

سه موتاسیون ژرم لاین جدید در ژن MLH1 در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال ارثی

دکتر مهدی منتظر حقیقی^{*}، دکتر سیدرضا محبی^۱، نرگس زالی^۱، دکتر مهسا مولایی^۱،
دکتر محمدرضا زالی^۱

^۱ مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: در اکثر موارد *Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer (HNPCC)* به عنوان یکی از انواع ارثی سرطان کولورکتال موتاسیون در یکی از ژن های مسوؤل ترمیم اتصالات نادرست در ژنوم با نام های *MSH2*، *MLH1*، *MSH6* و *PMS2* قابل تشخیص است. در این مطالعه، میزان نقش موتاسیون های این ژن ها در ایجاد *HNPCC* در جمعیت ایرانی بررسی شد. **روش بررسی:** در ۵۹۲ بیمار مبتلا به *HNPCC* بخش های کد کننده ژن ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر یافتند و توالی یابی شدند. علاوه بر آن ناپایداری توالی های تکراری درون ژنوم با استفاده از مارکرهای اختصاصی نیز بررسی شد. **یافته ها:** سه موتاسیون ژرم لاین جدید برای اولین بار در ژن *MLH1* تعیین شد. اولین موتاسیون یک جهش متقاطع *(Transversion) (c.364A>C)* بود که سبب تغییر اسید آمینه ترئونین به پرولین در کدون ۱۱۶ شده بود. این کدون در منطقه شدت حفظ شده بخش *HATPase* پروتئین *MLH1* قرار دارد. دومین موتاسیون نیز یک موتاسیون *transversion* بود که در موقعیت ۷۳۶ باعث تغییر نوکلئوتید آدنین به تیمین و در نتیجه سبب تغییر اسید آمینه ایزولوسین به لوسین شده بود. سومین جهش یک موتاسیون تغییر قاب (فریم شیفت) بود که با حذف ۲ نوکلئوتید تیمین و گوانین باعث ایجاد یک کدون خاتمه زود هنگام در ۵ کدون پایین دست ژن شده بود. با ایجاد این موتاسیون فریم شیفت، ۵ اسید آمینه پایین دست موتاسیون تغییر کرده بود که متعاقباً سبب ایجاد کدون خاتمه زود هنگام شده بود. یکی از بیماران از نظر مارکرهای توالی های تکراری دارای پایداری بود، در حالیکه بیمار دیگر ناپایداری در مارکرهای توالی های تکراری را نشان می داد. **نتیجه گیری:** بنظر می رسد که موتاسیون های ژرم لاین جدید ممکن است یک ویژگی منحصر بفرد برای تشخیص و تعیین افراد مبتلا به *HNPCC* در جمعیت ایرانی باشد که در جمعیت های دیگر دیده نشده است. **واژگان کلیدی:** سرطان کولورکتال ارثی (*HNPCC*)، ژن *MLH1*، موتاسیون و ناپایداری توالی های تکراری (*MSI*).

مقدمه

(syndrome) یک بیماری با الگوی توارثی اتوزومال غالب است که با تهاجم اولیه در سن پایین همراه می باشد. *HNPCC* حدود ۱۰-۵ درصد کل سرطان های کولورکتال را در بر می گیرد (۵-۱). *HNPCC* با موتاسیون هایی که در ژن های مسوؤل ترمیم ژنوم یعنی *MSH6*، *PMS2*، *MSH2* و *MLH1* رخ می دهند، ایجاد می شود و تاکنون بیش از ۳۰۰ موتاسیون مختلف در این ژن ها در جوامع گوناگون گزارش شده است

