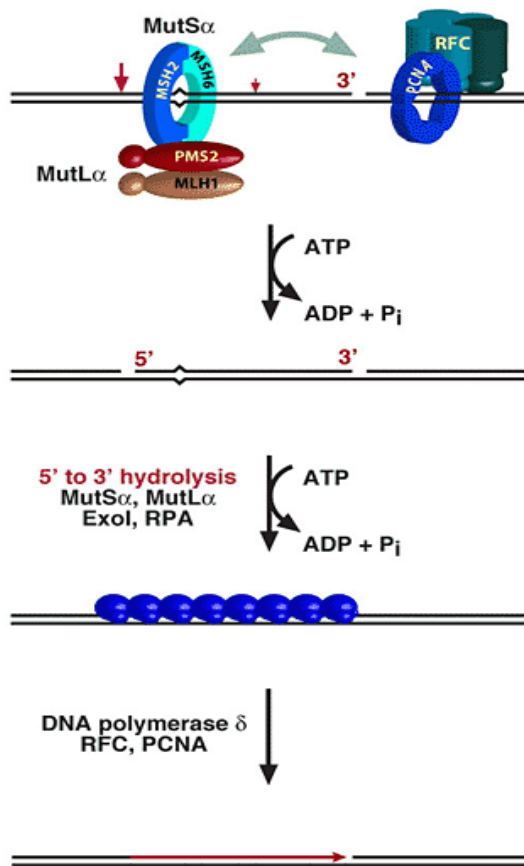
Opravy se účastní, stejně jako u *E. coli*, komplex proteinů hMutS α , MutL α (heterodimér hMLH1-hPMS2), ExoI, RPA, DNA polymeráza δ , PCNA a RFC. Při reparaci začínající ve směru 5' od chybného párování je pro iniciaci excize potřeba komplexu čtyř proteinů MutS α , MutL α , ExoI (hydrolyzuje dsDNA ve směru 5'-3') a RPA (protein stabilizující ssDNA). Odstranění chybného úseku pokračuje od 5' konce a za účasti dalších proteinů je nasyntetizován nový, opravený řetězec (Obrázek č.3).

Pro iniciaci 3'-závislé excize je zapotřebí komplex šesti proteinů MutS α , MutL α , ExoI, RPA, PCNA a RFC. (Obrázek č. 4). Heterodimér MutL α má latentní endonukleázovou aktivitu, která je aktivována při vazbě s komplexem mismatch – MutS α - RFC – PCNA. Ve vzdálenosti do 150bp je pak na 5' straně od chybného místa vytvořen nový zlom DNA a umožněna vazba ExoI. Následující excize a syntéza opraveného řetězce je stejná jako u 5'-závislé excize.

Obrázek č. 3: 5'- závislá excize a oprava chybně spárovaných nukleotidů (Modrich, 2006)



Obrázek č. 4: 3'- závislá excize a oprava chybně spárovaných nukleotidů (Modrich, 2006)



Dalšími lidskými MutS homology jsou hMSH4 a hMSH5, které jsou zahrnuty do meiotické rekombinace. Jejich heterodimér (Obrázek č. 2B) vytváří aminoterminální doménu zodpovědnou za rozpoznání chybně spojených nukleotidů při ligaci během rekombinace (Bellacosa 1997). Spolu s heterodimérem MLH1 a MLH3 se podílí na obnovení meiotického crossing overu (Borts et al., 2000).

2.4 Mikrosatelitová nestabilita

2.4.1 Repetitivní sekvence v genomu

Tandemové repetitivní sekvence se rozdělují do tří základních skupin – satelity, minisatelity a mikrosatelity. Satelity mají repetitivní jednotku o několika tisících párech bazí (bp), která se opakuje 10^3 - 10^7 krát v každém lokusu, obvykle v heterochromatinu chromozómu, nejčastěji kolem centromery. Minisatelity, neboli VNTR (Variable Number of Tandem Repeats), mají od dvou do několika set různě dlouhých repetitivních jednotek (od 13 bp), jejichž celkový počet se v lidském genomu blíží 3000. Většinou se nacházejí v subtelomerické oblasti chromozómu.

Mikrosatelity (STR, Short Tandem Repeat), jsou oligonukleotidové repetice volně rozptýlené po euchromatinu. Někteří autoři udávají repetici do 13 bp (Debrauwere et al., 1997), většinou se ale udává velikost do 6 bp (Schlötterer, 1998). Délka repetitivního úseku se pohybuje u všech druhů do 45 jednotek. Z tohoto limitu lze odvozovat nestabilitu delších repetitivních úseků, která může vyplýnout až v patologickou expanzi repetitivních jednotek (nad 200). Tato nestabilita pak může být vhodným diagnostickým markerem (Debrauwere et al., 1997). Dinukleotidové a jiné než trinukleotidové repetice jsou většinou lokalizovány v nekódujících oblastech genů, zatímco trinukleotidové v kódujících oblastech, nebo jejich těsné blízkosti. Trinukleotidy jsou zde tolerovány, protože při jejich delecí nebo inserci nedochází ke změně čtecího rámce. Základní analýzy lidského genomu prokázaly, že CCG repetice se přednostně vyskytují v 5' nepřekládané oblasti genu, ve většině případů vždy ve stejné orientaci jako transkript (Nadir et al., 1996). Mikrosatelity mají vysoce informativní charakter (mají konstantní délku u daného jedince, ale jsou

vysoce polymorfní v lidské populaci), proto se používají pro vazebné studie, mapování genů, identifikaci osob a analýzu lidských nádorů (Sutter et al., 1999).

2.4.2 Mikrosatelitová nestabilita

V roce 1992 skupina vedená Peinadem popsala několik kolorektálních karcinomů vykazujících delecí několika nukleotidů na poly-Asekvenci Alu elementu (Peinado et al., 1992). O několik měsíců později pozorovaly další skupiny nestabilitu DNA způsobenou změnami počtu repetitivních jednotek v mikrosatelitových sekvencích některých nádorů střeva. Nový hypermutabilní fenotyp byl nazván mikrosatelitová nestabilita (MSI) nebo fenotyp replikační chyby (RER). Tento jev byl spojen zejména s HNPCC (Aaltonen et al., 1993; Ionov et al., 1993; Marra a Boland, 1996).

Mikrosatelitová nestabilita je vysvětlována dvěma mechanismy : rekombinací a sklouznutím DNA polymerázy. Během replikace DNA může dojít v nově syntetizovaném repetitivním úseku k tvorbě smyčky, která nemusí být rozpoznána DNA-polymerázou a dochází k jejímu sklouznutí z řetězce. Studie provedené In vitro prokázaly, že sklouznutí DNA-polymerázy během replikace může záviset na původu repetitivní sekvence. Delší a na GC bohaté repetice vykazují nižší hladinu skluzu (Schlötterer a Tautz, 1992).

Vznik MSI není lineární funkcí délky mikrosatelitu. Například mikrosatelit o 105 bp je pouze 7 krát delší než 15 bp, ale mutuje 500 krát častěji. Platí pravidlo, že čím je delší repetitivní úsek a menší repetitivní jednotka, tím častěji dochází k nestabilitě mikrosatelitu. Wierdl et al. (1997) pozorovali dvě důležité věci: mikrosatelit delší než 51 bp má výraznou tendenci k tvorbě větších delecí. Jak roste, stává se méně stabilním a má větší tendenci ke ztrátě několika repetitivních jednotek. Je prokázáno, že spontánní mutace jsou u tri a tetranukleotidových mikrosatelitů 50 krát častější než u dinukleotidových (Weissenbach et al., 1992). Proto jsou monukleotidové a dinukleotidové mikrosatelity, nejčastěji (A)_n a (CA)_n, používány pro monitorování mikrosatelitové nestability. Aby nedocházelo ke zkreslování výsledků, používají se minimálně tři mikrosatelitové markery. Může se totiž stát, že by stabilní mikrosatelitový lokus mohl ležet blízko nestabilního. tak by se při studiu stejného pacienta dvěma různými lidmi při použití dvou různých markerů mohlo dosáhnout dvou odlišných výsledků (Arzimanoglou et al., 1998)

Nemoci spojené s nestabilitou repetice se rozdělují do dvou skupin. V první jsou choroby spojené s masivní expanzí nebo polymorfismem v kódující nebo regulační oblasti

specifického genu. Tyto expanze jsou v zárodečné linii, postihují genovou expresi nebo vedou k syntéze nefunkčního proteinu. Patří sem syndrom Fragilního X, Fiedrichova ataxie nebo Huntingtonova chorea, jejichž molekulárně genetická diagnostika je založena právě na detekci zvýšeného počtu repetitivních jednotek (Sršeň a Sršňová, 1995).

Druhá skupina chorob je založena na analýze rozsáhlých rodokmenů s hereditárními nebo sporadickými nádory, spojenými s nestabilitou mikrosatelitů v různých lokusech (Mao et al., 1994). MSI vedoucí k tkáňovým neopláziím byla poprvé nalezena u pacientů s kolorektálními karcinomy, hereditárními i sporadickými, a později i v dalších typech nádorů (endometria, trávicího systému, ale i leukemiích) (Cawkwell et al., 1995). U pacientů s HNPCC je genová nestabilita způsobena zárodečnou nebo somatickou mutací v mismatch repair genech. Mechanismus zodpovědný za MSI v ostatních nádorech se liší od mechanismu u HNPCC a může odrážet mnohem menší defekty v patologii reparačního systému. Nelze jasně říci, že mikrosatelitová nestabilita je kauzálně zahrnuta do vzniku a rozvoje nádoru. Nádory se změnami v mikrosatelitech mohou zahrnovat somatické mutace v genu nebo genech, zahrnutých do udržení celkové genomové stability. Obecně se ale má za to, že nestabilita jednoduchých repetitivních úseků odráží chybu vznikající při replikaci během mitózy nebo meiózy v gametogenezi (Debrauwere et al., 1997).

Karcinomy u nichž byla nalezena MSI se rozdělují do čtyř skupin (Aaltonen et al., 1993; Papadopoulos et al., 1995):

- nádory spojené s HNPCC vykazující změny v mnoha lokusech
- sporadické kolorektální karcinomy, které také vykazují nestabilitu v mnoha lokusech
- ostatní typy sporadických nádorů s menšími změnami
- nádory spojené s nestabilitou v mononukleotidových repeticích

Díky velkému polymorfismu mikrosatelitů můžeme v nádorech detekovat delece jednotlivých alel. Častěji deletované lokusy v určitých chromozomálních oblastech jsou považovány za horká místa tumor supresorových genů zahrnutých do rozvoje karcinomů. Vysoká hladina MSI je způsobena defekty MMR genů (Eshleman a Markowitz, 1996), ale původ nízké hladiny MSI není znám. Předpokládá se, genetická změna, nebo, a to s větší pravděpodobností, specifická mutace ve známém MMR genu vede k mutátorovému fenotypu nebo k mutaci dosud neidentifikovaného genu zodpovědného za genovou nestabilitu (Papadopoulos et al., 1995; Keller et al., 1998)

Mikrosatelitová nestabilita je rozeznávána jako změna ve velikosti v nádorové DNA oproti nenádorovému vzorku DNA (Cawkwell et al., 1995).

2.4.3 Hodnocení mikrosatelitové nestability

Mikrosatelitová nestabilita je typický fenotypový znak v nádorech pacientů s HNPCC. Je vhodným diagnostickým markerem molekulárně genetické analýzy u Lynchova syndromu. Proto vyvstala potřeba sjednotit kritéria pro její hodnocení. Roku 1997 na mezinárodním workshopu ICG (International Collaborative Group) o HNPCC byla ujednána kritéria pro detekci a definici MSI (Boland et al., 1998).

