

Klasyczne badanie patologiczne nowotworów jelita oparte jest o obserwacje kliniczne i histopatologiczne oraz takie czynniki, jak: inwazja komórek nowotworowych do węzłów chłonnych, wielkość guza czy złośliwość. Najważniejszym czynnikiem prognostycznym jest nadal stopień zaawansowania w chwili zdiagnozowania choroby (klasyfikacja TNM). Klasyfikacja taka odzwierciedla fenotyp, a nie biologię nowotworu, dlatego nie jest wystarczająca na potrzeby współczesnej medycyny. Rozwój metod molekularnych umożliwił włączenie do testów oznaczeń genów/białek odpowiedzialnych za cechy mające wpływ na tempo postępu choroby, odpowiedź nowotworu na leczenie chemoterapeutykami czy zdolność do metastazy. Rak jelita grubego jest uważany za chorobę heterogeniczną, do powstania której prowadzi wiele różnych szlaków molekularnych. Mimo tego, bardzo ważne jest opracowywanie modeli nowotworzenia na poziomie molekularnym, które ułatwiają pracę nad poszukiwaniem nowych markerów. Istnieje szereg argumentów, pokazujących, że morfologicznie czy histologicznie identyczne guzy mają różne rokowania oraz różnie odpowiadają na taką samą terapię. Dlatego obecnie tak ważne jest poszukiwanie nowych molekularnych czynników prognostycznych.

Słowa kluczowe: rak jelita, markery molekularne, klasyfikacja, DNA, mutacja, metylacja.

Molekularne modele nowotworzenia w raku jelita i odbytnicy

Molecular models of carcinogenesis in colorectal cancer

Maciej J. Żelazowski, Andrzej K. Bednarek

Zakład Kancerogenezy Molekularnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Genetyczny model kancerogenezy Fearona-Vogelsteina w raku jelita i odbytnicy

Nowotwory jelita grubego i odbytnicy pozostają jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie. W ostatnich latach szacowana roczna liczba nowych przypadków dla całej populacji ludzkiej wyniosła ponad 780 tys. zachorowań. Proces nowotworzenia w raku jelita grubego i odbytnicy (*colorectal cancer* – CRC) był pierwszym tak dobrze scharakteryzowanym modelem molekularnym w historii badań nad nowotworami w ogóle. Fakt, że nowotworzenie przebiega wieloetapowo, znany był już od połowy XX w., jednak dopiero rozwój technik biologii molekularnej w latach 80. ubiegłego wieku pozwolił na zidentyfikowanie zmian molekularnych, które stoją za inicjacją oraz progresją guzów. Pod koniec tamtej dekady E.R. Fearon i B. Vogelstein zauważyli, że CRC stanowi doskonały model ilustrujący wpływ zmian genetycznych na powstawanie nowotworów. Wcześniejsze badania kliniczne i histopatologiczne sugerowały, że znaczna większość, jeśli nie wszystkie, złośliwych guzów (*carcinoma*) jelita grubego i odbytu powstaje z istniejących wcześniej łagodnych guzów (gruczolaków): u chorych można znaleźć guzy w różnym stadium rozwoju, od małych gruczolaków aż po duże guzy metastatyczne. Ponadto, w procesie kancerogenezy w tej chorobie mają znaczenie zarówno czynniki dziedziczne, jak i środowiskowe, co umożliwiło zbadanie dziedzicznych oraz somatycznych zmian genetycznych [1]. Zaproponowany przez nich model wyróżniał się następującymi założeniami, pozostającymi nadal podstawą badań nad nowotworami [1]:

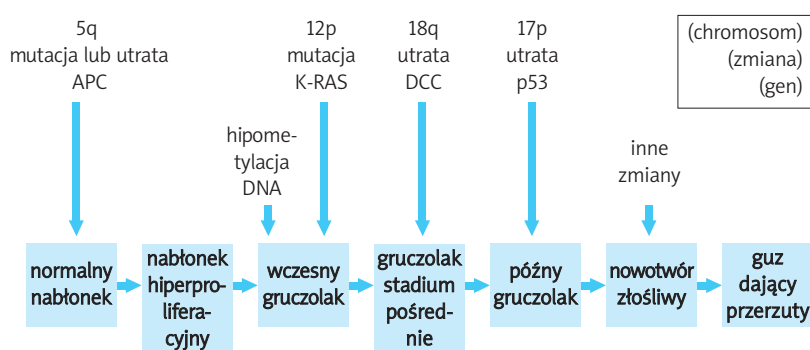
- 1) guzy jelita grubego powstają głównie w wyniku mutacji aktywujących onkogeny oraz inaktywujących geny supresorowe;
- 2) aby rozwinął się nowotwór złośliwy, potrzeba mutacji przynajmniej 4–5 genów; mniejsza liczba zmian wystarcza do powstania guza łagodnego;
- 3) chociaż zmiany genetyczne często zachodzą w pewnej preferowanej kolejności, to za właściwości biologiczne nowotworu odpowiada całkowita liczba oraz typ nabytych zmian, a nie ich kolejność;
- 4) w niektórych przypadkach zmutowane geny supresorowe powodują efekt fenotypowy nawet wtedy, gdy występują w stanie heterozygotycznym (ryc. 1).

Znaczenie mutacji aktywujących onkogeny oraz mutacji inaktywujących geny supresorowe

Jedną z najczęściej występujących zmian genetycznych w guzach jelita grubego są somatyczne mutacje genów z rodziny *RAS* (głównie *KRAS*). Około 50% gruczolakoraków jelita grubego oraz gruczolaków większych niż 1 cm ma mutacje w genach należących do tej rodziny [2]. Z drugiej strony, tego typu mutacje wykryto w zaledwie ok. 10% gruczolaków mniejszych niż 1 cm, niezależnie od tego, czy pochodziły one od pacjentów z wrodzoną predyspozycją, czy też pojawiały się sporadycznie [2]. Na podstawie tej obserwacji autorzy wysnuli wniosek, że aktywujące mutacje genów *RAS* skutkują

Classical pathological examination of colorectal tumours is based on clinical and histological markers, such as: lymphatic invasion of cancer cells, tumour size, or histopathological malignancy grading. The most important prognostic factor is still the stage of tumour development during the diagnosis (TNM classification). However, this classification reflects the phenotype, not the biology of the tumour and is not sufficient in modern medicine. Advances in molecular methods have enabled the introduction of tests estimating the expression of genes/proteins responsible for the rate of tumour progression, biological response to chemotherapy, or ability to metastasise. Colorectal cancer is thought to be a heterogenic disease, which can arise by multiple molecular pathways. Nevertheless, it is very important for new models of molecular carcinogenesis to be formulated, because they facilitate the work of finding new markers. There are numerous arguments showing that morphologically or histologically alike tumours often differ in prognosis or response to the same therapy. That is why the search for new molecular prognostic markers is so important.

