

Pregledni prispevek/Review article

# MOLEKULARNOGENETSKI PRISTOP ZA PRESEJANJE DEDNEGA NEPOLIPOZNEGA KOLOREKTALNEGA KARCINOMA

MOLECULAR GENETIC APPROACH FOR SCREENING OF HEREDITARY NON-POLYPOSIS COLORECTAL CANCER

Metka Ravnik-Glavac<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup> Inštitut za patologijo, Oddelek za molekularno genetiko, Medicinska fakulteta, Zaloška 4, 1000 Ljubljana

Prispelo 2005-04-08, sprejeto 2005-07-18; ZDRAV VESTN 2005; 74: 443-8

**Ključne besede:** molekularnogenetsko presejanje; populacijsko presejanje; analiza mikrosatelitne nestabilnosti; MSI; geni popravljanega mehanizma pri podvojevanju DNK; MMR geni; mutacijska analiza

**Izveček** – Izhodišča. Glavni cilj znanja o boleznih pri človeku je, prenesti čim več uporabnih informacij v klinično prakso. Dedni nepolipozni kolorektalni karcinom (HNPCC za angl. hereditary non-polyposis colorectal cancer) ali sindrom Lynch je najpogostejša avtosomno-dominantno dedovana nagnjenost za kolorektalni karcinom, ki zajema 1-2% vseh primerov raka debelega črevesa. Osnova najpogostejšega načina za prepoznavanje sindroma HNPCC je družinska anamneza, kakor jo je opredelila Mednarodna skupina za HNPCC (Amsterdamska merila I in II). Glavni molekularni vzrok za HNPCC je podedovana mutacija v enem od genov, ki kodirajo proteine, odgovorne za popravljanje napak pri podvojevanju DNK (MMR za angl. mismatch repair). Ker so mutacije v genih MMR našli tudi pri družinah, ki niso izpolnjevale amsterdamskih meril, so predlagali, naj bi bile molekularnogenetske značilnosti sindroma HNPCC lahko prva stopnja pri prepoznavanju sindroma. Več kot 90% tumorjev bolnikov s HNPCC namreč izraža genetsko mikrosatelitno nestabilnost. Ker pa je tudi približno 10% sporadičnih kolorektalnih karcinomov genetsko nestabilnih v predelih mikrosatelitov, je bilo potrebno razkriti molekularne mehanizme, ki ločijo mikrosatelitno nestabilne tumorje HNPCC od tumorjev sporadičnega izvora. Zdaj je znano, da so pri sporadični obliki visoko mikrosatelitno nestabilnih tumorjev pogoste hipermetilacija v promotorju gena MLH1 ter mutacije v genih BAX in TGFBR2.

Zaključki. Določitev statusa MSI in njegova ločitev na sporadične tumorje in tumorje HNPCC ter nadaljnja mutacijska analiza v tumorjih HNPCC je pomembna za presejanje in preprečevanje dednega kolorektalnega raka. Nekatere študije, tudi naša, so pokazale, da je obsežna molekularnogenetska analiza za sindrom HNPCC izvedljiva in dovolj občutljiva, da opravičuje populacijsko presejanje. Populacijsko presejanje vključuje molekularnogenetsko analizo v povezavi s kolonoskopijo. Kolonoskopija se omeji zgolj na nosilce mutacije. Omogoča, da se bolezen pri njih odkrije v zgodnji fazi, kar zmanjša umrljivost zaradi sindroma HNPCC in močno zniža stroške zdravljenja. Zato smo tudi v Sloveniji začeli populacijsko presejanje za sindrom HNPCC na družinski in molekularnogenetski osnovi.

**Key words:** large-scale molecular genetic screening; analysis of microsatellite instability; MSI; mismatch repair genes; MMR genes; mutational analysis

**Abstract** – Background. The main goal of knowledge concerning human diseases is to transfer as much as possible useful information into clinical applications. Hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) is the most common autosomal dominant inherited predisposition for colorectal cancer, accounting for 1-2% of all bowel cancer. The only way to diagnose HNPCC is by a family history consistent with the disease defined by International Collaborative Group on HNPCC (Amsterdam criteria I and II). The main molecular cause of HNPCC is a constitutional mutation in one of the mismatch repair (MMR) genes. Since HNPCC mutations have been detected also in families that did not fulfil the Amsterdam criteria, molecular genetic characteristics of HNPCC cancers have been proposed as valuable first step in HNPCC identification. Microsatellite instability is present in about 90% of cancers of HNPCC patients. However, of all MSI colorectal cancers 80-90% are sporadic. Several molecular mechanisms have been uncovered that enable distinguishing to some extent between sporadic and HNPCC cancers with MSI including hypermethylation of hMLH1 promoter and frequent mutations in BAX and TGFBR2 in sporadic CRC with MSI-H.

Conclusions. The determination of MSI status and careful separation of MSI positive colorectal cancer into sporadic MSI-L, sporadic MSI-H, and HNPCC MSI-H followed by mutation detection in MMR genes is important for prevention, screening and management of colorectal cancer. In some studies we and others have already shown that large-scale molecular genetic analysis for HNPCC can be done and is sensitive enough to approve population screening. Population screening includes also colonoscopy which is restricted only to the obligate carriers of the mutation. This enables that the disease is detected in earlier stages which would greatly decrease medical treatment costs and most importantly decrease mortality. In Slovenia we have started population screening based on molecular genetic and high-risk clinical bases.

