

گزارش یک موتاسیون ژرم لاین جدید در ژن *PMS2* در بیمار مبتلا به سرطان ارثی روده بزرگ

مهدی منتظر حقیقی^۱، محمد یعقوب طالقانی^۱، زهرا اکبری^۲، مانده علیدادی^۳، احسان ناظم الحسینی مجرد^۴، مهسا مولایی^۵، محمد رضا زالی^۶.

۱. دکتری ژنتیک مولکولی، مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران (مؤلف مسؤول) تلفن: ۰۲۱-۲۲۴۳۲۵۲۵، mah_haghighi@hotmail.com

۲. دانشجوی کارشناسی ارشد، زیست شناسی سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳. کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۴. دانشجوی کارشناسی ارشد، زیست شناسی سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات علوم پایه و اپیدمیولوژی بیماری های دستگاه گوارش دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۵. دانشجوی دکتری تخصصی پژوهشی، زیست شناسی سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۶. استادیار گروه پاتولوژی، زیست شناسی سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۷. استاد گروه داخلی، مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: سرطان ارثی کلون و رکتوم (HNPCC) یک سندرم اتوزومال غالب است. معمولاً در این سندرم پیشرفت سرطان در سنین جوانی افراد، اغلب ۴۰ تا ۵۰ سالگی، خود را نشان می دهد. موتاسیون در ژن های مسوول ترمیم ژنوم می تواند سبب این بیماری شود. یکی از ژن های درگیر در این بیماری ژن *PMS2* می باشد. در این مقاله، بیماری معرفی می شود که موتاسیون ژرم لاین جدیدی در ژن *PMS2* دارا می باشد. هدف از این مطالعه بررسی ژن *PMS2* و تعیین موتاسیون های احتمالی در این ژن می باشد.

معرفی مورد: مردی ۷۷ ساله که به علت تشخیص کارسینومای کولورکتال برای انجام آزمایش های ژنتیک معرفی شد. وی از یک پولیپ کارسینوما به اندازه ۶/۸ سانتیمتر در بخش کبدی کولون (Hepatic flexure) رنج می برد. اگرچه که این بیمار نه شاخص های بتسدا (Bethesda) و نه آمستردام ۲ (Amsterdam II) را داشت ولی غربالگری HNPCC این بیمار بعلت یافته های آشکار بافت شناسی انجام شد. نمونه ی خون برای بررسی موتاسیون های ژن ها و بلوک های پارافینی برای آنالیز ناپایداری توالی های تکراری MSI مورد استفاده قرار گرفت.

نتیجه گیری: یک موتاسیون انتقالی (Transition) در موقعیت ۶۷۶ که باعث تغییر نوکلئوتید گوانین (G) به آدنین (A) و متعاقباً باعث تبدیل اسید آمینه گلايسین به گلو تامیک اسید می شد، با بررسی توالی های بدست آمده از بخش های کد کننده ژن *PMS2* مورد شناسایی قرار گرفت. آزمون ایمونوهیستوشیمی نیز در این بیمار غیر نرمال بودن بیان *PMS2* را نشان داد و سنجش MSI نیز ناپایداری توالی های تکراری را در این بیمار نشان داد.

واژگان کلیدی: سرطان ارثی کلون و رکتوم (HNPCC)، ژن *PMS2*، ناپایداری توالی های تکراری (MSI).

وصول مقاله: ۹۰/۱۲/۲۰ اصلاحیه نهایی: ۹۱/۹/۲ پذیرش: ۹۲/۱/۱۸

مقدمه

امروزه سرطان روده بزرگ یک چالش جدی برای وضعیت بهداشت در دنیا به وجود آورده است و یکی از مهم ترین دست آوردهایی که در قرن ۲۱ حاصل شد اقدامات پیشگیری و تشخیص زودرس این سرطان بوده است.

شرح مورد

بیمار یک مرد ۷۷ ساله که به علت تشخیص کارسینومای کولورکتال بستری شده بود. آنالیز هیستوپاتولوژی یک پولیپ کارسینوما به اندازه ۶/۸ سانتیمتر در بخش کبدی کولون (Hepatic flexure) را نشان می داد. اگرچه که این بیمار نه شاخص های بتسدا (Bethesda) را داشت و نه آمستردام ۲ (Amsterdam II) ولی غربالگری HNPCC این بیمار به علت یافته های آشکار بافت شناسی انجام شد. نمونه ی خون برای بررسی موتاسیون های ژن ها و بلوک های پارافینی برای آنالیز ناپایداری توالی های تکراری MSI مورد استفاده قرار گرفت.