Key words: colorectal cancer, molecular markers, classification, DNA, mutation, methylation.



Proces nowotworzenia zachodzi poprzez serię zmian genetycznych w obrębie onkogenów (RAS) oraz genów supresorowych (głównie znajdujących się w regionach 5q, 17p, 18q); trzy fazy rozwoju gruczolaka generalnie można zdefiniować za pomocą zwiększających się rozmiarów, stopnia odróżnicowania i „kosmkowatej” morfologii (1); u pacjentów z FAP mutacja genu APC jest dziedziczna i odpowiada za istnienie nabłonka hiperproliferyjnego (stadium 2. na rycinie); w pierwszych fazach rozwoju guzów sporadycznych region ten również wydaje się być często dotknięty utratami chromosomowymi lub mutacjami (1); hipometylacja występuje już w bardzo małych gruczolakach i może powodować aneuploidię, a co za tym idzie – dalszą utratę alleli genów supresorowych. Mutacje genów z rodziny RAS (głównie KRAS) wydają się powstawać na wczesnym etapie rozwoju gruczolaka, by w wyniku ekspansji klonalnej wytworzyć większy guz. Na rycinie zachowano względny czas pojawiania się opisanych zmian, jednakże autorzy zaznaczają, że nie jest on niezmienny i podkreślają nadrzędną rolę akumulacji nad kolejnością nabywania zmian (1).

Ryc. 1. Genetyczny model nowotworzenia w jelicie grubym i odbytnicy (Fearon-Vogelsteina); wg [1], za pozwoleniem wydawcy

Fig. 1. Genetic model of carcinogenesis in colon and rectum (Fearon-Vogelstein model); from [1], with permission from Elsevier Limited, UK

przejściem z etapu małego guza łagodnego do większego, bardziej inwazyjnego stadium poprzez ekspansję klonalną komórki, w których taka mutacja nastąpiła [1]. Z sytuacją odwrotną mamy do czynienia w przypadku genów supresorowych – w ich przypadku utrata funkcji jest związana najczęściej z utratą jednego z alleli. Jednym z najczęściej traconych fragmentów chromosomów w CRC jest region 17p. Odsetek utraty lub zmiany tego regionu (w wyniku rekombinacji) dochodzi w nowotworach złośliwych do 75%, podczas gdy w zmianach łagodnych od ok. 10–30% [2]. W minimalnym regionie delecji zidentyfikowano gen *P53* (symbol oficjalny: *TP53*), obecnie jeden z najbardziej znanych genów supresorowych, a zmiany opisane powyżej w CRC potwierdzono właściwie dla większości pospolitych nowotworów [1]. W obrębie *P53* zaobserwowano również wiele różnych mutacji punktowych, których wynikiem są substytucje aminokwasowe, a w konsekwencji powstawanie niefunkcyjnych białek [3]. Na tej podstawie wysunięto hipotezę, wg której zmutowany allel *P53* w CRC miałby zapewniać przewagę selekcyjną, prowadząc do progresji nowotworu, nawet w obecności drugiego niezmutowanego allela [1]. Zachodząca później utrata allela dzikiego (*wild-type* – WT) jest najczęściej związana z przejściem ze stadium gruczolaka do nowotworu złośliwego i wzmacnia jeszcze przewagę selekcyjną zapewnioną przez powstanie mutacji [4]. Drugim regionem, najczęściej po 17p przejawiającym utratę przynajmniej jednego z alleli w CRC, jest 18q, w którym utrata jednego z alleli występuje w ponad 70% przypadków CRC i prawie 50% późnych gruczolaków [2]. Fearon i wsp. zidentyfikowali na tym ramieniu gen *DCC* (*deleted in colorectal carcinoma*) leżący dokładnie w regionie 18q21.3 [5]. Co ciekawe, białko kodowane przez ten gen wykazuje znaczącą homologię do rodziny białek adhezyjnych, a ostatnie badania zdają się potwierdzać taką jego funkcję: komórki linii raka jelita HT-29 transfekowane *DCC* wykazywały zwiększoną adhezję do podłoża [6]. Trzecim pod względem częstości utraty alleli w CRC genem jest *APC* (*adenomatous polyposis coli*). Normalne białko APC odpowiada za działanie antagonistyczne względem szlaku sygnałowego Wnt. Dziedziczne mutacje w obrębie *APC* powodują rodzinną polipowatość gruczolakowatą jelita (*familial adenomatous polyposis* – FAP) objawiającą się powstawaniem setek gruczolaków w obrębie jelita grubego. Gen ten znaj-

duje się w regionie 5q21-q22, a częstość utraty allelu w obrębie tego ramienia wynosi odpowiednio: do 50% w złośliwych guzach jelita grubego, ok. 30% w sporadycznych gruczolakach jelita, natomiast w gruczolakach powstających u chorych z rodzinną polipowatością gruczolakowatą jelita utrata któregoś z alleli w tym regionie jest niezwykle rzadka [2].

