

PATOLOGIA MOLEKULARNA RAKA JELITA GRUBEGO*

FRED T. BOSMAN, PU YAN

Institute of Pathology, University of Lausanne Medical Center, Lausanne, Switzerland

Rak jelita grubego (RJG) należy do najbardziej szczegółowo badanych typów nowotworów złośliwych, m.in. z uwagi na częste występowanie, ale także z powodu istnienia zmian prekursorowych – gruczolaków cewkowych i kosmkowych oraz wyróżnionych niedawno (siedzących) gruczolaków ząbkowanych, które można wykryć podczas badania endoskopowego i usunąć. Morfologiczne etapy sekwencji gruczolak – rak wyjaśniono już na poziomie molekularnym, co ułatwiła identyfikacja genów odpowiedzialnych za występowanie rodzinnej postaci RJG. Jednak, poza wczesnym wykrywaniem przypadków rodzinnego RJG i zastosowaniem w poradnictwie genetycznym, jeszcze do niedawna tak szczegółowa wiedza z zakresu patologii molekularnej miała niewielki wpływ na postępowanie kliniczne z chorymi na ten nowotwór. W ciągu ostatniej dekady wiele się zmieniło w tej kwestii. W związku z wprowadzeniem do stosowania leków swoiście ukierunkowanych przeciwko receptorowi czynnika wzrostu naskórka (*epidermal growth factor receptor* – EGFR), które okazały się skuteczne u chorych na RJG, rozpoczęto analizowanie mechanizmów odpowiedzialnych za oporność na te leki. Ustalenie, że raki z mutacją *KRAS* nie reagują na leczenie ukierunkowane przeciwko EGFR, miało olbrzymi wpływ na proces postępowania klinicznego z chorymi oraz diagnostykę molekularną RJG. Dodatkowe testy genetyczne, m.in. w kierunku obecności mutacji *NRAS*, *BRAF* i *PIK3CA*, również będą uwzględniane podczas podejmowania decyzji dotyczących tego, którym chorym należy podawać leki ukierunkowane. Trwają także badania nad nowymi lekami, skutecznymi u chorych na zaawansowanego RJG.

Bez odpowiedzi wciąż pozostają ważne pytania o to, u których chorych wystąpi wznowa po wycięciu guza pierwotnego oraz u których chorych uzyska się odpowiedź na chemioterapię adiuwantową według standardowego schematu zawierającego 5-fluorouracyl i oksaliplatinę. Z niecierpliwością oczekuje się opracowania testów o wartości predykcyjnej, które rozwiązałyby te problemy. Powstają nowe klasyfikacje RJG oparte na parametrach molekularnych i wkrótce zostaną wyróżnione nowe podtypy RJG zdefiniowane na podstawie kombinacji cech, takich jak: profil ekspresji genów, zaburzenia chromosomowe, mutacje genów i charakterystyka epigenetyczna. Pozwoli to na wynalezienie nowych metod leczenia, ale także będzie miało przełożenie na diagnostykę molekularną. Z kolei nowe metody leczenia i diagnostyki molekularnej przyczynią się do poprawy w zakresie postępowania klinicznego z chorymi na RJG.

Słowa kluczowe: rak jelita grubego, patologia molekularna, niestabilność chromosomowa, niestabilność mikrosatelitarna, fenotyp metylatora wysp CpG (CIMP), *KRAS*.

Wstęp

Oblicze nowoczesnej medycyny zmienia się bardzo dynamicznie. W opublikowanym niedawno artykule poświęconym zachodzącym zmianom Stephen Friend

i Leroy Hood [1] nazywają ją „medycyną 4P”: *predictive* (predykcyjną), *personalised* (zindywidualizowaną), *preventive* (zapobiegawczą) oraz *participatory* (partycypacyjną). W dużym stopniu zmiany te są zasługą rewolucji w dziedzinie genetyki molekularnej. Obecnie

*Artykuł stanowi tłumaczenie pracy „Molecular pathology of colorectal cancer”, opublikowanej w Pol J Pathol 2014; 65 (4): 257-266; DOI: 10.5114/pjp.2014.48094. Tłumaczenie przygotowała lek. med. Aleksandra Ambicka z Zakładu Patomorfologii Nowotworów Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Krakowie.

już w ciągu kilku dni i za rozsądną cenę można zsekwencjonować cały genom. Być może w niedalekiej przyszłości każdy będzie nosić przy sobie informacje na temat własnego genomu zakodowane na karcie chipowej, zawierającej również istotne dane dotyczące historii choroby. Niniejszy artykuł koncentruje się na raku jelita grubego (RJG), jednym z najczęściej występujących nowotworów złośliwych, który każdego roku na świecie jest przyczyną dużej liczby zgonów związanych z nowotworami [2]. Rak jelita grubego należy do najbardziej szczegółowo badanych typów nowotworów złośliwych, m.in. z uwagi na częste występowanie, ale także z powodu istnienia zmian prekursorowych – gruczolaków cewkowych i kosmkowych oraz wyróżnionych niedawno (siedzących) gruczolaków ząbkowanych, które można wykryć podczas badania endoskopowego i usunąć. Teoretycznie usuwanie gruczolaków mogłoby zapobiec wystąpieniu większości przypadków RJG. Charakterystyczne etapy morfologiczne ewolucji tych zmian prekursorowych wyjaśniono już na poziomie molekularnym, a tzw. sekwencja gruczolak – rak stanowi jeden z modelowych przykładów wieloetapowej progresji nowotworu. Zdobyte tej wiedzy ułatwiło poznanie zjawiska występowania różnorodnych rodzinnych form RJG, których molekularne podłoże w dużym stopniu zostało już wyjaśnione [3]. Do niedawna, z wyjątkiem wczesnego wykrywania rodzinnych postaci RJG i poradnictwa genetycznego, szczegółowa znajomość mechanizmów molekularnych miała niewielki wpływ na postępowanie kliniczne u chorych na RJG. Podstawowymi czynnikami uwzględnianymi przy wyborze metod leczenia były klasyczne parametry kliniczno-morfologiczne. Cel niniejszej publikacji stanowi ocena, w jaki sposób coraz rozleglejsza wiedza na temat zdarzeń molekularnych biorących udział w powstawaniu RJG i zmian prekursorowych, aż do wystąpienia przerzutów odległych, wpływa na metody (wczesnego) wykrywania RJG i leczenia chorych na ten powszechny na całym

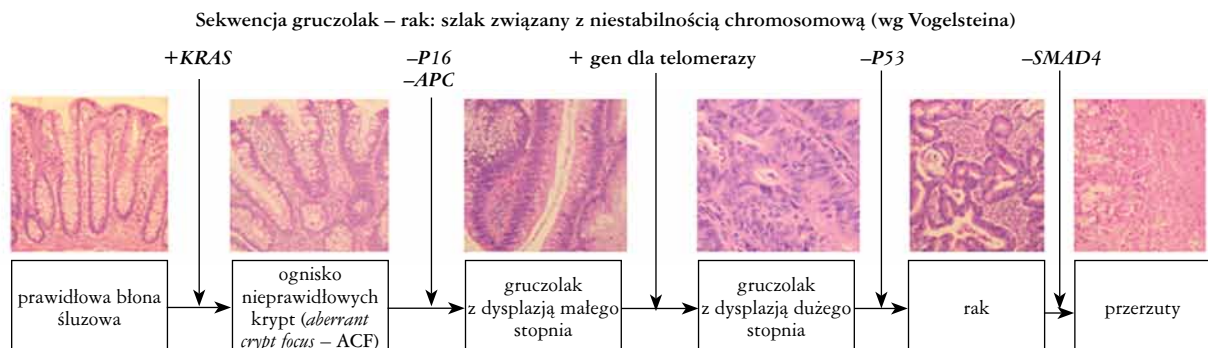
świecie nowotwór złośliwy, który wciąż pozbawia życia co drugiego chorego [2].