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 μm انتخاب شد و از کیت QIAGEN (QIAamp) DNA Mini kit به منظور استخراج DNA از بافت استفاده شد.

اندازه تومور توسط پاتولوژیست با اندازه گیری بزرگ ترین قطر تومورها بر حسب سانتی متر مربع به دست آمد. تومورهایی که از سکوم تا خم طحالی بودند به عنوان پروگزیمال و آنهایی که در کولون صعودی تا انتهای رکتوم بودند دیستال در نظر گرفته شدند (۱۲). نوع پاتوژنیک تومور، Staging و Grading تومور با بررسی مجدد میکروسکوپی لام های اولیه تأیید شدند. براساس طبقه بندی بافت شناسی سازمان بهداشت جهانی Grading تومور 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 (Mode differentiated) و آنهایی که اکثراً Soild/trabecular داشتند و یا حاوی سلول های مترشحه بودند به عنوان تمایز یافته ضعیف (Poor differentiated)، در نظر گرفته شدند (۱۳).

سرطان کولون و رکتوم بر اساس مکانیسم های مولکولی مختلف، به دو گروه ارثی و غیر ارثی تقسیم می شود که سرطان ارثی کولون و رکتوم Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer (HNPCC) شایع ترین نوع ارثی می باشد. سرطان ارثی کولون و رکتوم (HNPCC) یا سندرم لینچ (Lynch Syndrome) با الگوی توارثی اتوزومال غالب، تهاجم اولیه در سن پایین و احتمال ابتلا به سرطان های دیگر شناخته می شود (۱-۳).

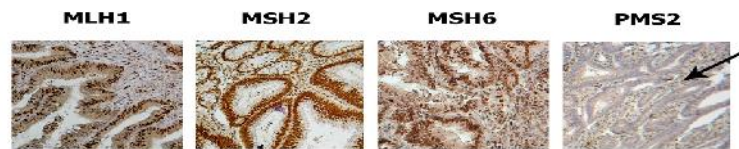
سندرم لینچ با موتاسیون های ژرم لاین در ژن های ترمیم کننده اسید نوکلئیک (Mismatch repair genes) ایجاد می شود. نقص در این توالی ها می تواند سبب تغییر در توالی اسید آمینه این پروتئین ها شود که به نوبه خود می تواند سبب ایجاد اختلال در عملکرد آنها و در نتیجه ایجاد خطا در فرآیند ترمیم اسید نوکلئیک و به دنبال آن اختلال در توالی DNA گردد (۳-۶). این امر خود آغازگر تحولی عظیم در پاتوژنز سرطان کولون و رکتوم محسوب می شود. از طرفی موتاسیون ژن های MMR می تواند سبب تغییر عمده در توالی های تکراری (Microsatellite) و در نتیجه ناپایداری توالی های تکراری (Microsatellite instability or MSI) گردد (۷و۸).

از مهمترین ژن هایی که در سیستم ترمیم اسید نوکلئیک نقش دارند می توان به MSH6، MSH2، MLH1، PMS2 اشاره نمود (۹و۱۰ و ۴). بررسی MSI و جهش در ژن های نامبرده نقش به سزایی در تشخیص و پاتوژنز سرطان کولون و رکتوم ایفا می کند، علاوه بر جنبه های تشخیصی، بررسی فاکتورهای مذکور در انتخاب روند درمانی و اقدامات مراقبتی مناسب نیز می تواند مفید باشد (۸و۱۱). در این مطالعه ضمن تشخیص یک موتاسیون جدید ژرم لاین پاتوبیولوژی این موتاسیون نیز مورد بررسی قرار گرفته شد.

IHC و بررسی بیان پروتئین‌ها مطابق روش EnVision انجام گردید (۱۴).

بررسی ایمونوهیستوشیمی در این فرد نشان داد که فقدان بیان پروتئین *PMS2* وجود دارد (شکل ۱).