Powstawanie fenotypu złośliwego poprzez nabycie kilku mutacji

Badania częstości występowania utraty alleli w CRC pozwoliły na stwierdzenie, że oprócz wspomnianych wcześniej zmian w obrębie ramion 5q, 17p i 18q, występuje również szereg o wiele rzadszych aberracji, głównie delecji w obrębie: 1q, 4p, 6p, 6q, 8p, 9q oraz 22q. Częstość utraty allelicznej w tych regionach wynosiła od ~25% do ~50% [7]. Średnia liczba utrat przypadających na jeden guz wynosiła 4–5 [7]. Grupa pacjentów, u których w guzach wykryto większą liczbę zmian w obrębie chromosomów, miała gorsze rokowanie niż pozostali pacjenci, chociaż wielkość i stopień klinicznego zaawansowania były w obu grupach bardzo podobne [7]. Tak złożony układ zmian w genomie odzwierciedla dwa procesy: po pierwsze – niektóre regiony chromosomów – czy wręcz geny, które ulegają delecji lub innej formie inaktywacji (mutacje, metylacja) – wydają się zawierać geny supresorowe, będące „celami” takich niekorzystnych zmian. Po drugie – wiele delecji w innych regionach, zachodzących w bardziej zróżnicowany sposób, może powstawać po części w sposób „przypadkowy”, jako efekt wcześniejszych zmian i nie mieć specjalnego wpływu na fenotyp komórki (choć nie jest wykluczone, że w miejscach tych mogą występować jakies geny supresorowe, a ich utrata może pogłębiać zmiany w fenotypie nowotworowym komórki) [1].

Nadrzędna rola akumulacji zmian genetycznych nad kolejnością ich powstawania

Model Fearona i Vogelsteina powstał dzięki obserwacjom histopatologicznym i klinicznym, pokazującym, że większość złośliwych guzów w jelicie grubym powstaje z wcześniej istniejących gruczolaków, które stopniowo zwiększają swoje rozmiary i stopień inwazyjności [1]. Progresja nowotworu zachodzi w sposób ciągły, jednak autorzy w celu utrzymania prostoty modelu, nadali mu formę etapową (ryc. 1.). Dwa ostatnie etapy są na tyle skomplikowane, że podkreśla się przyjęte duże uproszczenia. Proces nabywania kolejnych zmian genetycznych trwa zwykle w dekadach. Potwierdzają to badania zapadalności na nowotwory w zależności od wieku, pokazujące, że tempo rozwoju guzów jest proporcjonalne do 4.–6. potęgi czasu, który upłynął, co z kolei sugeruje potrzebę zajścia 4–6 niezależnych zdarzeń (nabycia odpowiednich zmian w genomie). Zmiany te zwykle zachodzą w specyficznych fazach w czasie progresji nowotworu, jednak można przytoczyć przynajmniej dwa argumenty wskazujące na to, że większe znaczenie ma postępująca akumulacja zmian, a nie ich wzajemny porządek. Po pierwsze – wszystkie opisane powyżej zmiany genomu obserwowano we wszystkich stadiach guzów [1]. Po drugie – w kilku przypadkach, w których możliwe było zbadanie

różnych stadiów rozwoju nowotworu w tym samym guzie, wykazano dzięki obecności tych samych mutacji, że część rakowata powstała z części łagodnej oraz że komórki w części rakowatej zawierały przynajmniej jedną zmianę genetyczną więcej [1]. Niemniej jednak model nabywania kolejnych zmian genetycznych w rozwoju CRC, przedstawiony na rycinie 1., z nielicznymi wyjątkami pozostaje w zgodzie ze zmianami znajdowanymi w poszczególnych stadiach.

Geny supresorowe a recesywne modele ich działania

W klasycznej teorii „podwójnego uderzenia” Knudsona [8] autor ten założył, że geny supresorowe nowotworów działają w sposób recesywny, tzn. zarówno allel matczyzny, jak i ojcowski muszą zostać inaktywowane, aby nastąpiło całkowite usunięcie funkcji supresyjnej [8]. Model ten został potwierdzony przez wiele obserwacji, głównie na przykładzie badań genu *RB* – retinoblastomy [9], jednak w ciągu kolejnych lat pojawiły się prace, sugerujące zrewidowanie modelu Knudsona. Powszechnie uważano, że zespoły genetyczne wywołujące predyspozycje do powstania nowotworów powstają na skutek dziedzicznej inaktywacji jednego z alleli genu supresorowego (unikalnego dla każdego z syndromów). Gdyby zarówno to założenie, jak i hipoteza recesywnego działania genów supresorowych były w pełni prawdziwe, guzy rozwijające się u pacjentów z takimi zespołami genetycznej predyspozycji powinny mieć inaktywowany drugi allel typu dzikiego w *locus* właściwego dla tej choroby genu supresorowego. Sytuacja taka występuje w dziedzicznych formach retinoblastomy i niektórych innych rodzajach dziedzicznych zespołów nowotworów, jednak badania nad guzami pochodzącymi od osób dotkniętych FAP zwykle nie wykazywały utraty regionu związanego z tą chorobą [2]. W guzach sporadycznych model recesywnego zachowania genów supresorowych przewiduje, że muszą zajść przynajmniej dwie zmiany genetyczne, aby powstał zauważalny efekt fenotypowy: w wyniku każdego z tych zdarzeń następuje inaktywacja jednego allelu genu supresorowego (np. poprzez mutację punktową, rekombinację mitotyczną lub utratę jakiejś części chromosomu). Jednak taki scenariusz narzuca jedną poważną sprzeczność w modelu recesywnego charakteru zachowania genów supresorowych w nowotworach sporadycznych, a mianowicie implikuje on powstanie efektu pozytywnej presji selekcyjnej już po nabyciu pierwszej, choćby najmniejszej, zmiany genetycznej, w tym przypadku – inaktywacji pierwszego z alleli [1]. Gdyby mutacja pierwszego z alleli nie dawała jakiegokolwiek przewagi selekcyjnej, prawdopodobieństwo powstania liczby komórek wystarczającej do zajścia drugiej mutacji byłoby niezwykle małe [1]. Doskonale widać ten problem na przykładzie mutacji w obrębie *P53*: już wczesne badania pokazały, że zmutowany mysz *p53*, wprowadzony do mających normalną wersję tego genu (*p53* WT) pierwotnych komórek szczurzych wraz z genem *ras* jest w stanie nadać tym komórkom właściwości nowotworowe, pomimo ekspresji dzikiego *p53* w tych komórkach [10]. Z tego powodu przyjęto założenie, że na poziomie komórkowym mutacje w *P53* mogą funkcjonować w sposób negatywnie dominujący, a nie recesywny [1]. Efekt taki można wytłumaczyć częściowo przez oligomeryzację białek powstałych ze zmutowanego