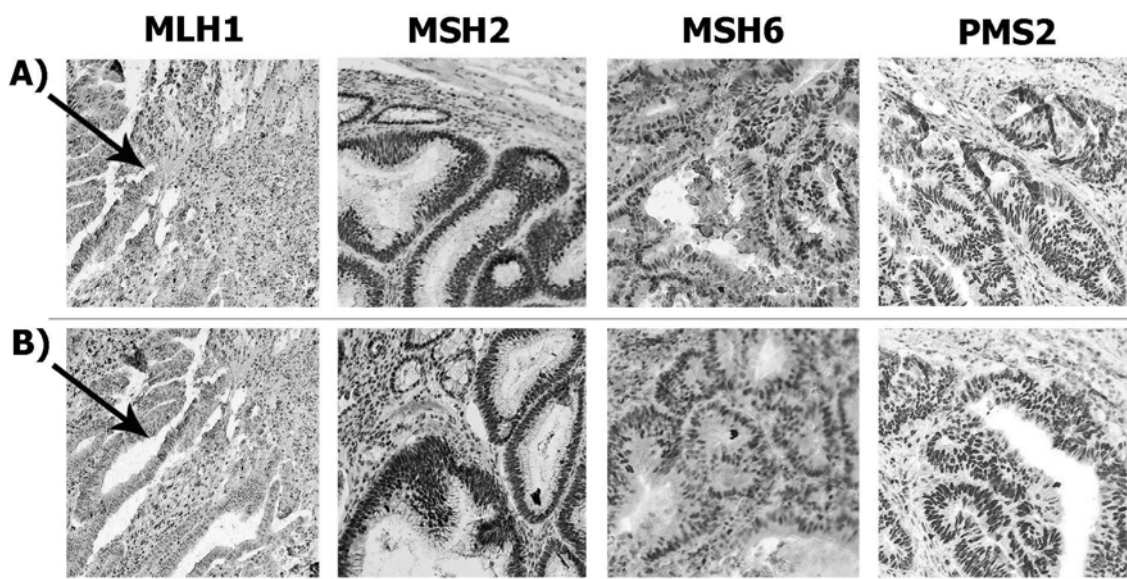
سرطان کولورکتال ارثی (*Hereditary Non Polyposis*)
[HNPCC] Colorectal Cancer) یا سندرم لینچ (*Lynch*)

^{*} آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دکتر

مهدی منتظر حقیقی (e-mail:mah_haghighi@hotmail.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۷/۷

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۷/۱۱/۱۹



شکل ۱- رنگ آمیزی ایمونوهیستوستو شیمی.

(A) بیمار با دو جهش بی معنی missense در اگزونهای ۴ و ۹ ژن MLH1 که فقدان بیان برای پروتئین MLH1 را نشان می دهد و میزان بیان نرمال برای پروتئین های دیگر ژنهای ترمیمی می باشد. (B) نشان دهنده بیمار با موتاسیون تغییر قاب در اگزون ۱۹ ژن MLH1 که دارای عدم بیان برای پروتئین MLH1 ونتیجتا فاقد رنگ پذیری هسته ها بود ولی برای دیگر پروتئین ها IHC نرمال داشت.

گرفته شدند. از کلیه بیماران و شاهد ها رضایت نامه کتبی اخذ و در مورد نحوه استفاده از نتایج و داوطلبانه بودن حق شرکت یا عدم شرکت در این مطالعه توضیح داده شد. فرم رضایت نامه اخلاقی شرکت افراد در مطالعه توسط کمیته اخلاق مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تصویب و مورد استفاده قرار گرفت. کلیه بیماران توسط پزشک آموزش دیده مورد مشاوره قرار گرفته و اطلاعات دموگرافیک، بالینی و شرح حال از ایشان کسب گردیده و در فرم های اطلاعاتی مربوطه وارد گردید.

استخراج DNA از ۱۰ سی سی خون محیطی مطابق روش استاندارد استخراج فنل- کلروفرم صورت گرفت و برای استخراج DNA از بلوک های پارافینی، ۳ برش با ضخامت ۱۰ میکرومتر انتخاب شد و از کیت QIAamp DNA Mini kit (ساخت کمپانی QIAGEN کشور آلمان) به منظور استخراج DNA از بافت استفاده شد. DNA های استخراج شده در دمای منفی ۲۰ نگهداری شدند تا بقیه مراحل تحقیقات بر روی آنها انجام شود.

در بررسی پاتولوژی، اندازه تومورها با اندازه گیری بزرگ ترین قطر تومورها بر حسب سانتی متر به دست آمد. تومورهایی که از سکوم تا خم طحالی بودند، به عنوان پروگزیمال و آنهایی که در کولون نزولی تا انتهای رکتوم بودند دیستال در نظر گرفته

(۶،۷). علاوه بر این ناپایداری توالی های تکراری در ژنوم در بعضی از افراد مبتلا به HNPCC نیز گزارش شده است که این تغییر نیز می تواند ملاکی برای تشخیص ژنتیکی این افراد فراهم کند. انواع و محل موتاسیون ها در ژن های MMR و تغییرات مرتبط با توالی های تکراری در بین جوامع مختلف، متفاوت می باشد. بنابراین از همین شاخص ها می توان برای تشخیص افراد مبتلا در هر جمعیتی استفاده کرد (۸-۱۲). هدف از انجام این تحقیق تعیین موتاسیون ها در ژن های سیستم ترمیم ژنوم و بررسی ناپایداری توالی های تکراری در ژنوم افراد مبتلا به سرطان کولورکتال مراجعه کننده به مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد بیمارستان طالقانی طی سال های ۱۳۸۳ تا ۱۳۸۶ بود.