K analýze MSI jsou doporučeni pacienti splňující alespoň jedno klinické kritérium podle Bethesdy:

Bethesda kritéria I (Rodriguez-Bigas et al., 1997)

- jedinci s karcinomem v rodinách splňujících Amsterodamská kritéria
- jedinci s dvěma s HNPCC spojenými nádory (synchronní i metachronní CRC a extrakolonické nádory)
- jedinci s CRC a příbuzným prvního stupně s CRC a/nebo s HNPCC spojeným extrakolonickým nádorem a/nebo kolorektálním adenomem: jeden z nádorů musí být diagnostikován do 45 let věku a adenom do 40 let věku
- jedinci s CRC nebo nádorem endometria diagnostikovaným do 45 let věku
- jedinci s histologicky nediferenciováním pravostranným CRC do 45 let věku
- jedinci s CRC s histologickým typem buněk tvaru pečetního prstene do 45 let věku
- jedinci s adenomy diagnostikovanými do 40 let věku

Během let vznikla potřeba kritéria podle Bethesdy upravit:

Bethesda kritéria II (Umar et al., 2004)

- jedinci s diagnostikovaným CRC do 50 let věku
- jedinci se synchronním nebo metachronním CRC nebo s HNPCC spojeným tumorem bez ohledu na věk

- jedinci do 60 let věku s CRC s MSI-H histologií
- jedinci s CRC nalezeným u jednoho nebo více příbuzných prvního stupně s HNPCC spojeným tumorem, s jedním tumorem diagnostikovaným do 50 let věku
- jedinci s CRC diagnostikovaným u dvou nebo více příbuzných prvního nebo druhého stupně s HNPCC spojenými tumory bez ohledu na věk

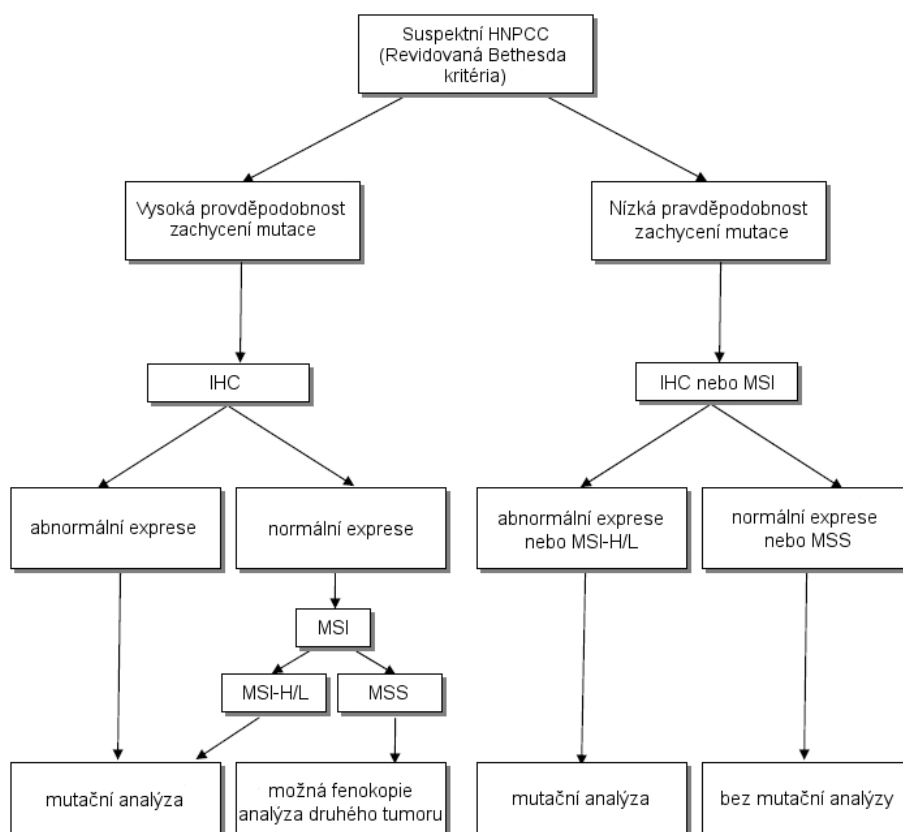
Postup molekulárního vyšetření pacientů s rizikem podle kritérií Bethesda je následující (Umar et al., 2004; Vasen et al., 2007) (Obrázek č. 5):

- Vyšetření MSI nebo IHC (imunohistochemická) analýza tumoru, germline MLH1/MSH2 testování u MSI-H tumorů nebo tumorů se ztrátou exprese jednoho z mismatch repairových genů.
- Po té, co je mutace identifikována, příbuzní v riziku jsou pozváni ke genetické konzultaci a, jestliže si to přejí, testování.
- Alternativním postupem v případě nedostupnosti tkáně je přímé testování MLH1/MSH2 genů.
- Jestliže není nalezena mutace MMR genu u probanda s MSI-H a/nebo s anamnézou HNPCC, výsledek testu je označen jako neinformativní. Pacienti a jedinci v riziku jsou konzultováni jako by HNPCC byl potvrzen a jsou sledováni jako vysoce rizikové případy.
- Je třeba ujistit pacienty o diskrétnosti vzhledem k obavám panujícím z diskriminace z důvodu genetického testování.

Definice MSI

MSI je definována jako změna délky řetězce způsobená insercí nebo delecí repetitivní jednotky mikrosatelitu v nádorové tkáni v porovnání s nenádorovou tkání. Nepopisuje tak detailní fenotyp nádoru, ale pouze informuje o pozorování nestability u daného markeru.

Obrázek č. 5: Molekulární vyšetření pacientů podle Bethesda kritérií (Vasen et al., 2007)



Nádorový fenotyp

Nádory mohou být podle dosažené hladiny nestability rozděleny do tří skupin:

- MSI-H, nádory s velkou mírou nestability. Sem patří většina nádorů s prokázanou nestabilitou.
- MSI-L, nádory s nízkou mírou nestability
- MSS, nádory bez prokázané nestability

Hranice mezi nádory s MSI-H a MSI-L je obecně akceptována. Rozdíl mezi skupinami MSI-L a MSS je mnohem těsnější. Základní míra mutací v mikrosatelitech u zjevně stabilních nádorů není přesně dána a míra nestability u těchto dvou skupin závisí i na typu a počtu vyšetřovaných markerů. Proto byl navržen referenční panel pěti mikrosatelitních markerů (Tabulka č. 3). Při používání tohoto panelu je pak jasně definována míra nestability. Jestliže je z vyšetřených markerů nalezena nestabilita u dvou a

více, hovoříme o fenotypu MSI-H, jestliže u jednoho MSI-L a jestliže není nalezena žádná změna v délce repetice, nádor je označen jako MSS. Při vyšetření více než pěti markerů je hranicí mezi MSI-L a MSI-H nádorem 30-40 % nestabilních markerů (Tabulka č. 4).

Tabulka č. 3: Referenční panel markerů pro mikrosatelitovou analýzu (Boland et al., 1998)

Referenční panel			
Marker	Repetice		GenBank
BAT25	Mononukleotidová		9834508
BAT26	Mononukleotidová		9834505
D5S346	Dinukleotidová		181171
D2S123	Dinukleotidová		187953
D17S250	Dinukleotidová		177030
Alternativní lokusy			
BAT40	D18S55	D3S1029	D5S107
BAT34C4	D18S58	D10S197	D8S87
TGFβRII	D18S61	D13S175	D18S69
ACTC(635/636)	D18S64	D17S588	D13S153
			D17S787
			D7S519
			D20S100

Tabulka č. 4: Kritéria pro interpretaci analyzovaných markerů (Boland et al., 1998)

	5 analyzovaných lokusů	>5 analyzovaných lokusů	Interpretace
Počet markerů vykazujících nestabilitu v délce řetězce	≥2	≥30-40 %	MSI-H
	1	<30-40 %	MSI-L
	0	0	MSS

Ztráta heterozygoty (LOH) a MSI

Problém může nastat, jestliže jedna z normálních alel pro daný marker chybí a žádný nový fragment není přítomen. V tomto případě nelze určit, zda se jedná o pravou LOH, nebo o MSI u níž změněná alela migruje společně s druhou alelou. Tuto situaci proto hodnotíme jako stabilitu markeru. Výsledek není zpravidla nijak ovlivněn, protože u většiny MSI-H nádorů je nestabilita prokázána ve více markerech. Obdobně, jestliže marker vykazuje alelickou imbalance a přítomnost nového fragmentu, nelze prokázat zda je ztráta alely výsledkem MSI nebo je opravdu přítomna spolu s nestabilitou. V takové situaci bude nestabilní marker (s novým fragmentem) označen jako neinformativní pro LOH. Obecně platí, že marker je označen buď LOH nebo MSI.

2.5 Alternativní strategie

Imunohistochemie reprezentuje alternativu pro identifikaci tumorů s defektem MMR aktivity (Vasen et al., 2007). Několik studií popsalo pozitivní korelaci mezi tumory definovanými jako MSI-H a absencí proteinu exprimovaného hMLH1 nebo hMSH2 (Thibodeau et al., 1998; Caldes et al., 2004; Plevová et al., 2004). Imunohistochemie dává přesnější informaci o poškozeném genu a může být proto efektivnější při určování počtu genů vyšetřovaných mutační analýzou k identifikaci příbuzných jedinců v riziku.

3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Hlavními cíli disertační práce jsou:

- zavedení metody fragmentační analýzy pomocí fluorescenčně značené PCR jako součást molekulárně genetické diagnostiky hereditárního nepolypózního kolorektálního karcinomu
- ověření její účinnosti srovnáním s dříve používanou analýzou MSI v polyakrylamidovém gelu
- vyšetřit dostupný soubor pacientů suspektních pro HNPCC
- získané výsledky korelovat s výsledky mutační a imunohistochemické analýzy mismatch repairových genů

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1 Soubor vyšetřovaných pacientů

Do studie bylo zařazeno 205 neoplázií (202 kolorektálních karcinomů, 1 karcinom prsu a 2 nádory endometria) od 152 pacientů s kolorektálním karcinomem, operovaných v letech 1995 – 2004. Ve 175 případech se jednalo o formalínem fixované parafínové bločky, ve 30 případech o zamraženou bioptickou tkáň. Jako kontrolní vzorky byly použity buňky periferní krve těchto pacientů, u 4 pacientů byla k dispozici i nenádorová tkáň střeva. Nejednalo se o náhodně vybraný soubor, pacienti byli selektováni podle rodinné anamnézy k vyšetření pro podezření na HNPCC. Pacienti byli rozděleni podle klinických kritérií do tří skupin. 37 pacientů splňovalo Amsterodamská kritéria, 72 pacientů nesplňovalo, ale u pacientů se jednalo o familiární výskyt, ve 43 případech se jednalo o sporadické případy.

4.2 Izolace DNA

Parafínové řezy tkání o tloušťce 5 μm byly deparafinizovány xylenem a dvakrát promyty 96% ethanolem. DNA ze zamražených tkání, nádorových i nenádorových, a z tkání z parafínových bloček byla izolována pomocí purifikačního kitu (NucleoSpin C+T Macherey-Nagel, Düren, Germany; QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany) dle přiloženého návodu. U všech vzorků byla doba inkubace při 56°C s Proteinázou K, z důvodů vyšší výtěžnosti DNA, prodloužena přes noc do druhého dne. DNA z buněk periferní krve byla izolována metodou vysolování (3M NaCl) rutinně prováděnou v naší laboratoři.

4.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pro PCR byly použity tři mononukleotidové (BAT-RII, BAT 25, BAT-26) a pět dinukleotidových (D2S123, D3S1029, D5S346, D17S250, D18S58) markerů (Applera,

Czech Republic). Pro následnou fragmentační analýzu na genetickém analyzátoru ABI Prism 310 byly označeny „forward“ primery na 5'konci fluorescenční barvou. (Tabulka č.5). Pro analýzu na polyakralamidovém gelu byly použity neznačené primery.

Podmínky PCR pro D2S123 byly 94°C 1' (94°C 40'' 58°C 40'' 72°C 1')₄₀ 72°C 7', pro ostatní markery 94°C 1'(94°C 30'' 50°C 30'' 72°C 30'')₄₀ 72°C 7'; 1x PCR buffer s (NH₄)₂SO₄, 1,5mM MgCl₂, 0,2mM dNTP (Promega, Madison, USA), 1μM každý z primerů, 2u/100μl Taq DNA polymerázy (Fermentas Inc., Hannover, USA).

Tabulka č. 5: Základní charakteristika použitých markerů

Marker Repetice	Délka fragmentu (bp)	Lokus Gen	Fluoresc. značka	Sekvence primeru	Citace
BAT-RII (A) ₁₀	83	3p22 TGF-βRII exon	HEX (černá)	F:ctgcttctccaaagtgcatta R:gcactcatcagagctacagga	Parson et al., 1995, modified
BAT-25 (A) ₂₅	125	4q12 c-kit onkogen intron	HEX (černá)	F:tcgcctccaagaatgtaagt R:tctgcattttaactatggctc	Ichikawa et al., 2001
BAT-26 (A) ₂₆	121	2p16 hMSH2 intron	TET (zelená)	F:tgactacttttgactcagcc R:aaccaatcaacattttaacc	Hoang et al., 1997
D2S123 (CA) ₁₃ TA(CA) ₁₅	110-140	2p16 hMSH2 intron	HEX (černá)	F:acattcctggaagtctgge R:ccttctgactgcatacca	Weissenbach , 1992
D3S1029 (CA) ₂₃	>168	3p21.3 hMLH1 intron	HEX (zelená)	F:atactgtggaccagattgattac R:taattcccaaatggtttaggggag	Jones, 1992
D5S346 (CA) ₂₆	96-122	5q21-22 APC intron	FAM (modrá)	F:actcactctagtataaatcggg R:agcagataagacagtattactagtt	Joslyn, 1991
D17S250 (TA) ₇ ...(CA) ₂₄	151-169	17q11.2-q12 Mfd15 polymorf. marker	FAM (modrá)	F:ggaagaatcaaatagacaat R:gctggccatatatatatttaaacc	Sutter et al., 1999
D18S58 (CA) ₁₇	144-160	18q21 DCC intron	TET (zelená)	F:gctccggctggtttt R:gcaggaatcgcaggaactt	Weissenbach , 1992

4.4 Fragmentační analýza

Elektroforéza v 10% nebo 8% denaturačním polyakrylamidovém gelu

Amplifikované fragmenty byly separovány na 10% (BAT-RII) nebo 8% (ostatní markery) polyakrylamidovém gelu (Akrylamid:Bisakrylamid 19:1, 8M urea, 1x TAE, pH 8, TEMED, APS) při 70°C, 250V, cca 4 - 5 hodin . Gel byl barven ethidium bromidem (2,5µM) 10-15 min a analyzován pod UV lampou.