allele z białkami prawidłowymi, powodującą inaktywację produktu allele WT. Obserwacje te uprawdopodobniły hipotezę o zapewnianiu komórkom nowotworów selektywnej przewagi wzrostowej przez mutację w *P53*, nawet przy jednoczesnej obecności allele dzikiego. Następująca w dalszym etapie utrata allele WT jest bowiem często związana z progresją od gruczolaka do guza złośliwego, a także ze wzmocnieniem efektu selektywnej przewagi wzrostowej, zapewnionej przez mutację *P53*. Kolejnym dowodem przemawiającym za takim modelem jest obserwacja guzów, będących etapem pośrednim pomiędzy jeszcze łagodnym gruczolakiem a złośliwym fenotypem gruczolakoraka: pierwszy z opisanych guzów tego typu zawierał jeden zmutowany allel *P53* oraz jeden allel WT, które ulegały ekspresji, dając mRNA na mniej więcej jednakowym poziomie [4]. Mutacja *P53* była obecna we wszystkich komórkach guza, przypuszczalnie jako efekt ekspansji klonalnej komórki, w której mutacja ta się pojawiła. Fearon i Vogelstein postawili na tej podstawie hipotezę mówiącą o tym, że gdyby tego guza nie usuwano, najprawdopodobniej w jednej z komórek zaszłaby utrata allele dzikiego *P53* i w wyniku ekspansji klonalnej tej komórki cały guz składałby się wyłącznie z takiego rodzaju komórek [1]. Ponadto, utrata allele dzikiego spowodowałaby progresję nowotworu, ponieważ guzy jelita, w których stwierdza się utratę w obrębie regionu 17p, są bardziej agresywne od takich, w których nie ma zmian w tym obszarze [11].

Implikacje modelu Fearona-Vogelsteina

Genetyczny model rozwoju guzów w jelicie grubym, chociaż bardzo uproszczony, zapewnił jednak swego rodzaju „plan działania” w badaniu tej choroby. Pozwolił on na wyznaczenie konkretnych etapów postępowania podczas planowania badań nad tą – tak złożoną – chorobą oraz na podjęcie prób znalezienia markerów molekularnych wczesnych etapów nowotworzenia w jelicie, np. badanie tzw. markerów złuszczeniowych, czyli poszukiwanie markerów dla kolonocytów uwalnianych z zewnętrznych warstw rozwijającego się nowotworu w próbkach kału: mutacje *KRAS* [12], *P53* [13] czy *APC* oraz marker niestabilności mikrosatelitarnej *Bat-26* [14]. Sama koncepcja przetrwała jako liniowy model fundamentalnych zasad kierujących procesem nowotworzenia w jelicie grubym. Obecnie oczywiste jest, że istnieje wiele szlaków prowadzących do powstania nowotworu w tym narządzie. Okazało się bowiem, że tylko ok. 10% nowotworów jelita ma mutacje w trzech „klasycznych” genach modelu Fearona-Vogelsteina: *APC*, *KRAS* i *P53* [15]. Dlatego powstały kolejne wersje ogólnych modeli kancerogenezy: jedną z najczęściej cytowanych prac podsumowujących aktualny stan wiedzy w tej dziedzinie jest praca Hanahana i Weinberga [16]. Wyróżnili w niej sześć kategorii funkcjonalnych zmian w metabolizmie lub fizjologii komórek, które muszą zostać nabyte, aby dać w pełni złośliwy fenotyp; są to [16]:

- 1) samowystarczalność względem sygnałów wzrostowych (np. aktywacja onkogenów *RAS*),
- 2) utrata wrażliwości na sygnały inhibujące wzrost (np. utrata aktywności przez gen supresorowy *RB*),
- 3) zdolność do unikania apoptozy (np. produkcja autokrynowa czynnika wzrostowego IGF),

- 4) nieograniczony potencjał wzrostowy (np. aktywacja telomerazy),
- 5) zdolność do angiogenezy (np. produkcja VEGF),
- 6) zdolność do inwazji tkanek i metastazy (np. inaktywacja E-kadheryny).

Warto dodać, że w obydwu modelach podkreśla się różnorodność oraz zmienność szlaków prowadzących do uzyskania potencjału złośliwego. W obu pracach uwydatnia się brak istnienia charakterystycznego wzorca zmian genetycznych choćby dla jednego typu czy podtypu nowotworu, nawet na określonych etapach rozwoju choroby.

Czynniki molekularne w diagnostyce raka jelita i odbytnicy

Z przytoczonych powyżej przykładów wynika, że CRC powinien być uważany za chorobę heterogeniczną, do powstania której prowadzą różne zmiany genetyczne. Skutkuje to istnieniem podtypów molekularnych, różnie odpowiadających na taką samą terapię oraz mających różne rokowania. Z tego powodu intensyfikuje się poszukiwania nowych i jak najlepszych molekularnych czynników prognostycznych. Badanie korelacji pomiędzy zmianami molekularnymi a cechami kliniczno-patologicznymi odzwierciedla ewolucję choroby [17]. Od dobrej oceny patologicznej i trafnej kwalifikacji choroby zależy efektywna opieka nad chorym oraz umożliwienie przeprowadzenia skutecznych badań nad mechanizmami powstawania choroby. Od momentu powstania modelu Fearona-Vogelsteina [1] zaczęto badać CRC w sposób zdeterminowany przez ten model. Wkrótce jednak okazało się, że nie da się wytłumaczyć, jak możliwe jest zakumulowanie w jednej komórce wszystkich zmian genetycznych opisanych przez Fearona i Vogelsteina (niosących ze sobą przewagę selekcyjną) w normalnym czasie jej życia. Zaczęto poszukiwać tego dodatkowego „nieklasycznego” czynnika, którym okazała się niestabilność genetyczna. Powodowała ona nie tylko utratę mechanizmów krytycznych dla utrzymania wierności DNA podczas podziału komórki, ale i na usunięcie mechanizmów zapożyczających apoptozę [17]. Najlepszą ilustracją konieczności istnienia takiego dodatkowego czynnika w postaci niestabilności genetycznej jest FAP. Choć do inicjacji powstawania setek tysięcy polipów wystarczy wyłącznie funkcjonalna inaktywacja genu *APC*, to jednak ogromna większość z nich będzie po prostu rosta przez kilka dekad, nie czyniąc żadnej poważnej szkody organizmowi chorego. Patrząc na tę sytuację w kontekście sporadycznego CRC, pojedyncze polipy (gruczolaki) wydają się mieć znacznie większą względną częstość przekształcenia w nowotwór złośliwy [17]. Sama idea posiadania przez identycznie wyglądające zmiany nowotworowe istotnych różnic biologicznych wzięta swój początek od kolejnego z genetycznych zespołów raka jelita – dziedzicznego niepolipowatego raka jelita grubego (*hereditary non-polyposis colorectal cancer* – HNPCC). W chorobie tej – odwrotnie niż w FAP – większość powstających polipów względnie szybko rozwinię się w formy złośliwe, jeśli nie podejmie się ich leczenia. Większość gruczolaków u chorych z HNPCC wykazuje utratę ekspresji białek MSH2 lub MLH1 (odpowiadających za naprawę błędnie sparowanych