مواد و روشها

تحقیق به روش توصیفی از نوع اکتشافی انجام گرفت. نمونه های خون برای بررسی موتاسیون های ژن ها و بلوک های پارافینی برای آنالیز ناپایداری توالی های تکراری MSI در ۵۹۲ بیمار مبتلا به HNPCC استفاده شد و نمونه های خون و بلوک پارافینی ۲۴۸ فرد مراجعه کننده طی همین زمان که کولونوسکوپی نرمال داشتند، به عنوان نمونه های شاهد در نظر

جدول ۱- توالی های پرایمرهای مارکرها برای آنالیز MSI

نام مارکر	ژن	شماره Genbank	تکرار نوکلئوتید	توالی پرایمر	سایز قطعه تکثیر شده (bp)
NR-27	Inhibitor of apoptosis protein-1	AF070674	27 A 5'UTR	F: AACCATGCTTGCAAACCACT R: CGATAATACTAGCAATGACC	۸۷
NR-21	SLC7A8	XM 033393	21 T 5'UTR	F: GAGTCGCTGGCACAGTTCTA R: CTGGTCACTCGCGTTTACAA	۱۰۹
NR-24	Zinc finger 2	X60152	24 T 3'UTR	F: GCTGAATTTTACCTCCTGAC R: ATTGTGCCATTGCATTCCAA	۱۳۱
BAT-25	c-kit	X06182	25 T intron 16	F: TACCAGGTGGCAAAGGGCA R: TCTGCATTTTAACTATGGCTC	۱۵۳
BAT-26	hMSH2	U04045	26 A intron 5	F: CTGCGGTAATCAAGTTTTTATAG R: AACCATTCAACATTTTAAACC	۱۸۳

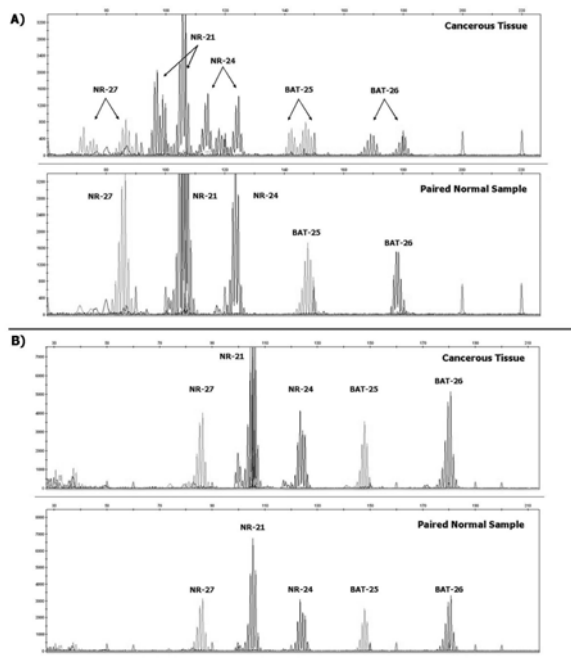
جدول ۲- توالی پرایمرهای PCR

ژن و اگزون	اندازه اگزون (bp)	طول پرایمر (mer)	Ta (°C)	سایز قطعه تکثیر شده (bp)	Primers Sequence
۱-اگزون-MLH1	۷۰	۲۲	۶۱/۸	۴۷۹	F: TTCAGATAACCTTTCCCTTTGG R: AGCAATACCCCAACTGAAGG
۹-اگزون-MLH1	۱۱۰	۲۲	۶۵/۶	۳۳۵	F: AATGGATGGATGAATGGACAGG R: GTGGGTGTTTCTGTGAGTGG
۱۹-اگزون-MLH1	۱۶۸	۲۱	۵۶/۳	۳۹۷	F: AAAAAATCCTCTTGTGTTTTCAG R: GGAATACAGAGAAAGAAGAACAC