Szlaki molekularne związane z rozwojem raka jelita grubego

Wyniki badań molekularnych nad RJG wyjaśniają, że w proces jego powstawania zaangażowanych jest kilka szlaków sygnałowych. Poznano już dosyć szczegółowo najważniejsze zjawiska (epi)genetyczne związane z transformacją nowotworową w obrębie jelita grubego. Ustalono również, że RJG to niejednorodna jednostka chorobowa [3]. Różnorodności morfologicznej w zakresie lokalizacji, stopnia złośliwości histologicznej i typu nowotworu dopełnia wielopoziomowa złożoność molekularna [4–6]. Obecnie wiadomo, że RJG to bardzo heterogenna choroba. Na tę heterogenność składa się m.in. zmienność obrazu klinicznego, prawdopodobieństwa wyleczenia, sposobu szerzenia się i odpowiedzi na leczenie. Podjęcie próby przynajmniej częściowego zrozumienia heterogenności RJG wiąże się z koniecznością poznania szlaków molekularnych odpowiedzialnych za jej powstawanie. Opracowano trzy najważniejsze koncepcje dotyczące przebiegu tych szlaków [7–9], a w ostatnim czasie powstała czwarta [10].

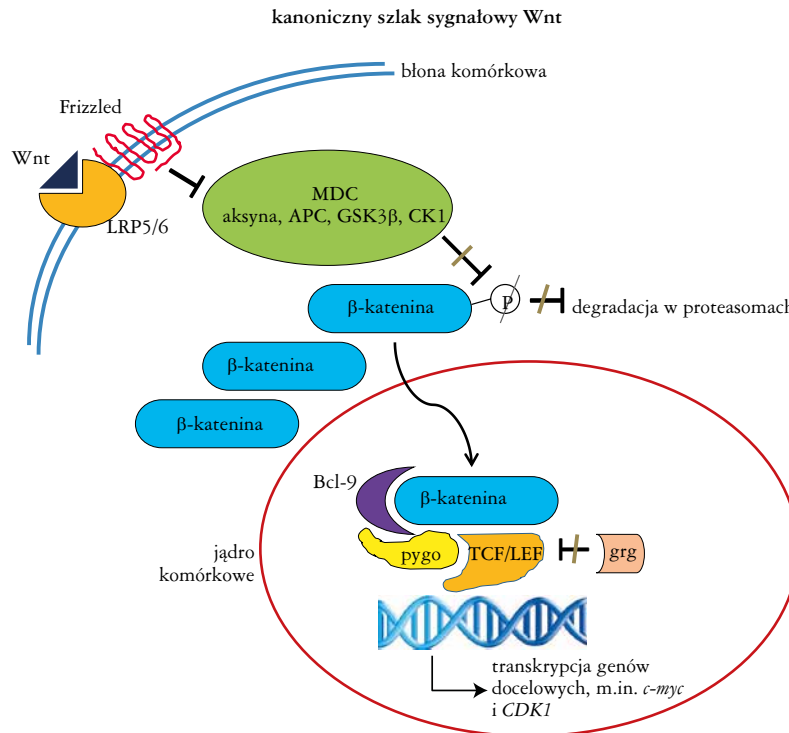
Szlak związany z niestabilnością chromosomową

Pierwszą spośród poznanych jest tzw. **klasyczna ścieżka** kancerogenezy, której cechą charakterystyczną stanowi niestabilność chromosomowa (*chromosomal instability* – CIN). Zwykle w dużym odsetku komórek raków z CIN stwierdza się aneuploidię i wykazują one wyraźną zmienność liczby kopii genów. Pomysł na przebieg tego szlaku, który dotyczy ok. 80% przypadków RJG, przedstawił Vogelstein w przełomowej publikacji [7]. Zdarzenia związane z klasyczną ścieżką kancerogenezy zilustrowano na rycinie 1. Wyjaśnienie mechanizmów tego szlaku ułatwiło odkrycie



Rycina 1. Model wieloetapowej kancerogenezy nabłonka jelita grubego zaproponowany po raz pierwszy przez Vogelsteina [7]. Zdjęcia mikroskopowe przedstawiają obraz morfologiczny zmian na każdym etapie transformacji nowotworowej. Nad strzałkami podano domniemane zaburzenia molekularne związane z poszczególnymi etapami tego procesu „+” – mutacja aktywująca, „-” – mutacja dezaktywująca

Źródło: *World Cancer Report 2014*. IARC, WHO press, p. 395. ISBN 978-92-832-0429-9. Rycinę opublikowano za zgodą wydawcy.



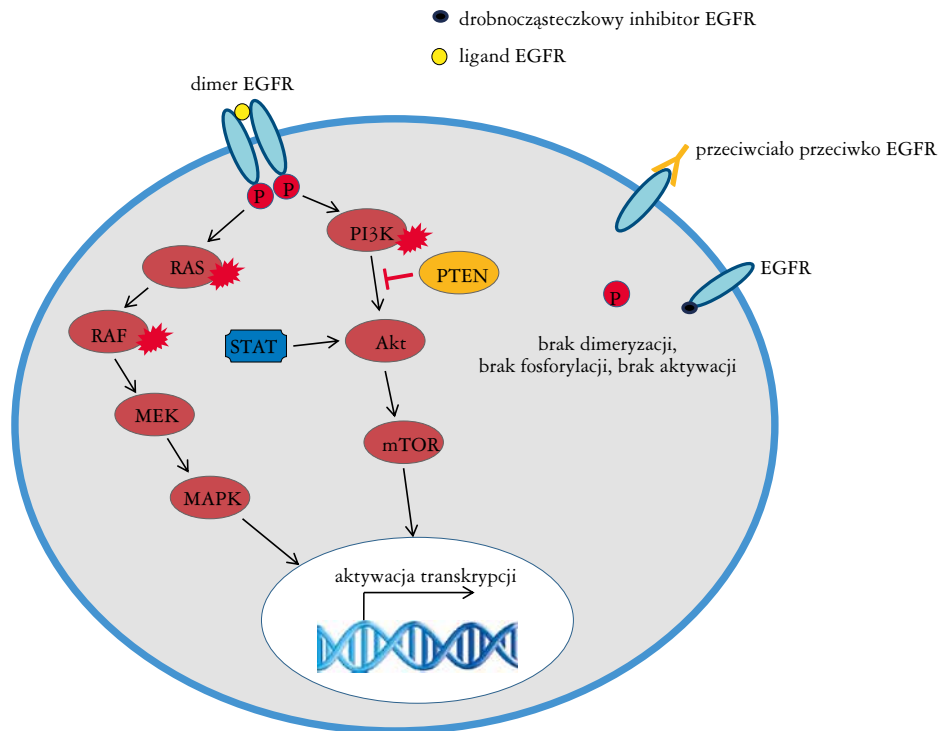
Rycina 2. Kanoniczny szlak sygnałowy Wnt. Brak Wnt powoduje, że β -katenina ulega fosforylacji przy udziale kinazy 3β syntazy glikogenu (GSK 3β) i kinazy kazeiny 1 (CK1), które tworzą niszczący kompleks białkowy (*multiprotein destruction complex* – MDC), złożony z aksyny, produktu genu *APC*, GSK 3β i CK1, a następnie jest degradowana w proteasomach. Natomiast związanie się Wnt z receptorem Frizzled i koreceptorami LRP5/6 prowadzi do powstania kompleksu receptorowego. To z kolei jest przyczyną destabilizacji MDC, który w rezultacie nie fosforyluje β -kateniny – kluczowego mediatora szlaku Wnt. Dlatego β -katenina nie ulega degradacji w proteasomach, gromadzi się w cytoplazmie i przechodzi do jądra komórkowego. Tutaj tworzy kompleks transkrypcyjny z białkami *pygopus* (pygo), Bcl-9 i TCF/LEF, który przestaje podlegać hamowaniu przez represor transkrypcyjny *groucho* (grg). Skutkiem tego jest uruchomienie transkrypcji genów docelowych pobudzających proliferację, m.in. *c-myc* i *CDK1*

genu *APC* (*adenomatous polyposis coli*) odpowiedzialnego za występowanie rodzinnej polipowatości gruczolakowatej jelita grubego (*familial adenomatous polyposis* – FAP) [11, 12]. Mutacje *APC* aktywują szlak sygnałowy Wnt, który odgrywa główną rolę w rozwoju RJG, o czym świadczy fakt, że zaburzenia w obrębie genów skutkujące aktywacją tego szlaku stwierdza się w blisko 90% wszystkich RJG [13]. Większość spośród nich stanowią mutacje *APC* typu utraty funkcji; opisywano również rzadkie mutacje genu β -kateniny. Drugi allel *APC* ulega z kolei wyciszeniu w wyniku mutacji, delecji allelu lub metylacji promotora genu. Utrata funkcji białka APC zaburza fosforylację β -kateniny, która nie podlega ubiquitylizacji i nie może zostać zdegradowana w proteasomach. Gdy β -katenina gromadzi się w nadmiarze, jest przenoszona do jądra komórkowego, gdzie we współpracy z kompleksem białek LEF/TCF podejmuje funkcję czynnika transkrypcyjnego i nasila ekspresję genów pobudzających wzrost komórki (ryc. 2.). Do aktywacji szlaku Wnt dochodzi już w polipach gruczolakowych – zmianach prekursorowych RJG – dlatego