zasad DNA) oraz przejawia jedną z form niestabilności genetycznej, charakteryzującą się akumulacją wielu mutacji, przede wszystkim w sekwencjach powtarzających się DNA [18]. Sekwencje te najczęściej występują w niekodujących regionach mikrosatelitarnych, stąd też wzięta się nazwa dla tego zjawiska – niestabilność mikrosatelitarna.

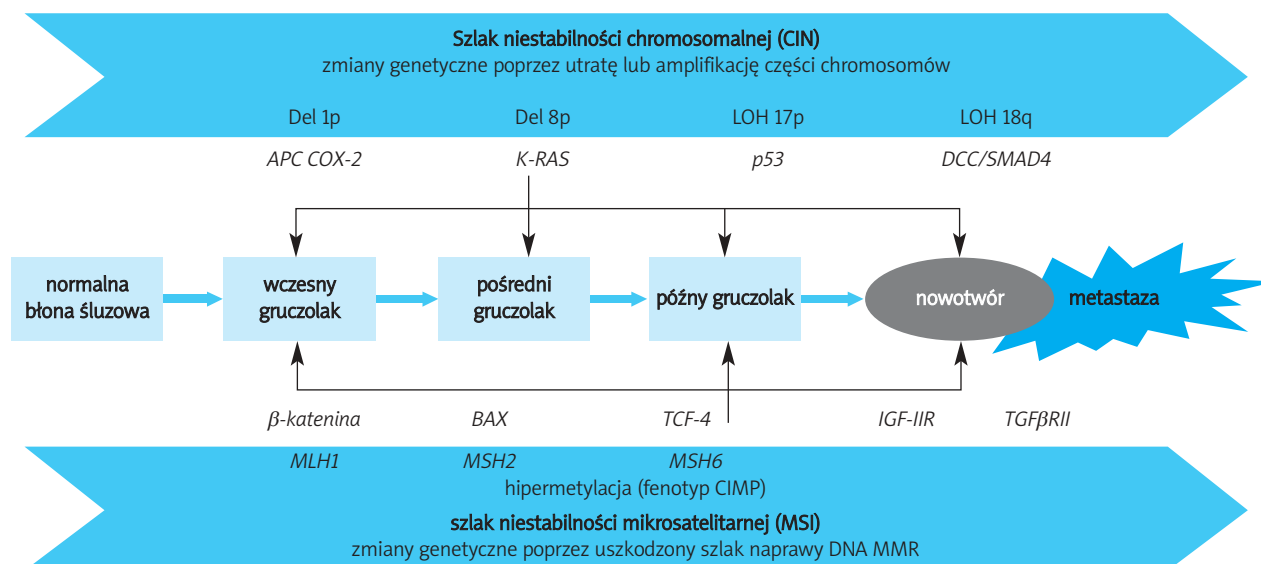
Niestabilność mikrosatelitarna

Zjawisko to (*microsatellite instability* – MSI) po raz pierwszy zostało opisane właśnie w CRC [19]. Po pierwotnej inaktywacji któregoś z genów szlaku MMR możliwe jest wykrycie mutacji w formie MSI występującej z wysoką częstością w całym genomie, co nazywa się wysoką niestabilnością mikrosatelitarną (*MSI-high* – MSI-H). Krótkie sekwencje powtarzające się występują również w regionach kodujących niektórych genów supresorowych, takich jak np. *TGF-βRII* czy *BAX*, tak więc w guzach o fenotypie „MSI-H” geny te mogą być mutowane i inaktywowane [20]. Generalnie nowotwory jelita o fenotypie „MSI-H” są dipoidalne, z niewielkimi utratami lub duplikacjami. Należy więc podkreślić rozróżnienie zachodzenia niestabilności genetycznej na dwóch poziomach: mikrosatelitarnej (MSI-H), bardziej subtelnej, dotyczącej sekwencji DNA oraz chromosomowej (*chromosomal instability* – CIN), dotyczącej całych chromosomów lub przynajmniej ich ramion. Obie formy niestabilności genetycznej wzajemnie się wykluczają, dlatego guzy z fenotypem CIN będą jednocześnie należały do fenotypu MSS (*microsatellite stable*). Związki pomiędzy fenotypem MSI oraz CIN a nowotworzeniem przedstawiono na

rycinie 2. Jednocześnie, pomimo istnienia tej przeciwstawności, wykazano, że model Fearona i Vogelsteina zakładający progresję wszystkich typów nowotworów jelita poprzez sekwencję podobnych zdarzeń jest do pewnego stopnia trafny – znaleziono przypadki pacjentów oraz rakowych linii komórkowych MSI-H, w których *APC*, *KRAS* i *TP53* były zmutowane [21, 22].

