

Rak jelita grubego jest częstym nowotworem zarówno u kobiet, jak i mężczyzn. Aktualne sposoby leczenia tej choroby obejmują zabieg chirurgiczny, chemioterapię i natświetlanie guzów odbytnicy. Jednak nowotwory w tym samym stadium zaawansowania, leczone w identyczny sposób, w różnym stopniu poddają się terapii. Różnice te przypisuje się pewnym cechom molekularnym, przy których pomocy można zróżnicować nowotwory o podobnym obrazie histologicznym. Wybór odpowiedniego sposobu leczenia, pozwoli m.in. na uniknięcie działań ubocznych. W celu właściwego rozpoznania raka jelita grubego, podjęto serię badań w szpitalu Sir Charles Gairdner w Zachodniej Australii, które obejmowały – już wcześniej badane – znaczniki molekularne, które z kolei mogłyby okazać się ważnymi markerami prognostycznymi w raku jelita grubego. Obejmują one: p53, K-ras, niestabilność mikrosatelitarną (microsatellite instability, MSI), metylację, polimorfizm genu MTHFR (methylene tetrahydrofolate reductase) i receptora transformującego czynnika wzrostowego beta typu II (TGF-B, RII).

Słowa kluczowe: rak jelita grubego, markery molekularne.

Markery molekularne w raku jelita grubego – doświadczenie z Zachodniej Australii

Molecular markers in colorectal carcinoma – the Western Australian experience

Artur Kamiński, David Joseph

Oddział Radioterapii, Szpital Sir Charles Gairdner, Nedlands, Western Australia

p53

Prognostyczna wartość p53 pozostaje kontrowersyjna. Gen p53, gen supresorowy (*tumour suppressor gene*, TSG), przyczynia się do wytwarzania jądrowej fosfoproteiny zaangażowanej w naprawę DNA. Mutacje tego genu wpływają na zahamowanie naprawy DNA, co wiąże się z klinicznymi konsekwencjami u chorych poddanych leczeniu chemo- i radioterapią. Częstość występowania mutacji p53 w raku jelita grubego w niektórych przypadkach dochodzi do 50 proc. Aby ocenić prognostyczną wartość p53 w raku jelita grubego, podjęto szereg badań.

Pierwsza seria chorych z rakiem w stopniu Dukes B i C liczyła 995 osób. Mutacja p53 występowała u 39 proc. badanych. U tych pacjentów przewaga mutacji wystąpiła w przypadku lokalizacji guza po lewej stronie jelita grubego ($p=0,006$). Nie znaleziono powiązania między statusem p53, a wiekiem chorego, płcią, czy też stadium lub stopniem zróżnicowania guza [1].

W drugiej grupie badanych, która obejmowała 388 chorych ze stopniem Dukes C mutację p53 stwierdzono w 28 proc. przypad-

ków. W tej grupie 133 pacjentów otrzymało fluorouracyl. Obecność mutacji nie była powiązana z przeżyciem chorych leczonych chemicznie czy chirurgicznie [2].

W serii 891 pacjentów w III stopniu zaawansowania raka jelita grubego, 1/3 była uzupełniająco leczona fluorouracylem. Mutacja p53 występowała u 289 osób. Stwierdzono, że chemioterapia przedłuża życie pacjentom z normalnym wariantem p53 ($p=0,041$). Jest to pierwsza tego typu obserwacja [3].

Zbadano również 122 pacjentów z rakiem odbytnicy ze stopniem Dukes C. Jednej trzeciej pacjentów uzupełniająco podano fluorouracyl. Mutację p53 wykryto tylko u 47 pacjentów. Obecność mutacji nie była związana z efektem chemioterapii, oraz z wydłużeniem życia całej grupy badanej [4].

Następnie 48 chorych z lokalnie zaawansowanym rakiem odbytnicy, przed operacją leczono chemo-radioterapią. Mutację p53 znaleziono u 35 proc. pacjentów. Obecność mutacji nie była powiązana ze zmniejszeniem objętości guza [5].