جهت سنجش MSI، بررسی ناپایداری توالی های تکراری بر روی DNA بافت تومورال و DNA ژنومیک استخراج شده از خون همان فرد به عنوان نمونه شاهد انجام گرفت. برای این منظور ۵ جایگاه ژنی با استفاده از مارکرهای ارائه شده توسط انستیتو سرطان آمریکا (BAT26, BAT25, NR-24, NR-21, NR-27) مورد بررسی قرار گرفت. مشخصات کامل مارکرها در جدول ۱ ارائه شده است. برای بررسی ناپایداری بافت های توموری از واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) مطابق روش انستیتو سرطان آمریکا استفاده شد و طبقه بندی میزان ناپایداری مارکرها بر اساس سه الگوی ۱- ناپایداری کم توالی های تکراری، ۲- ناپایداری شدید توالی های تکراری و ۳- پایداری توالی های تکراری انجام شد. بطوری که اگر فردی از ۵ مارکر استفاده شده برای بیش از یک مارکر ناپایدار باشد، آن فرد جزو گروه ناپایداری شدید توالی های تکراری (MSI-high) محسوب می شود و اگر یکی از مارکرها ناپایدار باشد آن شخص جزو گروه ناپایداری کم توالی های تکراری (MSI-low) به حساب می آید. اگر فردی برای هیچ کدام از مارکرها ناپایداری نشان نمی داد، آن شخص به عنوان فردی که دارای توالی های تکراری پایدار است (Microsatellit Stability) شناخته می شود (۱۶، ۱۸).

شدند (۱۳). نوع پاتوژنیک تومور، Staging و Grading تومور با بررسی مجدد میکروسکوپی لام های اولیه تأیید شدند. Grading براساس طبقه بندی بافت شناسی سازمان بهداشت جهانی (WHO) تعیین گردید. تومورها با ساختمان غددی منظم به عنوان خوب تمایز یافته (Well differentiated)، آنهایی که ساختمانی مابین خوب و تمایز یافته ضعیف داشتند به عنوان تمایز یافته متوسط (Moderate differentiated) و آنهایی که اکثراً Soild / trabecular داشتند و یا حاوی سلول های مترشحه بودند به عنوان تمایز یافته ضعیف (Poorly differentiated) در نظر گرفته شدند (۱۴). از رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی برای بررسی بیان پروتئین های MSH6، MLH1، MSH2 و PMS2 روی همه بیماران با استفاده از آنتی بادی های اختصاصی انجام شد. تمام مواردی که نقص در بیان حداقل یکی از پروتئین های MMR (Mismatch repair) را داشتند، برای آنالیز MSI و بررسی ژنوتیپ به بخش ژنتیک ارجاع داده شدند. شکل ۱ فقدان بیان پروتئین MLH1 را در دو بیمار نشان می دهد. رنگ آمیزی لامها به منظور آنالیز IHC و بررسی بیان پروتئین ها مطابق روش Envision انجام شد (۱۵).

تغییر اسید آمینه ایزولوسین به لوسین در کدون ۲۴۶ پلی‌پپتید MLH1 شده بود.



شکل ۲- آنالیز ناپایداری توالی های تکراری. (برای هر بیمار دو پانل وجود دارد.)
 بافت سرطانی در بالا و نمونه نرمال که به عنوان شاهد در پایین تصویر قرار گرفته است. شکل A: آنالیز MSI برای بیمار با دو موتاسیون بی معنی ژرم لاین در اگزون های ۹ و ۴ ژن MLH1 می باشد که این بیمار برای هر ۵ مارکر، نا پایداری نشان می داد بنابراین دارای MSI-High می باشد. شکل B: آنالیز MSI برای بیمار با موتاسیون در اگزون ۱۹ ژن MLH1 که دارای MSI کاملا نرمال می باشد. به عبارت دیگر دارای پایداری در این توالی های تکراری می باشد.

سومین موتاسیون یک موتاسیون فریم شیفت (تغییر قاب: Frame shift) با حذف دو نوکلئوتید گوانین و تیمین در موقعیت های ۶ و ۲۱۴۵ بود که سبب تغییر اسید آمینه در کدونهای ۷۱۵ و ۷۱۶ اگزون ۱۹ پلی پپتید MLH1 شده بود. در تمام موتاسیون ها توالی یابی دو طرفی صورت گرفت تا از وجود موتاسیون اطمینان حاصل شود (شکل ۳).