Fenotyp metylatora wysp CpG (CIMP)

Po oddzieleniu opisanego powyżej fenotypu MSI-H pozostaje duża grupa pacjentów z fenotypem MSS, licząca ok. 85% wszystkich przypadków CRC [17]. Zawiera ona tylko ok. 10% przypadków charakteryzujących się „klasycznym” zestawem mutacji *APC*, *KRAS* i *TP53* [17]. Z pozostałej części przypadków można wydzielić liczną grupę charakteryzującą się silną metylacją DNA – stąd nazwa „metylator wysp CpG” (*CpG island methylator phenotype* – CIMP). W nowotworach tych zwykle stwierdzano również mutację genu *BRAF* (wpływającego na podziały komórkowe, różnicowanie oraz wydzielanie) oraz stabilność na poziomie chromosomowym. Co ciekawe, guzy o fenotypie MSI-H, ale będące równocześnie „CIMP-high” wykazywały bardzo podobne cechy kliniczne i patologiczne: występowanie z większą częstością u kobiet, późniejszy wiek prezentacji, mniejszy stopień zróżnicowania (wyższy grading), postać śluzotwórczą, okrągłe i pęcherzykowate jądro komórkowe z wyraźnym jąderkiem [23]. Z drugiej strony znaleziono pomiędzy tymi dwiema grupami różnice podkreślające konieczność rozpatrywania pacjentów pod kątem niestabilności satelitarnej: guzy MSI-H/CIMP-H w porównaniu z guzami MSS/CIMP-H są częściej wykrywa-



APC – adenomatous polyposis coli; *BAX* – Bcl-2-associated X protein; *CIMP* – fenotyp metylatora wysp CpG; *COX* – cykloksygenaza; *DCC* – deleted in colorectal cancer; *IGF-IIR* – receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu II; *LOH* – utrata heterozygotyczności; *MLH* – homolog MutL; *MSH* – homolog MutB; *Smad* – mothers against decapentaplegic homologue (*Drosophila*); *TCF* – T cell factor, *TGF-βR* – receptor transformującego czynnika wzrostu β

Ryc. 2. Niestabilność genetyczna w CRC; sekwencja „gruczolak–nowotwór złośliwy” rozwija się na tle różnych typów niestabilności genetycznej, w tym epigenetycznego wyciszenia genów; wg [39]; za pozwoleniem wydawcy

Fig. 2. Genetic instability in CRC; the “adenoma-carcinoma” sequence develops on the background of different types of genetic instability, including epigenetic silencing of genes. From [39], with permission from Elsevier Limited, UK

ne dopiero w zaawansowanym stadium [23], komórki nowotworowe tracą łączność podczas wzrostu [24], brak limfocytów infiltrujących guz [25], mają gorsze rokowanie [26], ale dobrze odpowiadają na terapię adiuwantową za pomocą 5-fluorouracylu (5-FU) [26]. Dokładne mechanizmy odpowiedzialne za powstanie fenotypu CIMP-H nie są do końca poznane, ale zauważono pewne cechy wspólne pacjentów z tym fenotypem, sugerujące genetyczne podłoże dla CIMP. Oprócz częstego występowania u tych pacjentów mutacji *BRAF*, częściej występuje u nich rodzinna historia CRC. Ponadto, zaobserwowano silną metylację DNA w normalnej śluzówce pacjentów z polipami hiperplastycznymi [27]. U niektórych pacjentów z polipami hiperplastycznymi dochodzi do powstania kilku nowotworów, mogących mieć każdy z fenotypów MMS, MSI-Low czy MSI-H [28]. Możliwe jest więc, że zespół hiperplastycznych polipów jest dziedziczony jako choroba recesywna autosomalna, związana z wieloma polipami i guzami złośliwymi [17]. Pacjenci z jednym allelem zmienionego genu mogą rozwinąć kilka polipów, a tym samym może u nich występować zwiększone ryzyko rozwinęcia nowotworu CIMP-H [17]. Wczesne etapy nowotworów CIMP-H wydają się takie same, niezależnie od ich statusu MSI – genetyczne czynniki modyfikujące mogą następnie wpłynąć na prawdopodobieństwo metylacji i inaktywacji genów, takich jak *MLH1* czy *MGMT* (enzym odpowiedzialny za naprawę DNA po ekspozycji na karcynogeny alkilujące), co w efekcie zdecyduje o przejściu nowotworu na szlak dający fenotyp MSS, MSI-L czy MSI-H [27]. Nowotwory CIMP-H

lub z mutacją *BRAF* mogą mieć wspólne podłoże genetyczne oraz czynniki ogólnoustrojowe, czego dobrą ilustracją jest fakt ich częstszego występowania u kobiet. Dodatkowo niektóre czynniki środowiskowe wydają się mieć wpływ na patogenezę tego typu nowotworów. Wzrost ryzyka zapadnięcia na CRC związany z paleniem tytoniu w dużym stopniu da się wytłumaczyć przez posiadanie mutacji *BRAF* i/lub fenotyp CIMP-H [29]. Palenie jest również związane z polipami hiperplastycznymi, co może sugerować, że zwiększone ryzyko uwarunkowane jest przez najwcześniejsze etapy rozwoju choroby [30].

Molekularna klasyfikacja nowotworów jelita grubego według Jassa

Ze względu na cechy przedstawione powyżej, czyli typ niestabilności (lub jej brak) oraz obecność/brak metylacji DNA, nowotwory jelita grubego można zasadniczo podzielić wg Jassa [17] na pięć grup:

- 1) „sporadyczne MSI-H” – MSI-H, CIMP-H, metylacja *MLH1*, mutacja *BRAF*, stabilne na poziomie chromosomalnym, rozwijają się z polipów ząbkowanych (*serrated polyps*);
- 2) MSS lub MSI-L, CIMP-H, częściowa metylacja *MLH1*, mutacja *BRAF*, stabilne na poziomie chromosomalnym, rozwijają się z polipów ząbkowanych;
- 3) MSS lub MSI-L, CIMP-L, metylacja *MGMT*, mutacja *KRAS*, niestabilne na poziomie chromosomalnym, rozwijają się z gruczolaków lub polipów ząbkowanych;

