

dc_1009_15

**Klinikai és molekuláris vizsgálatok
colon tumorok progressziója során**

**MTA doktora pályázat
Doktori értekezés**

Dr. Damjanovich László

**Debreceni Egyetem
Általános Orvostudományi Kar
Sebészeti Intézet**

Debrecen, 2015.

Rövidítések jegyzéke

5-FU: 5-Fluorouracil

A: Adenin

AC: Amszterdam kritériumok

AFAP: Attenuált FAP

APC: Adenomatous polyposis coli

BG: Bethesda guidelines

C: Cytosin

c: codon

CIMP: Cytosin island methylation phenotype

CLSM: Konfokális lézer pásztázó mikroszkóp

CRC: Colorectalis carcinoma

DAB: Diaminobenzidin

DLN: Draining lymph node

EPCAM: Epithelial cell adhesion molecule

FAP: Familiáris adenomatózus polipózis

FCET: Áramlási citometriás energiatranszfer

FCRCTX: Familial colorectal carcinoma type X

FITC: Fluoreszcein izotiocyanát

FJP: Familiáris juvenilis polipózis

FRET: Fluoreszcencia rezonancia energia transzfer

G: Guanin

HDA: Heteroduplex analysis

HNPCC: Hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma

HPS: Hyperplastic polyposis syndrome

IBD: Gyulladásos bélbetegség

dc_1009_15

ICG-HNPCC: International collaborative group on HNPCC

IDL: Inszerció, delécio (mutáció)

IFN- γ : Interferon gamma

IGF-II R: Insulin-like growth factor II receptor

IR: Inzulin receptor

LS: Lynch syndrome

LLS: Lynch-like syndrome

MAP: MYH Associated polyposis

MLPA: Multiplex ligation dependent probe amplification

MLH: MutL homológ

MMR: Mismatch repair

MS: Mikroszatellita

MSH: MutS homológ

MSI: Mikroszatellita instabilitás

MSI-H: Nagyfokú mikroszatellita instabilitás

MSI-L: Alacsonyszintű mikroszatellita instabilitás

MSS: Mikroszatellita stabil

MTS: Muir-Torre szindróma

MUTYH: MutY homológ

nt: nukleotid

PMS: Posztmeiotikus szegregáció

PJS: Peutz-Jeghers szindróma

REIMS: Rapid evaporative ionizing mass spectrometry

RER: Replication error

siRNS: Kis interferáló RNS

SSCP: Single strand conformation polymorphism

T: Timin

dc_1009_15

TACSTD1=EPCAM (korábbi megjelölés)

TGF- β RII: transforming growth factor- β receptor II

TfrR: Transzferrin receptor

TRITC: Tetrametil rodamin izotiocyanát

TS: Turcot szindróma

Tartalomjegyzék

Bevezetés	7. oldal
A Lynch szindróma áttekintése	10.
Betegcsoportok és differenciál diagnózis	17.
Genetikai eltérések	18.
Az index személy és mutáció hordozó családtagjainak gondozása	22.
Célkitűzések	24.
Betegek és módszerek	25.
I. A HNPCC/LS betegek vizsgálata	25.
Adatbázis létrehozása	25.
Immunhisztokémiai vizsgálat	25.
DNS preparálás	27.
Mikroszatellita instabilitás vizsgálata	27.
A MLH1 és MSH2 gének szekvenálása	27.
PCR	27.
Mutáció keresés	30.
Szekvenálás	31.
MLH1 promóter hipermetiláció vizsgálata	31.
Nagy deléción kimutatása	31.
II. CRC sejtvonal epithel sejteinek és CRC betegek limfocitáinak plazma membrán vizsgálata	32.
LS-174-T CRC sejtvonal	32.

Limfocita preparálás nyirokcsomóból és perifériás vérből	32. oldal
Monoklonális antitestek	34.
Fab fragmentum preparálás és jelölés	34.
Sejtek antitest jelölése	35.
Áramlási citometriás energia transzfer mérések (FCET)	35.
Konfokális mikroszkópos mérések (CLSM)	36.
RNS interferencia vizsgálatok	36.
Tömegspektrometriás vizsgálatok (REIMS)	37.
Eredmények és megbeszélés	38.
I.1-2. HNPPC/LS adatbázis létrehozása	38.
I.3. Családfa analízisek	40.
I.4. Gondozás, tanácsadás	52.
II.1-2. LS-174-T CRC sejtvonal plazma membránjának dinamikus vizsgálata IFN-γ, és ICAM-1 siRNS hatására	55.
II.3-4. CD4+ T limfociták plazma membránjának összehasonlító vizsgálata colon tumorban és IBD-ben szenvedő betegekben	60.
II.5. Intraoperatív szövethatározás gyors ionizáló vaporációt felhasználó tömegspektrometria módszerével	69.
Összefoglalás	71.
Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	73.
Irodalomjegyzék	75.
Köszönetnyilvánítás	87.

Bevezetés

A colorectalis carcinomák eredete multifaktoriális, kialakulásukban környezeti és öröklődő tényezők egyaránt változó mértékű szerepet játszanak az egyes betegekben. Az érintettek 70-80%-ának sporadikus tumora van, öröklött tényezőnek nincs bizonyítéka. A további 20-30 %-ban mutatható ki családi halmozódás, ahol öröklött géneknek is szerepe lehet a daganat kialakulásában. A CRC a második leggyakoribb daganat világszerte és valószínűleg az egyik legtöbbet vizsgált tumoros elváltozás is. A teljes humán genom megismerése nagy momentumot adott a tumor asszociált gének jelentős részének megismeréséhez. Ma már általánosan elfogadott nézet, hogy a CRC kialakulása során mintegy 60-80 gén mutációja következik be, melynek kb. egy negyede magáért a daganat progressziójáért felelős. Az ismert genetikai háttérű öröklött daganatok esetében specifikus gének mutációi adódnak át részben, vagy teljesen a következő nemzedéknek. Szinte nincs olyan aspektusa az anyagcserének, mely ne változna meg a daganat progressziója során, a sejt életciklusát a túlélés és további osztódás felé tolva el. Egyidejűleg a változások minőségi és mennyiségi jelei a plazma membrán fehérje és lipid összetételében és a receptorok egymáshoz viszonyított elhelyezkedésében (a receptor topográfiában) is megnyilvánulnak, melyek funkcionális következtetések levonására adnak lehetőséget, megalapozva későbbi diagnosztikai és terápiás lépések kezdeményezését.

Az értekezésben összefoglalt közleményekben a CRC-vel két megközelítés alapján foglalkoztunk. **Klinikai munkánk során a Lynch szindrómás betegek vizsgálatára** koncentráltunk. Nem foglalkoztunk a FAP és variánsaival (AFAP, Gardner és Turcot szindróma), sem a Peutz-Jeghers-, vagy a Familiáris juvenilis polipózissal, a hyperplasztikus polipózis szindrómával csak olyan mértékben, hogy elkülöníthessük őket az LS-től. Motivációként szolgált az, hogy a LS a leggyakoribb öröklődő CRC forma, ennek ellenére a klinikai gyakorlatban világszerte kevésbé kerül felismerésre, a családtagok genetikai

vizsgálata hiányos és a daganatok kezelésében a megelőzés lehetősége messze nincs kihasználva.

Értekezésem második részében azon vizsgálatainkról szeretnék beszámolni, melynek során egy **CRC sejtvonala epithelsejtjei (LS-174-T) és colon tumoros, valamint Crohn betegekből származó limfociták sejt felszíni (plazma) membránjának az immunválaszban fontos receptorai által alkotott mintázatát** elemeztük. Ezen vizsgálatok paradigmájául azok a közlések szolgáltak, melyek alátámasztják, hogy a membrán fehérjék nem véletlenszerűen helyezkednek el a sejtmembránban, hanem hierarchikus rend mutatható ki a molekuláris (nanoscale), a „mesoscale” (akár több száz nanométer) és a mikrométeres tartományban. A membrán által határolt sejt koncepciója mintegy 175 évre tekint vissza. A mai elképzelés alapja az 1970-es évek elején publikált Singer-Nicolson folyékony mozaik membrán modell (Singer 1972). Bár alapvetően folyadék jellemzőkkel bír a mai membrán modell is, a legújabb ismeretek szerint a proteinek nem random módon helyezkednek el a lipid kettősrétegben, hanem számos kitüntetett terület, „microdomain” létezik, melyek inkább „gél” állapottal jellemezhetők. Ezek a speciális lipid összetételű membrán területek néhány 10 nm-től mikrométer nagyságig is terjedhetnek, a membrán akár 60-80% borítva (Lombard 2014). A microdomain („lipid tutaj”, vagy „lipid raft”) fehérje komponensei jellemzőek egy-egy raft típusra, a térbeli közelség miatt kapcsolatba léphetnek egymással és/vagy ligandjaikkal az adott receptor alegységek, ill. a nagy koncentrációban jelen levő fehérjék erősíthetik a sejt-sejt kapcsolatok kialakulását és a stimulus által kiváltott reakciót (de Bakker 2007). A lipid tutaj kitüntetett szerepére utalnak azok az eredmények is, melyek szerint, ha koleszterin kivonásával megbontjuk a raft szerkezetét, a korábban rendezetten elhelyezkedő MHC molekula komplexek random eloszlást mutatnak a membrán egyéb területein is (Anderson 2000, Vereb 2000, Lebedeva 2004, Vámosi 2004,)

Membrán vizsgálataink során két fő módszert alkalmaztunk, az áramlási citometriás fluoreszcencia rezonancia energiatranszfert (FRET, FCET) (Szöllősi 2002) a nanométeres skálán az intra- és intermolekuláris proximitás mérésekre és a konfokális lézer pásztázó mikroszkópiát, a mikrométeres távolsági tartományban. Méréseink során olyan molekulák jelenlétét, mintázatát vizsgáltuk, melyek egy bizonyos típusú lipid tutajban helyezkednek el és számos limfoid és nem limfoid sejtvonal esetében bizonyított szereppel rendelkeznek az immunfelismerés, antitumor immunitás (MHCI, ICAM-1), a limfocita homing, metasztázisképzés (ICAM-1, CD44s) és a differenciálódás-sejthalál folyamatában (IL-2/15R α és γ alegységek, CD59-komplement inhibitor). Az egyes receptorok abszolút számának kontrollhoz képest mért eltérésein kívül, korábban limfómás és más tumoros sejtvonalakon leírt receptor mintázatokhoz hasonló kolokalizációt tudtunk megfigyelni az általunk vizsgált receptorok között az **LS-174-T colon tumoros sejtvonal** epitéliumon is. IFN- γ stimulusra adott, reprodukálható mintázatváltozást is meg lehetett figyelni az ICAM-1 és az MHCI alegységek között. További vizsgálatokkal igazoltuk, hogy ez a kiváltott reakció ICAM-1 siRNS alkalmazásával kvantitatív módon blokkolható volt. Nem csak tumoros epitheliumot, hanem vastagbél daganatos és Crohn betegségben szenvedő betegek perifériás véréből, valamint nyirokcsomóiból származó **CD4⁺ limfocitákat** is vizsgáltunk. Célunk egy komplexebb receptor kolokalizáció vizsgálata volt. A kapott „mintázatok” eredményei alapján azt gondoljuk, hogy a CD4⁺ sejtek felszínén gyulladásos és tumoros betegségekben a vizsgált receptorok által alkotott lipid raft szerkezete átalakul. Az IFN- γ hatására létrejött molekuláris átrendeződés arra mutat, hogy specifikus célzott terápia esetén nem csak az adott target molekula jelenléte és megfelelő számossága, hanem más molekulákhoz viszonyított topográfiája is szerepet játszhat a kiváltott hatásban.

Az értekezés befejezéseként egy új klinikai vizsgáló eljárásról adok számot, mely jelentősen hozzájárulhat az intraoperatív tumor diagnosztikához, akár már a közeljövőben.

Több sebész munkatársammal együtt lehetőségünk volt csatlakozni egy fizikusokból, matematikusokból, orvosokból álló munkacsoporthoz, akiknek már jelentős tapasztalatuk volt biológiai szövetek **tömegspektrometriás elemzésében**. A sebészi elektromos vágó-koaguláló eszköz („elektromos kés”) használata közben keletkező füstöt elvezetve, a lipid komponensek spektrális eltéréseit elemezve jellemző különbséget lehetett kimutatni tumoros és normál szövetek között. Az azonosított molekulák között foszfatidiletanolamin, foszfatidilkolin, foszfatidsav, foszfatidilszerinek, foszfatidilinozitolok, szfingomielinek kardiolipinek, plazmalogének és szulfatidok szerepeltek. Az eljárás nagyon gyors, szinte „real time” üzemmódot tesz lehetővé és a mérések szerint átlagosan 95-100% szenzitivitással, valamint 92-100% specificitással dolgozik. A számos mérés közül elsősorban a CRC és azok máj áttéteinek vizsgálatában vettem részt. A mérések a műtét menetét gyakorlatilag nem befolyásolják. Az eddigi eredmények alapján ez a mérési módszer a nehéz anatómiai viszonyok között végzett beavatkozások közben segítheti a döntéshozatalt az ún. R0 reszekciók (teljes tumormentesítés) kivitelezésben. A módszer különösen sokat jelenthet olyan nehéz helyzetekben, amikor nagyon kicsi a mozgási lehetőség arra, hogy a sebészi metszésvonalat „messze” az ép szövetben vezetve operáljunk, azaz a tumor szabad szemmel jól láthatóan, teljes egészében eltávolítható legyen.

A bevezetés további részében a **Lynch szindróma** komplex klinikai képe és szerteágazó, ma is fejlődőben lévő, „bizonyító erejű” kivizsgálása miatt egy rövid áttekintést szeretnék nyújtani a kórképről és a hasonló genetikai hátterű, de eltérő megbetegedésekről. Az LS autoszomális domináns öröklés menetű kóros állapot, amely a hereditær colorectalis carcinomák leggyakoribb formája, az összes újonnan diagnosztizált eset kb. 3-4 %-át teszi ki világszerte (Lynch 2005). A szindróma genetikai háttere az MMR gének csírasejtes mutációjában áll. Az első részletes családfa leírás, melyben többszörös tumor halmozódás figyelhető meg Aldred Warthin pathológustól származik 1895-ből. A családban, melyet G

Családnak nevezett el vastagbél, gyomor, ovarium, endometrium carcinoma fordult elő nagy számban (Whartin 1913). Lynch és munkatársai 1966-ban írták le a nagyon hasonló kórképű N és M Családot és autoszómális domináns öröklődés menetüket, valamint feldolgozták a rendelkezésükre bocsátott G Család értékes kórrajzát (Lynch 1966). A klinikai gyakorlatban azonban a számos eltérő kombinációban megjelenő daganat és a nem pontosan feltérképezett családi háttér a kórkép korrekt azonosítását kezdetben nagyon megnehezítette. A diagnózis felállításának megkönnyítésére és a különböző kutatócsoportok munkájának összehangolására számos kritérium rendszert dolgoztak ki. Az eredeti **Amsterdam kritériumok** (Vasen 1991) az index személyre koncentrálnak és a több generációban előforduló colorectalis carcinomára. Azokban a családokban melyek teljesítik ezeket a feltételeket 40-85%-ban lehet kimutatni MMR géneltérést (Nyström-Lahti 1996, Möslein 1996, Wijnen 1997, Lynch 1999). Ugyanakkor az LS családok mintegy 40%-a így nem kerül felfedezésre a kis létszámú család, vagy a változatos daganat megjelenés miatt. Az ezt követő **Amsterdam II kritériumok** (Vasen 1999) az extracolikus daganatokat is figyelembe véve igyekeztek segíteni a betegek klinikai kép alapján történő felismerésére. Nőkben elsősorban az endometrium, ovarium daganata, férfiakban gyomorrák, mindkét nemből az uroepthelium és az epeutak, vékonybél rák halmozódása hívhatja fel a klinikus figyelmét. Később még több daganatról – agy, pancreas – derült ki, hogy asszociálódhat az LS-el (Axilbund 2012). A többször módosított **Bethesda útmutatót** a klinikai kivizsgálás szenzitivitásának fokozására, a részletes genetikai vizsgálatra javasolt betegek körének kiválasztására hozták létre (Rodriguez-Bigas 1997, Umar 2004). A módszer szenzitívebb, ugyanakkor a specificitás meglehetősen szerény maradt, ugyanis az Amsterdam negatív, de Bethesda pozitív családokban csak 15-30%-ában lehet MMR mutációt igazolni (Wijnen 1999, Lynch HT 1999). A kórkép sokszínűsége és számos bizonytalanság miatt a Lynch szindrómás betegek világszerte a mai napig is azok közé tartoznak, akiket a mindennapi klinikai gyakorlatban nagyon kevésbé ismernek fel a

velük foglalkozó orvosok. Ez a helyzet annak ellenére igaz, hogy mindenki tisztában van a genetikai analízis potenciális előnyeivel: a mutáció hordozó beteg metachron tumorai szűrés által idejekorán felismerhetőek, ezáltal az index személyek morbiditása és mortalitása csökkenthető. Az érintett családtagok szintén gondozásba vehetők, hasonló előnyökkel. Ha az MMR gén mutációja ismert, ettől a lépéstől kezdve csak a már ismert mutációt kell keresni a rokonokban, ami a drága kivizsgálást anyagilag is hatékonyabbá teszi. További új mutációk természetesen előfordulhatnak, de ez igen ritka, illetve a változó klinikai kép erre felhívhatja a figyelmet. Az anamnézis felvételében tehát jól hasznosítható útmutatók az alábbiak:

Amszterdam Kritériumok

1. Három vagy több szövettanilag igazolt CRC-s beteg a családban, melyek közül legalább egy a másik kettő elsőfokú rokona.
2. Legalább két generációban előforduló CRC, az érintett személyek közül egy elsőfokú rokona a másik kettőnek.
3. Legalább egy CRC beteg 50 éves életkor előtt.
4. A familiáris adenomatosus poliposis kizárható legyen.

Módosított Amszterdam Kritériumok

Ugyanaz mint az Amszterdam Kritériumok, azonban a vastagbél daganatokon kívül a HNPCC asszociált tumorok előfordulását (endometrium, petefészek, húgyúti, epeúti, gyomor, faggyúmirigy, hasnyálmirigy, központi idegrendszer) is figyelembe veszi.

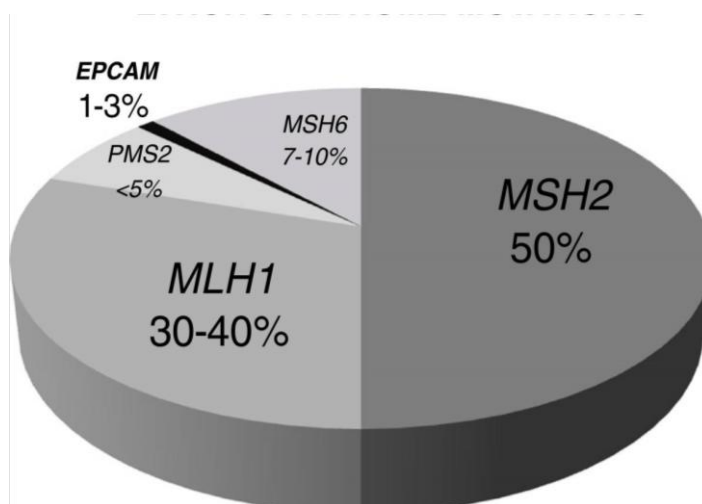
Bethesda Kritériumok

A Bethesda Kritériumok bármely pontjának teljesülése esetén alapos indokkal felmerül a HNPCC diagnózisának lehetősége és a további kivizsgálás (legalább a kiterjesztett, pontos anamnézis, immunhisztokémia) indokolt.

1. Az Amszterdam Kritériumokat teljesítő családok.
2. Két HNPCC asszociált daganat előfordulása egy személyben, akár szinkron vagy metakron vastagbél, akár vastagbél és egyéb HNPCC asszociált daganat együttes előfordulása.
3. Ha az index személy elsőfokú rokona vastagbél daganatban, vagy valamely HNPCC asszociált daganatban szenved, vagy vastagbél adenomatosus polipja van, amennyiben a daganatok 45 éves életkor, a polipok pedig 40 éves életkor előtt kerülnek felismerésre.
4. Vastagbél, vagy endometrium daganat esetén, ha az 45 éves életkor előtt kerül felismerésre.
5. 45 éves életkor előtt felismert, alacsonyan differenciált jobb oldali vastagbél daganat esetén.
6. Bármely lokalizációjú 45 éves életkor előtt diagnosztizált pecsétgyűrűsejtes vastagbél daganat esetén. (A pecsétgyűrűsejtek aránya több mint 50 %.)
7. 40 éves életkor előtt diagnosztizált vastagbél adenomatosus polipok esetén.

Az LS tünetegyüttese az eredeti, 1966-ban publikált átfogó tanulmány szerzőjéről kapta mai elnevezését. Ez a közlemény az említett N és M Családdal foglalkozott, melyekben a halmozottan előforduló colorectalis carcinoma mellett gyomor és endometrium tumor jelent meg. A szerző által használt első elnevezés a „**Cancer family syndrome**” volt. A későbbiekben „**Hereditær non-polyposis colorectal carcinoma**” (HNPCC) megjelölést használták a FAP-tól való megkülönböztetés céljából. Ez a név azonban kissé félrevezető, mivel a HNPCC-ben is találhatók polipok a vastagbélben, de ezek száma csak néhányra tehető. Boland és Troncale 1984-ben utaltak a tünetegyüttesre **Lynch szindróma-ként**, mely sokkal inkább megfelel a kórkép sokszínűségének (Boland 1984). A betegségre jellemző **RER fenotípus** 1993-ban vált ismertté (Aaltonen 1993), mely elsősorban a poly A, vagy poly

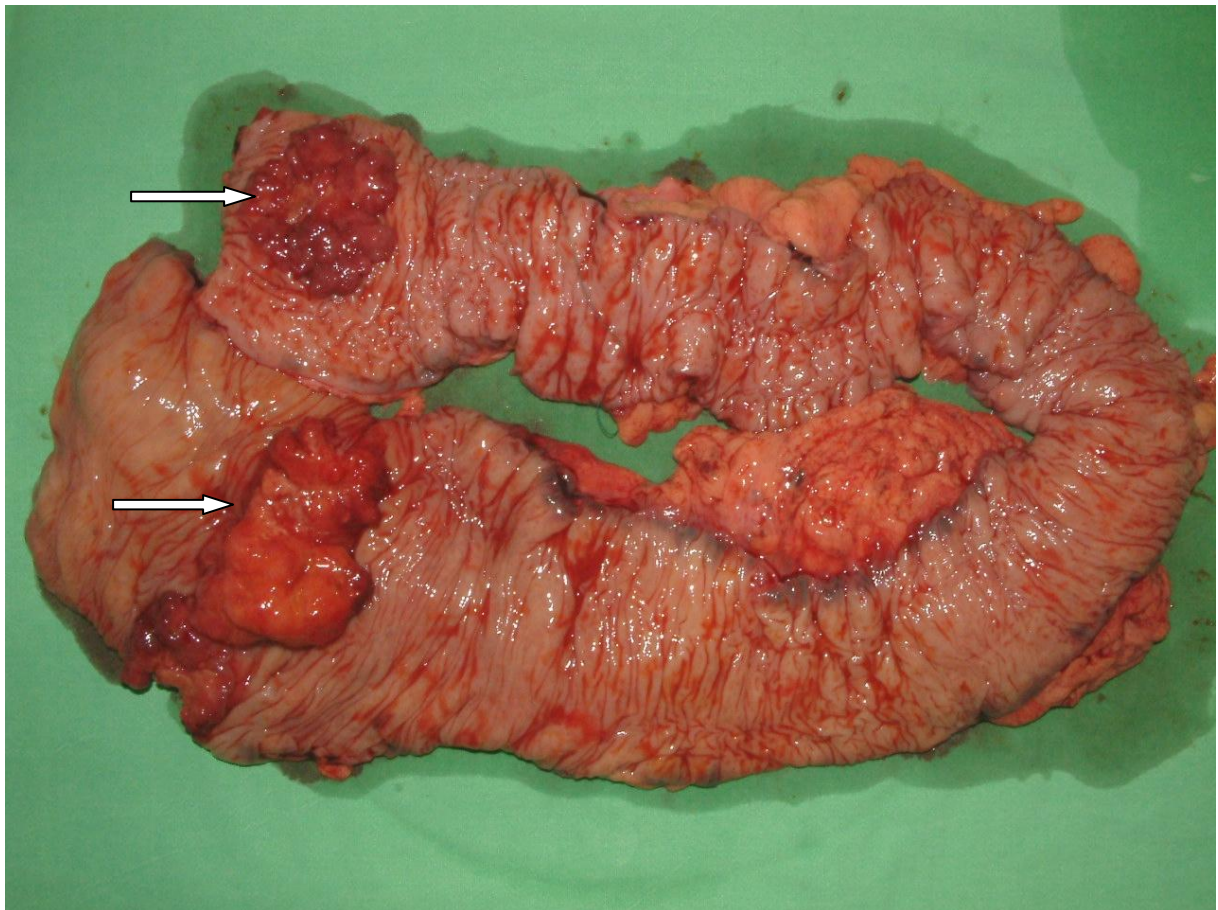
AC szekvenciák, az ún. **microsatelliták** hosszának eltérését jelenti a normálistól. A microsatellita instabilitás (MSI) hátterében a DNS mismatch repair gének mutációja áll (Fischel 1993, Leach 1993). A **mai definíció** szerint az LS diagnózisához elengedhetetlen egy MMR gén csírasejtes mutációjának, vagy az általuk kódolt fehérje hiányának/funkció kiesésének igazolása. A pontos pathogenetikai definícióhoz az utóbbi években járult hozzá az EPCAM gén deléciója is, mely másodlagosan, epigenetikus módon elnémítja az MSH2 gént, típusos LS-t hozva létre (Kovács 2009, Kuiper 2011). A mai LS elnevezés így jelentősen szélesebb körű beteg populációt ölel fel, mint a korábbi HNPCC megjelölés. Az MMR gének mutációinak gyakoriságát az I.1. ábra foglalja össze.