در تعیین محل موتاسیون ها، شماره گذاری نوکلئوتیدها بر اساس توالی cDNA MLH1 با شماره دستیابی ژن (NM-000249) و (gi: 28559089) و وجود نوکلئوتید آدنین (A) در کدون آغازی ATG در موقعیت ۶۱ انجام پذیرفت. فهرست موتاسیون هایی که توسط سایت HGVS ارائه شده است، نشان می دهد که شماره نوکلئوتید آدنین (A) در کدون آغازی

در بررسی موتاسیون های ژرم لاین، مناطق کد کننده و نواحی بین اگزون ها و اینترون های ژن MLH1 بوسیله PCR طبق روش های ارائه شده قبلی تکثیر شدند (۱۹). توالی پرایمرهایی که برای تکثیر اگزون های ۴، ۱۹ و ۹ استفاده شدند در جدول ۲ آمده است. قطعات تکثیر شده از هر اگزون به منظور اطمینان بیشتر بصورت دو طرفی توالی یابی شدند و توالی یابی با استفاده از دستگاه Sequencing (مدل XL ۳۱۳۰، ساخت کمپانی ABI کشور آمریکا) انجام شد.

یافته ها

بیمار اول، خانم ۵۲ ساله ای با شماره F ۸۳۲۰۳۷ بود که در طی یک کولونوسکوپی روتین بیماری او مشخص گردید. این فرد در خم طحالی دارای یک توده به قطر ۵/۵ سانتی متر با تشخیص آدنوکارسینومای خوب تمایز یافته بود. در این شخص متاستاز به غدد لنفاوی مشاهده نشد (P61(SM1) PNO, MO) و از نظر تقسیم بندی TNM، کلاس این تومور IIA تعیین گردید. بیمار شاخص های بتسدا (Bethesda) و آمستردام (Amsterdam II) را بطور کامل نشان می داد.

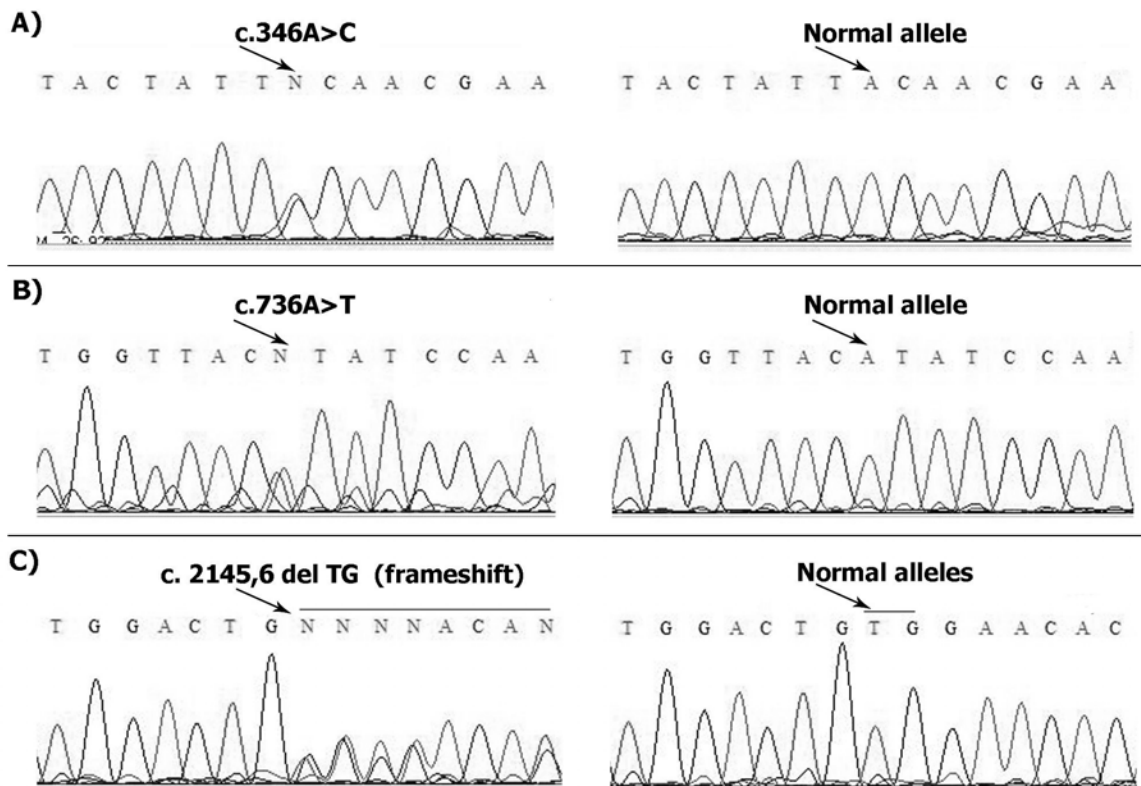
بیمار دوم، آقای ۵۲ ساله ای با شماره A ۸۳۱۸۴۷ بود که شاخص های بتسدا و آمستردام II را داشت و با کارسینوما در کولون صعودی به قطر ۹/۹ سانتی متر مراجعه کرد. تومور وی در طبقه بندی TNM بصورت pT3,pN0,M0 تعیین گردید. این بیمار با همی کولکتومی طرف راست درمان شد.