## Uvod

V zadnjih treh desetletjih je razumevanje genetike raka zelo napredovalo. Večino začetnih molekularnogenetskih raziskav so naredili prav na kolorektalnih tumorjih. Kot model za genetske študije so ga izbrali zaradi naslednjih vzrokov: kolon je mesto, kjer se pogosto razvijejo tumorji pri človeku; endoskopske tehnike omogočajo dober pregled kolona; širok spekter prisotnih neoplastičnih sprememb (od majhnih adenomov do karcinomov) omogoča korelacijo specifične genetske spremembe s patološkim napredovanjem tumorja. V zgodnjih kolorektalnih tumorjih so opazili dve vrsti genomske nestabilnosti: kromosomska nestabilnost (CIN, angl. chromosomal instability) (1) in mikrosatelitno nestabilnost (MSI, angl. microsatellite instability) (2). Pri kromosomski nestabilnosti tumorji hitro izgubljajo ali pridobivajo dele kromosomov, ki vsebujejo tumorske zaviralne gene in onkogene. Večina sporadičnih in del dednih kolorektalnih karcinomov (FAP - familialna adenomatozna polipoza) sledi tej molekularni poti, katere začetna stopnja je mutacija v genu *APC*, tej pa sledijo spremembe v *K-ras*, *DCC* in *TP53* (3). Mikrosatelitna nestabilnost pa se kaže kot kopčenje majhnih insercij in delecij v predelih kratkih ponavljajočih se zaporedij DNK (DNK mikrosateliti) na različnih kromosomih (2, 4). Namesto genov, ki so običajno mutirani pri kolorektalnem karcinomu, so tu inaktivirani določeni geni, vključeni v razvoj celice in vsebujejo kratke mononukleotidne ponovitve v kodirajočem predelu, kot so *BAX* (5), *TGFBR2* (6), *TCF4* (7), *TCFI*, *TEF4* (8).

Čeprav nekateri avtorji zagovarjajo model ene genetske poti, pri kateri vrsta genetske nestabilnosti lahko v manjši meri vpliva na genetske spremembe, vendar ne dovolj, da bi jo delili na dve neodvisni poti (9, 10), pa so številne druge pomembne lastnosti kolorektalnih tumorjev v soglasju z dvema različnima in neodvisnima potema kancerogeneze. Tako so kolorektalni karcinomi z MSI bolj pogosto na desni strani črevesja in imajo boljše napoved izida (2, 11). Tumorji z MSI imajo tudi sorazmerno posebne histološke lastnosti: prevladujejo mucinozni, slabo diferencirani, diploidni in s povečano limfoidno infiltracijo (12, 13). Celične linije z MSI in s CIN pa so se *in vitro* tudi različno odzvale na kemoterapijo (14).

Skupina kolorektalnih tumorjev z MSI obsega približno 10–15% vseh kolorektalnih tumorjev (15), od tega jih manj kot tretjina pripada bolnikom s sindromom dednega nepolipoznega kolorektalnega raka (HNPCC, angl. hereditary non-polyposis colorectal cancer), pri katerem pa je več kot 90% tumorjev mikrosatelitno nestabilnih (4). Da bi zmanjšali umrljivost zaradi raka v družinah s sindromom HNPCC, je naš prvi cilj, da ugotovimo kar se da veliko takih družin. Tukaj opisujemo molekularnogenetsko znanje, ki lahko služi za presejanje za sindrom HNPCC, kar je predpogoj za nadaljnje spremljanje, preprečevanje in zdravljenje tega sindroma na ravni populacije.

## Sindrom HNPCC ali sindrom LYNCH

Dedni nepolipozni kolorektalni karcinom ali sindrom Lynch je najpogostejša avtosomno-dominantno dedovana nagnjenost za kolorektalni karcinom in predstavlja 1–2% vseh primerov kolorektalnega karcinoma (16). Običajen način prepoznavanja HNPCC temelji na družinski anamnezi, kakor jo je opredelila Mednarodna skupina za HNPCC (Amsterdamska merila I in II). V družini s HNPCC morajo biti vsaj trije sorodniki s kolorektalnim karcinomom ali drugim rakom, povezanim s HNPCC (maternica, želodec, ovarij, jetrno-žolčni predel, sečila, možgani ter koža) v dveh zaporednih generacijah, vsaj en bolnik pa mora biti mlajši od 50 let (17, 18). Tumorji bolnikov s sindromom HNPCC imajo visoko stopnjo mikrosatelitne nestabilnosti, bolniki pa imajo podedovano mutacijo v enem od genov, ki kodirajo proteine, ki sestavljajo

molekularni mehanizem za popraviljanje napak pri podvojevanju DNK (MMR, angl. mismatch repair) (2, 4, 19). Tako se predpostavilo, da je okvarjen sistem MMR povezan z nastankom sindroma HNPCC. Številni geni sistema MMR so mutirani pri bolnikih s HNPCC: *MLH1* (20, 21), *MSH2*, *PMS1* (22, 23), *PMS2* (24) in *MSH6* (*GTBP*) (25). Pri večini bolnikov so mutacije prisotne v približno enakem razmerju v genih *MLH1* in *MSH2*, medtem ko so mutacije v ostalih treh genih našli le v posameznih primerih (26). Mutacijska analiza bi bila enostavnejša, če bi jo lahko izvajali le pri bolnikih iz družin, izbranih po amsterdamskih merilih. Vendar so podedovane mutacije v genih *MLH1* in *MSH2* našli tudi v precejšnjem deležu bolnikov s kolorektalnim rakom iz družin, ki niso izpolnjevale amsterdamskih meril (27), kar pomeni, da bi marsikatero družino na ta način lahko zgrešili. Po navadi so take družine majhne ali pa se bolezen pri njih izrazi v kasnejšem življenjskem obdobju. Po drugi strani pa je kar nekaj takih družin, ki izpolnjujejo amsterdamska merila, pa vseeno pri njih ne najdemo mutacije v genih MMR (18). Ker je mikrosatelitna nestabilnost značilna za več kot 90% tumorjev bolnikov s HNPCC, bi lahko bila v odsotnosti drugih diagnostičnih meril pomembna prva stopnja pri prepoznavanju družin s HNPCC. Vendar pa je 80–90% vseh kolorektalnih karcinomov z MSI sporadičnih. Doslej so odkrili tudi že številne molekularnogenetske značilnosti, ki do določene mere lahko razlikujejo med kolorektalnimi karcinomi z MSI sporadičnega in HNPCC izvora. Pomembno je torej vedeti, ali molekularne značilnosti, ki razlikujejo med sporadičnimi in dednimi tumorji z MSI, lahko določimo s tako natančnostjo in občutljivostjo, da je smiselno molekularnogenetsko testiranje in presejanje sindroma HNPCC na populacijski ravni.

