

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**A KI-67, FLT3 ÉS JAK2 GÉNEK MUTÁCIÓINAK VIZSGÁLATA TUMOROS
SEJTVONALAKBAN ÉS COLORECTALIS CARCINOMÁS BETEGEK
MINTÁIBAN**

DR. BUBÁN TAMÁS

TÉMAVEZETŐ:

DR. ANTAL-SZALMÁS PÉTER



DEBRECENI EGYETEM

KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2012

TARTALOMJEGYZÉK

1. Rövidítések jegyzéke.....	4
2. Bevezetés.....	5
3. Irodalmi összefoglaló	6
3.1 A colorectalis daganatok etiológiája, epidemiológiai, klinikai és patológiai jellemzői.....	6
3.1.1 Sporadikus tumorok	8
3.1.2 Familiáris CRC.....	10
3.1.3 Örökletes CRC szindrómák.....	10
3.1.3.1 Lynch szindróma	12
3.1.3.2 Familiáris CRC X szindróma	15
3.1.3.3 Muir-Torre szindróma	16
3.1.3.4 Familiáris adenomatosus polyposis (FAP).....	17
3.2 A colorectalis daganatok kialakulásának patomechanizmusa.....	18
3.2.1 A „klasszikus” adenoma-carcinoma útvonal molekuláris mechanizmusa	18
3.2.2 A hibajavító (MMR) rendszer fehérjéinek kiesése	20
3.3 A patogenezis szempontjából esetlegesen jelentős további faktorok.....	21
3.3.1 A Ki-67 fehérje.....	21
3.3.2 A JAK2 gén V617F mutációja	24
3.3.3 Az FLT3 gén belső tandem duplikációja és tirozin-kináz domén mutációja.....	26
4. Célkitűzés	28
5. Betegek, anyagok és módszerek.....	29
5.1 A vizsgálatban résztvevő betegek jellemzői	29
5.2 Az alkalmazott sejtvonalak	30
5.3 RNS, DNS izolálás	30
5.4 A Ki-67 gén cDNS-ének szekvenálása klónozással.....	30
5.5 A Ki-67 c.1300delC mutáció vizsgálata primer CRC mintákban szekvenálással	31
5.6 Az FLT3 tirozin kináz domén (TKD) mutáció kimutatása PCR+RFLP-vel	34
5.7 Az FLT3 internal tandem duplication (ITD) kimutatása PCR és agaróz- illetve poliakrilamid gélelektroforézis segítségével.....	34
5.8 Az FLT3 internal tandem duplication (ITD) kimutatása fragmentanalízissel és szekvenálással	35
5.9 A JAK2 gén V617F mutációjának kimutatása PCR+RFLP-vel	36
5.10 Microsatellita instabilitás vizsgálata	37

5.11 Statisztikai analízis	39
6. Eredmények.....	40
6.1 Ki-67 mutációk kimutatása daganatos sejtvonalakban és CRC-s betegek mintáiban.....	40
6.2 Az FLT3-ITD kimutatására alkalmas módszerek összehasonlítása.....	41
6.2.1 Az FLT3-ITD kimutatására használt módszerek alkalmazásának gyakorisága a nemzetközi irodalomban	41
6.2.2 Az FLT3-ITD kimutatása AML-es betegek mintáiban 3 különböző elektroforetikus módszerrel	43
6.2.3 Az elektroforetikus rendszerek analitikai paramétereinek meghatározása: reprodukálhatóság	44
6.2.4 Az elektroforetikus rendszerek analitikai paramétereinek meghatározása: érzékenység	48
6.2.5 Az elektroforetikus rendszerek analitikai paramétereinek meghatározása: felbontás	49
6.2.6 Az FLT3-ITD pozitív mintákban AGE és PAGE segítségével detektált multiplex sávok analízise.....	50
6.2.7 A CE-vel illetve DNS-szekvenálással meghatározott ITD méretek összehasonlítása....	51
6.3 Az FLT3-ITD és TKD mutációk előfordulásának gyakorisága sporadikus és örökletes colon tumoros betegek mintáiban	53
6.4 A JAK2 V617F mutáció előfordulásának gyakorisága sporadikus és örökletes colon tumoros betegek mintáiban	55
7. Megbeszélés	57
7.1 A Ki-67 potenciális szerepe a colorectalis daganatok kialakulásában.....	57
7.2 Az FLT3 génben lévő ITD kimutatására alkalmas elektroforetikus módszerek analitikai paramétereinek értékelése	59
7.3 A JAK2 V617F és az FLT3-ITD és -TKD mutációk jelentősége sporadikus és örökletes colorectalis tumorokban	62
8. Összefoglalás.....	65
9. Summary	66
10. A disszertáció új megállapításai.....	67
11. Irodalomjegyzék.....	68
12. Az értekezés alapjául szolgáló, illetve egyéb saját közlemények	80
13. Tárgyszavak / Keywords.....	83
14. Köszönetnyilvánítás	84

1. Rövidítések jegyzéke

AGE – agaróz gélelektroforézis

APC – adenomatosus polyposis coli

CE – kapilláris elektroforézis

CRC – colorectalis carcinoma

CV% – variációs koefficiens

FAP – familiaris adenomatosus polyposis

FLT3 – fms-like tyrosine kinase („fms-szerű tirozin kináz”)

HNPCC – hereditary non polyposis colorectal carcinoma

ITD – internal tandem duplication („belső tandem duplikáció”)

JAK2 – Janus kináz 2

MAP – MUTYH (= MYH) asszociált polyposis

MYH – humán mutY homológ

MMR gének – mismatch repair gének („hibajavító gének”)

PAGE – poliakrilamid gélelektroforézis

RFU – relatív fluoreszcencia egység

SNP – single nucleotide polymorphism

TKD – tirozin kináz domén

2. Bevezetés

A vastagbélrák (colorectalis carcinoma, CRC) világszerte a harmadik leggyakoribb daganatfajta nőkben, és a negyedik a férfiakban, ezzel összhangban a fejlett országok többségében a második leggyakoribb daganatos halálozási okként szerepel [1, 2]. A kialakulásában környezeti és genetikai tényezők is közrejátszanak. A fejlett országokban a legnagyobb a CRC incidenciája, a fejlődő országokban a legalacsonyabb, a különbség mintegy tízszeres. Az egyik legfőbb rizikótényező a kor, az incidencia 40-50 éves kor között meredeken emelkedni kezd. Az átlagos kockázatú populációban a CRC kialakulásának valószínűsége a teljes várható élettartamot figyelembe véve kb. 5%. Speciális, CRC-re hajlamosító öröklődő kórképek esetén az incidencia nagyobb. A bal és jobb colonszék tumoraik morfológiai megjelenése és klinikai tünetei különbözhetnek, de szövettanilag nem, többnyire adenocarcinomák. A daganat stádiumbeosztása meghatározza a CRC prognózisát és a további kezelés menetét is.

A CRC-t feloszthatjuk sporadikus, örökletes és családi halmozódást mutató csoportokra. Az esetek kb. 5-10%-ában egy ismert gén öröklött mutációja áll a betegség hátterében, további 20-25%-ban pedig egyértelmű a daganatos betegségek családi halmozódása, de ennek hátterében kevésbé ismert, kis hatású, örökletes genetikai eltérések kumulálódása állhat. A CRC-k 70%-a sporadikus, melyek valamilyen szerzett genetikai eltérés talaján alakulnak ki [3].

Mind a veleszületett, mind a szerzett CRC alapja a genetikai instabilitás, mely alapvetően három fő mechanizmusra vezethető vissza. A kromoszóma instabilitás az oka a sporadikus esetek kb. 85%-ának, amikor is számos számbeli és strukturális kromoszóma eltérés alakul ki és ez befolyásolja kulcsfontosságú gének működését. A hibajavító rendszer (MMR) fehérjéinek (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) hiánya felelős a CRC kb. 5%-át kitevő Lynch szindróma és a sporadikus esetek 8-15%-ának a kialakulásáért. Végül a CRC-s esetek 10-20%-ában mutatható ki számos gén promóter régióját érintő hypermetiláció, ami ezen fehérjék (pl. APC, MLH1) szintézisének a csökkenését vagy hiányát eredményezhetik. Ez a „CpG-sziget metilátor fenotípus” szintén társulhat microsatellita instabilitással, és leggyakrabban a sporadikus esetekben mutatható ki [4].

Bár mind a sporadikus, mind az örökletes CRC hátterében álló potenciális genetikai eltérések száma folyamatosan növekszik, számos nyitott kérdés vár még válaszra. Munkánk során sporadikus és örökletes CRC-s esetek mintáit vizsgáltuk új genetikai eltérések után kutatva, olyan fehérjék génjeit vizsgálva, melyek vagy a sejtosztódás szabályozásában töltenek be nélkülözhetetlen szerepet, vagy mutációik révén sejtproliferációt indukálnak.

3. Irodalmi összefoglaló

3.1 A colorectalis daganatok etiológiája, epidemiológiai, klinikai és patológiai jellemzői

Egy 2002-es világméretű felmérés szerint évente kb. 1 millió új CRC-s esettel kell számolnunk, és a CRC-hez társuló éves halálozás kb. fél millió fő [2]. Az Amerikai Egyesült Államokban évente kb. 150 000 új esetet diagnosztizálnak és hozzávetőlegesen 50 000 ember hal meg CRC-ben [5]. A CRC a harmadik leggyakoribb tumorfajta, és a tüdőrák után a második helyen áll a rákos halálozások listáján az USA-ban. Magyarországon is hasonló a helyzet: a CRC a harmadik leggyakoribb tumor a tüdő- és emlőrák után (KSH adatok, 2008), és második a tumoros halálokok listáján a tüdő- és emlőrák között. 2008-ban hazánkban 8100 ember betegedett meg rosszindulatú vastagbélrákban, és 4750 ember halt meg ebben a betegségben.

Bár az USA-ban az utóbbi évtizedekben valamelyest csökkent a CRC incidenciája [6], a fejlett országok többségében növekvő tendencia figyelhető meg. Egyébként is a fejlett országokban a legnagyobb a CRC incidenciája, a fejlődő országokban jóval alacsonyabb, a különbség mintegy tízszeres [7]. Ennek oka a táplálkozási és környezeti tényezőkön túl az egyes populációk genetikai fogékonyságában is kereshető. Az átlagos kockázatú populációban a CRC kialakulásának valószínűsége a teljes várható élettartamot figyelembe véve kb. 5%.

A halálozás CRC-ben csökkenő tendenciát mutat a fejlődő országokban az 1980-as évek óta. Ennek oka részben a betegség diagnosztizálásának fejlődése, az endoszkópia terjedése, ennek révén a CRC és az azt megelőző állapotok korábbi felismerése, de a terápia fejlődése is. Az öt éves túlélés az USA-ban a magas incidencia ellenére is 61 százalék [8], míg például Kelet-Európában csak 30 százalék [7].

A CRC negyven éves kor alatt viszonylag ritka betegség, ezt követően azonban az incidencia emelkedni kezd és a korrallal egyre nagyobb lesz [9]. Az öröklődő kórképekben a legnagyobb a CRC kockázata, ide tartozik pl. a FAP és a Lynch szindróma, bár a kettő együtt a colon tumoros esetek kevesebb, mint öt százalékáért felelős [10-12]. Ezekben a kórképekben jóval fiatalabb korban – nemritkán a 2-3. évtizedben – alakul ki CRC.

A betegség lefolyását illetően számos, azt befolyásoló tényezőről jelent meg publikáció. Így hatással lehet pl. a prognózisra a diagnózis időpontjában megfigyelhető tünetcsoport, a daganat bélen belüli helyzete, száma (egyszerre több tumor mutatható ki a colonban). A betegség felismerésekor panaszos betegek öt éves túlélése 49%, szemben a tünetmentes betegek 71%-ával, a súlyos szövődménynek számító perforáció vagy obstrukció jelentősen rontja az esélyeket [13-18]. A vérzés ugyanakkor nem független prediktor a

betegség kimenetele szempontjából [16, 19]. Azok a betegek, akiknél distalisan helyezkedik el a tumor, rosszabb túlélési aránnyal rendelkeznek, mint a proximálisabban elhelyezkedő tumorok esetén [20]. A betegek 3-5 százalékában található szinkron tumor, azaz legalább két, egymástól függetlenül, de egyidejűleg jelentkező daganat a bélben, ami hangsúlyozza a colon teljes átvizsgálásának fontosságát. A prognózis hasonló a szoliter tumorok hasonló stádiumában szenvedőkéhez [21]. Az utóbbi évtizedekben a vastagbélen belüli lokalizációt illetően fokozatos eltolódás észlelhető a jobb colonfél felé, ami főleg a coecumot érinti és különösen a nőkben figyelhető meg [6, 22, 23]. A jobb colon félben elhelyezkedő tumorok nagy méretet érhetnek el anélkül, hogy passzázszavart okoznának, ezért az első tünet gyakran az okkult vérzés okozta vashiányos anémia. A bal colonfélben lévő tumorok ezzel szemben gyakran lument szűkítők, obstrukciót, következményes székrekedést vagy hasmenést okozva.

A jobb és bal colonfél tumorai között szövettanilag azonban nincs különbség, túlnyomórészt adenocarcinomák. A mirigystruktúra alapján különböztetnek meg jól vagy kevésbé differenciált tumort. A nagy mennyiségű mucint termelő és szekretáló mucinosus tumorok leginkább distalisan fordulnak elő, felismerésükkor többnyire előrehaladott stádiumban vannak már [24]. Ha a mucin intracellularisan marad, a sejt pecsétgyűrű alakot vehet fel. Ha a tumor jórészt ilyen sejtekből áll, pecsétgyűrű sejtjes carcinomának hívjuk. Bár ritkán előforduló típus, egy tanulmányban a betegek döntő hányada már előrehaladott stádiumban volt a betegség diagnosztizálásának idején, kétharmaduknál pedig carcinosis peritonei is jelen volt. [25]. A CRC-k tizedében neuroendokrin differenciálódás is látható. A kiterjedt neuroendokrin differenciálódást tartalmazó tumorokat kis sejtjes carcinomának hívjuk. Ezek többnyire rossz prognózisúak. Az adenosquamosus carcinomában laphámsejtjes differenciálódás is látható. A CRC-k egyik új altípusa a medulláris carcinoma, egy nem differenciált, nagy eosinophil sejtekből és infiltráló kis lymphocytákból álló tumor, mely összefüggésbe hozható a microsatellita instabilitással és a Lynch szindrómával [26]. A prognózist illetően a szövettani típus néhány nagyobb kockázattal járó formát leszámítva (pl. a pecsétsejtjes vagy a nem differenciált carcinomák) nem független prognosztikai tényező [27-32].

A CRC eredményes kezelésének egyik nagy problémája, hogy a felismerés időpontjában a betegek ötödében már távoli áttétképződés alakult ki [33]. A tumoros folyamat hematogén (máj, tüdő) és lymphogén úton (regionális nyirokcsomók) adhat áttétet, illetve közvetlenül is ráterjedhet a környezetére (hashártya). A vena portaen keresztül az első hematogén metastasis többnyire a májban képződik, kivéve a rectum alsó részében

elhelyezkedő daganatok esetén, amikor a vena rectalis inferioron keresztül közvetlenül a tüdőben képződhet áttét. Számos más szerv is érintett lehet, pl. a csontokban, az agyban is keletkezhet metastasis.

A diagnózis felállítása után a betegség kiterjedésének, távoli áttétképződésének megállapítása szükséges a lehetséges kezelés és a prognózis meghatározásának céljából. Két osztályozást használnak elterjedten: a Duke szerintit és a TNM sémát [34]. A legfontosabb tényezők a tumor kiterjedése (a bélfal rétegeinek érintettsége), a távoli metastasis jelenléte, a nyirokcsomók érintettsége és száma, illetve a műtét során esetlegesen visszamaradt tumor. Jelentősége van továbbá a műtét előtti CEA szintnek. Emelkedett szintje esetén ($>5 \mu\text{g/l}$), csökken az öt éves túlélés aránya, illetve rövidebb a recidíváig eltelt idő [35-36].

A CRC kialakulásának patomechanizmusa alapján megkülönböztetünk sporadikus daganatokat, ahol nem szerepel a családi anamnézisben colon tumor (kb. 70%), családi halmozódást mutató (kb. 20-25%) és örökletes (5-10%) daganatokat.

3.1.1 Sporadikus tumorok

A sporadikus CRC-ben a beteg családi kórtörténetében nem szerepel colon tumor. A CRC-s betegek kb. 70 százaléka sorolható ide. A tumor általában 50 éves kor felett alakul ki. Kialakulásában diétás, környezeti tényezők mellett a szomatikus sejtekben bekövetkezett mutációk sora játszik szerepet.

Ha a beteg anamnézisében 1 cm-nél nagyobb polypus eltávolítása szerepel, a relatív kockázat 3,5-6,5 közé emelkedik, különösen, ha a szövettan villosus vagy tubulovillosus adenomát igazolt, vagy több polypus is volt. Ugyanakkor a kis adenomák nem növelik a kockázatot [37]. Ha CRC miatt műtetre kerül sor, a betegek 1,5-3 százalékában újabb primer (metakron) tumor alakulhat ki.

A gyulladós bélbetegségben (inflammatory bowel disease - IBD) szenvedő betegek a kiterjedéstől és a betegség időtartamától függően nagyobb kockázattal bírnak. Colitis ulcerosában a teljes vastagbél érintettsége 5-15-szörös, a bal colonfélre lokalizálódó betegség háromszoros kockázat emelkedéssel jár, míg a rectumra lokalizálódó formában nem kell lényeges rizikónövekedéssel számolni [38]. A kockázatonövekedés pancolitises esetekben a betegség kezdetétől számított 8-10, bal oldali érintettségben 15-20 év múlva kezdődik, amit a betegek gondozása során, az endoszkópos ellenőrzés tervezésénél figyelembe kell venni [39]. Crohn-betegségben, ha az egész vastagbél érintett, hasonlóan emelkedett a kockázat, mint colitis ulcerosában pancolitis esetén [40]. A fokozott rizikó hátterében a súlyos és elhúzódó

gyulladás feltételezhető. Egy tanulmányban az emelkedett C-reaktív fehérje szint növekedett CRC kockázattal járt, bár mások ezt nem tudták megerősíteni [41].

Számos tanulmány talált diabetes mellitusban szenvedő betegek körében fokozott kockázatot. Egy tizenöt tanulmányt felölelő, ezáltal több mint 2,5 millió beteget érintő meta-analízisben a CRC kockázata 30 százalékkal volt magasabb, mint a nem diabetesesek esetében [42]. Ennek oka a colon epitelsejtek növekedését stimuláló inzulin a II. típusú diabetesben jellemző túltermelődése lehet [43]. Egy 15 000 beteget felölelő prospektív tanulmányban a magasabb insulin-like growth factor (IGF-I) szint magasabb CRC kockázattal járt (RR=2,51), míg az IGF-I binding protein-3 magasabb szérumszintje védő hatású volt [44]. Ezek után érdekes lehet a hosszú távú inzulin terápia hatása a CRC kockázatát illetően. Legalább egy éves inzulin adagolás esetében a CRC kockázatát magasabbnak találták (RR=2,1) [45].

A cholecystectomy és a CRC között több vizsgálat lát összefüggést, de az eredmények nem egyértelműek. Egy tanulmányban mintegy 278 000 beteg sorsát tekintették át az epehólyag-eltávolítást követően, és csak mérsékelt növekedést tapasztaltak a jobb oldali colon tumorok gyakoriságában (a standardizált incidencia hányados 1,16 volt), míg a distalis tumorok aránya nem nőtt [46].

Az alkoholfogyasztást vizsgálva azt találták, hogy az alkoholt napi 45 g-ot meghaladó mennyiségben fogyasztó betegek kockázata mérsékeltten nőtt (RR=1,41) [47]. Ez összefüggésben lehet azzal, hogy az alkohol befolyásolja a folsav felszívódását, ami az amúgy is csökkent bevitt csak súlyosbítja [48, 49].

A túlsúly a CRC kockázatát másfélszeresére növeli [50]. A rizikófaktorok között megemlítendő még a coronaria betegségek [51], a dohányzás [52], az uretero-colicus anastomosis [53], korábbi kismencedei irradiáció [54] és az acromegalia [55]. A vörös húsok tartós fogyasztása a bal oldali CRC kockázatát növeli, míg a sovány húsok kisebb kockázattal járnak [56].

Kiterjedt irodalma van a védőfaktorok vizsgálatának is. Ami a diétát illeti, számos tanulmány a zöldségekben, gyümölcsökben gazdag étrend jótékony hatását írja le, a relatív rizikó csökkenésével (RR=0,5) [57-59]. További védőfaktorok között említik még az élelmi rostokat [60], a folsavat [61], a B6-vitamint [62], a magnéziumot [63], a fizikai aktivitást [64], a non-szteroidokat [65], a statinokat [66], az omega 3 zsírsavakat [67], a fokhagymát [68], a csökkent vörös hús és állati zsiradék bevitelét [69]. A hatásmechanizmus nem pontosan tisztázott. A védőhatás nem minden tanulmányban volt kimutatható, vannak ellenpéldák is, melyek az adott diétás faktor jótékony hatását nem támasztják alá [70]. A folsavat illetően egy

2010-ben publikált tanulmány a védőhatást igazolja [61], egy 2011-es pedig nem talált szignifikáns eltérést sem pro, sem kontra [71], de mindenképpen derűsebb képet fest, mint egy 2007-es tanulmány, mely a folsav rizikónövelő hatásáról számol be [72]. További vizsgálatok szükségesek annak megállapítására, hogy ezek a faktorok prevencióként mennyire használhatók a CRC elleni küzdelemben.

3.1.2 Familiáris CRC

A betegek kb. 25 százalékának pozitív a családi anamnézise CRC-re nézve, de nem igazolható egyetlen örökletes szindróma sem. Ezekben a familiáris esetekben a CRC kockázata fokozottabb, de nem olyan magas, mint az örökletes kórképekben. Ha egy elsőfokú rokon CRC-ben szenvedett, a kockázat közel kétszeresére növekszik. Még nagyobb a kockázat, ha az érintett személy 55 évnél fiatalabb volt a tumor felismerése idején, vagy több rokonnak is colon tumora volt. Ha egy cm-nél nagyobb, vagy villosus részeket illetve súlyos dysplasiát tartalmazó polypus fordult elő a családban, ez hasonló kockázatot jelent, mint a családi anamnézisben szereplő CRC [73]. Célszerű ilyenkor endoszkópos szűrést végezni 40 éves kortól, vagy legalább 10 évvel korábban, mint a legfiatalabb, tumorban szenvedő rokon kora.

A familiáris CRC öröklődése nagy valószínűséggel poligénes, háttérben kevésbé ismert, kisebb hatású, örökletes genetikai eltérések kumulálódása állhat. Eddig összesen 7 nagyobb, „teljes genom asszociációs vizsgálat” tett kísérletet ezen eltérések azonosítására és jelenleg 10 olyan locus ismerünk, amelyek változásai nagy valószínűséggel szerepet játszhatnak a betegség kialakulásában. Ezeknek a genetikai elemeknek a pontos azonosítása és funkciójuk megértése azonban még további kutatás tárgya [74].

3.1.3 Örökletes CRC szindrómák

Az összes CRC-s beteg kevesebb, mint 10 százalékát érintő csoportban öröklött hajlamot találunk a betegség kialakulására, amiért specifikus csírasejt mutáció a felelős. Ezt a csoportot az alapján osztjuk két részre, hogy a betegség alapvetően polyposis formájában (polypusok százai, ezrei uralják a képet) jelentkezik, vagy sem (1. táblázat). A polyposissal járó kórképek közé soroljuk a familiáris adenomatous polyposis szindrómát (FAP és MUTYH-asszociált polyposis) és a hamartomatous polyposis szindrómákat (pl. Peutz-Jeghers, juvenilis polyposis szindróma, Cowden szindróma), míg a polyposissal nem járó csoportba a Lynch, a familiáris CRC X szindrómát és egyéb ritka betegségeket. Ezek a

kórképek kifejezetten magas kockázattal bírnak a CRC kialakulása szempontjából. Az öröklődő mutáció azonosítható és az egészséges családtagok szűrésére is felhasználható.

1. táblázat Az örökletes vastagbél daganatok klasszifikációja

BETEGSÉG	GÉNEK	CRC RIZIKÓJA	KLINIKUM
Polyposissal nem járó <i>Lynch szindróma</i>	hMSH2, hMLH1, hPMSI, hPMS2, hMSH6 (DNA MMR gének)	≈ 80%	<ul style="list-style-type: none"> • Polypusok kialakulása: 20-30 éves korban • CRC: 30-40 éves korban • Endometrium rák: 30-40 éves korban • Adenomatous, gyakran multiplex colorectalis polypusok; korai kezdet, multiplex CRC • Endometrium, ovárium, gyomor, hepatobiliaris tumorok társulhatnak, gyakran multiplex tumorok kialakulása
<i>Muir-Torre szindróma</i>	hMSH2, hMLH1	≈ 80%	<ul style="list-style-type: none"> • Mint a Lynch szindrómában + faggyúmirigy- és emlő tumor jelentkezése
<i>Familiáris CRC X szindróma</i>		nem ismert	<ul style="list-style-type: none"> • Lynch szindrómának megfelelő Amsterdam-kritériumok, de MMR-gén defektus nélkül; később alakul ki CRC (50-60 éves korban) • Extraintestinális manifesztáció nincsen
Polyposissal járó <i>FAP</i>	adenomatous polyposis coli (APC) gén	≈ 100%	<ul style="list-style-type: none"> • Polypusok kialakulása: 10-20 éves korban • CRC: 20-40 évesen • Száz - több ezer adenomatous colorectalis polypus mellett gyomor, duodenum, ileum és jejunum polypusok kialakulása • Papillaris pajzsmirigyrák, mellékvese hyperplasia/tumor, hepatoblastoma
<i>Gardner szindróma</i>	APC	≈ 100%	<ul style="list-style-type: none"> • Mint FAP-ban; + desmoid tumorok, lágyrész tumorok, osteomák, fogfejlődési rendellenességek
<i>Turcot szindróma</i>	APC (70%); hMLH1, hPMS2 (30%)	≈ 100%	<ul style="list-style-type: none"> • Mint FAP-ban; extraintestinalis manifesztáció: kp. idegrendszeri tumorok (medulloblastoma, astrocytoma)
<i>Attenuált FAP</i>	APC	igen nagy, de nem éri el a 100%-ot	<ul style="list-style-type: none"> • Polypusok kialakulása: 20-30 éves korban • CRC: 30-50 éves korban • <100 polypus (átlag 30); proximalis colon túlsúly, számos felső GI traktusbeli polyp
<i>MAP (MYH-asszociált polyposis)</i>	MYH (MUTYH)-gén	≈50% (homozigóta mutáció esetén)	<ul style="list-style-type: none"> • Attenuált FAP fenotípus, de APC-gén mutáció nem mutatható ki
Hamartomatous kórképek <i>Peutz-Jeghers</i>	LKB1 (tumor szuppresszor gén)	≈ 40%	<ul style="list-style-type: none"> • Polypok kialakulása: kisgyermekkorban • CRC: 30-40 évesen • 5-100 hamartomatous polypus az egész GI traktusban, melyek a simaizom pseudoinvazióját mutatják • Mucocutan pigmentáció, emlő-, cervix-, gonád-, pajzsmirigy- és pancreastumor

<i>Juvenilis polyposis</i>	SMAD4, BMPR1A (tumor szuppresszor gének); PTEN	≈ 10-40%	<ul style="list-style-type: none"> • Polypusok kialakulása: 5-15 éves korban • CRC: 15-40 évesen • 50-200 polypus az egész GI traktusban colon túlsúllyal, kiszélesedett lamina propriával rendelkeznek; intussusceptio, anémia, vérzés, proteinvesztő enteropathia kísérheti • Veleszületett fejlődési rendellenességekkel társulhat: kardiális, craniofacialis abnormalitások, bélforgási zavar
<i>Cowden szindróma</i>	PTEN (protein tyrosine phosphatase gén)	nem növekedett	<ul style="list-style-type: none"> • Hamartomatosus polypusok az egész béltraktusban • Verrucosus bőrléziók, bőr-, emlő- és pajzsmirigy tumor, macrocephalia társulhat hozzá
<i>Ruvalcaba-Myhre-Smith</i>	PTEN	nem növekedett	<ul style="list-style-type: none"> • Hamartomatosus polypusok az egész béltraktusban • Macrocephalia, visszamaradott fejlődés, thyreoiditis, csontfejlődési rendellenességek kísérhetik
<i>Hereditær kevert polyposis</i>		≈ 30%	<ul style="list-style-type: none"> • Polypok kialakulása: 20-40 éves korban • CRC: 30-50 éves korban • 1-15 atípusos polypus: adenomatosus, hyperplasticus és hamartomatosus polypusok keveréke • Nincs extraintestinalis manifestatio

(Strate LL & Syngal S, Cancer Causes and Control 2005; 16:201-213. alapján)

3.1.3.1 Lynch szindróma

A polyposissal nem járó, örökletes CRC szindrómák hagyományos elnevezése hereditær nem polyposus colon carcinoma volt (HNPCC). A klasszikus definíció szerint ebbe a kategóriába tartoztak azok a kórképek, amelyek az MMR gének kiesésével függtek össze. Egyre több adat szól azonban amellet, hogy a klasszikus HNPCC-s esetek 30-50%-ban nem lehet MMR gén eltéréseket kimutatni. Ezért az MMR fehérjék kiesésével járó betegséget Lynch szindrómának, míg a klinikailag HNPCC-nek megfelelő de MMR elváltozással nem járó eseteket familiáris CRC X szindrómának nevezzük.

