

STUDIUM PATOGENEZE KOLOREKTÁLNÍCH KARCINOMŮ POMOCÍ PROFILŮ GENOVÉ EXPRESE A MOŽNOSTI JEJICH VYUŽITÍ V DIAGNOSTICKÉ A PREDIKTIVNÍ ONKOLOGII

STUDIES ON COLORECTAL CANCER PATHOGENESIS BY GENE EXPRESSION PROFILES AND POSSIBILITIES OF THEIR APPLICATION TO DIAGNOSTIC AND PREDICTIVE ONCOLOGY

SLABÝ O.¹, GARAJOVÁ I.², SVOBODA M.², KOCÁKOVÁ I.², VYZULA R.²

¹MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, ODDĚLENÍ KLINICKÉ A EXPERIMENTÁLNÍ PATOLOGIE, BRNO

²MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, KLINIKA KOMPLEXNÍ ONKOLOGICKÉ PĚČE, BRNO

Souhrn

Technologie DNA čipů je v současné době nejúčinnější a nejrozšířenější metodou studia genové exprese. Počet prací využívajících tuto technologii v posledních letech exponenciálně narůstá a možnosti jejího využití se výrazně posunuly z oblasti experimentální do oblasti klinické. Ve výzkumu kolorektálních karcinomů bylo za posledních pět let využito DNA čipů ve více než šedesáti studiích. Tyto práce popisovaly schopnost čipů odlišit nádorovou tkáň od zdravé střevní sliznice, rozdělit nádory podle histopatologického stádia, anatomické lokalizace, mikrosatelitní nestability, determinovat znaky regionálních a vzdálených metastáz v primárních nádorech, predikovat léčebnou odpověď a identifikovat prognostické skupiny pacientů. Srovnatelnost a reprodukovatelnost výsledků DNA čipových studií bohužel výrazně ovlivňuje jejich technologická rozmanitost. Přesto jsme našli několik desítek genů, potenciálních markerů kolorektální karcinogeneze, jejichž pozměněná exprese v nádorové tkáni byla pozorována ve dvou a více nezávislých studiích. Slibné výsledky přinesly práce zaměřené na využití profilů genové exprese ke stanovení prognózy. Průměrná senzitivita predikce relapsu nádorového onemocnění, vzdálenostní progresse a délky celkového přežití pomocí profilů genové exprese byla pro všechny tři parametry přibližně 80%. Dobré analytické vlastnosti prokázaly DNA čipy také v predikci léčebné odpovědi. Klinické využití profilů genové exprese bude znamenat zásadní krok vedoucí směrem k individualizaci léčby a dispenzarizace pacientů s kolorektálními karcinomy.

Klíčová slova: kolorektální karcinom, DNA čipová technologie, genová exprese, patogeneze, prognóza, predikce léčebné odpovědi

Summary

DNA microarray technology is currently the most effective and widespread technique used for gene expression studies. Over the last years the number of reports related to this technology exponentially increases and possibilities of DNA microarrays usage markedly drifted from basic to clinical research. DNA microarrays were used in more than sixty studies focused on colorectal cancer during last five years. This reports show efficiency of this technology to distinguish tumor from normal colonic tissue and classify tumors in order to their pathological grade, anatomic localization and microsatellite status. Subsequent papers demonstrate abilities of gene expression profiles to determine molecular signature of metastatic disease in primary tumors and predict therapy response and disease prognosis. However, comparability and reproducibility of studies based on DNA microarrays are notably affected by their technological diversity. Anyway, we found several genes (potential markers of colorectal carcinogenesis) with altered expression in tumors identified by two or more independent studies. Promising results were reached by gene expression profiles in prediction of colorectal cancer prognosis. DNA microarrays showed good analytical ability also in therapy response prediction. Clinical application of gene expression profiles will be the important advance leading to individualized therapy and dispensarization of patients with colorectal cancer.

Key words: colorectal cancer, DNA microarray technology, gene expression, pathogenesis, prognosis, prediction of therapy response

1. Úvod

Kolorektální karcinomy (KRK) patří v České republice k nejčtenějším nádorovým onemocněním. Poslední publikovaná data udávají jejich roční incidenci 78 případů a mortalitu 41 případů na 100.000 obyvatel. To naši zemi řadí na první místo v Evropě a jedno z předních míst ve světě. V léčbě tohoto onemocnění i přes vzrůstající náklady není dosahováno uspokojivých výsledků. Prognóza pacientů závisí nejen na použitých léčebných modalitách, ale i na stavu pokročilosti

onemocnění při zahájení léčby. Klinický výzkum se proto v současné době zaměřuje na prevenci, včasnou detekci, optimální selekci pacientů pro adjuvantní chemoterapii a individuální chemoterapeutický plán založený na biologických vlastnostech konkrétního nádoru.