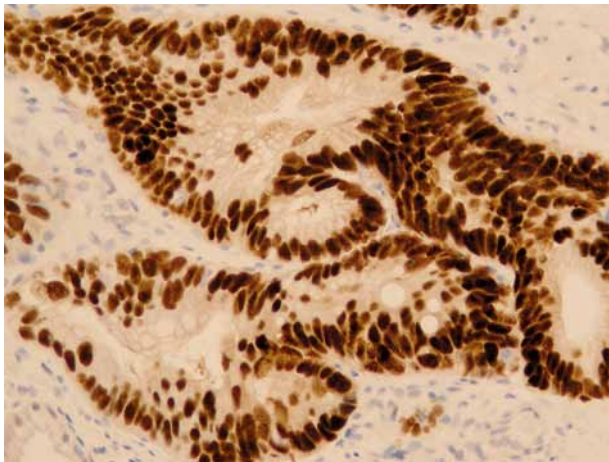
uważa się ją za wczesne zdarzenie w procesie transformacji nowotworowej nabłonka jelita grubego.

O tym, że gruczolaki jelita grubego stanowią zmiany prekursorowe RJG, wiedziano dużo wcześniej, nim biolodzy molekularni rozpoczęli wyjaśnianie mechanizmów związanych z transformacją tych zmian. Z biegiem czasu progresję polipa gruczolakowego do zmiany złośliwej, czyli raka, zaczęto nazywać sekwencją gruczolak – rak. Analizując jej mechanizmy, Vogelstein [7] uzupełnił tę sekwencję o dane molekularne, które w połączeniu z równie dobrze opracowaną koncepcją etapowej progresji zaowocowały stworzeniem niemal standardowego modelu kancerogenezy na poziomie molekularnym (ryc. 1.).

U chorych z FAP i mutacją germinálną *APC* już w bardzo młodym wieku powstają setki, a nawet tysiące polipów gruczolakowych. U tych chorych ryzyko wystąpienia RJG w ciągu całego życia wynosi 100%. Rozwój zmian nowotworowych nie jest ograniczony wyłącznie do jelita grubego – nowotwory pojawiają się również w górnym odcinku przewodu pokarmowego (żołądku, dwunastnicy) oraz w tkance łącznej (włókniakowatość typu głębokiego; *desmoid tumor*).



Rycina 3. Szlak sygnałowy MAPK. W warunkach prawidłowych szlak MAPK jest aktywowany przez interakcję pomiędzy receptorem i ligandem, pod wpływem której EGFR ulega dimeryzacji i fosforyluje kolejny element kaskady – cząsteczkę sygnałową. Ostatecznie aktywacja szlaku skutkuje transkrypcją genów związanych z różnymi procesami komórkowymi, m.in. proliferacją i naciekaniem. Tę aktywację mogą zahamować przeciwciała lub małe cząsteczki wiążące się z EGFR, które skutecznie wyciszają szlak MAPK jedynie wtedy, gdy żadne z kolejnych białek tej kaskady nie jest konstytutywnie aktywowane na skutek mutacji (np. *KRAS*, *BRAF* lub *PIK3CA*)



Rycina 4. Reakcja immunohistochemiczna na obecność białka p53 w komórkach raka okrężnicy. Zwraca uwagę silne, rozlane wybarwienie wszystkich jąder komórkowych, świadczące o obecności zmutowanego białka p53

Istnieje wyraźna zależność pomiędzy genotypem i fenotypem dotycząca obrazu klinicznego FAP. Mutacje zlokalizowane przed kodonem 157, za kodonem 1595 oraz w obrębie poddawanego alternatywnemu składaniu regionu w eksonie 9 wiążą się ze znacznie mniejszą częstością występowania polipów (atypowa FAP; patrz [14]), a także z rozwojem zmian nowotworowych w górnym odcinku przewodu pokarmowego

(dwunastnicy i żołądka). Obecność mutacji zlokalizowanych pomiędzy kodonami 1250 i 1464 ma związek z polipowością o ciężkim przebiegu. Z kolei mutacje zlokalizowane za kodonem 1444 wiążą się z występowaniem desmoidów [14]. Mutacje *APC* występują także w sporadycznych przypadkach RJG, które zazwyczaj rozwijają się u osób w podeszłym wieku (zwykle począwszy od 7. dekadzie życia); mutacje te mają jednak charakter sporadyczny, a nie germinalny [15].

Kolejne zdarzenia molekularne to aktywujące mutacje *KRAS* i *BRAF* w obrębie szlaku MAPK. Mutacje *KRAS*, które konstytutywnie aktywują szlak sygnałowy MAPK (ryc. 3.), stwierdza się w blisko 45% przypadków RJG. Gen *BRAF*, zlokalizowany za *KRAS* w szlaku sygnałowym MAPK, ulega mutacji w niespełna 10% przypadków. Mutacje w obrębie szlaku MAPK mogą również dotyczyć *NRAS* i genu kodującego kinazę 3-fosfoinozytolu (*phosphoinositide-3-kinase* – PIK3) [16]. Zagadnienie to zostanie omówione w kontekście molekularnych czynników predykcyjnych dla leczenia ukierunkowanego chorych na RJG.

Mutacje *TP53* typu utraty funkcji, które powodują gromadzenie się zmutowanego białka w jądrze komórkowym (ryc. 4.), powstają w ok. 70% przypadków związanych z klasyczną ścieżką kancerogenezy oraz zawsze podczas progresji od gruczolaka z dysplazją dużego stopnia do raka, kiedy dochodzi także

do aktywacji telomerazy [17], co zapewnia transformowanym komórkom nieograniczoną długość życia. Aktywacja szlaku związanego z transformującym czynnikiem wzrostu β (*transforming growth factor β* – TGF- β), której wyrazem jest brak ekspresji białka efektorowego SMAD4, prawdopodobnie wiąże się z powstawaniem przerzutów odległych [18].

Klasyczna ścieżka kancerogenezy jest powiązana z FAP i mutacją germinálną *APC*, przy czym nie u wszystkich chorych z polipowatością występuje mutacja *APC*. Szczegółowa analiza genomu tych chorych zaowocowała odkryciem roli genu *MUTYH*, który po uszkodzeniu DNA w wyniku oksydacji uczestniczy w procesie jego naprawy polegającym na wycinaniu zasad azotowych [19]. W przebiegu polipowatości związanej z *MUTYH* (*MUTYH-associated polyposis* – MAP) sekwencja zdarzeń jest w dużym stopniu taka sama jak w przypadku FAP, przy czym u chorych z MAP występuje mniejsza liczba polipów, raki pojawiają się między 4. a 7. dekadą życia, natomiast ryzyko wystąpienia RJG w ciągu całego życia jest mniejsze niż u chorych z FAP [20].