Az öröklődő colorectalis rákok közül a leggyakoribb a Lynch szindróma, az összes CRC kb. 1-4 százalékát teszi ki [75]. A betegség a CRC és más adenocarcinoma korai kialakulásával jellemezhető, pl. endometrium, ovarium, gyomor, húgyúti tumorok. A kórkép autoszóm domináns módon öröklődik. Kialakulásában a mismatch repair (MMR) gének hibáinak van szerepe. Az öt MMR génből leggyakrabban a hMSH2 és hMLH1 génben alakul ki mutáció [76]. Az MMR proteinek a DNS replikáció során keletkezett, a bázissorrendben változást eredményező hibákat javítják ki. Mutációik révén a DNS-ben hibák halmozódnak fel, főleg a microsatellitákban, ahol egy rövid, néhány bázisból (pl. CA) álló, de sorozatban ismétlődő DNS szakaszban számbeli eltérés, rövidülés vagy lánchosszabbodás alakulhat ki

(microsatellita instabilitás). Ha ez a proliferációt szabályzó génekben jelenik meg, tumor fejlődhet ki.

A Lynch szindrómás betegeknek életük során kb. 80 százalékos esélyük van CRC-re [77]. A tumor korábban jelentkezik, mint a sporadikus tumorok esetében, az átlagos életkor 44 év. A betegek 18 százalékában észlelhető szinkron tumor, míg negyedükben metakron daganat is kialakul. Szövettanilag gyakran mucinosusak vagy alacsonyan differenciáltak [78]. A betegségre jellemző a microsatellita instabilitás, a betegek adenomáiban, tumoraiban 80-90 százalékban megtalálható [79, 80]. A vastagbélben keletkező polypok egyébként nem különböznek a sporadikus colon polypoktól, de jellemzően korábban és nagyobb számban jelentkeznak, nagyobb méretűek. A nagyobb gyakorisággal megfigyelhető tubulovillosus, villosus szerkezet, a súlyosabb fokú dysplasia miatt hamarabb alakul ki tumoros elfajulás is [81, 82]. Az esetek nagy részében a daganat jellegzetesen a jobb colonfélre lokalizálódik.

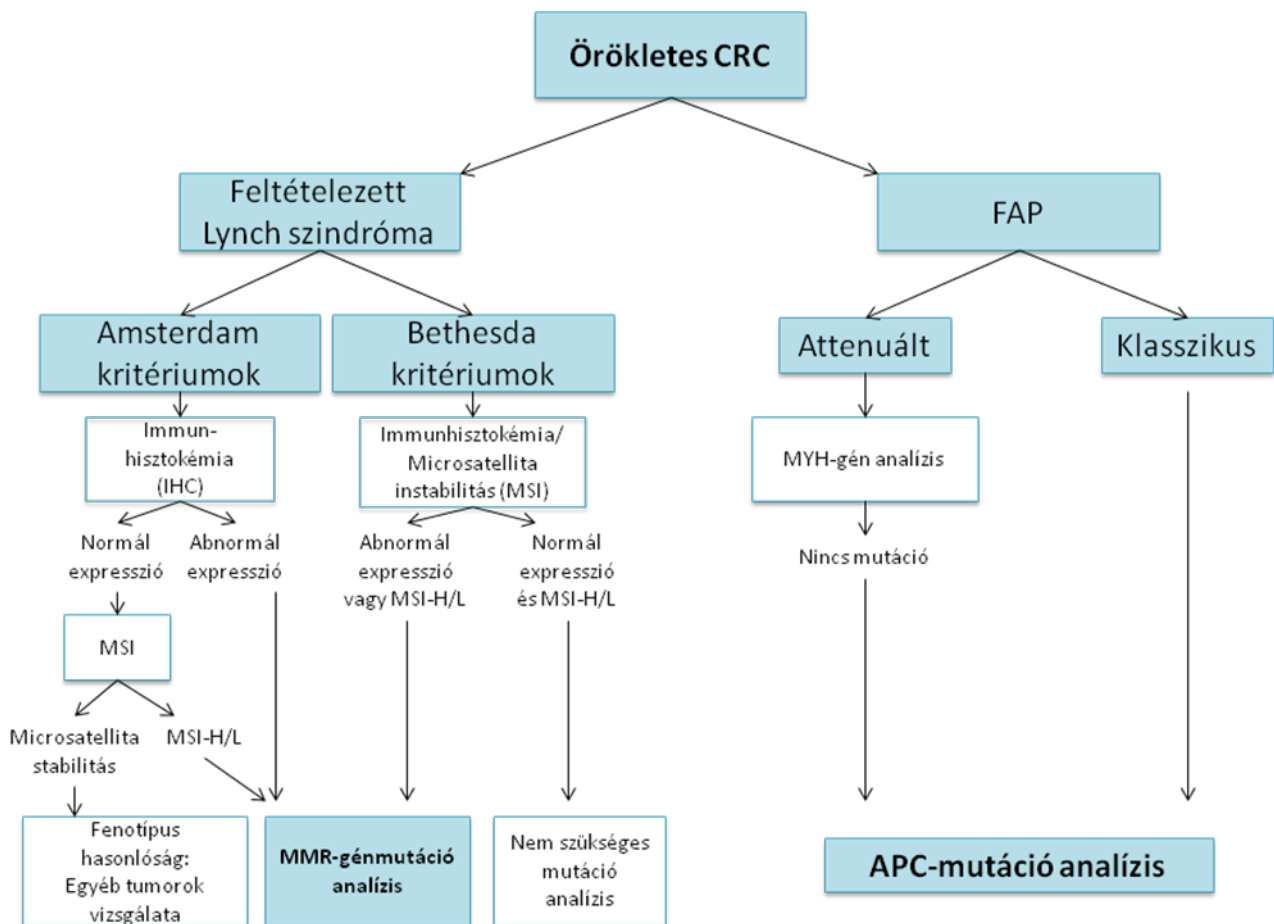
A HNPCC klinikai diagnózisát megkönnyítendő hozták létre egy klinikai feltételrendszert Amsterdam kritériumok néven. A kis létszámú családokat és az egyéb lokalizációjú daganatokat is figyelembe véve alkották meg a módosított Amsterdam és a Bethesda kritériumokat, amelyet később szintén revideáltak (2. táblázat). Ha a páciens megfelel az Amsterdam vagy a módosított Amsterdam kritériumoknak, az MMR gének immunhisztokémiai vizsgálatát (IHC) célszerű első lépésben elvégezni a tumorszöveten. Ha valamelyik javító funkciójú fehérje hiányzik, akkor ennek célzott genetikai vizsgálata következik. Ha nincs fehérje kiesés IHC-val, MSI vizsgálatot kell végezni, és ennek függvényében történnek a további lépések. A Bethesda és revideált Bethesda kritériumok alapján első lépésben MSI vizsgálat, majd ennek pozitivitása esetén IHC történik. Amennyiben a Lynch szindróma gyanúja komolyan felmerül, az MMR gének szekvenálása illetve további kiegészítő vizsgálatok történnek (nagyobb deléciók vizsgálata MLPA-val, hypermetiláció vizsgálata, TACSTD1 gén 3' végének analízise) [83-87] (1. ábra).

A metakron tumorok miatt a betegek követése, rendszeres kolonoszkópos vizsgálata nagyon fontos. Az endoszkópos szűrővizsgálat elvégzése, majd rendszeres ismétlése ezen betegek mellett a mutációt hordozó, de még tünetmentes családtagok esetében is indokolt, 20-25 éves kortól kezdve, a talált polypusok eltávolításával. Egy tanulmányban a rendszeresen (háromévente) végzett kolonoszkópia mellett a CRC rizikója és az általános mortalitás is mintegy 60 százalékkal csökkent [88]. Megelőzésképpen NSAID, nőknél hormonterápia jöhet szóba az endometrium és ovárium carcinoma megelőzésére, bár még nincs meggyőző adat ezek hatékonyságáról. Ezenkívül diéta, a dohányzás abbahagyása, a testmozgás gyakorlása ajánlható, de ezek hatásosságára sincs bizonyíték [89].

2. táblázat A HNPCC diagnosztikus kritériumai

Amsterdam kritériumok (1991)
Legalább három, colorectalis carcinomában szenvedő családtag, valamint az összes alábbi feltétel: <ul style="list-style-type: none">• A betegek közül legalább egy a másik kettő első fokú rokona• A CRC legalább két generációt érint• Legalább egy CRC 50 éves kor alatt került felismerésre.
Módosított Amsterdam kritériumok (1998)
Legalább három, colorectalis carcinomában vagy HNPCC asszociált tumorban (endometrium, vékonybél, ureter vagy vesetumor) szenvedő családtag, valamint az összes alábbi feltétel: <ul style="list-style-type: none">• A betegek közül legalább egy a másik kettő első fokú rokona• Legalább két generáció érintett• Legalább egy tumor 50 éves kor alatt került felismerésre• CRC esetében a familiáris adenomatosus polyposis kizárandó• A tumor patológiai vizsgálattal is igazolt.
Módosított Bethesda kritériumok (2003)
Az alábbi feltételek egyikének teljesülése esetén felmerül a HNPCC lehetősége és további vizsgálatok indokoltak: <ul style="list-style-type: none">• 50 év alatt diagnosztizált CRC• Szinkron/metakron CRC vagy más HNPCC asszociált tumor (gyomor, hólyag, ureter, vese, biliáris traktus, agy, vékonybél és sebaceousus bőrtumorok), kortól függetlenül• 60 éves kor alatt diagnosztizált CRC magas microsatellita instabilitással• CRC-s beteg, akinek legalább egy első fokú rokona CRC-ben vagy HNPCC asszociált tumorban szenved. A tumorok egyike 50 év alatt került felismerésre.• CRC-s beteg, akinek legalább két rokona CRC-ben vagy HNPCC asszociált tumorban szenved, kortól függetlenül.

(Vasen HF, Watson P, Mecklin JP et al. Gastroenterology 1999; 116:1453-1456. és Umar A, Boland CR, Terdiman JP et al. J Natl Cancer Inst. 2004; 96:261-268.alapján)



1. ábra Az örökletes CRC-k általános diagnosztikus algoritmus (Pineda et al, Mut Res 2010; 693:19-31. alapján)

3.1.3.2 Familiáris CRC X szindróma

Az évek során lezajlott nagy HNPCC-s tanulmányokból kiderült, hogy az Amsterdam kritériumoknak megfelelő családoknak csak kb. a felében fordult elő az MMR gének mutációja. Nem volt egyértelmű, hogy a mutáció-negatív családok is ugyanolyan magas kockázattal rendelkeznek-e CRC-re nézve, valamint más tumorok gyakorisága is hasonlóan magas-e náluk, mint az örökletes génmutációkat hordozókban, és ebből következően szükséges-e a fentebb említett szigorú szűrés.

Egy tanulmányban azt találták, hogy MMR géndefektus nélkül a CRC kockázata csak mintegy kétszeres, szemben a csírasejt mutációval rendelkező családokkal, és az átlag életkor is magasabb volt a tumor felismerésekor (61 vs. 49 év). Továbbá a megnövekedett rizikó csak CRC-re igazolódott, más tumorokat illetően nem volt szignifikáns. Ezek miatt javasolták, hogy a HNPCC elnevezés helyett a Lynch szindróma elnevezést használják a mutációt hordozó családokra, míg a géndefektustól mentes betegségekre a familiáris CRC X szindróma

terminust vezessék be [90]. Az „örökletes” szó kimaradt, mert a családi halmozódás önmagában nem elégséges ennek igazolására, ezt váltotta fel a „familiáris” jelző. Az „X” pedig az ismeretlen genetikai háttérre utal.

Genetikai eltéréseket keresve a Lynch szindrómától és a sporadikus CRC-től is eltérő molekulaprofilot találtak. Ennek jellegzetessége, hogy a carcinogenesisben részt vevő bizonyos jelátviteli útvonalak, egyes gének eltérései kisebb arányban mutathatóak ki familiáris CRC X szindrómában, mint egyik vagy mindkét másik kórképben (nuclearis β -catenin, CTNNB1-mutáció, TP53-mutáció, kromoszóma instabilitás) [91]. Tanulmányok sora állapított meg lényeges különbségeket a klinikai képben is. A familiáris CRC X szindróma idősebb korban, inkább a bal colonfelet érintve jelentkezik, nagyobb az adenomák aránya a már kialakult tumorhoz képest, azaz lassabb a carcinogenesis folyamata. Kevesebb a szinkron tumor, viszont nagyobb a mucinosus tumorok aránya. Az endometrium tumor rizikója nem szignifikánsan növekedett, más tumor kialakulásának a kockázata pedig egyáltalán nem emelkedett [92-95].

3.1.3.3 Muir-Torre szindróma

A Lynch szindróma egyik ritka változatának tartható, melyben – a családi anamnézistől függetlenül – legalább egy belső szervet érintő tumor (gyomor-bélrendszeri, vese-, ovárium-, endometrium vagy egyéb tumor) legalább egy faggyúmirigy neoplasticus betegségével (sebaceous adenoma, epithelioma vagy carcinoma) társul [96]. A faggyúmirigy elváltozása szembetűnő lehet, gyakran az arcon kezdődik. Ilyenkor belsőszervi tumor után is kutatni kell. A leggyakoribb ilyen tumorok közé tartoznak a colon neoplasiák, melyek általában a jobb colonfélben fordulnak elő. A második leggyakoribbak a genito-urinalis tumorok. A Muir-Torre szindróma ritka kórkép, eddig hozzávetőlegesen 200 esetet közöltek a világon, bár valószínűleg az érintett családok száma nagyobb ennél. Bár a legtöbb esetben a betegség nem mutat agresszív lefolyást, kb. 60%-ban alakul ki metastasis. Az autoszóm domináns öröklődésnek megfelelően mindkét nemben előfordul, enyhe férfi dominanciával (3:2 arányban). Az átlag életkor az első malignus daganat megjelenésekor 53 év (23-89). A legtöbb esetközlésben fejlett országokban élő fehér betegek szerepelnek. Ázsiai és afrikai betegekről gyakorlatilag nincs információ.

Az örökletes CRC-k vizsgálatában használatos microsatellita instabilitás és az MSH2, MLH1 expresszió immunhisztokémiai vizsgálata hasznos módszer a Muir-Torre szindróma kezdeti vizsgálataiban is. Ezzel, valamint a nagy kockázatú egyéneknél DNS-szekvenálást is alkalmazva a Muir-Torre szindrómás betegek nagy hányada felderíthető lenne. Az MMR

géndefektus többnyire az MSH2 gént érinti. Munkacsoportunk egy eset kapcsán a ritkábban érintett MLH1 génben mutatott ki mutációt (c.794G>C), mely felelőssé tehető a klinikai kép kialakulásáért [97].

3.1.3.4 Familiáris adenomatosus polyposis (FAP)

A FAP az összes CRC-s eset kb. 1%-át jelenti, incidenciája 1/10 000 [98]. Autoszóm domináns módon öröklődik, az APC gén mutációi felelősek a szindrómáért. Több variánsa ismert (Gardner szindróma, Turcot-szindróma, attenuált adenomatosus polyposis coli). A betegségre jellemző, hogy már a páciens korai életszakaszában több száz vagy akár ezer polyp alakul ki, emiatt igen nagy a CRC korai kialakulásának rizikója. Az átlagéletkor a polypok jelentkezésekor 16 év. A lokalizációt illetően a bal colonfél enyhe túlsúlya jellemző. A polyposis megnyilvánulhat hasmenés, vérzés vagy hasi fájdalom formájában, de a többség tünetmentes. Az egyes polypok endoszkópos és szövettani képe itt sem különbözik a sporadikus polypokétól, de a polypok nagy száma és korai megjelenése miatt kezelés nélkül szinte minden betegben bekövetkezik valamelyik polyp malignizálódása. Szűrés és kezelés nélkül a tumor jelentkezésekor az átlagéletkor 39 év, a várható élettartam 42 év [99]. A CRC nagy rizikója miatt az ismert FAP-os betegek és családtagjaik rendszeres szűrése és ellenőrzése javasolt. Ez évente történő szigmoidoszkópiából áll, mely a pubertáskorban kezdődik, és 35 éves korig tart. Ekkor, ha nincs polyp, elég 3 évente elvégezni a vizsgálatot [100]. Ha a szűrés során polypképződést észlelünk, szigmoidoszkópia helyett évente kolonoszkópia végzése, pozitív esetben polypectomia indokolt. Mivel polypok a gastrointestinalis traktus más részeiben is előfordulhatnak, gasztroszkópia rendszeres végzése is szükséges. A gyomorban, duodenumban előforduló polypok kevésbé malignizálódnak, de nagyszámú vagy méretű polypus esetén a vékonybél vizsgálata is indokolt lehet, leginkább kapszula endoszkópiával. Kezelésként profilaktikus colectomia javasolható felnőttkorban [101]. A NSAID sulindacról kimutatták, hogy 6-9 hónapig adva a FAP-os felnőttekben csökkenti a polypok számát 30-40 százalékkal, illetve a méretét 30-35 százalékkal [102]. Ez azonban nem elégséges a későbbi CRC rizikóját tekintve, ugyanis a terápia után a polypok ismét növekedésnek és gyarapodásnak indultak. Gyerekekben még ennyire sem hatásos, négy év után a kezdetben polypmentes egyéneknél a kialakult polypok számában, méretében nem volt különbség a placebóval összehasonlítva [103].

A FAP diagnózisa a klinikai kép alapján meglehetősen egyértelmű. A klasszikus és az attenuált forma elkülönítése is történhet ez alapján. Szemészeti vizsgálattal igazolható a retinealis pigment epithelium kongenitális hypertrophiája, ami jelzi, hogy az egyén örökölte a

FAP gént és polyposis rizikóval rendelkezik. Az eltérés megelőzi a polypok kialakulását, korrelál a FAP gén 9. és 15. exon mutációival. A genetikai diagnózist a FAP és a MUTYH gének szekvencia analízise adja meg (1. ábra).

3.2 A colorectalis daganatok kialakulásának patomechanizmusa

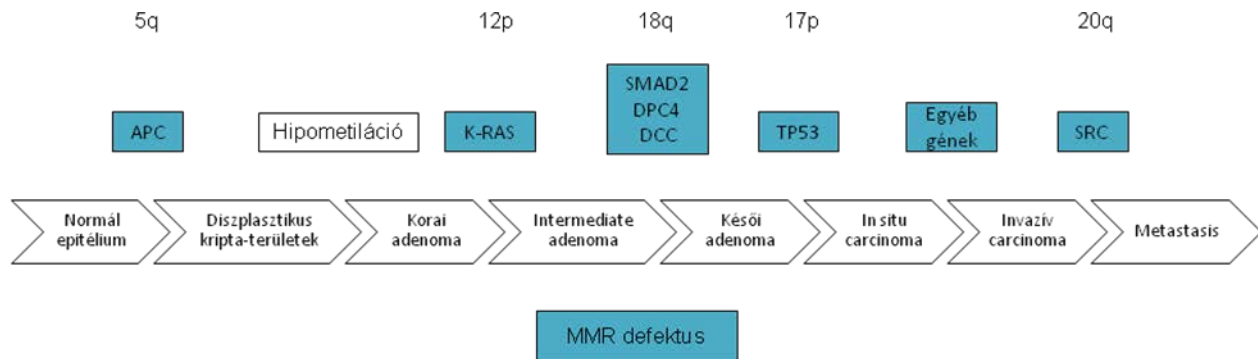
3.2.1 A „klasszikus” adenoma-carcinoma útvonal molekuláris mechanizmusa

A CRC kialakulásában kulcsfontosságú szerepet játszanak az egymás után kialakuló genetikai eltérések, melyek lehetnek öröklöttek vagy szerzettek. A mutáció növekedési előnyt biztosíthat az adott sejt utódainak. Ha egy második mutáció is kialakul ezen klonális populáción belül, az további előnyt jelenthet a növekedésben, végül újabb mutációk révén a proliferáció szabályozhatatlanná válik, kialakul a tumor, mely metastatizálhat is. A legtöbb CRC adenomából alakul ki, több lépésen keresztül. A normál nyálkahártyában a felszíni sejtek apoptózis révén a lumenbe lökődnek, majd folyamatosan pótlódnak. A kripták alján zajlik a proliferáció, ezt követően a sejtek fokozatosan haladnak a felszín felé, mialatt differenciálódnak. Ha ez a folyamat zavart szenved, adenoma, dysplasia, végül *in situ* carcinoma alakulhat ki. A carcinogenesis folyamata többlépcsős, melyben mindegyik lépés szelektív növekedési előnyt jelent a transzformálódó colon epitélisejteknek [104] (2. ábra).

A CRC kialakulásában korai eseményként feltételezik az APC (adenomatosus polyposis coli) gén mutációját az 5. kromoszómán. Mindkét allél mutációja kontrollálatlan sejtnövekedéshez, adenomatosus polypok kialakulásához vezet. Sporadikus tumorban ehhez mindkét allél szomatikus mutációja szükséges, míg FAP-ban az egyik kóros allél az érintett szülőtől származik, vagy új csírasejt mutáció eredménye. A másik funkcionáló allél kiesése korán, már a dysplastikus kripa sejtekben is kimutatható, ami az APC génnek a carcinogenesisben betöltött korai szerepét támasztja alá [105].

Ugyanabban a jeltovábbító kaszkádban (Wingless-féle jeltovábbító útvonal - Wnt), amelyikben az APC szerepel, vesz részt a béta-catenin is. A legtöbb sporadikus CRC-ben, amelyben normál APC gén van, mutációt mutattak ki a béta-cateninben [106, 107]. Feltételezik, hogy a legtöbb sporadikus CRC a Wnt útvonalat aktiváló mutációkkal kezdődik. A Wnt útvonal az evolúció folyamán konzervált jelátviteli mechanizmus, amely az embrió fejlődésében, és a colon epitél megújulásában is fontos szerepet játszik [107-109]. A normál APC fehérje megakadályozza a sejtben a béta-catenin felhalmozódását. Az APC vagy a béta-catenin gén mutációja következtében a sejtben a béta-catenin akkumulálódik a béta-catenin, mely megköti és aktiválja a T-sejt faktor 4-et (TCF-4) [110-112]. A béta-catenin/TCF-4 komplex a colon epitélisejtek differenciálódásával szemben a proliferáció irányába tolja el a hangsúlyt. A

Wnt útvonal aktivációja ezáltal a sejtek differenciálódását és apoptosist gátolva a sejtproliferáció felgyorsulását eredményezi [113].



2. ábra A CRC kialakulásának molekuláris mechanizmusai (Kinzler KW & Vogelstein B, Cell 1996; 87:159-170. alapján)

Az onkogének a sejtproliferációban és a sejtciklus szabályozásában vesznek részt. Mutációjuk révén a sejtosztódás szabályozhatatlanná válik a folyamatos génaktiváció miatt. A CRC kialakulásában több onkogén érintett (ras, src, c-myc, HER2/neu), de kiemelkedő szerepe a rasnak van [114-118]. Ennek három formája közül a K-ras érintett leggyakrabban CRC-ben [119-121]. Fontosságára jellemző, hogy ha kicserélik vagy eltávolítják a tumoros sejtekben a hibás ras gént, azok nem tudnak nude egerekben tumort képezni [122]. A ras onkogének a sejt jelátvitelében működnek közre a nucleusba irányuló növekedést stimuláló szignálok továbbításával. Normálisan ezek a fehérjék inaktív vagy aktív GDP-kötő állapotban vannak, míg pontmutáció következtében állandó GDP-kötő állapotba kerülnek, folyamatos proliferációt eredményezve. A kisebb adenomákban még nem mutatható ki a ras-mutáció, az egy cm-nél nagyobb adenomák és a sporadikus CRC-k 50 százalékában már igen [119, 123], ez arra utal, hogy az adenoma elfajulásának egy későbbi időpontjában következik be a mutáció [124]. Ez a genetikai eltérés gyakoribb a proximális tumorokban [125, 126], és szerepet játszhat a tumor progressziójában és az áttétképződésben is [127, 128].

Az onkogénekkal szemben a szuppresszor géneknek gátló hatásuk van a sejtosztódásra. Ha egy szuppresszor gén mindkét alállja mutálódik, a gátló hatás kiesik és fokozott proliferáció lesz a következmény. A 18. kromoszómán több szuppresszor gén

helyezkedik el, egyikük a „deleted in colon cancer” (DCC) gén. A gén terméke a sejt-sejt, sejt-intercelluláris mátrix kölcsönhatásban játszik szerepet, sok szövetben jelen van, így a normális colon epitélben is [129-131], de CRC-ben nem expresszálódik. Ha mutáció vagy deléció következtében kiesik a fehérje funkciója, rosszabb prognózisú a betegség lefolyása [132, 133]. A másik itt elhelyezkedő tumorszuppresszor gén a SMAD4, korábban „deleted in pancreatic cancer” – DPC4 gén [123]. A gén terméke a TGF- β által fémjelzett jelátviteli útvonal működésében létfontosságú. A TGF- β a legtöbb sejt növekedését gátolja, de a tumoros sejtek nagy részében ehhez a hatáshoz a SMAD4 is szükséges. A gén mutációi révén, melyek kimutathatók a sporadikus CRC-k egy hányadában [134-137], valamint juvenilis polyposisban csírasejt mutáció formájában, a gátló hatás nem érvényesül.

A 17. kromoszómán elhelyezkedő p53 tumorszuppresszor gén mindkét alléljének inaktivációja 50-70 százalékban fordul elő CRC-ben [123, 138-141]. Az allélek hiánya adenomákban általában nem mutatható ki, így a p53 fehérje funkciókiesése a tumorigenezis folyamatában viszonylag későn következik be [104, 123, 142]. Egy tanulmányban 3500 beteget vizsgálva a CRC stádiumával egyenes arányban nőtt a p53 mutációk gyakorisága [141]. A normál p53 fehérje a DNS-hez kötődve a proliferációt gátló géneket aktiválja, így a DNS javító mechanizmust segítve akár le is állíthatja a sejtciklust, ha DNS károsodást előidéző stresszhatás, pl. hypoxia éri a sejtet [143-145].

Az Src proto-oncogén terméke egy 60 kDa nagyságú, membránhoz kötött protein tirozin-kináz enzim (c-Src), mely a colon carcinomák 80%-ában overexpresszálódik és összefüggésbe hozható a CRC progressziójával, invazivitásával, metastasis képződésével és a csökkent túléléssel [146]. Alapvetően az NF-kB jelátviteli utat szabályozza vagy közvetlenül az I κ Ba (Y42) tirozin foszforilációján keresztül [147], vagy indirekt módon, köztes kináz útvonal (pl. Protein kináz C Alpha) stimulálásával [148].

3.2.2 A hibajavító (MMR) rendszer fehérjéinek kiesése

Ahogy korábban (3.1.3.1) a Lynch szindróma kapcsán részletesen tárgyaltuk, a tumor kialakulásának másik lehetséges útvonala a hibajavító MMR rendszer működésének sérülése. Ennek következtében genetikai hibák akumulálódhatnak a gyorsan proliferáló colon epitelsejtek fontos génjeiben, ami a sejtek malignus transzformációjához vezet (2. ábra).

3.3 A patogenezis szempontjából esetlegesen jelentős további faktorok

Szintén említettük már korábban, hogy a sporadikus CRC-s esetek 15 százalékában is megfigyelhető az MMR génexpresszió kiesése, amiért viszont nem mutáció, hanem az MMR gének promóter régiójának metilációja okolható [149, 150]. Lynch szindrómában, ahol a második, normál allélnak is inaktiválódni kell, hogy tumor fejlődjön ki, a normál allél ilyen epigenetikus inaktiválódása szintén szerepet játszhat [151]. A DNS metiláció elsősorban a sok gén promóter régiójában előforduló CpG dinukleotidokat érinti, melyekhez ezután methyl-CpG kötő fehérjék kapcsolódnak, megváltoztatva a kromatin struktúrát, így idézve elő gén expresszió csökkenést [152].

A peroxiszóma proliferáció aktivált receptor gén (PPAR) is részt vesz a carcinogenesis folyamatában. A PPAR gének olyan nukleáris receptorokat kódolnak, melyek a sejt szaporodásban és a lipidanyagcserében résztvevő fehérjéket szabályoznak. E receptorok aktiválódása gátolja a proliferációt és a differenciálódást segíti elő [153], és funkcióvesztést okozó mutációikat írták le sporadikus CRC-ben [154]. Akromegáliában a PPAR gének hibái okozhatják az adenomák és CRC megnövekedett gyakoriságát.

Számos adat támasztja alá a cyclooxygenase-inhibitorok védőhatását a CRC kialakulásában. Fentebb már szó esett a sulindac polyp regressziót okozó hatásáról FAP-os betegekben. Bár a mechanizmus nem tisztázott, a COX-2 szerepét feltételezik, amely túltermelődik a CRC sejtekben.

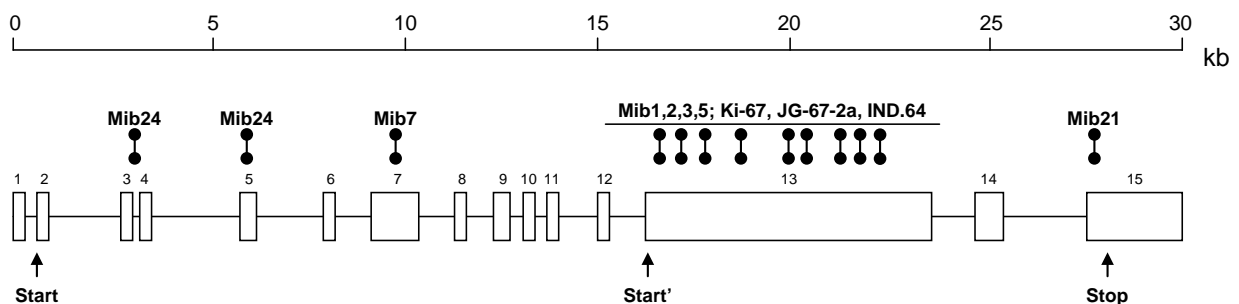
Nemrégiben kezdték el vizsgálni a Ki-67 fehérje esetleges szerepét a tumorgenezis folyamatában, melyet, mint proliferációs markert évek óta használnak a hisztopatológiában. Feltételezik, hogy genetikai módosulás révén hozzájárulhat a CRC kialakulásához. A JAK2 gén V617F mutációja konstans JAK2 aktivitást, állandó intracelluláris foszforilációt és sejtproliferációt eredményez, és hasonló az FLT3 gén belső tandem duplikációinak és a tirozin kináz domént érintő pontmutációknak is a hatása. Mindkét genetikai eltérés elsősorban malignus hematológiai betegségek kialakulásában játszik szerepet, sporadikus CRC-ben és tumoros sejtvonalakban nem voltak kimutathatók, de familiáris/örökletes CRC-ben még nem vizsgálták részletesen ezek jelentőségét.