Technologie DNA čipů umožňuje ve velmi krátkém čase paralelně monitorovat expresi tisíců genů, případně celý lidský genom na úrovni RNA (tedy transkriptom) [1,2]. Díky výrazným alteracím v expresních profilech „zblázněné“ nádorové

buňky je ideální aplikací pro tuto technologii právě onkologický výzkum [3]. Posun z oblasti základního výzkumu ke klinickému využití DNA čipů znamenala práce T. R. Goluba a kol. (1999) publikována v Science. Pomocí profilů genové exprese dokázal odlišit pacienty s akutní myeloidní a akutní T- a B-lymfoblastickou leukémií [4]. Klíčovou práci z hlediska onkologické prognostiky provedla van't Veerová a kol. (2002), která analyzovala profily genové exprese primárních nádorů pacientek s karcinomem prsu a pomocí 70 genů byla schopná predikovat metastázování nových pacientek s 89% přesností [5]. Tato sada genů je v současnosti ověřována multicentrickou klinickou studií a čeká na svoje uplatnění v rutinní klinické praxi.

Technologie DNA čipů byla během poledních sedmi let opakovaně využívána rovněž ve výzkumu kolorektálních karcinomů. Cílem tohoto přehledu je shrnout nejen nové poznatky o karcinogenním procesu, kterých bylo pomocí DNA čipové technologie dosaženo, ale také výsledky klinických studií zaměřených na prognózu a predikci léčebné odpovědi KRK a zhodnotit možnosti využití profilů genové exprese k individualizaci léčby a dispenzarizace pacientů s kolorektálními karcinomy [6].

2. Srovnání expresních profilů nádorové tkáně a normální střevní sliznice

Doposud největší množství DNA čipových studií bylo zaměřeno na srovnávání expresních profilů nádorové tkáně a k ní přílehlé normální střevní sliznice [7-23, 35]. Výstupem z těchto studií byla vždy sada genů s pozměněnou expresí, na základě které bylo možné s určitou citlivostí rozlišit nádorovou tkáň od normálního střevního epitelu. Byly takto identifikovány stovky nových genů, potenciálních markerů nádorové transformace, ale bohužel při minimálním průniku nalezených genových sad mezi jednotlivými studiemi.

Když opomeneme základní parametry ovlivňující váhu studie jako je například počet zkoumaných vzorků [24], podílí se na

variabilitě výsledků další faktory jako nehomogenní soubory pacientů, rozdílná kritéria pro kvalitu vstupního materiálu, validace výsledků alternativní metodikou, variabilita statistických metod, různá kritéria statistické významnosti nebo tzv. ischemické zdržení (čas od podvázání cév do zamražení vzorku) [25-27]. Díky výše uvedeným faktorům můžeme z velkého množství doposud identifikovaných genů pouze malé množství považovat za kandidátní geny nádorové transformace.

Vybrané studie srovnávající profily genové exprese u nádorové tkáně a normálního střevního epitelu jsou shrnuty a charakterizovány v tabulce č. 1. I přes rozmanitost čipových platform a nekonzistentnost metodických postupů se nám podařilo nalézt několik desítek genů s pozměněnou expresí identifikovanou ve dvou a více nezávislých studiích [28]. Tyto geny jsou shrnuty v konkrétními citacemi a rozčleněny podle biologické funkce v tabulce č. 2. U většiny z nalezených genů byla již dříve pozorována pozměněná exprese buď přímo u KRK nebo u jiných typů nádorových onemocnění.