Szlak związany z niestabilnością mikrosatelitarną

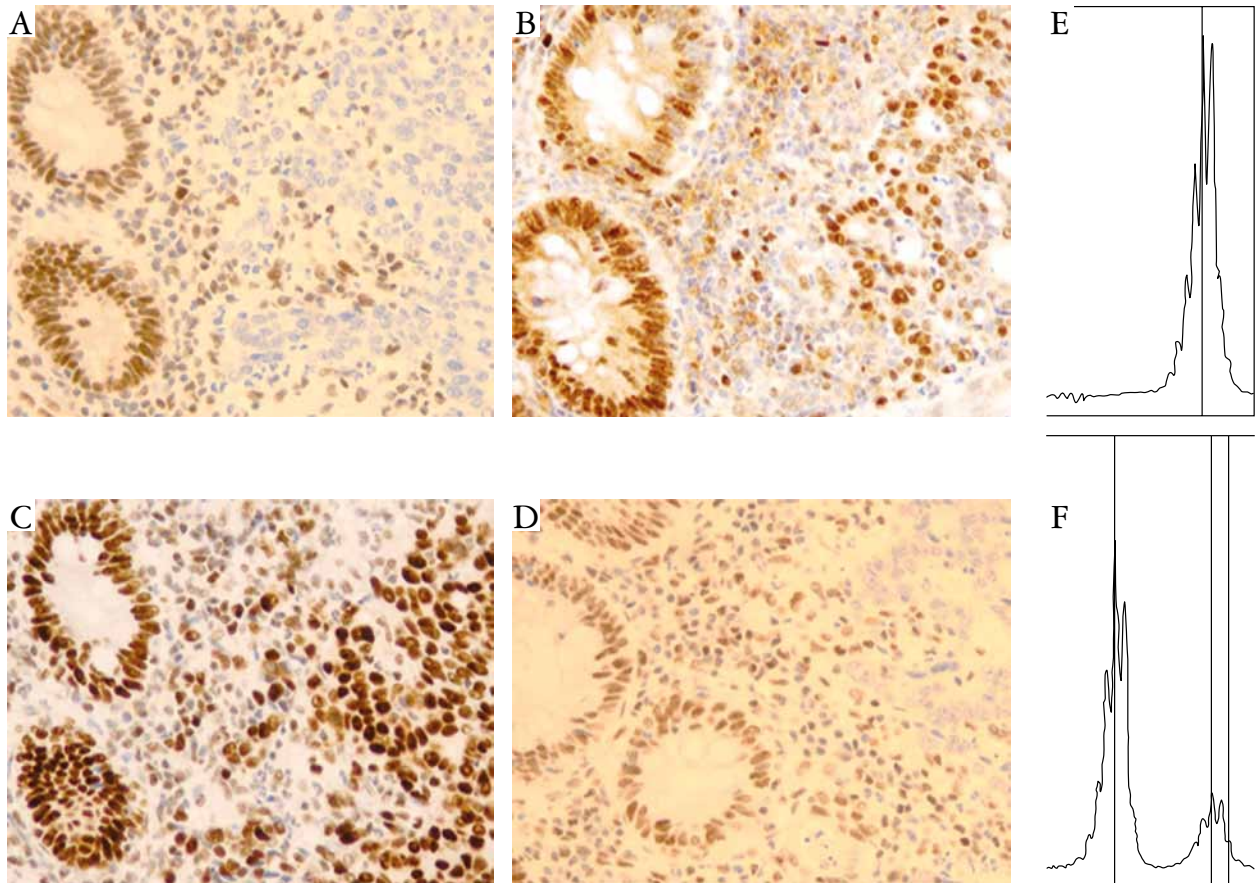
Szlak związany z niestabilnością mikrosatelitarną (*microsatellite instability* – MIN) jest odpowiedzialny za rozwój raków z hipermutacjami, których komórki – w przeciwieństwie do raków powstałych na podłożu CIN – wykazują aneuploidię tylko w niewielkim odsetku. Pierwowzór tego szlaku odkryto na początku lat 90. ubiegłego wieku, badając podłoże molekularne dziedzicznego RJG niezwiązanego z polipowatością (*hereditary non-polyposis colorectal cancer* – HNPCC), obecnie znanego jako zespół Lyncha [21]. Ustalenie, że przyczyną zespołu Lyncha jest mutacja jednego spośród genów kodujących białka uczestniczące w naprawie błędnie sparowanych zasad azotowych (*mismatch repair* – MMR), miało przełomowe znaczenie [22]. Podczas replikacji DNA pojawiają się błędy, takie jak nieprawidłowe parowanie pojedynczych zasad lub delecje i krótkie insercje, za których naprawę odpowiada system MMR. Białka tego systemu tworzą kompleks, który wiąże się z błędnie sparowaną zasadą, wykorzystuje informację zawartą na (prawidłowej) nici komplementarnej, a następnie wycina i naprawia błąd. Gdy system MMR nie działa, w komórkach kumulują się błędy, które występują również w sekwencjach mikrosatelitarnych. Są to powtarzające się sekwencje DNA, zwykle o długości 1–6 par zasad, rozmieszczone w obrębie całego genomu. Zaburzenia funkcjonowania systemu MMR są przyczyną powstawania nowych sekwencji mikrosatelitarnych, które można wykryć za pomocą testu wykorzystującego łańcuchową reakcję polimerazy (*polymerase chain reaction* – PCR). Do wykrywania niestabilności mikrosatelitarnej (*microsatellite instability* – MSI) wykorzystuje się w tym teście panel marke-

rów *loci* mikrosatelitarnych, m.in. BAT25, BAT26, D2S123, D5346 i D17S250 [23]. Jeśli co najmniej dwa markery wykazują niestabilność, mówi się o MSI dużego stopnia (*MSI-High* – MSI-H), jeśli niestabilny jest tylko jeden marker – o MSI małego stopnia (*MSI-Low* – MSI-L), a jeśli wszystkie markery są stabilne – o stabilności mikrosatelitarnej (*microsatellite stable* – MSS; ryc. 5.). Ponieważ białka związane z naprawą błędnie sparowanych zasad azotowych można bez trudu wykrywać w rutynowo przygotowywanych wycinkach tkankowych, ocena utraty ekspresji jednego spośród tych ważnych białek (MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2) metodą immunohistochemii stała się najważniejszym sposobem wykrywania nieprawidłowości systemu MMR i zespołu Lyncha [24] (ryc. 5.). Wracając do szlaków kancerogenezy, MSI-H odpowiada szlakowi związanemu z niestabilnością mikrosatelitarną. Zespół Lyncha jest odpowiedzialny za mniej więcej 3% przypadków RJG, natomiast MSI występuje w blisko 12% sporadycznych RJG. Jest to spowodowane metylacją promotora *MLH1*, która wyłącza transkrypcję tego genu, co z kolei skutkuje zaburzeniem MMR i wystąpieniem MSI-H [25].

W komórkach raków z MSI stosunkowo często pojawiają się mutacje *BRAF*. Z większą częstością występują również mutacje innych genów, nierzadko charakteryzujących się obecnością sekwencji mononukleotydowych w obrębie regionów kodujących. Dotyczy to np. genu receptora typu II TGF- β i proapoptotycznego genu *BAX*, które z tego powodu są często inaktywowane w komórkach raków z zaburzeniami funkcjonowania systemu MMR. W ostatnim czasie ocena MSI w sporadycznych RJG wzbudza spore zainteresowanie w kontekście klinicznym, gdyż raki z zaburzeniami funkcjonowania systemu MMR cechują się lepszym rokowaniem w porównaniu z rakami, w których naprawa błędnie sparowanych zasad azotowych przebiega prawidłowo. Niestabilność mikrosatelitarna stopniowo zaczyna być uwzględniana w procesie podejmowania decyzji klinicznych [26].

Transformacja nowotworowa poprzez szlaki związane z MIN i CIN przebiega podobnie: w postaci sekwencji gruczolak – rak. Jednak raki z MIN zachowują się inaczej niż raki powstałe na podłożu CIN: charakteryzują się lepszym rokowaniem, reagują odmiennie na standardową chemioterapię i mają dosyć szczególną morfologię – są to raki śluzowe lub rdzeniaste (ryc. 6.) z charakterystycznym naciekiem limfocytarnym, zlokalizowane w prawej części okrężnicy [27].