Fragmentační analýza fluorescenčně značených primerů

Fluorescenčně značené fragmenty byly analyzovány na genetickém analyzátoru ABI Prism 310. Byla použita multiplex analýza. Jednotlivé fragmenty mononukleotidových a dinukleotidových markerů příslušného vzorku byly smíchány dohromady a separovány v jedné analýze. Nádorová a nenádorové fragmenty byly porovnány.

5. VÝSLEDKY

5.1 Mikrosatelitová nestabilita

Celkem bylo izolováno a vyšetřeno 342 vzorků tkání od 191 pacientů. Do studie byly zařazeny párové (nádorová a nenádorová DNA) vzorky, jejichž analýza byla informativní v alespoň pěti markerech, 205 vzorků od 152 pacientů. Dále bylo do studie zařazeno 6 pacientů, u nichž nebyla k dispozici kontrolní nenádorová DNA, ale u nichž byla prokázána MSI alespoň ve dvou mononukleotidových markerech.

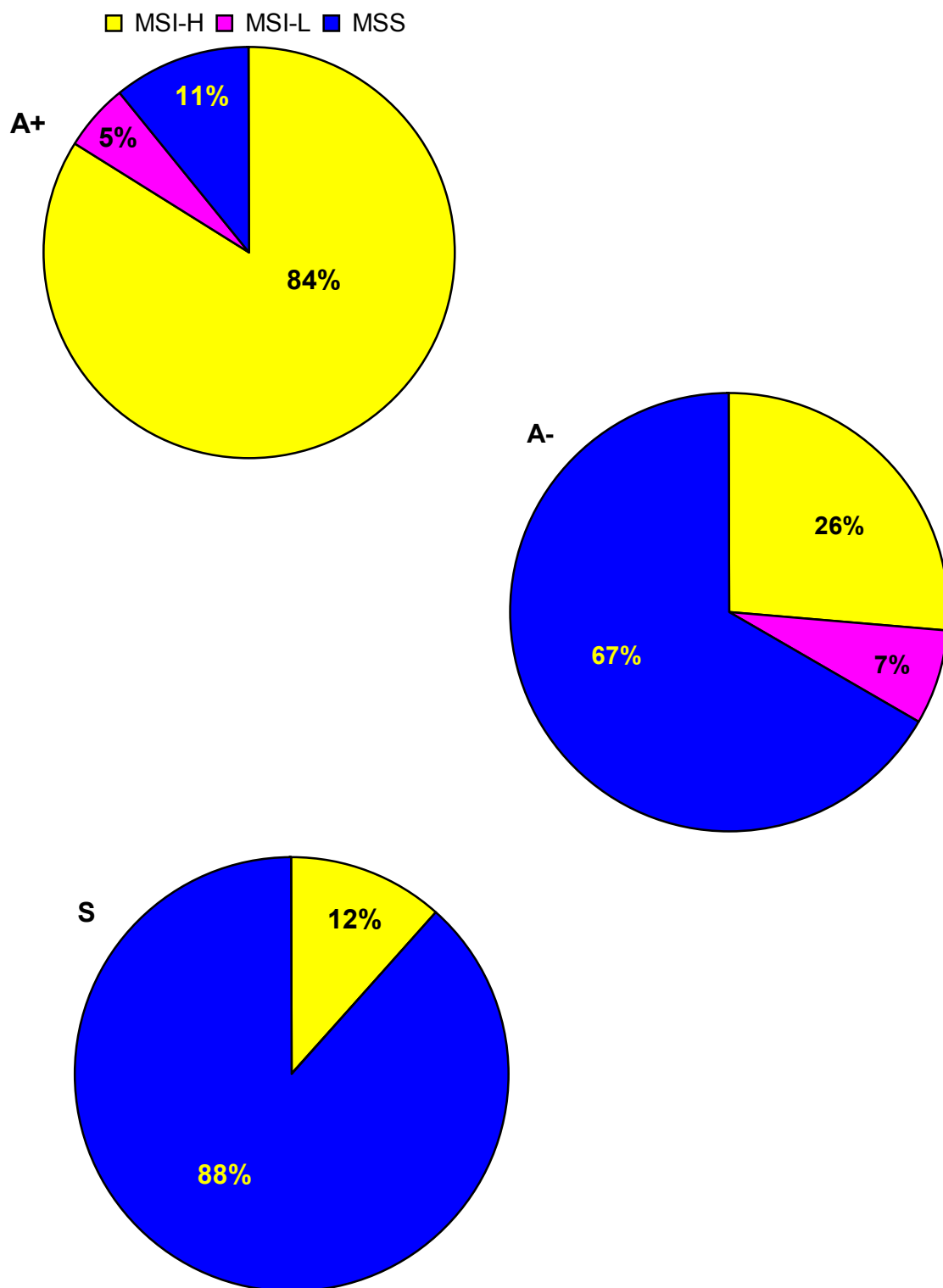
Pacienti byli rozděleni podle klinických kritérií do tří skupin. Skupina A+ splňovala Amsterodamská kritéria, skupina A- kritéria nespĺňovala, ale u pacientů se jednalo o familiární výskyt, skupina S byly sporadické případy. Výsledky mikrosatelitové analýzy ukazuje Tabulka č.6. Rozložení míry nestability podle je ukázáno v Amsterodamských kritérií Grafu č. 3.

Tabulka č. 6: Výsledky vyšetření mikrosatelitové nestability (A+ pacient splňoval Amsterodamská kritéria, A- familiární výskyt, S sporadické případy, LOH ztráta heterozygoty)

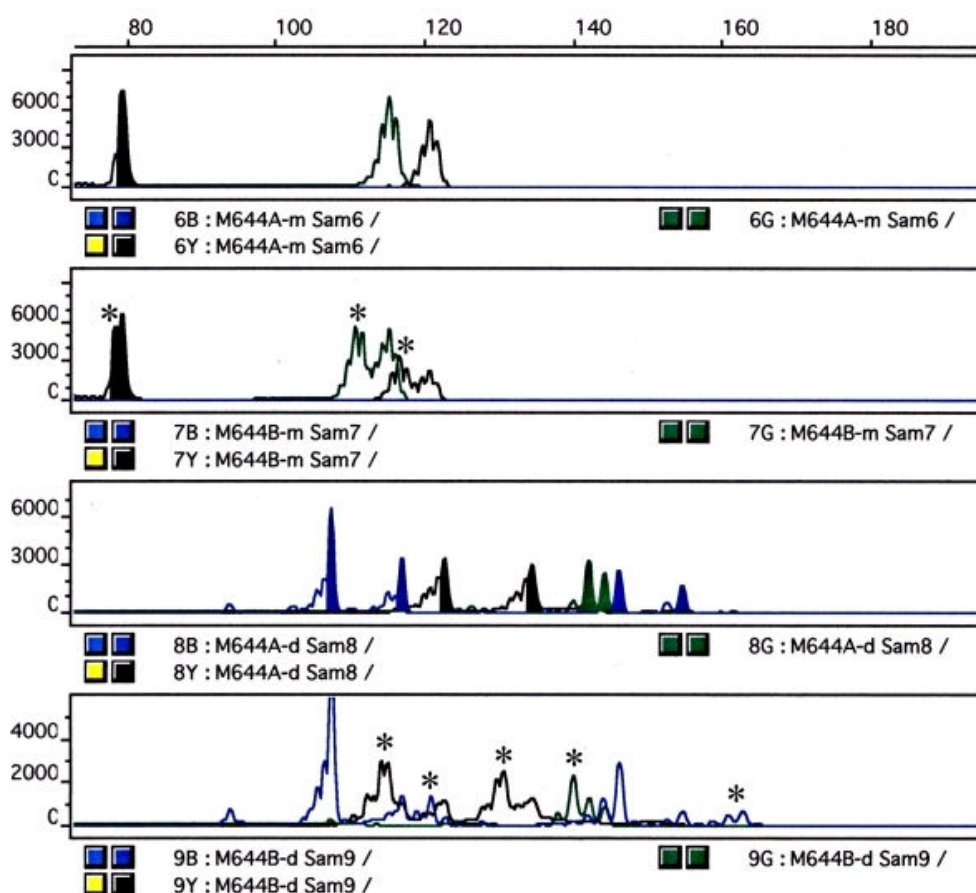
	MSI-H	MSI-L	MSS(LOH)	Celkem
A+	31	2	4(3)	37
A-	19	5	48(14)	72
S	5	0	38(15)	43
Celkem	55	7	90(32)	152

U 55 pacientů byla prokázána vysoká míra nestability, u 7 pacientů nízká míra nestability a u 90 pacientů nebyly nalezeny žádné změny v nádorové DNA. U 32 pacientů byla nalezena ztráta heterozygoty v alespoň jednom markeru. Příklad multiplex analýzy je na Obrázku č. 6. Ze všech 205 nádorových vzorků bylo 75 MSI-H, 12 MSI-L a 118 MSS, z nichž 44 vykazovalo LOH v alespoň jednom markeru.

Graf č. 3: Výsledky vyšetření MSI podle počtu pacientů v %, A+ splňujících Amsterodamská kritéria, A- nesplňujících Amsterodamská kritéria, S se sporadickým výskytem



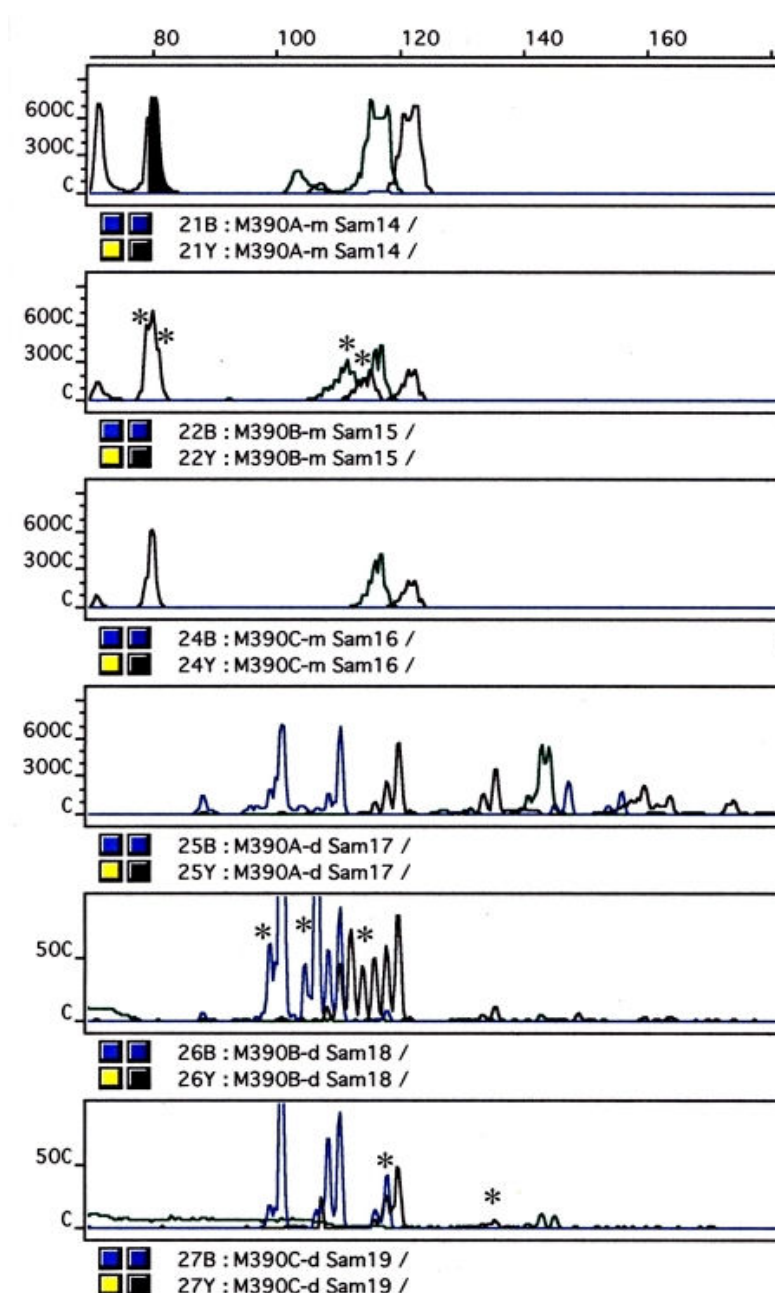
Obrázek č. 6: Příklad multiplex fragmentační analýzy (* nové fragmenty, M644A nenádorová DNA, M644B nádorová DNA, m - mononukleotidové markery: BAT-RII černý fragment 80pb, BAT-26 zelený fragment, BAT-25 černý fragment 120 bp; d – dinukleotidové markery: D5S346 modré fragmenty do 120 bp, D2S123 černé fragmenty, D18S58 zelené fragmenty, D17S250 modré fragmenty 140-160bp)



Od 43 pacientů byl k dispozici více než jeden vzorek tkáně, pouze u pěti z nich vykazaly vzorky různé míry nestability. Pacienti 837, M390 vykazali v jednom vzorku MSI-L, ve druhém MSI-H, celkově byli hodnoceni jako MSI-H, oba vzorky byly ze stejného místa odběru (Obrázek č. 7). U pacienta 628 byl nalezen jeden vzorek stabilní, ostatní tři vykazaly vysokou míru nestability, jednalo se o 3 různá místa odběru. U pacientky 478 byly k dispozici vzorek tkáně střeva a prsu. Analýza prsní tkáně nevykazala žádné změny v mikrosatelitech, pouze v lokusu D3S1029 byla nalezena ztráta

heterozygoty, tkáň střeva se jevila jako vysoce nestabilní. U pacienta 431 vykazaly dva vzorky ze stejného místa odběru vysokou míru nestability, třetí byl beze změn.