بعد از تهیه برش‌های مخصوص، رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی برای بررسی بیان پروتئین‌های *MSH6*، *PMS2*، *MSH2*، *MLH1*، با استفاده از آنتی بادی‌های اختصاصی انجام شد. رنگ آمیزی لام‌ها به منظور آنالیز



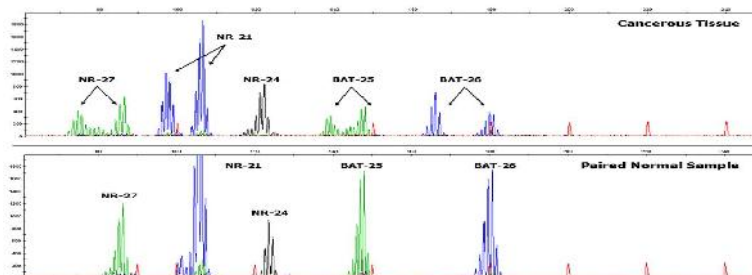
شکل ۱- رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی که فقدان بیان برای پروتئین *PMS2* و میزان بیان نرمال برای پروتئین‌های دیگر ژن‌های ترمیمی را نشان می‌دهد.

تکراری و ۳- پایداری توالی‌های تکراری انجام شد. اگر فردی از ۵ مارکر استفاده شده برای بیش از یک مارکر ناپایدار باشد آن فرد جز گروه ناپایداری شدید توالی‌های تکراری (*MSI-high*) محسوب می‌شد و اگر یکی از مارکرها ناپایدار باشد آن شخص جز گروه ناپایداری کم توالی‌های تکراری (*MSI-low*) به حساب می‌آمد و اگر فردی برای هیچکدام از مارکرها ناپایداری نشان نداد آن شخص به عنوان فردی که دارای توالی‌های تکراری پایدار است (*MSS*) شناخته می‌شد (۱۷-۱۵).

سنجش *MSI* در این بیمار نشان داد که چهار مارکر از ۵ مارکر مونونوکلئوتیدی که عبارت بودند از *NR-27*, *NR-26*, *BAT-25*, *BAT-21* دارای ناپایداری هستند و بنابراین وضعیت این فرد از نظر سنجش *MSI* بصورت *MSI-H* در نظر گرفته شد (شکل ۲).

بر اساس پروتکل‌های استاندارد، در مواردی که نقص در بیان حداقل یکی از پروتئین‌های *MMR* وجود داشته باشد نمونه برای آنالیز *MSI* و بررسی ژنوتیپ به بخش ژنتیک ارجاع داده می‌شود.

بررسی ناپایداری توالی‌های تکراری (*Microsatellite instability*) بر روی *DNA* بافت تومورال و *DNA* ژنومیک استخراج شده از خون همان فرد به عنوان نمونه کنترل 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 (جدول ۱). برای بررسی ناپایداری بافت‌های توموری از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (*PCR*) مطابق با روش انستیتو سرطان آمریکا استفاده شد و طبقه‌بندی میزان ناپایداری مارکرها بر اساس سه الگوی ۱- ناپایداری کم توالی‌های تکراری ۲- ناپایداری شدید توالی‌های



شکل ۲- الگوی ناپایداری توالی‌های تکراری (Microsatellite instability) بر روی DNA بافت سرطانی و نمونه نرمال

جدول ۱- توالی‌های 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	XM033393	21 T 5'UTR	F: GAGTCGCTGGCACAGTTCTA R: CTGGTCACTCGCGTTTACAA	۱۰۹
NR-24	Zinc finger 2	X60152	24 T 3'UTR	F: GCTGAATTTTACCTCCTGAC R: ATGTGCCATTGCATTCCAA	۱۳۱
BAT-25	c-kit	X06182	25 T intron 16	F: TACCAGGTGGCAAAGGGCA R: TCTGCATTTTAACTATGGCTC	۱۵۳
BAT-26	hMSH2	U04045	26 A intron 5	F: CTGCGGTAATCAAGTTTTTAG R: AACCATTCAACATTTTTAACCC	۱۸۳

کدون ۲۰۷ باعث تغییر اسید آمینه گلیسین به اسید آمینه گلوتامیک اسید می شود (شکل ۳). شماره گذاری نوکلئوتیدها در ژن *PMS2* مطابق توالی [gi: 102470225 (NM_000535) GenBank]؛ cDNA انجام گرفت. یعنی در حالیکه نوکلئوتید آدنین (A) در کدون آغازی ترجمه (ATG) در موقعیت ۸۷ مشاهده شد، شماره ۱+ برای آن در نظر گرفته شد به این ترتیب موقعیت موتاسیون بصورت $676G>A$ مشخص شد. در پایان جهت تایید موتاسیون بودن جهش پیدا شده و رد احتمال SNP بودن، احتمال پلی مورفیسم بودن این موتاسیون با مطالعه و مقایسه دقیق بانک اطلاعات مربوط به موتاسیون ژنهای MMR (-INSIGHT) www.insight-group.org رد شد.