Dzięki realizacji projektu *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) udało się zaobserwować, że podgrupa RJG z hipermutacjami nie wykazuje niestabilności mikrosatelitarnej. Co więcej, zidentyfikowano rodziny, u których członków w młodym wieku występują nieliczne polipy i RJG bez niestabilności mikrosate-



Rycina 5. Typowy przykład zaburzeń procesu naprawy błędnie sparowanych zasad azotowych, który odzwierciedla ujemna reakcja immunohistochemiczna na obecność MLH1. **A)** Reakcja na obecność MLH1. Zwraca uwagę brak wybarwienia jąder komórek nowotworowych, podczas gdy jądra prawidłowych komórek krypt i komórek podścieliska uległy zabarwieniu. Brak reakcji na obecność MLH1 z reguły współistnieje z ujemną reakcją na obecność PMS2 (**D**), gdyż PMS2 nie może stworzyć kompleksu ze zmutowanym MLH1. **B)** Reakcja na obecność MSH2. Jądra komórek nowotworowych uległy wybarwieniu, podobnie jak w przypadku MSH6 (**C**). **E, F)** Potwierdzenie niestabilności mikrosatelitarnej, wyrażonej zmianą lokalizacji markera mikrosatelitarnego BAT26 z powodu nieprawidłowej liczby powtórzeń

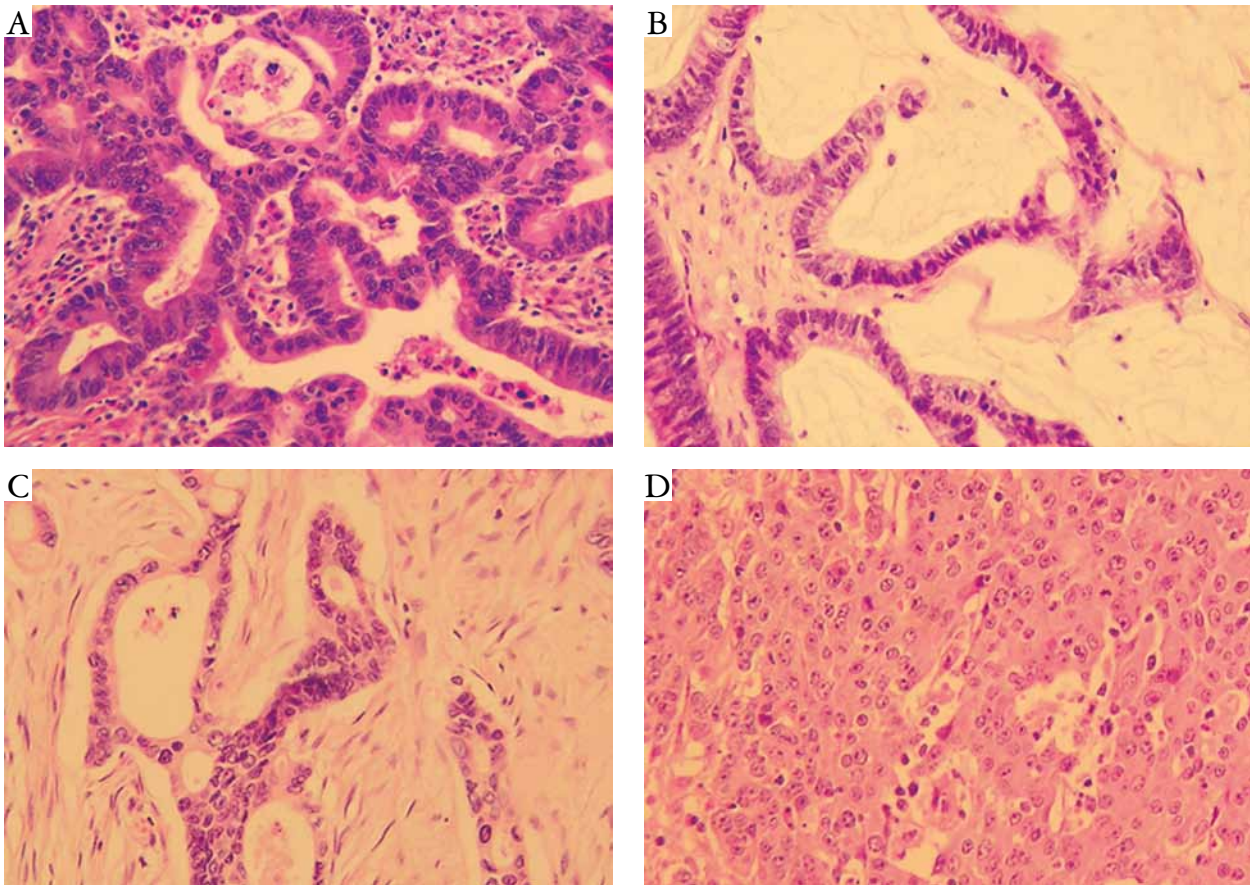
litarnej, natomiast nie stwierdza się mutacji *APC* ani *MYH*. Te obserwacje zaowocowały poszukiwaniami dodatkowych mechanizmów odpowiedzialnych za stan hipermutacji. Niedawno ustalono, że z zespołem tym wiążą się mutacje germinalne genów kodujących domeny dwóch polimeraz DNA (*POLE* i *POLD1*), odpowiedzialne za sprawdzanie poprawności syntezy DNA [10]. Wydaje się, że zahamowanie naprawy błędów w replikacji DNA powoduje powstawanie mutacji i w konsekwencji – fenotypu mutatorowego [28]. Zespół ten nosi nazwę *polymerase proofreading-associated polyposis* (PPAP).

Szlak związany z hipermetylacją wysp CpG

Hipermetylacja wysp CpG zlokalizowanych w promotorach genów uczestniczących w procesie regulacji transkrypcji to częsty mechanizm odpowiedzialny za wyciszenie genów supresorowych. Jeśli to zjawisko zachodzi w obrębie całego genomu, mówi się o fenotypie metylatora wysp CpG (*CpG island methylator phenotype* – CIMP) [29]. Niejasna pozostaje zarówno

przyczyna powstawania CIMP, jak i jego dokładne konsekwencje.

Na przełomie XX i XXI wieku zauważono, że płaskie, niegruczolakowe zmiany w błonie śluzowej, zwłaszcza zlokalizowane w prawej części okrężnicy, często charakteryzuje CIMP. Te zmiany powstają na skutek nieprawidłowego nawarstwiania się komórek nabłonka powierzchniowego z powodu nadmiernej proliferacji i zahamowania procesu apoptozy. Są one zbudowane z cewek gruczolowych o wyglądzie przypominającym zęby piły (stąd ich nazwa – ząbkowane) i przez długi czas uważano je najczęściej za niegroźne polipy hiperplastyczne. Niedawno udowodniono, że pewien podtyp tych polipów o charakterystycznej morfologii wykazuje znaczący potencjał złośliwości, dlatego nazwano go siedzącym gruczolakiem lub polipem ząbkowanym (*sessile serrated adenoma/polyp* – SSA/P) [30]. Siedzące gruczolaki lub polipy ząbkowane przypominają (łagodne) polipy hiperplastyczne, lecz wyróżnia je bardziej nieregularna architektomika krypt (ryc. 7.) i czasem obecność cech dysplazji.



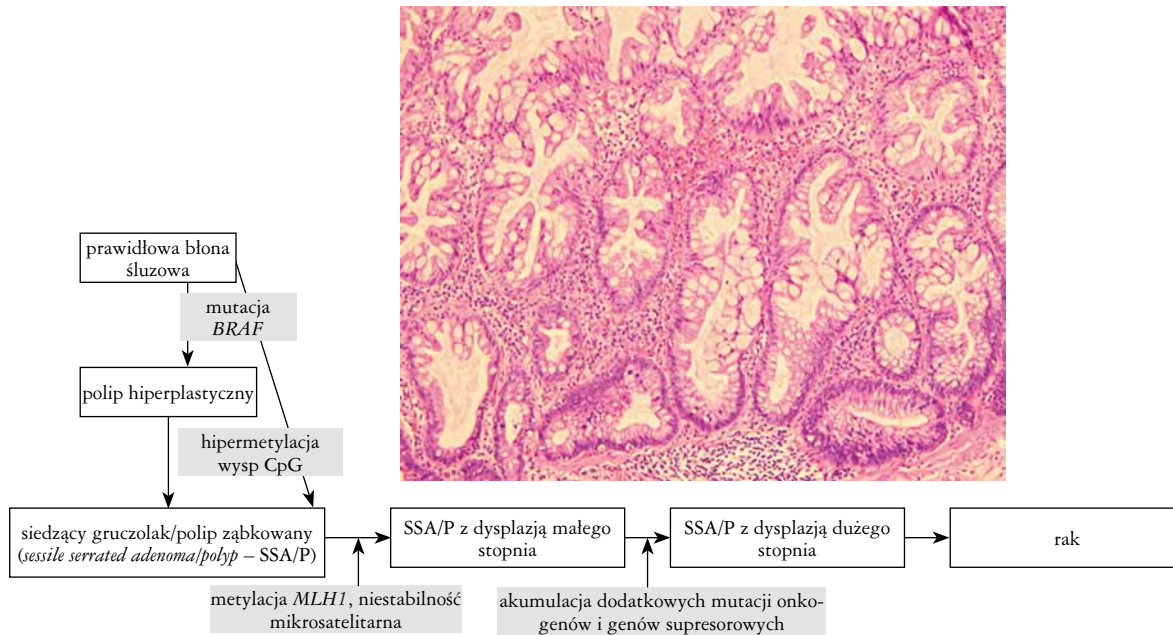
Rycina 6. Różnorodność morfologiczna raka jelita grubego. **A)** Mieszana architektonika cewkowa i ząbkowana z cechami atypii komórkowej średniego stopnia – polaryzacja komórek jest wciąż zachowana. **B)** Utkanie śluzowe. Jeśli ten rodzaj utkania dominuje (> 50%), rozpoznaje się raka śluzowego. **C)** Utkanie charakteryzujące się silną reakcją podścieliska (którą określa się mianem desmoplazji), z obecnością umiarkowanej liczby komórek nowotworowych. **D)** Utkanie nowotworu zbudowanego ze słabo zróżnicowanych komórek tworzących syncyrialne płaty, z charakterystycznym rozlanym naciekiem z limfocytów (*tumor infiltrating lymphocytes – TIL*), nazywanego rakiem rdzeniastym