Obrázek č. 7: Příklad pacienta s různou mírou nestability ve vyšetřovaných vzorcích (* nové fragmenty, m - mononukleotidové markery: BAT-RII černý fragment 80pb, BAT-26 zelený fragment, BAT-25 černý fragment 120 bp; d – dinukleotidové markery: D5S346 modré fragmenty do 120 bp, D2S123 černé fragmenty, D18S58 zelené fragmenty, D17S250 modré fragmenty 140-160bp vzorky M390A nenádorová DNA, vzorky M390B, C nádorová DNA, vzorek M390B vysoce nestabilní, vzorek M390C nízká míra nestability (D5S346 modrý fragment, D2S123 LOH černý fragment)



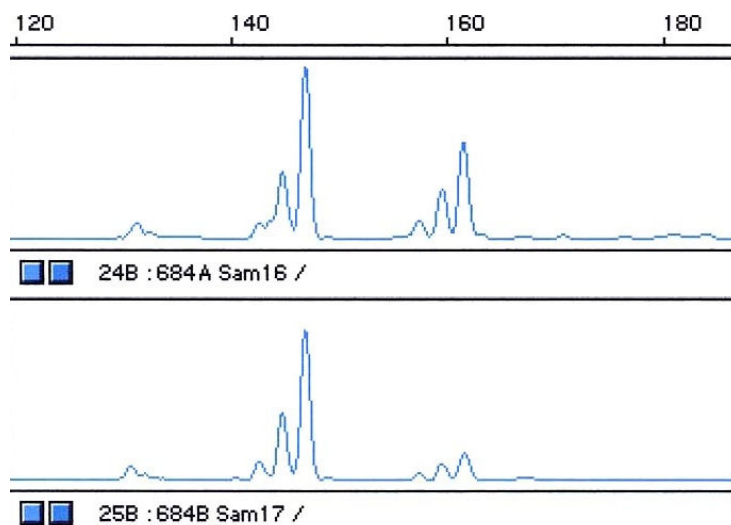
5.1.1 Ztráta heterozygosity

Ze všech 118 vzorků hodnocených jako stabilních v mikrosatelitech byla nalezena LOH v minimálně jednom lokusu u 44 případů (37,2 %). Ztráta jedné z alel se v největší míře projevovala u markerů D5S346 (gen pro APC) a D18S58 (gen pro DCC). (Tabulka č.7. Obrázek č. 8)

Tabulka č. 7: Zastoupení ztráty heterozygosity v jednotlivých lokusech

Marker	Počet LOH / celkem informativních vzorků v daném lokusu	Počet LOH na celkový počet pacientů s LOH v %	Analyzované LOH v %
D2S123	8/116	18,2	6,9
D3S1029	5/97	11,4	5,2
D5S346	25/118	56,8	21,2
D17S250	14/90	31,8	15,6
D18S58	21/89	47,7	23,6

Obrázek č. 8: Příklad ztráty heterozygosity v lokusu D17S250 (první řádek nenádorová DNA, druhý řádek nádorová)



5.1.2 Nízká míra nestability MSI-L

U 12 vzorků od sedmi pacientů byla nalezena nízká míra nestability. Z Tabulky č. 8 je patrné, že v pěti případech byla s nízkou hladinou nestability spojena i ztráta heterozygoty (Obrázek č. 7, poslední řádek M390C-d). U dvou pacientů byla nalezena mutace v MMR genu, hMSH2 respektive hMSH6 (Plevová et al., 2004; Křepelová et al., nepublikováno).

Tabulka č. 8: Zastoupení jednotlivých markerů u pacientů s nízkou hladinou nestability

Vzorek č.	Lokus s MSI	Poznámka
O3	D3S1029, D17S250	
336	D17S250	+2xLOH
385	BAT-26	mut hMSH6
834B	D2S123	
C	D2S123	+LOH
903	BAT-25	+LOH
M145B	D3S1029, D17S250	+3xLOH
C	D5S346	+2xLOH, mut hMSH2
M266B	D5S346	
C	D5S346	

5.1.3 Mononukleotidové x dinukleotidové markery

U 13 pacientů (8,6 %) byla zjištěna nestabilita pouze v dinukleotidových markerech. Šest z nich mělo nízkou míru nestability (O3, 336, 834, M145, M266, M390), 7 vysokou míru nestability (338, 431, 460, 544, 628, 832, 965).

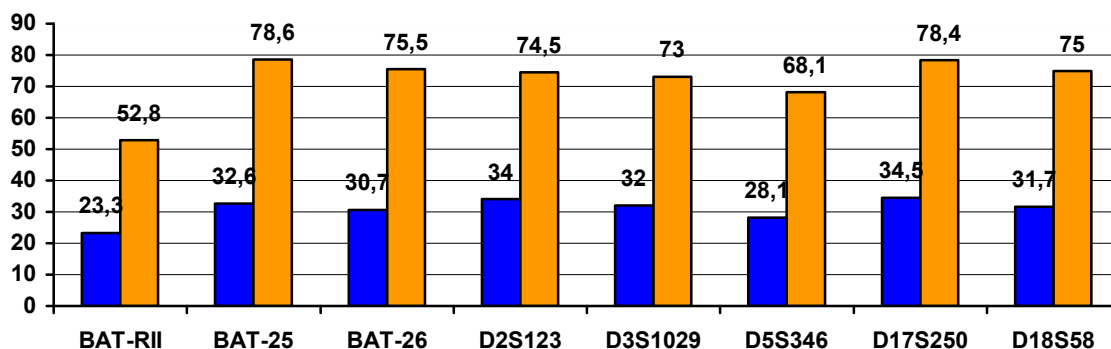
Pro větší citlivost metody při vyšetřování vzorků, u kterých nebyla k dispozici kontrolní nenádorová tkáň, byl v září 2002 do panelu vyšetřovaných markerů přidán

marker BAT-25. Do té doby vyšetřené vzorky s jasně definovaným výsledkem vyšetření již nebyly zpětně vyšetřeny. Touto skutečností je ovlivněn počet informativních vzorků vyšetřených tímto markerem (Tabulka č. 9). Z této tabulky je také patrné, že marker BAT-RII vykazuje nižší citlivost k detekce MSI (23,3 % oproti přibližně 30 % u ostatních markerů, Graf č. 4). Celkem 22 vzorků od 16 pacientů se jevílo MSI-H ve všech markerech vyjma BAT-RII (Obrázek č. 9)

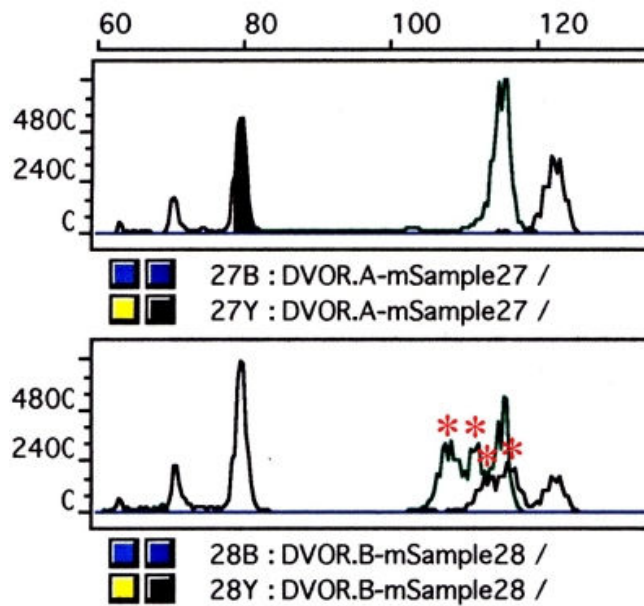
Tabulka č. 9: Výsledky vyšetření MSI podle jednotlivých markerů

	Počet informativních vzorků	Vzorků s nestabilitou	Vzorků s LOH	Informativní vzorky A+ pacientů	Vzorky A+ pacientů s MSI
BAT-RII	189	44	-	53	28
BAT-25	92	30	-	28	22
BAT-26	179	55	-	49	37
D2S123	162	55	13	47	35
D3S1029	150	48	9	37	27
D5S346	196	55	35	47	32
D17S250	148	51	15	37	29
D18S58	145	46	26	36	27

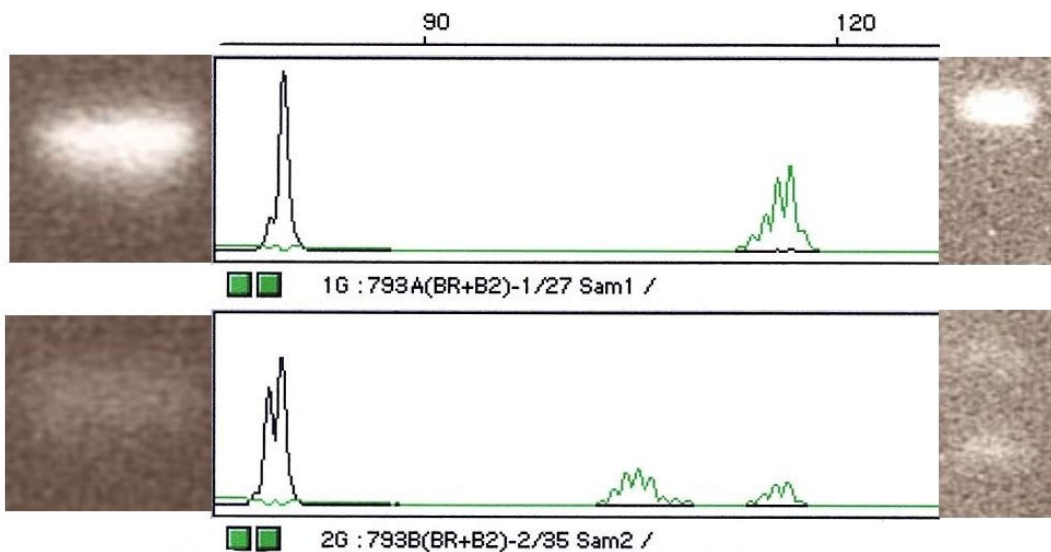
Graf č. 4: Citlivost detekce MSI podle jednotlivých markerů v % (všechny informativní vzorky modře, vzorky od A+ pacientů oranžově)



Obrázek č. 9: Příklad pacienta s nestabilitou v mononukleotidových markerech vyjma *BAT-RII* (* fragment se změněnou délkou, první řádek nenádorová DNA, druhý řádek nádorová DNA, *BAT-RII* černý fragment 80bp, *BAT-26* zelený fragment, *BAT-25* černý fragment 120 bp)



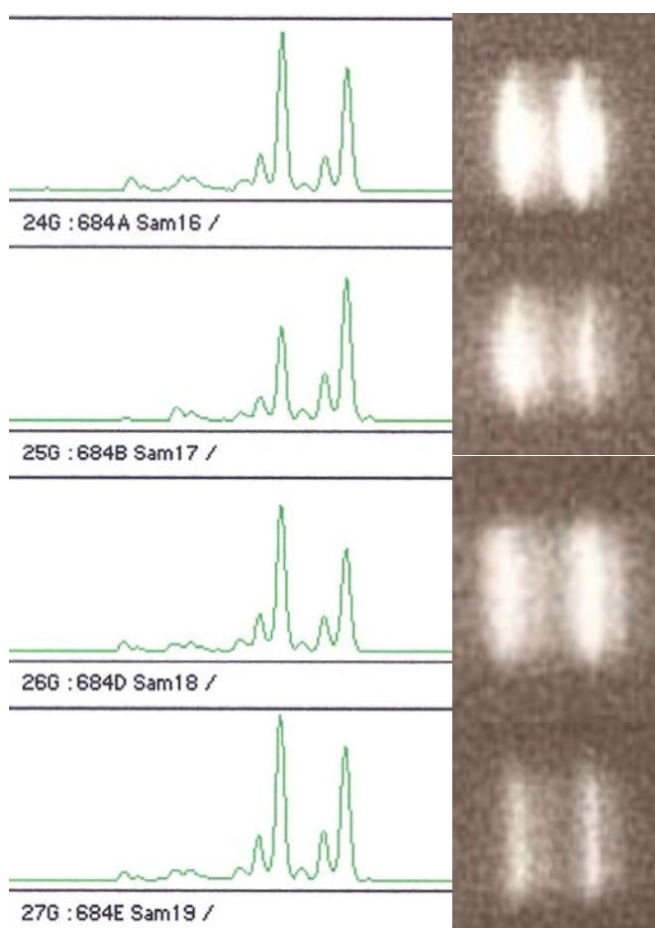
Obrázek č. 10: Srovnání citlivosti metod – mikrosatelitová nestabilita u markeru *BAT-RII* a *BAT-26* (první řádek kontrolní DNA, druhý řádek MSI v nádorové DNA)



5.2 Srovnání citlivosti obou metod

Výsledky vyšetření MSI oběma metodami jsou shrnuty v Tabulce č. 10. Z tabulky je patrné, že metoda fragmentační analýzy pomocí fluorescenčně značených primerů je schopna přesněji identifikovat LOH a změny v délce fragmentů (Obrázky č. 10 a 11). Ze 78 vzorků od 52 pacientů byla 100% shoda obou analýz u 25 pacientů, u 27 pacientů byly nalezeny změny ve vzájemném doplnění výsledků obou metod.