I.1. ábra. Az LS kialakulásához vezető MMR génmutációk megoszlása (Tutlewska 2013).

A **klinikai képet jellemzi**, hogy az átlag életkor a CRC diagnózisakor 44 és 61 év között van, mely jóval korábbra datálódik a sporadikus betegek átlag életkorához képest. A CRC a Lynch szindrómában 60-80%-ban a jobb colonfelet érinti (a flexura lienalistól proximalisan) szemben a sporadikus esetek 30%-ával. Gyakoribbak a szinkron daganatok (I.2. ábra), ill. a típusos szegmentális reszekción átesett betegeknél magas a metachron CRC-k aránya (10 évnél 16 %, 20 éves követés során 41 %) (Jarvinen 1995). A megelőző állapot LS esetén is lehet egy különálló adenoma, vagy ritkábban az úgynevezett flat carcinoma (I.3.

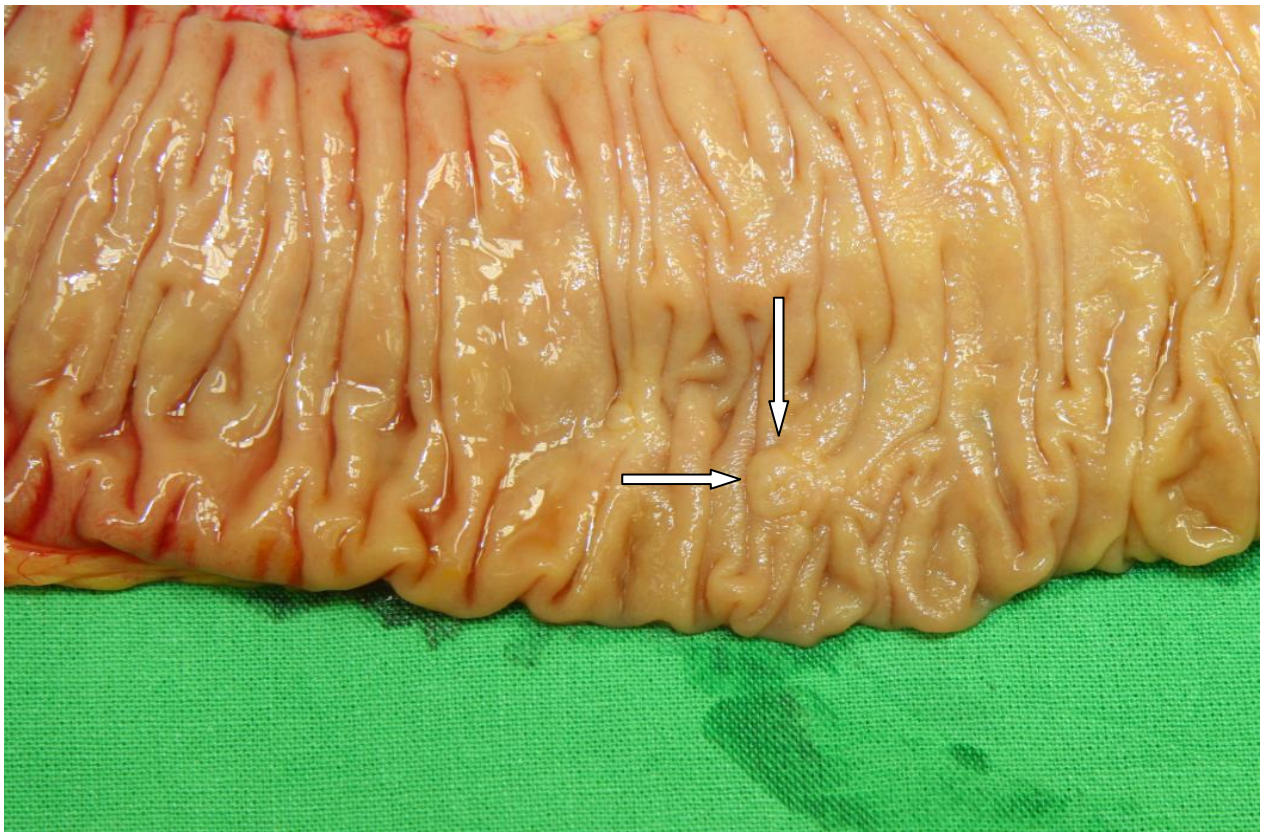
ábra). A FAP-hoz képest sokkal kevesebb a polypok száma, az átlagos megjelenés 50 éves korig 3, vagy annál kevesebb vastagbél neoplasia. A megjelenő adenomákra jellegzetes a villosus forma, és a high grade dysplasia. Az adenoma-carcinoma átalakulás folyamata felgyorsul LS esetében, ami átlagosan 35 hónapra tehető, szemben a sporadikus esetek 10-15 éves malignizálódási idejével. (Lynch 2005). **Az LS-ben a CRC kialakulásának élethosszig tartó rizikója** nagy változékonyságot mutat, az adott MMR gén mutációjától és a beteg nemétől függően. Leggyakrabban az MLH1 és MSH2 gének mutálódnak 30 és 74%-os előfordulási gyakorisággal, az eltérések együttesen az LS esetek 90-95%-ában mutathatók ki.



I. 2. ábra. 25 éves LS beteg kettős tumora. A nyilak a coecum és sigma tumorára mutatnak.

Rosszindulatú daganat kialakulásának aránya 10 és 22 % között került észlelésre az MSH6 gén mutációja esetén és 15-20 % körül mozog a PMS2 gén esetén. A mintegy 80%-os

penetrancia és a változó expresszió arány miatt CRC 60-80%-ban jelenik meg, míg az endometrium 40-60, az ovarium 9-12, gyomor 11-19, uroepitheliális daganat 4-5, epeúti malignoma 2-7, vékonybél daganat 1-4%-ban, és a legritkább az astrocytoma 1-3% előfordulással az LS betegek leszármazottaiban (Aarnio 1995, Watson 2008, Barrow 2009, Engel 2012). A faggyúmirigyek daganatával és az arcon előforduló „café au lait” foltokkal társuló CRC a **Muir-Torre szindróma**. Ez az LS egyik variánsának tekinthető, melyben a bőrelváltozások megelőzhetik és egyben a figyelmet is felkelthetik a további malignus daganatok megjelenésére (Lynch 1981, Tanyi 2009). Az endometrium ráknak, mely 14-54%-



I.3. ábra. Alig észrevehető flat carcinoma a colon ascendensben.

ban fordulhat elő az együttes MLH1 és MSH2 mutációt hordozókban, illetve 15-20%-ban PMS2 mutáció esetén, kiemelkedően magas az aránya, 17-71% MSH6 mutáció esetén (Giardello 2014).

A **kialakult carcinoma szövetileg** alacsonyan differenciált, pecsétgyűrű sejteket tartalmazhat, nagy mennyiségű extracelluláris mucin is jelen van, valamint magas a tumor infiltráló lymphocyták száma. Ez utóbbi megjelenésében Crohn-betegség szerű képet mutathat (Jenkins 2007, Peltomaki 2010). Számos közlemény ezt a jelenséget, a gazda szervezet fokozott immunreakciójaként értékeli. Szintén ezzel a megfigyeléssel próbálják alátámasztani egyes szerzők az LS-ben stádiumról stádiumra észlelt jobb CRC túlélési arányt (Drescher 2010).

Betegcsoportok és differenciál diagnózis

A sok évtizedes klinikai és molekuláris genetikai kutatás ellenére sem sikerült még egységes terminológiával ellátni a hasonló fenotípusú, de nem teljesen azonos klinikai megjelenésű daganatos szindrómákat, melyeknek a genetikai háttere sem fedt egymást. Az Amerikai Gasztrointesztinális Endoszkópos Társaság, az Amerikai Gasztrointesztinális Egyesület, az Amerikai Gasztroenterológiai Kollégium és az Amerikai Colorectalis Sebész Társaság 2014-ben kiadott közös közleményükben (Giardiello 2014) az alábbi megnevezéseket ajánlotta. A **HNPCC** elnevezés azokra a betegekre érvényes, akik teljesítik az Amsterdam I vagy II. kritériumokat. A **Lynch szindróma** azokat a betegeket, családokat fogja össze, akiknél a daganatos betegség az MMR gének, vagy az EPCAM gén mutációjához köthető. A „**LS-hez hasonló szindrómában**” szenvedő betegek (LLS) alatt azokat értjük, akik MMR gén fehérje expresszió, vagy MSI rendellenességet mutatnak, de nincs kimutatható csírasejt eredetű génmutáció. Egy közelmúltban megjelent közlemény szerint az LLS betegek kb. fele biallélikus szomatikus mutációval rendelkezett az MLH1, vagy MSH2 génekben. A „**Familial colorectal cancer type X**” (FCRCTX) elnevezés azokra a betegekre utal, akik az Amsterdam I kritériumokkal azonosíthatók, de nem mutatnak az LS-re jellegzetes MSI eltéréseket. Az idevágó közlemények szerint ez a beteg populáció kicsit idősebb, mint az LS esetén, a CRC kialakulásának esélye pedig lényegesen kisebb (incidencia arány 2.3, míg LS-

ben 6.1). Az extracolicus tumorok megjelenése ebben a csoportban nem magasabb, mint az átlag lakosság esetén. A genetikai háttér egyelőre ismeretlen. A **Muir-Torre szindróma** az LS egy ritka variánsa, akkor kerül diagnózisra, amikor a bőr faggyúmirigy adenomái, carcinomái, vagy keratoakanthomák jelennek meg a betegben. Leggyakrabban MSH2 mutáció áll a háttérben. A „**Constitutional mismatch repair deficiency syndrome**” fogalomkörébe tartoznak azok a betegek és családok, akikben az MMR gének, csírasejtes biállélikus mutációja található. Jellemzők a café au lait foltok, a gyermekkorban megjelenő colorectalis tumorok, vagy más LS daganatok, a vékonybél polyposisa, agydaganatok és hematológiai malignomák.

Az immunhisztokémia jelentősége

Az LS betegek 80-90%-ában az MSH2, vagy az MLH1 mutációja áll a kórkép háttérében. Rutin immunhisztokémiai vizsgálattal szűrhetőek a tumorszövet mintái a két protein sejtmagban észlelhető expressziójára. Belső kontrollként a tumort övező normál szövet jelölődése szolgál. Pozitív mag reakció esetében az LS diagnózisa elvethető. Az MMR fehérjék jelölődésének hiánya további útmutatással is szolgál, melyik gén mutálódhatott. A major proteinek (MLH1, MSH2) hiánya esetén a PMS2 és az MSH6 festődés is jellegzetesen kiesik. A két marker együttes használata megbízható eredményt ad, Lindor (2002) szerint az MLH1 és MSH2 immunhisztokémiai analízise 92.3 %-os szenzitivitással és 100 %-os specificitással rendelkezik. Rontja a szövettani eredményeket, hogy a festődés egyenetlen lehet a tumorban, csökkenő szenzitivitást okozva. Amennyiben az MSH6 és PMS2 expressziót is vizsgálták, az MLH1 változó kimutathatósága mellett is javultak az eredmények (Shia 2008). Ha a microsatellita vizsgálatok megerősíti az szövettani eredményeket, a következő lépés az adott gén szekvenálása.

Genetikai eltérések

Az **MMR gének** által kódolt fehérjék teszik lehetővé a szülői DNS másolásának nagyfokú pontosságát, kijavítva a replikáció során keletkező hibás bázis eltéréseket, pontmutációkat, inszerciákat, vagy deléciókat. Az MMR kaszkád tagjai egymással való specifikus kapcsolódás után felismerik és kimetszik a hibás nukleotidot, majd a DNS polimeráz újraszintetizálja a DNS láncot. A jelenleg ismert 7 MMR gén közül az MLH1, az MSH2, az MSH6 és a PMS2 gén csírasejt mutációja okoz LS-t. A kórkép autoszomális domináns öröklődés menetét mutat, azaz az öröklött mutáns gén mellett egy szerzett mutációval is rendelkeznie kell az egyénnek a betegség létrejöttéhez.

Az **EPCAM** gén egy hámsejtekben megjelenő adhéziós molekulát kódol. Mutációja a közelmúltban felismert, többféle epigenetikus úton hozhat létre Lynch szindrómát. A genomban közvetlenül az MSH2 gén promotere mellett helyezkedik el 5' irányban az EPCAM gén. Ha az utolsó két kodonjának deléciója következik be, ez maga után vonja az MSH2 gén promóter metylációját is, mely LS-t hoz létre. Ha az EPCAM mutáció során STOP kodon keletkezik, olyan szindróma alakul ki, mely részleges csak a colonra lokalizálódó fenotípusú LS-t vált ki (Chan TL 2006, Ligtenberg 2009, Lynch 2011, Kempers MJ 2011). Magyar szerzők mRNS vizsgálatokkal igazolták, hogy az EPCAM transzkripciót termináló kodonjainak deléciója esetén TACSTD1(EPCAM)/MSH2 fúziós transzkripciós termékek jönnek létre, mely az MSH2 működésének kieséséhez vezet (Kovács 2009).

Ritka változata az LS-nek az amelyben az MLH1 gén promóter régiója **hypermethylálódik** a csírasejtekben és ezáltal elnémul. Ezek a betegek nem mutatnak DNS bázis sorrend eltérést, a daganatos szöveteikben mozaik expresszió észlelhető és az utódok többnyire nem érintettek.

Az LS további jellemzője a **mikroszatelita instabilitás** (MSI). A genomban egyénre és szövetre jellemző módon találhatók adeninben gazdag, 2-6 nukleotidból álló, ismétlődő szekvenciák, melyek teljes hossza 10 nt is lehet, ezek a mikrosatelliták (Chambers 2000). Többnyire intronokban helyezkednek el, de megtalálhatók exonokban is. Az MSI jelensége az egészségestől való eltérést jelenti ezen szekvenciák hosszában. Sporadikus tumorokban 12-15%-os gyakorisággal, LS-ben mintegy 95%-ban mutatható ki az eltérés. Kialakulásának hátterében az áll, hogy a replikáció során a DNS polimeráz időnként hibát ejt a repetitív szekvenciák másolása során, mint amilyenek a mikrosatelliták. Ha megcsúszik a polimeráz enzim, egy inszerciós, vagy delíciós hurok (IDL) alakul ki, melyet az MMR rendszer felismerés után ki tud javítani a bázistévesztésekkel együtt. Ha ezek a hibák nem kerülnek javításra működő MMR fehérjék hiányában, a következő replikáció során a hibás gén továbbadódhat. Az egyszerű bázispár cserék pont mutációk formájában jelentkeznek. Az IDL-ek „frame shift mutációt” okoznak, melyek eredménye nonszensz mutáció lesz. Ez a folyamat egy csonka fehérje expresszióhoz vezet, mely eredeti funkcióját nem tudja ellátni, hamar lebomlik, illetve immunogenitását nem tartja meg ezáltal nem lehet kimutatni a sejtmagban. Az MSI kimutatására bizonyos mononukleotid (BAT25, BAT26) és dinukleotid markereket (D2S123, D5S346, D17S250) lehet felhasználni a tumorból, ill. vérből származó DNS minták összehasonlításával. Újabban a „quasimonomorph mononucleotid pentaplex” marker szettet ajánlják, annak nagyobb szenzitivitása miatt (Buhard 2004). Ez a vizsgálat nem igényel kontroll DNS mintát (vér a betegtől), mert a humán genomban nagyfokú hasonlóságot mutatnak és egyetlen PCR vizsgálattal megoldható az MS státusz jellemzése. Nagyfokú instabilitás áll fenn, ha a markerek több mint 30%-a eltérést mutat. Ha az eltérések aránya 30% alatti, alacsony instabilitásról beszélünk (MSI-L) és a LS diagnózisa nem valószínű. Amennyiben a tumorsejtek MSI negatívak az LS diagnózisa elvethető, ebben az esetben mikroszatelita stabil tumorról beszélünk. Egy további lehetséges út az LS kialakulásához az

úgynevezett „**nagy deléciók**” létre jött. Ez a pathomechanizmus az MSH2 mutációk kb. 33 %-ához járul hozzá, az eltérést MLPA technikával lehet kimutatni.

Egyre több bizonyíték halmozódik fel amellett, hogy a családi halmozódást mutató, de MSI-L, vagy MSS esetekben az „alacsony penetranciájú gének” mutációinak felhalmozódása állhat a háttérben (Aaltonen 2007, Wood 2007).

Figyelemre méltó, hogy a **sporadikus CRC, gyomor és endometrium** tumorok 12-17 %-ában is megfigyelhető MSI-H fenotípus (Ward 2001, Popat 2005). Ezek az esetek azonban legtöbbször a MLH1 gén promóterének biallélikus hypermethylociójához köthetők (CIMP). Amennyiben nem igazolható mutáció egyik MMR génben sem, a BRAF V600E mutáció lehetőségét is ajánlott megvizsgálni (Schlussel 2014). Ennek pozitivitása esetén az LS diagnóza majdnem teljesen kizárható.

Az LS igazolása nem ér véget az MMR gének mutáció vizsgálatával, akkor sem ha DNS szekvencia eltérést sikerül kimutatni. Bár a legtöbb deléciónak és nonszensz mutációnak patológias következményei vannak, a misszensz mutációk nem mindig értelmezhetők egyféleképpen. Ha az aminosav csere feltehetően nem okoz lényeges funkcióváltozást, az eltérést polimorfizmusnak nevezzük. Amennyiben bizonytalan az aminosav változás funkcionális eredménye, ismeretlen jelentőségű variánsról beszélünk. A genetikai változások funkcionális megítélésére számos matematikai modellt dolgoztak ki (Win 2013).

A klinikai és molekuláris genetikai vizsgálatok eredményeit összefoglalva a Lynch szindrómára az alábbiak jellemzőek:

Az MMR gének csírasejtes mutációja elengedhetetlen feltétele a diagnózisnak.

Az öröklődés menet autoszomális, domináns.

Mikroszatellita instabilitást lehet kimutatni a tumorok 95%-ában.

Az adenoma-carcinoma szekvencia jelentősen lerövidül 2-3 évre, a 10-15 éves sporadikus átalakuláshoz képest.

A colorectalis rák fiatalabb életkorban jelenik meg, mint az átlag populációban (45 év a 63 év helyett).

A proximális colon az esetek 70 %-ában érintett, szemben a 30%-os sporadikus érintettséggel.

Magas a szinkron tumorok száma. A betegek 25-30 %-ának metachron tumora jelentkezik 10 éven belül.

Extracolicus tumorok jelenhetnek meg: endometrium, ovarium, uroepitheliális, gyomor, vékonybél, epeút, hasnyálmirigy és agydaganat.

Szövetileg alacsonyan differenciált, pecsétgyűrű sejtes, bőséges mucint termelő tumort lehet látni. A Crohn betegséghez hasonló lymphocytás beszűrtség jellemző.

Kedvezőbb a colorectalis carcinomák túlélési esélye, mint az azonos stádiumú MSS, sporadikus tumornak.

Társult faggyúmirigy daganatok jelenhetnek meg.

Az index személy és mutáció hordozó családtagjainak gondozása

Tudományos jelentősége mellett klinikai következménye akkor van egy felfedezett mutációnak, ha az index személy és családja hajlandó együttműködni a kivizsgálásban és a követés során. Európai és USA ajánlások részletesen kidolgozott algoritmust javasolnak a különböző daganatok szűrésére (Vasen 2013, Giardello 2014). Hosszú távú követések eredményei alapján egyértelműen javasolt az 1-2 évente végzett **colonoscopy** (Jarvinen 2000). A relatíve sokkal kisebb számban előforduló további daganatok szűrése eddig nem hozta meg a kívánt eredményt, kivéve az egyszerű vizsgálatot (vizelet vér) igénylő uroepitheliális daganatokat. Így a tünetmentes beteg részletes felvilágosítása mellett további specifikus szűrés egyelőre nem ajánlott.

A **sebészi ellátás** keretében valamennyi ajánlás megemlíti a kiterjesztett, vagy szubtotális colectomiát (ileorectalis anastomosissal) CRC műtete esetén, a nagyarányú metachron tumor megjelenése miatt. Ugyanakkor elemezni kell az életminőség változást is (elsősorban a napi sokszori, híg széklet), mely a műtétet követően kialakul. Az endometrium és ovarium carcinomák lehetősége szükségessé teszi a családtervezésen túllévő, mutáció hordozó nők esetén a profilaktikus méh és ovarium eltávolításnak a megbeszélését.

Minden LS beteget részletesen fel kell világosítani a kórkép lényegéről, lehetőleg a család többi tagjával együtt. A megbeszélés tapintatos megközelítést igényel, a lehetséges **lelki megterhelést**, a laikus hozzáállást is figyelembe kell venni. Szükséges kitérni a várható betegségek tüneteire, de azt is hangsúlyozni kell, hogy nagymértékű segítséget tudunk nyújtani az idejekorán felismert daganat kezelésében. Bátorításul szolgálhat, hogy akik nem hordozzák a kóros gént, azoknak nem magasabb a daganat rizikója az átlag lakosságétól, így megszabadulhatnak a betegség hordozás és továbbadás pszichés terhétől. Ismert **mutációhordozó szülők gyermekeinek rutinszerű vizsgálata** nem ajánlott 20 éves kor alatt az esetleges pszichés teher miatt.