W sumie nie można użyć w raku jelita grubego p53 jako znacznika rokowniczego co do przeżycia, czy

Colorectal carcinoma (CRC) is a common malignancy in both males and females. Current treatment modalities include surgery, chemotherapy, and irradiation of rectal lesions. Despite these interventions, however, there is considerable variance in treatment success. This has been observed in same stage tumours treated with standardised surgical and chemo-therapeutic schedules. It has been postulated that these variations arise due to inherent differences in the tumour characteristics, in particular their molecular profiles. Identification of patient groups who are likely to respond to selected therapies may allow more appropriate patient selection for treatment whilst avoiding treatment related side effects. In order to achieve this, a number of studies have been undertaken at Sir Charles Gairdner Hospital in Western Australia. These have focused on previously identified molecular markers that may be of prognostic value in CRC. They include p53, K-ras, microsatellite instability, methylation, methylene-tetra-hydrofolate reductase (MTFHR) polymorphism, and transforming growth factor (TGF) beta type II.

There are a number of other markers that have been found to be associated with CRC. Although not formally tested in our institution, a brief overview has been appended for completeness. These include dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), thymidylate synthase (TS), thymidine phosphorylase (TP), vascular endothelial growth factor (VEGF), and the bcl-2 gene.

Key words: colorectal carcinoma (CRC), molecular markers.

też reakcji na chemioterapię. Prawdopodobnie przyczyną tego jest złożona funkcja p53 w sygnalizacji komórkowej oraz mnogość dróg interakcji, w tym poprzez p21, bax i bcl-2. Prospektywne badanie tego genu może mieć większą szansę wskazania jego roli w rokowaniu raka jelita grubego.

K-ras

Oprócz p53, mutacje onkogenu K-ras są jednymi z najczęstszych wśród nowotworów ludzkich. Poprzednio wysuwano hipotezę, że mutacja tego genu zwiększa ryzyko wystąpienia raka jelita grubego, jego nawrót i ostatecznie śmiertelność [6]. W naszym szpitalu nie znaleziono związku między obecnością mutacji K-ras, a przebiegiem klinicznym [7].

DEFEKT ODBUDOWY DNA

Niestabilność mikrosatelitarna (*microsatellite instability*, MSI) jest cechą nowotworów wykazujących defekt sekwencji DNA, związany z jego naprawą. MSI występuje aż w 15 proc. przypadków raka jelita grubego. Cechą ta upośledza mechanizmy odbudowy w uszkodzonych komórkach, m.in. po chemioterapii. Pierwotnie sądzono, że MSI rokuje dłuższe przeżycia [8].

W naszym szpitalu analizowano 388 chorych ze stopniem Dukes C. U pacjentów, u których stwierdzono MSI, przeżycie 5-letnie – po diagnozie i leczeniu – wynosiło 58 proc., istotnie dłużej niż w grupie bez MSI (32 proc. przeżyć 5-letnich, $p=0,017$). Trzeba jednak dodać, że w tej właśnie grupie – z MSI – więcej chorych po operacji otrzymało fluorouracyl, co mogło mieć wpływ na ostateczny wynik badania [9, 10].

Następnie odkryto, że MSI odwrotnie koreluje z obecnością mutacji p53 w raku jelita grubego w III stopniu zaawansowania ($p<0,0001$). Potwierdza to z wcześniejsze obserwacje, że MSI i brak mutacji p53 są związane z korzystnym rokowaniem po uzupełniającej chemioterapii [11].

U 656 chorych ze stopniem Dukes C po operacji zastosowano uzupełniającą chemioterapię. Zaobserwowano wydłużenie przeżycia kobiet ($p<0,0001$), chorych z rakiem prawego jelita grubego ($p<0,0001$) i MSI ($p=0,0007$). Chemioterapia ($p=0,0007$) była również skuteczniejsza u mężczyzn z rakiem prawego jelita grubego, niż u mężczyzn z rakiem lewostronnym [12, 13].

Byliśmy również zainteresowani tym, czy można przewidzieć stan węzłów chłonnych w raku jelita grubego III stopnia. W grupie 645 chorych blisko połowa miała zajęty jeden lub dwa węzły chłonne, pozostały trzy lub więcej węzłów. Nowotwory wykazujące MSI charakteryzowały się mniejszą liczbą zajętych węzłów ($p=0,02$). Płeć, lokalizacja nowotworu i mutacja Ki nie miały wpływu na liczbę zajętych węzłów. Nisko zróżnicowane nowotwory wykazywały większą liczbę zajętych węzłów ($p=0,007$) i były częstsze wśród młodszych chorych ($p=0,025$) [14].

Wyniki naszych badań zostały potwierdzone przez inne grupy i wykazały, że MSI jest niezależnym czynnikiem rokowniczym, związanym z dłuższym przeżyciem ($p<0,001$) i z mniejszym prawdopodobieństwem lokalnych czy odległych przerzutów ($p<0,001$) [15, 16].