3.3.1 A Ki-67 fehérje

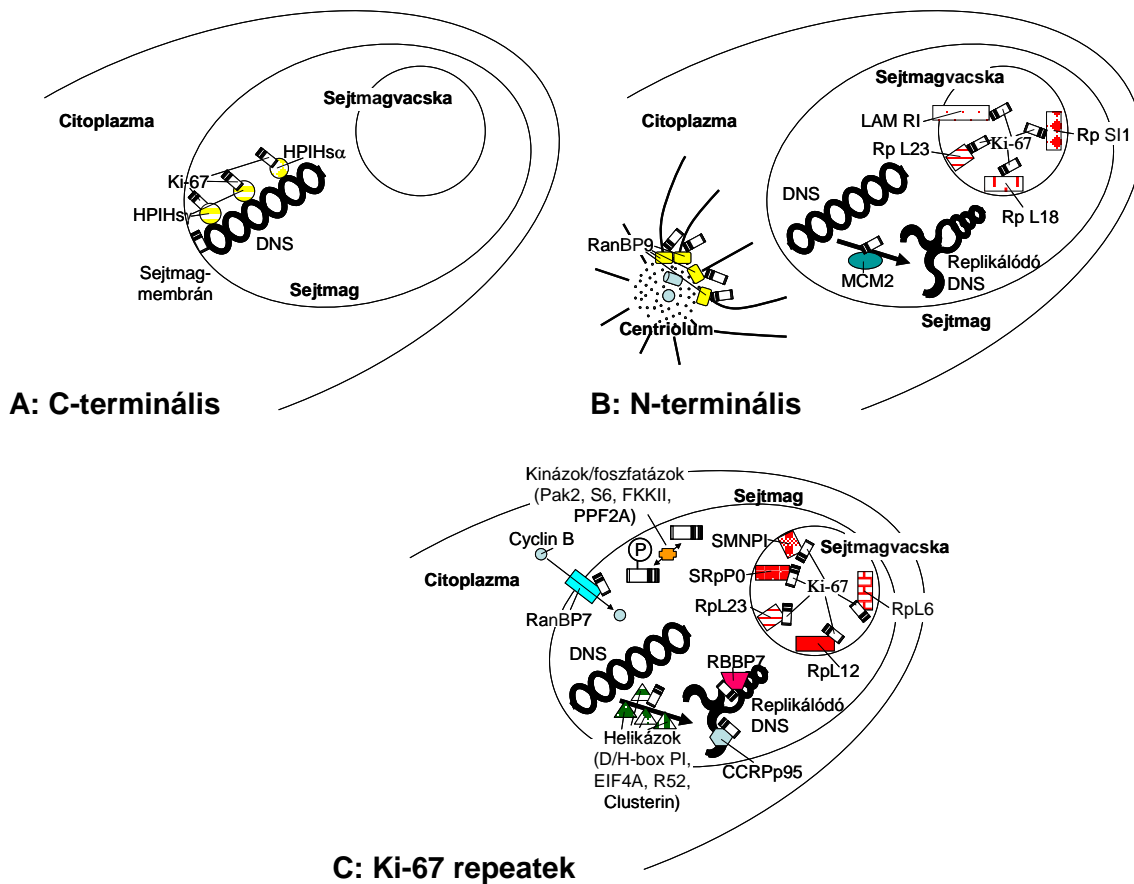
A Ki-67 antitestet már évtizedek óta használják a proliferáló sejtek arányának (Ki-67 index) meghatározására. Az antitest egy humán nukleáris antigénhez (Ki-67 fehérje) kötődik, amely minden proliferáló sejtben jelen van (G1, S, G2, M fázisban), de hiányzik a nyugvó sejtekből (G0 fázisban) [155]. A nagyszámú klinikai vizsgálat és közlemény

ellenére még mindig nem tisztázott a fehérje funkciója. Különösen az utóbbi néhány év kutatási eredményei alapján azonban már kezd körvonalazódni a feltételezett szerepe a sejtciklus szabályzásában. Felmerült, hogy mint potenciális onkogén a tumorgenezisben is szerepet játszhat. A fehérje felfedezése után gyorsan elterjedt a Ki-67 index használata, mint a proliferáló sejtek kimutatására szolgáló egyetlen pontosnak mondható módszer. Számos tanulmány foglalkozik a tumorok Ki-67 jelölésével és az ebből kikövetkeztethető prognosztikai értékkel.

Schlüter és munkatársai 1993-ban határozták meg a Ki-67 fehérje cDNS-ének szekvenciáját [156]. Számos szokatlan tulajdonsága van ennek a DNS-nek. A középpontban a nagy, 6845 bázispárnyi 13-as exon áll, mely 16 ismétlődő, 366 bázispárnyi szakaszt (Ki-67 repeat) tartalmaz, és ezek mindegyike egy erősen konzervált 66 bázispárnyi elemet, a Ki-67 motívumot hordozza. Ez utóbbit ismeri fel az eredeti anti-Ki-67 antitest. A Ki-67 fehérje szekvenciája egyedülálló, szignifikáns homológiát nem találtak más proteinnel. A kész Ki-67 fehérje a nucleusba kerül, erre utal a szekvenciában lévő 10 db lehetséges „sejtmagba irányító” szakasz. A fehérje szekvenciája lehetséges kináz funkcióra utal, és fogékony lehet proteázokra. A Ki-67 motívum minden komputerelemzés szerint alfa-helikális felépítésű, és töltött, valamint hidrofób aminosavak helyezkednek el egymással szemben a hélixben. Feltételezik, hogy ennek a szerkezetnek a membránhoz (pl. sejtmag membrán) való kötődésben van szerepe. Mivel a fehérje erősen pozitív töltésű, a DNS-hez könnyen kötődhet.



3. ábra A Ki-67 fehérje génjének felépítése A Ki-67 jelölésre használt antitestek felismerő helyei is láthatóak (Bubán T et al, Orv Hetil 2009; 150:1059-1070.)



4. ábra A Ki-67 fehérje egyes részeivel kölcsönhatásban lévő molekulák (Bubán T et al, Orv Hetil 2009; 150:1059-1070.)

A Ki-67-tel kölcsönhatásba lépő molekulák legrészletesebb leírása Schmidt és munkatársai nevéhez fűződik [157]. Egy gomba illetve egy emlős kettős-hibrid rendszert használva a Ki-67 fehérje izoláltan expresszált Ki-67 repeatjeihez, C- és N-terminális doménjeihez kötődő fehérjéket azonosítottak (4. ábra). A C-terminális rész esetében a heterokromatin fehérje I α és γ volt a két kölcsönható partner (4A ábra). Az N-terminális rész 4 különböző riboszómális fehérjével (Rp L18, L23, SI 1 és LAM RI), az MCM és a Ran-kötő fehérje 9-cel (RanBP9) asszociál. Az MCM az S-fázisba lépést és a DNS-replikációt kontrollálja, a RanBP9 a mikrotubulusok és a centroszóma kapcsolódását és funkcióját szabályozza (4B ábra). A Ki-67 repeatek nagyszámú fehérjével létesítenek kapcsolatot (4C ábra). Ezek közé riboszómális fehérjék, DNS helikázok, sejtciklus szabályzó fehérjék és szignalizációs molekulák tartoznak. A szerin/treonin kináz pak2, S6-kináz és a kazein kináz 2 valamint a protein-foszfataz 2A jelentős mértékben befolyásolhatják a fehérje foszforilációs állapotát. A RanBP7 (importin 7) a sejtmag membránon keresztüli transzport folyamatokban játszik jelentős szerepet, így a cyclin B transzportjában is. A 4 DNS helikáz jelenléte, pedig

azt jelzi, hogy a Ki-67 hozzájárulhat a kromoszómák dekonzenzációjához is. Mindezek alapján a Ki-67 biológiai funkciói rendkívül sokrétűek, melyeket a 3. táblázat foglal össze.

3. táblázat A Ki-67 fehérje legfontosabb biológiai hatásai

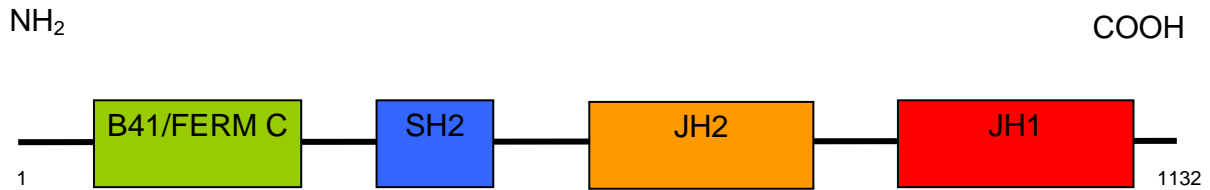
Kötődés a DNS-hez és nem-hisztin fehérjékhez – magasabb rendű kromatin struktúra kialakulásának és lebomlásának szabályozása
Lehetséges onkogén hatás
<p>Sejtciklus szabályozása</p> <ul style="list-style-type: none"> • elősegíti az S-fázisba lépést és a DNS-replikációt • szerepe van a kettőszálú DNS töréseinek javításában • elősegíti a cyclin B nukleáris transzportját, ami a G2-M átmenet és a mitózis beindulását indukálja • a Ki-67-asszociált DNS helikázok elősegítik a kondenzált kromoszómák „kibontását”, a kromoszómák struktúrájának átalakítását, a DNS magmembránhoz való kötődését • A Ki-67 riboszómális fehérjékkel való kölcsönhatása szerepet játszik a riboszómák működésének gyors helyreállításában

A Ki-67 fehérje, mint onkogén először 1996-ban Duchrow gondolatában vetődött fel [158]. Mivel a Ki-67 fehérje abszolút feltétele a sejtproliferációnak, a fehérje diszregulációja sejthalálhoz, az osztódás leállításához vagy túlstimuláláshoz vezethet. Nem lehet kizárni, hogy a Ki-67 fehérje egy potenciális onkogén, vagy, hogy involválva van az apoptózisban. Mint sok onkogén vagy proto-onkogén, pl. c-myc, bcl-2, c-abl, c-ets, a Ki-67 fehérje génje is a kromoszóma végéhez közel helyezkedik el (a 10. kromoszómán a q25-ter lokalizációban). Feltételezik, hogy a Ki-67 fehérje génje lehetséges célpontja a kromoszómális transzlokációnak, ami egyébként gyakran felelős malignus transzformációért. A gén feltételezett promóter régiója homológ a bcr (break point cluster) gén promóter régiójával, ami alátámasztja ezt a hipotézist.

3.3.2 A JAK2 gén V617F mutációja

A JAK2 egy a citoplazmában található protein tirozin-kináz, amely a hemopoetikus őssejtek proliferációját és differenciálódását befolyásoló citokinek (erythropoetin, granulocita kolóniastimuláló faktor, thrombopoetin, interleukin-3) szignalizációjában játszik fontos szerepet [159-162]. A JAK2 gén a 9. kromoszómán található, 25 exonból áll, és egy 1132 aminosavból felépülő, 130,7 kDa-os fehérjét kódol. A molekula két homológ kináz struktúrát

tartalmaz, a JH1 és a JH2 domént. A JH2 doménnak nincs kináz aktivitása („pseudokináz”) és gátolja a JH1 aktivitását. Az ún. FERM domén a citokin receptorokhoz, ill. a receptor protein tirozin-kinázokhoz való kötődésért felelős (5. ábra) [160-164].



5. ábra A JAK2 gén domén szerkezete (Nelson ME & Steensma DP, *Leukemia & Lymphoma* 2006; 47:177 – 194. alapján)

A JAK2 a citokin receptorokhoz kötődve autofoszforylálódik, aktiválódik és az intracelluláris jelátviteli elemek foszforylációját végzi. Ezek közül kiemelendő a STAT molekulák aktiválódása, melyek a sejtmagba jutva a regulatórikus DNS elemekhez kötődnek és a cél gén átíródását indukálják. A JAK/STAT szignalizációs útvonal jelentőségét a sejtosztódás és a sejttúlélés regulálása adja [162-164].

2005-ben a JAK2 génben találtak egy nagy klinikai jelentőséggel bíró mutációt, amit azóta elterjedten alkalmaznak a myeloproliferatív kórképek diagnosztikájában. A JAK2 gén 14. exonjában a JH1 domént gátló JH2 pseudokináz régióban kialakuló G1849T (V617F) mutáció a JH1 domén permanens aktiválódásához vezet. Ez a konstans JAK2 aktivitás állandó intracelluláris foszforylációt és sejtproliferációt eredményez, ami a malignus hematológiai betegségek kialakulásában játszik szerepet [160-165].

Irodalmi adatok alapján polycythaemia verában (65-97%), essentialis thrombocythaemiában (23-57%) és idiopátiás myelofibrosisban (35-57%) fordul elő leggyakrabban ez a génelterés. Krónikus myeloid leukaemiában nem volt kimutatható, ugyanakkor a ritkább krónikus myeloproliferatív kórképekben 0-33% között volt a gyakorisága. Akut myeloid leukaemiában 0-2% között, míg AML M7-ben 20% volt a mutációt hordozók aránya. Lymphoid leukaemiákban, másodlagos erythrocytosisban és az egészséges donorokban egyáltalán nem fordult elő ez a genetikai eltérés [160-167]. Sporadikus vastagbél daganat és vastagbél daganat eredetű sejtvonalak esetében sem sikerült igazolni a jelenlétét.

3.3.3 Az FLT3 gén belső tandem duplikációja (ITD) és tirozin-kináz domén (TKD) mutációja

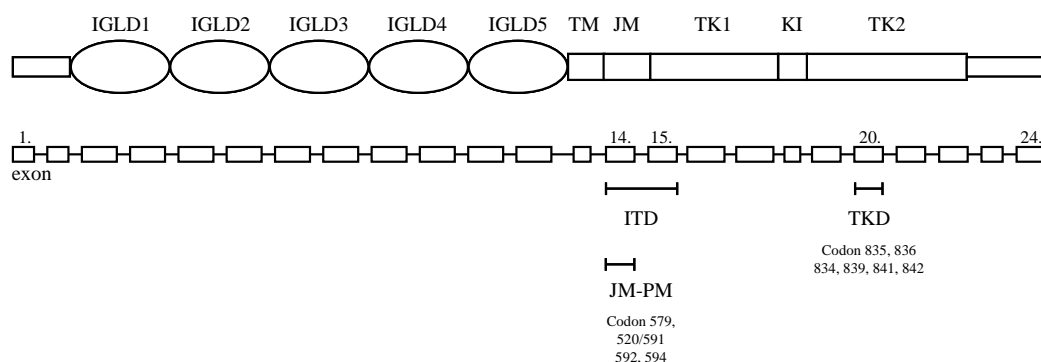
Az FLT3 egy a receptor tirozin-kináz csoportba tartozó protein-kináz. A receptor tirozin-kinázok transzmembrán fehérjék, amelyek ligandjukat megkötve megváltoztatják a konformációjukat, aktiválódnak és különböző sejten belüli jelátviteli utak több alkotóelemét foszforilálják. A III. alcsoportjukba tartozik az FLT3. Szerkezetére jellemző egy immunglobulinszerű extracelluláris rész, melynek a ligandkötésben van szerepe, egy rövid transzmembrán (TM), egy juxtamembrán (JM), egy specifikus tirozin-kináz rész valamint egy C-terminális domén. A kináz rész a kináz inzert domén (KI) által két részre (TK1 és TK2) oszlik (6. ábra). Az FLT3-at 1991-ben magzati egér májsejtekben, majd 1993-ban emberi sejtekben is kimutatták. Több elnevezés után végül az fms-like tyrosine kinase (FLT3) név terjedt el. A humán FLT3 gén a 13. kromoszómán helyezkedik el (13q12), 24 exonból áll, mérete kb. 100 kb, míg az általa kódolt fehérje 993 aminosavat tartalmaz. A szervezetben, a hemopoetikus progenitor sejtekben, a thymusban, a nyirokcsomóban, a májban, a placentában, a gonádokban, az agyban és a retinában található meg nagyobb mennyiségben, de kisebb koncentrációban a vastagbélben is kimutatható. A ligandja egy transzmembrán protein, ami számos sejt és szövet felszínén expresszálódik, melyek közül a legfontosabbak a csontvelői stromális fibroblastok. A ligand kötődése a receptor dimerképződéséhez és autofoszforilációjához vezet, ami a sejten belüli jelátviteli mechanizmusok aktiválása révén a hemopoetikus őssejtek proliferációját indukálja és apoptózisának gátlását eredményezi (7. ábra) [168].

Az FLT3 mutációk egyik nagy csoportját a juxtamembrán domént kódoló 14. és 15. exonok belső tandem duplikációi (internal tandem duplication - ITD) képezik. Eredetileg Nakao és munkatársai írták le 1996-ban [169]. Az ITD hossza 3 és 400 bázispár között, míg a pluszban beépült nukleotidok száma 3 és 36 bázispár között mozog. Mivel a leolvasás kereten belül marad, a képződő fehérje megőrzi kináz-funkcióját, csak éppen a tandem duplikáció méretétől függően hosszabb JM doménnel rendelkezik. A mutáció biológiai hatása a receptor ligand-független dimerizációja és aktivációja, mely proliferációt, illetve a myeloid sejtek differenciációjának és apoptózisának a gátlását eredményezi (7. ábra).

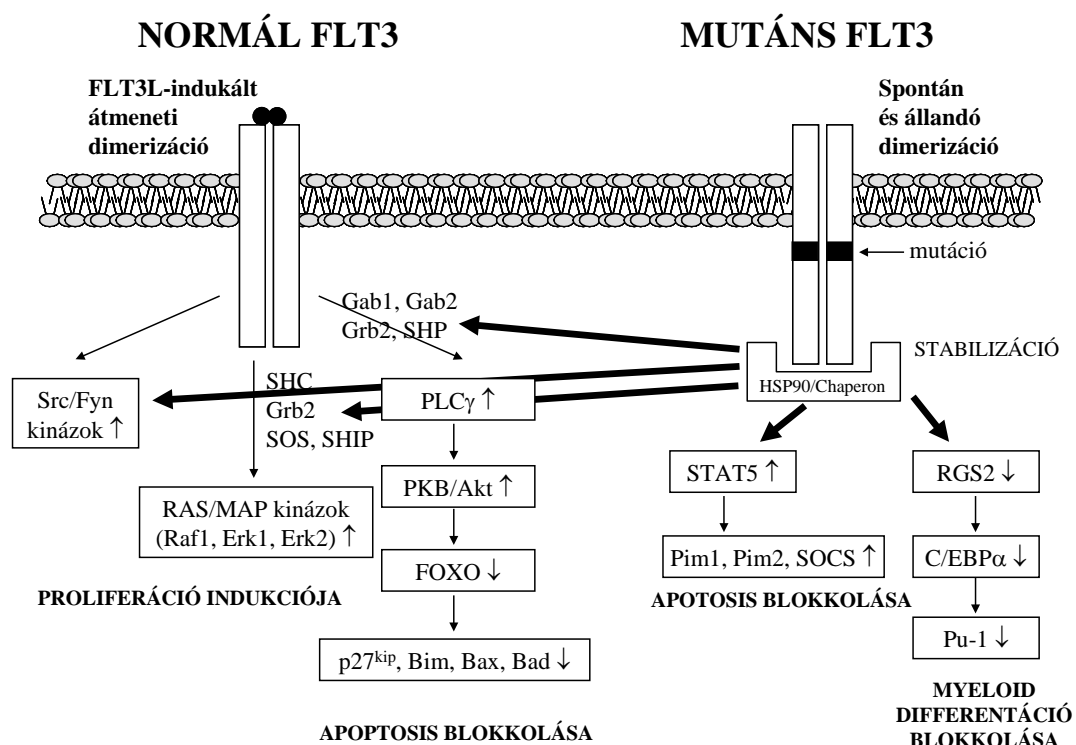
A mutációk másik nagy csoportja a tirozin-kináz domén (TKD) aktivációs hurkát érinti. Regulárisan az inaktív aktivációs hurok az enzim aktív zsebéhez kötődve megakadályozza az ATP és a szubsztrát kötődését a kinázhoz. Ligandkötődés esetén az aktivációs hurok foszforilálódik, aktiválódik, és a blokádnak megszűnik. Az itt kialakuló mutáció

szintén állandó kináz-aktivációt okoz [170]. Az esetek 85-90%-ban aminosav cserét eredményező (missense) mutáció fordul elő a 835. codonban.

Ezen mutációk tehát a tirozin-kináz spontán és állandó aktivációját, végső soron az AML-sejtek proliferációját és megnövekedett túlélését idézik elő. Ezenkívül olyan aberráns jelátviteli utakkal is összefüggésbe hozható a mutálódott FLT3, amelyek normál esetben nem aktiválódnak. Például a STAT5 aktivációja az apoptózis blokkolásához vezet, míg az RGS2 gén (és következményesen két myeloid transzkripciós faktor) gátlása a progenitor sejtek myeloid differenciálódását blokkolja. Összefüggés mutatható ki továbbá a HSP90 chaperon komplex-szel, mely stabilizálja a mutáns kináz szerkezetét és konstans aktivitását (7. ábra).



6. ábra Az FLT3 fehérje sematikus rajza és mutációinak lokalizációja (Kappelmayer et al, Curr Med Chem 2007; 14:519-30. alapján)



7. ábra Az FLT3 fehérje funkciói és kölcsönhatása más molekulákkal (Kappelmayer et al, Curr Med Chem 2007; 14:519-30. alapján)

4. Célkitűzés

Munkánk során alapvető célunk az, hogy örökletes és sporadikus CRC-ben szenvedő betegek daganataiban új genetikai eltéréseket azonosítsunk. Olyan fehérjék vizsgálatára helyezzük a hangsúlyt, melyek vagy a sejtosztódás szabályozásában töltenek be nélkülözhetetlen szerepet, vagy mutációik révén sejtproliferációt indukálnak. Így esett a választás a Ki-67 fehérje valamint a JAK2 és az FLT3 tirozinkinázok génjeire. Míg a Ki-67 számos ponton befolyásolja a sejtosztódást normál sejtekben is, addig a JAK2 és az FLT3 genetikai eltérései különböző myeloid malignómákban fordulnak elő nagyobb gyakorisággal. A JAK2 kivételével egyik gén mutációit sem tesztelték még sporadikus CRC-ben, míg egyik gén sem volt még vizsgálat tárgya örökletes vastagbél daganatokban.

Vizsgálatainkkal a következő kérdésekre keressük a választ:

- Kimutathatók-e a Ki-67 gén mutációi különböző tumoros sejtvonalakban illetve vastagbél-daganatokból izolált DNS mintákban?
- Az FLT3-ITD mutáció kimutatására leggyakrabban alkalmazott három különböző elektroforetikus módszer (agaróz és poliakrilamid gélelektroforézis valamint kapilláris elektroforézis) milyen analitikai paraméterekkel rendelkezik, és mennyire alkalmazható a rutin laboratóriumi diagnosztikában?
- Kimutathatók-e a JAK2 V617F, FLT3-ITD és -TKD mutációk vastagbél-daganatokból izolált DNS mintákban?

5. Betegek, anyagok és módszerek

5.1 A vizsgálatban résztvevő betegek jellemzői

A Ki-67, FLT3 és JAK2 mutációk vizsgálatához a DEOEC I. sz. Sebészeti Klinikáján operált 26 sporadikus CRC-ben szenvedő beteg (14 férfi, 12 nő; életkor: $65,4 \pm 12,5$ év) műtéti preparátumából származó mintát használtunk fel. A klinikai adatokat az Orvos- és Egészségtudományi Centrumban egységesen használt Medsolution programból gyűjtöttük ki. Az FLT3- és JAK2 mutációk vizsgálatát 38 olyan colontumoros beteg esetében is elvégeztük, akiknél az Amsterdam vagy a módosított Bethesda kritérium rendszer alapján a HNPCC gyanúja megalapozott volt. Ezeknél a betegeknél microsatellita instabilitás vizsgálat és 3 hibajavító fehérje (MLH1, MSH2, MSH6) immunhisztokémiai vizsgálata történt meg. A MSI meghatározása során 2 mononukleotid és 3 dinukleotid microsatellita amplifikálása történt meg fluoreszcensen jelölt primerekkel [171-173], majd a PCR termékek analízisét kapilláris elektroforézissel végeztük el ABI310-es készüléket használva. Amennyiben egy mintában magas microsatellita instabilitás és/vagy egy MMR fehérje kiesését észleltük, az MLH1 és MSH2 gének szekvencia analízisét végeztük el. Genetikai eltérést 6 beteg esetében tudunk kimutatni (Lynch szindróma; 4 férfi, 2 nő; életkor: $47,3 \pm 10,7$ év) és ezek az esetek korábbi publikációkban már bemutatásra kerültek [171-173]. A fennmaradó 32 beteget (15 férfi, 17 nő; életkor: $56,3 \pm 13,4$ év) a familiáris CRC X-típusba soroltuk. Mind a HNPCC-s, mind a sporadikus CRC-s betegeket a DEOEC Sebészeti Intézetében dolgozó Dr. Tanyi Miklós gondozta. A minták előkészítését és az immunhisztokémiai vizsgálatokat a DEOEC Patológiai Intézetében Dr. Tóth László végezte el. Az MSI vizsgálatok a DEOEC Laboratóriumi Medicina Intézetében történtek, míg az MLH1 és MSH2 gének mutáció analízisét/szekvenálását az Országos Onkológiai Intézetben Dr. Olasz Judit végezte. A vizsgálatokat a szükséges etikai engedélyek birtokában végeztük el.

Az FLT3 és a JAK2 gének mutációinak vizsgálatánál kontrollként 107 felnőtt akut myeloid leukémiás (AML; 47 férfi és 60 nő; életkor: $50,8 \pm 17,1$ év) és 99 polycythemia verás (PV; 55 férfi, 44 nő; életkor: $61,4 \pm 14,1$ év) beteg mintáját használtuk fel. Az AML és PV diagnózisát a WHO kritériumai alapján állították fel [174]. Ezeket a betegeket a DEOEC II. sz. Belgyógyászati Klinikáján dolgozó Dr. Batár Péter és Prof. Dr. Udvardy Miklós illetve a Nyíregyházi Jósa András Kórház Hematológiai Osztályán dolgozó Dr. Szerafin László gondozta.

5.2 Az alkalmazott sejtvonalak

A daganatos sejtvonalakban végzett Ki-67 génmutáció kereséshez négy sejtvonalat használtunk fel. Egy cervixcarcinoma (HeLa), egy tüdőcarcinoma (A549) és két coloncarcinoma (CXF94, SW480) tumoros sejtvonalat vizsgáltunk, melyek az American Type Culture Collection-től származnak (ATCC, Rockville, MD, USA). A sejteket a Dulbecco-féle módosított Eagle tápoldatban (Gibco-BRL, Berlin, Germany) tenyésztettük standard feltételek mellett. A tápoldatot 10%-os magzati borjú szérummal (Gibco-BRL) és antibiotikumokkal egészítettük ki.

5.3 RNS, DNS izolálás

A tumoros sejtvonallal kapcsolatos munkánk során 5×10^6 számú sejtől TRIzol™ Reagens (Gibco BRL) segítségével történt az RNS kivonása.

A sporadikus és örökletes CRC-s betegek esetében a Ki-67, FLT3 és JAK2 mutációk vizsgálatához formalinnal fixált, paraffinos metszetekből történt a DNS izolálás. Az 5-10 µm vastagságú (2-3 db) paraffinos metszetet melegítéssel (65°C, 10 perc) és xylollal (2x15 perc) deparaffináltuk, majd leszálló alkohol sorral (100%, 2x10 perc; 96%, 2x10 perc; 70%, 2x10 perc) a metszet rehidrálása következett. Ezután 20 µl Proteináz K-val emésztettük a preparátumokat (56°C, 16-18 óra) majd a „QIamp DNA mini kit” izoláló kit Tissue protokollját (QIAGEN) alkalmaztuk.

Az AML-es betegek esetében az FLT3 gén mutációinak vizsgálatához teljes vérből, míg a PV-s betegek esetében a JAK2 gén mutációjának vizsgálatakor Ficoll-szeparálást követően a granulocytarétegből végeztük el a DNS izolálást a „QIamp DNA Blood mini kit” izoláló kit (QIAGEN) segítségével.

A DNS- és RNS-minták koncentrációját és tisztaságát fotométerrel (GeneQuant vagy NanoDrop) határoztuk meg.