## Genetske razlike med HNPCC in sporadičnimi kolorektalnimi karcinomi z visoko mikrosatelitno nestabilnostjo

Zdaj že vemo, da obstajajo razlike v genetski osnovi inaktivacije genov MMR pri sporadičnih kolorektalnih tumorjih in tumorjih HNPCC. Pokazali so, da geni MMR delujejo kot tumorsko zaviralni geni, tako da morata biti oba alela tega gena inaktivirana za popolno izgubo dejavnosti gena (28). V številnih tumorsko zaviralnih genih poleg genskih mutacij in izgube heterozigotnosti (29) inaktivira izražanje genov tudi hipermetilacija v otočkih CpG v promotorjem delu gena (30). Hipermetilacija promotorja gena *MLH1* so opazili v povezavi z izgubo izražanja proteina v sporadičnih tumorjih z MSI (31–33). Pokazali so tudi, da je ta hipermetilacija bialelni dogodek, ki povzroči izgubo dejavnosti MMR v odsotnosti dodatnih somatskih mutacij (34). Izvedli smo analizo mikrosatelitne nestabilnosti na 345 naključno izbranih novoodkritih nezdravljenih primarnih kolorektalnih karcinomih. Vzroke za nastanek visoke MSI smo nadalje ugotavljali s preiskovanjem podedovanih in somatskih mutacij, analizo izgube heterozigotnosti in ugotavljanjem stopnje metilacije promotorjev genov *MLH1* in *MSH2*. Iz naših rezultatov je bilo razvidno, da sta gena *MLH1* in *MSH2* inaktivirana v večini (94%) tumorjev z visoko MSI. V tumorjih bolnikov s sindromom HNPCC so glavni vzrok nastanka mikrosatelitne nestabilnosti podedovana mutacija v enem od genov MMR na enem alelu in somatska mutacija ali izguba heterozigotnosti na drugem alelu. Večina sporadičnih tumorjev MSI pa nastane zaradi bialelne hipermetilacije promotorja *MLH1* in le malo zaradi somatskih MMR mutacij ali LOH (35).

V nekaterih drugih študijah rakov v okviru HNPCC so pokazali, da pride zaradi mutacij v genu *APC* (36, 37) in mutacij v *beta-kateninu* (38, 39) do uničenja signalne poti *wnt*. Na drugi strani pa so poročali, da so mutacije *APC*, *K-ras* in *TP53* pri

sporadični vrsti raka z visoko MSI redke ali celo odsotne. Ravno tako je izguba heterozigotnosti na 5q, 17p in 18q precej redkejša pri sporadičnem raku z visoko stopnjo MSI v primerjavi z visoko nestabilnimi raki bolnikov s HNPCC (40–44). Namesto tega pa smo našli mutacije v številnih drugih genih, kot so *BAX* (5), *TGFBR2* (45), *IGF2R* (46), *E2F-4*, (47), *CDX2* (48), *caspase-5* (49), *AXIN2* (50), *CilP* (51), *TCFI*, *TEF4*, *TFE3*, *RGS12* (8). Poleg tega so tudi ugotovili, da so številni normalno delujoči geni, vključujoč *HPP1*, *p16* in *hMLH1* utišani zaradi metilacije (52, 53). Zelo verjetno je, da tudi številni drugi geni, pri katerih pride do utišanja zaradi metilacije, prispevajo k nastanku sporadičnih kolorektalnih tumorjev z visoko stopnjo MSI. Zelo pomembno je, da natančno razlikujemo in razdelimo kolorektalne tumorje, ki so pozitivni z ozirom na MSI, v tri podskupine, tj. sporadične z nizko stopnjo MSI, sporadične z visoko stopnjo MSI in HNPCC, ker bo to pomembno vplivalo na načine preprečevanja, presejanja in ravnanja s kolorektalnim karcinomom na populacijski ravni (14).

## Določanje in evalvacija mikrosatelitne nestabilnosti

O tem, kako precizno opredeliti in natančno meriti MSI, obstajajo določene polemike (15, 54). Da lahko ovrednotimo status MSI, moramo primerjati DNK iz normalnega in tumorskega tkiva istega posameznika na različnih predelih v genomu. Katera koli sprememba v dolžini, bodisi zaradi insercije ali delecije ponavljajočega se dela v zaporedju mikrosatelitne sekvence, je definirana kot MSI. V splošnem lahko kolorektalne tumorje razdelimo v naslednje skupine: z visoko stopnjo MSI (MSI-H), če je pozitivnih vsaj 30–40% testiranih mikrosatelitnih označevalcev; z nizko stopnjo MSI (MSI-L), če je pozitivnih manj kot 30–40% testiranih označevalcev (12, 13, 55), ter mikrosatelitno stabilne tumorje (MSS), ki nimajo očitne nestabilnosti. Splošno sprejeto je razlikovanje med tumorji MSI-H in MSI-L, medtem ko je razlikovanje med skupinama MSI-L in MSS močno odvisno od vrste in števila analiziranih mikrosatelitnih označevalcev. Če bi uporabili zadostno število označevalcev, bi mogoče vsi kolorektalni karcinomi imeli določeno stopnjo nestabilnosti (56). Mononukleotidni označevalci so sorazmerno stabilni in nepolimorfni. Vseeno pa v rakah z visoko stopnjo MSI zelo pogosto pride do nastanka ali izginotja nukleotidov v mononukleotidnih označevalcih, kot so *BAT25*, *BAT26*, *BAT34* in *BAT40*. Pokazano je bilo, da je samo uporaba označevalca *BAT26* že dovolj za hitro določanje MSI statusa tumorjev (57, 58). V naši študiji smo na 300 diagnosticiranih primarnih še nezdravljenih kolorektalnih rakah pokazali, da bi zgolj z uporabo označevalca *BAT26* zgrešili enega od 29 visoko nestabilnih tumorjev. Vendar pa noben nizko nestabilni tumor ni bil pozitiven z *BAT26* ali *BAT25*. Večino vzorcev smo testirali z mononukleotidnimi označevalci *BAT26*, *BAT25* (25) in *BAT40* (59), dinukleotidi *D2S123* (60), *D5S346* (61), *TP53* (62), *D11S1294*, *D112179* (63), *D17S250* (64), *D18S58* (65) in *D18S69* (60), in tetranukleotidom *MYCLY* (66). Ugotovili smo, da imajo skoraj vsi tumorji MSI alteracije v bodisi več kot 40% (visoko MS nestabilni) ali manj kot 20% (nizko MS nestabilni) testiranih lokusov (67). Med samo analizo se je pokazalo, da so za določitev MSI statusa dovolj štirje izbrani označevalci, *BAT26*, *D2S123*, *BAT25* in *D5S346*. Tumorski vzorec smo določili kot visoko MS nestabilen, če sta bila spremenjena vsaj dva od štirih označevalcev (68, 69).