مناطق کد کننده و نواحی بین اگزون‌ها و اینترون‌های ژن *PMS2* بوسیله روش PCR بر اساس پرایمرهایی که برای تکثیر ۱۵ اگزون طراحی شده بود، تکثیر شدند (۱۸). توالی پرایمرهای اگزون ۶ مربوط به محل جهش پیدا شده در جدول ۲ آمده است. قطعات تکثیر شده از هر اگزون به منظور اطمینان بیشتر بصورت دو طرفی توالی‌یابی شدند و توالی‌یابی با استفاده از دستگاه سکونسینگ انجام شد و سپس با استفاده از نرم افزار 6 Lasergene آنالیز شدند. با بررسی نتایج بدست آمده یک موتاسیون ژرم لاین جدید در ژن *PMS2* برای اولین بار تعیین گردید که در افراد کنترل مشاهده نشد (جدول ۳). این موتاسیون در اگزون ۶ در موقعیت ۶۷۶ باعث تغییر یک نوکلئوتید پورینی به نوکلئوتید پورینی دیگر یعنی آدنین به گوانین می شود. بنابراین این موتاسیون یک موتاسیون انتقالی است که در

جدول ۲- توالی پرایمرهای PCR

ژن و اگزون	اندازه اگزون (bp)	طول پرایمر (mer)	Ta (°C)	سایز قطعه تکثیر شده (bp)	Primers Sequence
PMS2 اگزون ۶	165	20	62.1	443	F: GCGATGATGTGAGAACCCTTG R: GAGCCAAGACAACACCACTG

جدول ۳- اطلاعات مربوط به جهش ها در ژن PMS2

شماره دسترسی به ژن	وضعیت MSI	IHC نتیجه	نتیجه	*تغییر نوکلئوتید	کدون	اگزون	ژن	شماره بیمار
EF583852	MSI-H	Neg.PMS2	p.Gly207Glu	c.676G>A	207	6	PMS2	882230H

بحث

سرطان کولون و رکتوم یکی از بهترین الگوهای سرطان، به منظور پیشگیری و تشخیص زودرس است. تغییر ماهیت سلول اپی تلیال به پولیپ آدنوماتوز و سپس به سرطان، طولانی است و این فرصت هم برای بیمار و هم برای پزشکان از اهمیت خاصی برخوردار است تا با اقدام مناسب و شناسایی ضایعه مشکوک و پولیپ، این فرآیند را متوقف کرده و مانع ایجاد سرطان شوند.

سندروم لینچ تقریباً ۵-۲٪ سرطان‌های روده بزرگ را شامل می‌شود. این بیماری به صورت ارثی و الگوی اتوزومال غالب منتقل می‌شود. معمولاً افراد در سنین جوانی اغلب ۵۰-۴۰ سالگی مبتلا می‌شوند. افرادی که حامل موتاسیون ژن هستند حدود ۸۰٪ در طول عمر دچار سرطان کولون و رکتوم می‌شوند (۱۹).

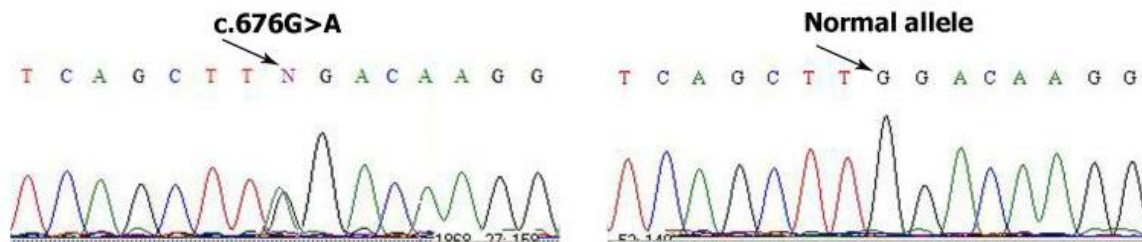
با این که میزان جهش‌های یافت شده در ژن PMS2 کمتر از دیگر ژن‌های دخیل در سیستم MMR گزارش شده است، ولی براساس مطالعه Niessen و همکاران در سال ۲۰۰۹، ۴٪ جهش‌های یافت شده در ۹۷ بیمار مبتلا به سندروم لینچ مربوط به این ژن می‌باشند (۲۰). همچنین بر اساس مطالعه senter و همکاران در سال ۲۰۰۸ افرادی که بر اساس آنالیز ایمونوهیستوشیمی عدم بیان پروتئین PMS2