Célkitűzések

I. HNPCC/LS betegek vizsgálata

1. Az LS szűrés bevezetése a klinikai gyakorlatunkba, HNPCC/LS adatbázis létrehozása
2. Az IHC és MS alapján kiszűrt betegek genetikai eltéréseinek vizsgálata
3. Családfa analízisek, a genetikai eltérések elemzése
4. A betegek és mutáció hordozó családtagjaik gondozásba vétele, tanácsadás

II. CRC sejtvonala epithel sejtjeinek és CRC betegek limfocitáinak plazma membrán vizsgálata

1. LS-174-T CRC sejtvonala plazma membránjának vizsgálata IFN- γ hatására az MHCI és ICAM-1 vonatkozásában
2. LS-174-T CRC sejtvonala plazma membránjának vizsgálata ICAM-1 siRNS hatására az MHCI és az ICAM1 vonatkozásában
3. CD4⁺ T limfociták plazma membrán összehasonlító vizsgálata CRC betegek nyirokcsomóiban és perifériás vérében
4. CD4⁺ T limfociták plazma membrán összehasonlító vizsgálata Crohn betegek nyirokcsomóiban és perifériás vérében
5. CRC betegek primer tumorának és máj metasztázisainak vizsgálata tömegspektrometriás mérésekkel

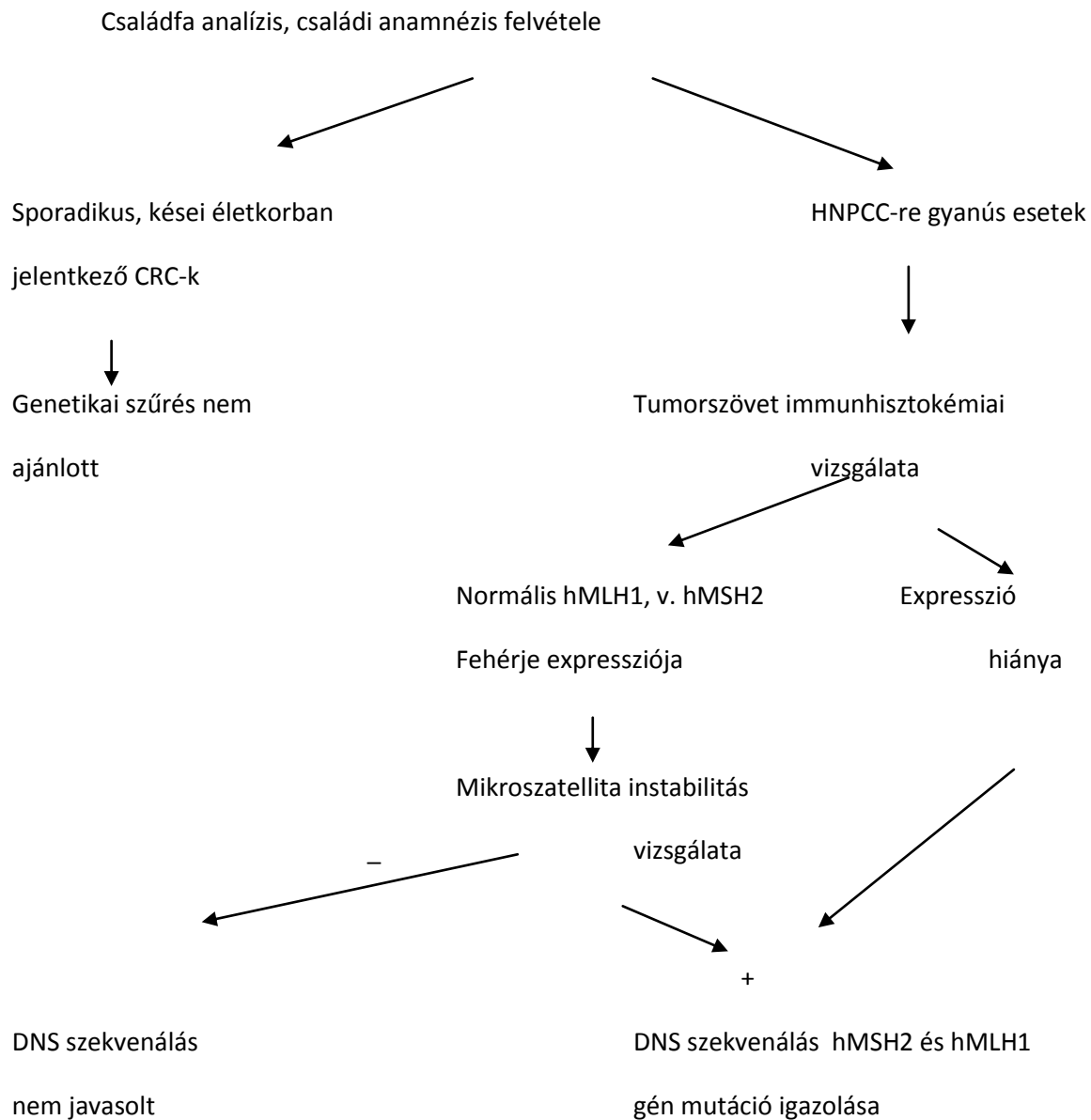
Betegek és módszerek

I. HNPPC/LS betegek vizsgálata

A CRC betegek rendszeres lekérdezését 2004-től vezettük be prospektív módon az AS és a BG ajánlásainak megfelelő kérdőív segítségével, az Intézetünkben történt ellátás során (legtöbbször CRC miatt). Az **adatbázis létrehozásához** az 1997-2003. közötti időszakot retrospektíven dolgoztuk fel, a betegeket a Medsol rendszerben tárolt adatok alapján választottuk ki, majd levelezés után a kitöltött kérdőíveket elemeztük. Az összesen 1127 megkeresett betegből 809 adatai használtuk fel, elhalálozás, vagy megfelelő válasz hiánya miatt. A prospektív feldolgozás szignifikánsan nagyobb számú LS beteg kiszűrését tette lehetővé (Damjanovich 2001, Tanyi 2004, 2006). Amennyiben a családi anamnézist az IHC megerősítette, MS vizsgálatot végeztünk. Az MSI-H betegek mintái kerültek további vizsgálatra: az MLH1 és MSH2 gén valamennyi exonjának szekvenálására, szükség esetén MLH1 promóter hypermethyloció, és MLPA analízis történt az alábbi algoritmus szerint (I.4. ábra).

Immunhisztokémiai vizsgálat

Vizsgálataink során rutin metodikával feldolgozott, formalinban fixált, paraffinba ágyazott vastagbél adenocarcinomából származó szöveti mintákat használtunk. Öt mikron vastagságú, sorozat metszeteket készítettünk a haematoxylin-eosin festéshez és az MSH2, MLH1 és (2012-től) az MSH6 immunhisztokémiai reakciókhoz. Az immunhisztokémiai reakció elvégzéséhez a metszeteket deparaffináltuk xylol, 96 %-os etil-alkohol segítségével, majd rehidráltuk. Endogén peroxidáz blokkolást végeztünk 0,5%-os metanolos hidrogén-peroxid oldattal 30 percen keresztül, majd desztillált vizes öblítés után antigén feltárást végeztünk. A metszeteket 20 percre mikrohullámú sütőbe helyeztük (600 W), citrát pufferben (10 mmol/l citromsav, 2N NaOH-dal, pH 6,4). Ezután pH 7,4-es PBS oldatban mostuk 30



I.4. ábra. A HNPCC vizsgálataink során alkalmazott algoritmus.

percig, 37°C-on. A monoklonális anti-humán MLH1 (clone G168-15, Becton-Dickinson Biosciences, USA), illetve anti-humán MSH2 (clone 25D12 Labvision Corp., Ferment, CA, USA) primer antitest 1:100 hígításával inkubáltunk 4 °C-on, éjszakán át. Kétszeri pH 7,4-es PBS oldatban történő mosás után hozzáadtuk a szekunder antitestet (LSAB, biotinnal konjugált 2. antitest, DAKO, Carpinteria, CA, USA). Ezt követően 20 percig

szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az előhívást VIP chromogénnel (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) végeztük, majd metilzöld magfestés, víztelenítés, lefedés történt.

DNS preparálás

A **paraffinos metszetekből** deparaffinálás és proteináz K emésztés után vontuk ki a DNS-t, a High Pure PCR Template Purification kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) előírása szerint. A beteg és családtagjai **vérmintái** (3-3 ml, EDTA-s vér) esetén a Wizard DNA Purification System (Promega Corp., Madison WI, USA) rendszert használtuk az útmutatónak megfelelően.

Mikroszatellita instabilitás vizsgálata

A tumorszövet és a beteg/hozzátartozók véréből izolált DNS mikrosatellita instabilitási vizsgálatát végeztük. Két **mononukleotid** markert (BAT 25, BAT 26) és három **dinukleotid** markert (D2S123, D5S346, D17S250) vizsgáltunk a Nemzetközi Referencia Panel utasításait követve, a HNPCC Microsatellite Instability Test alkalmazásával (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Az amplifikáció LightCyclerrel (Roche) történt, melyet olvadáspont analízis követett. Az MSI státuszt a „National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for Colorectal Cancer Detection” konszenzusa alapján határoztuk meg. Nagyfokú instabilitást (MSI-High) állapítottunk meg, amennyiben a tumorszövetben a markerek legalább 30 százaléka mutatott új alléleket a vérből izolált kontrollhoz képest. Ennél kevesebb eltérés esetén kismértékű instabilitásról (MSI-Low) beszélhetünk. Ha nem találtunk eltérést a tumorszövetből és a vérből izolált markerek között, akkor stabil MS státuszt (MSS) állapítottunk meg (Boland 1998).

MLH1 és MSH2 gének szekvenálása

PCR

hMLH1 és hMSH2 gének kódoló részeit összesen 35 primer párral fedtük le. A PCR reakciókat Primus96 PCR készülékben (MERCK) végeztük.

1 U REDTaq DNS polimeráz (SIGMA D 4309)

10x REDTaq PCR puffer (polimerázzal forgalmazták)

0.1 μM sense primer

0.1 μM antisense primer

dNTP mix: 100 μM egyenként (Promega U1240)

0.5 mM MgCl₂ (SIGMA M-8787)

200 ng genomiális DNS

PCR program:

96 °C 5 perc

93.5 °C 1 perc
Tanell. 1 perc } 35x

72 °C 1 perc

A primerek kötődési hőmérséklete (Tanell.) a primerek mellett található.

Primer szekvenciák:

MLH1 1 exon Tanell.: 56 °C

s 5'-gacgtttccttggtcttctg-3'

as 5'-ccgttaagtcgtagcccttaagt-3'

MLH1 2 exon Tanell.: 55 °C

s 5'-tattttctgttgattgccag-3'

as 5'-tgactctccatgaagcgc-3'

MLH1 3 exon Tanell.: 49 °C

s 5'-gagattggaaaatgagtaaca-3'

as 5'-cacaggaggatattttacaca-3'

MLH1 4 exon Tanell.: 52 °C

s 5'-cccagcagtgagttttcttt-3'

as 5'-gattactctgagacctaggc-3'

MLH1 5 exon Tanell.: 52 °C

s 5'-gattttctctttcccttggg-3'

as 5'-caaacaagcttcaacaatttac-3'

MLH1 6 exon Tanell.: 55 °C

s 5'-ttgccaggaccatcttggg-3'

as 5'-actcccagattttggactgt-3'

MLH1 7 exon Tanell.: 47 °C

s 5'-ctagtgtgtgttttggc-3'

dc_1009_15

as	5'-cataaccttatctccacc-3'	s	5'-ttgtcccaactgggtgtatctc-3'
MLH1 8 exon Tanell.:55 °C		as	5'-tcagttgaaatttcagaagt-3'
s	5'-aaatccttggtgtctctgctg-3'	MLH1 16 exon Tanell.:50 °C	
as	5'-gtgatggaatgataaaccaag-3'	s	5'-ttcatgttcttgcttcttcc-3'
MLH1 9 exon Tanell.:52 °C		as	5'-gaagtataagaatggctgtc-3'
s	5'-gcttcagaatctcttttcta-3'	MLH1 17 exon Tanell.:55 °C	
as	5'-gtggatttcccatgtgggtc-3'	s	5'-tgtccttttctgcaagc-3'
MLH1 10 exon Tanell.:55 °C		as	5'-ttccctccagcacacatg-3'
s	5'-ggacagtttgaactgggtgc-3'	MLH1 18 exon Tanell.:55 °C	
as	5'-gaggagagcctgatagaacatctg-3'	s	5'-gaggtattgaatttcttggac-3'
MLH1 11 exon Tanell.:55 °C		as	5'-gtgtgcatcaccactgtacc-3'
s	5'-tctaaggtaatgttctctcta-3'	MLH1 19 exon Tanell.:60 °C	
as	5'-aagtagctggatgagaagcg-3'	s	5'-ttcatgttcttgcttcttcc-3'
MLH1 12 exon Tanell.:55 °C		as	5'-gaagtataagaatggctgtc-3'
s	5'-ttaatacagactttgctaccag-3'		
as	5'-cagataaagagtagctgtactt-3'		
MLH1 13 exon Tanell.:55 °C		MSH2 1 exon Tanell.:59 °C	
s	5'-ggttcattcacagctctgtag-3'	s	5'-cttcaaccaggaggtgaggaggt-3'
as	5'-cacagcgtttagtaccctca-3'	as	5'-gaaaggagccgcgccacaag-3'
MLH1 14 exon Tanell.:60 °C		MSH2 2 exon Tanell.:47 °C	
s	5'-aagtggggttggtaggattc-3'	s	5'-atgtaatatctcaaactgtaatgt-3'
as	5'-ctctgctgtgtcacacactc-3'	as	5'-ataagtaaattaaaaaggaagataa-3'
MLH1 15 exon Tanell.:49 °C		MSH2 3 exon Tanell.:52 °C	

dc_1009_15

s	5'-tgttcaagagtttgtaaattttt-3'	s	5'-gtagtaggtatttatggaatac-3'
as	5'-tggaatctcctctatcactagact-3'	as	5'-taataatgacttacaacac-3'
MSH2 4 exon Tanell.:47 °C		MSH2 11 exon Tanell.:50 °C	
s	5'-tcttattccttttctcatagtag-3'	s	5'-ttaataaaaactgttatttccgatttg-3'
as	5'-tattgtaattcacattataatcc-3'	as	5'-agccaggtgacattcagaacattat-3'
MSH2 5 exon Tanell.:47 °C		MSH2 12 exon Tanell.:52 °C	
s	5'-agtggatatagaaatcttc-3'	s	5'-aggctatgtagaaccaatgc-3'
as	5'-accaatcaacatttttaaccc-3'	as	5'-taccagtaatgatgttgaac-3'
MSH2 6 exon Tanell.:48 °C		MSH2 13 exon Tanell.:55 °C	
s	5'-tttactaatgagcttgcc-3'	s	5'-aatcttgctttctgatataattg-3'
as	5'-caggttacataaaaactaacg-3'	as	5'-catttctatcttcaagggactagga-3'
MSH2 7 exon Tanell.:49 °C		MSH2 14 exon Tanell.:55 °C	
s	5'-agattgaatttagtgaagc-3'	s	5'-tcatgtaattatgtgcttcag-3'
as	5'-caaaatcacttggtaccttc-3'	as	5'-gtactccaatagtacatacc-3'
MSH2 8 exon Tanell.:47 °C		MSH2 15 exon Tanell.:55 °C	
s	5'-aatgagatcttttattgtttgtt-3'	s	5'-tgtctcttctcatgctgtcc-3'
as	5'-actgcttaaattaaaaaagtatattg-3'	as	5'-taagttaaactatgaaaacaaactg-3'
MSH2 9 exon Tanell.:55 °C		MSH2 16 exon Tanell.:58 °C	
s	5'-gtcactttgttctgtttgcag-3'	s	5'-gacattcacatgtgtttcagc-3'
as	5'-attccaacctccaatgaccc-3'	as	5'-taccttcattccattactggg-3'
MSH2 10 exon Tanell.:55 °C			

Mutáció keresés (HDA és SSCP analízis)

Az MLH1 és a MSH2 gén valamennyi exonját vizsgáltuk a betegek és hozzátartozóik véréből izolált DNS-ben, a QiAmap DNA Blood Midi, vagy Mini kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével. A felsorolt primerek segítségével minden exont, mindkét irányban amplifikáltunk. A PCR termékek denaturálás utáni futtatása vertikális gél apparátussal történt (BioRad) MDE gélen (Cambrex Bio Science Rockland Inc., Rockland, ME, USA) a gyártó instrukcióinak megfelelően. A vizualizálás ezüstözéssel történt. Az eltérő migrációt mutató PCR terméket szekvenáltuk.

Szekvenálás

Az eltérő elfő mintázatot adó PCR terméket láncterminálós módszerrel szekvenáltuk BigDye Terminator Cycle Sequencing v. 3.1 kittel (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a gyártó utasításainak megfelelően. A reakcióterméket ABI-PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems) készüléken elektroforetikusan futtattuk a készülék kézikönyve szerint. Az eredményt Sequencing Analysis v.3.7 szoftverrel analizáltuk (Beck 1997, Yanagisawa 2000).

MLH1 promóter metiláció vizsgálata

A transzkripció start helytől proximális irányban a –435 és –316 nukleotid közötti régió vizsgálata Kámory és mtsai szerint metilációra érzékeny és nem érzékeny enzimek, valamint belső kontrollok segítségével történt (Kámory 2003). A disztális rész vizsgálata –662 és –575 között történt kvantitatív valós idejű PCR segítségével, amelyben a metilációs státusz egy nem metilált humán sperma kontroll és egy teljesen metilált mesterséges kontroll segítségével határozható meg (Eads 2001).

Nagy deléció kimutatása MLPA módszerrel

A genomi deléciókat multiplex ligáció-függő próba amplifikációs módszerrel, a SALSA MLPA Kit P003 MLH1/MSH2 (MRC-Holland, Amsterdam Netherlands) segítségével mutattuk ki, a gyártó útmutatásai alapján, 2012-től. A feldúsított DNS-fragmenteket kapilláris gélelektroforézissel választottuk szét (Applied Biosciences). A különböző exonok amplifikációs termékeinek mennyiségét a görbe alatti terület alapján határoztuk meg, az összes fragment görbe alatti területének összegéhez viszonyítva. Deléciót állapítottunk meg a vizsgált mintában, ha valamely exon próbáinak amplifikációs terméke 35-55%-kal csökkent a negatív kontroll mintákhoz képest.

II. CRC sejtvonala epithel sejtjeinek és CRC betegek limfocitáinak plazma membrán vizsgálata

LS-174-T CRC sejtvonala

Az alacsony metasztatizáló képességű colorectalis sejtvonalat (HTCC, Manassas, VA, USA) logaritmikus növekedési fázisban tartottuk RPMI 1640 tápoldatban, 10 % FCS és 50 µg/ml gentamycin hozzáadásával. Hetente kétszer passzáltuk a sejteket 2.5×10^4 sejt/cm², a felválasztás tripszinezéssel történt. Az aktivációs kísérletekhez 5 IU/ml IFN- γ -t (R& D Systems, Minneapolis MN, USA) adtunk a kulturához és még 48 óráig tenyésztettük.

Limfocita preparálás nyirokcsomóból és perifériás vérből

Az anyaggyűjtést a DEOEC Etikai Bizottságának engedélyével végeztük. Nyirokcsomó mintát (1-1 db-ot) csak a sebészi beavatkozás során terápiás célból eltávolított preparátumból vettünk ileocecalis reszekció (jobb hemicolectomia) esetén a mesenterialis oldal felől. Crohn betegek vizsgálata során szintén ileocecalis nyirokcsomókat távolítottunk el, ha ez volt a betegség megnyilvánulásának egyetlen góca. Bármilyen társuló gennyes gyulladást kizáró okként kezeltünk. Kontroll nyirokcsomóként nem tumoros, nem gyulladós

reszekátumokból származó minták szolgáltak. Kontrollként egészséges önkéntes donorok perifériás vérért használtuk.

A vérből Ficoll (Sigma-Aldrich) grádiensen végeztük a limfocita szeparálását az előírásnak megfelelően. A nyirokcsomókat 30 percen belül, jégre helyezett Petri csészében apró darabokra vágtuk, a sejteket PBS-sel mostuk ki a kb. 1 mm³-es metszetekből. CLSM vizsgálatokhoz CD4⁺ sejteket dúsító MACS oszlopot használtunk a gyártó előírásainak megfelelően (Miltenyi Biotec).

Monoklonális antitestek

A MEM-111 (IgG2) az ICAM-1 (CD54), (Bazil 1990), a MEM-75 (IgG1) a transferrin receptor (TrfR, CD71), a MEM-85 (IgG2b) CD44 hyaluronsav receptor, a MEM-43/5 (IgG2a) CD59 komplement inhibitor azonosítására használt antitestek Dr. Václav Horejši ajándéka volt (Institute of Molecular Genetics, Prága, Cseh Köztársaság). A W6/32 (IgG2A) és L368 (IgG1) monoklonális antitesteket az MHC-I nehéz lánc, ($\alpha 2$ $\alpha 3$ domének monomorf epitópja ellen) (Tanabe 1992) és a $\beta 2$ mikroglobulin azonosítására (Szöllősi 1989) Dr. Frances Brodsky bocsátotta rendelkezésünkre (UCSF, CA, USA). Az antiTac (IgG2a) IL-2R α és a7A4-24 (IgG2) IL-15R α elleni antitestek Dr. Thomas Waldmann (NIH, Bethesda, MD, USA) ajándéka volt. Az IL-2/15R közös γ lánc elleni antitestet a BD Biosciences /Pharmingen-től (San Diego, CA, USA), a CD4 (clone S3.5) antitestet a Caltag, Buckingham, UK-tól vásároltuk.

Fab fragmentum preparálás

Az Fab fragmentek előállítását az előbb felsorolt monoklonális antitestekből papain (Pierce, Northumberland, UK) emésztéssel végeztük emésztő pufferben, 5 óráig, 37°C-on. Az antitesteket centrifugálással választottuk el, majd az Fc és Fab fragmentumokat protein A-sepharose oszlopon választottuk el Edidin szerint (Edidin 1982).

Az Fab fragmentumok és kolera toxin B alegység fluoreszcens jelölése

Az antitest fehérjéket donorként FITC-cel, akzeptorként TRITC-cel (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) jelöltük, ill. további donor-akceptor festékpárokat is alkalmaztunk: Alexa-Fluor-488 Alexa-Fluor-546 (Molecular Probes-Invitrogen, OR, USA), Cy3-Cy5 (Amersham, GE, USA). A festék -fehérje molekuláris aránya átlagosan 0.7 és 1.51 között volt. A pontos jelölési arányt minden mérés előtt, minden újonnan használt antitest esetében spektrofotométeren mértük meg (Shimadzu UV-2100, Japan). A jelöletlen kolera toxin B alegységet az RBI-től vásároltuk (Natick, MA, USA), vagy a FITC-cel jelölt kolera toxin B alegységet a Sigma-Aldrich-től (S-A Kft, Magyarország) szereztük be. Az általunk jelölt antitestek megtartották biológiai aktivitásukat (antigén specificitásukat és aviditásukat), melyet jelöletlen antitestekkel való kompetícióval ellenőriztünk.

Sejtek antitest jelölése

1×10^6 sejtet 50 μ l-ben vettünk fel és telítő dózisu monoklonális antitestet, vagy Fab fragmentet adtunk hozzá, az esetleges összetapadt molekula konglomerátumokat nagy fordulatszámú centrifugálással választottuk szét a jelölés előtt. A sejteket 40 percig jégen inkubáltuk sötétben. A jelölés után mostuk, majd 50 μ l PBS-ben reszuszpendáltuk a sejteket. Végül 2 % -os paraformaldehidet használtunk fixálásként. A kötőhelyek számát fluorescens gyöngyökkel való intenzitás kalibrálás után határoztuk meg (Quantum 25, FCS Corp., USA).

Áramlási citometria energia transzfer mérések (FCET) a jelölt sejtfelszíni fehérjék között

A sejtenkénti energiatranszfer méréseket a donor-akceptor molekula párok között FACS^{tar} Plus, kettős lézer gerjesztésű áramlási citométeren, vagy FACS Calibur, vagy a három lézert alkalmazó (Ar ion 488 nm, szolid fázis 532 nm, HeNe 633 nm-en emittáló) FACS DiVa készülékeken (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) végeztük. A sejttörmeléket

kétirányú szórás kép alapján választottuk le (előre- és oldalirányú fény szórás). Egy-egy sejtről gerjesztés után 3-4 fluoreszcencia intenzitási adatot mértünk egyidejűleg. A háttér intenzitás (autofluoreszcencia) mértékét jelöletlen szuszpenzióról vettük fel. A donor és az akceptor gerjesztését követően mértük a donor akceptorral és anélkül emittált energiáját, valamint az akceptor molekula gerjesztő fénynél észlelt emisszióját. A gerjesztőfény kiszűrésére a donor-akceptor festékpárokra megfelelő sáv és felül áteresztő filtereket használtunk

A GM1 lipid-raft méretének meghatározása kolera toxin jelöléssel.

A FITC jelölt kolera toxin B-t (Sigma-Aldrich KFT, Magyarország) 50 µl sejt szuszpenzióhoz adtuk 30 percre. A kolera toxin B adagját 5 és 150 µg/ml között fokozatosan emeltük. A sejteket jelölés után paraformaldehiddel fixáltuk. Az 1×10^6 /ml sejtet tartalmazó szuszpenzióból kb. 10^4 sejtet mértünk le FCET módszerrel.

CLSM

Az LS-174-T sejteket Zeiss LSM 510, vagy Olympus Fluo View 1000 konfokális mikroszkópban is vizsgáltuk az előzőekben leírt fluoreszcens jelzések után, a receptor klaszterek µm-es skálán történő megfigyelése céljából. A sejteket fedőlemez-kamrában (Nunc, Roskilde, Dánia) tenyésztettük, majd 4°C-on 30 percig jelöltük, és PBS-ben való mosás után paraformaldehidben fixáltuk. Az optikai rétegvastagság 1.0-1.5 mikron volt, legalább két-három fluoreszcencia intenzitás mérést végeztünk egyazon optikai sík képi rekonstrukciója előtt.