A			B		
	CIMP-H	CIMP-L	CIMP-H	CIMP-L	CIMP-O
MSI-H	1 (12%) • metylacja <i>MLH1</i> • mutacja <i>BRAF</i> • rozwijają się z polipów ząbkowanych				5 (3%) • związane z zespołem Lyncha • CIMP negatywne • stabilne chromosomalnie • niezmutowane <i>BRAF</i>
MSI-L	2 (8%) • częściowa metylacja <i>MLH1</i> • mutacja <i>BRAF</i> • stabilne na poziomie chromosomalnym • rozwijają się z polipów ząbkowanych	3 (20%) • metylacja <i>MGMT</i> • mutacja <i>KRAS</i> • niestabilne na poziomie chromosomalnym • rozwijają się z gruczolaków lub polipów ząbkowanych	3 (5–10%) • mutacja <i>BRAF</i> • niezmutowane <i>TP53</i> • stabilne chromosomalnie • słabo zróżnicowane komórki typu sygnetowego • zwykle złe rokowanie • częściej u kobiet • lokalizacja głównie w prawej części jelita	4 (5%) • metylacja <i>MGMT</i> • mutacja <i>KRAS</i> 5 (30–35%) • mutacja <i>KRAS</i> • stabilne chromosomalnie • głównie u mężczyzn	6 (40%) • niestabilne na poziomie chromosomalnym (CIN) • brak mutacji w <i>KRAS</i> i <i>BRAF</i> • głównie w dalszych odcinkach jelita • brak skłonności do częstszego występowania u którejś z płci
MSS					

Ryc. 3. Schematyczne porównanie podziałów nowotworów jelita grubego wg Jassa [17] oraz Ogino i Goela [31] (pola powierzchni zajmowane przez poszczególne grupy nie odzwierciedlają ich wartości procentowej); grupa 1 („sporadyczne MSI-H”), grupa 2 wg Jassa/3 wg Ogino-Goela (O-G) są grupami, co do których nie ma wątpliwości; grupa 5. Jassa zawiera przypadki wyłącznie z zespołem Lyncha, podczas gdy 2 wg O-G zawiera oprócz tego zespołu także pacjentów z FAP oraz sporadyczne; wydzielenie przez O-G grup 4–6. nie zostało dotychczas potwierdzone przez różnice w przeżyciu pacjentów [31]

Fig. 3. Schematic comparison of the divisions of CRC made by Jass [17] and Ogino and Goel [31]: Group 1 (“sporadic MSI-H”), and group 2 according to Jass/3 by Ogino-Goel (O-G) are groups for which there is no doubt; Jass' group 5 includes only cases of Lynch syndrome, while group 2 by O-G also includes patients with FAP and sporadic CRC, in addition to Lynch syndrome patients; separation of O-G groups 4 to 6 has not yet been confirmed by differences in survival of patients [31]. (The area occupied by each group in the figure does not reflect its percentage.)

4) CIMP negatywne, CIN, głównie MSS, powstają z gruczolaków (sporadycznych oraz związanych z zespołami dziedzicznymi: FAP oraz MUTYH);

5) „rodzinne MSI-H” – związane z zespołem Lyncha, CIMP negatywne, brak mutacji w *BRAF*, stabilne chromosomalnie, MSI-H, powstają z gruczolaków.

Oprócz ww. cech molekularnych grupy wydzielone przez Jassa charakteryzują się oczywiście odmiennym profilem cech morfologicznych i klinicznych [17], wśród których znajdują się: rodzaj zmiany prekursorowej, stopień zróżnicowania czy zdolność do tzw. „pączkowania” guza. Modyfikacje do klasyfikacji Jassa wprowadzili Ogino i Goel [31]. Zaproponowali oni aktualizację wg wyników nowych badań i nieco inaczej przeprowadzili podział pomiędzy grupami wydzielonymi również na podstawie statusu MSI oraz CIMP. Teoretyczna liczba możliwych do utworzenia na tej podstawie grup wynosi 9 (3 typy MSI × 3 typy CIMP), jednak autorzy – podobnie do Jassa – zauważają, że analiza fenotypu oraz właściwości kliniczno-patologicznych uzasadnia istnienie co najwyżej sześciu oddzielnych grup [31]; porównanie obu podziałów znajduje się na rycinie 3.; w nawiasach podano częstość występowania wg [32] oraz [33].

Klasyfikacja nowotworów CRC oparta na statusie MSI/CIMP/CIN jest koncepcją stosunkowo młodą, dlatego mało jest w piśmiennictwie prac dotyczących jej wartości prognostycznej oraz predykcyjnej. Przeprowadzone dotychczas badania wpływu statusu MSI na długość przeżycia pacjentów wskazują na pozytywną korelację MSI z OS w porównaniu z pacjentami z CIN [34]. Z drugiej strony istnieją prace, których wyniki są na tyle niejednoznaczne, że komplikują ocenę przydatności tego markera do prognozowania [35]. Dlatego żadne z towarzystw naukowych nie zaleciło do tej pory rutynowego stosowania oceny MSI dla sporadycznego CRC. Podobnie z zastosowaniem statusu MSI w przewidywaniu odpowiedzi na chemioterapię, głównie 5-FU: nieliczne publikacje pokazują, że pacjenci z guzami MSI-H nie wykazywali tak dobrej odpowiedzi na leczenie 5-FU, jak pacjenci MSS lub MSI-L (brak poprawy OS) [36]. Kwestionuje się to jednak w kilku kolejnych publikacjach (m.in. [37]). Badania *in vitro* wykazały, że linie komórkowe raka jelita mające fenotyp MSI-H faktycznie są bardziej odporne na 5-FU – składniki systemu naprawiającego błędnie sparowane zasady w DNA (MMR) wiążą 5-FU i włączają go do DNA, co indukuje apoptozę. W komórkach MSI-H zjawisko to nie zachodzi, ponieważ mają one defekty tego szlaku [38].