METYLACJA

Metylacja odcinków promotorowych może mieć wpływ na transkrypcję genów i ewentualnie funkcje produktu danego genu. Stopień metylacji wybranych genów został oceniony u 58 chorych na raka jelita grubego. Hipermetylację genów hMLH1, p16 i MDR obserwowano odpowiednio u 23, 29 i 28 proc. chorych. Hipermetylację tych genów częściej znajdowano w nowotworach z MSI ($p<0,001$). Ponadto korelowała ona z niskim zróżnicowaniem histologicznym ($p<0,001$). Geny TS, ATM, PARP i p21 nie wykazywały hipermetylacji [17].

Gen myf-3 odgrywa ważną rolę w różnicowaniu komórek mięśni-

wych. Hipermetylację tego genu stwierdzono w 88 proc. gruczolaków jelita grubego i w 99 proc. raków jelita grubego. Stopień hipermetylacji korelował z wiekiem, z lokalizacją nowotworu (proksymalny vs dystalny), inwazyjnością oraz z MSI [18].

Wyspy CpG są charakterystyczne dla niektórych raków jelita grubego. Jednaczesa metylacja wielu wysp CpG jest określana jako CpG *island methylator phenotype* (CIMP). U 275 pacjentów z rakiem stopnia II i III, CIMP korelowała z nisko zróżnicowanymi, prawostronnymi rakami o wysokim stopniu ($p<0,05$). CIMP korelowało ujemnie z obecnością mutacji *p53* ($p<0,05$) i dodatnio z obecnością mutacji *MTHFR* u kobiet ($p=0,037$). CIMP nie wykazuje związku z przeżyciem, ale w powiązaniu z innymi czynnikami może rokować korzystną odpowiedź na leczenie chemiczne [19, 20].

POLIMORFIZM GENU MTHFR (METHYLENE TETRAHYDROFOLATE REDUCTASE)

Enzym MTHFR przetwarza pochodne folanu w metabolizmie puryn. Wariant TT tego genu przyczynia się do obniżenia poziomu folanu w surowicy, obniżenia metylacji DNA w białych krwinkach i zwiększonego ryzyka rozwinięcia się raka jelita grubego. W naszym szpitalu porównano 501 pacjentów chorych na raka jelita grubego z 1 207 zdrowymi osobnikami. Wariant TT częściej występował u chorych na raka ($p=0,03$), częściej występował także w rakach z MSI ($p=0,05$) [21].

GEN RECEPTORA TRANSFORMUJĄCEGO CZYNNIKA WZROSTU BETA TYPU II (TGF-B, RII)

Gen *TGF-B RII* w raku jelita grubego zachowuje się jak gen supresorowy (*tumour suppressor gene*, TSG). Mutacja tego genu koreluje z niskim zróżnicowaniem nowotworu ($p=0,006$) i brakiem przerzutów do węzłów chłonnych ($p=0,04$), jak wykazano u 210 chorych na raka

jelita grubego. Obecność tej mutacji wykazywała również trend wydłużenia przeżycia i obecność mutacji *p53* i *K-ras* [22].

Istnieją jeszcze inne markery molekularne związane z rakiem jelita grubego – nie badane w naszym szpitalu. Wśród nich występują: dehydrogenaza dihydropirimidinu (DPD), syntetaza timidylatu (TS), fosforylaza timidynu (TP), naczyniowy śródbłonkowy czynnik wzrostu (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) oraz gen *bcl-2*.

DPD, TS I TP

DPD, TS i TP to enzymy zaangażowane w metabolizmie piryrimidyn, w tym fluorouracylu. Zauważono, że chorzy na raka jelita grubego z niskimi poziomami tych enzymów wykazują lepszą odpowiedź na leczenie fluorouracylem. Wysokie poziomy tych enzymów wiążą się ze złą odpowiedzią na leczenie chemiczne [23].

W stopniu IV raka jelita grubego poziom TS w przerzutach jest związany z odpowiedzią na leczenie fluorouracylem. Nie znaleziono natomiast związku między poziomem TS w pierwotnych ogniskach nowotworu i reakcją na chemioterapię, sugerując, że następuje klonalne zróżnicowanie komórek przerzutowych. Zjawisko to może wiązać się z różnicami przeżyć w raku zlokalizowanym i przerzutowym [24].

VEGF

Czynnik VEGF odgrywa rolę w angiogenezie, migracji komórek, przebudowie macierzy międzykomórkowej i przepuszczalności naczyń, co przyczyniają się do postępu procesu nowotworowego. Wykazano, że poziomy VEGF są wyższe u chorych na raka jelita grubego niż u zdrowych dawców ($p<0,0001$) [25].