Obrázek č. 11: Srovnání citlivosti metod – ztráta heterozygoty u markeru D18S58 (první řádek kontrolní DNA, druhý řádek nádorová DNA s LOH, další řádky nádorová DNA beze změn)



Tabulka č. 10: Srovnání účinnosti metod fragmentační analýzy v denaturačním polyakrylamidovém gelu a genetickém analyzátoru (vzorek bez nestability: -, s nestabilitou +, výsledek gelové elektroforézy před lomítkem, v genetickém analyzátoru za lomítkem, ND - nevyšetřeno, ni – neinformativní, LOH – ztáta heterozygoty, rozdílné výsledky zvýrazněny)

	BAT-R11	BAT-26	D2S123	D3S1029	D5S346	D18S58
DJ	-/- ni/-	ni/- ni/-	ND	ND	ND	ND
VoM	-/- -/- -/- -/-	-/- -/- -/- -/-	ND	ND	ND	ND
336	-/-	-/-	-/-	LOH/-	-/LOH	-/LOH
338	-/-	ni/-	ni/LOH	-/+	-/+	ni/+
339	+/+	+/+	-/+	+/+	+/+	+/+
385	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-
386	+/+	+/+	ND	ND	ND	ND
460	-/-	-/-	ni/-	ni/+	+/+	+/+
462	-/-	-/-	ni/+	-/+	-/LOH	-/+
464	-/-	-/+	ni/+	-/+	-/+	-/+
465	-/-	-/-	-/-	-/ni	-/-	-/ni
467	-/-	+/+	+/+	ni/ni	ni/+	+/ni
468	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
494	-/+	ni/+	+/+	-/+	-/+	ni/ni
510	-/- -/- -/- -/-	-/- -/- -/- -/-	-/- -/- -/- -/-	-/- -/- -/- -/-	-/- -/- -/- -/-	-/- -/- -/- -/-
514	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
519	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
520	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-
523	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	LOH/LOH LOH/LOH	-/LOH -/LOH
524	-/-	ni/+	-/+	-/+	-/LOH	+/ni
530	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
534	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
535	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
539	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
544	-/-	ni/ni	ni/ni	ni/ni	ni/+	ni/ni
558	-/- -/- -/-	-/- -/- -/-	-/- -/- -/-	-/- -/- -/-	-/- -/- -/-	-/- -/- -/-
575	-/-	-/-	-/-	-/-	-/LOH	-/-
578	-/- -/-	-/- ni/-	-/- ni/-	-/- ni/-	-/- -/-	-/LOH -/LOH
579	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-
585	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

Tabulka č. 10: pokračování

596	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	LOH/- -/-	-/- -/-	-/- -/-
628	-/- -/- -/- ni/ni	ni/+ -/- -/- ni/+	ni/- ni/- ni/- ni/LOH	ni/ni ni/ni -/ni +/ni	-/+ -/- -/- +/+	ni/ni ni/ni ni/ni ni/ni
629	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
631	-/-	-/ni	ni/-	-/-	-/-	-/ni
659	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
660	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-
684	-/- -/- -/- -/-	-/- -/- -/- -/-	-/- -/- -/- -/-	-/LOH LOH/LOH -/- -/-	LOH/LOH LOH/LOH -/- -/-	LOH/LOH LOH/LOH -/- -/-
p	718	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
723	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
736	-/- -/-	-/- ni/-	-/- ni/-	-/- -/-	LOH/- LOH/-	ni/LOH ni/LOH
743	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
782	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
783	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/LOH
793	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
806	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
832	ni/-	ni/-	ni/-	ni/+	ni/-	ni/+
834	-/- -/-	-/- -/-	-/+ -/+	-/- -/LOH	-/- -/-	-/+ -/-
837	-/- -/+	ni/- +/+	ni/- ni/+	ni/ni ni/+	-/+ -/+	-/ni -/ni
838	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
839	-/- -/-	+/+ -/+	ni/+ ni/+	ni/+ ni/+	ni/LOH ni/-	+/+ ni/-
850	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/- -/-	-/LOH -/LOH
852	ni/- ni/-	ni/- ni/+	ni/+ ni/+	ni/+ ni/+	ni/+ ni/ni	-/LOH -/LOH
Celkový výsledek						
shoda	72	62	49	51	53	47
doplnění	4	14	18	11	6	11
diskrepance	2	2	4	9	12	13

5.3 Mutační analýza a imunohistochemické vyšetření

U 119 pacientů z vyšetřovaného souboru byla provedena mutační analýza mismatch repairových genů hMLH1, hMSH2 a hMSH6 (Plevová et al., 2004; Křepelová et al., nepublikováno). Mutace byla nalezena u celkem 33 pacientů, u 30 pacientů s vysokou mírou nestability, u 2 s nízkou mírou nestability a u jednoho pacienta beze změn v mikrosatelitových sekvencích. U 81 % pacientů s MSI-H fenotypem byla nalezena mutace v MMR genech hMLH1, hMSH2. U pacienta 385 s MSI-L fenotypem byla nalezena mutace v genu MSH6

69 vzorků od 66 pacientů bylo imunohistochemicky vyšetřeno na přítomnost exprese proteinu MLH1 a MSH2 v nádorové tkáni (Plevová et al., 2004). Shoda byla prokázána u 61 pacientů (92,4 %). U 23 pacientů byla prokázána ztráta exprese MLH1, u 3 ztráta exprese MSH2, všichni tito pacienti vykazali vysokou míru mikrosatelitové nestability. U MSS pacientů nebyla nalezena změna v expresi genů MLH1 a MSH2.

Výsledky mikrosatelitové nestability, imunohistochemické a mutační analýzy jsou detailněji rozebrány v Příloze 1.

6. DISKUZE

Detekce mikrosatelitové nestability se stala integrální součástí diagnostického protokolu u pacientů s podezřením na HNPCC, kdy předchází nebo doplňuje mutační analýzu MMR genů (Vasen 2007). Nestabilita mikrosatelitů je charakteristickým fenotypovým projevem ztráty funkce opravných proteinů kódovaných mismatch repairovými geny v nádorových buňkách.

Nestabilita byla vyšetřována a hodnocena podle standardizovaného protokolu daného „International Collaborative Group on HNPCC“ (Boland et al., 1998).

Vzhledem k tomu, že 85 % nádorových vzorků byla formalínem fixovaná tkáň v parafinových bločcích, získaná DNA byla nízké kvality, rozštěpena do kratších fragmentů, které se špatně amplifikovaly. Celkem bylo izolováno a vyšetřeno 342 vzorků tkání od 191 pacientů. Do studie bylo zařazeno pouze 205 informativních vzorků od 152 pacientů. Pro dosažení minimálního počtu pěti informativních markerů byl proto přidán do vyšetřovaného souboru další marker z referenčního panelu D17S250 (Boland et al., 1998). Pro srovnání, všechny markery u vzorků z čerstvých nebo zamražených tkání, byly po amplifikaci 100% informativní.

Do roku 2001 byla na pracovišti prováděna fragmentační analýza v denaturačním polyakrylamidovém gelu. Po získání analyzátoru ABI Prism 310 byla tato metoda převedena na fragmentační analýzu pomocí PCR s fluorescenčně značenými primery. Souběžně bylo oběma metodami vyšetřeno 52 pacientů. Používané markery byly BAT-RII, BAT-26, D2S123, D3S1029, D5S346 a D18S58. U 19 pacientů byla nalezena diskrepance mezi jednotlivými metodami. Fragmentační analýza pomocí fluorescenčně značených primerů citlivěji detekovala ztráty heterozygosity a nově vzniklé fragmenty lišící se od původních o jednu repetitivní jednotku (Obrázek č. 11). Toto zjištění plně koresponduje s výsledkem Christensena (Christensen et al., 1999).

Tabulka č. 11: Frekvence mikrosatelitové nestability (spor- sporadické, pravostr- pravostranné, neselekt- neselektované)

Aaltonen, 1993	11/17 (79 %)	HNPCC
Aaltonen, 1994	8/49 (16 %)	spor CRC
	25/29 (86 %)	HNPCC
Cawkwell, 1995	12/54 (22 %)	CRC
Ishimaru, 1995	17/80 (20,1 %)	CRC
Jass, 1995	21/50 (42 %)	CRC
Parson, 1995	100/111 (90 %)	CRC
Brassett, 1996	7/33 (21 %)	časné CRC
	18/18 (100 %)	HNPCC
	6/65 (9 %)	familiár CRC
Bubb, 1996	36/215 (16,4 %)	spor CRC
Liu, 1996	68/74 (92 %)	HNPCC
Risinger, 1996	8/13 (62 %)	HNPCC
Akiyama, 1997	13/14 (93 %)	HNPCC
Fujiwara, 1998	37/39 (95 %)	HNPCC
	18/57 (31 %)	spor pravostr CRC
Iacopetta, 1998	37/183 (20 %)	pravostr CRC
Krajinovic, 1998	6/25 (24 %)	CRC
Thibodeau, 1998	59/188 (31,3 %)	CRC
Vostriukhina, 1998	6/8 (75 %)	HNPCC
Bapat, 1999	12/22 (54,5 %)	HNPCC
Capozzi, 1999	17/47 (36,2 %)	CRC
Dietmaier, 1999	26/148 (17,6 %)	CRC
Pedroni, 1999	12/37 (32,4 %)	CRC
Salahshor, 1999	22/181 (12 %)	neselekt CRC
Sutter, 1999	15/29 (51,7 %)	HNPCC
Wu, 1999	21/36 (58,3 %)	HNPCC
Fleisher, 2000	29/148 (20 %)	spor CRC
Fridrichová, 2000	11/21 (52,4 %)	HNPCC
González-García, 2000	64/415 (15,5 %)	CRC
Gryfe, 2000	122/607 (20%)	CRC
Johannsdottir, 2000	36/92 (39,1 %)	HNPCC
Cunningham, 2001	69/257 (27 %)	neselekt CRC
Caldes, 2004	27/58 (46,6 %)	HNPCC
Smolarz, 2004	7/30 (23 %)	HNPCC
Wei, 2004	10/13 (76,9 %)	HNPCC

Frekvence mikrosatelitové nestability u sporadických kolorektálních karcinomů je 10-15 %, u pacientů splňujících Amsterodamská kritéria pro HNPCC 23 až 93 % (Tabulka č. 11). Udávaná frekvence do jisté míry závisí na analyzovaném souboru pacientů. Vyšší frekvence je udávána u rozsáhlých analýz nádorových rodin, což ovlivňuje celkový výsledek. Do našeho souboru nebyli zařazeni žádní příbuzní vyšetřovaných pacientů s výjimkou jedné sourozenecké dvojice. Celkem bylo vyšetřeno 152 pacientů, u nichž byla prokázána vysoká míra nestability u 36 % pacientů a nízká míra nestability u 6 % pacientů. U 59 % pacientů nebyla nalezena nestabilita v mikrosatelitových markerech. Tato zjištění korespondovala s rozložením pacientů do skupin podle Amsterodamských kritérií. 83 % pacientů s MSI-H fenotypem splňovalo Amsterodamská kritéria, což je v souladu s výsledky ostatních autorů. U 81 % MSI-H pacientů byla nalezena zárodečná mutace v genech hMLH1 nebo hMSH2 (Plevová et al., 2004; Křepelová nepublikováno). U pacientů s MSI-L fenotypem byly nalezeny dvě mutace: u pacienta M145 byla nalezena zárodečná mutace MSH2 genu, míra jeho nestability byla hraniční, k jednomu (dvěma u druhého zkoumaného vzorku) nestabilnímu markeru byla přidružena i LOH v několika dalších lokusech. U pacienta 385 byl nalezen jasný MSI-L fenotyp v mononukleotidovém markeru BAT-26 a mutace v genu MSH6. Tento výsledek koreluje se zjištěním Wu, že suspektní HNPCC s nízkou mírou nestability v mononukleotidových markerech vykazují vyšší frekvenci mutací v genu MSH6 (Wu et al., 1999).