Kljub pomembni kvalitativni razliki med visoko in nizko nestabilnimi kolorektalnimi raki, ki zadeva nestabilnost znotraj mononukleotidnih ponovitev, so v številnih študijah uporabljali le dinukleotidne označevalce in diagnosticirali visoko nestabilne tumorje tudi v primerih, ko so opazili razlike le pri dveh od osmih testiranih označevalcev. Na srečanju na Natio-

nal Cancer Institute v Bethesdi so priporočili v vseh nadaljnjih raziskavah uporabo najbolj informativnih mikrosatelitnih označevalcev v kolorektalnih tumorjih (15). Ta set sestavljajo: dva mononukleotidna (*BAT26* in *BAT25*) in trije dinukleotidni (*D2S123*, *D5S346* in *D17S250*) mikrosatelitni označevalci. Dinukleotidni označevalci so bili izbrani zaradi izredne nestabilnosti in občutljivosti za določanje nizko nestabilnega statusa tumorjev. Ker pa uporaba tega seta omogoča, da se označi tumor kot visoko nestabilen tudi v primeru, ko sta spremenjena dva dinukleotidna in noben mononukleotiden označevalec, je vprašanje, ali je tak tumor v resnici visoko nestabilen (14). Ker je bilo mogoče odkriti podedovane mutacije v genih DNK popravljalnega mehanizma (kar pomeni dokončno diagnozo sindroma HNPCC) le v družinah z genetsko visoko nestabilnimi raki (70), je torej zelo pomembno, da izločimo nizko nestabilne rake, kadar uporabljamo molekularnogenetski pristop za prepoznavanje družin s sindromom HNPCC.

Ko enkrat določimo visoko nestabilni status tumorja, pa je podobno težko razlikovati med sporadičnimi in visoko nestabilnimi kolorektalnimi tumorji v okviru HNPCC. V populacijskem presejanju za sindrom HNPCC je zato koristno, da preden v vseh visoko nestabilnih tumorjih iščemo mutacije v genih DNK popravljalnega mehanizma, določimo še metilacijski status promotora gena *MLH1* (35), dobro pa je, da analiziramo na mutacije gene z mononukleotidnimi ponovitvami v kodirajočem delu, kot sta *BAX*, *TGRBR2* in *BRAF* (71), ki so pogosto mutirani pri sporadičnih visoko nestabilnih rakah.

## Odkrivanje mutacij v genih DNK popravljalnega mehanizma

Podedovane mutacije v katerem koli od petih genov, ki so vključeni v DNK popravljalni mehanizem, *MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS2* in *PMS1*, lahko povzročijo nastanek dednega nepolipoznega kolorektalnega raka. Posamezniki s podedovano mutacijo imajo visoko doživljenjsko ogroženost, da zbolijo za kolorektalnim rakom (verjetnost 70–85%), rakom endometrija (verjetnost 50%), kot tudi določeno drugo, s sindromom HNPCC povezano obliko raka (verjetnost pod 15%). Podedovane mutacije v genih *MSH2* (38%) in *MLH1* (49%) so odgovorne za večino družin s HNPCC, medtem ko so geni *MSH6*, *PMS2* in *PMS1* manj pogosto vključeni (72). Odkritih je bilo že več kot 300 različnih mutacij v genih MMR, ki povečajo nagnjenost za nastanek sindroma HNPCC (Baza podatkov Mednarodne skupine za HNPCC, <http://www.nfdht.nl>). Število najdenih mutacij v genu *MSH6* v zadnjih letih počasi narašča in predstavlja 9% vseh odkritih mutacij. Mutacije *MSH6* so pogostejše pri klinično manj značilni obliki HNPCC z eno ali več od naslednjih značilnosti: pojav bolezni v poznejšem življenjskem obdobju, pogostejšim rakom endometrija in nizko stopnjo mikrosatelitne nestabilnosti v tumorskem tkivu (73). Medtem ko odkritje podedovane mutacije v enem od genov popravljalnega mehanizma DNK pomeni dokončno diagnozo sindroma HNPCC oz. sindroma Lynch, odsotnost mutacije zaradi tehničnih vzrokov pri odkrivanju mutacij nujno ne pomeni odsotnosti tega sindroma. Detekcijo mutacij z uporabo bolnikove DNK in/ali RNK namreč lahko izvedemo s številnimi različnimi metodami, od katerih pa nobena ni 100-odstotno občutljiva. Ker so mutacije razpršene vzdolž celotnih genov, je genetsko testiranje zahtevno in dolgotrajno. Večina objavljenih mutacij so zamenjave enega nukleotida ali majhne delecije ali insercije (1–5 bp). Za odkritje teh mutacij se uporablja sekveniranje vseh eksonov skupaj z intronskimi povezavami (70) ali uporaba posrednih metod in sekveniranja samo tistih predelov, ki vsebujejo spremembe. Posredne metode, ki so omogočile odkrivanje mutacij pri sindromu HNPCC, vključujejo analizo heterodupleksov, denaturacijsko

gradientno gelsko elektroforezo (DGGE), konformacijski polimorfizem enoverižne DNK (SSCP) in denaturacijsko visokoločljivostno tekočinsko kromatografijo (DHPLC) (29, 35, 74–77). Z uporabo teh metod pa se ne zaznajo velike delecije (obsegajo enega ali več eksonov), duplikacije in genomske preureditve, ki tudi nastanejo v genih MMR pri bolnikih s sindromom HNPCC. Velike delecije lahko odkrijemo z analizo po Southernu (78) ali z analizo mRNK s pomočjo testa, ki prepozna skrajšanje proteina (test PTT) (79, 80). Pred kratkim je bila za ugotavljanje velikih delecij v genih *MSH2* in *MLH1* predstavljena tudi metoda, ki temelji na pomnožitvi kratkih fluorescenčnih predelov z mnogokratno verižno reakcijo s polimerazo (PCR) (81). To metodo so nadalje še optimizirali, tako da vključuje različne eksone obeh genov (*MSH2* in *MLH1*) med eno reakcijo in tako omogoča, da v primeru mutacije, ko je celoten predel, ki bi se moral pomnožiti odsoten ali dupliran, to lahko pravilno določimo z uporabo eksonov drugih referenčnih genov (82). Za razlago potencialnih mutacij, ki vplivajo na izrezovanje intronov ali detekcijo genomskih preureditev, so nedavno uspešno testirali na genu *MLH1* tudi novo metodo, ki vključuje tehniko ločevanja alelov v somatskih celičnih hibridih, kar še dodatno poveča občutljivost testiranja mutacij v podedovanih boleznih (83).