Wykazano związek SSA/P ze zwiększonym ryzykiem występowania RJG, lecz dotychczas nie określono prawidłowo wielkości tego ryzyka, choć dostępne obecnie dane naukowe sugerują, że jest ono mniejsze niż ryzyko progresji klasycznych gruczolaków [31]. Zaobserwowano, że zmianami prekursorowymi raków charakteryzujących się CIMP są zmiany ząbkowane, a oprócz CIMP w komórkach tych raków często występują mutacje *BRAF*. Powiązanie ze sobą CIMP i architektoniki ząbkowanej doprowadziło do opracowania koncepcji szlaku kancerogenezy związanego z CIMP [32].

Wśród zdarzeń molekularnych tego szlaku oprócz CIMP należy wymienić mutację *BRAF*, zwłaszcza charakterystyczną mutację V600E, metylację promotorów różnych genów (jako konsekwencji CIMP) oraz metylację promotora *MLH1*, która skutkuje wyciszeniem ekspresji tego genu. To z kolei odpowiada za zaburzenia funkcjonowania systemu MMR, wystąpienie MSI i stan hipermutacji.

W tym miejscu należy podkreślić, że przedstawione koncepcje szlaków kancerogenezy stanowią model, na

podstawie którego można ustalać przebieg kolejnych zdarzeń molekularnych skutkujących rozwojem RJG, uwzględniając również parametry kliniczne i patomorfologiczne. W rzeczywistości istnieje wiele podtypów RJG, których charakterystyczne cechy molekularne w znacznym stopniu się nakładają [30]. W ostatnim czasie podjęto kilka prób stworzenia klasyfikacji molekularnych RJG, których rezultaty opublikowano. Nie dziwi fakt, że wspomniane klasyfikacje są do siebie bardzo podobne, a także w pewnym stopniu odzwierciedlają przebieg szlaków kancerogenezy [4–6]. Klasyfikacje molekularne stanowią kolejny dowód na niejednorodność RJG. Obecnie trwają prace nad sformułowaniem klasyfikacji molekularnej na drodze konsensusu, z wykorzystaniem analizy ogólnodostępnych danych dotyczących genomu; ich pierwsze wyniki już opublikowano [33]. Wciąż nie wiadomo, jaki będzie wpływ klasyfikacji RJG na postępowanie kliniczne, które nadal w znacznym stopniu jest zależne od klasycznych parametrów klasyfikacji TNM, choć niedawno na znaczeniu zyskała ocena MSI. Ten czynnik molekularny należy brać pod uwagę przy dokonywa-



Rycina 7. Szlak transformacji nowotworowej nabłonka jelita grubego związany z fenotypem metylatora wysp CpG (*CpG island methylator phenotype* – CIMP), zwany również szlakiem ząbkowanym. Wczesne zmiany morfologiczne powstałe na podłożu tego szlaku charakteryzują się mutacją *BRAF* (typowa mutacja V600E) i CIMP. Późniejsze zmiany wykazują nieprawidłowości systemu naprawy błędnie sparowanych zasad azotowych spowodowane hipermetylacją promotora *MLH1*, morfologicznie wyrażone architekturą ząbkowaną. Zmiany te noszą nazwę siedzących gruczolaków ząbkowanych. Progresja wynika ze zjawiska hipermutacji w obrębie genomu, spowodowanego nieprawidłowościami systemu naprawy błędnie sparowanych zasad azotowych, i obejmuje zaburzenia genomowe spotykane również w związku z tzw. klasyczną ścieżką kancerogenezy (ryc. 1.)

Źródło: Bosman T. *Molecular pathology of colorectal cancer*. W: *Molecular Surgical Pathology*. Cheng L, Eble JN (red.). Springer Verlag 2013; s. 13 (ryc. 1.7). Rycinę opublikowano za zgodą wydawcy.

niu wyboru metody leczenia adiuwantowego chorych na RJG w II/III stopniu zaawansowania klinicznego i prawdopodobnie również metody leczenia chorych na RJG z przerzutami odległymi. Powstaje pytanie, czy przedstawione szlaki kancerogenezy mają wpływ na proces postępowania klinicznego u chorych na RJG, a jeśli tak, to jaki.

Czy patologia molekularna rozwiąże problemy dotyczące postępowania u chorych na raka jelita grubego?

Wyjaśnienie istoty choroby to cel, do którego ostatecznie dąży patomorfologia, a z jego osiągnięcia choroby powinni odnosić korzyści. Zatem należy się zastanowić, które spośród ważnych problemów dotyczących opieki nad chorymi na RJG można rozwiązać na poziomie molekularnym, z korzyścią dla tych chorych. W tym kontekście istotne jest znalezienie odpowiedzi na następujące pytania:

1. Czy patologia molekularna może dostarczyć skuteczniejszych metod badania przesiewowego populacji w kierunku RJG?
2. Czy testy molekularne mogą pomóc wskazać chorych należących do grupy dużego ryzyka wystąpienia nawrotu choroby po wycięciu zmiany pierwotnej?

3. Czy testy molekularne mogą pomóc ustalić, u których chorych z grupy dużego ryzyka nawrotu choroby wystąpi odpowiedź na obecnie stosowaną (chemio)terapię adiuwantową?
4. Czy na podstawie testów molekularnych można prognozować, u których chorych najprawdopodobniej uzyska się odpowiedź na dostępne leki ukierunkowane?

Molekularne badania przesiewowe w kierunku raka jelita grubego

Na całym świecie programy badań przesiewowych w kierunku RJG zyskały na znaczeniu, z uwagi na dużą częstość występowania tej choroby oraz możliwość rozpoznawania i prawidłowego leczenia zmian prekursorowych podczas kolonoskopii. Do standardowych badań przesiewowych należy badanie kału na obecność krwi utajonej (*fecal occult blood test* – FOBT), przeprowadzane w celu wyodrębnienia mniejszej populacji chorych kwalifikujących się do kolonoskopii w przypadku dodatniego wyniku FOBT. Badanie kału na obecność krwi utajonej charakteryzuje się dość dużą czułością, lecz brakiem swoistości [34]. Trwają badania nad bardziej swoistymi testami molekularnymi. Większość z nich opiera się na wykrywaniu DNA komórek nowotworowych w kale i po-

szukiwaniu charakterystycznych dla raka zaburzeń genowych, takich jak hipermetylacja lub swoiste mutacje. Wyniki analiz przeprowadzonych w warunkach laboratoryjnych są obiecujące, lecz nie opracowano jeszcze czułych i swoistych testów molekularnych umożliwiających wykrywanie RJG [35].