69 vzorků od 66 pacientů z našeho souboru bylo zařazeno i do imunohistochemické analýzy proteinů MLH1 a MSH2 (Plevová et al., 2004). Zde byla nalezena jasná pozitivní korelace - 92,4 % vzorků prokázalo shodu, u MSI-H vzorků byla nalezena snížená nebo úplná ztráta exprese proteinů MLH1 nebo MSH2. Tato naše zjištění odpovídají i dalším studiím (Vasen et al., 2007).

V souboru bylo 9 pacientů, u nichž nebyla k dispozici nenádorová DNA. V takových případech se doporučuje, aby byly vyšetřeny alespoň tři mononukleotidové markery z referenčního panelu (Boland et al., 1998). Proto byl zaveden marker BAT-25. Vzorky, u nichž byla nalezena nestabilita v minimálně dvou mononukleotidových markerech, byly zařazeny do studie a označeny jako MSI-H. Vzorky, které byly nestabilní v jednom nebo žádném markeru byly označeny jako neinformativní a vyřazeny z hodnoceného souboru.

V referenčním panelu markerů jsou i dva quasimonomorfní markery BAT-26 a BAT-25. U obou se v naší, evropské, populaci vyskytuje pouze jedna alela. Z tohoto důvodu je některými skupinami upřednostňována možnost vyšetření nestability mikrosatelitů v nádorové tkáni bez srovnání s tkání kontrolní (Iacopetta a Hamelin, 1998; Samowitz et al., 1999). Iacopetta, stejně jako Fridrichová (Fridrichová et al., 2000), Cunningham (Cunningham et al., 2001) a Lamberti (Lamberti et al., 1999) prokázali, že u téměř 100 % MSI-H vzorků byla nalezena nestabilita i v markeru BAT-26. S tím poněkud nekoreluje naše zjištění, že u 13 pacientů (7 MSI-H) byla nalezena nestabilita pouze v dinukleotidových markerech, proto se přikláníme k variantě srovnání s nenádorovou DNA, pokud je tato k dispozici. V případě, že kontrolní DNA není k dispozici, je doporučeno vyšetřit další mononukleotidové markery z referenčního panelu, např. BAT-40 (Umar et al., 2004).

Nižší citlivost markeru BAT-RII (22 MSI-H vzorků beze změny v BAT-RII) odpovídá studiím jiných autorů (Iacopetta et Hamelin 1998; Parsons et al., 1995; Akiyama et al., 1997, Gebert et al., 2000; Iacopetta et al., 1998). Je třeba zdůraznit, že nestabilita v markeru BAT-RII je projevem somatické frameshift mutace v nádoru, neboť tento marker je umístěn v kódující oblasti genu TGFβRII. Většina autorů udává, že u 60-90 % MSI-H nádorů je nalezena 1bp nebo 2bp inserce/delece (**62 %** Johannsdottir et al., 2000; **72,7 %** Markowitz et al., 1995; **82 %** Gebert et al., 2000; **85 %** Akiyama et al., 1997; **85 %** Fujiwara et al., 1998; **86 %** Iacopetta et al., 1998; **90 %** Parsons et al., 1995), čemuž odpovídá i námi zjištěných 70,6 %.

U více než 37 % vzorků byla pozorována ztráta heterozygoty alespoň v jednom lokusu. Nejcitlivějšími markery se ukázaly být D5S346 a D18S58, intronové markery genů APC respektive DCC. Ke stejnému zjištění dospěli i další autoři (Gebert et al., 2000; Dietmaier et al., 1999; Thibodeau et al., 1998). U těchto případů bude pravděpodobně vznik tumoru způsoben kumulací somatických mutací v tumorsupresorových genech, což se může projevit v klinické prognóze (Gebert et al., 2000).

K rozporu oproti studii Dietmaiera (Dietmaier et al., 1999) došlo u výskytu LOH u MSI vzorků. V žádném ze 148 vzorků nenalezli současně LOH i MSI. V naší studii jsme našli LOH i MSI u 15 pacientů (15/152). Tento rozdíl byl pravděpodobně způsoben odlišnou metodikou. Dietmaierova skupina používala pro analýzu vzorky odebrané

mikrodisekcí z parafinových bločků. Tento způsob je efektivnější a zvyšuje citlivost metody. Druhou možností by bylo ověření „pravosti“ LOH. Vyšetřením nestability mikrosatelitu získáváme ve skutečnosti výsledek chybějící fragment „se jeví jako LOH“. Z vyšetření nepoznáme, zda se jedná o úplnou ztrátu původní alely, nebo je ve skutečnosti „ztracený“ fragment stejně dlouhý jako fragment druhé alely a migrují současně. Abychom ověřili „pravost“ LOH, museli bychom oba fragmenty kvantifikovat. Zde však může nastat problém způsobený právě kvalitou DNA získanou z formalínem fixovaných parafinových bločků.

7. SOUHRN

Mikrosatelitová nestabilita je základní součástí molekulárně genetické analýzy HNPCC. Je typickým fenotypovým projevem nádorových buněk kolorekta vyplývajícím ze ztráty funkce mismatch repairového systému.

Na našem pracovišti byla v roce 2001 zavedena metoda fragmentační analýzy pomocí fluorescenčně značených PCR produktů. Účinnost metody byla ověřena na souboru 52 pacientů. V současné době se již metoda fragmentační analýzy v polyakrylamidovém gelu pro vyšetřování mikrosatelitové nestability neprovádí.

Hlavním cílem studie bylo vyšetřit mikrosatelitovou nestabilitu u dostupného souboru pacientů, suspektních HNPCC odeslaných ke genetické analýze. Pacienti byli rozděleni do skupin podle podmínek splnění Amsterodamských kritérií. U 55 pacientů byla prokázána vysoká míra nestability (36,2 %), u 7 pacientů nízká míra nestability (4,6 %) a u 90 pacientů nebyly nalezeny žádné změny v nádorové DNA. U 32 pacientů byla nalezena ztráta heterozygosity v alespoň jednom markeru. 83 % pacientů splňujících Amsterodamská kritéria byl prokázán fenotyp vysoké míry nestability (MSI-H). Výsledky vyšetření mikrosatelitové nestability byly pozitivně korelovány s mutační a imunohistochemickou analýzou genů MLH1, MSH2 a MSH6. U 81% pacientů s MSI-H fenotypem byla prokázána germline mutace u MLH1 nebo MSH2 genu. U jednoho pacienta s MSI-L fenotypem byla nalezena mutace v genu MSH6. U 92,4 % pacientů byla nalezena shoda MSI fenotypu s expresí genů MLH1 a MSH2 .

8. PŘEHLED LITERATURY

Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, Järvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, Petersen GM, Kinzler KW, Vogelstein B, de la Chapelle A: Clues to the Pathogenesis of Familial Colorectal Cancer. *Science* 1993; 260:812-6

Aaltonen LA, Peltomäki P, Mecklin JP, Järvinen H, Jass JR, Green JS, Lynch HT, Watson P, Tallqvist G, Juhola M, Sistonen P, Hamilton SR, Kinzler KW, Vogelstein B, Chapelle A: Replication Errors in Benign and Malignant Tumors from Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Patients. *Cancer Res* 1994; 54(7):1645-8

Akiyama Y, Iwanaga R, Saitoh K, Shiba K, Ushio K, Ikeda E, Iwama T, Nomizu T, Yuasa Y: Transforming Growth Factor Beta Type II Receptor Gene Mutations in Adenomas from Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 1997; 112(1):33-9

Arzimanoglou II, Gilbert FG, Barber HRK: Microsatellite Instability in Human Solid Tumors. *Cancer* 1998; 82:1808-20

Bapat BV, Madlensky L, Temple LKF, Hiruki T, Redston M, Baron DL, Xia L, Marcus VA, Soravia C, Mitri A, Shen W, Gryfe R, Berk T, Chodirker BN, Cohen Z, Gallinger S: Family History Characteristics, Tumor Microsatellite Instability and Germline MSH2 and MLH1 Mutations in Hereditary Colorectal Cancer. *Hum Genet* 1999; 104:167-176

Bellacosa A: Functional Interactions and Signaling Properties of Mammalian DNA Mismatch Repair Proteins. *Cell Death and Differentiation* 2001; 8: 10761092; http://www.nature.com/cdd/journal/v8/n11/fig_tab/4400948f1.html

Berends MJW, Wu Y, Sijmons RH, Mensink RGJ, van der Sluis T, Hordijk-Hos JM, de Vries GE, Hollema H, Karrenbeld A, Buys CHCM, van der Zee AGJ, Hofstra RMW, Kleibeuker JH: Molecular and Clinical Characteristics of MSH6 Variants: An Analysis of 25 Index Carriers of a Germline Variant. *Am J Hum Genet* 2002; 70:26-37

Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S: A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for Cancer Detection and Familial Predisposition: Development of International Criteria for the Determination of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Cancer Res* 1998; 58:5248-57

Borts Rh, Chambers SR, Abdullah MFF: The Many Faces of Mismatch Repair in Meiosis. *Mut Res* 2000; 451:129-50

Brassett C, Joyce JA, Froggatt NJ, Williams G, Furniss D, Walsh S, Miller R, Evans DG, Maher ER: Microsatellite Instability in Early Onset and Familial Colorectal Cancer. *J Med Genet* 1996; 33(12):981-5

Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A, Tannergard P, Bollag RJ, Godwin AR, Ward DC, Nordenskjöld M, Fishel R, Kolodner R, Liskay RM: Mutation in the DNA Mismatch Repair Gene Homologue hMLH1 is Associated with Hereditary Non-polyposis Colon Cancer. *Nature* 1994; 368:258-61

Bubb VJ, Curtis LJ, Cunningham C, Dunlop MG, Carothers AD, Morris RG, White S, Bird CC, Wyllie AH: Microsatellite Instability and the Role of hMSH2 in Sporadic Colorectal cancer. *Oncogene* 1996; 12(12):2641-9

Burt RW: Colon Cancer Screening. *Gastroenterology* 2000; 119:837-853

Caldes T, Godino J, Sanchez A, Corbacho C, De la Hoya M, Lopez Asenjo J, Saez C, Sanz J, Benito M, Ramon Y, Cajal S, Diaz-Rubio E: Immunohistochemistry and Microsatellite Instability testing for Selecting MLH1, MSH2 and MSH6 Mutation Carriers in Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer. *Oncol Rep* 2004; 12(3): 621-9

Cama A., Genuardi M, Guanti G, Radice P, Varesco L: Molecular Genetics of Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer (HNPCC) 1996; 82:122-35

Capozzi E, Puppa LD, Fornasarig M, Pedroni M, Boiocchi M, Viel A: Evaluation of the Replication Error Phenotype in Relation to Molecular and Clinicopathological Features in Hereditary and Early Onset Colorectal Cancer. *Eur J Cancer* 1999; 35(2):289-95

Cawkwell L, Li D, Lewis FA, Martin I, Dixon MF, Quirke P: Microsatellite Instability in Colorectal Cancer: Improved Assessment Using Fluorescent Polymerase Chain Reaction. *Gastroenterology* 1995; 109:465-715

Cunningham JM, Kim CY, Christensen ER, Tester DJ, Parc Y, Burgart LJ, Halling KC, McDonnell SK, Schaid DJ, Vockley CW, Kubly V, Nelson H, Mechels VV, Thibodeau SN: The Frequency of Hereditary Defective Mismatch Repair in a Prospective Series of Unselected Colorectal Carcinomas. *Am J Hum Genet* 2001; 69:780-90

Debrauwere H, Gendrel CG, Lechat S, Dutreix M: Difference and Similarities Between Various Tandem Repeat Sequences: Minisatellites and Microsatellites. *Biochimie* 1997; 79:577-86

Dietmaier W, Riedlinger W, Köhler A, Wegele P, Beyser K, Sagner G, Wartbichler R, Rüschoff J: Detection of Microsatellite Instability (MSI) and Loss of Heterozygosity (LOH) in Colorectal Tumors by Fluorescence-Based Multiplex Microsatellite PCR. *Biochimica* 1999; 2: 42-5

Dieumegard B, Grandjouan S, Sabourin JC, Le Bihan ML, Lefrere I, Bellefghih, Pignon JP, Rougier P, Lasser P, Bénard J, Couturier D, Bressac-dePaillerets B: Extensive Molecular Screening for Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer. *Br J Cancer* 2000; 82(4):871-80