RNS interferencia vizsgálatok

Az ICAM-1 expresszió blokkolására két validált rövid interferáló RNS szakaszt használtunk, siRNS 8142 és 8233 (Ambion, Huntingdon, Egyesült Királyság). Negatív kontrollként a GFP (green fluorescein protein) siRNS-ét használtuk. Az LS-174-T sejteket elektroporáció útján transzfektáltuk Nucleofector eszközzel (Amara, Köln, Németország). A

sejtekhez az optimális körülményeket a gyártó adatbázisából választottuk ki (T-oldat, T-20 program).

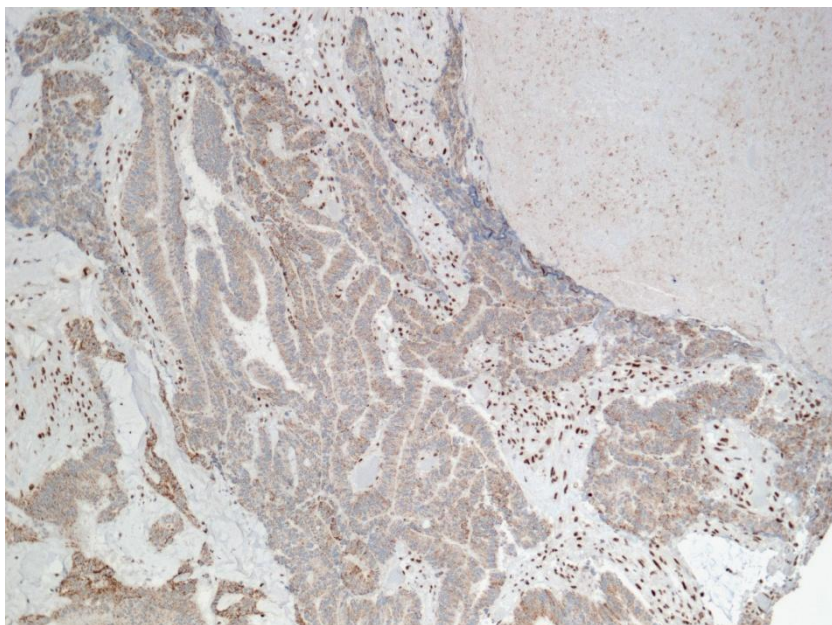
Valós idejű, in situ tömegspektrometriás mérések (REIMS)

Konvencionális elektromos kést használtunk műtét közben (Erbe 300, Germany). A keletkező ionizált molekulákat tartalmazó füstöt a késre applikált teflon csővel, VAC 100 Venturi pumpával szívtuk el (Veriflo, Parker Instruments). A nagy felbontású tömegspektrometriás méréseket Thermo LTQ Orbitrap Discovery és Thermo LCQ Deca XP eszközökkel végeztük. A mérések 150-500 ms időt vettek igénybe, az alkotók molekulatömege 600-900 dalton között változott.

Eredmények és megbeszélés

I. 1-2. HNPCC/LS adatbázis létrehozása, genetikai eltérések vizsgálata

A HNPCC adatbázisunk alapjait 2003-ban hoztuk létre. Az 1997-től 2003-igterjedő időszakot retrospektíven, kérdőívek segítségével elemeztük. A CRC miatt műtéten átesett betegeink családfáját az Amsterdam és a Bethesda Kritériumoknak megfelelően vettük fel. A lekérdezés 2004-óta prospektíven zajlik, még a primer műtét bentfekvése idején. Az adatbázisunk 1576 betegét kérdeztük le, 1341-et (84%) minősítettünk sporadikus előfordulású CRC-nak. Valamennyi betegünk közül 69 (4.4%) teljesítette az AC, 166 beteg (10.5%) a BG feltételeit. Összesen 153 betegnél végeztük el az IHC és MSI vizsgálatokat a 235 potenciálisan pozitív betegből (48-AC, 105-BG arányban). A vizsgálatok száma a megfelelő minták hiánya miatt lett kevesebb a tervezettnél (kezdeti, retrospektív vizsgálati fázis). Az Amszterdam pozitívak közül 15 (31%), a Bethesda pozitívak közül 19 (18.1%) bizonyult MSI-H-nak. A 34 mutáció analízis és szekvenálás során az első csoportból 9 családban (az AC pozitívak 60%-a)



I.4. ábra Colon tumorból metszet. A tumor sejtek magfestődésének hiánya (barna, DAB) az MSH6 fehérje hiányát jelzi.

igazoltunk 8 különböző patogén mutációt, második csoportból 5 családban 5 különböző patogén mutációt (a BG pozitívak 26%-a) (Kámory 2006, Tanyi 2014). A feltárt patogén mutációk közül 5 bizonyult eddig még ismeretlennek, ill. a vizsgálataink természetesen feltártak már leírt allél variációkat is (Tanyi 2014). A 14 mutációból mindössze egy mutatott ismétlődést 3 különböző, genetikailag független családban, időben egymástól távol végzett vizsgálatok során (Tanyi 2012).

Esetszámaink nemzetközi összehasonlításban nem nagyok, de korábban hazai viszonylatban csak Papp és mtsai adtak hírt nagyobb anyagról (Papp 2007). Húsz HNPCC-s és 16 HNPCC gyanús család vizsgálatáról számoltak be. A 18 rokon kapcsolatban nem levő betegben 18 mutációt észleltek. Ezek között 16 patogénnek mutatkozott, valamint 9 még nem szerepelt az adatbázisokban, így új mutációként közölték. Ismétlődő variánst ez a munkacsoport sem talált. Tímár és mtsai 2009-ben a Nemzeti Onkológiai Konzorcium nevében megjelentetett összefoglalójukban 57 család vizsgálatáról adnak jelentést (Tímár 2009). Tizennyolc patogén mutációt találtak, 9 MLH1 és 9 MSH2 megoszlásban. Ismétlődés, azaz „founder” mutáció itt sem mutatkozott. Az eltérések fele új volt, valamint 7 besorolatlan variánst is találtak. A fenti vizsgálatokkal negatívnak bizonyult, de anamnesztikusan pozitív családok további vizsgálata során 5 EPCAM mutációhoz köthető, epigenetikus MSH2 elnémulást is kimutattak. Érdekes az összehasonlítás a hazai és a finn, valamint balti populációkkal, ahol a lélekszám nagyságrendi hasonlósága mellett egyértelmű founder mutációt is találtak (Chapelle 1998. Nystrom-Lahti 1994, 1996.) „Founder mutációra” saját vizsgálataink során sem bukkantunk, az egyetlen ismétlődő variáns az MLH1 c.143A>C (p.Q48P) volt, három genetikailag nem rokon családban találtuk meg, különböző vizsgálatsorok alkalmával (Tanyi 2012).

I.3. Családfa analízisek, a genetikai eltérések elemzése

A családfa analízisek, és az egyes családok, családtagok betegség szemlélete számos tanulsággal szolgáltak a hazai helyzetre vonatkozóan. Hazánk földrajzi mérete ellenére sok esetben egy család ellátása több egészségügyi intézményben történik, a beteg érdekében történő adathozzáférés pedig sajnálatosan esetleges. A családi anamnézis megfelelően részletes felvétele intézményeinkben nem általános. Szomorú példák sorával találkozhatunk a lakosság egészségtudatosságát illetően is. A következő nyolc családon keresztül a jellemző eseteket mutatom be. A családfák elkészítéséhez standardizált jeleket használtunk (Bennett 2008).

1. Család

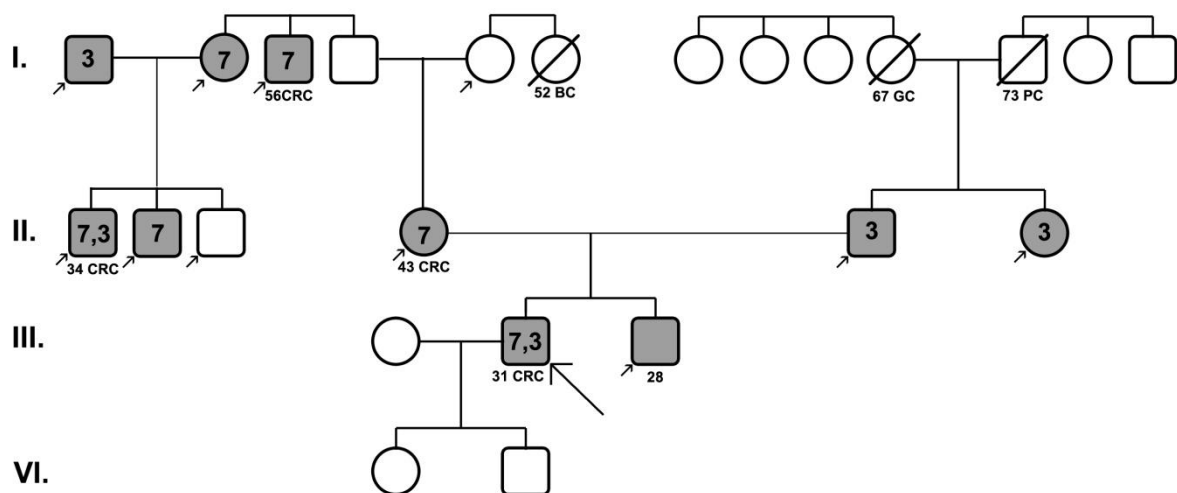
A 31 éves férfibeteg flexura lienalis carcinoma miatt került műtetre. Családi anamnézisében édesanyja 43 évesen, anyai nagyapjának testvére 56 évesen, és az index személy unokatestvére 34 évesen szenvedett vastagbél daganatban (I.5. ábra). Összesítve az anyai ágon 4 vastagbél és 1 emlődaganat fordult elő elsőfokú rokonok között, az apai ág egy gyomor és egy tüdődaganat által volt érintve. Immunhisztokémiával az MSH2 festődés hiányát tapasztaltuk, míg az MLH1 pozitív maradt. Az MSI státusz magas instabilitást igazolt. Mindkét gén valamennyi exonját szekvenáltuk, melynek során az MLH1 génben nem találtunk eltérést az immunhisztokémiához hasonlóan. Az MSH2 esetében két mutációt sikerült igazolni, a 7. exon 422.kodon Glu → STOP cserét kialakító nonszensz mutációt, valamint a 3. exon 127. kodon Asp → Ser változást kiváltó misszensz mutációt. A szükséges felvilágosítás után 12 családtag vérmintájából izoláltunk DNS-t. Vizsgálataink alapján az anyai ágon 5 személy hordozza a 7. exonban található nonszensz mutációt, köztük 3 személy vastagbél daganatban szenvedett. A 3. exon mutációja két apai ági családtagban volt kimutatható, valamint az anyai ágon is két személyben. A két mutáció együttes előfordulása 3

családtagban volt fellelhető. Az emlő, tüdő- és gyomordaganatos rokonokat elhalálozás miatt nem sikerült kivizsgálnunk.

Eredményeinket összevetettük az akkor legaktuálisabb nemzetközi mutációs adatbázissal (The Human Gene Mutation Database, Cardiff, International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumors)

A 7. exon nonszensz mutációja új eredménynek bizonyult. Mivel a mutáció STOP kodon kialakulásához vezet, mely trunkált fehérjét eredményez, a változást patogén eltérésnek tartjuk. Ezt az elképzelést támasztja alá a 4 vastagbél daganatban szenvedő beteg hordozó állapota.

A 3. exon misszensz mutációja már több szerző által közlésre került, mint nem patogén polimorfizmus (Samowitz 2001). Az amerikai populációban való előfordulását 0.02-nek adja meg a „The National Institute of Environmental Health Sciences Genome Project”, mely 4 %-os heterozigota előfordulást jelent.



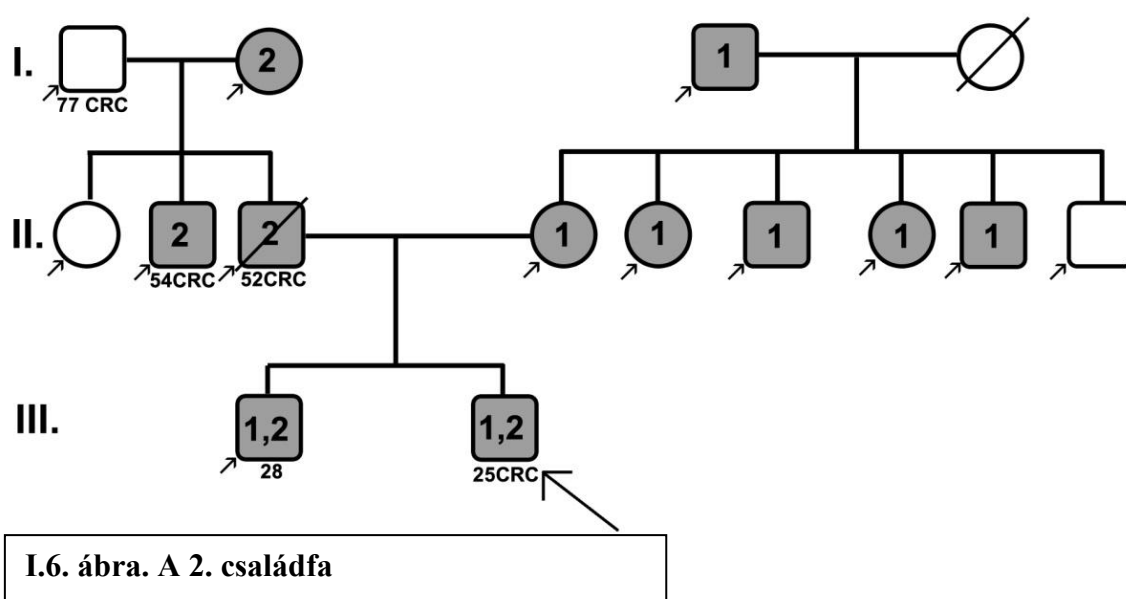
I.5. ábra Az 1. családfa

A család két tagja csak a patogén mutációt hordozta, a CRC 43 és 56 éves korukban alakult ki. Bár a 3. exon mutációja polimorfizmusként ismert, a család másik 2 tagjában, akikben mindkét mutáció jelen volt, a CRC 31 és 34 éves korban jelentkezett. A jelenség okaként esetleg szóba jöhet a nem patogén mutáció jelenléte is, illetve olyan egyéb mutáció, vagy epigenetikus változás (Valeri 2010) az MMR családdhoz tartozó más génekben, melyet nem vizsgáltunk tanulmányunkban. Az index személy öccsét 28 éves korában vizsgáltuk, mindkét mutációt hordozza, de valószínűleg fiatal kora miatt még nem alakult ki benne daganat. Valamennyi mutáció hordozó személy magas rizikójúnak tekintendő, akik rendszeres gondozást igényelnek. Ennek tulajdonítható, hogy colonoscopia során az index személyből 4 év alatt tubulo-villosus adenomát távolítottunk el.

2. Család

A 25 éves fiatalember szinkron rectum és mucinosus coecum adenocarcinoma miatt subtotalis colectomián esett át klinikánkon. A családi anamnézis szegényes, mindössze a 77 éves nagyapa volt érintett CRC által az apai ágon (I.6. ábra). Más carcinoma nem fordult elő ebben a családban. Az index személy 28 éves bátyjából egy tubulo-villosus adenomát távolítottunk el. A Bethesda kritériumok alkalmazása vetette fel a gyanút az LS-re. Immunhisztokémiával az MLH1 és az MSH2 expresszió negatívnak bizonyult. Az MS státusz nagyfokú instabilitása támogatta a diagnózist. Az MLH1 promóter hypermetilációját ki tudtuk zárni. Ezek után végeztük el a két gén 35 exonjának a szekvenálását, mely az MLH1 19. exon 716. kodonjában Val → Met cserét, valamint az MSH2 13. intron 2210 + 1 G >C nukleotidjának cseréjét mutatta ki. 15 családtagot vizsgáltunk meg összesen, akik közül az anyai ágon 8 személyben igazoltuk az MLH1 mutációját, és az apai ágon 5 családtagban az MSH2 mutációt. Az MLH1 19. exon mutációját illetően ellentmondó közlemények láttak napvilágot. Míg Hutter és munkatársai úgy vélték, hogy az eltérés patogén, Cederquist és munkatársai polimorfizmusnak vélik a mutációt. (Hutter 1998, Cederquist 2004). Saját adataink jobban

alátámasztják a mutáció polimorfizmus jellegét tekintve, hogy 8 hordozó családtagból mindössze 1 volt beteg a vizsgálatunk idején. Az MLH1 fehérje vizsgálat szerint a mutáció egy nem konzervatív szakaszon helyezkedik el, és az adatbázisok ebben a régióban több más polimorfizmus leírását is tartalmazzák.

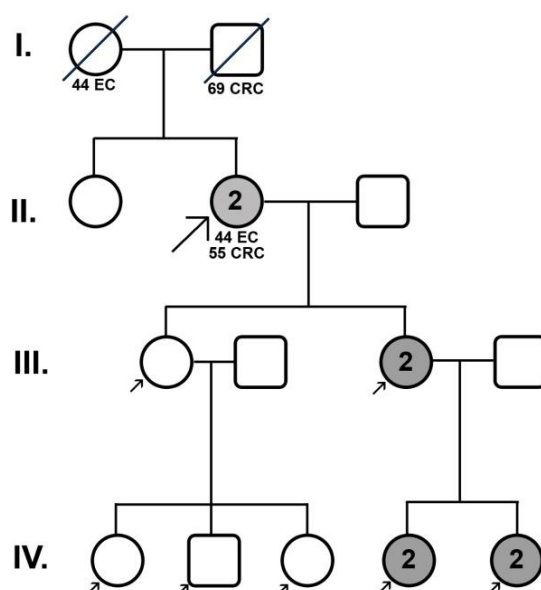


Az MSH2-ben feltárt 13. intron 2210 + 1 G >C patogén mutációként már korábban leírásra. (Kurzawski 2002). A mutáció leolvasási kereteltolást okoz az exon-intron határon. A második családban ez az elváltozás 5 személyben volt kimutatható. Az adatok gondos értelmezésére hívja fel a figyelmet, hogy az apai nagyapa aki 77 évesen CRC-ben szenvedett ezt a mutációt nem hordozta, azaz sporadikus vastagbélrákos betegnek tekinthető. Az index személy bátyjából szűrés során adenomatosus polypot távolítottunk el endoszkóposan. A többi családtag gondozásba vételével kapcsolatban sajátos problémába ütköztünk, a kooperáció hiánya miatt. A részletes felvilágosítás ellenére sem sikerült érzékeltetnünk a betegség kialakulásának veszélyét, és szűrésre a testvérpáron kívül többen nem jelentkeztek. Az index személy édesapja került tünetek miatt vizsgálatra CRC miatt, egyidejű prostata daganattal. Az előbbi még reszekábilis volt, a prostata carcinoma, viszont kiterjedt paraaorticus nyirokcsomó

metastasisist adott, melynek következtében a beteg 9 hónappal később elhunyt. Az édesapa testvére más intézetben került előrehaladott végbéldaganat miatt rectum exstirpatoria.

3. Család

A proband 44 éves korában endometrium, majd 56 évesen colon descendens adenocarcinomában szenvedett. Szülei ekkor már nem voltak életben, édesanyja 48 évesen endometrium, édesapja 69 évesen gyomor daganat miatt halt meg (I.7. ábra). A nagyszülőkről idevágó információval nem rendelkeztek. A család kis létszáma és a szegényes anamnézis ellenére a jellegzetes, fiatal korban jelentkező CRC és EC együttese LS lehetőségére hívta fel a figyelmet. IHC során MSH2 negatívnak bizonyult a tumor szövet és a mikroszatellita vizsgálat MSI-H státuszt igazolt. A szekvenálás során az MSH2 13. exon 711. kodon Arg→STOP változást sikerült igazolnunk. A patogén mutáció a nemzetközi adatbázisokban már szerepelt, lengyel és koreai családokban került leírásra. Az utóbbiakban gyomorrákkal együtt előfordulva mutatták ki, amely az endometriumrák helyett a második leggyakoribb daganat a CRC után Koreában (Kim 2001). A család összesen 8 tagjának DNS-ét sikerült

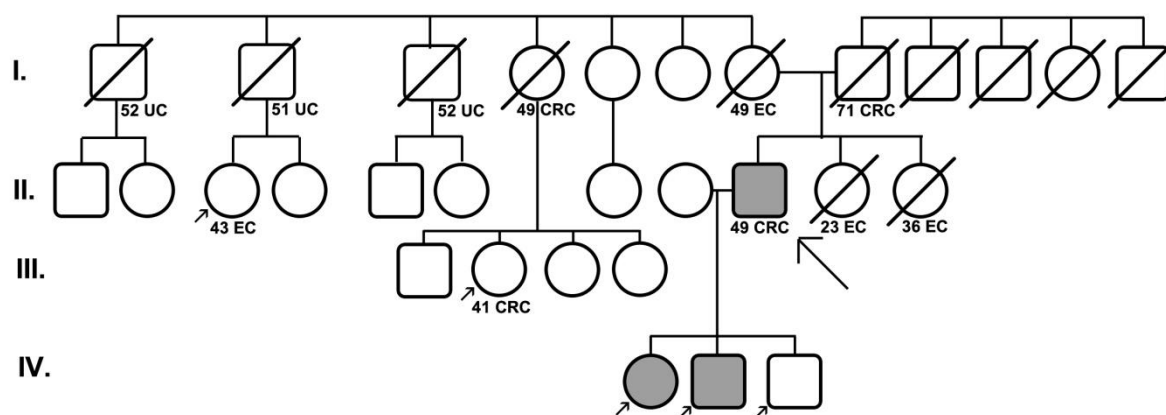


I.7. ábra. A 3. család

megvizsgálunk, további 3 személyben mutattunk ki mutációt. Ellentétben a második családdal itt a felvilágosítás rendszeres nőgyógyászati és colonoscopos vizsgálatokhoz vezetett, mely több adenomatosus polyp eltávolítása révén megakadályozta a malignus betegség kialakulását.

4. Család

A 49 éves férfi flexura hepatica adenocarcinoma miatt került műtetre. Családi anamnézise azonnal felkeltette a figyelmet LS irányban (I.8. ábra). Két húgát 23 és 36 évesen veszítette el endometrium carcinoma következtében. Édesanyjának 49 évesen endometrium, édesapjának 71 évesen végbélrákja volt. Az anyai ágon fordult még elő 3 húgyúti daganat, endometrium, és vastagbél daganat. Az IHC vizsgálat az MLH1 festődésének a hiányát mutatta ki, MSI-H jellegzetesség mellett. A gén nagy szakasz delícióját sikerült kimutatni MLPA vizsgálat segítségével, mely az adatbázisok szerint új mutációnak bizonyult (INSIGHT). A delíció 1786 bp veszteséget okozott a 11. exon 301. kodonjában kezdődve, 11. intronban végződve (g.28756-g.305429). A kereteltolásos mutáció a fehérje heterodimer képzésért (MLH1-PMS1/2) felelős szakaszának funkcióját szünteti meg.

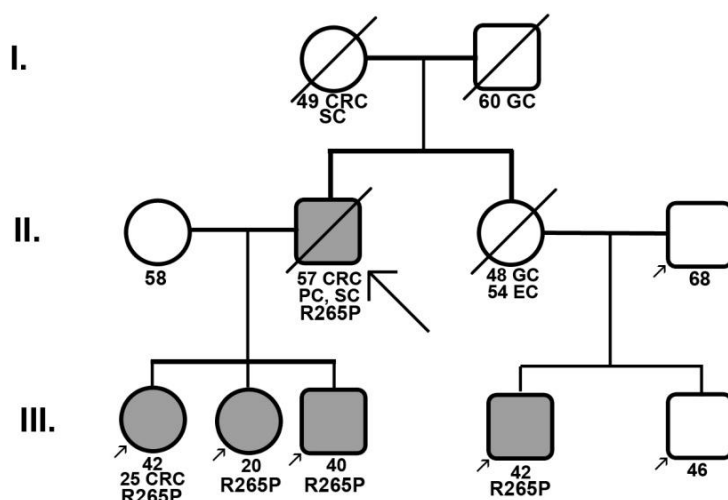


I.8. ábra. A 4. család

A nagy számú családtag vizsgálatával, az anamnézis feltárásával típusos LS család került látóterünkbe, akikben azonban elsősorban a LS asszociált daganatok domináltak. A genetikai vizsgálatba itt sem sokan egyeztek bele, és a szűrésben, gondozásban való együttműködés is sajnálatosan alacsony fokú volt.