بررسی بیان پروتئین های MSH6, PMS2, MSH2 و MLH1 با رنگ آمیزی ایمنو هیسیتوشیمی (IHC) برای هر دو بیمار انجام شد. هر دو بیمار عدم بیان پروتئین های MMR را نشان دادند.

در بررسی ناپایداری توالی های تکراری، بعد از این که ۵ مارکر برای دو بیماری که دارای موتاسیون جدید بودند مورد ارزیابی قرار گرفتند، مشخص شد بیمار واجد دو موتاسیون (۸۳۲۰۳۷F) ناپایداری شدید در توالی های تکراری را نیز دارد. در حالی که بیمار دیگر (۸۳۱۸۴۷A) که دارای موتاسیون فریم شیفت بود، الگوی پایداری برای توالی های تکراری نشان می داد (شکل ۲).

در غربالگری موتاسیون ها، اولین موتاسیون در ژن MLH1 یک موتاسیون Transversion یا معکوس بود. در این موتاسیون نوکلئوتید پورینی آدنین در موقعیت ۳۴۶ با یک نوکلئوتید پیریمیدینی سیتوزین سبب تغییر اسید آمینه ترئونین به پرولین در کدون ۱۱۶ زنجیره پلی پپتیدی در اگزون ۴ شده بود.

موتاسیون دوم نیز یک موتاسیون معکوس بود که در موقعیت ۷۳۶ سبب تغییر یک نوکلئوتید آدنین به تیمین و منجر به



شکل ۳- محل موتاسیون های ژرم لاین و توالی های نرمال در ژن MLH1

بیمار شماره F ۳۷۰۳۲۰۸۳ دو موتاسیون بی معنی (Missense) را در اگزون های ۴ و ۹ ژن MLH1 نشان داد. موتاسیون c.346A>C در ناحیه به شدت حفظ شده HATPase پروتئین MLH1 اتفاق افتاد و سبب تغییر اسید آمینه ترئونین که واجد گروه هیدروکسی است به اسیدآمینه پرولین با گروه آمید شد. با ایجاد دومین موتاسیون یعنی c.736A>T اسید آمینه ایزولوسین به لوسین تبدیل می گردد که هر دو اسید آمینه از اسیدآمینه های خطی (آلیفاتیک) هستند و واجد حلقه و اتم های ناهمجنس O، N یا S در زنجیره های کناری شان نیستند. زنجیره های کناری شان بطور مشخصی غیرقطبی است. این تغییر به عنوان تغییر مقاوم شده در نظر گرفته می شود و پاتوژنیسیته HNPCC در این بیمار به شدت مرتبط با این موتاسیون است. در این بیمار ایمونوهیستوشیمی تومور از نظر بیان پروتئین MLH1 منفی تشخیص داده شد، در حالی که برای دیگر پروتئین ها یعنی MSH6، MSH2 و PMS2 طبیعی بود. این بیمار از نظر بررسی توالی های تکراری دارای ناپایداری شدید در این توالی ها بود، بطوری که هر ۵ مارکر مورد بررسی در این فرد دارای ناپایداری بودند. در بیمار شماره H ۸۸۲۲۴۷، حذف دو نوکلئوتید در اگزون ۱۹ ژن MLH1 (c.2145,6,delTG) سبب تغییر قاب و در