Drummond JT, Li GM, Longley MJ, Modrich P: Isolation of an hMSH2-p160 Heterodimer that Restores DNA Mismatch Repair to Tumor Cells. *Science* 1995; 268:1909-12

Eshleman JR, Markowitz SD: Mismatch Repair Defects in Human Carcinogenesis. *Hum Mol Genet* 1996; 5:1489-94

Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R: The Human Mutator Gene Homolog MSH2 and Its Association with Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer. *Cell* 1993; 75(5):1027-38

Fleisher AS, Esteller M, Harpaz N, Leytin A, Rashid A, Xu Y, Liang J, Stine OC, Yin J, Zou TT, Abraham JM, Kong D, Wilson KT, James SP, Herman JG, Meltzer J: Microsatellite Instability in Inflammatory Bowel Disease-associated Neoplastic Lesions Is Associated with Hypermethylation and Diminished Expression of the DNA Mismatch Repair Gene, hMLH. *Cancer Res* 2000; 60:4864-8

Fridrichová I, Ilenčíková D, Fiedl W, Hlavčák P, Škorvaga M, Križan P, Pálaj J, Piršel M, Farkašová E, Bartošová Z: Approaches to Identification of HNPCC Suspected Patients in Slovak Population. *Neoplasma* 2000; 47(4): 219-26

- Fujiwara T, Stolker JM, Watanabe T, Rashid A, Longo P, Eshleman JR, Booker S, Lynch HT, Jass JR, Green JS, Kim HT, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR: Accumulated Clonal Genetic Alterations in Familial and Sporadic Colorectal Carcinomas with Widespread Instability in Microsatellite Sequences. *Am J pathol* 1998; 153(4):1063-78
- Gebert J, Sun M, Ridder R, Hinz U, Lehnert T, Möller P, Schackert HK, Herfarth Ch, Doeberitz MK: Molecular Profiling of Sporadic Colorectal Tumors by Microsatellite Analysis. *Int J Oncol* 2000; 16: 169-79
- González-García I, Moreno V, Navarro M, Martí-Ragué J, Marcuello E, Benasc C, Campos O, Capellá G, Peinado MA: Standardized Approach for Microsatellite Instability Detection in Colorectal Carcinomas. *J Nat Cancer Inst* 2000; 92(7): 544-9
- Gryfe R, Kim H, Hsieh ETK, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, Redston M, Gallinger S: Tumor Microsatellite Instability and Clinical Outcome in Young Patients with Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 2000; 342:69-77
- Guerrette S, Wilson T, Gradia S, Fishel R: Interactions of Human h MSH2 with h MSH3 and hMSH2 with hMSH6: Examination of Mutations Found in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Mol Cell Biol* 1998; 18(11):6616-23
- Hampel H, Peltomaki P: Hereditary Colorectal Cancer: Risk Assessment and Management. *Clin Genet* 2000; 57:89-97
- Hoang JM, Cottu PH, Thuille B, Salmon RJ, Thomas G, Hamelin R: BAT-26, an Indicator of the Replication Error Phenotype in Colorectal Cancers and Cell Lines. *Cancer Res* 1997; 57:300-3
- Christensen M, Sunde L, Bolund L, Orntoft TF: Comparison of Three Methods of Microsatellite Detection. *Scand J Clin Lab Invest* 1999; 59:167-78
- Iacopetta B, Hamelin R: Rapid and Nonisotopic SSCP-Based Analysis of the BAT-26 Mononucleotide Repeat for Identification of the Replication Errors Phenotype in Human Cancers. *Hum Mut* 1998; 12:355-60
- Iacopetta B, Grieu F: Routine Detection of the Replication Error Phenotype in Clinical Tumor Specimens Using Fluorescence-SSCP. *BioTechniques* 2000; 28(3):566-9
- Ichikawa A, Sugano K, Fujita S: DNA Variants of BAT-25 in Japanese, a Locus Frequently Used for Analysis of Microsatellite Instability. *Jpn J Clin Oncol* 2001; 31(7):346-8
- Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M: Ubiquitous Somatic Mutations in Simple Repeated Sequences Reveal a New Mechanism for Colonic Carcinogenesis. *Nature* 1993; 363(6429):558-61
- Ishimaru G, Adachi J, Shisek M, Yamaguchi N, Muto T, Yokota J: Microsatellite Instability in Primary and Metastatic Colorectal Cancers. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 1995; 64:153-7
- Jass JR, Cottier S, Jeevaratnam P, Pokos V, Holdaway KM, Bowden ML, Van der Water N, Browett PJ: Diagnostic Use of Microsatellite Instability in Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer. *The Lancet* 1995; 346:1200-1
- Johannsdottir JT, Jonasson IG, Bergthosson JT, Amundadottir LT, Magnusson J, Egilsson V, Ingvarsson S: The Effect of Mismatch Repair Deficiency on Tumorigenesis; Microsatellite Instability Affecting Genes Containing Short Repeat Sequences. *Int J Oncol* 2000; 16:133-9

- Jones MH, Yamakawa K, Nakamura Y: Isolation and Characterization of 19 Dinucleotide Repeat Polymorphisms on Chromosome 3p. *Hum Mol Genet.* 1992;1(2):131-3.
- Joslyn G, Carlson M, Thliveris A, Albertsen H, Gelbert L, Samowitz W, Groden J, Stevens J, Spirio L, Robertson M, et al.: Identification of Deletion Mutations and Three New Genes at the Familial Polyposis Locus. *Cell* 1991;66(3):601-13
- Keller G, Rudelius M, Vogelsang B, Grimm V, Wilhelm MG, Mueller J, Siewert JR, Höfler H: Microsatellite Instability and Loss of Heterozygosity in Gastric Carcinoma in Comparison to Family History. *Am J Pathol* 1998; 152:1281-9
- Krajcinovic M, Richer C, Gorska-Flipot I, Gaboury L, Novakovic I, Labuda D, Sinnett D: Genomic Loci Susceptible to Replication Errors in Cancer Cells. *Br J Cancer* 1998; 78(8):981-5
- Krutílková V, Havlovicová M, Goetz P: Specializované genetické poradenství u dětských a dospělých pacientů. *ČLČ* 2002; 141(1):23-7
- Lamberti C, Kruse R, Ruelfs C, Caspari R, Wang Y, Jungck M, Mathiak M, Malayeri HR, Friedl W, Sauerbruch T, Propping P: Microsatellite Instability – a Useful Diagnostic Tool to Select Patients at High Risk for Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer: A Study in Different Groups of Patients with Colorectal Cancer. *Gut* 1999; 44:839-43
- Lindblom A, Tanergard P, Werelius B, Nordenskjöld M: Genetic Mapping of a Second Locus Predisposing to Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer. *Nature Genet* 1993; 5:279-82
- Lipkin SM, Wang V, Jacoby R, Banerjee-Basu S, Baxevanis AD, Lynch HT, Elliot RM, Collins FS: MLH3: a DNA Mismatch Repair Gene Associated with Mammalian Microsatellite Instability. *Natur Genet* 2000; 24:27-35
- Lipkin SM, Wang V, Stoler DL, Anderson GR, Kirsch I, Hadley D, Lynch HT, Collins FS: Germline and Somatic Mutation Analyses in the DNA Mismatch Repair Gene MLH3: Evidence for Somatic Mutation in Colorectal Cancers. *Hum Mutat* 2001; 17:389-96
- Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaides NC, Lynch HT, Watson P, Jass JR, Dunlop M, Wyllie A, Peltomaki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW: Analysis of Mismatch Repair Genes in Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer Patients. *Nat Med* 2(2):169-74, 1996
- Lu SL, Akiyama Y, Nagasaki H, Saitoh K, Yuasa Y: Mutations of the Transforming Growth Factor- β Type II Receptor Gene and Genomic Instability in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Biochem Biophys Res Com* 1995; 216(2):452-7
- Lynch HT, Smyrk TC, Cavalieri J, Lynch JF: Identification of an HNPCC Family. *Am J Gastroenterol* 1994; 89(4):605-9
- Lynch HT, Smyrk T, Lynch J: An update of HNPCC (Lynch Syndrome). *Cancer genet Cytogenet* 1997; 93:84-99
- Lynch HT, Chapelle A: Genetic Susceptibility to Non-polyposis Colorectal Cancer. *J Med Genet.* 1999; 36(11):801-18
- Lynch HT, Chapelle A: Hereditary Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 2003; 348(10): 919-32
- Lynch PM: Clinical Challenges in Management of Familial Adenomatous Polyposis and Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Cancer Suppl* 1999; 86(8): 1713-9

- Mao L, Lee DJ, Tockman MS, Eroza YS, Asin F: Microsatellite Alterations as Clonal Markers for Detection of Human Cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:9871-5
- Marra G, Boland CR: DNA Repair and Colorectal Cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 1996; 25(4):755-72
- Modrich P: DNA Mismatch Repair and Genetic Stability, 2006
<http://www.hhmi.org/research/investigators/modrich.html>
- Nadir E, Margali H, Gallily T, Ben-Sasson SA: Microsatellite Spreading in the Human Genom: Evolutionary Mechanism and a Possible Selective Advantage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:6470-5
- Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Wei YF, Carter KC, Ruben SM, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD, Venter JC, Dunlops MG, Hamilton SR, Petersen GM, de la Chapelle A, Vogelstein B, Kinzler KW: Mutations of Two PMS Homologues in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Nature* 1994, 371:75-80
- Nyström-Lahti M, Parsons R, Sistonen P, Pylkkänen L, Aaltonen LA, Leach FS, Hamilton SR, Eatson P, Bronson E, Fusaro R, Cavalieri J, Lynch J, Lanspa S, Smyrk T, Lynch P, Drouhard T, Kinzler KW, Vogelstein B, Lynch HT, de la Chapelle A, Peltomäki P: Mismatch Repair Genes on Chromosomes 2p and 3p Account for a Major Share of Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Families Evaluable by Linkage. *Am J Hum Genet* 1994; 55:659-65
- Palombo F, Gallinary P, Iaccarino I, Lettieri T, Hughes M, D'Arrigo A, Truong O, Hsuan JJ, Jiricny J: GTBP, a 160-kilodalton Protein Essential for Mismatch-binding Activity in Human Cells. *Science* 1995; 268:1912-4
- Papadopoulos N, Nicolaides NC, Liu B, Parsons R, Lengauer C, Palombo F, D'Arrigo A, Markowitz S, Wilson JK, Kinzler KW, Jiricny J, Vogelstein B : Mutations of GTBP in Genetically Unstable Cells. *Science* 1995; 268: 1915-7
- Parsons R, Myeroff LL, Liu B, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B: Microsatellite Instability and Mutations of the Transforming Growth Factor Beta Type II Receptor Gene in Colorectal Cancer. *Cancer Res.* 1995; 55(23):5548-50.
- Pedroni M, Tamassia MG, Percesepe A, Roncucci L, Benati P, Lanza G, Gafa R, Di Gregorio C, Fante R, Losi L, Gallinari L, Scorcioni F, Vaccina F, Rossi G, Cesnaro AM, Ponz de Leon M: Microsatellite Instability in Multiple Colorectal Tumors. *Int J Cancer* 1999; 81:1-5
- Peinado MA, Malkhosyan S, Velazquez A, Peruco M: Isolation and Characterization of Allelic Losses and Gains in Colorectal Tumors by Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(21):10065-9
- Peltomäki P, Aaltonen L, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, Järvinen H, Green JS, Jass JR, Weber JL, Leach FS, Petersen G, Hamilton SR, de la Chapelle A, Vogelstein B: Genetic Mapping of a Locus Predisposing to Human Colorectal Cancer. *Science* 1993, 260:810-2
- Peltomäki P: DNA Mismatch Repair Gene Mutations in Human Cancer. *Envirom Health Perspectives* 1997; 105(Suppl 4):775-80
- Petersen GM, Brensinger JD, Johnson KA, Giardiello FM: Genetic Testing and Counseling for Hereditary Foms of Colorectal Cancer. *Cancer Suppl* 1999; 86(8): 1720-30

Plevová P, Křepelová A, Papežová M, Sedláková E, Čuřík R, Foretová L, Navrátilová M, Novotný J, Zapletalová J, Palas J, Nieslanik J, Horáček J, Dvořáčková J, Kolář Z. Immunohistochemical Detection of the hMLH1 and hMSH2 Proteins in Hereditary Non-Polyposis Colon Cancer and Sporadic Colon Cancer. *Neoplasma* 2004; 51:275-84

Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, Perucho M: Somatic Frameshift Mutations in the BAX Gene in Colon Cancers of the Microsatellite Mutator Phenotype. *Science* 1997; 275:967-9

Riccio A, Aaltonen LA, Godwin AK, Loukola A, Percesepe A, Salovaara R, Masciullo V, Genuardi M, Paravaou-Petsotas M, Bassi DE, Ruggeri BA, Klein-Szanto AJP, Testa JR, Neri G, Bellacosa A: The DNA Repair Gene MBD4(MED1) is Mutated in Human Carcinomas with Microsatellite Instability. *Nat Genet* 1999; 23:266-8