Wśród 121 chorych na raka jelita grubego w II stopniu zaawansowania, nawrót choroby był częstszy gdy stwierdzano VEGF ($p<0,001$) [26].

Podobnie, poziomy VEGF kore-

lowały z wartością T, obecnością nacieków naczyń limfatycznych, postępem choroby i poziomem enzymu TP. Na ogół VEGF rokuje niepomyślnie na przeżycie [27].

Bcl-2

Produkt onkogenu *bcl-2* hamuje apoptozę. Ekspresja białka *bcl-2* spada z transformacją gruczolaka w raka, a wewnętrzkomórkowy poziom mRNA *bcl-2* wzrasta wraz ze zróżnicowaniem ($p=0,027$). Ekspresja genu *bcl-2* jest kontrolowana potranskrypcyjnie [28].

Chorzy na raka jelita grubego z nadekspresją *bcl-2* wykazują lepszą reakcję na chemioterapię ($p=0,011$). Ponadto ci, którzy reagują dobrze, mają szansę na dłuższe przeżycie ($p=0,0013$) [29, 30].

Powyżej opisano kilka swoistych cech wybranych markerów raka jelita grubego. Mutacje *p53* częściej znajdują się w rakach lewostronnych, które rzadziej odpowiadają na chemioterapię. Jest to więc cecha niepożądana. MSI częściej występuje w rakach prawostronnych i u kobiet. Chorzy ci częściej odpowiadają na chemioterapię, a rzadziej obserwuje się u nich przerzuty do węzłów chłonnych. MSI rokuje dłuższe przeżycia – jest więc cechą pożądaną. Hipermetylacja wysp CpG dodatnio korelowała z niską zróżnicowanymi, prawostronnymi rakami w zaawansowanej chorobie i ujemnie z obecnością mutacji *p53*. Dotąd jest to marker o nieokreślonej klinicznie wartości. Polimorfizm genu *MTHFR* na razie nie rokuje dłuższego przeżycia, ale może okazać się markerem toksyczności związanej z chemioterapią. Gen receptora transformującego czynnika wzrostu beta typu II zapowiada się jako czynnik rokowniczy, dotychczas jednak jest związany tylko z brakiem przerzutów do węzłów chłonnych. Obecnie nadal bada się *p53*, MSI, metylację i polimorfizm genu *MTHFR* w raku jelita grubego, jak i w innych nowotworach, szczególnie w raku piersi.

p53

The prognostic value of *p53* in CRC remains controversial. The *p53* tumour suppressor gene encodes for a nuclear phospho-protein involved in cellular responses to DNA damage. Mutations of this gene are believed to have an impact on these cellular responses which usually take place during the G1 cell arrest phase of the cell cycle. These mutations may potentially have clinical consequences in the setting of cell repair following the administration of chemotherapy for colonic adenocarcinoma. The incidence of *p53* mutations in CRC has been reported to be as high as 50%. In order to ascertain its prognostic value in CRC, tumours of varying stage and site have been scrutinised in recent years.

A series of 995 patients with Dukes B and C CRC were evaluated for *p53* status and selected clinical characteristics. Most of these patients did not receive adjuvant chemotherapy. *p53* mutations were found in 39% of patients. In this series *p53* mutations were found to be more prevalent in left sided tumours ($p=0.006$). No association was found between *p53* status and patient age, gender, tumour stage or grade [1].

Another series of 388 patients with Dukes C CRC alone were analysed for the presence of *p53* mutation. The incidence of *p53* mutation was 28% in all tumours. A total of 133 received chemotherapy. The presence of *p53* mutation did not predict for survival in either the treated or untreated group [2].

The prognostic value of *p53* with respect to survival and response to chemotherapy was investigated in the setting of Stage III CRC. 891 patients were checked

for *p53* status and analysed with respect to response to chemotherapy. About one third of these patients received adjuvant fluorouracil based chemotherapy. 289 patients were found to have the *p53* mutation. In this setting those patients with normal *p53* variants were found to benefit from chemotherapy ($p=0.041$), whereas those with *p53* mutations clearly had no benefit from receiving adjuvant treatment. This is the first time such a finding has been made [3].