5.4 A Ki-67 gén cDNS-ének szekvenálása klónozással

A sejtvonalakból kivont RNS-t (5 µg) a Murine Reverse Transcriptase enzim (Ready-To-Go®, Amersham-Pharmacia, Piscataway, NJ, USA) és 100 pmol pd(T)₁₂₋₁₈ (Amersham-Pharmacia) felhasználásával írtuk át cDNS-sé. A Ki-67 gén exonjainak amplifikációjához szükséges primerek és egyéb összetevők és a PCR körülmények a 4. táblázatban láthatók. A PCR termékeket 1%-os agaróz gélen elektroforézissel választottuk szét és ethidium bromid jelöléssel UV lámpa alatt tettük láthatóvá. A PCR termékeket vagy a gélből kimetszve

tisztítottuk a Prep-A-Bene[®] DNA Purification System (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) segítségével, vagy közvetlenül a PCR csövekből vettük a mintát és az E.Z.N.A.[®] Cycle Pure Kit-et használtuk (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany). A tisztított PCR termékeket pCR[®]II-Blunt-TOPO[®] vektorba (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) építettük be, majd TOP 10 One Shot[®] kompetens *E. coli* baktériumokban sokszoroztuk fel. Kanamycin tartalmú agar táptalajon szelektáltuk a klónokat, majd „QIAGEN Plasmid Maxi Kit” (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) segítségével izoláltuk a plasmidokat. Minden sejtvonal esetében három klónt vizsgáltunk, legalább kétszer.

A plasmid DNS szekvenálása a Thermosequenase Kit (Amersham Pharmacia) és M13 szekvenáló primerek (forward 5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3' és reverse 5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3') segítségével történt az alábbi körülmények között: 12 ciklus 15 másodpercig 95, 55, és 70°C-on, majd 13 ciklus 20 másodpercig 95, 55 és 70°C-on. A DNS szekvenáláshoz automatizált szekvenáló készüléket használtunk (Model 4200, LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA). A kapott szekvenciát a Ki-67 cDNS-t leíró eredeti publikációban közölt [156] illetve az Ensembl génbankban található Ki-67 cDNS referencia szekvenciával vetettük össze.

5.5 A Ki-67 c.1300delC mutáció vizsgálata primer CRC mintákban szekvenálással

Az alkalmazott primerek

Ki-67 delC1: 5'-GTG AAT CTG GGT AAA AGT GA-3'

Ki-67 delC2: 5'-CTG AAA GAA TGA AGG TCT CA-3'

A PCR mix összemérése

Ki-67 delC1 (10 pmol/μl):	1,0 μl
Ki-67 delC2 (10 pmol/μl):	1,0 μl
10x puffer (no MgCl ₂):	2,5 μl
dNTP (100 mM):	0,2 μl
MgCl ₂ (25 mM):	2,0 μl
d.H ₂ O:	16,2 μl
AmpliTaq Gold:	0,1 μl
Összesen:	23,0 μl
$\Sigma=25 \mu\text{l}=23 \mu\text{l PCR mix} + 2 \mu\text{l gDNS (0,05 } \mu\text{g}/\mu\text{l)}$	

Az alkalmazott PCR körülményei

94°C - 12 perc	ciklusszám: 1
94°C - 30 sec	} ciklusszám: 40
55°C - 30 sec	
72°C - 30 sec	
72°C - 10 perc	ciklusszám: 1
4°C	folyamatos

4. táblázat PCR primerek és egyéb körülmények a Ki-67 fehérje különböző exonjainak PCR amplifikációjához

Amplifikált exon	Forward primer	Reverse primer	PCR körülmények	Termék hosszúsága (bp)
1-12. exon (7. exon nélkül)	5'-TAT ACA TAT GAT GTG GCC CAC GAG ACG-3'	5'-TAT AGG ATC CTA CGT TTC CAT TTT CTC TAA TAC AC-3'	^a 10 ciklus: 94°C – 2 min. 65°C – 2 min. (-1,5°C/ciklus) 72°C – 5 min.	1400
7. exon	5'-ATA TGA ATT CCA CCA TGG AGA AAG CTC AAG ATT CCA-3'	5'-ATA TGG ATC CTC AAA TGG AAT CAC CAA AGT TGT TGA-3'	45 ciklus: 94°C – 2 min. 55°C – 2 min. 72°C – 5 min.	1070
Repeatek 13. exon (1-3 repeat)	5'-TAT ACC GCG GCA CCA TGG AGC CCG TGT AAC TGG AAT-3'	5'-ATA TGG ATC CTC ATT TGC GCT TTT TCT TGT CTT CTA-3'	^b 35 ciklus: 94°C – 1 min. 50°C – 1 min. 72°C – 2 min.	1000
14-15. exon	5'-TAT AGA ATT CGC TGC TGA TAG CTT AAG CG-3'	5'-TAT AGG ATC CAT ATC TTC ACT GTC CCT ATG ACT TCT GGT-3'		900

^a A PCR Primus 96 Plus Thermocycler (MWG Biotech AG, Ebersberg, Germany) készüléken történt, 1 µl cDNS-t, 0,5 µl dNTP-t (100 mM), 2,5 µl forward és reverse primert (20 mM), 0,5 µl Pfu DNS Polymerase-t (1,5 U) és 5 µl Pfu DNS Polymerase 10x Puffer-t (Promega Corp., Madison, WI, USA) tartalmazó 50 µl reakció-térfogatban az exon 1-12 és az exon 7 esetében.

^b Az exon 13 és exon 14-15 esetében 5 µl 10x ProofStart PCR Puffert és 1 µl ProofStart DNS Polymerase-t (2,5 U) (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) és a fent említett anyagokat ugyanabban a koncentrációban használtuk 50 µl reakció-térfogatban. A β₂-microglobulin cDNS-ét használtuk kontroll templákként.

A PCR terméket agaróz elektroforézis segítségével tettük láthatóvá. 3%-os TBE-agaróz gélt készítettünk. A géltre 10 µl PCR terméket vittünk fel, melyhez 1 µl 10x-es loading dye festéket adtunk. A mintákat 90V feszültségen kb. 1,5 óráig futtattuk, és ethidium bromid jelöléssel UV lámpa alatt tettük láthatóvá. Sikeres PCR esetében a termék mérete 437 bp.

A PCR termék tisztítása

A PCR termék tisztítására Microcon ultrafiltrációs oszlopot (Amicon® Ultra – 0,5 ml, 30K; Millipore, Carrigtowhill, Ireland) használtunk, mellyel a feleslegben maradt reakció komponenseket távolítottuk el. A tisztítás után kb. 5-7 µl tisztított PCR termék állt rendelkezésünkre, melyhez 25 µl sterilizált desztillált vizet adtunk.

A szekvenáló PCR reakció összeállítása

A szekvenáláshoz az Applied Biosystems BigDye Terminator (v. 3.1) kitjét használtuk.
8,0 µl tisztított PCR termék
4,0 µl TRR 3.1 (Applied Biosystem)
4,0 µl TRR puffer (5x)
4,0 µl primer

A szekvenáló PCR kondíciói

96°C-on: 30 sec
50°C-on: 15 sec
60°C-on: 4 min
A ciklusszám: 25

A szekvenáló elegy összterfogata: 20 µl

A szekvenáló PCR termékének tisztítása

A be nem épült dezoxi- és didezoxi-nukleotidok eltávolítására a QIAGEN DyEx Spin Kit-jét használtuk. A megtisztított terméket vákumcentrifugában (Savant SpeedVac SC100 készülékben) szárítottuk teljes beszáradásig (kb. 30 perc). Ezután 15 µl formamidot (Applied Biosystems, Hi-Di™ Formamide) mértünk a beszáradt mintákra, és szekvenálásig ebben a formában -20°C-on tároltuk azokat. A formamidban lévő mintákat közvetlenül szekvenálás előtt denaturáltuk. A mintákat 3 percig 95°C-on inkubáltuk, majd azonnal jég közé raktuk és minimum 5 percig jégben tartottuk.

A minták mérése, szekvenálás

A szekvenálás ABI Prism 310 Genetic Analyzer készülékkel történt. A mérés során Pop-6™ (Performance Optimized Polymer 6; Applied Biosystems) géllal dolgoztunk. A szekvenálást 47 cm-es (50 µm átmérőjű) kapillárisal (Applied Biosystems) 10 másodperces injektálási idővel végeztük. Egy minta detektálását az analizátor 15.0 kV-os feszültség mellett

36 percig végezte. Az adatgyűjtés és analízis a „ABI Prism™ Collection and Sequencing Analysis” 3.4.1 software segítségével történt.

5.6 Az FLT3 tirozin kináz domén (TKD) mutáció kimutatása PCR+RFLP-vel

Az alkalmazott primerek

FLT33-20F: 5'-CCG CCA GGA ACG TGC TTG-3'

FLT34-20R: 5'-GCA GCC TCA CAT TGC CCC-3'

A PCR mix összemérése

FLT33-20F primer, (cc.:10 pmol/μl)	0,5 μl
FLT34-20R primer, (cc.:10 pmol/μl)	0,5 μl
dNTP (100 mM)	0,1 μl
10x PCR Gold Buffer (no MgCl ₂)	2,5 μl
MgCl ₂ (25 mM)	2,0 μl
dH ₂ O	14,2 μl
Ampli Taq Gold	0,2 μl
gDNS (cc.: 0,1 μg/μl)	5,0 μl

Σ=25 μl=20 μl PCR mix + 5 μl gDNS

Az alkalmazott PCR körülményei

94°C - 12 perc	ciklusszám: 1
94°C - 30 sec	} ciklusszám: 40
65°C - 30 sec	
72°C - 30 sec	
72°C - 10 perc	ciklusszám: 1
4°C	folyamatos

Emésztés - a reakció összeállítása

5 μl PCR termék
0,25 μl EcoR V enzim (New England Biolabs)
1,5 μl NEB 3 Puffer
0,15 μl BSA 100x
8,1 μl dH ₂ O

Σ=15 μl=10 μl emésztő mix + 5 μl PCR termék
A mixet 16 órán át emésztettük 37°C-on.

Az emésztetlen és emésztett PCR termékeket agaróz gélelektroforézis segítségével tettük láthatóvá. 3%-os TBE-agaróz gélt készítettünk. A géltre 10 μl terméket vittünk fel, melyhez 1 μl 10x-es loading dye festéket adtunk. A mintákat 90V feszültségen kb. 1,5 óráig futtattuk és ethidium bromid jelöléssel UV lámpa alatt tettük láthatóvá. A vad típusú allél jelenléte esetén a 114 bp nagyságú PCR termék az emésztés során 68 és 46 bp nagyságú termékekre hasad. Az enzim hasítási helye elvész mutáció jelenléte esetén, így ekkor egy 114 bp nagyságú termék is megjelenik a hasított termékek mellett.

5.7 Az FLT3 internal tandem duplication (ITD) kimutatása PCR és agaróz- illetve poliakrilamid gélelektroforézis segítségével

Az alkalmazott primerek

FLT314F forward: 5'-GCA-ATT-TAG-GTA-TGA-AAG-CCA-GC-3'

FLT315R reverse: 5'-CTT-TCA-GCA-TTT-TGA-CGG-CAA-CC-3'

A PCR mix összemérése

FLT314F primer (1 pmol/μl)	0,5 μl	<i>Az alkalmazott PCR körülményei</i>		
FLT315R primer (1 pmol/μl)	0,5 μl	94°C	12,0 perc	ciklusszám: 1
AmpliTaq Gold puffer (no MgCl ₂)	2,5 μl	94°C	30 sec	} ciklusszám: 35
MgCl ₂ (25 mM)	2,0 μl	56°C	1,0 perc	
dNTP (100 mM)	0,1 μl	72°C	2,0 perc	
Steril desztillált víz	14,2 μl	72°C	10,0 perc	ciklusszám: 1
AmpliTaq Gold polymerase enzim	0,2 μl	4°C-on		folyamatos
Összesen:	<u>20,0 μl</u>			

20,0 μl reakcióelegyhez 5,0 μl DNS-t (0,05 μg/μl) adtunk.

A PCR terméket agaróz illetve poliakrilamid gélelektroforézis segítségével tettük láthatóvá. 3%-os TBE-agaróz illetve 6%-os poliakrilamid gélt készítettünk. A géltre 10 μl PCR terméket vittünk fel, melyhez 1 μl 10x-es loading dye festéket adtunk. A mintákat 90V feszültségen kb. 1,5 óráig futtattuk és ethidium bromid jelöléssel UV lámpa alatt tettük láthatóvá. A vad típusú allél jelenléte esetén egy 331 bp-os termék, míg mutáns allél esetén egy ennél nagyobb méretű sáv is látható az elektroforetogrammon.

5.8 Az FLT3 internal tandem duplication (ITD) kimutatása fragmentanalízissel és szekvenálással

Az alkalmazott primerek

FLT314F forward: 5'-6 FAM-GCA-ATT-TAG-GTA-TGA-AAG-CCA-GC-3'

FLT315R reverse: 5'-CTT-TCA-GCA-TTT-TGA-CGG-CAA-CC-3'

A PCR mix összemérése

FLT314F primer (1 pmol/μl)	0,5 μl	94°C	12,0 perc	ciklusszám: 1
FLT315R primer (1 pmol/μl)	0,5 μl	94°C	30 sec	} ciklusszám: 35
AmpliTaq Gold puffer (no MgCl ₂)	2,5 μl	56°C	1,0 perc	
MgCl ₂ (25 mM)	10,0 μl	72°C	2,0 perc	
dNTP (100 mM)	0,1 μl	72°C	30,0 perc	ciklusszám: 1
Steril desztillált víz	9,2 μl	4°C-on		folyamatos
AmpliTaq Gold polymerase enzim	0,2 μl			
Összesen:	<u>23,0 μl</u>			

23,0 μl reakcióelegyhez 2,0 μl DNS-t (0,05 μg/μl) adtunk.

Az alkalmazott PCR körülményei

94°C	12,0 perc	ciklusszám: 1
94°C	30 sec	} ciklusszám: 35
56°C	1,0 perc	
72°C	2,0 perc	
72°C	30,0 perc	ciklusszám: 1
4°C-on		folyamatos

A Fragmentanalízis mix elkészítése

1,0 μl PCR termék (8x-ra hígítva desztillált vízzel)
0,5 μl ROX 500 méret standard (2x-re hígítva desztillált vízzel)
13,5 μl formamid
Összesen: 15,0 μl

A formamidba felvett mintákat 2 percig 95°C-on inkubáltuk, majd jég között tartottuk legkevesebb 5 percig. Analízisig -20°C-on tároltuk.

Fragmentanalízis

A denaturált mixek analízise az ABI310 kapilláris elektroforézis készülékkel (Applied Biosystems) történt. A mérést/adatgyűjtést a GeneScan (Applied Biosystems), az analízist a GeneScan illetve a PeakScanner szoftverek (Applied Biosystems) segítségével végeztük el. Az alkalmazott kapilláris 47 cm hosszú, az elektroforézis POP6 polimerben (Applied Biosystems) zajlott, 60°C-on, 15 kV-os feszültségen, 10 másodperces injektálással (2 kV) és 60 perces adatgyűjtéssel. A spektrális kalibrálás a Fluorescent Amidite Matrix Standard Kit D (Applied Biosystems), segítségével történt.

A vad típusú allél jelenléte esetén egy 331 bp-os termék, míg mutáns allél esetén egy ennél nagyobb méretű csúcs is látható az elektroforetogrammon.

Szekvenálás

Az FLT3-ITD pozitív minták közül 10 esetében direkt szekvenálást is végeztünk az 5.5. pontban leírtaknak megfelelően.

5.9 A JAK2 gén V617F mutációjának kimutatása PCR+RFLP-vel

Az alkalmazott PCR primerei

JAK23 reverse: 5'-TGAATAGTCCTACAGTGTTTTTCAGTTTCA-3'

JAK25 forward: 5'-ATCTATAGTCATGCTGAAAGTAGGAGAAAG-3'

A PCR mix összemérése

JAK23 primer (cc.: 10 pmol/μl)	2,4 μl
JAK25 primer (cc.: 10 pmol/μl)	2,4 μl
dNTP (cc: 100 mM)	0,2 μl
10x PCR Gold Buffer (15 mM MgCl ₂)	2,5 μl
steril dH ₂ O	15,4 μl
Ampli Taq Gold	0,1 μl
gDNS (cc.: 0,05 μg/μl)	2,0 μl

Σ=25 μl=23 μl PCR mix + 2 μl gDNS

Az alkalmazott PCR körülményei

94°C	12 perc	ciklusszám: 1
94°C	1 perc	} ciklusszám: 36
58°C	1 perc	
72°C	1 perc	
72°C	10 perc	ciklusszám: 1
4°C		folyamatos

Emésztés - a reakció összeállítása

5 μl PCR termék
 0,2 μl BSA X I enzim (New England Biolabs)
 1,5 μl NEB 4 Puffer
 8,3 μl dH₂O

Σ=15 μl=10 μl emésztő mix + 5 μl PCR termék
 A mixet 16 órán át emésztettük 37°C-on.

Az emésztetlen és emésztett PCR termékeket agaróz gélelektroforézis segítségével tettük láthatóvá. 3%-os TBE-agaróz gélét készítettünk. A gélre 10 µl terméket vittünk fel, melyhez 1 µl 10x-es loading dye festéket adtunk. A mintákat 90V feszültségen kb. 1,5 óráig futtattuk és ethidium bromid jelöléssel UV lámpa alatt tettük láthatóvá. A vad típusú allél jelenléte esetén egy 174 bp-os és egy 160 bp-os termék, a mutáns allél esetében pedig egy 364 bp-os termék látható.

5.10 Microsatellita instabilitás vizsgálata

Az MSI vizsgálat során 3 dinukleotid és 2 mononukleotid microsatellita stabilitását vizsgáltuk meg PCR és CE segítségével. Ezek legfontosabb jellemzői:

<i>MS</i>	<i>kr. lokalizáció</i>	<i>közeli gén</i>	<i>méret (bp)</i>	<i>jelzés</i>
D2S123	2p16	hMSH2	211	FAM
D5S346	5q21-5q22	APC	125	FAM
D17S250	17q11.2-17q12	BRCA1	152	NED
BAT-25	4q21	c-kit	124	HEX
BAT-26	2p16	hMSH2	122	NED

Az alkalmazott primerek

d2s123	HNPC1	5'-FAM-AAA CAG GAT GCC TGC CTT TA-3'
	HNPC2	5'-GGA CTT TCC ACC TAT GGG AC-3'
d5s346	HNPC3	5'-FAM-ACT CAC TCT AGT GAT AAA TCG GG-3'
	HNPC4	5'-AGC AGA TAA GAC AGT ATT ACT AGT T-3'
d17s250	HNPC5	5'-NED-GGA AGA ATC AAA TAG ACA AT-3'
	HNPC6	5'-GCT GGC CAT ATA TAT ATT TAA ACC-3'
Bat-25	HNPC7	5'-HEX-TCG CCT CCA AGA ATG TAA GT-3'
	HNPC8	5'-TCT GCA TTT TAA CTA TGG CTC-3'
Bat-26	HNPC9	5'-NED-TGA CTA CTT TTG ACT TCA GCC-3'
	HNPC10	5'-AAC CAT TCA ACA TTT TTA ACC C-3'

A PCR mixek összemérése:

Mix 1 - d2s123

primer 1 (10 pmol/µl)	0,1 µl
primer 2 (10 pmol/µl)	0,1 µl
PCR puffer (MgCl ₂ nélkül)	1,5 µl
dNTP (100 mM)	0,1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,0 µl
dH ₂ O	10,1 µl
Összesen:	12,9 µl

Mix 2 - d5s346

primer 3 (10 pmol/µl)	0,04 µl
primer 4 (10 pmol/µl)	0,04 µl
PCR puffer (MgCl ₂ nélkül)	1,5 µl
dNTP (100 mM)	0,1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,0 µl
dH ₂ O	9,22 µl
Összesen:	12,9 µl

Mix 3 - d17s250

primer 5 (10 pmol/μl)	0,41 μl
primer 6 (10 pmol/μl)	0,41 μl
PCR puffer (MgCl ₂ nélkül)	1,5 μl
dNTP (100 mM)	0,1 μl
MgCl ₂ (25 mM)	1,0 μl
dH ₂ O	9,48 μl
Összesen :	12,9 μl

Mix 4 - Bat25

primer 7 (10 pmol/μl)	0,09 μl
primer 8 (10 pmol/μl)	0,09 μl
PCR puffer (MgCl ₂ nélkül)	1,5 μl
dNTP (100 mM)	0,1 μl
MgCl ₂ (25 mM)	1,0 μl
dH ₂ O	10,12 μl
Összesen:	12,9 μl

Minden mixhez 0,1 μl AmpliTaq Gold enzimet (Applied Biosystems) és 2 μl DNS-t adunk.

Az alkalmazott PCR körülményei

95°C	12 perc	ciklusszám: 1
94°C	30 másodperc	} ciklusszám: 50
54°C	30 másodperc	
72°C	45 másodperc	
72°C	10 perc	ciklusszám: 1

Mix 5 - Bat26

primer 9 (10 pmol/μl)	0,125 μl
primer10 (10 pmol/μl)	0,125 μl
PCR puffer (MgCl ₂ nélkül)	1,5 μl
dNTP (100 mM)	0,1 μl
MgCl ₂ (25 mM)	1,0 μl
dH ₂ O	10,05 μl
Összesen:	12,9 μl

Az 5 egyedi PCR termékét pooloztuk:

Mix 1	2 μl
Mix 2	6 μl
Mix 3	2 μl
Mix 4	4 μl
Mix 5	3 μl
Összesen:	17 μl

A poolozott PCR mixeket és a ROX festékkel jelzett méret standardot (ABI ROX 500, Applied Biosystems; 2x hígítva dH₂O-val) formamidban (Applied Biosystems) vettük fel (PCR termékek poolja 3,0 μl; Méret standard 0,5 μl; Formamid 11,5 μl), majd 2 percig 95°C-on és 5 percig jégben tárolva denaturáltuk a mintákat. Az így előkészített mintákat ABI310 kapilláris elektroforézis készülék segítségével analizáltuk az 5.8. pontban leírtaknak megfelelően.

5.11 A Ki-67-expresszió analízise áramlási citométer segítségével

A sporadikus CRC-s betegek esetében a tumorból lefagyasztott 1-2 mm-es átmérőjű darabot felolvasztás után MediMachine készülék segítségével homogenizáltunk. A sejtaggregátumokat 50 μm-es pórusátmérőjű szűrő segítségével távolítottuk el. A sejteket

anti-cytokeratin-Cy5 (DAKO, Glostrup, Dánia), anti-Ki-67-FITC (Mib1, DAKO) antitestekkel és propídium iodiddal (PI) jelöltük. A minták analízisét FACS Calibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA) áramlási citométerrel végeztük. A tumoros sejteket fokozott cytotkeratin (FL4 fluoreszcencia intenzitás) expressziójuk alapján azonosítottuk. A PI felvétel (FL2 fluoreszcencia intenzitás) alapján határoztuk meg a G0/G1, S és G2/M fázisban lévő sejtek arányát, míg a Ki-67 expressziót a sejtek FL1 fluoreszcencia intenzitása adta meg.

5.12 Statisztikai analízis

A vizsgált paraméterek megoszlásának normalitását Kolmogorov-Smirnov teszt segítségével vizsgáltuk. A kategorikus változók összehasonlítását a χ^2 -teszt segítségével, míg a folytonos változókét a Mann-Whitney U-teszt vagy a Student-féle t-teszt segítségével végeztük. A folytonos változók korrelációját Pearson teszt alkalmazásával értékeltük, a betegek túlélését pedig Kaplan-Meier analízis segítségével. Bármely különbséget szignifikánsnak tekintettünk, ha a $p < 0,05$. A statisztikai analízis a Statistica program segítségével történt.

6. Eredmények

6.1 Ki-67 mutációk kimutatása daganatos sejtvonalakban és CRC-s betegek mintáiban

A Ki-67 fehérje szerepet játszik a magasabb rendű kromatin struktúra kialakulásának és lebomlásának szabályozásában és számos ponton lehet funkciója a sejtciklus regulálásában is. Éppen ezért a fehérje hiánya vagy szerkezetének és ezzel együtt funkciójának módosulása szerepet játszhat bizonyos daganatok kialakulásában. Ezeket a változásokat okozhatják kisebb genetikai eltérések, úgymint pontmutációk vagy deléciók/inzerciók a Ki-67 gén szekvenciájában. Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy kimutathatóak-e ilyen genetikai eltérések daganatos sejtvonalakban illetve CRC-s betegek daganatos szöveteiben.

Két colontumor (CXF94, SW480), egy cervixcarcinoma (HeLa) és egy tüdőtumor (A549) sejtvonal sejteiből izoláltunk RNS-t, majd az erről átírt cDNS-ből a Ki-67 gén exonjait amplifikáltuk 4 PCR segítségével. A PCR termékeket szekvenáló vektorba klónoztuk és meghatároztuk az amplifikált szakasz szekvenciáját. A vizsgálat során összesen nyolcféle genetikai eltérést találtunk (5. táblázat). Az első egy T>A nukleotid csere a 237. pozícióban (c.237T>A; CXF94 sejtekben), ami nem okoz változást az aminosav sorrendben. A 311. és 712. pozícióban A>G illetve T>A cserét detektáltunk, ami aszparagin/szerin illetve triptofán/arginin aminosav cserét eredményezett a CXF94/SW480 és a HeLa/CXF94 sejtvonalakban. Az 1300. pozícióban egy 1 bázispáros deléció (c.1300delC) volt kimutatható az A549 és az SW480 sejtekben. Ez a változás kereteltolódást és STOP kodont eredményez a deléciót követő 12. kodonban, ami a fehérje hiányát okozza vagy trunkált fehérjéhez vezet. Az izoleucin/leucin csere (c.1891A>C) és az arginin/triptofán csere (c.2494C>T) a CXF94 illetve az A549 sejtvonalakban volt kimutatható. Végül a C-terminális szakasz két 1 nukleotidos báziscseréje (c.9289A>G és c.9737G>C) valamennyi sejtvonalban detektálható volt.

Miután valamennyi talált nukleotid csere a c.1300delC kivételével polimorfizmusnak bizonyult, ezért ezt az egy genetikai eltérést vizsgáltuk meg CRC-s betegek mintáiban. Összesen 26 sporadikus CRC-ben szenvedő beteg vett részt ebben a tanulmányban. A betegek klinikai adatai a 8. táblázatban láthatóak. A kutatás során a tumorokból izoláltunk DNS-t és ebben határoztuk meg szekvenálással az 1 bázispáros deléció jelenlétét. A c.1300delC eltérés nem volt detektálható a vizsgált CRC-s betegek mintáiban.

A Ki-67 expresszió mértékét a CRC-s betegek mintáiban áramlási citometria segítségével vizsgáltuk meg. A tumoros sejtek azonosítása fokozott citokeratin expressziójuk alapján történt és a Ki-67 jelölés mellett propídium iodid segítségével sejtciklus analízist is végeztünk. A tumoros sejtekben jól detektálható volt a Ki-67 expressziója, ami jellegzetes

sejtciklus függést mutatott. A G2/M fázisban lévő sejtek intenzívebb Ki-67 festődést mutattak a G0/G1 fázisban lévőkhez képest (MFI: $18,5 \pm 7,8$ vs. $8,4 \pm 3,4$, $p < 0,0003$). Tíz tumoros minta esetében hyperploid tumoros sejtpopuláció volt jelen (DNS index: $1,38 \pm 0,09$) a diploid sejtek mellett. A hyperploid sejtek Ki-67 expressziója (átlagos fluoreszcencia intenzitás) szignifikánsan magasabb volt az ugyanezen mintában lévő diploid sejtekhez viszonyítva (Diploid – G0/G1: $8,9 \pm 2,9$ vs. Hyperploid – G0/G1: $12,9 \pm 6,0$, $p < 0,03$; Diploid – G2/M: $18,8 \pm 7,6$ vs. Hyperploid – G2/M: $24,0 \pm 9,3$, $p < 0,02$).

6.2 Az FLT3-ITD kimutatására alkalmas módszerek összehasonlítása

6.2.1 Az FLT3-ITD kimutatására használt módszerek alkalmazásának gyakorisága a nemzetközi irodalomban

Az FLT3 tirozin kináz génjének mutációi szoros összefüggést mutatnak az akut myeloid leukémia prognózisával. Alapvetően arra kerestünk választ, hogy az FLT3-ITD mutáció kimutatható-e CRC-s betegek daganatos mintáiban és mutat-e összefüggést a betegség klinikai paramétereivel.

Első lépésben azt akartuk kideríteni, hogy az FLT3-ITD kimutatására milyen módszerek használhatóak és milyen gyakorisággal alkalmazzák ezeket a nemzetközi irodalomban. Ezért a következő kifejezések kombinációjával keresést végeztünk a PubMed adatbázisban: “FLT3” AND [“ITD” OR “LM” OR “internal tandem duplication” OR “length mutation”] AND “Language: English” AND “Publication year: 2010-2011”. Összesen 177 közlemény felelt meg a kritériumoknak. Első lépésben az összefoglaló cikkeket (15 közlemény), valamint a kizárólag állat modelleket vagy ismert FLT3-ITD pozitív sejtvonalakat használó, az FLT3 jelátviteli mechanizmusát vagy egyéb biokémiai tulajdonságát vizsgáló tanulmányokat (27 közlemény) kihagytuk a feldolgozásból. A további 135 cikkből 122-t sikerült teljes terjedelmében megszerezni. Az Anyag és módszer fejezetet áttekintve 32 esetben lehetett az FLT3-ITD meghatározáshoz használt módszert közvetlenül kideríteni, míg 67 esetben korábbi, referenciaként hivatkozott cikkben találtunk leírást a módszerről. 23 cikk esetében nem lehetett azonosítani a módszert (sem az eredeti szöveg, sem a referencia cikk alapján; 2 esetben a referencia cikk nem volt elérhető számunkra). Végül a 122 cikk teljes szövegét áttanulmányozva 99 esetben tudtuk azonosítani az FLT3-ITD meghatározás módszerét.