ATG مثبت یک (+) می باشد و بر همین اساس شماره موتاسیون های گزارش شده به ترتیب زیر می باشد: در موقعیت ۳۴۶ آدنین با سیتوزین جایگزین می شود (c.346A>C) یا به عبارت دیگر در کدون ۱۱۶ اسید آمینه ترئونین به پرولین تبدیل می شود (p.thr116pro). آدنین در موقعیت ۷۳۶ به تیمین تبدیل می گردد (c.736A>T)، یعنی در کدون ۲۴۹ اسید آمینه ایزولوسین با لوسین عوض می شود و بالاخره در موقعیت ۶ و ۲۱۴۵ حذف دو نوکلئوتید تیمین و گوانین (TG) در کدون ۷۱۵ و ۷۱۶ باعث تغییر قاب خواندن می شود. مشخصات این سه موتاسیون که در بانک ژن ثبت شده است، در جدول ۳ آمده است.

بحث

ما سه موتاسیون جدید ژرم لاین را در ژن MLH1 در بیماران مبتلا به HNPCC پیدا کردیم که در بین افراد طبیعی جمعیت ایرانی دیده نشده اند و این موتاسیون ها توسط هیچ مرکز تحقیقاتی دیگری در دنیا ثبت نشده است و ما برای اولین بار آنها را در سایت NCBI به ثبت رساندیم.

جدول ۳- اطلاعات مربوط به جهش‌ها در ژن MLH1

شماره بیمار	ژن	اگزون	کدون	تغییر نوکلئوتید*	نتیجه	نتیجه IHC	MSI وضعیت	شماره دسترسی به ژن
F832037	MLH1	۴	۱۱۶	A>C346c.	Pro116p.Thr	Neg.MLH1	MSI-H	EF570786
F832037	MLH1	۹	۲۴۶	A>T736c.	Leu246p.Ile	Neg.MLH1	MSI-H	EF570787
A831847	MLH1	۱۹	۷۱۵و۷۱۶	delTG6,2145c.	ThrfsX5715p.Thr	Neg.MLH1	MSS	EF125076

* شماره گذاری بر اساس توالی cDNA. به این ترتیب که موقعیت مثبت یک (+) مربوط می شود به نوکلئوتید آدنین در کدون آغازی ATG [GenBank: NM_000249]

۳. این موتاسیون‌ها در چندین شجره‌نامه با فنوتیپ مشابه دیده شوند.

۴. ارتباطی بین میزان DNA موتانت و شدت علائم وجود داشته باشد.

البته همانطور که قبلاً اشاره شد در این تحقیق ما دو شاخص اول را بررسی کردیم. یافته‌های ما بیان می‌کند که موتاسیون بی‌معنی در ژن‌های MMR در بیماران HNPCC دارای ناپایداری در توالی‌های تکراری شایع است. هم‌چنین این موتاسیون‌های ژرم لاین در بیمارانی با توالی‌های تکراری پایدار پیدا شدند.

بنابراین تعیین این موتاسیون‌های جدید ممکن است بیانگر این مطلب باشد که ویژگی‌های افراد مبتلا به HNPCC در جمعیت ایرانی احتمالاً با ویژگی‌های افراد مبتلا در کشورهای دیگر متفاوت است. این تفاوت می‌تواند شاخصی برای تشخیص افراد مبتلا در جمعیت ایرانی باشد. به منظور اطمینان از نتایج حاصله، مطالعات بیشتری برای تأیید یا رد یافته‌های این تحقیق پیشنهاد می‌گردد.

نتیجه منجر به یک کدون خاتمه زودرس در ۵ کدون پایین دست موتاسیون شد. با ایجاد این موتاسیون فریم شیفت ۵ اسید آمینه پایین دست موتاسیون تغییر کرد، به این صورت که GTHCL←VEHIV تغییر کرد و به خاطر کدون خاتمه زودرس ۴۱ اسید آمینه در C ترمینال پروتئین MLH1 حذف شدند که عبارت بودند از:

(VEHIVYKALRSHILPPKHFTEDGNILQLANLPDL YKVFERC)

در این بیمار تومور از نظر پایداری توالی‌های تکراری به شدت ناپایداری نشان می‌داد، بطوری که هر ۵ مارکر ناپایدار بود و آنالیز ایمونوهیستوشیمی، هیچ بیانی را برای پروتئین MLH1 نشان نداد، اما برای دیگر پروتئین‌ها بیان به صورت طبیعی بود.