Velkou skupinu z těchto genů tvoří regulátory buněčného cyklu a apoptózy, onkogeny a nádorové supresory. Typickým regulátorem buněčného cyklu je CDC25B, člen CDC25 fosfatázové rodiny, který aktivuje cyklin-dependentní kinázu CDC2 a je proto klíčový pro indukci M-fáze buněčného cyklu, s čímž souvisí jeho onkogenní vlastnosti. Zvýšené hladiny chemokinu a růstového onkogenu GRO-1 strukturně podobného interleukinu 8, byly již asociovány se ztrátou kontroly buněčného cyklu a angiogenezi u melanomu [29] a karcinomu prostaty [30]. Zvýšená exprese onkogenu MYC, který má klíčovou úlohu v kontrole buněčné proliferace a diferenciaci, byla pozorována ve více než 70% KRK [31]. Nárůst hladin onkogenu MYC byl opakovaně potvrzen pomocí DNA čipů. Onkogen MYC je jedním z cílových genů regulovaných β-kateninovým komplexem. β-katenin je ve zdravé tkáni inhibován produktem APC (adenomatous polyposis coli) genu, jehož alterace se vyskytují u většiny KRK. Mutované formy APC genu ztrácí schopnost vázat se na β-katenin, který může

Tabulka č. 1: Vybrané čipové studie zaměřené na molekulární charakterizaci kolorektálních karcinomů

Reference	Rok	Čipová platforma	N sond	N genů +/-	Počet vzorků	Validace
Srovnání nádorové tkáně a normální střevní sliznice						
Notterman a kol. (10) *	2001	Affymetrix GeneChip	6600	19/47	22 NSE, 4 AD, 18 KRK	RT-PCR
Takemasa a kol. (13)	2001	cDNA microarray	4608	23/36	16 NSE, 16 KRK	
Agrawal a kol. (35)	2002	Affymetrix GeneChip	12000	339	10 NSE, 60 KRK	NB, TMA
Birkenkamp-Demtroder a kol. (15)	2002	Affymetrix GeneChip	6800	88/70	6 NSE 21 LKRK	RT-PCR
Lin a kol. (16) *	2002	cDNA microarray (LCM)	23040	50	20 NSE, 11 KRK, 9 AD	
Williams a kol. (19)	2003	cDNA microarray	9592	574/2058	20 NSE, 20 KRK	RT-PCR
Bertucci a kol. (20)	2004	cDNA microarray	8074	130/115	23 NSE, 22 KRK	TMA
Birkenkamp-Demtroder a kol. (22)	2005	Affymetrix GeneChip	7129	80	20 NSE, 25 KRK	RT-PCR
Croner a kol. (7)	2005	Affymetrix GeneChip	22284	168/283	10 NSE, 10 KRK	
Jansová a kol. (8)	2006	cDNA microarray	19008	31/164	18 NSE, 18 KRK	RT-PCR
Kolorektální karcinomy různé anatomické lokalizace						
Bertucci a kol. (20)	2004	cDNA microarray	8074	46	10 LKRK, 9 PKRK	TMA
Birkenkamp-Demtroder a kol. (22)	2005	Affymetrix GeneChip	7129	30	15 LKRK, 10 PKRK	RT-PCR
Srovnání kolorektálních karcinomů vzhledem k mikrosatelitní nestabilitě						
Mori a kol. (38)	2003	cDNA microarray	8064	20	12 MSIK, 29 MSSK	RT-PCR
Banerjea a kol. (39)	2004	Affymetrix GeneChip	22284	542	29 MSIK, 104 MSSK	RT-PCR
Primární nádory ve vztahu k rozvoji regionální a vzdálenostní progresi						
Yanagawa a kol. (42)	2001	cDNA microarray (LCM)	9121	40/7	10 KRK, 10 HMKRK	RT-PCR
Bertucci a kol. (22)	2004	cDNA microarray	8074	46	6 KRKNO, 13KRKNX	TMA
Croner a kol. (40)	2005	Affymetrix GeneChip	22284	neuvezeno	41 KRKNO, 25KRKNX	
* bylo provedeno také srovnání expresních profilů adenomu a adenokarcinomu						
<i>N sond - odpovídá počtu genů detekovatelných daným čipem; N genů +/- - počet nalezených up/down regulovaných genů; LCM - laserová mikrodisekce; NB - Northern Blot; TMA - tkáňové microarrays; RT-PCR - reverzní transkriptázová PCR; IHC - imunohistochemické metody; NSE - normální střevní epitel; KRK - kolorektální karcinom; AD - adenom; LKRK - levostranný KRK; PKRK - pravostranný KRK; MSIK - KRK s mikrosatelitní nestabilitou; MSSK - KRK bez mikrosatelitní nestability; HMKRK - jaterní metastáze KRK; KRKNX - primární KRK metastazující do jater; KRKNO - primární KRK metastazující do uzlin; KRKNO - primární KRK bez postižení uzlin</i>						