5. Család

Az 57 éves férfi anaemia tüneteivel került colonoscopiára, melynek során a coecum mucinosus adenocarcinomája igazolódott. Kivizsgálás során CT a pancreasban is térfoglalást írt le. Mindemellett a távolabbi anamnézisben „bőrkinövések eltávolítása szerepelt”. Saját vizsgálatunk idején az index személy nyakán helyezkedett el bőrelváltozás. Előkészítés utáni műtét során a coecum daganat miatt jobb oldali hemicolectomia történt, de sajnos a pancreas folyamat inoperábilisnak bizonyult. Figyelmünket azonban már felkeltette a többszörös tumor előfordulás és biopsziát vettünk a hasnyálmirigy daganatból és a bőrelváltozás teljes egészében eltávolításra került (I.9. ábra). Az IHC vizsgálat negatív volt MLH1 festődés tekintetében, az MSI státusz nagyfokú instabilitásra utalt. Szekvenálással az MLH1 gén csírasejtes mutációját találtuk a 10. exonban, Arg265Pro cserével. (c.794 G→C, misszensz mutáció).



I.9. ábra. Az 5. családfa

A családfa analízis az index személy édesanyjában 49 évesen, lányában 25 évesen fedezett fel CRC-t, édesapjában 60 évesen, nővérében 48 évesen derült fény gyomor tumorra, és ugyancsak a nővérében 54 éven endometrium daganatra. Az ismert mutáció birtokában elvégeztük a családtagok mutációs vizsgálatát is, összesen 5 személy esetében. Közülük 4-ben mutattuk ki a genetikai eltérést. További 3 tumoros családtagok elhalálozás miatt nem tudtunk vizsgálni.

A tumoros halmozódás a családtagokban és a többszörös bőr tumor jelenléte az index személyben vetette fel a Muir-Torre szindróma lehetőségét, melyet ma az LS szindróma egyik variánsának tekintenek. Az első leírások 1967-ből és 1968-ból származnak (Muir 1967, Torre 1968). A betegség az LS egyéb megnyilvánulásaitól a faggyúmirigyekben megjelenő bőr tumorokkal különíthető el, melyre első alkalommal Lynch utalt 1981-ben (Lynch1981). Az MTS előfordulási aránya az LS-en belül 1-10 % körül mozog (Ponti 2006, Lynch 2006), és a CRC megjelenését a bőrelváltozások időben jelentősen megelőzhetik (60 % körül). Amennyiben a recidiváló bőr tumorok felhívták volna a vizsgálatot korábban végző orvos figyelmét az öröklődő jellegre, egy jól kivitelezett szűrő programban való részvétel potenciálisan megmenthette volna a beteg életét. A hasnyálmirigy daganat HNPCC asszociálta előfordulásáról kevés közlés szerepel az irodalomban, MTS-ben pedig nem találtunk erre való utalást.

A klinikai kép háttérében álló MLH1 10. exon c.794 G→C cserével járó misszensz mutáció Arg→Pro helyettesítéssel jár. Mivel nem találtunk erre utalást a vizsgált adatbázisokban, a mutációt új patogén mutációként tartjuk számon. Hasonló pozícióban kialakult misszensz mutáció közlésére találtunk adatot egy szlovák LS család leírásában (MLH1 c.793 C→A, Arg→Ser) (Zavodna 2006). A 29 éves probandban colon ascendens daganat, családjában endometrium daganat, vastagbél polyp és malignus melanoma fordult elő. A szerző a mutációt a családi kép alapján patogénnek gondolja. Szintén a 793 pozícióban C→T,

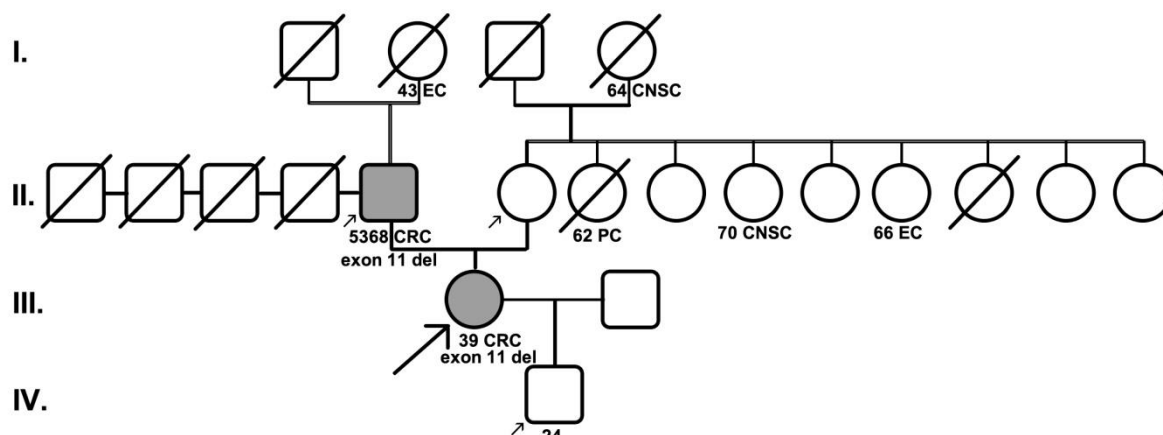
Arg→Cys változást okozó mutációt írtak le egy cseh LS család esetén, melyet szintén patogénnek véltek (Plevova 2004). Ezt a patogén mutációt 1999-ben már mások is megerősítették.

Érdekes és sokszor nem könnyen eldönthető kérdés, hogy egyes, vagy többszörös mutációk előfordulása esetén melyik tekinthető patogénnek. Az LS-ről bővülő információ halmaz a kérdés megoldása helyett sokszor további kérdéseket vet fel, mint amilyen az epigenetikus modifikációk lehetősége, például microRNS-ek által (Valeri 2010, Hutchinson 2013). A genetikai változás sem biztosan okoz következményes funkció változást, ha a fehérje konformációja nem változik meg alapvetően. A kérdés megközelítésére az aminosav cserék okozta funkcionális változásokat vizsgáló szoftvereket hoztak létre különböző munkacsoportok (Win 2014). A számítások figyelembe veszik az aminosav csere enzimatikusan aktív vagy közömbös régiókban való lokalizációját, az új aminosav tulajdonságait, mely egyértelműen megváltoztathatja a fehérje funkcióját. Három különböző programot próbáltunk ki az új mutáció patogén jellegének eldöntésére: „ártalmas” (SIFT), „patológiás” (PMut) illetve „valószínűleg káros” (PolyPhen) véleményezést kaptunk. Azt gondoljuk, hogy ezek az eredmények is megerősítik az Arg265Pro cserét okozó mutáció patológiás voltát.

6. Család

A 39 éves nőbetegnél vérszékelés miatti kivizsgálása során sigma daganat igazolódott. Családi anamnézisében halmozottan fordult elő daganatos megbetegedés, édesapja 53 évesen CRC, majd 68 évesen metachron rectum tumor műtétén esett át (I.10. ábra). Apai nagyanyja 43 évesen EC-ben halt meg. Anyai ágon nagyanyja 64 évesen, nagynénje 70 évesen központi idegrendszeri tumorban halt meg. Édesanyja másik leánytestvére 62 évesen endometrium, egy

további leánytestvér 66 évesen tüdő carcinoma miatt került kezelésre. A családi halmozódás felderítése után elkezdtek az LS irányú kivizsgálást.



I.10. ábra. A 6. család

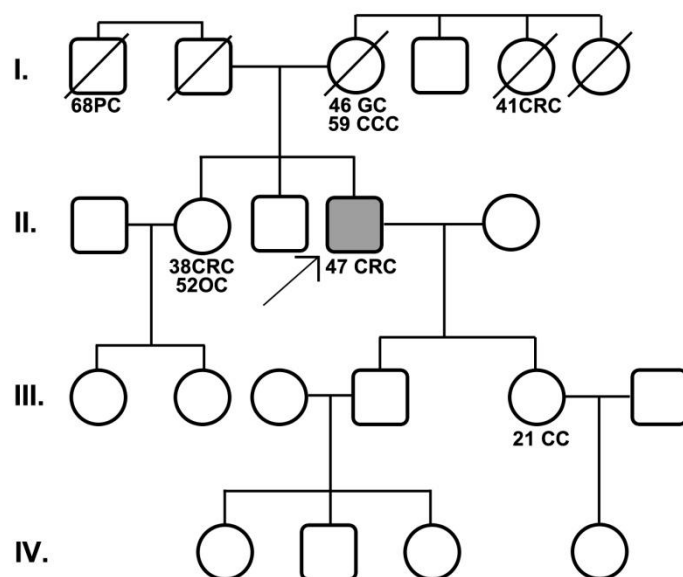
A proband műtete után vizsgált tumor szövet MSI-H-nak bizonyult, az MLH1 és az MSH6 festődés negatív volt. Genetikai vizsgálataink az MLH1 gén nagy delécióját igazolták. A családtagok közül összesen 4 főt tudtunk megvizsgálni. Az index személy és édesapja hordozta a genetikai elváltozást. Az édesanya és a fiúgyermek normális allél jelenlétét mutatta. A további vizsgálatok objektív akadályokba ütköztek az apai oldalon elhalálozások miatt, az anyai ág pedig nem hordozta a kóros gént, így nem is törekedtünk vizsgálatokra.

A 6. családban talált 3.8 kb-s nagy deléció az MLH1 gén 11. exonjának teljes egészét érinti. Az adatbázisokkal való egyeztetés után ez szintén új mutációnak mutatkozott (INSIGHT). Típusosan a deléciót szenvedett gén által kódolt fehérje funkcióképtelen és hamar lebomlik a sejtben létrehozva az MMR kaszkádban a működésképtelenséget. Ennek a családnak is a példája felhívja a figyelmet arra, hogy a több forrásból származó információt gondosan értékelni kell, mielőtt felállítjuk az LS diagnózist. Bár nagyszámú daganat fordult elő a családban az anyai ág nem hordozza az elváltozást, így a fokozott kockázat az ő leszármazottaikban nem valószínűsíthető, az ezzel járó pszichés terhet nem kell hordozniuk. A bővülő ismeretek tudatában azonban az sem kizárható, hogy pl. az alacsony penetranciájú

(onko)génekben felhalmozódó mutációk hozzák létre a daganatok családi halmozódását (Wood 2007).

7. Család

A 47 éves férfi puffadás, széklethabitus változás miatt került kivizsgálásra, mely a haránt vastagbél mucinosus adenocarcinomáját igazolta. Kiterjesztett jobb hemicolectomiát végeztünk. A családi anamnézis feltárása során jellegzetes LS családfát sikerült rögzítenünk (I.11. ábra). A proband édesanyja 46 évesen gyomordaganatban szenvedett, majd 59 évesen epeúti daganatba belehalt. Az édesanya nővére 41 éves korában hunyt el, májattéteket okozó vastagbél daganat miatt. Az édesapa testvére 68 évesen hörgőrákban halt meg. A beteg 38 éves húga bal oldali vastagbél és sigmabél szinkron daganata miatt került ellátásra, 52 évesen pedig petefészek tumor miatt Wertheim műtéten esett át. Az index személy egyik gyermeke 21 éves korában endometrium carcinoma miatt conisatióra került.



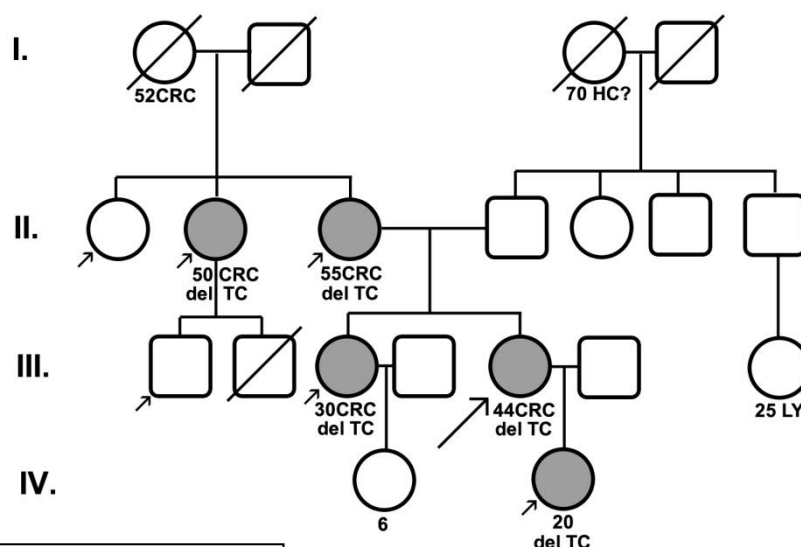
I.11. ábra A 7. családfa

Az index személy vastagbél tumorának IHC vizsgálat MLH1 expresszió hiányt mutatott, az MSH2 és az MSH6 pozitív volt. A nagyfokú mikroszatelita instabilitás tovább erősítette az

eddiggi adatokat, ezért elvégeztük az MLH1 gén szekvenálását. A 2. exon 143. kodon A →C cserével járó misszensz mutációját találtuk (p.Q48P). A pathogenitás eldöntésére a család többi tagjának szűrését terveztük, melyet vallási okokra hivatkozva megtagadtak. A szoftveres előrejelzést alkalmazva egy „egyértelműen pathogén” (PMut) és két „feltehetőleg káros” (SIFT, PolyPhen) véleményt kaptunk. Röviddel saját vizsgálataink után jelent meg Hardt és munkatársainak nagy összefoglaló közleménye a Német HNPCC Konzorcium nevében, mely ezt a mutációt, mint új és patogén elváltozást említi (Hardt 2011, Tanyi 2012). Az index személy követése során adenomatosus polipok eltávolítása történt szövődíjmentesen a vastagbélből. Több családtag nem volt hajlandó a szűrésben, diagnosztikában részt venni.

8. Család

A 44 éves nőbeteg intézetünkben való ellátása előtt egy évvel korábban már bal oldali hemicolectomián esett át flexura lienalis tumor miatt más intézetben. Az általunk végzett műtete során a hasfalra törő rectosigma daganatot észleltünk, a kismencedei hashártya apró gócos érintettségével. A folyamat látható tumor visszahagyása nélkül eltávolítható volt, ezért Hartmann műtétet végeztünk. A beteg kemoterápiában részesült, tumormarkerei csökkenő tendenciát mutattak. Egy évvel később a rekonstrukció reményével újabb műtét történt, recidívát nem észleltünk, így a bélfolytonosságot helyreállítottuk. A családi anamnézisben további 4 vastagbél daganatos betegre, 1 bőr, 1 hematológiai és egy rosszindulatú májváltozásra derült fény (I.12. ábra). Valamennyi CRC az anyai ágon fordult elő 30,44, 50, 52 és 55 éves életkorban. Az Amsterdam kritériumok teljesülése egyértelműen LS irányába mutatott, így kellő tájékoztatás és beleegyezés után elkezdtük a kivizsgálást. A proband tumor szövetéből végzett immunhisztokémia az MSH2 jelölődés hiányát mutatta, az MLH1 és MSH6 pozitív volt, mindemellett a tumor MSI-H-nak mutatkozott.



I.12. ábra. A 8. család

Az MSH2 gén valamennyi exonjának szekvenálása során a 6. exon két nukleotidját érintő kis deléciót találtunk (delTC c.969-970) (Insight). További 6 családtag célzott vizsgálata során 4 személy bizonyult hordozónak. Az összesen 5 delécióhordozó családtagból 4-ben CRC fordult elő. A proband anyai nagyanyja szintén vastagbélrákban szenvedett, de ő vizsgálatunk idején már nem volt életben, így a genetikai státusza nem ismert. Adataink ellenőrzése során ezen eredményünk új mutációnak bizonyult, mely kereteltolást okoz, és egyértelműen patogénnek tekinthető. A család tagjai nagyon jól együttműködnek a szűrésben, követésben, újabb daganatot egyelőre nem észleltünk (Tanyi 2012).

A család vizsgálatok összefoglalása:

Összesen 14 patogén mutáció hordozó családot sikerült azonosítanunk, akikben 12 különböző géneltérést találtunk. Hét mutáció az MLH1 génben volt (2 deléció-egy esetben teljes 11. exon-, egy „splice site error” és 4 misszensz mutáció), 5 az MSH2 gént érintette (1 deléció, 1 „splice site error”, 3 nonszensz mutáció). A mutáció „találathi aránya” eddigi vizsgálatainkban magasabbnak mutatkozik, mint egyes nagy esetszámú munkák alapján várható lenne. Egy 6628 beteget felölelő vizsgálat során az AC pozitív betegek mindössze 3.1%-a bizonyult LS szindrómásnak, a saját 4.4%-os találathi eredményünkkel szemben. Azt gondoljuk, hogy ezt az

eredményt az IHC és MS vizsgálat nagyobb arányú elvégzése okozta, míg az USA-ban az MS státuszt csak a szekvenálás előtti lépésként alkalmazzák rutinszerűen (Tanyi 2014).

Tanulságos maga a számtalan formában megjelenő tumor variáció. Valamennyi esetén fel kell merüljön a vizsgáló orvosban a közös genetikai háttér lehetősége, mely néhány rövid kérdéssel tisztázható. Fontos a család hozzáállásának, a családtagok együttműködésének a megnyerése (saját érdekükben). Sokkal hatékonyabb a prospektíven elvégzett családfakutatás, még a bent fekvés alatt, mint utólag kérdőívek segítségével (Tanyi 2004, 2006).

I.4. A betegek és mutáció hordozó családtagjaik gondozásba vétele, tanácsadás

A **tipizált mutáció hordozók** esetében az észlelt mutációra és az általuk okozott tumorok spektrumára lebontott részletes útmutatók kerültek kidolgozásra európai és amerikai szakértőcsoportok által (Vasen 2013, Giardiello 2014). Legfontosabb megállapításaik között is első a **CRC colonoscopos szűrésének hatékonysága**. Az 1-2 évente rendszeresen ismételt tükrözések egy 2000-ben publikált finn tanulmány szerint a mortalitást 65, a morbiditást 60%-kal csökkentette, egy 15 éves megfigyelési periódus alatt, a nem szűrt populációhoz képest. (Jarvinen 2000). A gyomorrák, bár jóval ritkább a CRC-nél, szintén eredményesen szűrhető 2-3 évente végzett endoszkópiával. Mindkét vizsgálatot rendszeresen felajánljuk az érintett családtagoknak. A CRC esetében számos vélemény a profilaktikus szubtotális vastagbél reszekció mellett foglalt állást, de a jelentős életminőség romlást (gyakori híg székletürítés, gyengülő kontinencia), feltétlenül számításba kell venni az életkor és az esetleg eleve gyengébb sphincter funkció függvényében (Mecklin 2008). Saját gyakorlatunkban is kiterjesztett reszekcióra törekszünk, de legalább a szigmapélig érdemes megtartani a distalis colont, a jobb kontinencia érdekében. Az így megkímélt, rövidebb vastagbél könnyebben ellenőrizhető.

Az **endometrium- és ovariumrák szűrése** nem hozta meg a remélt eredményt, de a profilaktikus műtéti beavatkozás lehetőségét ebben az esetben is javasolt felajánlani a 40 év feletti, családtervezésen túllévő nők számára. Kifejezett a kockázat MSH6 mutáció esetén. Az 1-2 évente végzett vizelet-vér vizsgálat nem megterhelő, hatásfoka azonban alacsony, ezért nem része az ajánlott vizsgálatoknak, ahogy a többi LS asszociált tumort sem lehet még eredményesen szűrni. Jelentős előrelépést tehetünk azonban az idevágó ismeretek terjesztésével, valamint az egyes daganatok korai tüneteinek ismertetésével. Sokan nem értik meg a **„hordozó státusz” veszélyeit**, sem saját egészségük, sem a továbbadás szempontjából. Valószínű, hogy inkább a szűrővizsgálatok kellemetlensége áll előtérben, mintsem az általuk szerezhető „egészségnyereség”. Tapasztalataink szerint a hazai lakosságban nem elsősorban a pszichés teher, hanem a betegség lényegének meg (nem) értése játszik fontos szerepet. Ugyanakkor az első néhány kiszűrt daganat, polip bizonyítja a család számára is a gondozás előnyét, ami hosszú távon mindenképpen előnyt jelent az együttműködésben. Az Egyesült Államokban a legnagyobb az irodalma a diagnózis jogi és etikai következményeinek. Jelentősek a vélemény különbségek a felvilágosítási kötelezettség és a magánélet szentsége között. Sokan az egészségügyi biztosításuk, vagy munkájuk miatt aggódnak. Politikai reagálásként már törvény is született a genetikailag érintettek diszkriminációja ellen (Hudson 2008).

Nagy gondossággal és alapos megfontolás után szabad **fiatalokat vizsgálni**. Húsz éves kor alatt még igazolt HNPCC-s családban sem javasolják a szűrővizsgálatokat. A szülőkkel történt egyeztetés után a hordozó státusz felmérhető különösebb megterhelés nélkül, de az eredmény közlésének lelki hatásaira gondolni kell. Javasolt azonban a család index betegében megjelent daganat felfedezési ideje előtt elkezdeni a szűrést a hordozó, de még tünetmentes többi családtagban.

Fontos az **ismeretanyag propagálása az orvos kollégák felé** is: időben-térben elkülönülő rendeléseken láthatják ugyan annak a betegnek és/vagy családnak a bőr, endometrium, gastrointestinalis (CRC, gyomor, vékonybél, pancreas) és idegrendszeri tumorát, amíg valaki összekapcsolja a halmozódás háttérében álló genetikai láncszemet.

A családi halmozódást mutató, de a jelenleg még **nem tisztázott háttérű beteg csoportokra** is ki kell terjeszteni a szűrést, ill. annak lehetőségét fel kell ajánlani. Az adatbázisokból kiszűrt AC és BG pozitív, de IHC és/vagy MSI negatív betegeket és családtagjaikat az FCRCTX kategóriába sorolja a mai irodalom, és az átlagosnál magasabb rizikójú betegeknek kell tekinteni őket, ugyanúgy mint az LLS és a „Constitutional MMR deficiency” szindrómákhoz tartozó betegeket.

MSI státuszt kívánatos lenne ismerni a genetikai háttér pontos azonosításától függetlenül, a **sporadikus esetekben is**. Az MSI-H daganatok ugyanis, az 5-FU alapú kezelésre másként reagálnak, felesleges, sőt káros is lehet a „klasszikus” kezelési sémák alkalmazása. Mindemellett a túlélés esélyei jobbak, mint az MSS tumorok esetében (Boland 2010).

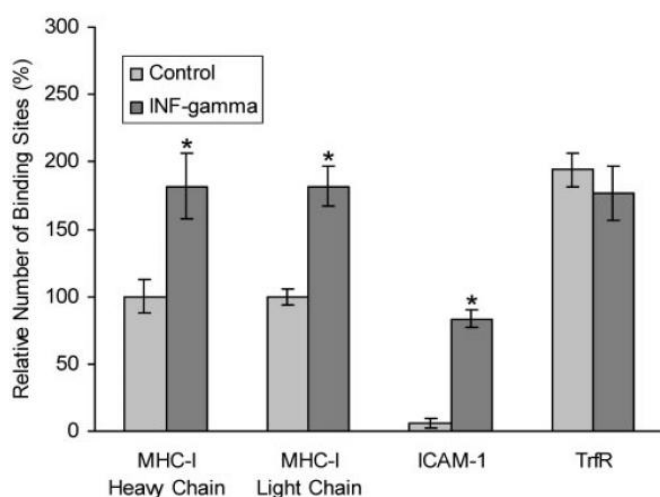
II. Sejtfelszíni membrán receptor mintázatok vizsgálata CRC epitheliális sejtvonalon és betegekből származó limfocitákon

II.1-2. LS-174-T CRC sejtvonal plazma membrán mintázatának dinamikus vizsgálata IFN- γ és ICAM-1 siRNS hatására az MHCI és ICAM-1 vonatkozásában

Az immunrendszer megfelelő működésének egyik alapvető követelménye, hogy különbséget tudjon tenni saját és idegen fehérjék között, valamint az antigént észlelő és a megfelelő immunválaszt kiváltó receptorok működése összehangolt legyen. Számos esetben a receptor és a specifikus ligandja közötti kapcsolat kis affinitású, így a válasz kiváltásához a fehérjéknek elegendően nagy számban és koncentráltan kell jelen lenniük a sejtfelszín egy kitüntetett területén. Ugyanakkor, a jelátviteli kaszkádokban résztvevő különböző proteineknek is egymás fizikai közelségében kell lenni (Damjanovich 2002, Vámosi 2005). Korábban bizonyos T és B lymphoma sejtvonalak (JY humán limfoblaszt, HUT 102 B2 humán T limfóma) (Matkó 1994), valamint uveális melanoma (Bene 2004) membránjában egyértelműen kimutatásra került az MHCI és ICAM-1 molekulák szoros, rendezett asszociációja. Koncentrációjuk több más receptorról együtt a plazmamembrán kitüntetett területein, a GM1 gangliozid és magas koleszterin tartalommal jellemezhető lipid tutajban volt megfigyelhető.