Piśmiennictwo

1. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-67.
2. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319: 525-2.
3. Young KH, Leroy K, Møller MB, et al. Structural profiles of TP53 gene mutations predict clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma: an international collaborative study. *Blood* 2008; 112: 3088-98.
4. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 1989; 342: 705-8.
5. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, et al. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 1990; 247: 49-56.
6. Martin M, Simon-Assmann P, Kedinger M, Martin M, Mangeat P, Real FX, Fabre M. DCC regulates cell adhesion in human colon cancer derived HT-29 cells and associates with ezrin. *Eur J Cell Biol* 2006; 85: 769-83.
7. Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y, White R. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 1989; 244: 207-11.
8. Knudson AG, Jr. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res* 1985; 45: 1437-43.
9. Weinberg RA. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res* 1989; 49: 3713-21.
10. Jenkins JR, Rudge K, Currie GA. Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature* 1984; 312: 651-4.
11. Kern SE, Fearon ER, Tersmette KW, et al. Clinical and pathological associations with allelic loss in colorectal carcinoma [corrected]. *JAMA* 1989; 261: 3099-103.
12. Doolittle BR, Emanuel J, Tuttle C, Costa J. Detection of the mutated K-Ras biomarker in colorectal carcinoma. *Exp Mol Pathol* 2001; 70: 289-301.
13. Eguchi S, Kohara N, Komuta K, Kanematsu T. Mutations of the p53 gene in the stool of patients with resectable colorectal cancer. *Cancer* 1996; 77 (8 Suppl): 1707-10.
14. Ahlquist DA, Skoletsky JE, Boynton KA, Harrington JJ, Mahoney DW, Pierce WE, Thibodeau SN, Shuber AP. Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: feasibility of a multi-target assay panel. *Gastroenterology* 2000; 119: 1219-27.
15. Samowitz WS, Slattery ML, Sweeney C, Herrick J, Wolff RK, Albertsen H. APC mutations and other genetic and epigenetic changes in colon cancer. *Mol Cancer Res* 2007; 5: 165-70.
16. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
17. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007; 50: 113-0.
18. Iino H, Simms L, Young J, et al. DNA microsatellite instability and mismatch repair protein loss in adenomas presenting in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut* 2000; 47: 37-42.
19. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260: 816-9.
20. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, Perucho M. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 1997; 275: 967-9.
21. Tomlinson I, Ilyas M, Johnson V, Davies A, Clark G, Talbot I, Bodmer W. A comparison of the genetic pathways involved in the pathogenesis of three types of colorectal cancer. *J Pathol* 1998; 184: 148-52.
22. Losi L, Ponz dL, Jiricny J, et al. K-ras and p53 mutations in hereditary non-polyposis colorectal cancers. *Int J Cancer* 1997; 20;74: 94-6.
23. Samowitz WS, Albertsen H, Herrick J, Levin TR, Sweeney C, Murtaugh MA, Wolff RK, Slattery ML. Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology* 2005; 129: 837-45.
24. Chiriac LR, Shen L, Catalano PJ, Issa JP, Hamilton SR. Phenotype of microsatellite-stable colorectal carcinomas with CpG island methylation. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 429-36.
25. Hawkins N, Norrie M, Cheong K, Mokany E, Ku SL, Meagher A, O'Connor T, Ward R. CpG island methylation in sporadic colorectal cancers and its relationship to microsatellite instability. *Gastroenterology* 2002; 122: 1376-87.
26. Van Rijnsoever M, Elsaleh H, Joseph D, McCaul K, Iacopetta B. CpG island methylator phenotype is an independent predictor of survival benefit from 5-fluorouracil in stage III colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2898-2903.
27. Minoo P, Baker K, Goswami R, et al. Extensive DNA methylation in normal colorectal mucosa in hyperplastic polyposis. *Gut* 2006; 55: 1467-74.
28. Jass JR, Iino H, Ruszkiewicz A, et al. Neoplastic progression occurs through mutator pathways in hyperplastic polyposis of the colorectum. *Gut* 2000; 47: 43-9.
29. Samowitz WS, Albertsen H, Sweeney C, Herrick J, Caan BJ, Anderson KE, Wolff RK, Slattery ML. Association of smoking, CpG island

- methylator phenotype, and V600E BRAF mutations in colon cancer. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 1731-8.
30. Morimoto LM, Newcomb PA, Ulrich CM, Bostick RM, Lais CJ, Potter JD. Risk factors for hyperplastic and adenomatous polyps: evidence for malignant potential? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11 (10 Pt 1): 1012-8.
 31. Ogino S, Goel A. Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J Mol Diagn* 2008; 10: 13-27.
 32. Ogino S, Kawasaki T, Kirkner GJ, Kraft P, Loda M, Fuchs CS. Evaluation of markers for CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer by a large population-based sample. *J Mol Diagn* 2007; 9: 305-14.
 33. Ogino S, Kawasaki T, Kirkner GJ, Suemoto Y, Meyerhardt JA, Fuchs CS. Molecular correlates with MGMT promoter methylation and silencing support CpG island methylator phenotype-low (CIMP-low) in colorectal cancer. *Gut* 2007; 56: 1564-71.
 34. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2005; 23: 609-18.
 35. Kim GP, Colangelo LH, Wieand HS, Paik S, Kirsch IR, Wolmark N, Allegra CJ; National Cancer Institute. Prognostic and predictive roles of high-degree microsatellite instability in colon cancer: a National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Collaborative Study. *J Clin Oncol* 2007; 25: 767-72.
 36. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003; 349: 247-57.
 37. Wright CM, Dent OF, Newland RC, et al. Low level microsatellite instability may be associated with reduced cancer specific survival in sporadic stage C colorectal carcinoma. *Gut* 2005; 54: 103-8.
 38. Jo WS, Carethers JM. Chemotherapeutic implications in microsatellite unstable colorectal cancer. *Cancer Biomark* 2006; 2: 51-60.
 39. Soreide K, Nedrebo BS, Knapp JC, Glomsaker TB, Soreide JA, Korner H. Evolving molecular classification by genomic and proteomic biomarkers in colorectal cancer: Potential implications for the surgical oncologist. *Surg Oncol* 2009; 18: 31-50.

Adres do korespondencji

Maciej J. Żelazowski

Zakład Kancerogenezy Molekularnej
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
ul. Mazowiecka 6/8
92-215 Łódź
e-mail: mzelazow@csk.umed.lodz.pl
tel./faks +48 42 678 24 65