Risinger JI, Barrett JC, Watson P, Lynch HT, Boyd J: Molecular Genetic Evidence of the Occurrence of Breast Cancer as an Integral Tumor in Patients with the Hereditary Nonpolyposis Colorectal Carcinoma Syndrome. *Cancer* 1996; 77(9):1836-43

Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, Lynch H, Perucho M, Smyrk T, Sobin L, Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: Meeting Highlights and Bethesda Guidelines. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:1758-62

Salahshor S, Kressner U, Fischer H, Lindmark G, Glimelius B, Pahlman L, Lindblom A: Microsatellite Instability in Sporadic Colorectal Cancer is not an Independent Prognostic Factor. *Br J Cancer* 1999; 81(2):190-3

Samowitz WS, Slattery ML, Potter JD, Leppert MF: BAT-26 and BAT-40 Instability Colorectal Adenomas and Carcinomas and Germline Polymorphisms. *Am J Pathol* 1999; 154:1637-41

Santucci-Darmanin S, Neyton S, Lespinasse F, Saunieres A, Gaudray P, Paquis-Flucklinger V: The DNA Mismatch-repair MLH3 Protein Interacts With MSH4 in Meiotic Cells, Supporting a Role for This MutL Homolog in Mammalian Meiotic Recombination. *Hum Mol Genet* 2002; 11(15): 1697-1706

Schlötterer C, Tautz D: Slippage Synthesis of Simple Sequence DNA. *Nucleic Acids Res* 1992; 20:211-5

Schlötterer C: Genome Evolution. Are Microsatellites really Simple Sequences? *Curr Biol* 1998; 8:132-4

Smolarz B, Romanowicz-Makowska H, Langer E, Kozłowska E, Kulig A, Dziki A: Genetic Analysis of Microsatellite Markers in Patients from Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC) Families. *Exp Oncol* 2004; 26(3): 205-9

Souza RF, Appel R, Yin J, Wang S, Smolinski KN, Abraham JM, Zou TT, Shi YQ, Lei J, Cottrell J, Cymes K, Biden K, Simms L, Leggett B, Lynch PM, Frazier M, Powell SM, Harpaz N, Sugimura H, Young J, Meltzer SJ: Microsatellite Instability in the Insulin-like Growth Factor II Receptor Gene in Gastrointestinal Tumors. *Nature Genetics* 1996; 14: 255-257

Sršeň Š, Sršňová K: *Základy klinické genetiky*; Osveta Martin 1995, str. 54-59

Sutter C, Gebert J, Bischoff P, Herfarth C, von Knebel Doeberitz M: Molecular Screening of Potential HNPCC Patients Using a Multiplex Microsatellite PCR System. *Mol Cell Probes*. 1999;13(2):157-65

Thibodeau SN, French AJ, Cunningham JM, Tester D, Burgart LJ, Roche PC, McDonnell SK, Schaid DJ, Vockley CW, Michels VV, Farr GH, O'Connell MJ: Microsatellite Instability in Colorectal Cancer: Different Mutator Phenotypes and the Principal Involvement of hMLH1. *Cancer Res* 1998; 58:1713-8

Tinley ST, Lynch HT: Integration of Family History and Medical Management of Patients with Hereditary Cancers. *Cancer Suppl.* 1999; 86(8): 1705-12

Umar A, Boland R, Terdiman JP, Syngal S, Chapelle A, Rüschoff J, Fishel R, Lindor NM, Burgart LJ, Hamelin R, Hamilton SR, Hiatt RA, Jass J, Lindblom A, Lynch HT, Peltomaki P, Ramsey SD, Rodriguez-Bigas MA, Vasen HFA, Hawk ET, Barrett JC, Freedman AN, Srivastava S: Revised Bethesda Guidelines for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome) and Microsatellite Instability. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(4): 261-8

Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991; 34:424-25

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; 116:1453-6

Vasen HF, Moslein G, Alonso A, Bernstein I, Bertario L, Blanco I, Burn J, Capella G, Engel C, Frayling I, Friedl W, Hes FJ, Hodgson S, Mecklin JP, Moller P, Nagengast FN, Parc Y, Renkonen-Sinisalo L, Sampson JR, Stormorken A, Wijnen J: Guidelines for the Clinical Management of Lynch Syndrome (HNPCC). *Med Genet.* 2007 Mar 30; [Epub ahead of print]

Vostrukhina OA, Nikiforova IF, Shtam TA, Kantorov SL, Tutaev KI, Sumakov AR, Komissarova SV, Kalinovskii VP, Vasil'ev SV, Kovalev VK: Microsatellite Instability of Genome in Cells of Sporadic and Hereditary Carcinoma of the Gastrointestinal Tract. *Vopr Onkol* 1998; 44(5):509-14

Wang J, Sun L, Myeroff L, Wang X, Gentry LE, Yang J, Liang J, Zborowska E, Markowitz S, Wilson JKV, Brattain MG: Demonstration that Mutation of the Type II Transforming Growth Factor β Receptor Inactivates its Tumor Suppressor Activity in Replication Error-positive Colon Carcinoma Cells. *J Biol Chem*, 1995; 270:22044-9

Wei SC, Shun CT, Tsai-Wu JJ, Wu Ch, Sheu JC, Wang CY, Wong JM: Microsatellite Instability and hMLH1 and hMSH2 Gene Expression in Taiwanese Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *J Formos Med Assoc* 2004; 103(5): 331-6

Weissenbach J, Gyapay G, Dib C, Vignal A, Morissette J, Millasseau P, Vaysseix G, Lathrop M: A Second-generation Linkage Map of the Human Genome. *Nature.* 1992; 359(6398):794-801.

Wierdl M, Dominska M, Petes TD: Microsatellite Instability in Yeast: Dependence on the Length of the Microstellite. *Genetics* 1997; 146:769-79

Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T: Human DNA Repair Genes. *Science* 2001; 291:1284-9

Wu Y, Berends MJW, Mensink RGJ, Kempinga C, Sijmons RH, Zee AGJ, Hollema H, Kleibeuker JH, Buys CHCM, Hofstra RMW: Association of Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer-Related Tumors Displaying Low Microsatellite Instability with MSH6 Germline Mutations. *Am J Hum genet* 1999; 65:1291-8

Použité www odkazy

ICG HNPCC

<http://www.insight-group.org/>

Faculty of Medicine - Memorial University of Newfoundland

<http://www.med.mun.ca/MMRvariants/statistics.aspx>

Fishel Lab

<http://mmr.med.ohio-state.edu/rfishel/RF2.html>

9. PŘEHLED PUBLIKACÍ AUTORKY

Původní práce

Plevová P., Křepelová A., **Papežová M.**, Sedláková E., Čuřík R., Foretová L., Navrátilová M., Novotný J., Zapletalová J., Palas J., Nieslanik J., Horáček J., Dvořáčková J., Kolář Z. Immunohistochemical detection of the hMLH1 and hMSH2 proteins in hereditary non-polyposis colon cancer and sporadic colon cancer. *Neoplasma* 2004, 51:275-284

(IF 0,782)

Plevová P., Sedláková E., **Papežová M.**, Zapletalová J., Čuřík R., Kolář Z., Křepelová A. Epidermal growth factor receptor expression in colorectal tumors with and without microsatellite instability. *Virchows Arch.* 2004, 445:99-100.

(IF 2,357)

Bortlík M, Vítková I, **Papežová M.**, Kohoutová M, Novotný A, Adamec S, Chalupná P, Lukáš M. Deficiency of APC protein in sporadic colorectal adenomas and its associations with clinical phenotype and histology. *World J Gastroenterol* 2006; 12(24): 3901-3905

Bortlík M, Vítková I, **Papežová M.**, Kohoutová M, Novotný A, Adamec S, Lukáš M.: Vztah exprese proteinů mismatch repair systému (MLH1, MSH2) k charakteristikám adenomů tlustého střeva. *Česká a Slovenská gastroenterologie a hepatologie* 2005, 59(4):155-61

Bortlík M, Vítková I, **Papežová M.**, Kohoutová M, Novotný A, Adamec S, Chalupná P, Lukáš M: Frequency of the APC protein deficiency and its evaluation with regard to the malignant potential of sporadic colorectal adenomas. *Folia Gastroenterol Hepatol* 2004, 2(4):174-182

Papežová M., Mareš J., Goetz P.: Molekulární genetika Wilmsova tumoru. *ČLČ* 140, 2001, 11:323-7

Abstrakta

M. Papezova, A. Krepelova, P. Plevova, L. Foretova, V. Kebrdlova: Microsatellite instability in Czech patients with colorectal cancer. Abstract. Eur J Hum Genet 2005, 13(S1):211
(IF 3,669)

Krepelova, K. Pavlikova, P. Vasovcak, A. Mrakotova, A. Puchmajerova, **M. Papezova**, L. Foretova, P. Plevova: Genomic deletions in MSH2 or MLH1 genes in patients with Lynch syndrome detected by MLPA. Abstract. Eur J Hum Genet 2005, 13(S1):209
(IF 3,669)

Papežová M., Křepelová A. Mikrosatelitová analýza pomocí fluorescenční PCR u pacientů s HNPCC. 5. konference DNA diagnostiky, pracovní den SLG ČLS JEP, 14.-15. 12. 2001, Praha. Abstrakt. Čas. Lék. čes., 2002, 141:589.

M. Papezova, A. Krepelova, V. Kebrdlova, T. Dolezal, L. Foretova, P. Plevova. Microsatellite instability in HNPCC patients. Abstract. Eur. J. Hum. Genet. 2002, 10(S1):101
(IF 3,136)

Plevová P., Křepelová A., **Papežová M.**, Sedláková E., Čuřík R., Foretová L., Navrátilová M., Palas J., Nieslanik J., Řiháková P., Vodvářka P., Horáček J., Kolář Z. Expres proteinů hMLH1 a hMSH2 v nádorech kolorekta a její klinický význam. Abstrakt. 7. Ostravské dny podpůrné léčby v onkologii, duben 2003. Sborník, s.67-68. ISBN 80-02-01542-8

Plevová P., Křepelová A., **Papežová M.**, Sedláková E., Čuřík R., Foretová L., Novotný J., Palas J., Nieslanik J., Kolář Z. Immunohistochemical detection of the hMLH1 and hMSH2 proteins in hereditary and sporadic colon cancer tissues. Abstract. Eur. J. Cancer Supplements 1(5)2003, 588. ISSN 1359-6349.
(IF 3,694)

Plevová P., Křepelová A., **Papežová M.**, Sedláková E., Čuřík R., Foretová L., Palas J., Novotný J., Nieslanik J., Kolář Z. Immunohistochemical detection of the hMLH1 and

hMSH2 proteins in hereditary and sporadic colon cancer tissues. Abstract. *Virchows Arch.* 2003, 443, 395. ISSN 0945-6317.

(IF 2,357)

Plevová, P., Křepelová, A., **Papežová, M.** Sedláková, E., Kolář, Z., Čuřík, R., Foretová, L., Navrátilová, M., Palas, J., Řiháková, P., Vodvářka, P. Imunohistochemická detekce proteinů hMLH1 a hMSH2 v nádorech pacientů s hereditárním nepolypózním kolorektálním karcinomem. Abstrakt. Edukační sborník. 26. Brněnské onkologické dny a 16. Konference pro sestry a laboranty, BRNO, 29.-31. 5. 2002, 2002, 42.

10. PŘÍLOHY

1. Plevová P., Křepelová A., Papežová M., Sedláková E., Čuřík R., Foretová L., Navrátilová M., Novotný J., Zapletalová J., Palas J., Nieslaník J., Horáček J., Dvořáčková J., Kolář Z. Immunohistochemical detection of the hMLH1 and hMSH2 proteins in hereditary non-polyposis colon cancer and sporadic colon cancer. *Neoplasma* 2004, 51:275-284
2. Plevová P., Sedláková E., Papežová M., Zapletalová J., Čuřík R., Kolář Z., Křepelová A. Epidermal growth factor receptor expression in colorectal tumors with and without microsatellite instability. *Virchows Arch.* 2004, 445:99-100.
3. Bortlík M, Vítková I, Papežová M, Kohoutová M, Novotný A, Adamec S, Chalupná P, Lukáš M. Deficiency of APC protein in sporadic colorectal adenomas and its associations with clinical phenotype and histology. *World J Gastroenterol* 2006; 12(24): 3901-3905
4. Bortlík M, Vítková I, Papežová M, Kohoutová M, Novotný A, Adamec S, Lukáš M.: Vztah exprese proteinů mismatch repair systému (MLH1, MSH2) k charakteristikám adenomů tlustého střeva. *Česká a Slovenská gastroenterologie a hepatologie* 2005, 59(4):155-61
5. Bortlík M, Vítková I, Papežová M, Kohoutová M, Novotný A, Adamec S, Chalupná P, Lukáš M: Frequency of the APC protein deficiency and its evaluation with regard to the malignant potential of sporadic colorectal adenomas. *Folia Gastroenterol Hepatol* 2004, 2(4):174-182