Az **LS-174-T hámsejtek** vizsgálata során elsődleges célunk az volt, hogy kimutassuk van-e jellemző receptor asszociáció, valamint a mintázat reagál-e citokin hatásra. Az LS-174 sejteken hasonló mintázatot találtunk, mint amely korábban limfoid sejteken leírásra került. Mindkét receptor a GM1 ganglioziddal jellemezhető lipid tutajban helyezkedett el, az MHCI

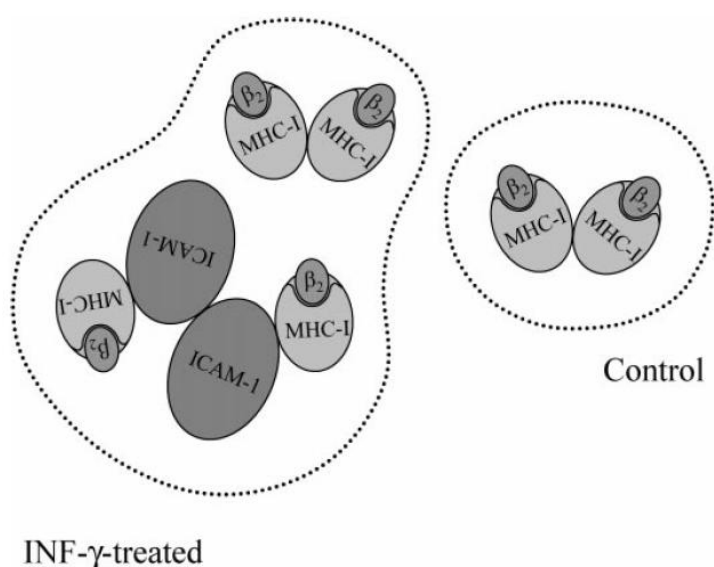
molekulák nagyfokú homoasszociációt mutatva. A 48 órás IFN- γ kezelés egyértelmű, reprodukálható változásokat okozott, közel kétszeresére növelte az MHCI és tízszeresére az ICAM-1 receptor számot (II.1. ábra). A negatív kontrollként használt transferrin receptor, mely más típusú membrán területen („coated pit”) helyezkedik el és nem asszociálódik egyik általunk vizsgált receptorral sem, számaránya szignifikánsan nem változott. Az energia transzfer mérések eredményét intermolekuláris távolság mérésre konvertálva, a sorozatos triangulatio módszerét alkalmazva (Damjanovich S 1999, Szentesi 2004), azt tudtuk megállapítani, hogy IFN- γ hatására az MHCI korábbi homoasszociációjának magas foka csökkent,



II.1. ábra. IFN- γ hatása az MHCI és ICAM-1 expresszióra az LS-174-T sejtek plazma membránjában. Az MHCI megkétszereződik, az ICAM1 mennyisége közel tízszeresére változik. Negatív kontroll a TrfR.

és az MHCI molekulák heteroasszociációja nőtt az ICAM-1-hez. Bár a molekuláris átrendeződés biológiai jelentősége nem ismeretes, korábbi mérések alapján egyértelmű, hogy mindkét általunk vizsgált molekula oligomereket képez különböző tumoros limfociták felszínén. Az MHCI nehéz és könnyű lánc között végzett energia transzfer mérésekkel az is kimutatható volt, hogy a molekulák polarizáltak, egy meghatározott irányban állnak egymáshoz képest. Nem észleltünk változást a kontrollként használt transferrin receptorok

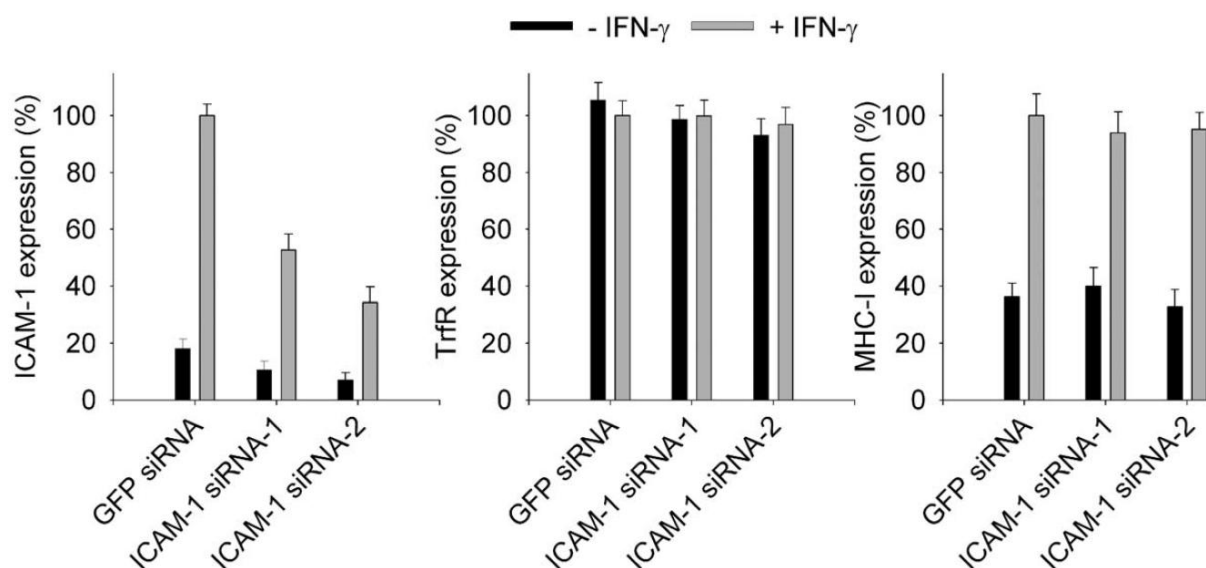
abszolút számában és az előbbi 2 receptorhoz való távolságában. Az IFN- γ kezelés nem csak a receptorok számosságát és egymáshoz való viszonyát, hanem az őket befogadó lipid raft méretét is megváltoztatta. Ez utóbbira a koleratoxin-GM1-gangliosid energia transzfer mérésekből lehetett következtetni. A távoli, „coated pitben” elhelyezkedő TrfR homoasszociáció továbbra is nagyfokú volt (azaz az energia transzfer értékek továbbra is magasak voltak a TrfR-ok között) és nem csökkent a távolság a GM1 ganglioside-dal jellemzett rafthoz. Az LS-174-T sejtek mérete, alakja és proliferációs rátája a vizsgálat idő periódusa alatt változatlanak mutatkozott. A két receptor kolokalizációját megerősítettük konvencionális fluoreszcens mikroszkópos és CLSM vizsgálatokkal is. Ennek a vizsgálatoknak az összefoglalása a II.2 ábrán látható vázlatosan: bár az MHCI receptor szám közel kétszeresére nő, az ICAM-1 közbeékelődése miatt az MHCI homoasszociáció foka csökken IFN- γ stimuláció után (Bacsó 2002).



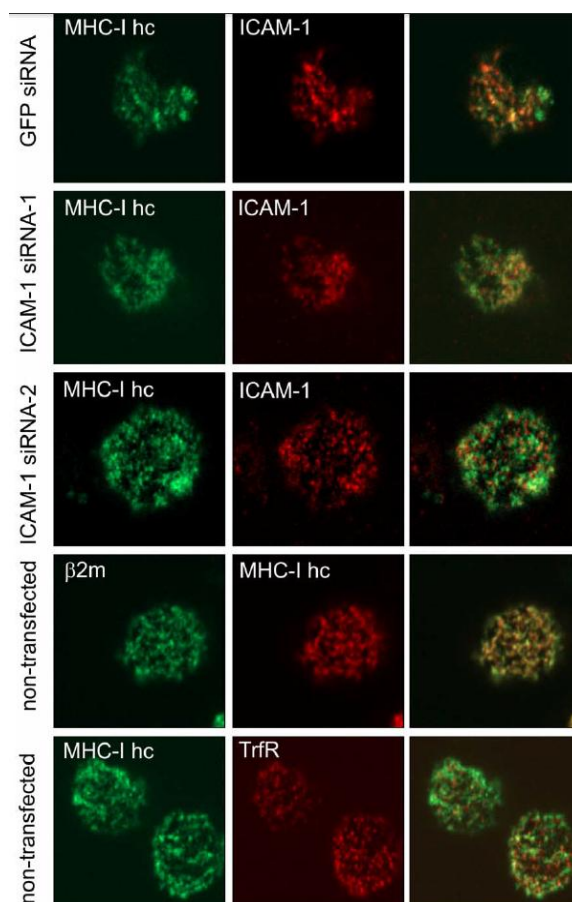
II.2. ábra. IFN γ hatása LS-174-T sejtek plazma membránjának receptor konfigurációjára. Az MHCI számosság jelentősen nő, de a homoasszociációjuk csökken az ICAM1 közbeékelődése miatt (Bacsó 2002).

Az IFN γ hatására kialakult receptor mintázat változást az LS-174-T sejtre gyakorolt komplex hatások egyikének is tulajdoníthatjuk, de az is feltételezhető, hogy a két receptor nem véletlenszerűen, pl. a receptorszám növekedése miatt került egymás molekuláris

közelségébe. A kérdés további vizsgálatára **RNS interferencia** vizsgálatokat alkalmaztunk. Az ICAM-1 mRNA transzlációját gátló siRNS 8142 és 8233-t alkalmazva azt észleltük, hogy a plazma membránban jelentősen lecsökkent ICAM-1 jelenlét mellett az MHCI homoszociáció foka ismét megnőtt, azaz „visszarendeződött” a IFN- γ kezelés előtti helyzetbe. A megfigyelésekből arra következtettünk, hogy az ICAM-1 irányított módon is kerülhet az MHCI molekulák közelségébe. A két gátló RNS közül az siRNS 8233 expressziót csökkentő hatása erőteljesebbnek bizonyult. A kiváltott jelenség specificitását az irreleváns GFP siRNS hatástalansága és a TrfR (ebben a kísérletben is irreleváns, távoli molekula) számosságának (II.3. ábra) és térbeli eloszlásának (II.4. ábra) változatlansága is erősítette. Az IFN γ és az siRNS fokozatos kombinált alkalmazásával közel lineáris ICAM-1 expresszió növekedést sikerült kiváltanunk. A receptor membránban való reprezentációjának növekedésével párhuzamosan lehetett kiváltani az MHCI molekulák közé történő „beékelődését”, ami egy dinamikus



II.3. ábra. Az ICAM-1 siRNS hatása az LS-174-T sejtekre. Két különböző siRNS-sel transzfektáltuk a sejteket, a GFP siRNS negatív kontrollként szolgált. A receptor expressziót áramlási citometriával határoztuk meg, IFN- γ kezelés előtt és után. A referencia alapnak a GFP siRNS-sel kezelt sejtek ICAM-1 expresszióját vettük.



II.4. ábra. IFN γ -val kezelt LS-174-T sejtek vizsgálata konfokális mikroszkóppal. A két receptor együttállását a narancs színű foltok jelzik (1. sor). Mindkét siRNS gátolta az ICAM-1 expressziót és ezzel párhuzamosan az MHCI-gyel való asszociációját (jól elkülönült zöld és piros területek, 2., 3. sor). Pozitív kontrollként az MHCI nehéz lánc és a β 2 mikroglobulin együttesét vizsgáltuk (teljes átfedés, narancs színben tűnik fel, 4. sor). Negatív kontroll a TrfR és az MHCI nehéz lánc egyidejű jelölése (jól elkülöníthető piros és zöld jelölődés, 5. sor) (Nagy 2006).

szabályozott folyamatra és nem véletlenszerű történésre utal (Nagy 2006). Az ICAM-1 tumor metasztázis képzésben betöltött szerepéről egyre több információ halmozódik fel. Szerepet tulajdonítanak az ér- és nyirokér felszínén elhelyezkedő molekuláknak a kissejtes tüdőrák és emlőrák metasztázisainak kialakulásában (Finzel 2004, Kawai 2009), valamint CRC és pancreas tumor sejtek mesotheliumon való megtapadásában (Ksiazek 2010). Kínai szerzők az ICAM-1 polimorfizmus és a gyomorrák rizikója és prognózisa között találtak összefüggést (Tian 2012). A különböző citokinek célzott terápiában játszott hatásmódosító, adjuváns

szerepe szintén jelentős irodalommal rendelkezik (Waldmann 2007, Steel 2012). Vizsgálataink egyértelműen arra hívják fel a figyelmet, hogy nem csak egyes receptorok jelenléte, vagy hiánya lehet fontos ezen terápiás módzatok hatékonyságában, hanem a kaszkádban résztvevő molekulák egymáshoz való térbeli viszonya, orientációja is. A citokinek klinikai alkalmazása esetén valószínűleg azok többlépcsős, esetenként sok támadáspontú szerepét is figyelembe kell venni.

II.3-4. CD4+ T limfociták plazma membrán mintázatának

összehasonlító vizsgálata colon tumorban és IBD-ben szenvedő betegekben

A CD4+ limfocitáknak központi szerepük van az adaptív immunválaszban, hiszen ezek a sejtek segítik a citotoxikus T sejtek és az antitestek által mediált választ is. Szükségesek az immuntolerancia fenntartásában és a saját szervezet számára káros reakciók gátlásában is. Kiemelt szerepüket mi sem bizonyítja jobban, mint a HIV vírus hatására kialakuló súlyos depléciójuk, mely opportunist fertőzésekhez és gyakoribb daganat kialakuláshoz vezet. A korábbi felfogás szerint két fő típusra oszlott a CD4+ sejtek családja, az IFN- γ termelő Th1, intracelluláris patogének ellen ható és a Th2, IL-4 termelő, extracelluláris paraziták ellen aktiválódó sejtekre. A közelmúltban derült fény arra, hogy a korábbi differenciálódási irányok jelentősen bővülnek a Th1, Th2 mellett a Th17 irányban, mely számos specifikus patogén ellen aktiválódik és a regulatórikus (Treg) sejtek irányában, melyek az immuntoleranciát szolgálják, a follikuláris helper sejtek (T_{FH}) pedig a B sejtek antitest termelését irányítják. Az összejt jellegű sejtek szinte bármely effektor, memória és regulatórikus irányban tudnak differenciálódni. Számos alcsoport azonban megtart bizonyos fokú „rugalmasságot”, mely lehetővé teszi, hogy újabb antigén stimulus hatására további, vagy más fajta citokineket termelő sejtekké alakuljanak át (Geginat 2014).

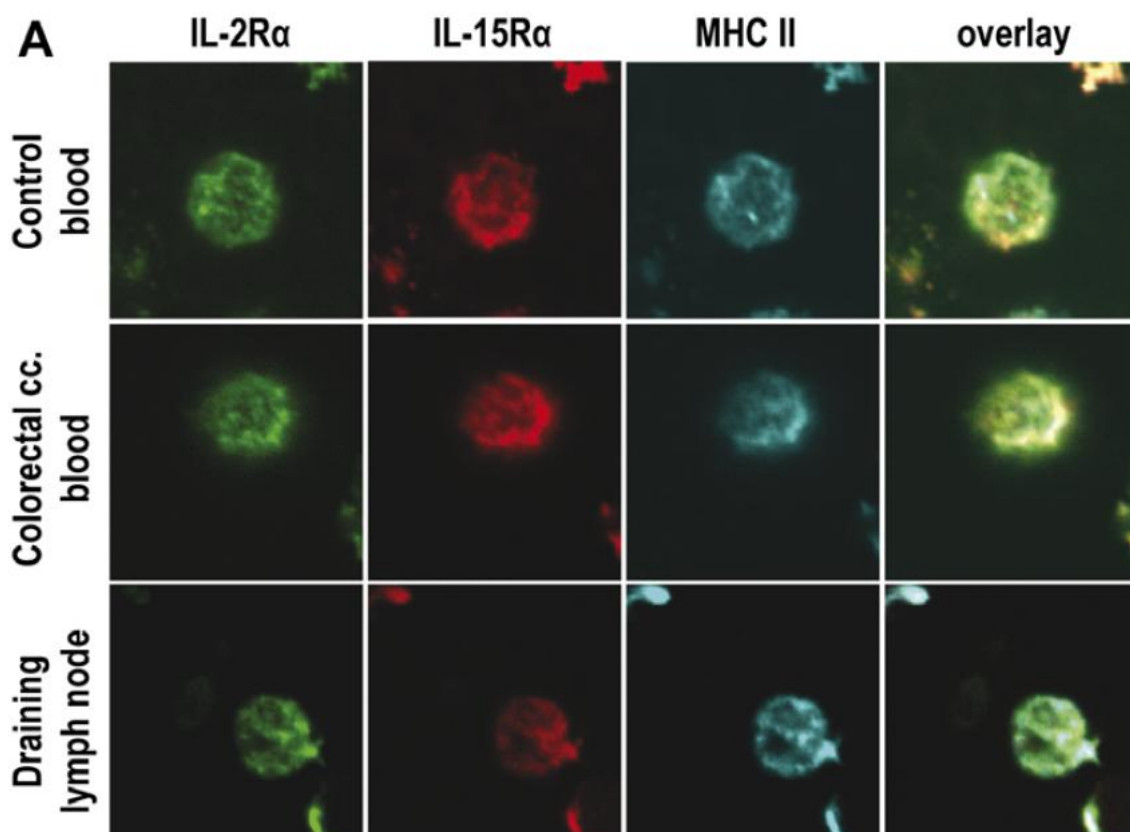
A helper T limfociták a tápcsatornában vannak kitéve a legnagyobb antigén kínálatnak, annak ellenére, hogy az emésztőrendszer minden szakasza speciális mechanikus barierrel van ellátva. Számos bizonyíték szól amellett, hogy a téves immunfelismerés és reakció szerepet játszik az olyan gyulladásos betegségek kialakulásában, mint a colitis ulcerosa és a Crohn betegség (Maynard 2009). A hibás immunfelismerés lehetősége fennáll akkor is, amikor viszont az immunrendszer nem képes felismerni a megváltozott saját sejteket, mint pl. a colonban kialakuló daganat esetében. A plazma membrán mikrodomén szerveződéséről származó adatok elsősorban sejtvonalakon történt mérések eredményei. Vizsgálataink középpontjában az állt, hogy ki tudunk-e mutatni konzisztens különbségeket az általunk korábban is vizsgált raftok mintázatában a colonban zajló tumoros és gyulladásos folyamatok hatására, betegekből származó CD4⁺ helper sejteken. Méréseink során az MHCI és MHCII alegységeit, az IL-2 α és IL-15 α alegységeket és az ICAM1 molekulák egymáshoz viszonyított topográfiáját néztük.

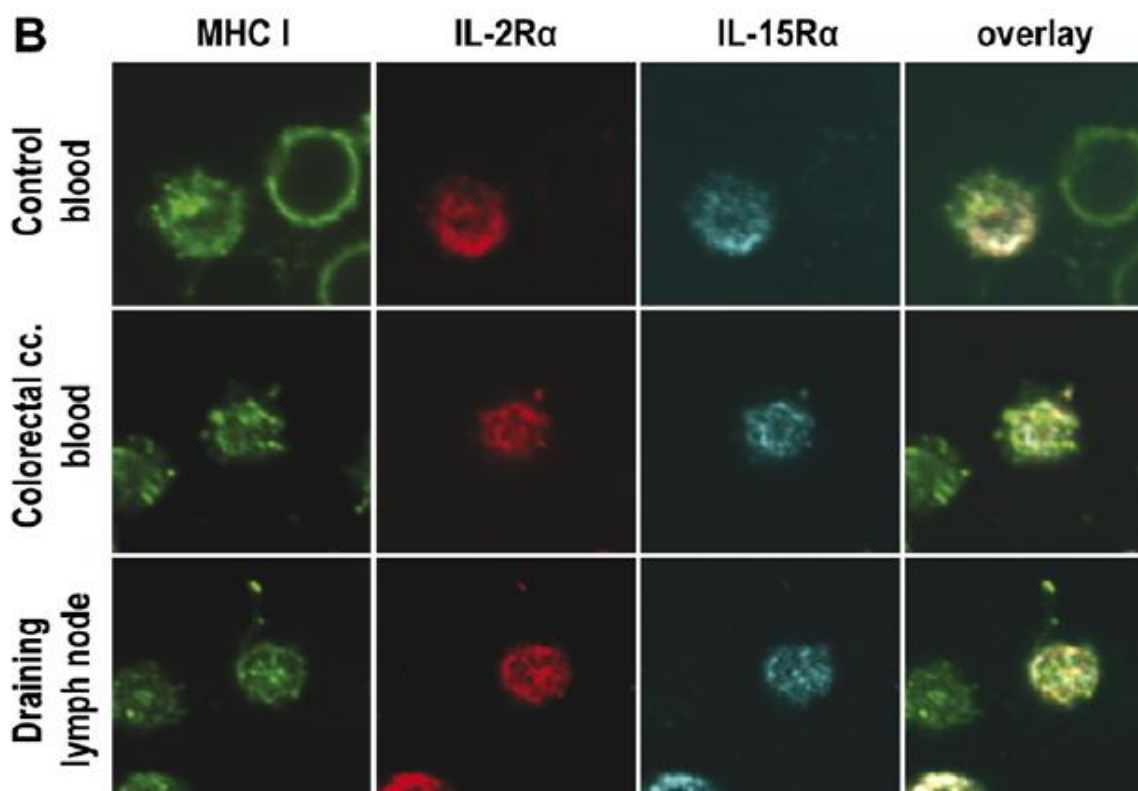
Tumoros esetekben méréseinket jobb hemicolectomián átesett betegek drenáló nyirokcsomójából és ugyanazon beteg perifériás véréből izolált sejteken végeztük. Kontrollként önkéntesektől származó periférás vért használtunk. Áramlási citometriával először az **abszolút receptorszámokat** határoztuk meg. A betegek perifériás vérmintái nem mutattak jelentős eltérést a kontrollhoz képest. Ezzel ellentétében a tumor drenáló nyirokcsomók CD4⁺ sejtjein az MHCI, az ICAM1 és az IL-15R α 40-50%-os, az MHCII és az IL-2R α 28-35%-os csökkenést mutatott (II.5. ábra). A statisztikai szignifikancia minimum szintjét messze meghaladó csökkenés minden vizsgált proteint érintett. A jelenség önmagában is felveti a lokális „immunparalízis” lehetőségét, hiszen a T sejtek aktivációja IL-2R α alegység számbeli növekedésével és a nagyaffinitású $\alpha\beta\gamma$ receptor komplexum kialakulásával járna, az MHCII pedig az antigén prezentációban nélkülözhetetlen.

Konfokális mikroszkópos vizsgálataink az abszolút receptorszám csökkenés mellett azt mutatták, hogy a receptorok továbbra is a jellemző lipid tutajban helyezkednek el

Control blood		
β_2m	268.4 ± 36.4 (14)	
MHC I heavy chain	216.8 ± 28.1 (14)	
MHC II (HLA-DR)	42.9 ± 3.2 (24)	
IL-2R α	54.2 ± 5.3 (12)	
IL-15R α	16.5 ± 0.9	
ICAM-1	10.7 ± 1.2 (12)	
	Colorectal	
	Blood	DLN
β_2m	356.9 ± 76.5 (4)	140.3 ± 20.8 (18)*
MHC I heavy chain	257.5 ± 30.6 (6)	126.1 ± 14.6 (18)*
MHC II (HLA-DR)	36.7 ± 7.1 (10)	31.1 ± 4.0 (16)*
IL-2R α	57.6 ± 8.4 (6)	35.0 ± 4.4 (9)*
IL-15R α	13.1 ± 4.6	6.4 ± 2.3 *
ICAM-1	12.1 ± 1.2 (6)	6.1 ± 0.5 (5)*

II.5. ábra. CD4⁺ sejtek receptor expressziója. A megadott számértékeket 10^3 -al szorozva közelítőleg az abszolút receptorszámot kapjuk meg, a zárójelben levő számok a függetelen mérések számát jelentik. A csillaggal jelezett értékek szignifikánsan különböznek a kontrolltól ($p < 0.05$).