5. táblázat Különböző tumoros sejtvonalak Ki-67 fehérjéjének cDNS-ében kimutatott mutációk jellemzői

Exon	Pozíció eredeti cDNS alapján^a	Nukleotid változás Ensembl alapján^b	Aminosav változás Ensembl alapján^b	SNP	Sejtvonal
4	433	c.237T>A	nincs	rs1063536 (T allél: 7-8%)	CXF94
5	507	c.311A>G	p.Asn104Ser	rs2071498 (A allél: 38-42%)	CXF94, SW480
7	908	c.712T>A	p.Trp238Arg	rs7095325 (T allél: 22-28%)	HeLa, CXF94
7	1496	c.1300delC	csonkolt fehérje	---	A549, SW480
9	2087	c.1891A>C	p.Ile631Leu	rs997983 (C allél: 8-10%)	CXF94
13	2690	c.2494C>T	p.Arg832Trp	rs34916904 (T allél: 2-5%)	A549
14	9485	c.9289A>G	p.Asn3097Asp	rs2798669 (A allél: 100%)	HeLa, CXF94, SW480, A549
15	9933	c.9737G>C	p.Arg3246Thr	rs2857042 (G allél: 100%)	HeLa, CXF94, SW480, A549

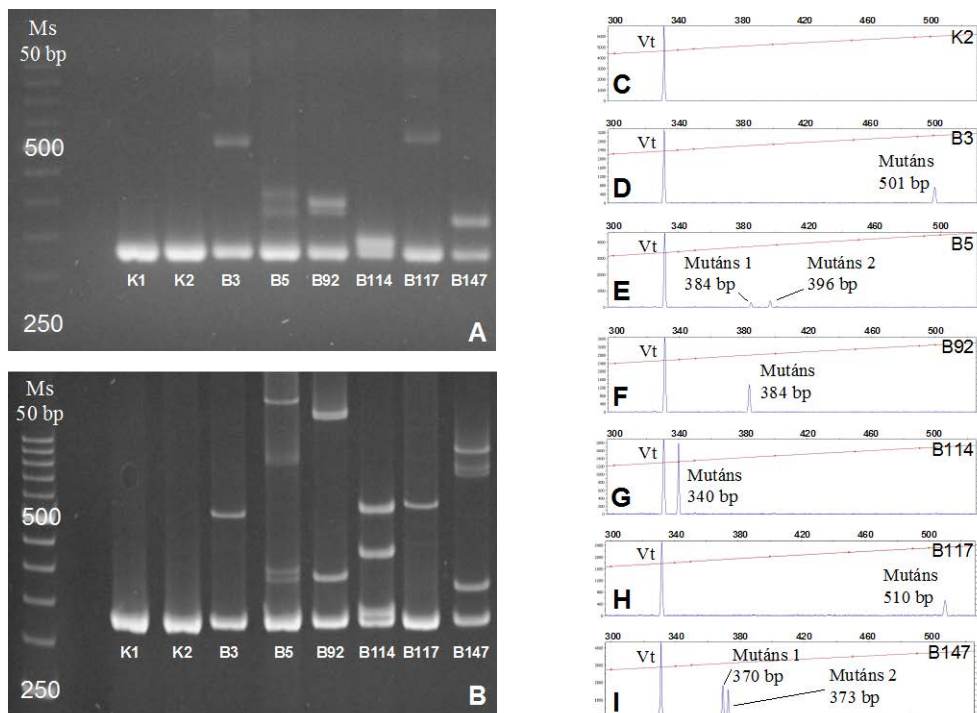
^aSchlüter et al., J Cell Biol, 1993; 123:513-522. ^bwww.ensembl.org (SNP: single nucleotide polymorphism)

Ami a módszerek megoszlását illeti, 29 közleményben (29,3%) használtak agaróz (AGE) és/vagy poliakrilamid (PAGE) gélelektroforézist az FLT3-ITD PCR-termékek kimutatására önmagában vagy 37 esetben (37,4%) DNS-szekvenálással kombinálva. A kapilláris elektroforézis (CE) aránya önmagában vagy DNS-szekvenálással használva 16 illetve 3 (16,2% illetve 3,0%) volt. További 4 illetve 6 esetben (4,0% és 6,1%) az AGE/PAGE és a CE kombinációja DNS-szekvenálással társult vagy anélkül történt. További 4 cikkben AGE/PAGE + CE + Q-PCR + szekvenálást együtt, AGE + CE + dHPLC + szekvenálást együtt illetve önállóan Q-PCR-t és önállóan high-resolution melting analysis (HRMA) használtak. Ezek alapján úgy gondoltuk, hogy az AGE és PAGE még mindig széleskörben használt módszerek az FLT3-ITD kimutatásában, ezért összehasonlításuk a kapilláris elektroforézissel és a 3 módszer analitikai tulajdonságának jellemzése érdekes vizsgálat lehet.

6.2.2 Az FLT3-ITD kimutatása AML-es betegek mintáiban 3 különböző elektroforetikus módszerrel

Összesen 73 AML-ben szenvedő felnőtt beteg 95 darab DNS mintájában vizsgáltuk meg három különböző elektroforetikus módszerrel az FLT3-ITD kimutathatóságát. 18 beteg esetében kettő, 2 beteg esetében három független mintát dolgoztunk fel. Legalább egy mutáns allél jelenlétét tudtuk kimutatni 18 beteg 20 mintájában, függetlenül a használt módszertől.

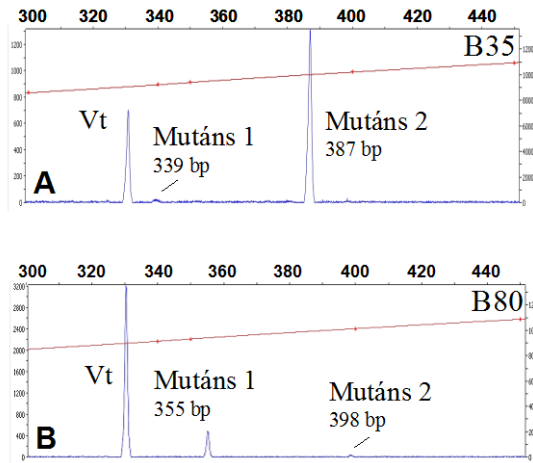
A kapilláris elektroforézis alapján meghatározott ITD méret 9-178 bázispár között mozgott (medián 40 bp), a mutáns/vad allél aránya 0,006 és 3,714 között változott (medián 0,144), míg a mutáns/összes allél aránya 0,48 és 77,8% között (medián 12,5%) volt. A 18 ITD-pozitív betegből kilencben egynél több mutáns allél volt kimutatható (többszörös ITD). A kapilláris elektroforézis során két mutációra utaló csúcsot 7, három csúcsot 2 minta mutatott. Habár mindhárom módszer képes volt azonosítani az FLT3-ITD pozitív mintákat, különbség volt köztük a mutáns allélek számát, méretét és intenzitását illetően (10. ábra), következésképpen további munkánk során a három elektroforetikus módszer analitikai tulajdonságait vizsgáltuk meg.



10. ábra Az FLT3-ITD pozitív és negatív DNS-minták vizsgálata három különböző elektroforetikus módszerrel A genomi DNS-t az Anyag és módszer fejezetben leírtak szerint amplifikáltuk. A PCR-termékeket (10 μ l) 3% agaróz (A) és 6% poliakrilamid gélen (B) futtattuk. A kapilláris elektroforézishez külön PCR protokolt használtunk fluoreszcensen jelölt forward primerrel. A mintákat ABI310 analizátorral vizsgáltuk, a PCR-termékek méretét a PeakScanner szoftverrel határoztuk meg a ROX-500 méret-standard alapján (C, D, E, F, G, H, I). Az FLT3 vad-típusú allélből amplifikált PCR-termék mérete 331 bp, az ennél nagyobb méretű sávok ITD jelenlétére utalnak. (K: kontroll, B: beteg, Vt: vad típus)

6.2.3 Az elektroforetikus rendszerek analitikai paramétereinek meghatározása: reprodukálhatóság

Két ITD-pozitív mintát (B35 és B80) használtunk a vizsgálathoz. A kapilláris elektroforézis során a B35 minta egy nagy és egy alig látható kisebb mutáns csúcsot mutatott 387 és 339 bp-nál. A B80 mintánál egy nagy mutáns csúcsot láttunk 355 bp-nál és egy nagyon kis intenzitású másikat 398 bp-nál (11. ábra).



11. ábra A B35 és B80-as betegek mintáinak kapilláris elektroforetogramja

A 6. táblázat tartalmazza a CE-vel meghatározott ITD méret reprodukálhatósági adatait. Az intra-assay variabilitást két módon határoztuk meg. Egyrészt, mindkét pozitív mintát tízszer amplifikáltuk ugyanolyan körülmények között, ugyanazon a napon, majd mindegyik PCR terméket az ABI310 analizátor kapillárisába injektáltuk (6. táblázat, „10 cső”). Másrészt, mindkét minta esetében a tíz PCR termék egyikét tízszer injektáltuk a készülékbe (6. táblázat, „1 cső”). A vad-típusú és mutáns allélról felszaporodott PCR termék méretét illetően nagyon jó intra- és inter-assay reprodukálhatóságot észleltünk (a CV% 0,2% alatt volt). Az ITD nagyságát a mutáns és vad allél méretének a különbsége adta meg. Az intra- és inter-assay CV% 1, ill. 2% alatti volt, ha az ITD mérete nagyobb volt (24 bp felett; B35 minta – ITD2; B80 minta – ITD1 és ITD2). A B35 minta ITD1 esetében kisebb, 9 bázispárnyi inzerciót észleltünk, relatíve nagyobb intra- és inter-assay CV%-kal (7 és 11%).

6. táblázat A kapilláris elektroforézissel végzett FLT3-ITD-méret meghatározás analitikai jellemzői

	Vad típusú allél ^{a,b}	Mutáns allél 1 ^{a,b}	Mutáns allél 2 ^{a,b}	ITD 1 ^b	ITD 2 ^b
B35 minta^a					
Intra-assay variáció (1 cső)^c	330,9±0,2 (0,1%) ^e	339,2±0,6 (0,2%)	387,2±0,1 (0,1%)	8,3±0,6 (7,2%)	56,1±0,3 (0,5%)
Intra-assay variáció (10 cső)^c	331,2±0,1 (0,1%)	338,9±0,4 (0,1%)	386,9±0,1 (0,1%)	7,7±0,5 (6,5%)	55,7±0,1 (0,2%)
Inter-assay variáció^d	330,6±0,5 (0,2%)	339,7±0,6 (0,2%)	387,1±0,1 (0,1%)	9,1±1,0 (11,0%)	56,5±0,6 (1,1%)
B80 minta^a					
Intra-assay variáció (1 cső)^c	330,8±0,2 (0,1%) ^e	355,2±0,1 (0,1%)	398,4±0,1 (0,1%)	24,4±0,2 (0,8%)	67,6±0,3 (0,4%)
Intra-assay variáció (10 cső)^c	331,0±0,2 (0,1%)	355,2±0,1 (0,1%)	398,1±0,2 (0,1%)	24,1±0,2 (0,8%)	67,1±0,4 (0,6%)
Inter-assay variáció^d	330,3±0,5 (0,2%)	355,2±0,1 (0,1%)	398,5±0,3 (0,1%)	24,8±0,4 (1,6%)	68,1±0,7 (1,0%)

^aKét FLT3-ITD pozitív, két-két mutáns allélt hordozó mintát (B35 és B80) vizsgáltunk.

^bA vad típusú és mutáns allélok méretét CE-vel határoztuk meg ABI310 analizátort és PeakScanner szoftvert használva. Az ITD méreteket a mutáns és vad-típusú allélokról amplifikált PCR termék méretkülönbségéből számoltuk ki.

^cAz intra-assay variabilitást két különböző módon határoztuk meg. Egyrészt, a két pozitív mintával tízszer végeztünk PCR-t ugyanolyan körülmények között ugyanazon a napon, majd mindegyik PCR-terméket egymástól függetlenül vizsgáltuk az ABI310 analizátorral ("10 cső"). Másrészt, mindkét minta esetében a 10 PCR-termékből egyet kiválasztva, egymás után tízszer vizsgáltuk az analizátorral ("1 cső").

^dA két FLT3-ITD pozitív mintát 10 egymást követő napon napi egy alkalommal amplifikáltuk és analizáltuk.

^eA feltüntetett számadatok a 10 meghatározásból számolt átlag±SD értéket mutatják. A CV%-ot (zárójelben) az „SD / átlag x 100” képlet alapján számoltuk ki.

7. táblázat A kapilláris elektroforézissel végzett FLT3-ITD-arány meghatározás analitikai jellemzői

	Mutáns 1/Totál (%)^{a,b}	Mutáns 2/Totál (%)^{a,b}	Mutáns 1/Vad típus^{a,b}	Mutáns 2/Vad típus^{a,b}
B35 minta^a				
Intra-assay variáció (1 cső)^c	0,39±0,20 (51,3%) ^c	63,9±0,5 (0,8%)	0,011±0,006 (54,5%)	1,790±0,035 (2,0%)
Intra-assay variáció (10 cső)^c	0,43±0,34 (79,1%)	65,3±1,6 (2,5%)	0,012±0,009 (75,0%)	1,911±0,114 (6,0%)
Inter-assay variáció^d	0,63±0,36 (57,1%)	65,7±2,4 (3,7%)	0,020±0,012 (60,0%)	2,052±0,203 (9,9%)
B80 minta^a				
Intra-assay variáció (1 cső)^c	11,9±0,1 (0,8%) ^c	1,5±0,1 (6,7%)	0,138±0,001 (0,7%)	0,018±0,002 (11,1%)
Intra-assay variáció (10 cső)^c	12,6±0,2 (1,6%)	1,2±0,1 (8,3%)	0,146±0,003 (2,1%)	0,014±0,002 (14,3%)
Inter-assay variáció^d	12,5±0,5 (4,0%)	1,3±0,3 (23,1%)	0,144±0,007 (4,9%)	0,016±0,004 (25,0%)

^aKét FLT3-ITD pozitív, két-két mutáns allélt hordozó mintát (B35 és B80) vizsgáltunk.

^bA vad típusú és mutáns allélok görbe alatti területeit (AUC) CE-vel határoztuk meg ABI310 analizátort és PeakScanner szoftvert használva. A mutáns allélok arányát az $AUC_{\text{mutáns allél}} / AUC_{\text{mutáns+vad típusú allélok}}$ vagy az $AUC_{\text{mutáns allél}} / AUC_{\text{vad típusú allél}}$ képlet segítségével számoltuk ki.

^cAz intra-assay variabilitást két különböző módon határoztuk meg. Egyrészt, a két pozitív mintával tízszer végeztünk PCR-t ugyanolyan körülmények között ugyanazon a napon, majd mindegyik PCR-terméket egymástól függetlenül vizsgáltuk az ABI310 analizátorral ("10 cső"). Másrészt, mindkét minta esetében a 10 PCR-termékből egyet kiválasztva, egymás után tízszer vizsgáltuk az analizátorral ("1 cső").

^dA két FLT3-ITD pozitív mintát 10 egymást követő napon napi egy alkalommal amplifikáltuk és analizáltuk.

^eA feltüntetett számadatok a 10 meghatározásból számolt átlag±SD értéket mutatják. A CV%-ot (zárójelben) az „SD / átlag x 100” képlet alapján számoltuk ki.

A mutáns/vad-típus illetve mutáns/összes allél hányados meghatározásánál változó reprodukálhatósági eredményeket kaptunk (7. táblázat). A B35 minta ITD2 és a B80 minta ITD1 esetében a mutáns/összes allél hányados 65% és 12%, az intra- és interassay CV%, pedig 5% alatt volt. A reprodukálhatóság rosszabb volt, amikor a mutáns/összes allél arány 1,2-1,5% körül mozgott (B80 minta ITD2), ekkor az intra-assay CV% 10-14%, míg az inter-assay CV% 25% volt. 1% alatti mutáns/összes allél hányadosnál (B35 minta ITD1) a reprodukálhatóság már nem volt elfogadható; a CV% 50% feletti volt.

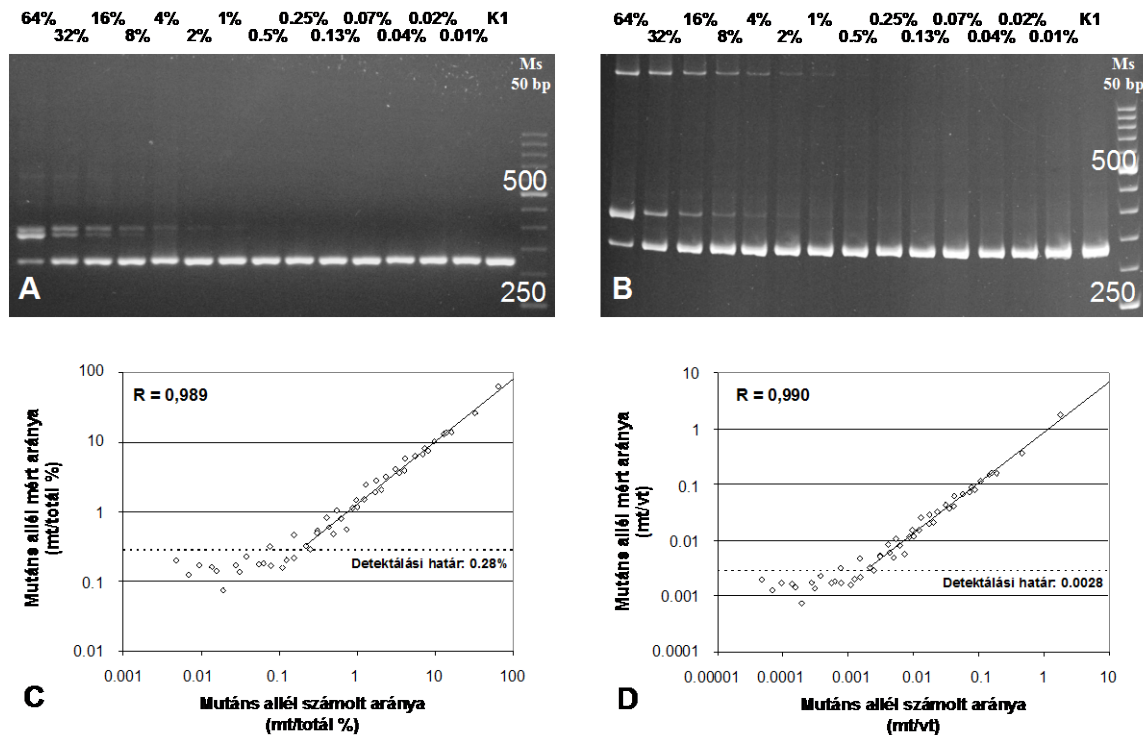
Ugyanezeket a vizsgálatokat elvégeztük AGE és PAGE esetében is. A nagyobb mutáns allérről amplifikálódó PCR termék jól látható volt, hasonló helyen és hasonló intenzitással minden nap és minden futtatásnál, míg a kisebb mutáns sáv hiányzott.

6.2.4 Az elektroforetikus rendszerek analitikai paramétereinek meghatározása: érzékenység

Következő lépésként a három különböző elektroforetikus módszer detektálási limitjét hasonlítottuk össze. A B35 és B80 minta DNS-éből egy ITD-negatív minta DNS-ével sorozathígítást készítettünk. A DNS koncentráció az FLT3 pozitív és negatív mintában egyenlő volt. A mutáns/összes allél arányt az eredeti mintában CE és PeakScanner analízis segítségével határoztuk meg, a hígított DNS mintákban pedig a kezdeti érték és a hígítási faktor alapján számoltuk ki (12A és 12B ábra). A DNS mixet jelöletlen primerekkel amplifikáltuk az FLT3-PCR során, majd 10 µl PCR terméket vittünk fel agaróz vagy poliakrilamid géltre (12A és 12B ábra). A domináns mutáns allél kimutatható volt 1-2%-os hígításnál mindkét módszer segítségével (12A és 12B ábra), de a minor mutáns allél ezekkel a módszerekkel nem volt detektálható.

A hígított DNS-eket fluoreszcensen jelzett forward és jelöletlen reverse primerrel is amplifikáltuk, amit a PCR termék denaturációja majd CE követett. A mutáns/vad típus (12D ábra), illetve mutáns/összes allél hányadost (12C ábra) PeakScanner analízissel állapítottuk meg. Mivel két különböző minta hígítási sorait vizsgáltuk, a három elvégzett kísérlet eredményeit poolozva jelenítettük meg (12C és 12D ábra). A dilúciós görbe lineáris részét határoló legalsó pont megállapításához egy változó cutoff értéket (0.1-0.5%) teszteltünk a kalkulált mutáns/összes allél arány (12C ábra), illetve 0.001-0.005 értéket a kalkulált mutáns/vad típusú allél arány esetében (12D ábra), és egy lineáris regressziós vonalat húztunk az aktuális cutoff feletti pontokon keresztül. A két vizsgált hányados esetében a 0.2% és 0.002 cutoffhoz tartozott a legjobb regressziós koefficiens ($R=0.989$ és $R=0.990$). Az assay analitikai érzékenységét a legalacsonyabb kalkulált mutáns allél hányadossal rendelkező 10

adatpontot figyelembe véve állapítottuk meg. Ezeknek az értékeknek az átlag+3SD-je 0.28% és 0.0028 volt, amely meghatározza a mért mutáns/összes és mutáns/vad típusú allél hányados detektálási limitjét (12C és 12D ábra).



12. ábra Az agaróz, poliakrilamid és kapilláris elektroforézis érzékenysége az FLT3-ITD kimutatása során Egy ITD-pozitív DNS mintából (B35) sorozathígítást készítettünk egy ugyanolyan koncentrációjú ITD-negatív mintát felhasználva. A keverékeket az Anyag és módszer fejezetben leírtak szerint amplifikáltuk, majd 10 μ l PCR-terméket agaróz (3%, A), illetve poliakrilamid (6%, B) gélen futtattunk. A sávok feletti számok a DNS-keverékekből számolt mutáns/total allél rátát mutatják. Az FLT3 vad típusú allél PCR termékének mérete 331, a mutánsé 387 bp. A kapilláris elektroforézishez eltérő PCR protokolt alkalmaztunk fluorescensen jelölt forward primerrel, a fentebb említett DNS hígítási sorozat felhasználásával. A vad típusú és mutáns csúcsok alatti területeket a PeakScanner szoftverrel határoztuk meg, és a mért AUC arányokat (C: mutáns/total, D: mutáns/vad típus) a számolt arányokkal vetettük össze. Az ábra C és D részén a regressziós egyenesek a 0,2% mutáns/total és a 0,002 mutáns/vad típus arány feletti pontokra illeszkednek, míg a detektálási cut-off értékeit a legalsó 10 pont arányaiból számolt átlag+3SD alapján határoztuk meg. Az ábra A és B része három kísérlet egyikét mutatja, míg a C és D része három független meghatározás adatait poolozva jeleníti meg.

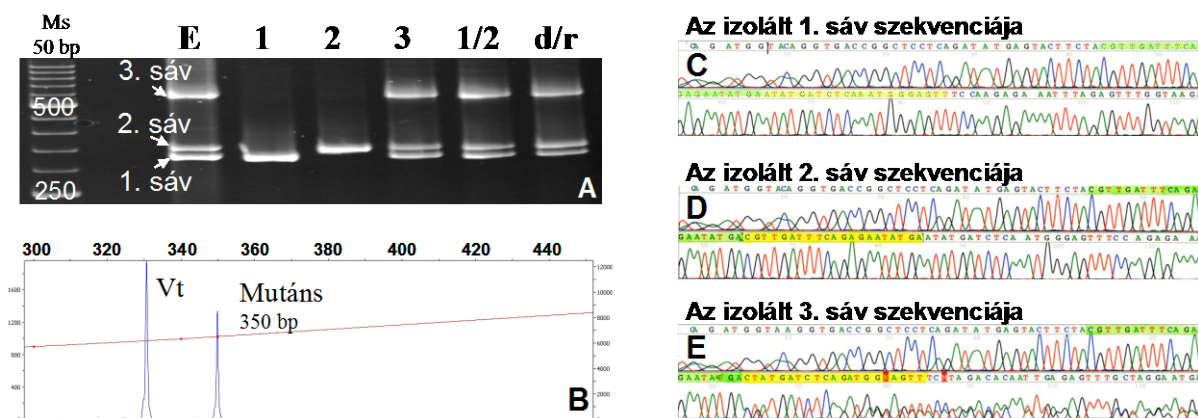
6.2.5 Az elektroforetikus rendszerek analitikai paramétereinek meghatározása: felbontás

Megvizsgáltuk a három elektroforetikus módszer felbontását is. A B114 mintában a vad és mutáns allél PCR termékének 9 bázispárnyi különbségét mindegyik módszer kimutatta

(10A, 10B, és 10G ábra). Ellenben a B147 minta esetében a 370 és 373 bp mutáns allél ugyan jól detektálható kapilláris elektroforézissel, de ez a három bázispárnyi különbség agaróz vagy poliakrilamid gél elektroforézissel már nem volt feloldható (10A, 10B és 10I ábra).

6.2.6 Az FLT3-ITD pozitív mintákban AGE és PAGE segítségével detektált multiplex sávok analízise

A 20 FLT3-ITD pozitívnak talált DNS mintában 2, 3, sőt 4 nagyméretű PCR terméket tartalmazó mutáns sávot mutattunk ki 12, 3 és 2 esetben a PAGE illetve 2, 3 és 0 esetben az AGE segítségével. Ezeket az „extra sávokat” – melyek többsége nem látható a CE esetében (10. ábra) – vizsgáltuk meg részletesebben a B55 beteg mintájában. A vad típusú (1. sáv = 331 bp), az 1. mutáns (2. sáv = kb. 350 bp) és a 2. mutáns sávot (3. sáv = kb. 550 bp) poliakrilamid gélből vágtuk ki (13A ábra, 'E' sáv), majd ezekből DNS-t izoláltunk és bidirekcionális szekvenálással meghatároztuk a bázissorrendet. Ez alapján egy 21 bázispárnyi duplikáció igazolódott a 14. intron/15. exon területén (c.1773_1793dup21) az 1. mutáns sávban (13C és 13D ábra). A 2. mutáns sávban a két szekvencia keveréke a sáv ismételt excíziója és amplifikációja után is megfigyelhető volt (13E ábra). Ez arra utal, hogy a 2. mutáns sáv a vad típusú és az 1. mutáns sáv heteroduplexe. Ennek igazolására két kísérletet végeztünk. Először a két sávból izolált DNS-t összekevertük és együtt amplifikáltuk az FLT3-ITD PCR során (13A ábra, '1/2' sáv). Másodszor, a két izolált DNS-t külön-külön sokszorosítottuk a PCR során, majd összekevertük, denaturáltuk 95°C-on 10 percig és fokozatosan hűtöttük 4°C-ra (13A ábra, 'd/r' sáv). Mindkét esetben a vad típusú, az 1. és 2. mutáns sáv egyaránt megfigyelhető volt a PAGE során. Végül a két mutáns sávot külön PCR-rel is vizsgáltuk fluorescens primereket és CE-t (ABI 310 analyzer) alkalmazva. A heteroduplex képződést ebben az esetben megakadályozza a PCR termékek denaturálása és formamid adása. A CE igazolta a vad típusú (331 bp) és csak egy mutáns (350 bp) allél jelenlétét (13B ábra).



13. ábra A nagyobb sávok, melyek a poliakrilamid gélen láthatók, ITD jelenlétében a vad típusú és mutáns allélekről amplifikálódott PCR-termékek heteroduplexei. A B55 DNS-mintát az Anyag és módszer fejezetben leírtak alapján amplifikáltuk. A vad típusú allél PCR-terméke (331 bp, 1. sáv) és két nagyobb molekulású extra sáv (2. és 3. sáv) látható a poliakrilamid gélelektroforézisen („E” sáv, az ábra „A” részén). A három sávot kimetszettük a gélből és az ezekből izolált DNS-t külön-külön amplifikáltuk ugyanolyan PCR protokol szerint („1”, „2”, „3” sáv, az ábra „A” része). Az izolált 1. és 2. sávot egyenlő arányban összekevertük, ugyanolyan körülmények között ismét amplifikáltuk („1/2” sáv, az ábra „A” része), vagy az izolált 1. és 2. sávot külön-külön amplifikáltuk, összekevertük egyenlő arányban, denaturáltuk +95°C-on, majd lassan lehűtöttük +4°C-ra („d/r” sáv, az ábra „A” része). Az izolált és reamplifikált sávokat egyaránt szekvenáltuk. Az 1. sáv a vad-típusú allél szekvenciáját mutatta (C), a 2. sáv egy 21 bp-nyi ITD-t tartalmazott (c.1773_1793dupl21; D), míg a 3. sáv szekvenciája az előző kettő keverékének felelt meg (E). A fluorescensen jelölt és denaturált PCR-termékek kapilláris elektroforézise csak a vad típust és egy 350 bp-os mutáns csúcsot mutatott (B).

6.2.7 A CE-vel illetve DNS-szekvenálással meghatározott ITD méretek összehasonlítása

Korábbi publikációkból jól ismert, hogy az ITD minden esetben „in-frame” genetikai elválást okoz, azaz olvasókeret eltolódás nem jön létre. Ez egyben azt is jelenti, hogy az ITD-t tartalmazó nukleotidok száma mindig osztható hárommal. Meglepő módon a CE segítségével kapott ITD méret adatokra ez nem volt maradéktalanul igaz. Éppen ezért 10 esetben direkt szekvenálást végeztünk ITD-pozitív minták DNS-én, majd a duplikált/inzertálódott nukleotidok számát a CE által meghatározott ITD mérethez hasonlítottuk (8. táblázat). A két módszer közötti korreláció nagyon erős ($R = 0,999$), de a duplikátum/inzertum mérete DNS szekvenálással 7%-kal nagyobbak bizonyult, mint CE-vel ($\text{Méret}_{\text{szekvenálással}} = 1.07 \times \text{Méret}_{\text{CE}} + 0.5$; (14A ábra). Sikerült kizárni azt is, hogy ez esetleg az analízishez használt ingyenes PeakScanner program sajátossága miatt van, mivel az ABI310 készülékhez hivatalosan adott GeneScan szoftverrel teljesen megegyező eredményeket kaptunk (8. táblázat, 14B ábra).