## Smiselnost molekularnogenetske detekcije in presejanja družin s sindromom HNPCC (sindrom Lynch)

Molekularnogenetski pristop za odkrivanje družin s sindromom HNPCC (ali sindrom Lynch) je pomemben iz več vidikov:

1. Dostop do dobro organiziranih registrov dednih oblik raka v številnih državah ni mogoč.
2. Celo če bi taki registri obstajali, niso vedno zadostni, saj so precejšen delež podedovanih mutacij v genih MMR našli pri bolnikih iz družin, ki niso izpolnjevale amsterdamskih meril. Taki primeri so bile majhne družine, družine, ki niso vedele dovolj o svoji družinski anamnezi, ali družine, v katerih so otroci ali starši zgodaj umrli zaradi drugih vzrokov, še preden se bi jim lahko razvil rak (27, 84, 85).
3. Kadar koli družina izpolnjuje ali pa tudi kadar ne izpolnjuje kliničnih meril, je dokončno diagnozo bolezni mogoče postaviti le na osnovi ugotovljene podedovane mutacije.

Potreba po diagnosticiranju sindroma HNPCC v celotni populaciji postaja vse bolj pomembna prav zaradi vse večjih uspehov pri preprečevanju raka s kolonoskopskim presejanjem ter obetov v kemopreventivi. V 15-letnem projektu za profilaktično presejanje se je zaradi kolonoskopskega pregledovanja bolnikov iz družin s HNPCC in nosilcev mutacij v triletnih presledkih zmanjšalo tveganje za kolorektalnega raka za več kot polovico in umrljivost za približno 65% (86, 87). Iz študije na človeških celičnih linijah, ki so imele okvarjene gene, vključene v sindrom HNPCC, je bilo razvidno, da aspirin zavira mutatorski fenotip, tako da spodbudi genetsko selekcijo za mikrosatelitno stabilnost. Zato bi lahko predstavljal uspešno možnost za profilaktično zdravljenje sindroma HNPCC (88). Ker imajo nosilci mutacije v enem od genov DNK popravilnega mehanizma 70–80% doživljenjsko verjetnost, da razvijajo kolorektalnega raka, je potrebno določiti, kdo v družini ima ali nima mutacije, ki je v tej družini povezana s sindromom HNPCC. Izziv in smisel je torej, da diagnosticiramo kar se da največ posameznikov z nagnjenostjo za sindrom HNPCC, in to na najbolj učinkovit in po ceni ugoden način. Zaradi dovolj dobrega znanja o molekularnogenetskem mehanizmu HNPCC ter sorazmerno visoke penetrance in incidence bolezni je HNPCC genetska bolezen, pri kateri je smiselno mutacijsko presejanje na populacijski ravni. Ker je sama mutacijska analiza precej zahtevna in draga, je zaželeno,

da visokorizično populacijo določimo vnaprej s preprostejšimi metodami. Zato so bili izdelani in ovrednoteni različni logistični modeli, ki so temeljili na kliničnopatoloških in družinskih podatkih (78, 89). Nedavno so predlagali, da bi molekularnogenetski pristop za presejanje HNPCC temeljil na analizi mikrosatelitne nestabilnosti novoodkritih kolorektalnih rakov, temu pa bi sledila mutacijska analiza genov *MLH1* in *MSH2* v MSI pozitivnih rakih (90). Med 535 bolniki s kolorektalnim rakom jih je bilo 66 (12%) MSI pozitivnih. Med temi jih je imelo 18 (3,4% od vseh) podedovano bolezensko mutacijo v genu *MLH1* ali v genu *MSH2*. Občutljivost tega pristopa je bila malo manjša kot občutljivost pristopa, ki je upošteval vsaj eno od naslednjih značilnosti bolnika: starost manj kot petdeset let, prisotnost raka črevesja ali endometrija že prej in vsaj enega sorodnika z rakom črevesja ali endometrija. Pokazali so tudi, da je označevalec *BAT26* zelo občutljiv kazalec mikrosatelitne nestabilnosti. Vendar pa je specifičnost MSI nizka predvsem zaradi tega, ker je pri visokem deležu MSI pozitivnih tumorjev vzrok za mikrosatelitno nestabilnost epigenetsko utišanje gena, kar je somatski dogodek, ki ga povzroči metilacija promotorja (90).

V naši študiji, v katero smo vključili 345 novoodkritih nezdravljenih primarnih kolorektalnih karcinomov, smo še izboljšali specifičnost odkrivanja na HNPCC vezane mikrosatelitne nestabilnosti. Vse visoko nestabilne tumorje smo namreč analizirali še na status metilacije. Podedovane mutacije smo po tej metodologiji odkrili v 63% tumorjev, ki niso imeli hipermetilacije v promotorju gena *MLH1*. Analiza MSI in metilacije tako lahko nudi dodaten kažipot za mutacijsko presejanje v družinah, ki izpolnjujejo vsaj določena klinična merila za HNPCC. Še več, v državah, kjer ni dostopa do registrov dednega raka ali ti ne obstajajo, ta, zgolj molekularnogenetski pristop lahko pomaga začeti gradnjo nacionalnega registra HNPCC, ki omogoči in olajša spremljanje, obravnavo, preprečevanje in zdravljenje te bolezni na nacionalni ravni (35).