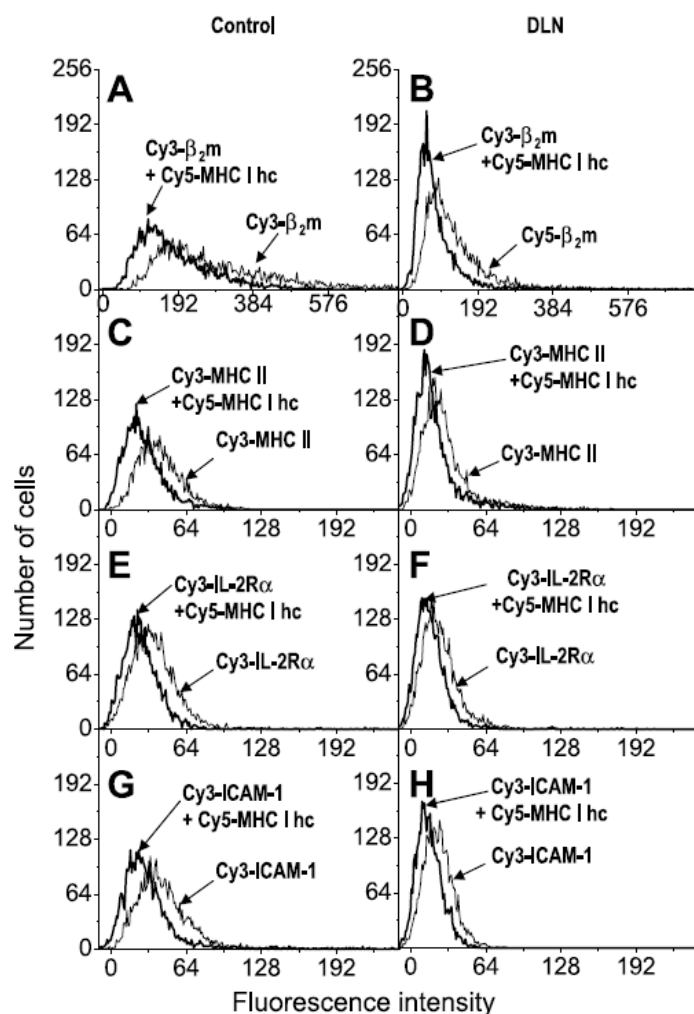




II.6.A és B ábra. CRC betegek nyirokcsomójából és perifériás véréből származó limfociták konfokális mikroszkópos vizsgálata. A jobb szélső oszlopban láthatók az egy mikrodoménben elhelyezkedő receptorok jelöléséből származó kevert színek.

(II.6.A és B ábra). A páronkénti áramlási citometriás **energiatranszfer** mérések távolság változásra konvertált eredményei, azonban **jelentős molekuláris átrendeződést** igazoltak. Ezek a változások lényegileg a raftnak a kontrollhoz viszonyított fellazulását mutatták, a receptor sűrűség csökkenés alapján kalkulált értékhez képest jóval nagyobb mértékben. Ezt a feltételezést a FRET mérések akceptorszámra korrigált eredményei is igazolták (Bene 2007). Az áramlási citometriás energiatranszfer méréseink arra is utaltak, hogy a receptorszám csökkenés mellett az egyes **molekulák rafton belüli elhelyezkedése** mutat igazán jelentős különbséget a periférián található limfocitákhoz képest (II.7. ábra). A **II.7. B, D, F, H** ábrákon mind az átlagos fluoreszcencia intenzitás, mind az akceptor jelenlétében mért intenzitás csökkenés kisebb mértékű, mint a kontroll esetén, ami a vizsgált molekulák kisebb számára és egymáshoz viszonyított nagyobb távolságára utal. Az eredményekből azt a következtetést

vontuk le, hogy a tumor közvetlen környezetében cirkuláló limfociták receptor mintázata megváltozik a perifériás és az egészséges egyedekből származó sejteken kimutathatóhoz képest. Az általunk megfigyelt jelenség biológiai jelentősége még nem ismert, de elképzelhető, hogy az egymás mellé rendelt molekulák befolyással vannak az asszociálódott receptor funkciójára. Ramalingam és mtsai 1997-ben az MHCI és az inzulin receptor



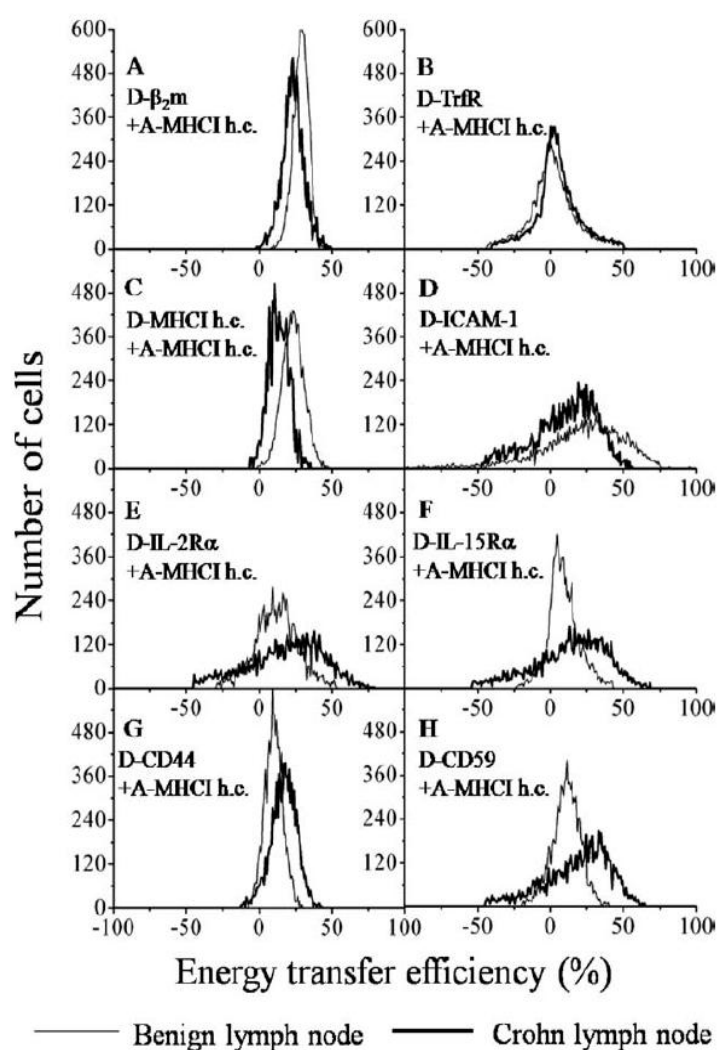
II.7. ábra. Receptor páronkénti FRET hisztogrammmok perifériás vérből (Control) és tumor drenáló nyirokcsomókból (DLN) származó CD4⁺ limfocitákon. A halvány vonal az akceptor jelenléte nélküli fluoreszcencia intenzitást (Cy3), a vastag vonal az akceptor (Cy5) jelenlétében végzett vizsgálat eredményét mutatja. **A, B:** pozitív kontrol a β_2 mikroglobulin és az MHCI nehéz lánc közötti FRET mérés, **C, D:** MHCII és MHCI nehéz lánc közötti FRET mérés, **E, F:** IL-2 α és MHCI nehéz lánc közötti FRET mérés, **G, H:** ICAM-1 és MHCI nehéz lánc közötti FRET mérés eredménye. A vastagabb vonal által jelzett görbék balra tolódása kisebb transzfer hatásfokot, azaz nagyobb távolságot jelent a molekula párok között.

kölcsönhatására mutattak rá B-sejtes limfóma vonalakon. Az IR mesterséges lipid membránban is az MHCI mellé asszociálódik, az asszociáció élő sejtmembránban is megtörténik. Az MHCI - IR arány növekedésével 1:1-től 1:20-ig nő az inzulin receptor ligand iránti affinitása, az IR autofoszforilációja és az MHCI molekula foszforilációja, valamint a foszfoinozitol 3-kináz aktivitása. Az IR által mutatott funkcióváltozásokat a szerzők egyértelműen az MHCI-gyel történt asszociációval kapcsolják össze.

A tumoros betegekből származó limfocita minták után kíváncsiak voltunk, hogy **a Crohn betegség okoz-e receptor mintázat változásokat a CD4+ limfociták felszínén** (Damjanovich 2012). A tumoros mintákhoz való hasonlítás relevanciáját a betegség immunológiai háttere szolgáltatta, melyet számos korábbi eredmény támaszt alá. Bár a betegséget kiváltó specifikus antigén-antitest kölcsönhatás még nincs azonosítva, az eredmények itt is a helper T limfociták megváltozott szerepére utalnak. Az előzőekben vizsgált receptor panelt (MHCI β 2-mikroglobulin/nehéz lánc, ICAM-1, IL-2/15R α , γ alegységek) kibővítettük a CD44s hyaluronsav receptor és CD59 komplement inhibitor molekulákkal. A két utóbbi molekula szintén igazoltan fontos szereppel bír a sejt-sejt kölcsönhatásokba, a homingban és a sejthalál folyamatában, emellett mindkettő alkotója az MHCI köré szerveződő raft protein mintázatnak. Kontrollként nem tumoros egyedekből származó nyirokcsomókat használtunk, akikben jelentős gyulladásos paraméter emelkedés sem volt kimutatható.

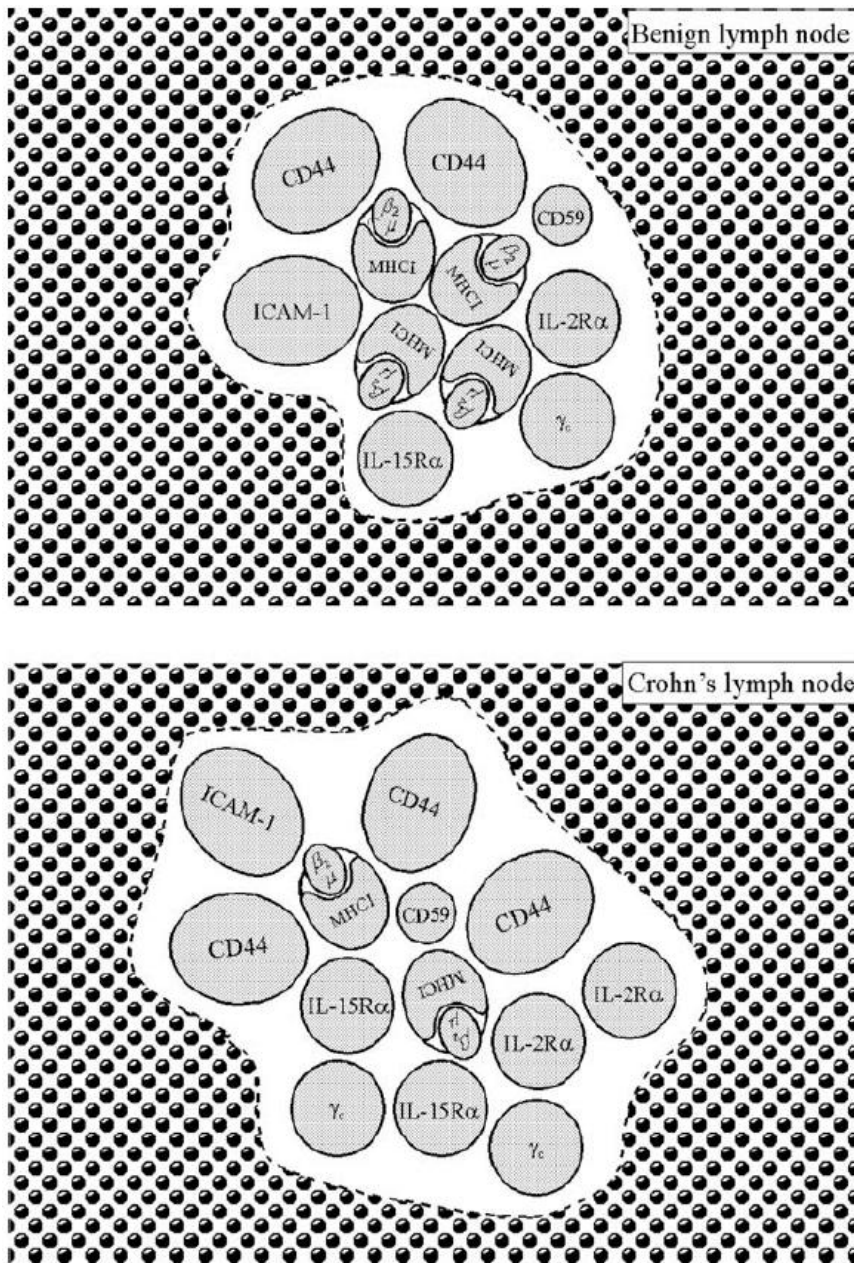
Az **abszolút receptor számok** mérése során az MHCI alegységek tekintetében közel 50%-os csökkenést észleltünk, míg az IL-2/15R α alegységek 50-70%, a közös γ -lánc 130% emelkedést mutatott a nyirokcsomókból származó CD4+ limfocitákon. A CD44 és a CD59 molekulák száma emelkedett a legjelentősebben, mintegy kétszeresére a kontrollhoz képest. A GM1 gangliozid jelenléte is szignifikánsa nőtt utalva a raft méretének növekedésére. A Trf száma közel változatlan maradt. A **páronként intermolekuláris FRET**

mérések eredményei a Crohn betegség esetén is jelentős átrendeződést mutatottak a rafton belül. Az MHCI molekulák homoasszociációjának csökkenését az ICAM-1 hasonló távolodása kísérte az MHCI-től. Az IL-2R α , az IL-15R α , a CD44 és CD59 molekulák ugyanakkor az MHCI-hez való közeledést mutattak (II.8. ábra). A rafton kívül elhelyezkedő Trf helyzetében nem találtunk változást (negatív kontroll).



II. 8.ábra. Jellemző páronkénti FRET hisztogramok Crohn betegekből és egészséges kontrollokból származó nyirokcsomó CD4⁺ limfocitákon. A: pozitív kontroll (MHCI nehéz lánc és β -2 mikroglobulin közötti mérés). B: negatív kontroll (MHCI és Trf receptor). C,D: az MHCI-MHCI és az MHCI-ICAM-1 görbék balra tolódnak. A csökkenő transzfer hatásfok távolodásra utal. E,F,G,H: A görbék jobbra tolódása az IL-2R α , IL-15R α , CD44 és CD59 esetén magasabb energia transzfer hatásfokot, azaz a molekulák MHCI-hez való közeledését jelzi.

A nagyszámú mérés eredményeiből kétdimenziós ábrát készítettünk, figyelembe véve a receptorok abszolút számát és a molekulák egymáshoz viszonyított távolságát (II.9. ábra).



II.9. ábra. A páronkénti receptor távolság mérés és az abszolút receptorszámok vázlatos ábrázolása Crohn betegekből és kontroll nyirokcsomókból származó CD4+ limfocitákon. A jelek arányosak a receptorszámmal, az MHCI molekula azonban a nagy számossága miatt szükségszerűen alulreprezentált. A hangsúly páronkénti a távolságmérésekből származtatott térbeli elhelyezkedés bemutatásán van.

A tumoros és Crohn betegekből származó CD4+ limfociták vizsgálati eredményeit összehasonlítva a következő megállapításokat tettük. A receptor páronként végzett FRET mérési technika alkalmas a lipid rafton belüli finom molekuláris átrendeződések kimutatására. A két vizsgált csoportban hasonlóság volt az MHCI és az ICAM-1 számosságának jelentős csökkenése, a két molekula eltávolodása egymástól és a raft fellazulása. Ellentétes változást mutatott az IL-2/15R α alegységek, CD44 és CD59 molekulák számbeli reprezentációja, jelentős csökkenést mutatva tumoros mintákon, míg Crohn-os sejteken ezen receptorok száma szignifikánsan nőtt. Ugyanezen molekulák elrendeződésében is ellentétes tendenciát tudtunk kimutatni a két csoport között, míg a tumoros sejteken csökkent az asszociáció az MHCI-gyel („lazább” receptor konfiguráció), addig a Crohn-os sejteken egyértelmű közeledést észleltünk az MHCI irányában.

A FRET vizsgálatok nagy felbontása mellett kiemelendő a kifejezett költség és munkaigénye, ezért nem valószínű, hogy jelen formájában rutin vizsgáló eljárássá válhatna. A sejtfelszínen elhelyezkedő sok ezer membrán fehérje asszociációjával, aggregációjával és ezek jelentőségével azonban már évtizedek óta foglalkozik számos tudományág (Metzger 1992). A nagyszámú receptor együttes egyidejű azonosítását **„nanoscale” vizsgálatokkal** (de Bakker 2007), ill. **„micropatterning”** (Sunzenauer 2013) technikával igyekszik számos munkacsoport felderíteni. Különböző utakon próbálják elérni azt, hogy a molekuláris mintázatról képet alkothassunk, funkcionális jelentőségükről információval rendelkezünk és a sejtfolymatokba beavatkozhassunk.

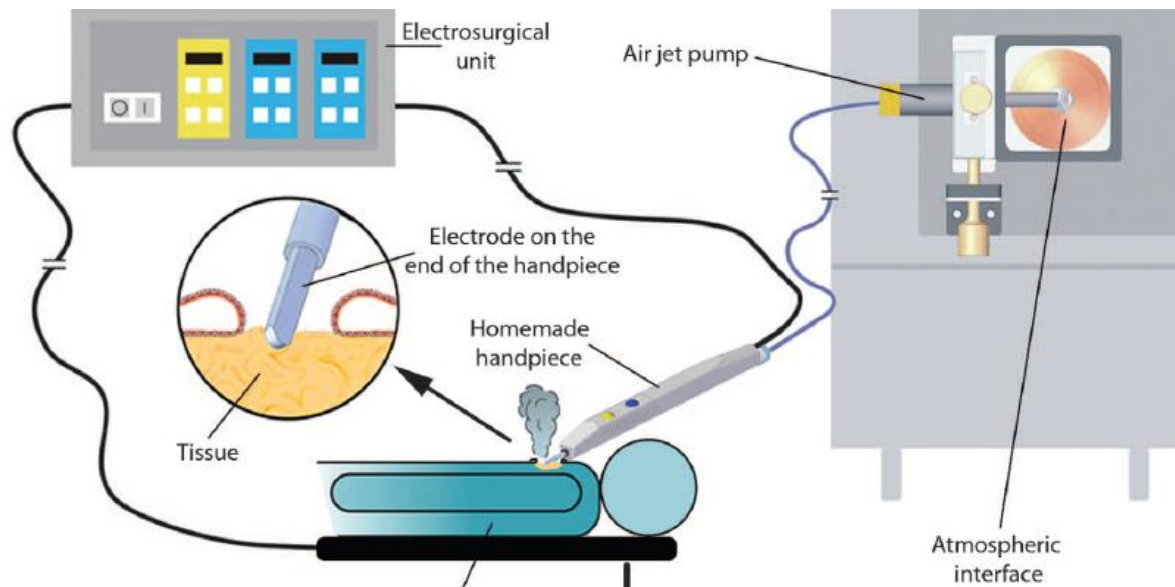
II.5. Intraoperatív szövethanalízis gyors ionizáló vaporációt felhasználó tömegspektrometria módszerével

Biológiai szövetek tömegspektrometriás analízise több évtizede intenzív kutatás tárgya. A gyors vaporizációt felhasználó ionizációs tömegspektrometria (REIMS) egy olyan fejlesztés alatt álló technika, mely alkalmasnak látszik arra, hogy közel valós idejű molekuláris felbontású „szövethanalízist” tegyen lehetővé. A módszer intraoperatív alkalmazásához az elektromos kés használata közben keletkező „füst” elvezetése szükséges. A füstben jelenlévő ionizált molekulák (9 különböző lipid, elsősorban foszfolipidek) analízise teszi lehetővé a szöveti azonosítást. Az elővizsgálatok során egy olyan adatbázis került felvételre mely 1624 daganatos, 1231 egészséges és 78 gyulladásos szövetminta spektrumát tartalmazta. Ezen vizsgálatok azt mutatták, hogy inkább az alkotórészek aránya jellemző az egyes szöveti típusra, nem pedig egy specifikus molekula.

Az adatbázisra alapozva végeztünk méréseket 156 vastagbélrákos, adenomás, és IBD-s betegben, mérést végezve a makroszkóposan ép területeken is. További 16 CRC máj metasztázist és 21 „egészséges” máj mintát analizáltunk. A daganatos esetekben 5.8-6.8% volt a tévesen negatívnak ítélt tumor, metasztázis esetében minden mérés a valós státusznak megfelelő volt. Tizenegy IBD-s beteg 20 spektruma és 7 adenoma 34 spektruma esetén nem volt téves eredmény. Nem volt különbség az in vivo és az ex vivo felvett spektrumok között. A nem vastagbél eredetű szövethanalíziseket is figyelembe véve, a 81 betegből felvett 864 spektrum eredményeit elemezve a módszer szenzitivitása 97.7%, a specificitása 96.5%-nak bizonyult. A fals pozitív arány 3.5%, a fals negatív arány 2.3 % volt.

Primer máj és tüdő tumorok esetében azonban kissé csökkent a specificitás 95%-ra, a fals pozitív arány pedig 6 és 8% lett. A jövőbeli alkalmazhatóságot potenciálisan növelheti az a megfigyelés, hogy nem csak a szövethanalízissel, hanem a változó citológiai grádussal is

eltérő spektrum vehető fel. A módszer találati pontosságát mindenképpen befolyásolja a különböző szövettani típusú betegségekről felvett adatbázis, mely viszonyítási alapja lehet az aktuális mérésnek.



II.5.1 ábra A REIMS intraoperatív működésének modellje. Az elektromos kés hatására keletkező füstöt tefloncsövön a tömegspektrométerhez vezetjük. A minta beérkezésétől számítva mintegy 0.5 sec-on belül a mérés lezajlik. (Balog J. 2013)

Hasonló következtetésekre jutottak többek között Eberlin és munkatársai (Eberlin 2014), deszorpciós elektrospay ionizációs tömegspektrometria alkalmazása során, agy tumorok ill., gyomor tumorok esetében. A vizsgálat nem kíván előkészítést, gyorsabb mint a fagyasztott szöveti vizsgálat és az értékelés nem múlik a vizsgáló szubjektív véleményén.

Összefoglalás

I. HNPCC/LS betegek vizsgálata

A Debreceni Egyetem Sebészeti Klinikáján ellátott CRC betegekből létrehoztunk egy adatbázist, melyet első lépésben 1997-2010 között retrospektíven, kérdőívek segítségével vizsgáltunk.

Bevezettük a prospektív lekérdezést 2010-től, valamint az anamnézis (Amsterdam, Bethesda kérdőívek) alapján gyaníthatóan pozitív betegek anyagán immunhisztokémiai és mikroszatellita vizsgálatokat végeztünk.

Az IHC és MS vizsgálatok révén kiszűrt betegeket genetikai vizsgálatoknak vetettük alá. A mutációkeresés során 16 hordozó családot sikerült felderítenünk, akik összesen 12 különböző pathogén mutációt hordoztak. A 5 újonnan feltárt mutációból 1 misszensz, 3 keret eltolásos és 1 nonszensz mutáció volt, valamint számos már leírt polimorfizmust is kimutattunk.

Az együttműködő családtagokat gondozásba vettük. Ennek köszönhetően vastagbél polipok kerültek eltávolításra, még a malignus növekedési fázis előtt. A genetikai eltérést nem mutató, de anamnesztikus adatok alapján nagy rizikójú betegeknél és családtagjaiknak is folyamatosan felajánljuk a követés lehetőségét és az általa nyújtotta előnyöket.

II. CRC sejtvonal epithel sejtjeinek és CRC betegek limfocitáinak plazma membrán vizsgálata

Kísérletes munkáink során CRC sejtvonal (LS-174-T) és betegekből származó CD4+ helper limfociták plazma membránjában szerveződő lipid raftok kompozícióját és változásait vizsgáltuk az MHCI, MHCII, ICAM-1, IL-2/15 α -, γ -alegységek, CD44s, CD59 vonatkozásában.

Kimutattuk, hogy konzisztens receptor mintázatok találhatók a vizsgált sejtek felszínén. Az LS-174-T sejtek esetében IFN- γ hatására az MHCI és ICAM-1 relációjában dinamikus átrendeződés megy végbe, mely ICAM-1 siRNS-sel kvantitatíve befolyásolható.

Mind a CRC-s, mind a Crohn betegek drenáló nyirokcsomóiból származó CD4⁺ limfociták mutattak receptor számbeli és mintázatbeli különbségeket a kontroll periférás vér CD4⁺ sejtjeihez képest, a nanométeres és a mikrométeres tartományban is (nano- és mesoscale). Az eredmények elsősorban arra mutatnak, hogy célzott molekuláris therápia esetén nem feltétlenül elegendő a „target” molekula megcélzása, de a molekuláris környezet figyelembe vétele úgyszintén fontos lehet.