The prognostic significance of *p53* alterations was also investigated in Dukes C rectal cancer alone. In a consecutive series of 122 patients who were followed up for a median period of 56 months, 47 exhibited mutations of the gene. One third underwent post-operative adjuvant chemotherapy. The presence of the *p53* mutation was not found to be associated with an improved response to fluorouracil based chemotherapy, nor improved overall survival amongst the whole cohort [4].

Further to this, *p53* status was also analysed in the neo-adjuvant setting. 48 patients with locally advanced rectal cancer were treated with pre-operative chemo-radiation prior to undergoing definitive surgery. 35% of tumours exhibited *p53* mutation and 40% had *p53* protein accumulation. Neither of these alterations, however, was associated with reduction in tumour size or local failure [5].

Ultimately it may be difficult to substantiate *p53* as a reliable predictor of outcome or response to chemotherapy. This is because of its complicated role in cell signalling and multiple pathway interactions, including p21, bax, and bcl-2. Prospective study of

this gene may be more helpful in elucidating its role as a marker of outcome and response.

K-ras

In addition to *p53*, mutations of the *K-ras* oncogene are one of the most common in human malignancies. It has been supposed that mutation of this gene increases the risk of this disease, its recurrence, and ultimately death. It has been found to correlate with the presence of *p53* mutations, and with a relatively low frequency in rectal cancer [6].

In our institution the presence of this mutation has not been found to be correlated to a clinical survival outcome [7].

MISMATCH REPAIR

Microsatellite instability is a feature of tumours characterised by a defective DNA mismatch repair sequence. Up to 15% of CRC may exhibit MSI, up to of which 5% may be in hereditary non-polyposis colon cancer (HNPCC). The defect is commonly a consequence of post-transcriptional silencing of the *hMLH1* repair gene, amongst others. When present in tumours, this defect impairs cellular repair of tumour cells, especially following chemotherapeutic intervention. In addition to the work undertaken at our institution, there is a body of evidence to suggest that MSI is predictive of a clinical survival advantage [8].

Initially a series of 388 patients with Dukes C colonic adenocarcinoma were analysed for the presence of microsatellite instability. The presence of MSI was found to be associated with improved survival at 5 years of follow up (58%) compared to those patients who were MSI negative (32%; $p=0.017$). Although one explanation for this difference may be that in this cohort

more patients with MSI received chemotherapy than those negative for MSI [9, 10].

Furthermore, microsatellite instability was found to be inversely correlated to the presence of *p53* mutation in Stage III CRC ($p<0.0001$). This is consistent with both microsatellite instability and normal *p53* being predictive of favourable responses to chemotherapy [11].

Once the trend of MSI in survival was established, other parameters were considered. 656 patients with Dukes C CRC were stratified by gender, tumour site, and presence of microsatellite instability and investigated for response to chemotherapy. There was a clear survival advantage for patients who were female ($p<0.0001$), those with right sided tumours ($p<0.0001$), and those with microsatellite instability ($p=0.0007$). Of note, men with right sided tumours also benefited from chemotherapy ($p=0.0007$), but men with left sided tumours did not. These factors need to be taken into account when making recommendations regarding chemotherapy [12, 13].

Stage III CRC was investigated to determine whether extent of nodal involvement correlated with the microsatellite instability, *Ki* mutation, patient gender, or tumour site. Of 645 patients reviewed, about half had one or two nodes involved with tumour, whilst the other half three or more. Tumours which exhibited microsatellite instability were associated with less frequent lymph node involvement ($p=0.02$). The other parameters weren't correlated with the number of lymph nodes affected by tumour. Of note, tumours that were poorly differentiated were associated with a greater lymph node burden ($p=0.007$), as were tumours from younger patients ($p=0.025$) [14].

Further to our own investigations, MSI has been independently shown to be associated with a survival advantage independent of other prognostic factors ($p<0.001$), with decreased likelihood of local or distal metastases ($p<0.001$) [15, 16].

METHYLATION

The methylation status of selected genes was investigated in a series of 58 colorectal cancers. Methylation of the *hMLH1*, *P16*, and *MDR* genes occurred with a frequency of 232, 29, and 28% respectively. Methylation of these genes was more frequent in tumours positive for MSI ($p<0.001$) and correlated strongly with poor histological differentiation ($p<0.001$). The *TS*, *ATM*, *PARP*, and *p21* genes did not exhibit methylation. Further clinical associations are under investigation [17].

The *Myf-3* gene is involved in muscle cell differentiation. Hypermethylation of this gene was found in 88% of colonic adenomas and 99% of colonic carcinomas. The level of hypermethylation correlated with patient age, proximal rather than distal colon, tumour invasiveness, and those tumours that were positive for MSI [18].