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره هفدهم / تابستان ۱۳۹۲

را نشان دادند، دارای ۶۰٪ نرخ بالاتری از جهش در این ژن بودند (۲۱). در مطالعه حاضر، بیمار یک جهش بی معنی (Missense) را در اگزون ۶ ژن PMS2 نشان داد که منجر به جایگزینی اسید آمینه گلايسن با گلو تامیک اسید شد. همانطور که می‌دانیم گلايسین یک اسید آمینه خطی است با زنجیره جانبی غیر قطبی، در حالیکه گلو تامیک اسید یک اسید آمینه اسیدی است که می‌تواند بدون بار باشد و یا دارای بار منفی که این موضوع بستگی به شرایط محیطی دارد.

گلو تامیک اسید اغلب در جایگاه‌های فعال پروتئین‌ها یا آنزیم‌ها یافت می‌شود جایی که حلقه ایمیدازول می‌تواند بین این موقعیت‌ها به منظور کاتالیز و شکست و بست پیوندها بطور یکنواختی جابجا شود، بنابراین این موتاسیون می‌تواند شکل فضایی پروتئین نرمال را تغییر دهد. نتایج ایمونوهیستوشیمی فقدان بیان پروتئین PMS2 را نشان داد و آنالیز MSI ناپایداری شدید مارکرهای تکراری را آشکار کرد. بطوریکه که این بیمار برای ۴ مارکر از ۵ مارکر، ناپایداری نشان می‌داد بنابراین دارای MSI-High می‌باشد.

PMS2، شناسایی شد که از این میان ۴ مورد از نوع بازآرایی ژنومی و ۳ جهش نقطه‌ای وجود داشت (۲۳). همچنین در مطالعه‌ای که توسط Vasovcak و همکاران در سال ۲۰۱۲ صورت گرفته پروفایل موتاسیون‌های مرتبط با عدم بیان پروتئین TDG، DNA glycosylases، که مسئول ترمیم آسیب‌های دآمیناسیون می‌باشد، و همزمانی معنی دار آن با فقدان بیان PMS2 ارائه شده است (۲۴). شاخص‌های متفاوتی برای بیان که یک موتاسیون جدید پاتوژنیک وجود دارد. از جمله این موارد، تغییر منطقه به شدت حفظ شده توسط موتاسیون و یا به هم ریختگی جفت شدن بازها را می‌توان اشاره کرد. باید در نظر گرفت که موتاسیون مورد نظر در نمونه‌های کنترل دیده نشود و در چندین شجره‌نامه با فنوتیپ مشابه دیده شود و همچنین یک ارتباط بین میزان DNA موتانت و شدت علائم نیز وجود داشته باشد. در این تحقیق دو شاخص اول مورد بررسی قرار گرفت که هر دو مورد صادق بود.



شکل ۳- محل موتاسیون Missense ژرم لاین c.676G>A (G207E) و توالی نرمال را در ژن PMS2

تشخیص موتاسیون در ژن PMS2 به علت حضور ژن‌های کاذب، پروسه‌ای سخت می‌باشد که البته با طراحی پرایمر مناسب و دقیق این کار عملی است بسیاری از جهش‌ها در این ژن منحصر به فرد و شناخته شده می‌باشند که البته در مواردی جهش‌های جدید و ناشناخته عامل ابتلا می‌باشد. در مطالعه‌ای که توسط Clendenning و همکاران در سال ۲۰۰۶ صورت گرفت از روش تکثیر Long-range برای شناسایی موتاسیون‌های PMS2 استفاده شد که در این مطالعه پنج موتاسیون جدید c.705+1G>T, c.862_863del, c.736_741del6ins11, c.1688G>T و c.2007-1G>A، شناسایی شده و از این موتاسیون‌ها به عنوان مارکر پیش آگهی دهنده کاربردی مطرح می‌شود (۲۲).

همچنین در سال ۲۰۰۶ از میان ۷۷۵ تومور ۷ موتاسیون جدید با استفاده از روش DGGE در نمونه‌های فاقد بیان

نتیجه گیری

موتاسیون‌ها در ژنهای درگیر در این سرطان مورد بررسی قرار گیرد. همچنین جهت اطمینان از استفاده موتاسیون یافت شده و تعمیم آن به عنوان بیسو مارکری در تشخیص HNPCC در بیماران مبتلا در جمعیت ایران، افراد بیشتری مورد مطالعه و ارزیابی قرار گیرند.