## Zaključki

Molekularnogenetsko presejanje sindroma HNPCC na populacijski ravni je izvedljivo in smiselno. Izvedemo ga lahko z določitvijo mikrosatelitne nestabilnosti, ki ji sledi mutacijska analiza. Za določitev visoko mikrosatelitno nestabilnih tumorjev je dovolj občutljiv mononukleotidni označevalec *BAT26*. Da bi močno izboljšali občutljivost, učinkovitost in ceno, je pred mutacijsko analizo vseh odkritih MSI-pozitivnih tumorjev potrebno: (1) upoštevati določene klinične značilnosti za visoko tveganje (2), določiti v visoko nestabilnih rakih še status metilacije promotorja gena *MLH1* ali (3) oboje. Mutacijska analiza mora vključevati vsaj detekcijo majhnih mutacij v genih *MLH1* in *MSH2* in mogoče tudi v genu *MSH6*. Ker v nekaterih populacijah velike delecije v genu *MSH2* prispevajo približno tretjino vseh znanih mutacij (82), bi določitev teh sprememb še dodatno povišala občutljivost presejanja v okviru sindroma HNPCC.

Ko so družine enkrat genetsko diagnosticirane, to močno vpliva na obravnavanje družin in zdravljenje bolnikov in odpira možnosti za genetsko svetovanje in testiranje DNK pred pojavom simptomov pri sorodnikih s tveganjem. Iz študij je razvidno, da je sprejemljivost za genetsko testiranje lahko zelo visoka, če je genetsko svetovanje zelo skrbno in osebno (91). Molekularnogenetsko presajanje v povezavi s kolonoskopijo nadalje odpira možnosti za sledenje in preprečevanje bolezni v ogroženih družinah in v prihodnosti omogoča uvedbo novih odkritij na tem področju. Zaradi pojavljanja kolorektalnega raka v zgodnejšem življenjskem obdobju in pospešene kancerogeneze je priporočljivo začeti s kolonoskopijo po dvajsetem letu starosti in jo pri nosilcih mutacije ponoviti vsako leto ali vsaki dve leti. Zaradi visoke pojavnosti metakronih kolorektalnih karcinomov pri bolnikih s sindromom HNPCC

priporočajo tudi subtotalno kolektomijo. Zaradi visoke incidence ginekološkega raka pri bolnicah pa predlagajo tudi redne ultrazvočne preglede endometrija in ovarija (92). Zaključimo lahko, da so populacijske molekularnogenetske analize za identifikacijo in potrditev družin s sindromom HNPCC, genetsko svetovanje in testiranje sorodnikov s tveganjem, ki jim sledijo programi za sledenje in preprečevanje bolezni, potrebni, ker omogočajo, da se bolezen odkrije v zgodnji ozdravljivi fazi, kar je povezano z zmanjšanjem stroškov zdravljenja in predvsem z boljšim preživetjem bolnikov. V Sloveniji smo ob sodelovanju Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, Onkološkega inštituta in Kliničnega oddelka za abdominalno kirurgijo Kliničnega centra že začeli populacijsko presejanje sindroma HNPCC na molekularnogenetski ravni.