CpG islands are distinct genetic base signatures found in certain colorectal cancer subpopulations. The CpG island methylator phenotype (CIMP) is characterised by simultaneous methylation of multiple islands. A cohort of 275 stage II and III CRC patients was analysed to find if there was any correlation between the presence of CpG island methylation and other molecular markers in this disease. Concurrent methylation was found to be more prevalent amongst poorly differentiated, right sided, high stage tumours, with fe-

wer *Tp53* mutations when compared to CIMP negative tumours ($p<0.05$). Furthermore, CIMP positive tumours were found to be more common in females who carried at least one allele of the MTHFR polymorphism ($p=0.037$). Although CIMP status had no prognostic value in tumours treated by surgery alone it may yet act as a surrogate marker for response to chemotherapy on account of its association with the other parameters. It is important to note that microsatellite instability and CpG island methylator phenotype appear to be molecular signatures of right sided CRC, which may need to be considered as a separate pathological entity that warrants directed study and subsequent management in its own right [19, 20].

METHYLENE-TETRA-HYDRO-FOLATE REDUCTASE (MTFHR) POLYMORPHISM

The MTFHR enzyme facilitates methylation by catalysing folate intermediates in purine metabolism. A polymorphic variant of this enzyme (TT) appears to produce reduced plasma levels of folate, reduced DNA methylation in white blood cells, and increased risk of CRC. 501 patients with CRC were compared with 1207 healthy control subjects. The MTFHR TT genotype was more frequent in older patients with CRC than age matched controls ($p=0.03$) and was twice as frequent in tumours which exhibited microsatellite instability ($p=0.05$). Further evaluation is being undertaken in order to establish this genetic signature as a diagnostic marker of CRC and prognostic marker of tumour response to therapy, respectively [21].

TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA TYPE II

The transforming growth factor-beta (*TGF-B*) type II receptor

(*RII*) gene may behave like a tumour suppressor gene in CRC. In a cohort of 210 patients with right sided CRC, mutations in *RII* were found to be associated with poor histological differentiation ($p=0.006$) and absence of lymph node invasion ($p=0.04$). There was also a trend for improved survival in addition to the presence of *p53* and *K-ras* mutations (NS). Tumours with *RII* mutations were found in 86% of those that exhibited microsatellite instability, and appear to share similar clinico-pathological features [22].

DPD, TS AND TP

Dihydropyrimidine dehydrogenase is an enzyme, which metabolises pyrimidines, including fluorouracil. Thymidylate synthase and thymidine phosphorylase are other enzymes which contribute to pyrimidine catabolism. It has been found that colorectal tumors that respond to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. High intra-tumoral values of these enzymes predict for tumours, which do not respond to 5-FU [23].

It has also been found that intra-tumoral levels of TS in colorectal cancer metastases predict for response to 5-FU. But in this cohort intra-tumoral levels in the primary lesion did not necessarily correlate with response to chemotherapy, suggesting there may be clonal differentiation of the metastatic lesions [24].

In Stage II CRC low levels of TS have been shown to be associated with lower rates of tumour recurrence and metastases, and improved overall survival. High levels of TP have been found to correlate with tumour T stage, lymph node involvement, tumour

vascularity, and decreased overall survival.

VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR

Vascular endothelial growth factor is essential in angiogenesis and tumour progression. It also plays a role in cell migration, extra-cellular matrix remodelling, and permeability. It has been shown that VEGF levels are higher in patients with colorectal cancer when compared with healthy controls ($p<0.0001$) [25].

In a series of 121 patients with Stage II colon cancer it was found that recurrence was more common in VEGF positive tumours ($p<0.001$) [26].

In Stage II CRC serum levels of VEGF were found to be associated with tumour T stage, lymphovascular invasion, and disease progression. Incidentally, VEGF levels also correlated with TP levels, another poor prognostic marker [27].

Bcl-2

The oncogene bcl-2 product inhibits apoptosis which under normal circumstances would lead to cell death. The expression of the bcl-2 gene product has been found to decrease with differentiation from adenoma to carcinoma, whilst cellular levels of bcl-2 mRNA increase ($p=0.027$). This supports post transcriptional control of the bcl-2 gene product, although does not recognise it as a prognostic tool [28].

It has been shown that patients in whom bcl-2 is over-expressed in primary CRC are more likely to respond to chemotherapy ($p=0.011$). Additionally, those who show a good response to chemotherapy in CRC also exhibit improved survival ($p=0.0013$) [29, 30].