Tabulka č. 2: Geny s rozdílnou expresí v nádorové tkáni identifikované minimálně dvěma nezávislými čipovými studiemi

GeneBank	Symbol	Gene Name	□ Reference
Buněčný cyklus, onkogeny, nádorové supresory, apoptóza			
S78187	CDC25B	cell division cycle 25B	+ 7, 9, 10, 15, 19
X54489	CXCL1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (MGSA, GRO-1)	+ 7, 9, 10, 18, 19, 23
K02276	MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	+ 7, 10, 19, 23, 35
H74208	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2 (Bcl-2)	+ 19, 20
AI800528	BIRC5	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	+ 7, 19
U33286	CSE1L	CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast) (CAS)	+ 10, 15
U37518	TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10 (TRAIL)	- 9, 19
U60519	CASP10	caspase 10, apoptosis-related cysteine peptidase	- 9, 12
Transkripční faktory			
U14134	GTF3A	general transcription factor IIIA	+ 10, 15
Růstové faktory, cytokiny			
M38449	TGFB1	transforming growth factor, beta 1 (Camurati-Engelmann disease)	+ 7, 9, 15, 22
M77349	TGFB1	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa (BIGH3)	+ 9, 10, 14, 15, 35
U88323	GDF15	growth differentiation factor 15 (PLAB, PDF, PTGFB)	+ 18, 19
Buněčná signalizace			
AF487339	NME1	non-metastatic cells 1, protein (nm23A)	+ 10, 11, 20, 23
M97496	GUCA2A	guanylate cyclase activator 2A (guanylin)	- 10, 15, 17
Z70295	GUCA2B	guanylate cyclase activator 2B (uroguanylin)	- 15, 35
Metabolické enzymy a transportní proteiny			
M61832	AHCY	S-adenosylhomocysteine hydrolase	+ 7, 10, 15
Z26491	COMT	catechol-O-methyltransferase	- 10, 15, 17
M10050	FABP1	fatty acid binding protein 1, liver	- 7, 13, 15
M33987	CA1	carbonic anhydrase I	- 7, 19, 22
J03037	CA2	carbonic anhydrase II	- 7, 8, 9, 13, 19, 35
M83670	CA4	carbonic anhydrase IV	- 7, 10, 15, 20, 22, 35
X04350	ADH1C	alcohol dehydrogenase 1C (class I), gamma polypeptide (ADH3)	- 7, 9, 10, 35
K01383	MT1A	metallothionein 1A (functional)	- 7, 11, 15, 19, 21, 35
U29091	SELENBP1	selenium binding protein 1	- 7, 13, 15
U14528	SLC26A2	solute carrier family 26, member 2	- 13, 35
L02785	SLC26A3	solute carrier family 26, member 3; colon mucosa-associated (DRA)	- 10, 15, 35
Proteiny extracelulární matrix, adhezivní molekuly, angiogeneze			
BC054498	COL1A2	collagen, type I, alpha 2	+ 7, 8, 13, 17, 20, 35
J03040	SPARC	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	+ 7, 10, 19, 20, 35
J04765	SPP1	secreted phosphoprotein 1 (osteopontin)	+ 10, 22, 35
M32977	VEGF	vascular endothelial growth factor	+ 13, 13, 40
AJ002550	MMP1	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	+ 7, 14, 20, 22
AL542407	MMP2	matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase)	+ 20, 22
AI628953	MMP3	matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)	+ 7, 20, 22
BC003635	MMP7	matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)	+ 7, 20, 22, 40
AK075448	MMP11	matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)	+ 7, 20
AA411757	CEACAM1	carcinoembryonic antigen-related molecule 1 (biliary glycoprotein)	- 10, 15, 19