در کنار تشخیص بالینی سرطان‌های ارثی، تعیین تاریخچه بستگان و انجام تست‌های ژنتیک نقش بسیار مهمی در درمان، پیشگیری و شناسایی ابعاد این بیماری ارثی ایفا می‌کند. باید یادآور شد که زمانی تست‌های ژنتیک ارزش دارد که در بستر یک تاریخچه فامیل دقیق قرار گیرد. پیشنهاد می‌شود همراه با شجره‌نامه‌ها، بررسی

تشکر و قدردانی

با تشکر فراوان از مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که هزینه انجام این مطالعه را بر عهده گرفت.

References

1. Stephenson BM, Finan PJ, Gascoyne J, Garbett F, Murday VA, Bishop DT. Frequency of familial colorectal cancer. *Br J Surg* 1991; 78:1162-6.
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; 39:833-7.
3. Lagerstedt Robinson K, Liu T, Vandrovцова J, Halvarsson B, Clendenning M, Frebourg T, and et al. Lynch Syndrome (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer) Diagnostics. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99:291-9.
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. Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaides 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.
6. Peltomäki 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.
7. 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.
8. Hatch SB, Lightfoot HM Jr, Garwacki CP, Moore DT, Calvo BF, Woosley JT, and et al. Microsatellite instability testing in colorectal carcinoma: choice of markers affects sensitivity of detection of mismatch repair-deficient tumors. *Clin Cancer Res* 2005; 11:2180-7.
9. 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: International society for gastrointestinal hereditary tumours collaborative study. *Clin Cancer Res* 2006; 12:3389-93.
10. Peltomäki P, Vasen HF. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 1997; 113:1146-58.
11. 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.
12. Ponz de Leon M, Sant M, Micheli A, Sacchetti C, Di Gregorio C, Fante R, et al. Clinical and pathologic prognostic indicators in colorectal cancer. *Cancer* 1992; 69:626-35.
13. Basil C Morson, Sobin LH. International histological classification of tumors. *Diseases of the Colon & Rectum* 1977; 8 : 697-99.
14. Jover R, Payá A, Alenda C, Poveda MJ, Peiró G, Aranda FI, et al. Defective mismatch-repair colorectal cancer: clinicopathologic characteristics and usefulness of immunohistochemical analysis for diagnosis. *Am J Clin Pathol* 2004; 122:389-94.

15. Buhard O, Suraweera N, Lectard A, Duval A, Hamelin R. Quasimonomorphic mononucleotide repeats for high-level microsatellite instability analysis. *Dis Markers* 2004; 20:251-7.
16. Burgart LJ. Testing for defective DNA mismatch repair in colorectal carcinoma: a practical guide. *Arch Pathol Lab Med* 2005; 129:1385-9.
17. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A national cancer institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58:5248-57.
18. Jin HY, Liu X, Li VK, 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.
19. Mangold E, Pagenstecher C, Friedl W, Mathiak M, Buettner R, Engel C, et al. Spectrum and frequencies of mutations in MSH2 and MLH1 identified in 1,721 German families suspected of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Int J Cancer* 2005; 116: 692-702.
20. Niessen RC, Kleibeuker JH, Westers H, Jager PO, Rozeveld D, Bos KK, et al. PMS2 involvement in patients suspected of Lynch syndrome. *Genes Chromosomes Cancer* 2009;48:322-9.
21. Senter L, Clendenning M, Sotamaa K, Hampel H, Green J, Potter JD, et al. The clinical phenotype of Lynch syndrome due to germ-line PMS2 mutations. *Gastroenterology* 2008;135:419-28.
22. Clendenning M, Hampel H, LaJeunesse J, Lindblom A, Lockman J, Nilbert M, et al. Long-range PCR facilitates the identification of PMS2-specific mutations. *Hum Mutat* 2006;27:490-5.
23. Hendriks YM, Jagmohan-Changur S, van der Klift HM, Morreau H, van Puijenbroek M, Tops C, et al. Heterozygous mutations in PMS2 cause hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome). *Gastroenterology* 2006;130:312-22.
24. Vasovcak P, Krepelova A, Menigatti M, Puchmajerova A, Skapa P, Augustinakova A, et al. Unique mutational profile associated with a loss of TDG expression in the rectal cancer of a patient with a constitutional PMS2 deficiency. *DNA Repair (Amst)* 2012;11:616-23.