Thus far we have made a number of significant findings regarding molecular markers in CRC. *p53* mutations have been shown to be associated with left sided tumours and less likely to respond to chemotherapy in selected patients, hence a marker of poor outlook. MSI has been shown to be associated with right sided tumours, less frequent lymph node involvement, more prevalent amongst females, with better response to chemotherapy and overall improved survival; a marker of better prognosis. Methylation of CpG islands was found to be correlated with poorly differentiated, right sided, high stage tumours, and fewer *Tp53* mutations but thus far is not clearly a positive or negative prognostic factor. The MTHFR polymorphisms remain to be proven as predictors of survival and are more likely to be markers of toxicity due to chemotherapy. The *TGF-B RII* gene may yet be a marker of positive outcome, but thus far has only been shown to predict the absence of lymph node invasion. Currently we are undertaking further study of markers including *p53*, microsatellite instability, methylation, and the MTHFR polymorphism in CRC as well as other malignancies, including breast cancer.

PIŚMIENNICTWO

1. Soong R, Powell B, Elsaleh H, Gnanasamanthan G, Smith DR, Goh HS, Joseph D, Iacopetta B. *Prognostic significance of *Tp53* gene mutation in 995 cases of colorectal carcinoma. Influence of tumour site, stage, adjuvant chemotherapy and type of mutation.* Eur J Cancer 2000; 36: 2053-60.
2. Elsaleh H, Powell B, Soontrapornchai P, Joseph D, Goria F, Spry N, Iacopetta B. *p53 gene mutation, microsatellite instability and adjuvant chemotherapy: impact on survival of 388 patients with Dukes' C colon carcinoma.* Oncology 2000; 58: 52-9.
3. Elsaleh H, Powell B, McCaul K, Grieu F, Grant R, Joseph D, Iacopetta B. *p53 alteration and microsatellite instability have predictive value for survival benefit from chemotherapy in stage III colorectal carcinoma.* Clin Cancer Res 2001; 7: 1343-9.
4. Elsaleh H, Soontrapornchai P, Grieu F, Joseph D, Iacopetta B. *p53 alterations have no prognostic or predictive significance in Dukes' C rectal carcinomas.* Int J Oncol 1999; 15: 1239-43.
5. Elsaleh H, Robbins P, Joseph D, Powell B, Grieu F, Menso L, Iacopetta B. *Can p53 alterations be used to predict tumour response to pre-operative chemo-radiotherapy in locally advanced rectal cancer?* Radiother Oncol 2000; 56: 239-44.
6. Andreyev HJ, Norman AB, Cunningham D, et al. *K-ras mutations in patients with colorectal cancer: the multi-center RASCAL study.* JNCI 1998; 90: 675-84.
7. Dix BR, Robbins PD, Spagnolo DV, Padovan GL, House AK, Iacopetta BJ. *Clonal analysis of colorectal tumors using K-ras and p53 gene mutations as markers.* Diagn Mol Pathol 1995; 4: 261-5.
8. van Rijnsoever M, Elsaleh H, Iacopetta B. *Microsatellite instability in colorectal cancer: prognostic, predictive or both?* Am J Pathol 2002; 160: 384-5; discussion 385-6.
9. Elsaleh H, Powell B, Soontrapornchai P, Joseph D, Goria F, Spry N, Iacopetta B. *p53 gene mutation, microsatellite instability and adjuvant chemotherapy: impact on survival of 388 patients with Dukes' C colon carcinoma.* Oncology 2000; 58: 52-9.
10. Elsaleh H, Shannon B, Iacopetta B. *Microsatellite instability as a molecular marker for very good survival in colorectal cancer patients receiving adjuvant chemotherapy.* Gastroenterology 2001; 120: 1309-10.
11. Elsaleh H, Powell B, McCaul K, Grieu F, Grant R, Joseph D, Iacopetta B. *p53 alteration and microsatellite instability have predictive value for survival benefit from chemotherapy in stage III colorectal carcinoma.* Clin Cancer Res 2001; 7: 1343-9.
12. Elsaleh H, Joseph D, Grieu F, Zeps N, Spry N, Iacopetta B. *Association of tumour site and sex with survival benefit from adjuvant chemotherapy in colorectal cancer.* Lancet 2000; 355: 1745-50.