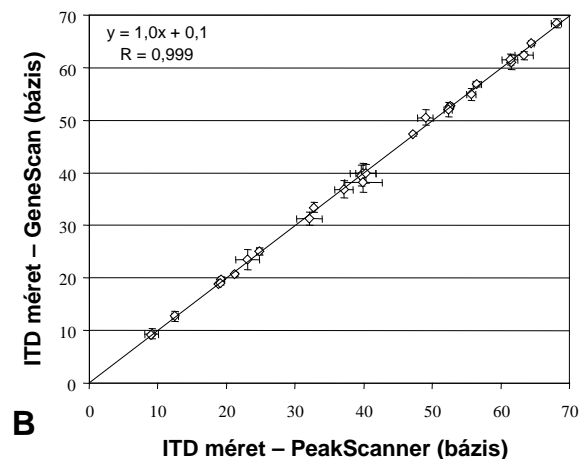
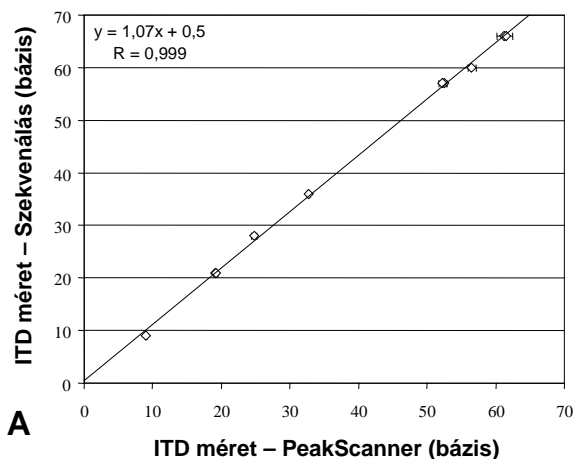
8. táblázat A PeakScanner és GeneScan szoftverrel, valamint a DNS szekvenálással meghatározott FLT3-ITD méretek összehasonlítása

Minta ^a	DNS szekvenálás ^a	PeakScanner ^b	GeneScan ^b
B13	c.1773_1793dup21 ^a	19,2±0,3 bp ^c	19,7±0,4 bp
B16	c.1742_1777dup36	32,7±0,2 bp	33,4±0,9 bp
B35	c.1776_1833dup58 + c.1833_1834insCC	56,5±0,6 bp	56,9±0,5 bp
B55	c.1773_1793dup21	19,1±0,2 bp	18,9±0,2 bp ^c
B58	c.1772_1833dup62 + c.1833_1834insGAGA	61,5±0,2 bp	60,9±1,4 bp
B80	c.1734G>A + c.1734_1735insCAACCAACCAACCATGCGAGGGCCTCC	24,8±0,4 bp	25,0±0,7 bp
B92	c.1790_1835dup46 + c.1835_1836insCCTCCCCACGG	52,5±0,3 bp	52,5±0,3 bp
B113	c.1762_1827dup66	61,3±1,1 bp	61,5±1,0 bp
B114	c.1788_1789insGGGGTCCCT	9,0±0,1 bp	9,1±0,1 bp
B125	c.1786_1837+3dup55 + c.1837+3_1837+4insCC	52,3±0,6 bp	52,0±1,3 bp

^aA 10 ITD-pozitív minta DNS-ét direkt módon szekvenáltuk, majd meghatároztuk a domináns mutáns allélben a duplikált/inzertálódott nukleotidok helyét és számát.

^bA vad-típusú és mutáns allélok méretét CE-vel határoztuk meg ABI310 analizátort illetve PeakScanner és GeneScan szoftvert használva. Az ITD méreteket a mutáns és vad-típusú allélokról amplifikálódott PCR termékek méretkülönbségéből számoltuk ki.

^cA feltüntetett adatok 3-10 önálló meghatározásból számolt átlag±SD értéket mutatják.



14. ábra A PeakScanner és GeneScan szoftverek illetve a DNS szekvenálás segítségével meghatározott ITD méretek összehasonlítása. Tíz ITD-pozitív minta DNS-ét direkt módon szekvenáltuk, majd a domináns mutáns allél duplikált/inzertálódott nukleotidjainak számát meghatároztuk és összehasonlítottuk a CE és PeakScanner analízis segítségével kalkulált ITD mérettel (A). Tizenhét AML-es beteg 27 ITD-jének méretét kapilláris elektroforézissel és PeakScanner illetve GeneScan programmal határoztuk meg (B). Az ábrán látható négyzetek és hibaszávok a 3-10 független kísérletben mért PeakScanner és GeneScan eredmények átlag- és SD-értékeit mutatják.

6.3 Az FLT3-ITD és TKD mutációk előfordulásának gyakorisága sporadikus és örökletes colon tumoros betegek mintáiban

Az FLT3 mutációk jelenlétét 26 sporadikus és 38 örökletes CRC-ben szenvedő beteg mintájában vizsgáltuk meg, a 6.2 pontban validált PCR+CE módszer (FLT3-ITD) illetve egy PCR+RFLP módszer (FLT3-TKD) segítségével. A 38 örökletes esetből 6 beteg esetében volt ismert valamelyik MMR génben genetikai eltérés (Lynch szindrómás esetek), míg 32 egyén esetében a betegség hátterében álló genetikai eltérés nem volt ismert (familiáris CRC X típus). A familiáris CRC-X csoportban 7 esetben észleltük valamelyik MMR fehérje hiányát IHC során microsatellita stabilitás mellett, míg 2 esetben alacsony instabilitás mellett. További két esetben észleltünk magas microsatellita instabilitást és hiányzó MMR fehérje festődést, míg egy esetben a magas MSI nem járt fehérje hiánnyal (de itt az MSH6 festés még nem történt meg). A Lynch szindrómás esetek mindegyikében magas microsatellita instabilitás mellett észleltünk MMR fehérje hiányt. A betegek klinikai adatai a 9. táblázatban láthatóak. Az örökletes és sporadikus tumoros betegek klinikai jellemzőit összehasonlítva a korábbi közlemények adataihoz hasonló eredményeket kaptunk [175, 176]. Az átlagéletkor szignifikánsan alacsonyabb, míg az átlagos túlélés (OS) szignifikánsan hosszabb volt a Lynch

szindrómás csoportban a sporadikusok csoportjához hasonlítva. A familiáris CRC X szindrómás betegek csoportjában a bal colonfél érintettsége, szignifikánsan alacsonyabb átlag életkor és hosszabb túlélési idő volt jellemző összehasonlítva a sporadikus tumoros betegek adataival. Ami a vizsgált FLT3-ITD és TKD mutációkat illeti, azokat sem a sporadikus, sem az örökletes colon tumoros betegek csoportjában nem tudtuk kimutatni (9. táblázat). Kontrollként 107 AML-es beteg 147 mintájában vizsgáltuk meg az ITD és TKD mutáció jelenlétét. Az FLT3-ITD aránya 25,2% (27/107), míg az FLT3-TKD gyakorisága 5,6% (6/107) volt. Az AML-es betegek klinikai adatait a 10. táblázat mutatja.

9. táblázat A sporadikus és örökletes CRC-ben szenvedő betegek klinikai adatai

	Sporadikus CRC	Lynch szindróma	CRC X
Betegszám (n)	26	6	32
Kor (év) ^a	66,7 (48,4-81,0)	47,3 (34,0-59,1) ^f	52,9 (37,7-76,3) ^e
Nem (F/N) ^b	14/12	4/2	15/17
Tumor lokalizáció ^b			
coecum	3 (11,5%)	0 (0%)	1 (3,1%)
colon ascendens	4 (15,4%)	1 (16,7%)	4 (12,5%)
colon transversum	1 (3,8%)	1 (16,7%)	3 (9,4%)
colon descendens	2 (7,7%)	2 (33,3%)	1 (3,1%)
colon sigmoideum	7 (26,9%)	2 (33,3%)	8 (25,0%)
rectum	9 (34,7%)	0 (0%)	15 (46,9%)
MSI			
MSI-S	NT	2 (33,3%)	23 (71,9%)
MSI-L	NT	0 (0%)	6 (18,7%)
MSI-H	NT	4 (66,7%)	3 (9,4%)
Immunhisztokémia			
MLH1-negatív	NT	3 (50,0%)	9 (28,1%)
MSH2-negatív	NT	1 (16,7%)	4 (12,5%)
MSH6-negatív	NT	1 ^g	2 ^h
Metastasis jelenléte ^b	12 (44,4%)	1 (16,7%)	10 (31,3%)
FLT3-ITD pozitív	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
FLT3-TKD pozitív	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
JAK2 V617F pozitív	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
OS (nap) ^c	1406 (139-2670)	2053 (1169-3007) ^d	1906 (894-3780)

Az adatokat (kivéve a kort, nemet és az általános túlélést – OS) százalékos arányban tüntettük fel. A kor és az általános túlélés adatai medián (5-95-percentilis) formában szerepelnek. A statisztikai analízist a ^aMann-Whitney U, a ^b χ^2 vagy a ^cKaplan-Meier tesztek alkalmazásával végeztük. ^dLynch szindróma vs. sporadikus CRC: p<0.04; ^eCRC-X vs. sporadikus CRC: p<0.02; ^fLynch szindróma vs. sporadikus CRC: p<0.005. ^gMSH6 immunhisztokémiát csak két esetben végeztünk. ^hMSH6 immunhisztokémiát csak 16 esetben végeztünk. Rövidítések: MSI-S: microsatellita stabilitás; MSI-L: alacsony microsatellita instabilitás; MSI-H: magas microsatellita instabilitás; NT: nem történt; OS: általános túlélés (overall survival).

10. táblázat Az FLT3 vad típusú és az FLT3 ITD/TKD pozitív AML-betegek klinikai adatai

	FLT3 vad típus	FLT3-ITD pozitív	FLT3-TKD pozitív
Betegszám (n)	74	27	6
Kor (év) ^a	51,8 (23,8-75,1)	58,3 (21,3-72,8)	53,8 (29,2-78,4)
Nem (F/N) ^b	34/40	10/17	3/3
Fvs-szám (G/l) ^a	12,8 (1,3-233,0)	49,8 (4,0-227,5) ^e	91,8 (45,7-118,7) ^g
Hgb (g/l) ^a	82,0 (49,0-118,2)	84,0 (53,3-121,3)	96,0 (78,3-113,8)
THR-szám (G/l) ^a	44,0 (11,6-262,3)	58,0 (17,0-227,1)	49,5 (14,3-113,3)
LDH (U/l) ^a	782,0 (284,3-2725,8)	1031,0 (472,0-2695,0)	1863,5 (860,5-3555,0) ^f
Blast-arány (%) ^a	43,0 (2,7-83,0)	50,0 (10,6-81,0)	26,5 (7,3-59,5)
CD135 pozitivitás (%) ^a	31,0 (0-90,3)	34,0 (1,6-70,0)	45,0 (4,6-54,0)
OS (nap) ^c	463,0 (20,5-2391,5)	210,0 (3,4-972,1) ^d	912,0 (8,6-960,6)

Az adatokat (kivéve a nemet) median (5-95-percentilis) formában tüntettük fel. A statisztikai analízist a ^aMann-Whitney U, a ^b χ^2 , vagy a ^cKaplan-Meier tesztek alkalmazásával végeztük. FLT3-ITD pozitív vs. vad típus: ^dp<0.01; ^ep<0.003. FLT3-TKD pozitív vs. vad típus: ^fp<0.03; ^gp<0.02. Rövidítések: Fvs: fehérvérsejt szám; Hgb: hemoglobin koncentráció; Htc: hematokrit; THR: thrombocyta; LDH: laktát-dehidrogenáz aktivitás; OS: általános túlélés (overall survival).

6.4 A JAK2 V617F mutáció előfordulásának gyakorisága sporadikus és örökletes colon tumoros betegek mintáiban

A 26 sporadikus és 38 örökletes CRC-s minta esetében megvizsgáltuk a JAK2 gén V617F mutációjának jelenlétét is egy PCR+RFLP módszer segítségével. Sem az örökletes, sem a sporadikus colon tumorban szenvedő betegek csoportjában nem volt kimutatható a JAK2 V617F mutáció. Kontrollként 99 PV-s betegek mintáját analizáltuk. A V617F mutáció gyakorisága 86,9% (86/99) volt (11. táblázat).

11. táblázat A JAK2 V617F pozitív és negatív polycythaemia verás betegek klinikai adatai

	JAK V617F negatív		JAK V617F pozitív	
	férfi	nő	férfi	nő
Betegszám (n) ^a	9	4	46	40
Kor (év) ^b	56,1 (33,0-71,4)	57,8 (30,9-61,3)	58,2 (43,3-83,1)	68,1 (38,1-83,1)
Fvs-szám (G/l) ^b	10,1 (5,3-13,7) ^d	7,3 (5,1-9,5) ^e	12,1 (8,4-46,1) ^d	12,0 (7,3-23,8) ^e
Hgb (g/l) ^b	180,5 (174,7-201,2)	178,5 (176,2-194,5)	180,0 (154,0-228,3)	176,0 (153,6-220,0)
Htc ^b	0,55 (0,51-0,61)	0,52 (0,47-0,59)	0,56 (0,46-0,74)	0,55 (0,42-0,64)
Vvt-szám (T/l) ^b	5,82 (5,40-7,19) ^e	6,12 (5,71-6,50)	7,05 (5,44-9,28) ^e	6,99 (5,16-8,82)
Thr-szám (G/l) ^b	322,0 (165,0-734,9) ^f	262,0 (246,0-343,5) ^f	689,0 (341,5-1425,8) ^f	706,0 (413,5-1346,1) ^f
LDH (U/l) ^b	361,0 (300,6-425,8) ^f	336,5 (301,7-361,2) ^f	502,0 (269,6-1293,4) ^f	565,0 (355,6-1001,6) ^f
Splenomegalia ^a	2 (22,2%) ^e	0 (0%) ^e	34 (73,9%) ^e	31 (77,5%) ^e
OS (napok) ^c	1521 (918-3017) ^f	2182 (353-3894)	2689 (482-6851) ^f	2850 (147-7786)

A splenomegalia adatait a pozitív betegek százalékos arányában, míg az egyéb adatokat – kivéve a betegszámot – medián formájában tüntettük fel (5–95-percentilis). A statisztikai elemzéseket ^a χ^2 test, ^bMann-Whitney U-test, vagy ^cKaplan-Meier -tesztet alkalmazva végeztük. JAK V617F pozitív vs. negatív: ^dp<0.03; ^ep<0.01; ^fp<0.002. Rövidítések: Fvs: fehérvérsejt; Hgb: hemoglobin; Htc: hematocrit; Vvt: vörösvérsejt; Thr: thrombocyt; LDH: lactate-dehidrogenase aktivitás; OS: általános túlélés (overall survival).

7. Megbeszélés

7.1 A Ki-67 potenciális szerepe a colorectalis daganatok kialakulásában

Eredményeink egyértelműen mutatják, hogy többféle, a Ki-67 gént érintő eltérés azonosítható különböző tumoros sejtek cDNS-ében, de az, hogy ezek a genetikai variánsok milyen változásokat okoznak a molekula funkciójában, még további vizsgálatokat igényel. A c.1300delC hatása tűnik a legnyilvánvalóbbnak, mivel ez STOP szignált eredményez a 446. kodonban, csonkolt fehérje képződéshez vezetve. A kimutatott 7-ből 6 polimorfizmus aminosav cserét eredményez a fehérjében. Pusztán a megváltozott aminosavak kémiai sajátosságaira alapozva az izoleucin/leucin és aszpartát/aszparagin csere tűnik a legkevésbé hangsúlyosnak, míg a triptofán/arginin és arginin/triptofán csere a legjelentősebbnek, az oldalláncuk méretében és töltésében lévő különbségnek köszönhetően. Mivel a Ki-67 fehérje több mint 200 lehetséges foszforilációs helyet tartalmaz [156, 177], az általunk észlelt aszparagin/szerin és treonin/arginin csere befolyásolhatja a fehérje poszttranszlációs módosulásait. Az is ismert, hogy a Ki-67 fehérje foszforilációja a fehérje aktiválását – deaktiválását, sőt még a sejtmagon belüli megoszlását is szabályozza [156, 177], így ez a két aminosav csere megváltozott funkciót eredményezhet. Mindezek alapján a kimutatott polimorfizmusok hatással lehetnek a fehérje működésére, de nagyobb tumoros populáció vizsgálata szükséges annak megítélésére, hogy van-e hajlamosító hatása ezeknek a polimorfizmusoknak a CRC kialakulására.

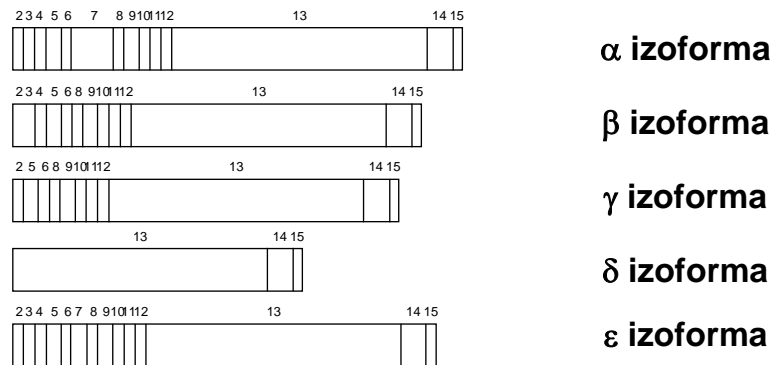
A 14. és 15. exon esetében valamennyi vizsgált tumoros sejtvonalból izolált és klónozott DNS-ben a c.9289. és c.9737. pozícióban „A” és „G” nukleotidokat találtunk. A kapott szekvenciát az eredeti közleményben [156] leírt Ki-67 szekvenciával összevetve ezek eltértek attól; a megfelelő pozícióban „G” és „C” nukleotid volt. Ez alapján tekintettük ezeket a variánsokat mutációknak. Az eredmények publikálásakor a talált eltérések nem szerepeltek még SNP-ként az adatbázisokban. Később a genetikai ismeretanyag bővülésével és egyre több ember genomjának szekvenálása után egyre több változatról derült ki, hogy a populációban különböző frekvenciával előforduló polimorfizmusok. A 14. és 15. exon esetében pedig az is világossá vált, hogy a c.9289. és c.9737. pozícióban az eddig vizsgált több mint 400, különböző rasszhoz tartozó egyén esetében az általunk talált „A” és „G” nukleotidok szerepelnek, ezek tehát a vad típusú allélnak felelnek meg és nem a mutáns variánsnak. Az eredeti közleményben egy tumoros (IM-9 myeloma multiplex) sejtvonal cDNS-e került szekvenálásra. Elképzelhető, hogy ez a sejtvonal tartalmazott a két leírt pozícióban mutációt. Mindezek alapján az általunk vizsgált 4 tumoros sejtvonalban mi valójában a vad típusú formában találtuk meg ezt a két eltérést.

Miután a legegységelműbb hatása a c.1300delC eltérésnek lehet a Ki-67 működésére, ezt az eltérést vizsgáltuk meg sporadikus és örökletes CRC-s esetek tumoros mintáiban, azonban az eltérés nem volt kimutatható. Vizsgálataink során minden esetben a primer tumorból izolált DNS mutációanalízisét végeztük el, azonban a betegek közel felében távoli metasztázis vagy recidíva is jelentkezett. Érdemes volna ezekből a másodlagos elváltozásokból is genetikai vizsgálatot végezni, hiszen a tumor progressziója során a klonális evolúció részeként újabb mutációk és eltérések alakulhatnak ki, így a diagnóziskor kapott vizsgálati eredmény csak egy „genetikai pillanatfelvétel”.

Érdekes módon, amilyen nagyszámú publikáció alkalmazza a Ki-67 expressziót a proliferáló sejtek arányának meghatározására, annyira kevés vizsgálat foglalkozik a Ki-67 fehérje biokémiai és funkcionális tulajdonságaival. Saját adatainkon kívül genetikai eltérés a Ki-67 fehérje génjében még nem került leírásra, és az általunk felismert c.1300delC sem vizsgálták tovább mások. Az hogy a Ki-67 mutációk nem kerültek leírásra nagyobb számban részben a fehérje sejtostódásban betöltött univerzális és kulcsfontosságú szerepével függhet össze. Elképzelhető, hogy a fehérje teljes hiányát vagy a funkció teljes kiesését okozó genetikai eltérések az adott sejt pusztulását okozzák. Nem mond ennek ellent az általunk talált STOP kodont eredményező c.1300delC mutáció léte sem, hiszen ez a 7. exonban található és a Ki-67-nek ismert egy – relatíve nagyobb mennyiségben kimutatható – splice variánsa, ami ezt az exont nem tartalmazza [178]. Elképzelhető, hogy ebben az esetben a teljes Ki-67 szekvenciát tartalmazó forma hiányzik, de az egyéb splice variánsok (16. ábra) jelen vannak, így működőképes fehérje található a sejtekben; azonban az izoformák arányának megváltozása hatással lehet a sejtproliferációra és szerepe lehet a tumoros transzformációban [179].

Az újabban felfedezett splice variánsok koncentrációja a sejtben nagyon alacsony a korábban ismert α és β változathoz képest és csak a sejtciklus bizonyos szakaszaiban termelődnek, ezért igen nehéz a kimutathatóságuk. A funkcióikat vizsgálva Schmidt és munkatársai 93 agytumoros beteg szövetmintáit dolgozták fel. Az alacsony RNS szint miatt csak az α és β változatot tudták értékelni. 95%-ban mindkét izoforma jelen volt a daganatban, de 5%-ban csak a rövidebb forma volt megtalálható, tehát a hosszú és rövidebb változat egymástól függetlenül is előfordulhat. Perifériás mononukleáris sejtek mitózis indukciója során azt találták, hogy a sejtciklus korábbi szakaszaiban a rövidebb forma észlelhető, a hosszú forma pedig csak a későbbi szakaszokban, amikor a rövid forma expressziója már lecsengőben van. A 7. exon a kísérleteik szerint – a többi doménnel szemben – antiproliferatív hatással bír, így a G1-G0 átmenetben, a differenciálódásban játszhat szerepet. Amennyiben a

7. exon kiesik, ez hozzájárulhat a tumoros sejtek állandó osztódásához. A rövidebb izoformák tehát a sejtciklust lendítik előre, a hosszabbak pedig inkább a differenciálódás irányában hatnak [179].



16. ábra A Ki-67 fehérje izoformái. A számok az adott izoforma kódolásában résztvevő exonokat jelölik.

7.2 Az FLT3 génben lévő ITD kimutatására alkalmas elektroforetikus módszerek analitikai paramétereinek értékelése

Az FLT3-ITD az egyik leggyakoribb genetikai eltérés az AML-ben szenvedő felnőtt betegekben. Az FLT3-ITD kimutatására a rutin diagnosztikában leggyakrabban alkalmazott 3 módszer a PCR-t követő agaróz, poliakrilamid illetve kapilláris elektroforézis. Vizsgálataink során AML-es betegek DNS mintáin teszteltük ezt a három detektálási módot és meghatároztuk a három rendszer analitikai paramétereit.

Az ITD-pozitív minták aránya mindhárom vizsgálati módszerrel – AGE, PAGE, CE – egyforma volt a vizsgált betegpopulációban, mely a három technika hasonló érzékenységére utal. Ugyanakkor, a CE néhány kisebb intenzitású mutáns sávot is kimutatott, melyek agaróz vagy poliakrilamid géllal nem voltak láthatóak. Ennek megfelelően a vizsgálati módszerek detektálási küszöbe – egy ITD-pozitív DNS minta sorozathígításával meghatározva – 1-2% volt AGE és PAGE, illetve 0,28% volt CE esetében. A korábbi FLT3-ITD közlemények többségében hasonló szenzitivitást találtak az AGE és PAGE esetében [180-182], míg két cikk [183, 184] valamivel magasabb értéket közölt (5-6%). A CE-t illetően 0,8-2% szenzitivitást írtak le FLT3-ITD meghatározásnál 5 közleményben [185-189], míg 3-10%-ot 4 másik cikkben [190-193]. A CE valamivel magasabb szenzitivitása, melyet a munkánk során megfigyeltünk, az általunk a mérési csúcsok észlelésére használt alacsonyabb RFU

küszöbértékkel magyarázható. Új mintáknál az RFU>50 jelet fogadtuk el csúcsnak, a nyomon követés során pedig, ismert csúcs-pozíciójú mintáknál akár a 15 feletti RFU értékeket is pozitívnak tekintettük. Ezáltal – egy közel maximális, 6000 RFU-s szignált alapul véve – 1% alatti szenzitivitás is könnyen elérhető volt. Ezzel ellentétben a korábbi tanulmányok 150-es RFU értéket használtak [192] maximum 2-3%-os érzékenységet érve el. Annak érdekében, hogy egy adott mintában bizonyítsuk ezen alacsony szignálú ITD-eltérések jelenlétét, ismételt vizsgálatokat végeztünk, és csak ha reprodukálható volt a csúcs jelenléte, akkor tekintettük a mintát pozitívnak. A viszonylag alacsony észlelési küszöb ellenére – amit a hígításos vizsgálatban figyeltünk meg –, csak a 1,5% feletti mutáns allél arányt lehetett még elfogadható reprodukálhatósággal megmérni, ezért ezt az értéket fogadtuk el, mint kvantitálási küszöböt a CE során.

Habár ezek a nagyon alacsony arányban jelenlévő mutáns allélek nem voltak kimutathatóak AGE és PAGE során, számos nagyobb méretű extrasávot találtunk ezekkel a módszerekkel, amelyek viszont a CE elektroforetogramjáról hiányoztak. Alapos vizsgálatnak vetettük alá a vad típusú és mutáns allélokról amplifikálódott PCR termékeket DNS szekvenálást és heteroduplex analízist alkalmazva és azt találtuk, hogy a nagy extrasávok a vad típusú és mutáns allélok által létrehozott heteroduplexeknek felelnek meg. Korábbi publikációk szintén leírták ezt a jelenséget [193]. Egy tanulmány direkt szekvenálást alkalmazott [192], míg egy másik [194] a mi kísérletünkhöz hasonló „keverés” módszert használt a heteroduplexek jelenlétének bizonyítására. Az AGE és PAGE módszerrel nem detektálható kis intenzitású mutáns allélek jelenlétét és a heteroduplex képződést figyelembe véve a multiplex ITD-k kimutatásának megbízható módszere a CE.

AML-es betegeink mintáit vizsgálva alkalmunk nyílt a különböző elektroforetikus módszerek felbontását is összehasonlítani. Habár mindegyik módszer alkalmas a sávok/csúcsok közötti 9 bp-nyi különbség felismerésére, 3 bp-nyi különbség feloldására csak a CE képes. Hasonlóan nagy felbontást észleltek két korábbi tanulmányban [187, 195], mely alátámasztja ennek a technikának a fontosságát a multiplex ITD-k kimutatásában.

A multiplex ITD-k aránya tanulmányunkban – CE-vel meghatározva – 50% (9/18) volt, ami valamivel magasabb, mint a korábban közölt 11-32% [182, 192, 195-202]. Ez is nagy valószínűséggel az alacsonyabb RLU küszöbértékkel magyarázható, melyet a CE során a csúcsok meghatározására használtunk.

Ami az ITD méretét illeti, alapvetően három különböző technikát alkalmaztak eddig ennek meghatározására. DNS szekvenálás [195, 196, 201, 203-206], CE [189, 193, 196, 200, 202, 207] és az Agilent Bioanalyzer használatával [194, 209] 3-400 bp-nyi ITD méreteket

mutattak ki, 24-70 bp közötti átlagértékekkel. Saját eredményeink is ezen határok közé esnek, mivel az észlelt ITD méret intervalluma 9-178 bp volt 40 bp-os középértékekkel. Adataink azt mutatták, hogy a CE segítségével végzett ITD méret meghatározás reprodukálhatósága megfelelő, még a legrövidebb szakasz (9 bp) esetében is 11%-os interassay CV%-ot kalkuláltunk. A duplikálódott/inzertálódott nukleotidok száma azonban nem minden esetben volt hárommal osztható, amit két korábbi közleményben is prezentáltak már [194, 208], de más, Agilent Analyzert vagy CE-t alkalmazó tanulmányokban nem említették. Ez a jelenség a vad típusú és mutáns allélról amplifikálódott PCR termék méretének variabilitásával magyarázható, ami mindkét esetben ± 0.6 bp. Miután az ITD méretét a vad és a mutáns PCR termékek méretkülönbsége adja, a két meghatározás együttes variabilitása ± 1.0 bp változást idézhet elő az ITD méretében. Emiatt az a módszer, amelyik pontos ITD méret meghatározást biztosít, az vagy a DNS minta direkt szekvenálása, vagy az izolált és klónozott ITD fragmentumok szekvenálása. Az előbbi megközelítést követve 10 ITD-t tartalmazó mintát szekvenáltunk, és a talált duplikáció/inzerció soha nem okozott olvasási keret eltolódást. Ugyanakkor a szekvenálással meghatározott ITD méretek valamivel nagyobbak voltak, mint amit CE és PeakScanner vagy GeneScan elemzés során kaptunk. Irodalmi adatokra és saját tapasztalatunkra alapozva javasoljuk a DNS szekvenálás használatát a pontos ITD méret meghatározására, különös tekintettel arra, hogy újabb adatok szerint a duplikáció/inzerció helye is prognosztikus jelentőséggel bírhat [199].