## Literatura

- Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y, et al. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 1989; 244: 207-11.
- Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon (see comments). *Science* 1993; 260: 816-9.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319: 525-32.
- Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer (see comments). *Science* 1993; 260: 812-86.
- Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, et al. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 1997; 275: 967-9.
- Eshleman JR, Lang EZ, Bowerfind GK, Parsons R, Vogelstein B, Willson JK, et al. Increased mutation rate at the hprt locus accompanies microsatellite instability in colon cancer. *Oncogene* 1995; 10: 33-7.
- Duval A, Gayet J, Zhou XP, Iacopetta B, Thomas G, Hamelin R. Frequent frameshift mutations of the TCF-4 gene in colorectal cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* 1999; 59: 4213-5.
- Potočnik U, Glavač D, Ravnik-Glavac M. Identification of novel genes with somatic frameshift mutations within coding mononucleotide repeats in colorectal tumors with high microsatellite instability. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 36: 48-56.
- Tomlinson I, Ilyas M, Johnson V, Davies A, Clark G, Talbot I, et al. A comparison of the genetic pathways involved in the pathogenesis of three types of colorectal cancer. *J Pathol* 1998; 184: 148-52.
- Shitoh K, Konishi F, Miyaki M, Iijima T, Furukawa T, Tsukamoto T, et al. Pathogenesis of non-familial colorectal carcinomas with high microsatellite instability. *J Clin Pathol* 2000; 53: 841-5.
- Peltomäki P, Lothe RA, Aaltonen LA, Pylkkanen L, Nystrom-Lahti M, Seruca R, et al. Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res* 1993; 53: 5853-5.
- Thibodeau SN, French AJ, Cunningham JM, Tester D, Burgart LJ, Roche PC, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1. *Cancer Res* 1998; 58: 1713-8.
- Jass JR, Do KA, Simms LA, Iino H, Wynter C, Pillay SP, et al. Morphology of sporadic colorectal cancer with DNA replication errors. *Gut* 1998; 42: 673-9.
- Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, Goldberg RM, Cunningham JM, Sargent DJ, et al. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1043-8.
- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. 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.
- Mecklin JP, Jarvinen HJ, Hakkiuoto A, Hallikas H, Hiltunen KM, Harkonen N, et al. Frequency of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. A prospective multicenter study in Finland. *Dis Colon Rectum* 1995; 38: 588-93.
- 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: 424-5.
- 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.
- Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for clonic carcinogenesis. *Nature* 1993; 363: 558-61.
- Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, et al. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 1994; 263: 1625-9.
- Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 1994; 368: 258-61.
- Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer (published erratum appears in *Cell* 1994; 77: 167). *Cell* 1993; 75: 1027-38.
- Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993; 75: 1215-25.
- Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Wei YF, Carter KC, Ruben SM, et al. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 1994; 371: 75-80.
- Papadopoulos N, Nicolaides NC, Liu B, Parsons R, Lengauer C, Palombo F, et al. Mutations of GTBP in genetically unstable cells (see comments). *Science* 1995; 268: 1915-7.
- Peltomäki P, de la Chapelle A. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Adv Cancer Res* 1997; 71: 93-119.
- Liu B, Farrington SM, Petersen GM, Hamilton SR, Parsons R, Papadopoulos N, et al. Genetic instability occurs in the majority of young patients with colorectal cancer (see comments). *Nat Med* 1995; 1: 348-52.
- Parsons R, Li GM, Longley MJ, Fang WH, Papadopoulos N, Jen J, et al. Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell* 1993; 75: 1227-36.
- Holinski-Feder E, Muller-Koch Y, Friedl W, Moeslein G, Keller G, Plaschke J, et al. DHPLC mutation analysis of the hereditary nonpolyposis colon cancer (HNPCC) genes hMLH1 and hMSH2. *J Biochem Biophys Methods* 2001; 47: 21-32.
- Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9821-6.
- Hackman P, Tannergard P, Osei-Mensa S, Chen J, Kane MF, Kolodner R, et al. A human compound heterozygote for two MLH1 missense mutations (letter). *Nat Genet* 1997; 17: 135-6.
- Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ, Kim CY, Roche PC, Burgart LJ, et al. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res* 1998; 58: 3455-60.
- Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6870-5.
- Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma AH, Lutterbaugh JD, Periyasamy S, et al. Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8698-702.
- Potočnik U, Glavač D, Golouh R, Ravnik-Glavac M. Causes of microsatellite instability in colorectal tumors: implications for hereditary non-polyposis colorectal cancer screening. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; 126: 85-96.
- Huang J, Papadopoulos N, McKinley AJ, Farrington SM, Curtis LJ, Wyllie AH, et al. APC mutations in colorectal tumors with mismatch repair deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9049-54.
- Rowan AJ, Lamlum H, Ilyas M, Wheeler J, Straub J, Papadopolou A, et al. APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational «hotspot» and interdependence of the «two hits». *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 3352-7.
- Mirabelli-Primdahl L, Gryfe R, Kim H, Millar A, Luceri C, Dale D, et al. Beta-catenin mutations are specific for colorectal carcinomas with microsatellite instability but occur in endometrial carcinomas irrespective of mutator pathway. *Cancer Res* 1999; 59: 3346-51.
- Miyaki M, Iijima T, Kimura J, Yasuno M, Mori T, Hayashi Y, et al. Frequent mutation of beta-catenin and APC genes in primary colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res* 1999; 59: 4506-9.
- Olschwang S, Hamelin R, Laurent-Puig P, Thuille B, De Rycke Y, Li YJ, et al. Alternative genetic pathways in colorectal carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 12122-7.
- Fujiwara T, Stalker JM, Watanabe T, Rashid A, Longo P, Eshleman JR, et al. Accumulated clonal genetic alterations in familial and sporadic colorectal carcinomas with widespread instability in microsatellite sequences. *Am J Pathol* 1998; 153: 1063-78.
- Salahshor S, Kressner U, Pahlman L, Glimelius B, Lindmark G, Lindblom A. Colorectal cancer with and without microsatellite instability involves different genes. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; 26: 247-52.
- Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Tanaka K, Muraoka M, Onda A, Okumura Y, et al. Molecular nature of colon tumors in hereditary nonpolyposis colon cancer, familial polyposis, and sporadic colon cancer (see comments). *Gastroenterology* 1996; 111: 307-17.
- Jass JR, Biden KG, Cummings MC, Simms LA, Walsh M, Schoch E, et al. Characterisation of a subtype of colorectal cancer combining features of the suppressor and mild mutator pathways. *J Clin Pathol* 1999; 52: 455-60.
- Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability (see comments). *Science* 1995; 268: 1336-8.
- Souza RF, Appel R, Yin J, Wang S, Smolinski KN, Abraham JM, et al. Microsatellite instability in the insulin-like growth factor II receptor gene in gastrointestinal tumours (letter) (published erratum appears in *Nat Genet* 1996; 14: 488). *Nat Genet* 1996; 14: 255-7.