13. Duval A, Iacopetta B, Thorstensen L, Meling GI, Lothe RA, Thuille B, Suraweera N, Thomas G, Hamelin R. *Gender difference for mismatch repair deficiency in human colorectal cancer.* Gastroenterology 2001; 121: 1026-7.
14. Elsaleh H, Cserni G, Iacopetta B. *Extent of nodal involvement in Stage III colorectal carcinoma: relationship to clinicopathologic variables and genetic alterations.* Dis Colon Rectum 2002; 45: 1218-22.
15. Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, Redston M, Gallinger S. *Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer.* N Engl J Med 2000; 342: 69-77.
16. Hemminki A, Mecklin JP, Jarvinen H, Aaltonen LA, Joensuu H. *Microsatellite instability is a favorable prognostic indicator in patients with colorectal cancer receiving chemotherapy.* Gastroenterology 2000; 119: 921-8.
17. Shannon BA, Iacopetta BJ. *Methylation of the hMLH1, p16, and MDR1 genes in colorectal carcinoma: associations with clinicopathological features.* Cancer Lett 2001; 167: 91-7.
18. Shannon B, Kay P, House A, Iacopetta B. *Hypermethylation of the MYF-3 gene in colorectal cancers: associations with pathological features and with microsatellite instability.* Int J Cancer 1999; 84: 109-13.
19. Van Rijnsoever M, Grieu F, Elsaleh H, Joseph D, Iacopetta B. *Characterisation of colorectal cancers showing hypermethylation at multiple CpG islands.* Gut 2002; 51: 797-802.
20. Iacopetta B. *Are there two sides to colorectal cancer?* Int J Cancer 2002; 101: 403-8.
21. Shannon B, Gnanasamanthan S, Beilby J, Iacopetta B. *A polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene predisposes to colorectal cancers with microsatellite instability.* Gut 2002; 50: 520-4.
22. Iacopetta BJ, Welch J, Soong R, House AK, Zhou XP, Hamelin R. *Mutation of the transforming growth factor-beta type II receptor gene in right-sided colorectal cancer: relationship to clinicopathological features and genetic alterations.* J Pathol 1998; 184: 390-5.
23. Salonga D, Danenberg KD, Johnson M, Metzger R, Groshen S, Tsao-Wei DD, Lenz HJ, Leichman CG, Leichman L, Diasio RB, Danenberg PV. *Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase.* Clin Cancer Res 2000; 6: 1322-7.
24. Aschele C, Debernardis D, Tunesi G, Maley F, Sobrero A. *Thymidylate synthase protein expression in primary colorectal cancer compared with the corresponding distant metastases and relationship with the clinical response to 5-fluorouracil.* Clin Cancer Res 2000; 6: 4797-802.
25. George ML, Eccles SA, Tutton MG, Abulafi AM, Swift RI. *Correlation of plasma and serum vascular endothelial growth factor levels with platelet count in colorectal cancer: clinical evidence of platelet scavenging?* Clin Cancer Res 2000; 6: 3147-52.
26. Cascinu S, Staccioli MP, Gasparini G, Giordani P, Catalano V, Ghiselli R, Rossi C, Baldelli AM, Graziano F, Saba V, Muretto P, Catalano G. *Expression of vascular endothelial growth factor can predict event-free survival in stage II colon cancer.* Clin Cancer Res 2000; 6: 2803-7.
27. Van Triest B, Pinedo HM, Blaauwgeers JL, et al. *Prognostic role of thymidylate synthase, thymidine phosphorylase, platelet-derived endothelial cell growth factor and proliferation markers in colorectal cancer.* Clin Cancer Res 2000; 6: 1063-72.
28. Berney CR, Downing SR, Yang JL, Russell PJ, Crowe PJ. *Evidence for post-transcriptional down-regulation of the apoptosis-related gene bcl-2 in human colorectal cancer.* J Pathol 2000; 191: 15-20.
29. McKay JA, Lloret C, Murray GI, Johnston PG, Bicknell R, Ahmed FY, Cassidy J, McLeod HL. *Application of the enrichment approach to identify putative markers of response to 5-fluorouracil therapy in advanced colorectal carcinomas.* Int J Oncol 2000; 17: 153-8.
30. Bukholm IK, Nesland JM. *Protein expression of p53, p21 (WAF1/CIP1), bcl-2, Bax, cyclin D1 and pRb in human colon carcinomas.* Virchows Arch 2000; 436: 224-8.

ADRES DO KORESPONDENCJI

Artur Kamiński

Department of Radiation Oncology

Sir Charles Gairdner Hospital

Nedlands

Western Australia, 6009

e-mail: Art.Kaminski@health.wa.gov.au