A REIMS technikával végzett méréseink eredményei ígéretesek a közeljövőben kifejlesztendő szövetanalizáló eszköz tekintetében. A mérés gyors és pontosnak mutatkozik. A sejtek lipid összetevőinek tömegspektrometriás analízise lehetővé teheti az intraoperatív diagnosztika fejlődését és a fagyasztott metszet szövettani vizsgálata mellett további segítség lehet a daganatok típusának és dignitásának eldöntésében.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Damjanovich L, Kósa Cs, Bartha I. A hereditær nonpolyposis colon carcinoma felismerésének gyakorlati jelentősége. Magyar Seb. 2001;54:88-90.

Damjanovich S, Mátyus I, **Damjanovich L**, Bene L, Jenei A, Matkó J, Gáspár R, Szöllösi J. Does mosaicism of the plasma membrane at molecular and higher hierarchical levels in human lymphocytes carry information on the immediate history of cells? Immunol. Letters. 2002;82:93-99.

Bacsó Zs, Bene L, **Damjanovich L**, Damjanovich S. INF- γ Rearranges Membrane Topography of MHC-I and ICAM-1 in Colon Carcinoma Cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002;290:635-640.

Tanyi M, Kanyári Zs, Orosz L, Juhász B, Lukács G, **Damjanovich L**. A HNPCC klinikai jelentősége, korai felismerésének sebészeti vonatkozásai. Magyar Seb. 2004;57:267-278.

Tanyi M, Kanyári Zs, Juhász B, Lukács G, Olasz J, Kámory E, Csuka O, Tóth L, **Damjanovich L**. A hereditær nonpolipózis kolorektális karcinóma fenotípusának sokszínűsége. Két, igazolt mutáció hordozó beteg családfa analízise. Magyar Seb. 2006;59:411-420.

Tanyi M, Olasz J, Lukács G, Csuka O, Tóth L, Szentirmay Z, Ress Zs, Bartha Zs, Tanyi JL, **Damjanovich L**. Pedigree and genetic analysis of a novel mutation carrier patient suffering from hereditary nonpolyposis colorectal cancer. World J. Gastroenterol. 2006;28:1192-1997.

Kámory E, Tanyi M, Kolacsek O, Olasz J, Tóth L, **Damjanovich L**, Csuka O. Two Germline alterations in mismatch repair genes found in a HNPCC patient with poor family history. Pathol. Oncol. Res. 2006;12:228-233.

Nagy P, Vámosi G, Damjanovich S, **Damjanovich L**. ICAM-1 inhibits the homocluster formation of MHC-I in colon carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006;347:758-763.

Vámosi Gy, Bodnár A, Damjanovich S, Nagy P, Varga Z, **Damjanovich L**. The role of supramolecular protein complexes and membrane potential in transmembrane signaling processes of lymphocytes. *Immunology Letters.* 2006;104:53-58.

Bene L, Kanyári Z, Bodnár A, Kappelmayer J, Waldmann TA, Vámosi G, **Damjanovich L**. Colorectal carcinoma rearranges cell surface protein topology and density in CD4⁺ T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007;361:202-207.

Tanyi M, Olasz J, Kámory E, Csuka O, Tanyi JL, Ress Z, **Damjanovich L**. Difficulties in recognizing families with hereditary non-polyposis colorectal carcinoma. Presentation of 4 families with proven mutation. *EJSO* 2008;34:1322-1327.

Tanyi M, Olasz J, Lukács G, Tanyi JL, Tóth L, Antal-Szalmás P, Ress Z, Bubán T, András C, **Damjanovich L**. A new mutation in Muir-Torre syndrome associated with familial transmission of different gastrointestinal adenocarcinomas. *EJSO* 2009;35:1128-1130.

Damjanovich L, Volkó J, Forgács A, Hohenberger W, Bene L. Crohn's disease alters MHC-rafts in CD4⁺ T-cells. *Cytometry A.* 2012;81:149-164.

Tanyi M, Olasz J, Tanyi JL, Tóth L, Antal-Szalmás P, Bubán T, András Cs, Urbancsek H, Garami Z, Csuka O, **Damjanovich L**. Q48P mutation in the hMLH1 gene associated with Lynch syndrome in three Hungarian families. *Familal Cancer.* 2012;11:519-524.

Balog J, Sasi-Szabó L, Kinross J, Lewis MR, Muirhead LJ, Veselkov K, Mirnezami R, Dezső B, **Damjanovich L**, Darzi A, Nicholson JK, Takáts Z. Intraoperative tissue identification using rapid evaporative ionization mass spectrometry. *Science Transl. Med.* 2013;5:1-11.

Tanyi M, Olasz J, Tanyi JL, Tóth L, Antal-Szalmás P, Rész Z, Bubán T, Palatka K, András C, Urbancsek H, Garami Z, Csuka O, **Damjanovich L**. MLH1 and MSH2 mutation screening in HNPCC families of Hungary – Two new MMR gene mutations. EJSO 2014;40:1445-1452.

Irodalomjegyzék

Anderson HA, Hiltbold EM, Roche PA. Concentration of MHC class II molecules in lipid rafts facilitates antigen presentation. Nat. Immunol. 2000;1:156-62

Aaltonen L, Jarvinen H et al. Explaining the familial colorectal cancer risk with repair (MMR)- deficient and MMR- stable tumors. Clin. Cancer Res. 2007;13:356-361.

Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. Science. 1993;260:812-6.

Aarnio M, Mecklin JP, Aaltonen LA et al. Life-time risk of different cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome. Int. J. Cancer. 1995;64:430-433.

Axilbund JE, Wiley EA. Genetic testing by cancer site: pancreas. Cancer J. 2012;18:350-4.

Barrow E, Robinson L, Alduaij W et al. Cumulative lifetime incidence of extracolonic cancers in Lynch syndrome: a report of 121 families with proven mutations. Clin. Genet. 2009;75: 141-149.

Bazil V, Stefanova I, Hilgert I, Kristofova H, Vanek S, Horejsí V. Monoclonal antibodies against human leukocyte antigens. IV. Antibodies against subunits of the LFA-1 (CD11a/CD18) leukocyte-adhesion glycoprotein. Folia Biol. (Praha) 1990. 36: 41-50.

Beck NE, Tomlison IPM, Homfray T. Use of SSCP analysis to identify germline mutations in HNPCC families fulfilling the Amsterdam criteria. *Hum. Genet.* 1997;99:219-224.

Bennett RL, French KS, Resta RG et al. Standardized human pedigree nomenclature: Update and assessment of the recommendations of the National Society of Genetic Counselors. *J. Genet. Counsel.* 2008;17:424-433.

Boland CR, Troncale FJ. Familial colonic cancer without antecedent polyposis. *Ann. Intern. Med.* 1984;100:700-1.

Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW. 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;58:5248-5257.

Buhard O, Suraweera N, Lectard A et al. Quasimonomorphic mononucleotide repeats for high-level microsatellite instability analysis. *Disease Markers.* 2004;20:251-257.

Cederquist K, Emanuelsson M, Goransson I: Mutation analysis of the MLH1, MSH2 and MSH6 genes in patients with double primary cancers of the colorectum and the endometrium: a population-based study in northern Sweden. *Int. J. Cancer.* 2004;109:370-376.

Chambers GK, MacAvoy ES. Microsatellites: Consensus and controversies. *Comparat. Biochem. Physiol. Part B.* 2000;126:455-476

Chan TL, Yuen ST, Kong CK et al. Heritable germline epimutation of MSH2 in a family with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat. Genet.* 2006;38:1178-1183.

Damjanovich S, Bene L, Matkó J et al. Two-dimensional receptor patterns in the plasma membrane of cells. A critical evaluation of their identification, origin and information content. Biophys. Chem. 1999;82:99-108.

De la Chapelle A, Wright FA. Linkage disequilibrium mapping in isolated populations: the example of Finland revisited. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998;95:12416-23.

de Bakker B, Bodnár A, van Dijk EMHP et al. Nanometer-scale organization of the alpha subunits of the receptors for IL2 and IL15 in human T lymphoma cells. J. Cell. Science. 2007;121:627-633.

Drescher KM, Sharma P, Lynch HT. Current hypotheses on how microsatellite instability leads to enhanced survival of Lynch syndrome patients Clin. Dev. Immunol. 2010;2: 1-13.

Eads CA, Lord RV, Wickramasinghe K. Epigenetic patterns in the progression of esophageal adenocarcinoma. Cancer Res. 2001;61:3410-3418.

Eberlin LS, TibshiraniRJ, Zhang J et al. Molecular assessment of surgical-resection margins of gastric cancer by mass-spectrometric imaging. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014;111:2436-2441.

Edidin M, and Wei T. Lateral diffusion of H-2 antigens on mouse fibroblasts. J. Cell. Biol. 1982;95: 458-462.

Finzel AH, Reiniger AJ, Bode PA et al. ICAM-1 supports adhesion of human small-cell lung carcinoma to endothelial cells. Clin. Exp. Metastasis. 2004;21:185-9.

Engel C, Loeffler M, Steinke V et al. Risk of less common cancers in proven mutation carriers with Lynch syndrome. J. Clin. Oncol. 2012;30: 4409-4015.

Fischel R, Lescoe MK, Rao MRS, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*. 1993;75:1027-38.

Geginat J, Paroni M, Maglie S et al. Plasticity of human CD4 T cell subsets. *Frontiers Immunol*. 2014;630:1-9.

Giardiello FM, Allen J I, Axillbund JE et al. Guidelines on genetic evaluation and management of Lynch syndrome: A consensus statement by the U.S. Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Gastrointest. Endoscopy*. 2014;80:197-220.

Hudson KL, Holohan MK, Collins FS. Keeping the pace with times- the Genetic Information Nondiscrimination Act of 2008. *N. Engl. J. Med*. 2008;358:2661-2663.

Hutchinson J, Cohen Z, Onyeagucha BC et al. *Cancer Genetics*. 2013;206:309-316.

Hutter P, Couturier A, Membrez V: Excess of hMLH1 germline mutations in Swiss families with hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Int. J. Cancer*. 1998;78:80-84.

International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumors

<http://www.insightgroup.org>.

Jarvinen HJ, Mecklin JP, Sistonen P. Screening reduces colorectal cancer rate in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology*. 1995;108:1405-11.

Jarvinen HJ, Aarnio M, Mustonen H et al. Controlled 15-year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2000;118:829-834.

Jenkins MA, Hayashi S, O'Shea AM et al. Pathology features in Bethesda guidelines predict colorectal cancer microsatellite instability: a population based study. *Gastroenterology*. 2007;133:48-56.

Kastrinos F, Mukherjee B, Tayob N et al. Risk of pancreatic cancer in Lynch Syndrome. *JAMA*. 2009;302:1790-1795.

Kámory E, Kolacsek O, Otto S. HMLH1 and hMSH2 somatic inactivation mechanisms in sporadic colorectal cancer patients. *POR*. 2003;9:236-241.

Kawai Y, Kaidoh M, Yokohama Y et al. Chemokine CCL2 facilitates ICAM-1 mediated interactions of cancer cells and lymphatic endothelial cells in sentinel lymph nodes. *Cancer Sci*. 2009;100:419-28.

Kempers MJ, Kuiper RP, Ockeloen CW et al. Risk of colorectal and endometrial cancers in EPCAM deletion-positive Lynch syndrome: a cohort study. *Lancet Oncol*. 2011;12:49-55.

Kim JC, Kim HC, Roh SA, Koo KH, Lee DH, Yu CS, Lee JH, Kim TW, Lee HL, Beck NE, Bodmer WF: hMLH1 and hMSH2 mutations in families with familial clustering of gastric cancer and hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Cancer Detect. Prev*. 2001;25: 503-510.

Kovács ME, Papp J, Szentirmay Z, Otto S, Oláh E. Deletions removing the last exon of TACSTD1 constitute a distinct class of mutations predisposing to Lynch syndrome. *Hum. Mutat*. 2009;30:197-203.

Ksiazek K, Mikula-Pietrasik J, Catar R et al. Oxydative stress-dependent increase in ICAM-1 expression promotes adhesion of colorectal and pancreatic cancers to the senescent peritoneal mesothelium. *Int. J. Cancer*. 2010;127:293-303.

Kuiper RP, Vissers LE, Venkatachalam R et al. Recurrence and variability of germline EPCAM deletions in Lynch syndrome. Hum. Mutat. 2011;32:407-14.

Kurzwaski G, Suchy J, Kladny J et al. Germline MSH2 and MLH1 mutational spectrum in HNPCC families from Poland and the Baltic States. J Med Genet. (abstract) 2002;39: E65.

Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulus N, Liu B, Jen J, Parsons R et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Cell. 1993;75:1215-25.

Lebedeva T, Anikeeva N, Kalams SA et al. Major histocompatibility complex class I-intercellular adhesion molecule-1 association on the cell surface of target cells: implications for antigen presentation to cytotoxic T-lymphocytes. Immunology. 2004;113:460-71

Ligtenberg MJ, Kuiper RP, Chan TL et al. Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. Nat. Genet. 2009;41:112-117.

Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O et al. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. J. Clin. Oncol. 2002;20:1043-1048

Lombard J. Once upon a time the cell membranes: 175 years of cell boundary research. Biology Direct. 2014;9:32.

Lynch HT, Shaw MW, Magnuson CW, Larsen AL, Krush AJ. Hereditary factors in cancer: study of two large Midwestern kindreds. Arch. Intern. Med. 1966;117:206-12.

Lynch HT, Lynch PM, Pester J, Fusaro RM. The cancer family syndrome. Rane cutaneous phenotypic linkage of Torre's syndrome. Arch. Intern. Med. 1981;141:607-611.

Lynch HT, de la Chapelle A. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. J. Med. Genet. 1999;36:801-818.

- Lynch HT.** Hereditary Colorectal Cancer-part II. Curr. Probl. Surg. 2005;42:267-334.
- Lynch HT,** Fusaro RM, Lynch PM. Sebaceous Skin Lesions as Clues to Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer. J. Invest. Dermatol. 2006;126: 2158-2159.
- Lynch HT,** Riegert-Johnson DL, Snyder C et al. Lynch syndrome associated extracolonic tumors are rare in two extended families with the same EPCAM deletion. Am. J. Gastroenterol. 2011;106:1829-36.
- Matkó J,** Bushkin Y, Wei T, Edidin M. Clustering of class I HLA molecules on the surfaces of activated and transformed human cells. J. Immunol. 1994;152:3353-3360
- Maynard CL,** Weaver CT. Intestinal Effector T Cells in Health and Disease. Immunity. 2009;31.(3):389-400.
- Mecklin JP.** The implications of genetics in colorectal cancer. Annals Oncol. 2008;19. suppl. 5, v87-v90.
- Metzger H.** Transmembrane signaling: The joy of aggregation. J. Immunol. 1992;149:1477-1487.
- Möslein G,** Tester DJ, Lindor NM et al. Microsatellite instability and mutation analysis of hMSH2 and hMLH1 in patients with sporadic, familial and hereditary colorectal cancer. Hum. Mol. Genet. 1996;5:1245-1252.
- Muir EG,** Bell AJ, Barlow KA. Multiple primary carcinomata of the colon, duodenum, and larynx associated with kerato-acanthomata of the face. Br. J. Surg. 1967;54:191-195.
- National Institute of Environmental Health Sciences Genome Project,** NIEHS SNPs.
<http://egp.gs.washington.edu/M.html>.

Nyström-Lahti M, Sistonen P, Mecklin JP, Pylkkanen L, Aaltonen LA, Jarvinen H et al.

Close linkage to chromosome 3p and conservation of ancestral founding haplotype in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994;91:6054-8.

Nyström-Lahti M, Wu Y, Moisio AL, Hofstra RM et al. DNA mismatch repair gene mutations in 55 kindreds with verified or putative hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Hum. Mol. Genet.* 1996;5:763-769.

Papp J, Kovács ME, Oláh E. Germline MLH1 and MSH2 mutational spectrum including frequent large genomic aberrations in Hungarian hereditary non-polyposis colorectal cancer families: Implications for genetic testing. *World J. Gastroenterol.* 2007;13:2727-2732.

Peltomäki P, Offerhaus GJA, Vasen HFA. Lynch syndrome. In: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, editors. *WHO classification of tumors of the digestive system*. Sterling (Va): Stylus Publishing. 2010;152-5.

Plevová P, Krepelová A, Papezová M, Sedláková E, Curik R et al.: Immunohistochemical detection of the hMLH1 and hMSH2 proteins in hereditary non-polyposis colon cancer and sporadic colon cancer. *Neoplasma*. 2004;51:275-284.

PMut: <http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/>

PolyPhen: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>

Ponti G, Losi L, Pedroni M, Lucci-Cordisco E, Di Gregorio C, Pellacani G, Seidenari S. Value of MLH1 and MSH2 mutations in the appearance of Muir-Torre syndrome phenotype in HNPCC patients presenting sebaceous gland tumors or keratoacanthomas. *J. Invest. Dermatol.* 2006;126:2302-2307.

Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J. Clin. Oncol.* 2005;23:609-618.

Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, et al. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: Meeting Highlights and Bethesda guidelines J. Natl. Cancer Inst. 1997;89:1758-62.

Samowitz WS, Curtin K, Lin H. The Colon Cancer Burden of Genetically Defined Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer. Gastroenterology. 2001;121:830-838.

Schluskel AT, Gagliano RA, Seto-Donlon S. The evolution of colorectal cancer genetics-Part 2: clinical implications and applications. J. Gastrointest. Oncol. 2014;5:336-344.

Shia J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I. The utility of immunohistochemistry. J. Mol. Diagn. 2008;10:293-300.

Sorting Intolerant from Tolerant: <http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>

Szentesi G, Horváth G, Bori I. et al. Computer program for determining fluorescence resonance energy transfer efficiency from flow cytometric data on a cell-by-cell basis. Comp. Methods Programs Biomed. 2004;75:201-211.

Szöllősi J, Damjanovich S, Balázs M et al. Physical association between MHC class I and class II molecules detected on the cell surface by flow cytometric energy transfer. J.Immunol. 1989;143:208-213.

Szöllősi J, Péter Nagy, Zsolt Sebestyén et al. Applications of fluorescence resonance energy transfer for mapping biological membranes. Mol. Biotech. 2002;251-266.

Tanabe M, Sekimata M, Ferrone S et al. Structural and functional analysis of monomorphic determinants recognized by monoclonal antibodies reacting with the nants recognized by

monoclonal antibodies reacting with the HLA class I alpha 3 domain. J. Immunol. 1992; 148: 3202-3209.

The Human Gene Mutation Database, Cardiff <http://archive.uwcm.ac.uk>

Tian M, Sun Y, Li Z et al. Polymorphisms of ICAM-1 are associated with gastric cancer risk and prognosis. World J. Gastroenterol. 2012;18:368-374.

Tímár J, Kásler M, Heringh A et al. A daganatos betegellátás innovatív fejlesztése genomikai módszerekkel. Beszámoló a Nemzeti Onkológiai Konzorcium 2008. évi tevékenységéről. Magyar Onkológia. 2009;53:321-334.

Torre D. Multiple sebaceous tumors. Arch. Dermatol. 1968;98:549-551.

Tutlewska K, Lubinski J, Kurzawski G. Germline deletions in the EPCAM gene as a cause of Lynch syndrome – literature review. Hered. Cancer Clin. Pract. 2013;11:1-9.

Umar A, Boland CR, Terdiman JP et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary Nonpolyposis colorectal cancer (Lynch Syndrome) and microsatellite instability. J. Natl. Cancer Inst. 2004;96:261-268.

Valeri N, Gasparini P, Fabbri M et al. Modulation of mismatch repair and genomic stability by miR-155. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010;107:6982-6987.

Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC) Dis. Col. Rect. 1991;34:424-425.

Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. Gastroenterology. 1999; 116: 1453-1456.

Vasen HF, Blanco I, Aktan-Collan K et al. Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts. Gut. 2013;62:812-823.

Vámosi G, Bodnár A, Vereb G et al. IL-2 and IL-15 receptor α -subunits are coexpressed in a supramolecular receptor cluster in lipid rafts of T-cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004;101:11082-7.

Vereb G, Matkó J, Vámosi G et al. Cholesterol-dependent clustering of IL-2R α and its co-localization with HLA and CD48 on T-lymphoma cells suggest their functional association with lipid rafts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000;97:6013-8.

Ward R, Meagher A, Tomlinson L et al. Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer. Gut. 2001;48:821-829.

Warthin AS. Heredity with reference to carcinoma as shown by the study of the cases examined in the pathological laboratory of the University of Michigan, 1985-1913. Arch. Intern. Med. 1913;12:546-55.

Watson P, Vasen HF, Mecklin JP et al. The risk of extra-colonic, extraendometrial cancer in Lynch syndrome. Int. J. Cancer. 2008;123:444-449.

Win AK, MacInnis RJ, Dowti JG, Jenkins AM, Criteria and prediction models for mismatch repair gene mutations: a review J. Med. Genet. 2013;50:785-793.

Wijnen J, Khan PM? Vasen H et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer families not complying with the Amsterdam criteria show extremely low frequency of mismatch-repair-gene mutations. Am. J. Hum. Genet. 1997;61:329-335.

Wood LD, Parsons WD, Jones S et al. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science*. 2007;318:1108-1113

Yanagisawa Y, Akiyama Y, Iida S. Methylation of the hMLH1 promoter in familial gastric cancer with microsatellite instability. *Int. J. Cancer*. 2000;85:50-53.

Zavodna K, Bujalkova M, Krivulcik T et al. Novel and recurrent germline alterations in the MLH1 and MSH2 genes identified in hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients in Slovakia. *Neoplasma*. 2006;53: 269-276.

Köszönetnyilvánítás

Általános orvoskari diplomám megszerzése óta az a szerencsés helyzet kísért, hogy olyan munkahelyeken dolgozhattam ahol a daganatkutatás, a diagnosztika és később a daganatos betegek ellátása kiemelkedő szerepet játszott. Ez a nagyon kiterjedt és izgalmas terület engem is magával ragadott és a mai napig is személyes kihívásnak tekintem, ha egy daganatos beteg gyógyulása reményében hozzám fordul segítségért. Pályám elején 1984-ben, fiatal patológusként **Gomba Szabolcs Professzor** Intézetében kezdtem dolgozni, majd, a philadelphiai Wistar Intézetben, **Prof. Dr. Clayton A. Buck** laboratóriumában kaptam 3 éves ösztöndíjat. Fő témánk az integrin kutatás volt. Legtöbbet főnökömnek és **Dr. Steven Albeldának** köszönhetek.

Hazatérve, 1992-ben a klinikum felé fordultam **Balázs György Professzor** Sebészeti Klinikáján. Tőle kaptam lehetőséget, hogy az Erlangeni Egyetem Sebészeti Klinikáján is tanuljak onkológiai sebészetet **Prof. Dr. W. Hohenbergertől**. Mindemellett próbáltam az elméleti intézetekben adódó lehetőségeket (Debreceni Egyetem Biofizikai Intézet, Országos Onkológiai Intézet) kihasználni és a kutatási tevékenységemet is folytatni. Édesapámnak, **Prof. Dr. Damjanovich Sándornak** köszönhetek ezen a téren a legtöbbet. Ekkor is a daganat progresszió során kimutatható eltérések vizsgálata volt a fő cél. Tumorsejtek és limfociták sejtmembrán receptor klasztereit vizsgáltuk, elsősorban **Dr. Bene László** segítségével.

A klinikum felől közelítve számunkra új területen is elkezdtünk dolgozni és az öröklődő vastagbél daganatok egyik formáját, a HNPCC-t kezdtük el tanulmányozni **Dr. Tanyi Miklós** kollegámmal, az Országos Onkológiai Intézet Molekuláris Genetikai Laboratóriumának-**Dr. Csuka Orsolya, Dr. Olasz Judit** - majd később a Debreceni Egyetem Pathológiai és Laboratóriumi Medicina Intézeteinek- **Dr. Antal-Szalmás Péter, Prof. Dr. Kapplemayer János**- hathatós segítségével.

Az értekezésben nem tárgyalt klinikai onkológiai munkánk során emlő és gyomor daganatok stádium függő progresszióját is vizsgáltuk, melynek a mindennapi sebészi gyakorlatunkra is lehet kihatása. Ezen a területen **Dr. Tóth Dezsővel** működtünk együtt a legtöbbet.

Hálásan köszönöm valamennyi tanárom, mentorom és társszerző munkatársam segítségét.

Köszönöm családom valamennyi tagjának kitartását, szeretét és támogatását.