Több mint 20 cikk tanulmányozta eddig az AML-es betegek mintáiban a mutáns allél arányát, négy különféle módszert alkalmazva. Szemikvantitatív AGE vagy PAGE 5 publikációban szerepelt [pl. 198, 204, 210], míg kvantitatív adatokat nyertek dHPLC [211], Agilent Bioanalyzer [194, 209] és CE [181, 182, 190, 195, 197, 199, 200, 203, 205-207, 212, 213] használatával 1, 2 illetve 13 közleményben. Az eredményeket alapvetően kétféleképpen közlik a publikációkban; a mutáns/vad típusú [190, 195, 199, 203, 205-207, 212, 213] vagy a mutáns/(vad típusú+mutáns) [181, 182, 194, 197, 198, 200, 209] allél hányadost használják közel egyenlő gyakorisággal. Emiatt saját vizsgálatunk során mindkét hányadost meghatároztuk. A mutáns/vad-típusú allél hányados középértéke a betegcsoportunkban 0,144 (0,006-3,714), ugyanakkor a mutáns/totál allél hányados középértéke 12,5% (0,48-77,8%) volt, ami valamivel alacsonyabb, mint a korábban közölt adatok (határ- és középértékek a mutáns/vad típusú allél arányt illetően: 0,008-32,56 és 0,530-0,836; határ- és középértékek a mutáns/totál allél hányadost illetően: 1-100% és 30-47%). Valószínűleg ez is az általunk alkalmazott alacsonyabb RFU küszöbértékkel magyarázható, amit a csúcs meghatározáshoz használtunk. Ami ezeknek a meghatározásoknak a reprodukálhatóságát illeti, adataink azt

mutatják, hogy a mutáns/vad típusú és a mutáns/totál allél hányados 0,020 és 1,5% felett <25% interassay CV% értékkel jellemezhető, így ezeket az arányértékeket tekintjük a módszer kvantitatálási küszöbértékeinek (ennél kisebb arányok már nem kvantitálhatók elfogadható reprodukálhatósággal).

Kísérleti eredményeink és a korábbi publikációk adatai egyértelműen azt mutatják, hogy a CE-t használó vizsgálmódszer a legalkalmasabb az FLT3-ITD mutáns/totál allél arány kimutatására és kvantitációjára, amely akár rutin diagnosztikai célokra is használható. Kutatási céllal a multiplex ITD jelenlétének igazolása CE segítségével lehetséges, ha a mutáns allélek aránya 0,28% felett van, míg az ITD méretéről és helyéről a DNS szekvenálás adhat megbízható információt.

7.3 A JAK2 V617F és az FLT3-ITD és -TKD mutációk jelentősége sporadikus és örökletes colorectalis tumorokban

Bár a JAK2 gén mutációi dominálónan a krónikus myeloproliferatív kórképek és ezen belül is elsősorban a polycythemia vera kialakulásával mutatnak összefüggést, de nagyszámú kísérletes adat szól amellett, hogy a JAK/STAT szignalizációs útvonal aktiválódása fontos szerepet játszhat a CRC patogenezisében is. A STAT3 aktivált, foszforilált változata fokozott mértékben mutatható ki a tumoros sejtek magjában és ez a jelenség összefüggést mutatott a tumor kifejezettebb invazivitásával, fokozott metastasis képző hajlammal, a tumor progressziójával és az egyértelműen rosszabb prognózissal. Tumoros CRC sejtvonalakat vizsgálva a JAK2 és a STAT3 inhibitorai csökkentették a tumorsejtek proliferációját és fokozták ezek apoptosist. Jelentős mértékben csökkentették továbbá a tumor invazivitását és migrációját, elsősorban az extracelluláris mátrixot degradáló enzimek szintézisének csökkentése és a tumorsejtek közötti kapcsolódást elősegítő adhéziós molekulák expressziójának növelése révén [214].

Mindezek alapján logikusnak tűnik a feltételezés, hogy a JAK2 és a kapcsolódó szignalizációs útvonal génjeinek mutációi, amelyek konstans szignalizációt és ezzel együtt aktivációt eredményeznek, szerepet játszhatnak a CRC kialakulásában. Két nagyobb vizsgálat analizálta a humán genom kinázokat kódoló génjeinek mutációi és bizonyos daganatok kialakulása közötti összefüggéseket [215, 216], és a CRC esetében a JAK/STAT rendszer fehérjéi közül kettőben sikerült 1-1 genetikai eltérést kimutatni: JAK1 p.E886K és TYK2 p.H732R. Azonban ezeknek a mutációknak is az incidenciája nagyon alacsony volt (<5%). Jeong és munkatársai 47 CRC-s beteg mintáiban analizálták a JAK1, JAK3 és TYK2 gének mutációit, de nem találtak eltérést, és a többi vizsgált szolid tumor (emlő, gyomor,

hepatocelluláris és nem kissejtes tüdő carcinoma) esetében is csak egy-két egyedi mutáció volt kimutatható [214]. Négy tanulmány vizsgálta közvetlenül a JAK2 V617F mutáció előfordulását CRC-s sejtvonalakban és sporadikus CRC-s betegek tumormintáiban, azonban egyetlen esetben sem sikerült a mutációt kimutatni [217-220]. Saját eredményeink is azt mutatták, hogy a sporadikus daganatokban ez a mutáció nem fordul elő.

Valamennyi felsorolt publikáció sporadikus CRC-s eseteket vizsgált, azonban a betegek kisebb hányadát kitevő örökletes esetekben nem tesztelték még a JAK2 V617F mutáció előfordulását. A vizsgálatunk során 32 olyan CRC-s beteg mintáját analizáltuk, akik az Amsterdam vagy a módosított Bethesda kritériumoknak megfeleltek, de a betegség hátterében álló, az MMR géneket érintő mutációt nem sikerült igazolni (familiáris CRC X típus). Ezekben az esetekben sem sikerült azonban a JAK2 V617F mutációt kimutatni.

A JAK2 V617F mutáció hiánya többféleképpen is magyarázható. A kontrollként szolgáló PV-s betegcsoportban a minták 86,9%-ban detektáltunk pozitívást, ami valamivel alacsonyabb a nemzetközi irodalomban jelenleg elfogadott 95-97%-os pozitivitási aránynál [221, 222]. Így felmerül annak a lehetősége, hogy a vizsgált genetikai eltérés kimutatására használt módszer érzékenysége nem megfelelő, és a kis mennyiségben jelenlévő tumoros mutált allél kimutatására már nem alkalmas [222]. Miután a CRC-s betegek esetében a DNS izolálás parafinos metszetekből történt, amelyek úgy lettek kiválasztva, hogy dominálónan tumoros szövetet tartalmazzanak, ez a magyarázat nem túl valószínű. A másik lehetőség, hogy a JAK2 génben további genetikai eltérések is ismertek, így a 12. exon mutációi illetve további ritka eltérések, amelyeket nem vizsgáltunk, és amelyek magyarázhatják a fokozott JAK/STAT szignalizációt [221, 223]. Nem elképzelhetetlen, hogy a JAK2 és a további szignalizációs elemek epigenetikai változásai (pl. promóter régió metilálása) is befolyásolhatják ezek működését [218]. Végül, esetleg bizonyos negatív reguláló elemek, mint pl. a SOCS fehérjék genetikai okokra visszavezethető kiesése is eredményezhetik a fokozott JAK/STAT aktivációt [218].

Az FLT3 gén expressziója és mutációi dominálónan a hematopoetikus sejtekben fordulnak elő, de viszonylag nagy mennyiségben mutatható ki ez a fehérje illetve ennek mRNS-e a placentában és a központi idegrendszerben is [168, 224, 225]. Sokkal kisebb az FLT3 expressziója a szervezet egyéb szöveteiben, így a vesében, a szívben, a gonádokban, a bőrben, és hasonlóan kis mennyiségben a vastagbélben is kimutatható [225]. Miután korábban ilyen vizsgálat nem történt, meghatároztuk az FLT3 mutációinak előfordulását sporadikus és örökletes CRC-s betegek tumormintáiban, de genetikai eltérés nem volt kimutatható. A mutációk kimutatására alkalmazott módszerek érzékenysége megfelelőnek tűnik, és vélhetően

nem ez áll a mutációk hiányának hátterében, hiszen a kontrollként vizsgált AML-es populációban az FLT3-ITD és –TKD eltérések gyakorisága 25,2% és 5,6% volt, ami megfelel az irodalmi adatoknak [168].

A vizsgálatban résztvevő 6 Lynch szindrómás beteg mutáció analízise más szempontból is érdekes volt. Ezekben az esetekben az MMR gének mutációi igazolhatóak voltak és magyarázták az örökletes CRC kialakulását. Az MMR komponensei szerepet játszanak a genetikai hibák javításában és kiesésük esetén a spontán is kialakuló genetikai eltérések akkumulálódnak a genomban. Az FLT3 és a JAK2 mutációi nem voltak kimutathatóak ezekben a betegekben sem, így ezek kialakulása az MMR gének kiesése esetében sem tűnik valószínűnek és vélhetően nincs szerepük sem az örökletes, sem a sporadikus CRC patogenezisében.

8. Összefoglalás

A vastagbélrák (CRC) a fejlett országok többségében a második leggyakoribb daganatos halálozási okként szerepel. Mind a sporadikus, mind az örökletes CRC hátterében környezeti és genetikai tényezők is közrejátszanak, amelyek közül jónéhányat sikerült már azonosítani. Munkánk során sporadikus és örökletes CRC-s esetek mintáit vizsgáltuk Ki-67, FLT3-ITD, -TKD és a JAK2 V617F mutációk után kutatva. Olyan fehérjék vizsgálatára helyeztük a hangsúlyt, melyek vagy a sejtsztódás szabályozásában töltenek be nélkülözhetetlen szerepet, vagy mutációik révén sejtproliferációt indukálnak. Az általunk vizsgált genetikai eltéréseket örökletes CRC-s betegekben korábban még nem tanulmányozták, a sporadikus eseteket illetően is kevés adat áll rendelkezésre.

A Ki-67 fehérje szerepet játszik a magasabb rendű kromatin struktúra és a sejtciklus szabályozásában, így a fehérje hiánya vagy szerkezetének módosulása szerepet játszhat bizonyos daganatok kialakulásában. Négy tumoros sejtvonalat vizsgálva 8 féle genetikai eltérést sikerült azonosítani a Ki-67 génben, melyek közül egy – korábban még le nem írt – 1-nukleotidos deléció kereteltolódást és trunkált fehérjét eredményez, 1 nem jár aminosav cserével, míg további 6 eltérés aminosav cserével járó polimorfizmus volt. A c.1300delC mutáció jelenlétét 26 sporadikus CRC-s beteg mintájában is megvizsgáltuk, de az eltérés nem volt kimutatható.

Az FLT3-ITD, -TKD és a JAK2 V617F mutációk a myeloid malignomákhoz társuló gyakori genetikai eltérések. Első lépésként az FLT3-ITD kimutatására alkalmas genetikai módszerek validálását végeztük el, amit hasonló részletességgel korábban még nem publikáltak. Adataink azt mutatták, hogy a CE-t használó vizsgálmódszer a legalkalmasabb az FLT3-ITD mutáns/total allél arány kimutatására és kvantitációjára. A multiplex ITD jelenlétének igazolása CE segítségével lehetséges, ha a mutáns allélek aránya 0,28% felett van, míg az ITD méretéről és helyéről a DNS szekvenálás adhat megbízható információt. A kontrollként szolgáló akut myeloid leukémiás populációban (107 beteg) az FLT3-ITD illetve az FLT3-TKD mutáció gyakorisága 25,2% és 5,6%, míg a polycythaemia verás betegek (99 személy) esetében a JAK2 V617F mutáció frekvenciája 86,9% volt, ami lényegében megfelel az irodalmi adatoknak. Ezután 26 sporadikus és 38 örökletes CRC-s beteg mintájában vizsgáltuk meg az FLT3-ITD, -TKD és a JAK2 V617F mutációk jelenlétét, azonban nem sikerült ezeket az eltéréseket kimutatni. Az FLT3 és a JAK2 mutációi nem voltak kimutathatóak a 6 Lynch szindrómás betegünk esetében sem, így ezek kialakulása az MMR gének kiesése esetében sem tűnik valószínűnek és vélhetően nincs szerepük sem az örökletes, sem a sporadikus CRC patogenezisében.

9. Summary

Colorectal carcinoma is the second most frequent cancer cause of death in the majority of the developed countries. Environmental and genetic factors – many of which have been successfully identified – may play a role in the development of sporadic and hereditary CRC, too. In our study we analyzed samples of patients with sporadic and hereditary CRC searching for genetic alterations of Ki-67, FLT3 and JAK2 genes. We focused on such proteins which either play an essential role in regulation of cell cycle or in the case of their mutations induce an enhanced cell proliferation. The genetic alterations we studied have not been examined by others in patients with hereditary CRC and there are only limited data on sporadic cases, too.

Ki-67 protein has a role in the regulation of higher chromatin structure and cell cycle, therefore lack of the protein or alteration of its structure may play a role in the development of certain tumors. Analyzing four tumor cell lines we have successfully identified 8 genetic alterations in the Ki-67 gene one of which – a one-nucleotide deletion that was not described earlier – was resulted in a frame shift and truncated protein, one mutation was not associated with amino acid change while other 6 alterations were polymorphisms with amino acid changes. We also searched for the presence of c.1300delC mutation in samples of 26 patients with sporadic CRC but it was not detectable.

FLT3-ITD, -TKD and JAK2 V617F mutations are frequent genetic alterations accompanying to myeloid malignancies. As a first step we validated three genetic methods used for detection of FLT3-ITD which had not been published in such details previously. Our results suggest that CE is the most suitable method to detect and quantify the mutant/total allele ratio of FLT3-ITD. Verification of the presence of multiple ITDs is possible with CE if the ratio of the mutant alleles is above 0.28%, while DNA sequencing can provide reliable information about the exact size and location of ITD. The frequency of FLT3-ITD and –TKD mutation was 25.2% and 5.6% in the control group of 107 AML patients, while the rate of JAK2 V617F mutation was 86.9% in 99 PV patients similarly to data published in literature. Thereafter we analyzed the presence of FLT3-ITD and mutations of FLT3-TKD and JAK2 V617F in samples of 26 and 38 patients with sporadic and hereditary CRC but we could not find these alterations. Mutations of FLT3 and JAK2 genes were also not detectable in 6 patients with Lynch syndrome so their formation does not seem to be probable even in the case of loss of function of the MMR genes and they probably do play a role in the pathogenesis of neither sporadic nor hereditary CRC.

10. A disszertáció új megállapításai

10.1 Tumoros sejtvonalak cDNS-ében 8 genetikai eltérést találtunk, amelyből 7 a normál populációban kisebb-nagyobb gyakorisággal előforduló polimorfizmusnak bizonyult. Egy 1 nukleotidos deléciónak – c.1300delC – azonban elvileg egyértelműen lehet patogén hatása csonkolt fehérje képződéshez vezető STOP kodon létrejöttén keresztül.

10.2 A c.1300delC jelenléte nem volt kimutatható a sporadikus CRC-s betegek tumormintáiban.

10.3 Az FLT3-ITD kimutatására alkalmas genetikai módszerek validálását végeztük el, amit hasonló részletességgel korábban még nem publikáltak. Adataink azt mutatták, hogy

- a CE-t használó vizsgálómódszer a legalkalmasabb az FLT3-ITD mutáns/totál allél arány kimutatására és kvantitációjára,
- a CE metodika esetében a mutáns/totál allél arány kimutatásának analitikai érzékenysége 0,28%-ra növelhető,
- a multiplex ITD jelenlétének igazolása CE segítségével lehetséges,
- az ITD méretéről és helyéről a DNS szekvenálás adhat megbízható információt.

10.4 Az FLT3-ITD, –TKD és a JAK2 V617F mutációk nem fordultak elő sporadikus és örökletes CRC-s betegek tumormintáiban.

11. Irodalomjegyzék

- [1] Parkin DM. International variation. *Oncogene* 2004; 23:6329–6340.
- [2] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55:74–108.
- [3] Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl Med* 2003; 348:919-932.
- [4] Oliveira C, Westra JL, Arango D et al. Distinct patterns of KRAS mutations in colorectal carcinomas according to germline mismatch repair defects and hMLH1 methylation status. *Hum Mol Genet* 2004; 13:2303-2311.
- [5] Jemal A, Siegel R, Ward E et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008; 58:71-96.
- [6] Howe HL, Wu X, Ries LA et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2003, featuring cancer among U.S. Hispanic/Latino populations. *Cancer* 2006; 107:1711-1742.
- [7] Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 1999; 49:33-64.
- [8] Ries L, Kosary CL, Hankey BF et al. SEER cancer statistics review 1973-1995. National Cancer Institute, Bethesda, MD 1998.
- [9] Eddy DM. Screening for colorectal cancer. *Ann Intern Med* 1990; 113:373-384.
- [10] Burt RW, DiSario JA, Cannon-Albright L. Genetics of colon cancer: impact of inheritance on colon cancer risk. *Annu Rev Med* 1995; 46:371-379.
- [11] Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, et al. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology* 1993; 104:1535-1549.
- [12] Ponz de Leon M, Sassatelli R, Benatti P, Roncucci L. Identification of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the general population. The 6-year experience of a population-based registry. *Cancer* 1993; 71:3493-3501.
- [13] Beahrs OH, Sanfelippo PM. Factors in prognosis of colon and rectal cancer. *Cancer* 1971; 28:213-218.
- [14] Steinberg SM, Barkin JS, Kaplan RS et al. Prognostic indicators of colon tumors. The gastrointestinal Tumor Study Group experience. *Cancer* 1986; 57:1866-1870.
- [15] Griffin MR, Bergstralh EJ, Coffey RJ et al. Predictors of survival after curative resection of carcinoma of the colon and rectum. *Cancer* 1987; 60:2318-2324.
- [16] Wolmark N, Wieand HS, Rockette HE, Fisher B. The prognostic significance of tumor location and bowel obstruction in Dukes B and C colorectal cancer. Findings from the NSABP clinical trials. *Ann Surg* 1983; 198:743-752.
- [17] Carraro PG, Segala M, Cesana BM, Tiberio G. Obstructing colonic cancer: Failure and survival patterns over a ten-year follow-up after one-stage curative surgery. *Dis Colon Rectum* 2001; 44:243-250.
- [18] Crucitti F, Sofo L, Doglietto GB et al. Prognostic factors in colorectal cancer: current status and new trends. *J Surg Oncol Suppl* 1991; 2:76-82.
- [19] Chapuis PH, Dent OF, Fisher R et al. A multivariate analysis of clinical and pathological variables in prognosis after resection of large bowel cancer. *Br J Surg* 1985; 72:698-702.
- [20] Halvorsen TB, Johannesen E. DNA ploidy, tumor site, and prognosis in colorectal cancer. *Scand J Gastroenterol* 1990; 25:141-148.
- [21] Passman MA, Pommier RF, Vetto JT. Synchronous colon primaries have the same prognosis as solitary colon cancers. *Dis Colon Rectum* 1996; 39:329-334.
- [22] Mamazza J, Gordon PH. The changing distribution of large intestinal cancer. *Dis Colon Rectum* 1982; 25:558-562.
- [23] Vukasin AP, Ballantyne GH, Flannery JT et al. Increasing incidence of cecal and sigmoid carcinoma. *Cancer* 1990; 66:2442-2449.

- [24] Consorti F, Lorenzotti A, Midiri G et al. Prognostic significance of mucinous carcinoma of colon and rectum: A prospective case-control study. *J Surg Oncol* 2000; 73:70-74.
- [25] Psathakis D, Schiedeck TH, Krug F et al. Ordinary colorectal adenocarcinoma vs. primary colorectal signet-ring cell carcinoma: study matched for age, gender, grade, and stage. *Dis Colon Rectum* 1999; 42:1618-1625.
- [26] Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ et al. Prognostic factors in colorectal cancer: College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124:979-994.
- [27] Newland RC, Dent OF, Lyttle MN, Chapuis PH. Pathologic determinants of survival associated with colorectal cancer with lymph node metastases. A multivariate analysis of 579 patients. *Cancer* 1994; 73:2076-2082.
- [28] Secco GB, Fardelli R, Campora E, Lapertosa G. Primary mucinous adenocarcinomas and signet-ring cell carcinomas of colon and rectum. *Oncology* 1994; 51:30-34.
- [29] Halvorsen TB, Seim E. Association between invasiveness, inflammatory reaction, desmoplasia and survival in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 1989; 42:162-166.
- [30] Ofner D, Riedmann B, Maier H, Hittmair A. Standardized staining and analysis of argyrophilic nucleolar organizer region associated proteins (AgNORs) in radically resected colorectal adenocarcinoma – correlation with tumour stage and long-term survival. *J Pathol* 1995; 175:441-448.
- [31] Michelassi F, Ayala JJ, Balestracci T, Goldberg R. Verification of a new clinicopathologic staging system for colorectal adenocarcinoma. *Ann Surg* 1991; 214:11-18.
- [32] Harrison JC, Dean PJ, el-Zeky F, Vander Zwaag R. From Dukes through Jass: pathological prognostic indicators in rectal cancer. *Hum Pathol* 1994; 25:498-505.
- [33] Jemal A, Siegel R, Ward E et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008; 58:71-96.
- [34] AJCC (American Joint Committee on Cancer) Cancer Staging Manual, 6th ed, Greene FL, Page DL, Fleming ID et al (Eds), Springer-Verlag, New York, 2002. p. 114.
- [35] Harrison LE, Guillem JG, Paty P, Cohen AM. Preoperative carcinoembryonic antigen predicts outcomes in node-negative colon cancer patients: A multivariate analysis of 572 patients. *J Am Coll Surg* 1997; 185:55-59.
- [36] Wanebo HJ, Rao B, Pinsky CM et al. Preoperative carcinoembryonic antigen level as a prognostic factor in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1978; 299:448-451.
- [37] Atkin WS, Morson BC, Cuzick J. Long-term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid adenomas. *N Engl J Med* 1992; 326:658-662.
- [38] Ekobom A, Helmick C, Zack M et al. Ulcerative colitis and colorectal cancer: A population-based study. *N Engl J Med* 1990; 323:1228-1233.
- [39] Greenstein AJ, Sachar DB, Smith H et al. Cancer in universal and left-sided ulcerative colitis: Factors determining risk. *Gastroenterology* 1979; 77:290-294.
- [40] Gillen CD, Walmsley RS, Prior P et al. Ulcerative colitis and Crohn's disease: A comparison of the colorectal risk in extensive colitis. *Gut* 1994; 35:1590-1592.
- [41] Erlinger TP, Platz EA, Rifai N, Helzlsouer KJ. C-reactive protein and the risk of incident colorectal cancer. *JAMA* 2004; 291:585-590.
- [42] Larsson SC, Orsini N, Wolk A. Diabetes mellitus and risk of colorectal cancer: a meta-analysis. *J Natl cancer Inst* 2005; 97:1679-1687.
- [43] Watkins LF, Lewis LR, Levine AE. Characterization of the synergistic effect of insulin and transferrin and the regulation of their receptor on human colon carcinoma cell line. *Int J Cancer* 1990; 45:372-375.
- [44] Ma J, Pollak MN, Giovannuci E et al. Prospective study of colorectal cancer risk in men and plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91:620-625.

- [45] Yang YX, Hennessy S, Lewis JD. Insulin therapy and colorectal cancer risk among type 2 diabetes mellitus patients. *Gastroenterology* 2004; 127:1044-1050.
- [46] Lagergren J, Ye W, Ekblom A. Intestinal cancer after cholecystectomy: Is bile involved in carcinogenesis? *Gastroenterology* 2001; 121:542-547.
- [47] Cho E, Smith-Warner SA, Ritz J et al. Alcohol intake and colorectal cancer: a pooled analysis of 8 cohort studies. *Ann Intern Med* 2004; 140:603-613.
- [48] Harnack L, Jacobs DR Jr, Nicodemus K et al. Relationship of folate, vitamin B-6, vitamin B-12, and methionine intake to incidence of colorectal cancers. *Nutr Cancer* 2002; 43:152-158.
- [49] Giovannuci E, Rimm EB, Ascherio A et al. Alcohol, low-methionine – low-folate diets, and risk of colon cancer in men. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:265-273.
- [50] Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 2003; 348:1625-1638.
- [51] Chan AO, Jim MH, Lam KF et al. Prevalence of colorectal neoplasm among patients with newly diagnosed coronary artery disease. *JAMA* 2007; 298:1412-1419.
- [52] Colangelo LA, Gapstur SM, Gann PH, Dyer AR. Cigarette smoking and colorectal carcinoma mortality in a cohort with long-term follow-up. *Cancer* 2004; 100:288-293.
- [53] Stewart M, Macrae FA, Williams CB. Neoplasia and ureterosigmoidostomy: A colonoscopy survey. *Br J Surg* 1982; 69:414-416.
- [54] Sandler RS, Sandler DP. Radiation-induced cancers of the colon and rectum: Assessing the risk. *Gastroenterology* 1983; 84:51-57.
- [55] Delhougne B, Deneux C, Abs R et al. The prevalence of colonic polyps in acromegaly: A colonoscopic and pathological study in 103 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:3223-3226.
- [56] Chao A, Thun MJ, Conell CJ et al. Meat consumption and risk of colorectal cancer. *JAMA* 2005; 293:172-182.
- [57] Kim YI, Mason JB. Nutritional chemoprevention of gastrointestinal cancers: A critical review. *Nutr Rev* 1996; 54:259-279.
- [58] Terry P, Giovannuci E, Michels KB et al. Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:525-533.
- [59] Slattery ML, Boucher KM, Caan BJ et al. Eating patterns and risk of colon cancer. *Am J Epidemiol* 1998; 148:4-16.
- [60] Negri E, Franceschi S, Parpinel M, La Vecchia C. Fiber intake and risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7:667-671.
- [61] Kim DH, Smith-Warner SA, Spiegelman D et al. Pooled analyses of 13 prospective cohort studies on folate intake and colon cancer. *Cancer Causes Control* 2010; 21:1919-1930.
- [62] Wei EK, Giovannuci E, Selhub J et al. Plasma vitamin B6 and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97:684-692.
- [63] Larsson SC, Bergkvist L, Wolk A. Magnesium intake in relation to risk of colorectal cancer in women. *JAMA* 2005; 293:86-89.
- [64] Colditz GA, Cannuscio CC, Frazier AL. Physical activity and reduced risk of colon cancer: Implications for prevention. *Cancer Causes Control* 1997; 8:649-667.
- [65] Heath CW Jr, Thun MJ, Greenberg EJ et al. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and human cancer. *Cancer* 1994; 74:2885-2888.
- [66] Poynter JN, Gruber SB, Higgins PD et al. Statins and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005; 352:2184-2192.
- [67] Geelen A, Schouten JM, Kamphuis C et al. Fish consumption, n-3 fatty acids, and colorectal cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Am J Epidemiol* 2007; 166:1116-1125.

- [68] Ngo SN, Williams DB, Cobiac L, Head RJ. Does garlic reduce risk of colorectal cancer? A systematic review. *J Nutr* 2007; 137:2264-2269.
- [69] Butler LM, Sinha R, Millikan RC et al. Heterocyclic amines, meat intake, and association with colon cancer in a population-based study. *Am J Epidemiol* 2003; 157:434-445.
- [70] Asano T, McLeod RS. Dietary fibre for the prevention of colorectal adenomas and carcinomas. *Cochrane Database Syst Rev* 2002; CD003430.
- [71] Figueiredo JC, Mott LA, Giovannucci E et al. Folic acid and prevention of colorectal adenomas: a combined analysis of randomized clinical trials. *Int J Cancer* 2011; 129:192-203.
- [72] Cole BF, Baron JA, Sandler RS et al. Folic acid for the prevention of colorectal adenomas: A randomized clinical trial. *JAMA* 2007; 297:2351-2359.
- [73] Winawer SJ, Zauber AG, Gerdes H et al. Risk of colorectal cancer in the families of patients with adenomatous polyps. National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med* 1996; 334:82-87.
- [74] Houlston RS, Webb E, Broderick P et al. Meta-analysis of genom-wide association data identifies four new susceptibility loci for colorectal cancer. *Nat Genet* 2008; 40:1426-1435.
- [75] Dunlop MG, Farrington SM, Nicholl I et al. Population carrier frequency of hMSH2 and hMLH1 mutations. *Br J Cancer* 2000; 83:1643-1645.
- [76] Syngal S, Fox EA, Li C et al. Interpretation of genetic test results for hereditary nonpolyposis colorectal cancer: implications for clinical predisposition testing. *JAMA* 1999; 282:247-253.
- [77] Aarnio M, Sankila R, Pukkala E et al. Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int J Cancer* 1999; 81:214-218.
- [78] Jass JR, Stewart SM. Evolution of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut* 1992; 33:783-786.
- [79] Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260:816-819.
- [80] Iino H, Simms L, Young J et al. DNA microsatellite instability and mismatch repair protein loss in adenomas presenting in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut* 2000; 47:37-42.
- [81] Lynch HT, Watson P, Lanspa SJ et al. Natural history of colorectal cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I and II.) *Dis Colon Rectum* 1988; 31:439-444.
- [82] Vasen HF, Mecklin JP, Watson P et al. Surveillance in hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an international cooperative study of 165 families. The International Collaborative Group on HNPCC. *Dis Colon Rectum* 1993; 36:1-4.
- [83] Hampel H, Frankel WL, Martin E et al. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26:5783-5788.
- [84] Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acid Res* 2002; 30:e57.
- [85] Palomaki GE, McClain MR, Melillo S et al. EGAPP supplementary evidence review: DNA testing strategies aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome. *Genet Med* 2009; 11:42-65.
- [86] Bettstetter M, Dechant S, Ruemmele P et al. Distinction of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and sporadic microsatellite-unstable colorectal cancer through quantification of MLH1 methylation by real-time PCR. *Clin Cancer Res* 2007; 13:3221-3228.
- [87] Kovacs ME, Papp J, Szentirmay Z et al. Deletions removing the last exon of TACSTD1 constitute a distinct class of mutations predisposing to Lynch syndrome. *Human Mutation* 2009; 30:197-203.