Testy molekularne o wartości rokowniczej u chorych na raka jelita grubego

Zasadniczy problem w postępowaniu klinicznym u chorych na większość nowotworów złośliwych stanowi udzielenie odpowiedzi na pytanie, u których chorych dojdzie do nawrotu choroby po pierwotnym leczeniu, jakim w przypadku większości nowotworów jest wycięcie guza pierwotnego, czasem poprzedzone chemioterapią i/lub radioterapią neoadiuwantową. Nie ulega wątpliwości, że chorzy, u których prawdopodobieństwo wystąpienia nawrotu choroby jest duże – obecnie dotyczy to chorych na RJG w III stopniu zaawansowania klinicznego i w II stopniu z dużym ryzykiem nawrotu – mogą zostać poddani chemioterapii adiuwantowej. Z kolei chorym z grupy o małym prawdopodobieństwie nawrotu choroby – RJG w I stopniu zaawansowania klinicznego i w II stopniu z małym ryzykiem nawrotu – należy oszczędzić takiego leczenia, które wiąże się z możliwością wystąpienia istotnych działań niepożądanych. Stosowane obecnie kryteria oceny ryzyka wznowy są nieprecyzyjne, o czym świadczy fakt, że występuje ona nawet u małego odsetka chorych na RJG w I stopniu zaawansowania klinicznego, natomiast u ok. 30% chorych na RJG w III stopniu zaawansowania nie dochodzi do wznowy [36]. Opracowano kilka testów o wartości rokowniczej, analizujących profile („podpisy”) molekularne komórek nowotworowych, które mogłyby umożliwić stratyfikację chorych pod względem ryzyka nawrotu [37–39]. Podczas przeprowadzonego ostatnio badania oceniono je w niezależnej populacji chorych i ustalono, że wszystkie miały wartość rokowniczą [40]. Jednak, co zastanawiające, nie opierały się one na tych samych zestawach genów ani nie umieszczono na ich podstawie tych samych chorych w grupie o dużym ryzyku. Nie dziwi fakt, że łączna interpretacja tych profilów molekularnych miała większą wartość niż którykolwiek spośród nich interpretowany pojedynczo. Wyniki te wskazują, że choć znalezienie skutecznych (molekularnych) kryteriów identyfikacji chorych na RJG należących do grupy dużego ryzyka nawrotu stanowi pilny problem, to efektywność dotychczasowych prób osiągnięcia tego celu budzi wątpliwości.

Testy molekularne o wartości predykcyjnej dla chemioterapii

Odpowiedź na zastosowane leczenie odnotowuje się u zaledwie ok. 50% chorych na RJG zakwalifikowanych do chemioterapii adiuwantowej (tj. chorych z grupy dużego ryzyka wystąpienia wznowy ocenio-

nego na podstawie kryteriów klinicznych i histopatologicznych – II i III stopień zaawansowania klinicznego) [41]. Chorzy, u których nie udaje się uzyskać odpowiedzi na leczenie, są narażeni na pojawienie się typowych działań niepożądanych chemioterapii, przy braku jakiegokolwiek korzyści. Dlatego warto byłoby dysponować (klinicznymi, molekularnymi) parametrami umożliwiającymi prognozowanie odpowiedzi na leczenie wg schematu FOLFOX, stanowiącego połączenie 5-fluorouracylu, kwasu folinowego i oksaliplatyny. Podjęto starania, aby opracować odpowiednie testy molekularne, lecz żadnego z nich nie stosuje się jeszcze w codziennej praktyce z powodu niewystarczającej czułości i swoistości [42, 43]. Zatem wciąż trwają poszukiwania skuteczniejszych schematów leczenia adiuwantowego oraz narzędzi pozwalających przewidzieć wystąpienie odpowiedzi na leczenie.

Markery molekularne o wartości predykcyjnej dla leczenia ukierunkowanego u chorych na raka jelita grubego

Jak wspomniano wcześniej, standardowe leczenie chorych na zaawansowanego RJG opiera się na połączeniu 5-fluorouracylu, kwasu folinowego i oksaliplatyny (schemat FOLFOX). W ostatnim dziesięcioleciu uzyskano dowody świadczące o tym, że w pewnej podgrupie chorych korzystne może się okazać podawanie leków ukierunkowanych przeciwko receptorowi czynnika wzrostu naskórka (*epidermal growth factor receptor* – EGFR). Stworzono przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko EGFR, których działanie okazało się skuteczne u niektórych chorych na RJG. Wstępne obserwacje zostały poddane walidacji w prospektywnych badaniach klinicznych, których wyniki potwierdziły najpierw uzyskanie odpowiedzi na cetuksymab [44], a następnie także na panitumumab [45], lecz jedynie w grupie chorych z guzami niewykazującymi mutacji *KRAS*. To odkrycie natychmiast spowodowało, że ocena mutacji *KRAS* w komórkach RJG stała się jedną z najczęściej wykonywanych analiz w laboratoriach molekularnych. Ważne ograniczenie badania w kierunku mutacji *KRAS* stanowi jednak fakt, że identyfikuje ono chorych (z guzami z mutacją *KRAS*), u których nie wystąpi odpowiedź na leczenie ukierunkowane przeciwko EGFR, wykluczając ok. 40% chorych, którzy nie zareagują na leczenie, natomiast odpowiedź uzyska się zaledwie u ok. 40% chorych z guzami, w których nie stwierdzono mutacji *KRAS*. Krok naprzód stanowiłaby możliwość skutecznego przewidywania, u których chorych wystąpi odpowiedź na leczenie, zamiast tego, u których tej odpowiedzi się nie stwierdzi. Podczas badania dotyczącego oceny mutacji w obrębie innych genów szlaku MAPK [46] ustalono, że połączenie analizy mutacji kilku genów szlaku MAPK znacząco zwiększyło wartość predykcyjną tych testów. Jednak precyzja obecnie dostępnych testów wciąż jest

daleka od ideału i podejmuje się próby opracowania testów molekularnych, dzięki którym możliwe będzie dokładniejsze prognozowanie odpowiedzi na leczenie [47].

W tym kontekście ważny problem stanowi oporność na leczenie. Korzystne działanie leków ukierunkowanych przeciwko EGFR zwykle utrzymuje się przez krótki okres, z powodu rozwoju oporności [48]. Prowadzone obecnie badania mają wyjaśnić, jakie mechanizmy są odpowiedzialne za niepowodzenie leczenia związane z opornością [49]. Inne badania dotyczą nowych punktów uchwytu dla leków ukierunkowanych molekularnie, które mogłyby mieć znaczenie w leczeniu chorych na zaawansowanego RJG [50].

Podsumowanie

Fascynująca przygoda, jaką jest odkrywanie szczegółów procesu transformacji nowotworowej nabłonka jelita grubego, jeszcze nie dobiegła końca. W ramach kwalifikacji chorych do leczenia pokonano drogę od klasycznych parametrów histopatologicznych (w tym kluczowych parametrów makroskopowych), poprzez coraz bardziej szczegółową klasyfikację TNM, aż do parametrów molekularnych, aby dostosować leczenie do konkretnego nowotworu o specyficznych cechach. Wprawdzie proces kancerogenezy w obrębie jelita grubego nie został jeszcze w pełni poznany, lecz z całą pewnością jest bardziej zrozumiały niż 20 lat temu. Trwa identyfikowanie czynników predykcyjnych dla dostępnych leków ukierunkowanych, opracowywanie nowych leków ukierunkowanych przeciwko elementom szlaków zaangażowanych w proces transformacji nowotworowej nabłonka jelita grubego oraz testów molekularnych, które pozwolą na przewidywanie odpowiedzi na te nowe leki. Na świecie w ramach projektu TCGA podejmuje się próby dokładniejszego poznania biologii molekularnej RJG i innych nowotworów złośliwych. Patomorfologia ma kluczowe znaczenie dla postępu w tej dziedzinie, ponieważ wiedzę z tego zakresu zdobyto (i wciąż się zdobywa) w znacznej mierze dzięki badaniom molekularnym przeprowadzonym z wykorzystaniem wycinków tkankowych, na podstawie których patomorfolodzy ustalają rozpoznanie. Patomorfolodzy powinni pozostać na tej centralnej pozycji jako partnerzy w zespole współpracujących ze sobą specjalistów z wielu dziedzin, m.in. biologów molekularnych (w tym specjalizujących się w nowotworach złośliwych), bioinformatyków i onkologów (molekularnych). Ostatecznie zaowocuje to postępowaniem w zakresie wczesnego wykrywania RJG oraz umożliwi dokładniejsze przewidywanie wystąpienia odpowiedzi na leczenie (adiuwantowe), opracowanie skuteczniejszych leków i bardziej precyzyjnych czynników predykcyjnych, z czego chorzy będą odnosiли korzyści.