47. Yin J, Kong D, Wang S, Zou TT, Souza RF, Smolinski KN, et al. Mutation of hMSH3 and hMSH6 mismatch repair genes in genetically unstable human colorectal and gastric carcinomas. *Hum Mutat* 1997; 10: 474-8.
48. Wicking C, Simms LA, Evans T, Walsh M, Chawengsaksophak K, Beck F, et al. CDX2, a human homologue of *Drosophila* caudal, is mutated in both alleles in a replication error positive colorectal cancer. *Oncogene* 1998; 17: 657-9.
49. Schwartz SJ, Yamamoto H, Navarro M, Maestro M, Reventos J, Perucho M. Frameshift mutations at mononucleotide repeats in caspase-5 and other target genes in endometrial and gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Res* 1999; 59: 2995-3002.
50. Liu W, Dong X, Mai M, Seelan RS, Taniguchi K, Krishnadath KK, et al. Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling. *Nat Genet* 2000; 26: 146-7.
51. Vilkki S, Launonen V, Karhu A, Sistonen P, Vastrik I, Aaltonen LA. Screening for microsatellite instability target genes in colorectal cancers. *J Med Genet* 2002; 39: 785-9.
52. Toyota M, Issa JP. CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. *Semin Cancer Biol* 1999; 9: 349-57.
53. Mori Y, Yin J, Rashid A, Leggett BA, Young J, Simms L, et al. Instability: comprehensive identification of frameshift mutations caused by coding region microsatellite instability. *Cancer Res* 2001; 61: 6046-55.
54. Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, et al. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1758-62.
55. Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R, Ruschoff J. Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res* 1997; 57: 4749-56.
56. Starostik P, Muller-Hermelink HK. Diagnosis of microsatellite instability-positive colorectal cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2001; 1: 71-80.
57. Zhou XP, Hoang JM, Cottu P, Thomas G, Hamelin R. Allelic profiles of mononucleotide repeat microsatellites in control individuals and in colorectal tumors with and without replication errors. *Oncogene* 1997; 15: 1713-8.
58. 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.
59. Liu L, Markowitz S, Gerson SL. Mismatch repair mutations override alkyltransferase in conferring resistance to temozolomide but not to 1, 3-bis(2-chloroethyl)nitrosourea. *Cancer Res* 1996; 56: 5375-9.
60. Weissenbach J. A second generation linkage map of the human genome based on highly informative microsatellite loci. *Gene* 1993; 135: 275-8.
61. Spirio L, Joslyn G, Nelson L, Leppert M, White R. A CA repeat 30-70 KB downstream from the adenomatous polyposis coli (APC) gene (published erratum) appears in *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 6348.
62. Jones MH, Nakamura Y. Detection of loss of heterozygosity at the human TP53 locus using a dinucleotide repeat polymorphism. *Genes Chromosomes Cancer* 1992; 5: 89-90.
63. Vanagaite L, James MR, Rotman G, Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, et al. A high-density microsatellite map of the ataxia-telangiectasia locus. *Hum Genet* 1995; 95: 451-4.
64. Weber JL, Kwitek AE, May PE, Wallace MR, Collins FS, Ledbetter DH. Dinucleotide repeat polymorphisms at the D17S250 and D17S261 loci. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 4640.
65. Dib C, Faure S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, et al. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 1996; 380: 152-4.
66. Makela TP, Hellsten E, Vesa J, Alitalo K, Peltonen L. An Alu variable polyA repeat polymorphism upstream of L-myc at 1p32. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 217.
67. Potocnik U, Glavac D, Golouh R, Ravnik-Glavac M. Evaluation of microsatellite markers for efficient assessment of high microsatellite instabile colorectal tumors. *Pflugers Arch* 2000; 439 Suppl 3: R47-R49.
68. Potocnik U. Molekularno genetska analiza dednih in sporadičnih oblik kolorektalne raka v slovenski populaciji, Magistrsko delo. Ljubljana: Medicinska fakulteta, 1998.
69. Ravnik-Glavac M, Potocnik U, Glavac D. Incidence of germline *hMLH1* and *hMSH2* mutations (HNPCC patients) among newly diagnosed colorectal cancers in a Slovenian population. *J Med Genet* 2000; 37: 533-6.
70. Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, Canzian F, Hemminki A, Peltomaki P, et al. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 1998; 338: 1481-7.
71. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 2002; 418: 934.
72. Peltomaki P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 735-40.
73. Peltomaki P. DNA mismatch repair and cancer. *Mutat Res* 2001; 488: 77-85.
74. Wahlberg S, Liu T, Lindblom P, Lindblom A. Various mutation screening techniques in the DNA mismatch repair genes hMSH2 and hMLH1. *Genet Test* 1999; 3: 259-64.
75. Wijnen J, Vasen H, Khan PM, Menko FH, van der Klift H, van Leeuwen C, et al. Seven new mutations in hMSH2, and HNPCC gene, identified by denaturing gradient-gel electrophoresis. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 1060-6.
76. Beck NE, Tomlinson IP, Homfray T, Frayling I, Hodgson SV, Harocopus C, et al. Use of SSCP analysis to identify germline mutations in HNPCC families fulfilling the Amsterdam criteria. *Hum Genet* 1997; 99: 219-24.
77. Ravnik-Glavac M, Potocnik U, Kozelj M, Krizman I, Glavac D. A novel in frame deletion of codons 188-190 in the hMSH2 gene of a Slovenian patient with hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Hum Hered* 1998; 48: 285-7.
78. Wijnen JT, Vasen HF, Khan PM, Zwinderman AH, van der Klift H, Mulder A, et al. Clinical findings with implications for genetic testing in families with clustering of colorectal cancer. *N Engl J Med* 1998; 339: 511-8.
79. Kohonen-Corish M, Ross VL, Doe WF, Kool DA, Edkins E, Faragher I, et al. RNA-based mutation screening in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 818-24.
80. Bateman JF, Freddi S, Lamande SR, Byers P, Nasioulas S, Douglas J, et al. Reliable and sensitive detection of premature termination mutations using a protein truncation test designed to overcome problems of nonsense-mediated mRNA instability. *Hum Mutat* 1999; 13: 311-7.
81. Charbonnier F, Raux G, Wang Q, Drouot N, Cordier F, Limacher JM, et al. Detection of exon deletions and duplications of the mismatch repair genes in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families using multiplex polymerase chain reaction of short fluorescent fragments. *Cancer Res* 2000; 60: 2760-3.
82. Wang Y, Friedl W, Sengteller M, Jungck M, Filges I, Propping P, et al. A modified multiplex PCR assay for detection of large deletions in MSH2 and MLH1. *Hum Mutat* 2002; 19: 279-86.
83. Nakagawa H, Yan H, Lockman J, Hampel H, Kinzler KW, Vogelstein B, et al. Allele separation facilitates interpretation of potential splicing alterations and genomic rearrangements. *Cancer Res* 2002; 62: 4579-82.
84. Nystrom-Lahti M, Wu Y, Moisio AL, Hofstra RM, Osinga J, Mecklin JP, et al. DNA mismatch repair gene mutations in 55 kindreds with verified or putative hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 763-9.
85. Farrington SM, Lin-Goerke J, Ling J, Wang Y, Burczak JD, Robbins DJ, et al. Systematic analysis of hMSH2 and hMLH1 in young colon cancer patients and controls. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 749-59.
86. Jarvinen HJ, Mecklin JP, Sistonen P. Screening reduces colorectal cancer rate in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 1995; 108: 1405-11.
87. Jarvinen HJ, Aarnio M, Mustonen H, Aktan-Collan K, Aaltonen LA, Peltomaki P, et al. Controlled 15-year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 2000; 118: 829-34.
88. Ruschoff J, Wallinger S, Dietmaier W, Bocker T, Brockhoff G, Hofstadter F, et al. Aspirin suppresses the mutator phenotype associated with hereditary nonpolyposis colorectal cancer by genetic selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 11301-6.
89. Loukola A, Salovaara R, Kristo P, Moisio AL, Kaariainen H, Ahtola H, et al. Microsatellite instability in adenomas as a marker for hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Am J Pathol* 1999; 155: 1849-53.
90. Salovaara R, Loukola A, Kristo P, Kaariainen H, Ahtola H, Eskelinen M, et al. Population-based molecular detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2193-200.
91. Aktan-Collan K, Mecklin JP, de la Chapelle A, Peltomaki P, Uutela A, Kaariainen H. Evaluation of a counselling protocol for predictive genetic testing for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 2000; 37: 108-13.
92. Lynch HT, Lynch JF. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Semin Surg Oncol* 2000; 18: 305-13.