- [88] Jarvinen HJ, Mecklin J-P, Sistonen P. Screening reduces colorectal cancer rate in families with hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 1995; 108:1405-1411.
- [89] Burke W, Petersen G, Lynch P et al. Recommendations for follow-up care of individuals with an inherited predisposition to cancer. I. Hereditary nonpolyposis colon cancer. Cancer Genetics Studies Consortium. *Jama* 1997; 277:915-919.
- [90] Lindor N, Rabe K, Petersen G et al. Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. *JAMA* 2005; 293:1979-1985.
- [91] Abel-Rahman W, Ollikainen M, Kariola R et al. Comprehensive characterization of HNPCC-related colorectal cancers reveals striking molecular features in families with no germline mismatch repair gene mutations. *Oncogene* 2005; 24:1542-1551.
- [92] Mueller-Koch Y, Vogelsang H, Kop R et al. Hereditary non-polyposis colorectal cancer: clinical and molecular evidence for a new entity of hereditary colorectal cancer. *Gut* 2005; 54:1733-40.
- [93] Dove-Edwin I, De Jong A, Adams J et al. Prospective results of surveillance colonoscopy in dominant familial colorectal cancer with and without Lynch syndrome. *Gastroenterology* 2006; 130:1995-2000.
- [94] Valle L, Perea J, Carbonell P et al. Clinicopathologic and pedigree differences in Amsterdam-I-positive hereditary nonpolyposis colorectal cancer families according to tumor microsatellite instability status. *J Clin Oncol* 2007; 25:781-786.
- [95] Llor X, Pons E, Xicola R et al. Differential features of colorectal cancers fulfilling Amsterdam Criteria without involvement of the mutation pathway. *Clin Cancer Res* 2005; 11:7304-7310.
- [96] Schwartz RA, Torre DP. The Muir-Torre syndrome – a 25-year retrospect. *J Am Acad Dermatol* 1995; 33:90-104.
- [97] Tanyi M, Olasz J, Lukács G et al. A new mutation in Muir-Torre syndrome associated with familiar transmission of different gastrointestinal adenocarcinomas. *Eur J Surg Oncol* 2009; 35:1128-1230.
- [98] Bulow S, Faurschou Nielsen T, Bulow C et al. The incidence rate of familial adenomatous polyposis. Results from the Danish Polyposis Register. *Int J Colorectal Dis* 1996; 11:88-91.
- [99] Galle TS, Juel K, Bulow S. Causes of death in familial adenomatous polyposis. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34:808-812.
- [100] Winawer SJ, Fletcher RH, Miller L et al. Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rationale. *Gastroenterology* 1997; 112:594-642.
- [101] King JE, Dozois RR, Lindor NM, Ahlquist DA. Care of patients and their families with familial adenomatous polyposis. *Mayo Clin Proc* 2000; 75:57-67.
- [102] Giardiello FM, Hamilton SR, Krush AJ et al. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1993; 328:1313-1316.
- [103] Giardiello FM, Yang VW, Hylind LM et al. Primary chemoprevention of familial adenomatous polyposis with sulindac. *N Engl J Med* 2002; 346:1054-1059.
- [104] Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61:759-767.
- [105] Lamlum H, Ilyas M, Rowan A et al. The type of somatic mutation at APC in familial adenomatous polyposis is determined by the site of the germline mutation: a new facet to Knudson's 'two-hit' hypothesis. *Nat Med* 1999; 5:1071-1075.
- [106] Su LK, Vogelstein B, Kinzler KW. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins *Science* 1993; 262:1734-1737.

- [107] Bienz M, Clevers H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 2000; 103:311-320.
- [108] Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF. The ABC of APC. *Hum Mol Genet* 2001; 10:721-733.
- [109] Uthoff SM, Eichenberger MR, McAuliffe TL et al. Wingless-type frizzled protein receptor signaling and its putative role in human colon cancer. *Mol Carcinog* 2001; 31:56-62.
- [110] Korinek V, Barker N, Morin PJ et al. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/colon carcinoma. *Science* 1997; 275:1784-1787.
- [111] Morin PJ, Sparks AB, Korinek V et al. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997; 275:1787-1790.
- [112] Goss KH, Groden J. Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J Clin Oncol* 2000; 18:1967-1979.
- [113] Kim PJ, Plescia J, Clevers H et al. Survivin and molecular pathogenesis of colorectal cancer. *Lancet* 2003; 362:205-209.
- [114] Forgacs I. Oncogenes and gastrointestinal cancer. *Gut* 1988; 29:417-421.
- [115] Cartwright C. Intestinal cell growth control: Role of Src tyrosine kinases. *Gastroenterology* 1998; 114:1335-1338.
- [116] Hamilton SR. The molecular genetics of colorectal neoplasia. *Gastroenterology* 1993; 105:3-7.
- [117] Kapitanovic S, Radosevic S, Kapitanovic M et al. The expression of p185(HER-2/neu) correlates with the stage of disease and survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1997; 112:1103-1113.
- [118] Irby RB, Mao W, Coppola D et al. Activating SRC mutation in a subset of advanced human colon cancers. *Nat Genet* 1999; 21:187-190.
- [119] Takayama T, Ohi M, Hayashi T et al. Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer and, and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 2001; 121:599-611.
- [120] Shibata D, Schaeffer J, Li ZH et al. Genetic heterogeneity of the c-K-ras locus in colorectal adenomas but not in adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:1058-1063.
- [121] Tortola S, Marcuello E, Gonza'lez I et al. p53 and K-ras gene mutations correlate with tumor aggressiveness but are not of routine prognostic value in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17:1375-1381.
- [122] Shirasawa S, Furuse M, Yokoyama N, Sasazuki T. Altered growth of human colon cancer cell lines disrupted at activated Ki-ras. *Science* 1993; 260:85-88.
- [123] Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319:525-532.
- [124] Pretlow TP, Brasitus TA, Fulton NC et al. K-ras mutations in putative preneoplastic lesions in human colon. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:2004-2007.
- [125] Frattini M, Balestra D, Suardi S et al. Different genetic features associated with colon and rectal carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2004; 10:4015-4021.
- [126] Harada K, Hiraoka S, Kato J et al. Genetic and epigenetic alterations of Ras signalling pathway in colorectal neoplasia: analysis based on tumour clinicopathological features. *Br J Cancer* 2007; 97:1425-1431.
- [127] Giehl K. Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis. *Biol Chem* 2005; 386:193-205.
- [128] Miranda E, Destro A, Malesci A et al. Genetic and epigenetic changes in primary metastatic and nonmetastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2006; 95:1101-1107.
- [129] Fearon ER, Cho KR, Nigro JM et al. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 1990; 247:49-56.

- [130] Thiagalingam S, Lengauer C, Leach FS et al. Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nat Genet* 1996; 13:343-346.
- [131] Cho KR, Oliner JD, Simons JW et al. The DCC gene: structural analysis and mutations in colorectal carcinomas. *Genomics* 1994; 19:525-531.
- [132] Popat S, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of the relationship between chromosome 18q genotype, DCC status and colorectal cancer prognosis. *Eur J Cancer* 2005; 41:2060-2070.
- [133] Sun XF, Rutten S, Zhang H, Nordenskjold B. Expression of the deleted in colorectal cancer gene is related to prognosis in DNA diploid and low proliferative colorectal adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 1999; 17:1745-1750.
- [134] Riggins GJ, Thiagalingam S, Rozenblum E et al. Mad-related genes in the human. *Nat Genet* 1996; 13:347-349.
- [135] Eppert K, Scherer SW, Ozcelik H et al. MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell* 1996; 86:543-552.
- [136] MacGrogan D, Pegram M, Slamon D, Bookstein R. Comparative mutational analysis of DPC4 (Smad4) in prostatic and colorectal carcinomas. *Oncogene* 1997; 15:1111-1114.
- [137] Xie W, Rimm DL, Lin Y et al. Loss of Smad signaling in human colorectal cancer is associated with advanced disease and poor prognosis. *Cancer J* 2003; 9:302-312.
- [138] Soussi T. The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 910:121-137.
- [139] Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM et al. p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 1990; 50:7717-7722.
- [140] Kikuchi-Yanoshita R, Konishi M, Ito S et al. Genetic changes of both p53 alleles associated with the conversion from colorectal adenoma to early carcinoma in familial adenomatous polyposis and non-familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res* 1992; 52:3965-3971.
- [141] Russo A, Bazan V, Iacopetta B et al. The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J Clin Oncol* 2005; 23:7518-7528.
- [142] Kirsch DG, Kastan MB. Tumor-suppressor p53: Implications for tumor development and prognosis. *J Clin Oncol* 1998; 16: 3158-3168.
- [143] Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D et al. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991; 51:6304-6311.
- [144] Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:7491-7495.
- [145] Woods DB, Vousden KH. Regulation of p53 function. *Exp Cell Res* 2001; 264:56-66.
- [146] Mao W, Irby R, Coppola D et al. Activation of c-Src by receptor tyrosine kinases in human colon cancer cells with high metastatic potential. *Oncogene* 1997; 15:3083-3090.
- [147] Kang JL, Jung HJ, Lee K, Kim HR. Src tyrosine kinases mediate crystalline silica-induced NF-kappaB activation through tyrosine phosphorylation of IkappaB-alpha and p65 NF-kappaB in RAW 264.7 macrophages. *Toxicol Sci* 2006; 90:470-477.
- [148] Funakoshi-Tago M, Tago K, Andoh K et al. Functional role of c-Src in IL-1-induced NF-kappa B activation: c-Src is a component of the IKK complex. *J Biochem* 2005; 137:189-197.
- [149] Chung DC, Rustgi AK. DNA mismatch repair and cancer. *Gastroenterology* 1995; 109:1685-1699.

- [150] Herman JG, Umar A, Polyak K et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:6870-6875.
- [151] Kane MF, Loda M, Gaida GM et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res* 1997; 57:808-811.
- [152] Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003; 349:2042-2054.
- [153] Gupta RA, Brockman JA, Sarraf P et al. Target genes of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in colorectal cancer cells. *J Biol Chem* 2001; 276:29681-29687.
- [154] Sarraf P, Mueller E, Smith WM et al. Loss-of-function mutations in PPAR gamma associated with human colon cancer. *Mol Cell* 1999; 3:799-804.
- [155] Gerdes J, Lemke H, Baisch H et al. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133:1710-1715.
- [156] Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol* 1993; 123:513-522.
- [157] Schmidt MHH, Broll R, Bruch H-P et al. The proliferation marker pKi-67 organizes the nucleolus during the cell cycle depending on Ran and cyclin. *B J Pathol* 2003; 199:18-27.
- [158] Duchrow M, Schlüter C, Wohlenberg C et al. Molecular characterization of the gene locus of the human cell proliferation-associated nuclear protein defined by monoclonal antibody Ki-67. *Cell Prolif* 1996; 29:1-12.
- [159] Tefferi A, Gilliland DG. Oncogenes in myeloproliferative disorders. *Cell Cycle* 2007; 6:550-566.
- [160] James C, Ugo V, Couédis JPL et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005; 434:1144-1148.
- [161] Tefferi A, Gilliland G. The JAK2 v617F tyrosine kinase mutation in myeloproliferative disorders: status report and immediate implications for disease classification and diagnosis. *Mayo Clinic Proceedings* 2005; 80:947-958.
- [162] Tefferi A. JAK and MPL mutations in myeloid malignancies. *Leukemia & Lymphoma* 2008; 49:388-397.
- [163] Lucet IS, Fantino E, Styles M et al. The structural basis of Janus kinase 2 inhibition by a potent and specific pan-Janus kinase inhibitor. *Blood* 2006; 107:176-183.
- [164] Nelson ME, Steensma DP. JAK2 V617F in myeloid disorders: What do we know now, and where are we headed. *Leukemia & Lymphoma* 2006; 47:177-194.
- [165] Lee JW, Hwa YS, Kim SY et al. JAK2 V617F mutation is uncommon in non-Hodgkin lymphomas. *Leukemia and Lymphoma* 2006; 47:313-314.
- [166] Campbell PJ, Gresshammer M, Döhner K et al. V617F mutation in JAK2 associated with poorer survival in idiopathic myelofibrosis. *The American Society of Hematology* 2006; 107:2098-2100.
- [167] Levine RL, Loriaux M, Huntly BJP et al. The Jak2 V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. *The American Society of Hematology* 2005; 106:3377-3379.
- [168] Kappelmayer J, Udvardy M, Antal-Szalmás P. Pgp and FLT3: identification and modulation of two proteins that lead to chemotherapy resistance in acute myeloid leukemia. *Curr Med Chem* 2007; 14:519-530.
- [169] Nakao M, Yokota S, Iwai T et al. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996; 10:1911-1918.

- [170] Schmidt-Arras D, Schwäble J, Böhmer FD, Serve H. Flt3 receptor tyrosine kinase as a drug target in leukemia. *Curr Pharm Des* 2004; 10:1867-1883.
- [171] Tanyi M, Olasz J, Lukács G et al. Pedigree and genetic analysis of a novel mutation carrier patient suffering from hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12:1192-1197.
- [172] Tanyi M, Olasz J, Kámory E et al. Difficulties in recognizing families with Hereditary Non-polyposis Colorectal Carcinoma. Presentation of 4 families with proven mutation. *Eur J Surg Oncol* 2008; 34:1322-1327.
- [173] Tanyi M, Olasz J, Lukács G et al. A new mutation in Muir-Torre syndrome associated with familial transmission of different gastrointestinal adenocarcinomas. *Eur J Surg Oncol* 2009; 35:1128-1130.
- [174] Vardiman JW. The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: an overview with emphasis on the myeloid neoplasms. *Chem Biol Interact* 2010; 184:16-20.
- [175] Abdel-Rahman WM, Peltomäki P. Lynch syndrome and related familial colorectal cancers. *Crit Rev Oncog* 2008; 14:1-22.
- [176] Lindor NM. Familial colorectal cancer type X: the other half of hereditary nonpolyposis colon cancer syndrome. *Surg Oncol Clin N Am* 2009; 18:637-645.
- [177] Duchrow M, Schllüter C, Key G et al. Cell proliferation associated nuclear antigen defined by antibody Ki-67: a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1995; 43:117-21.
- [178] Gerdes J, Li L, Schlüter C et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol*, 1991; 138:867-873.
- [179] Schmidt MHH, Broll R, Bruch HP et al. Proliferation marker pKi-67 occurs in different isoforms with various cellular effects. *J Cell Biochem* 2004; 91:1280-1292.
- [180] Muñoz L, Aventín A, Villamor N et al. Immunophenotypic findings in acute myeloid leukemia with FLT3 internal tandem duplication. *Haematologica* 2003 ;88:637-645.
- [181] Shih LY, Huang CF, Wu JH et al. Internal tandem duplication of FLT3 in relapsed acute myeloid leukemia: a comparative analysis of bone marrow samples from 108 adult patients at diagnosis and relapse. *Blood* 2002; 100:2387-2392.
- [182] Shih LY, Kuo MC, Liang DC et al. Internal tandem duplication and Asp835 mutations of the FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) gene in acute promyelocytic leukemia. *Cancer* 2003; 98:1206-1216.
- [183] Stirewalt DL, Meshinchi S, Kussick SJ et al. Novel FLT3 point mutations within exon 14 found in patients with acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2004; 124: 481-484.
- [184] Stirewalt DL, Willman CL, Radich JP. Quantitative, real-time polymerase chain reactions for FLT3 internal tandem duplications are highly sensitive and specific. *Leuk Res* 2001; 25:1085-1088.
- [185] Lin P, Jones D, Medeiros LJ et al. Activating FLT3 mutations are detectable in chronic and blast phase of chronic myeloproliferative disorders other than chronic myeloid leukemia. *Am J Clin Pathol* 2006; 126:530-533.
- [186] Shih LY, Huang CF, Wang PN et al. Acquisition of FLT3 or N-ras mutations is frequently associated with progression of myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2004; 18:466-475.
- [187] Lin MT, Rich RG, Shipley RF et al. A molecular fraction collecting tool for the ABI 310 automated sequencer. *J Mol Diagn* 2007; 9:598-603.
- [188] Ravandi F, Kantarjian H, Faderl S et al. Outcome of patients with FLT3-mutated acute myeloid leukemia in first relapse. *Leuk Res* 2010; 34:752-756.

- [189] Cloos J, Goemans BF, Hess CJ et al. Stability and prognostic influence of FLT3 mutations in paired initial and relapsed AML samples. *Leukemia* 2006; 20:1217-1220.
- [190] Zwaan CM, Meshinchi S, Radich JP et al. FLT3 internal tandem duplication in 234 children with acute myeloid leukemia: prognostic significance and relation to cellular drug resistance. *Blood* 2003; 102:2387-2394.
- [191] Huang Q, Chen W, Gaal KK et al. A rapid, one step assay for simultaneous detection of FLT3/ITD and NPM1 mutations in AML with normal cytogenetics. *Br J Haematol* 2008; 142:489-492.
- [192] Murphy KM, Levis M, Hafez MJ et al. Detection of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations by a multiplex polymerase chain reaction and capillary electrophoresis assay. *J Mol Diagn* 2003; 5:96-102.
- [193] Libura M, Asnafi V, Tu A et al. FLT3 and MLL intragenic abnormalities in AML reflect a common category of genotoxic stress. *Blood* 2003; 102:2198-2204.
- [194] Mills KI, Gilkes AF, Walsh V et al. Rapid and sensitive detection of internal tandem duplication and activating loop mutations of FLT3. *Br J Haematol* 2005; 130:203-208.
- [195] Thiede C, Steudel C, Mohr B et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 2002; 99:4326-4335.
- [196] Meshinchi S, Stirewalt DL, Alonzo TA et al. Structural and numerical variation of FLT3/ITD in pediatric AML. *Blood* 2008; 111:4930-4933.
- [197] Gale RE, Green C, Allen C et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*; 2008; 111: 2776-2784.
- [198] Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* 2001; 98:1752-1759.
- [199] Kayser S, Schlenk RF, Londono MC et al. Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome. *Blood* 2009; 114: 2386-2392.
- [200] Seedhouse CH, Pallis M, Grundy M et al. FLT3-ITD expression levels and their effect on STAT5 in AML with and without NPM mutations. *Br J Haematol* 2009; 147:653-661.
- [201] Ahmad F, Mandava S, Das BR. Analysis of FLT3-ITD and FLT3-Asp835 mutations in de novo acute myeloid leukemia: evaluation of incidence, distribution pattern, correlation with cytogenetics and characterization of internal tandem duplication from Indian population. *Cancer Invest* 2010; 28:63-73.
- [202] Ciolli S, Vannucchi AM, Leoni F et al. Internal tandem duplications of Flt3 gene (Flt3/ITD) predicts a poor post-remission outcome in adult patients with acute non-promyelocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2004; 45:73-78.
- [203] Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S et al. Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2006; 107:3724-3726.
- [204] Schnittger S, Schoch C, Dugas M et al. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood* 2002; 100:59-66.
- [205] Meshinchi S, Alonzo TA, Stirewalt DL et al. Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML. *Blood* 2006; 108:3654-3661.

- [206] Liang DC, Shih LY, Hung IJ et al. Clinical relevance of internal tandem duplication of the FLT3 gene in childhood acute myeloid leukemia. *Cancer* 2002; 94:3292-3298.
- [207] Chillón MC, Santamaría C, García-Sanz R et al. Long FLT3 internal tandem duplications and reduced PML-RAR α expression at diagnosis characterize a high-risk subgroup of acute promyelocytic leukemia patients. *Haematologica* 2010; 95:745-751.
- [208] Noguera NI, Ammatuna E, Zangrilli D et al. Simultaneous detection of NPM1 and FLT3-ITD mutations by capillary electrophoresis in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2005; 19:1479-1482.
- [209] Knapper S, Mills KI, Gilkes AF et al. The effects of lestaurtinib (CEP701) and PKC412 on primary AML blasts: the induction of cytotoxicity varies with dependence on FLT3 signaling in both FLT3-mutated and wild-type cases. *Blood* 2006; 108:3494-3503.
- [210] Whitman SP, Archer KJ, Feng L et al. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Res* 2001; 61:7233-7239.
- [211] DeAngelo DJ, Stone RM, Heaney ML et al. Phase 1 clinical results with tandutinib (MLN518), a novel FLT3 antagonist, in patients with acute myelogenous leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome: safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Blood* 2006; 108:3674-3681.
- [212] Brown P, Meshinchi S, Levis M et al. Pediatric AML primary samples with FLT3/ITD mutations are preferentially killed by FLT3 inhibition. *Blood* 2004; 104:1841-1849.
- [213] Whitman SP, Maharry K, Radmacher MD et al. FLT3 internal tandem duplication associates with adverse outcome and gene- and microRNA-expression signatures in patients 60 years of age or older with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood* 2010; 116:3622-3626.
- [214] Jeong EG, Kim MS, Nam HK et al. Somatic mutations of JAK1 and JAK3 in acute leukemias and solid cancers. *Clin Cancer Res* 2008; 14:3716-3721.
- [215] Bardelli A, Parsons DW, Silliman N et al. Mutational analysis of the tyrosine kinome in colorectal cancers. *Science* 2003; 300:949.
- [216] Greenman C, Stephens P, Smith R et al. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 2007; 446:153-158.
- [217] Lee JW, Kim YG, Soung YH et al. The JAK2 V617F mutation in de novo acute myelogenous leukemias. *Oncogene* 2006; 25:1434-1436.
- [218] Herreros-Villanueva M, Garcia-Giron C, Er TK. No evidence for JAK2 V617F mutation in colorectal cancer. *Br J Biomed Sci* 2010; 67:220-222.
- [219] Motté N, Saulnier P, Le Couedic JP et al. Mutations in JAK2V617F homologous domain of JAK genes are uncommon in solid tumors. *Int J Cancer* 2007; 121:2113-2115.
- [220] Scott LM, Campbell PJ, Baxter EJ et al. The V617F JAK2 mutation is uncommon in cancers and in myeloid malignancies other than the classic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005; 106:2920-2921.
- [221] Passamonti F, Elena C, Schnittger S et al. Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. *Blood* 2011; 117:2813-2816.
- [222] Lucia E, Martino B, Mammi C et al. The incidence of JAK2 V617F mutation in bcr/abl-negative chronic myeloproliferative disorders: assessment by two different detection methods. *Leuk Lymphoma* 2008; 49:1907-1915.
- [223] Yoo JH, Park TS, Maeng HY et al. JAK2 V617F/C618R mutation in a patient with polycythemia vera: a case study and review of the literature. *Cancer Genet Cytogenet* 2009; 189:43-47.

[224] Lavagna C, Marchetto S, Birnbaum D, Rosnet O. Identification and characterization of a functional murine FLT3 isoform produced by exon skipping. *J Biol Chem* 1995; 270:3165-3171.

[225] deLapeyrière O, Naquet P, Planche J et al. Expression of *Flt3* tyrosine kinase receptor gene in mouse hematopoietic and nervous tissues. *Differentiation* 1995; 58:351-359.

12. Az értekezés alapjául szolgáló, illetve egyéb saját közlemények



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK/297/2012.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Bubán Tamás

Neptun kód: UBS096

Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Bubán, T.**, Koczok, K., Földesi, R., Szabó, G., Sümegei, A., Tanyi, M., Szerafin, L., Udvardy, M., Kappelmayer, J., Antal-Szalmás, P.: Detection of internal tandem duplications in the FLT3 gene by different electrophoretic methods.
Clin. Chem. Lab. Med. 50 (2), 301-310, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/CCLM.2011.762>
IF:2.15
2. **Bubán T.**, Tóth L., Tanyi M., Kappelmayer J., Antal-Szalmás P.: Ki-67: Egy régi játékos új arcai.
Orvosi Hetilap. 150 (23), 1059-1070, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2009.28638>
3. **Bubán, T.**, Schmidt, M., Broll, R., Antal-Szalmás, P., Duchrow, M.: Detection of mutations in the cDNA of the proliferation marker Ki-67 protein in four tumor cell lines.
Cancer Genet. Cytogenet. 149 (1), 81-84, 2004.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-4608\(03\)00297-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-4608(03)00297-8)
IF:1.577



További Közlemények

4. Tanyi, M., Olasz, J., Tanyi, J.L., Tóth, L., Antal-Szalmás, P., **Bubán, T.**, András, C., Urbancsek, H., Garami, Z., Csuka, O., Damjanovich, L.: Q48P mutation in the hMLH1 gene associated with Lynch syndrome in three Hungarian families.
Fam. Cancer. 11 (3), 519-524, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10689-012-9515-9>
IF:1.302 (2011)
5. Tanyi, M., Olasz, J., Lukács, G., Tanyi, J.L., Tóth, L., Antal-Szalmás, P., Rész, Z., **Bubán, T.**, András, C., Damjanovich, L.: A new mutation in Muir-Torre syndrome associated with familial transmission of different gastrointestinal adenocarcinomas.
Eur. J. Surg. Oncol. 35 (10), 1128-1130, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejso.2009.03.011>
IF:2.564
6. Bodnár, Z., **Bubán, T.**, Várvolgyi, C.: Submucosal tumor-like gastric wall abscess.
Gastrointest. Endosc. 59 (4), 599-599, 2004.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0016-5107\(03\)02724-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0016-5107(03)02724-X)
7. Várvolgyi, C., **Bubán, T.**, Szakáll, S., Hargitai, Z., Galuska, L., Jeney, C., Kakuk, G., Gaál, J.: Fever of unknown origin with seronegative spondyloarthritis: An atypical manifestation of Whipple's disease.
Ann. Rheum. Dis. 61 (4), 377-378, 2002.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/ard.61.4.377>
IF:3.593
8. Várvolgyi C., Mátyus J., Balogh Z., Bodnár Z., **Bubán T.**, Kakuk G.: Szűrővizsgálatok a gastroduodenalis fekélybetegség kockázatának felmérésére vesetranszplantációs listán lévő betegekben.
Magyar Belorv. Arch. 52 (4), 339-344, 1999.



Összesített impakt faktor: 11.186

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 3.727

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudánymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.10.10



13. Tárgyszavak / Keywords

Vastagbél daganat, Lynch szindróma, Familiáris vastagbél daganat X típus, genetikai eltérés, Ki-67, FLT3-ITD, FLT3-TKD, JAK2 V617F

Colon cancer, Lynch syndrome, Familial colorectal cancer type X, genetic alteration, Ki-67, FLT3-ITD, FLT3-TKD, JAK2 V617F

14. Köszönetnyilvánítás

Hálásan köszönöm témavezetőmnek, Dr. Antal-Szalmás Péter Tanár úrnak a szakmai vezetést, a tudományos munkában, az eredmények értelmezésében és publikálásában nyújtott nélkülözhetetlen irányítását.

Köszönöm Dr. Kappelmayer János Professzor úrnak, hogy lehetővé tette, hogy a Laboratóriumi Medicina Intézetben írhattam meg Ph.D. dolgozatomat.

Külön köszönet illeti az LMI-ben dolgozó asszisztensnőket: Szabó Gabriellát és Vargáné Földesi Rózát.

Köszönettel tartozom a munkám során nyújtott szakmai segítségért, adatok szolgáltatásáért a klinikus kollégáknak, mindenek előtt Dr. Tanyi Miklós Adjunktus úrnak és Dr. Damjanovich László Professzor úrnak valamint Dr. Udvardy Miklós Professzor úrnak, Dr. Batár Péter Adjunktus úrnak és Dr. Szerafín László Főorvos úrnak.

Külön köszönet illeti a DEOEC Patológiai Intézetében Dr. Méhes Gábor Tanár urat és Dr. Tóth László Adjunktus urat a betegek mintáinak előkészítéséért és az immunhisztokémiai vizsgálatok elvégzéséért.

Hálásan köszönöm az Országos Onkológiai Intézetben dolgozó Dr. Olasz Judit segítségét, aki az MLH1 és MSH2 gének mutáció analízisét végezte el.

Köszönet illeti Dr. Leövey András Professzor urat, aki bizalmat szavazott nekem, hogy az I. sz. Belklinikára kerülhessek, Dr. Kakuk György Professzor urat, aki lehetővé tette, hogy a Belklinikán státuszba vegyenek, Dr. Nagy Endre Professzor urat, aki hozzásegített a lübecki ösztöndíj-lehetőséghez, és Dr. Paragh György Professzor urat, aki biztosította a kutatómunkához szükséges időt. Köszönöm munkatársaimnak, Dr. Várvölgyi Csaba Főorvos úrnak, Dr. Balogh Zoltán Tanár úrnak és Dr. Bodnár Zoltán Főorvos úrnak munkahelyi támogatásukat, a távollétemben végzett extramunkájukat.

Hálásan köszönöm a Lübecki Egyetem Sebészeti Kutatólaboratórium vezetőjének, Dr. Rainer Broll Professzor úrnak és munkatársainak, Dr. Michael Duchrownak[†], Dr. Mirko Schmidtnek, Vera Groblebennek, Regina Kaatznak, Elke Geribinek és Gisela Grosser-Papenak az ösztöndíj ideje alatt Németországban nyújtott szakmai, technikai segítségért, emberi támogatásukért.

Külön köszönöm a családom, feleségem, két gyermekem és szüleim türelmét és támogatását, akik nélkülözni voltak kénytelenek az ösztöndíj, a labormunka és a közlemények megírása idején.

A disszertáció elkészítését a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0025 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