Piśmiennictwo

Zamiast prac oryginalnych wybrano przede wszystkim aktualne artykuły przeglądowe, aby ułatwić dalsze zgłębianie piśmiennictwa związanego z tematem niniejszej publikacji.

- Hood L, Friend SH. Predictive, personalized, preventive, participatory (P4) cancer medicine *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8: 184-187.
- Bosman FT. Colorectal cancer. In: *World Cancer Report 2014* (Ed. Stewart BW and Wild CP). IARC Press, Lyon 2014; 32-402.
- Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2011; 6: 479-507.
- Sadanandam A, Lyssiotis CA, Homicsko K, et al. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat Med* 2013; 19: 619-625.
- De Sousa E, Melo F, Wang X, et al. Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nat Med* 2013; 19: 614-618.
- Budinska E, Popovici V, Tejpar S, et al. Gene expression patterns unveil a new level of molecular heterogeneity in colorectal cancer. *J Pathol* 2013; 231: 63-76.
- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal carcinogenesis. *Cell* 1996; 87: 159-170.
- Hemminki A, Peltomäki P, Mecklin JP, et al. Loss of the wild type MLH1 gene is a feature of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 1994; 8: 405-410.
- Jass JR. Serrated adenoma of the colorectum and the DNA-methylator phenotype. *Nat Clin Pract Oncol* 2005; 2: 398-405.
- Briggs S, Tomlinson I. Germline and somatic polymerase ϵ and δ mutations define a new class of hypermutated colorectal and endometrial cancers. *J Pathol* 2013; 230: 148-53.
- Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, et al. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992; 359: 235-237.
- Cottrell S, Bicknell D, Kaklamani L, Bodmer WF. Molecular analysis of APC mutations in familial adenomatous polyposis and sporadic colon carcinomas. *Lancet* 1992; 340: 626-630.
- Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1653: 1-24.
- Nieuwenhuis MH, Vasen HF. Correlations between mutation site in APC and phenotype of familial adenomatous polyposis (FAP): a review of the literature. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 61: 153-161.
- Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, et al. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 229-233.
- Tian S, Simon I, Moreno V, et al. A combined oncogenic pathway signature of BRAF, KRAS and PI3KCA mutation improves colorectal cancer classification and cetuximab treatment prediction. *Gut* 2013; 62: 540-549.
- Yan P, Saraga EP, Bouzourene H, et al. Telomerase activation in colorectal carcinogenesis. *J Pathol* 1999; 189: 207-212.
- Fleming NI, Jorissen RN, Mouradov D, et al. SMAD2, SMAD3 and SMAD4 mutations in colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2011; 79: 1-16.
- Nielsen M, Morreau H, Vasen HF, Hes FJ. MUTYH-associated polyposis (MAP). *Cancer Res* 2013; 73: 725-735.
- Sampson JR, Jones N. MUTYH-associated polyposis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2009; 23: 209-218.
- Lynch HT, Lanspa SJ, Boman BM, et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer – Lynch syndromes I and II. *Gastroenterol Clin North Am* 1988; 17: 679-712.
- Nyström-Lahti M, Parsons R, Sistonen P, et al. Mismatch repair genes on chromosomes 2p and 3p account for a major share of hereditary nonpolyposis colorectal cancer families evaluable by linkage. *Am J Hum Genet* 1994; 55: 659-665.
- Mead LJ, Jenkins MA, Young J, et al. Microsatellite instability markers for identifying early-onset colorectal cancers caused

- by germ-line mutations in DNA mismatch repair genes. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 2865-2869.
24. Shia J, Tang LH, Vakiani E, et al. Immunohistochemistry as first-line screening for detecting colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: a 2-antibody panel may be as predictive as a 4-antibody panel. *Am J Surg Pathol* 2009; 33: 1639-1645.
 25. Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ, et al. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res* 1998; 58: 3455-3460.
 26. Pino MS, Chung DC. Microsatellite instability in the management of colorectal cancer. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; 5: 385-399.
 27. Tougeron D, Maby P, Elie N, et al. Regulatory T lymphocytes are associated with less aggressive histologic features in microsatellite-unstable colorectal cancers. *PLoS One* 2013; 8: e61001.
 28. Heitzer E, Tomlinson I. Replicative DNA polymerase mutations in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2014; 24: 107-113.
 29. Teodoridis JM, Hardie C, Brown R. CpG island methylator phenotype (CIMP) in cancer: causes and implications. *Cancer Lett* 2008; 268: 177-186.
 30. Snover DC. Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 2011; 42: 1-10.
 31. Bettington M, Walker N, Clouston A, et al. The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges. *Histopathology* 2013; 62: 367-386.
 32. Jass JR, Baker K, Zlobec I, et al. Advanced colorectal polyps with the molecular and morphological features of serrated polyps and adenomas: concept of a 'fusion' pathway to colorectal cancer. *Histopathology* 2006; 49: 121-131.
 33. Sadanandam A, Wang X, de Sousa E, et al. Reconciliation of classification systems defining molecular subtypes of colorectal cancer: interrelationships and clinical implications. *Cell Cycle* 2014; 13: 353-357.
 34. Pox CP. Controversies in colorectal cancer screening. *Digestion* 2014; 89: 274-281.
 35. Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, et al. Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening. *N Engl J Med* 2014; 370: 1287-1297.
 36. Dotan E, Cohen SJ. Challenges in the management of stage II colon cancer. *Semin Oncol* 2011; 38: 511-520.
 37. Omberg L, Ellrott K, Yuan Y, et al. Enabling transparent and collaborative computational analysis of 12 tumor types within The Cancer Genome Atlas. *Nat Genet* 2013; 45: 1121-1126.
 38. Maak M, Simon I, Nitsche U, et al. Independent validation of a prognostic genomic signature (ColoPrint) for patients with stage II colon cancer. *Ann Surg* 2013; 257: 1053-1058.
 39. Reimers MS, Kuppen PJ, Lee M, et al. Validation of the 12-gene colon cancer recurrence score as a predictor of recurrence risk in stage II and III rectal cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2014; 106 pii: dju269. doi: 10.1093/jnci/dju269.
 40. Di Narzo AF, Tejpar S, Rossi S, et al. Test of four colon cancer risk-scores in formalin fixed paraffin embedded microarray gene expression data. *J Natl Cancer Inst* 2014; 106 pii: dju247. doi: 10.1093/jnci/dju247.
 41. Van Loon K, Venook AP. Adjuvant treatment of colon cancer: what is next? *Curr Opin Oncol* 2011; 23: 403-409.
 42. Yuan Y, Tan CW, Shen H, et al. Identification of the biomarkers for the prediction of efficacy in first-line chemotherapy of metastatic colorectal cancer patients using SELDI-TOF-MS and artificial neural networks. *Hepatogastroenterology* 2012; 59: 2461-2465.
 43. Jensen NF, Smith DH, Nygård SB, et al. Predictive biomarkers with potential of converting conventional chemotherapy to targeted therapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Scand J Gastroenterol* 2012; 47: 340-355.
 44. Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 3992-3995.
 45. Peeters M, Douillard JY, Van Cutsem E, et al. Mutant KRAS codon 12 and 13 alleles in patients with metastatic colorectal cancer: assessment as prognostic and predictive biomarkers of response to panitumumab. *J Clin Oncol* 2013; 31: 759-765.
 46. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol* 2010; 11: 753-762.
 47. Sartore-Bianchi A, Bencardino K, Di Nicolantonio F, et al. Integrated molecular dissection of the epidermal growth factor receptor (EGFR) [corrected] oncogenic pathway to predict response to EGFR-targeted monoclonal antibodies in metastatic colorectal cancer. *Target Oncol* 2010; 5: 19-28.
 48. Van Emburgh BO, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, et al. Acquired resistance to EGFR-targeted therapies in colorectal cancer. *Mol Oncol* 2014; 8: 1084-1094.
 49. Bardelli A, Siena S. Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 1254-1261.
 50. Chong CR, Jänne PA. The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer. *Nat Med* 2013; 19: 1389-1400.