شاخص‌های متفاوتی به شرح زیر برای بیان این که موتاسیون‌های جدید پاتوژنیک هستند، وجود دارند:

۱. این موتاسیون‌ها منطقه به شدت حفظ شده را تغییر داده یا سبب به هم ریختگی در جفت شدن بازها شوند.
۲. این موتاسیون‌ها در نمونه‌های شاهد دیده نشوند.

REFERENCES

1. Stephenson BM, Finan PJ, Gascoyne J, Garbett F, Murday VA, Bishop DT, et al. Frequency of familial colorectal cancer. *Br J Surg* 1991;78:1162-66.
2. Wagner A, Tops C, Wijnen JT, Zwinderman K, van der Meer C, Kets M, et al. Genetic testing in hereditary non-polyposis colorectal cancer families with a MSH2, MLH1, or MSH6 mutation. *J Med Genet* 2002;39:833-37.
3. Robinson KL, Liu T, Vandrovcova J, Halvarsson B, Clendenning M, Frebourg T, et al. Lynch Syndrome (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer) Diagnostics. *JNCI* 2007;99:291-99.
4. Liu SR, Zhao B, Wang ZJ, Wan YL, Huang YT. Clinical features and mismatch repair gene mutation screening in Chinese patients with hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:2647-51.
5. Wagner A, Tops C, Wijnen JT, Zwinderman K, Meer C, Kets M, et al. Genetic testing in hereditary non-polyposis colorectal cancer families with a MSH2, MLH1, or MSH5 mutation. *J Med Genet* 2002;39:833-37.
6. Park JG, Kim DW, Hong CW, Nam BH, Shin YK, Hong SH, et al. Germ Line Mutations of Mismatch Repair Genes in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Patients with Small Bowel Cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:11-16.
7. Peltomaki P, Vasen HF. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. *Gastroenterology* 1997;113:1146-58.
8. Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaidis NC, Lynch HT, Watson P, et al. Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med* 1996;2:169-74.

9. Peltomaki P, Gao X, Mecklin JP. Genotype and phenotype in hereditary nonpolyposis colon cancer: a study of families with different vs shared predisposing mutations. *Fam Cancer* 2001;1:9-15.
10. Mead LJ, Jenkins MA, Young J, Royce SG, Smith L, St John DJ, et al. Microsatellite Instability Markers for Identifying Early-Onset Colorectal Cancers Caused by Germ-Line Mutations in DNA Mismatch Repair Genes. *Clin Cancer Res* 2007;13:2865-69.
11. Hatch SB, Lightfoot HM Jr, Garwacki CP, Moore DT, Calvo BF, Woosley JT, et al. Microsatellite instability testing in colorectal carcinoma: choice of markers affects sensitivity of detection of mismatch repair-deficient tumors. *Clin Cancer Res* 2005;11:2180-87.
12. Mori Y, Selaru FM, Sato F, Yin J, Simms LA, Xu Y, et al. The impact of microsatellite instability on the molecular phenotype of colorectal tumors. *Cancer Res* 2003; 63:4577- 82.
13. Ponz de Leon M, Sant M, Micheli A, Sacchetti C, Di Gregorio C, Fante R, et al. Clinical and pathological prognostic indicators in colorectal cancer. *Cancer* 1992;69:626-35.
14. Morson BC, Sobin LH. International histological classification of tumors. *Dis Colon Rect* 1977;8:697-99.
15. Jover R, Payá A, Alenda C, Poveda MJ, Peiró G, Aranda FI, et al. Defective mismatch-repair colorectal cancer. *Am J Clin Pathol* 2004;122:389-94.
16. Buhard O, Suraweera N, Lectard A, Duval A, Hamelin R. Quasimonomorphic mononucleotide repeats for high-level microsatellite instability analysis. *Dis Markers* 2004;20:251-57.
17. Burgart LJ. Testing for defective DNA mismatch repair in colorectal carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2005;129:1385-89.
18. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. Development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:5248-57.
19. Jin HY, Liu X, Li VKM, Ding Y, Yang B, Geng J, et al. Detection of mismatch repair gene germline mutation carrier among Chinese population with colorectal cancer. *BMC Cancer* 2008;8:44-49.