□ - *exprese genu (+ up-regulovaný, - down-regulovaný) v nádorové tkáni ve srovnání s normálním střevním epitelem*

tvorit komplexy s jinými proteiny, například TCF (T-cell factor). TCF/ β -kateninový komplex je spojen s trvalou aktivací Wnt signální dráhy a následně zvýšenou expresí onkogenu MYC [31]. Dalším z genů aktivovaných signální drahou TCF/ β -katenin je regulátor apoptózy a buněčné proliferace BIRC5 (survivin). Survivin je členem rodiny IAP (inhibitor of apoptosis protein) a jeho antiapoptotický účinek je spojen především s vazbou na různé druhy kaspáz a jejich inhibicí [31]. Zvýšená hladina antiapoptotického proteinu Bcl-2 zvyšuje u nádorových buněk schopnost přežívání a jejich rezistenci vůči proapoptickým stimulům, jako je odstranění růstových faktorů a glukózy, hypoxie, antionkogen p53 a chemoterapeutická léčba (je jedním z MDR „multi drug resistance“ proteinů) [31]. Snížená exprese byla pozorována u genů proapoptických faktorů jako je TNFSF10 (TRAIL) a kaspáza 10 (CASP10). TRAIL funguje jako induktor apoptózy specificky v nádorových buňkách agonizací receptorů TRAIL-R1 a TRAIL-R2. Jeho snížená exprese v nádorové tkáni je spojena s nižší apoptotickou aktivitou. U kolorektálních karcinomů byla zvýšená exprese receptoru TRAIL-R1 pozitivně asociována s lepší exprese free survival (DFS) a sníženým rizi-

kem relapsu onemocnění [32]. Na skupině genů spojených s buněčným cyklem a apoptózou byl pozorován nárůst exprese především u genů s antiapoptickým účinkem, naproti tomu sníženou expresí vykazovaly geny proapoptické. Všechny tři nalezené geny související s růstovými faktory (TGFB1, TGFB1, GDF15) patří do proteinové rodiny TGF- β . Alterace v TGF- β signální dráze byly u KRK dříve pozorovány především na úrovni TGF- β receptorů. Mutace v genu pro TGF- β receptor II se nacházejí u většiny KRK s mikrosatelitní nestabilitou a asi v polovině všech ostatních. Navíc zvýšená hladina proteinu SMAD4, který je jedním z intracelulárních transduktorů signálu TGF- β receptorů, byla asociována se signifikantně lepší prognózou KRK, a jeho deficience s neschopností TGF- β signální dráhy inhibovat proliferaci v G1-fázi buněčného cyklu, již dříve popsanou u transformovaných buněk [31]. Gen pro NME1 (nm23), kódující nukleotid difosfát kinázu, svůj název získal díky snížené expresi ve vysoce metastatických nádorových liniích. Tato inverzní asociace byla potvrzena také v klinické studii s KRK nemetastazujícími a metastazujícími do jater [32].

Tabulka č. 3: Číповé studie zaměřené na stanovení prognózy a predikci léčebné odpovědi kolorektálních karcinomů

Reference	Rok	Číповá platforma	N sond	N genů +/-	Počet vzorků	Validace
Využití mikročipů ke stanovení prognózy						
Wang a kol. (45)	2004	Affymetrix GeneChip	22284	23	31 KRKDP, 43 KRKSP	GeneChip
Eschrich a kol. (46)	2005	cDNA microarray	31872	43	30 KRKDP, 45 KRKSP	
Barrier a kol. (43)	2005	Affymetrix GeneChip	22284	30	9 KRKDP, 9 KRKSP	
Arango a kol. (47)	2005	Affymetrix GeneChip	22284	218	15 KRKDP, 10 KRKSP	RT-PCR
Využití mikročipů k predikci léčebné odpovědi a její charakterizaci na molekulární úrovni						
Mariadason a kol. (48)	2003	cDNA microarray	9216	50	30 KRK buněčných linií	RT-PCR
Inoue a kol. (44)	2004	Affymetrix GeneChip	12000	neuveдено	12 KRK	RT-PCR
Arango a kol. (49)	2004	cDNA microarray	9216	neuveдено	30 KRK buněčných linií	
Ghadimi a kol. (51)	2005	cDNA microarray	9984	54	30 KRK	RT-PCR
Souza a kol. (50)	2005	Affymetrix GeneChip	22284	152/40	buněčná linie SW-620	RT-PCR
<i>N sond - odpovídá počtu genů detekovatelných daným číпом; N genů +/- - počet nalezených up/down regulovaných genů; RT-PCR - reverzně transkriptázová PCR; KRKDP - kolorektální karcinomy s dobrou prognózou; KRKSP - kolorektální karcinomy se špatnou prognózou</i>						

Další velkou skupinu tvoří geny pro metabolické enzymy a transportní proteiny. Změny v metabolických drahách mastných kyselin a jejich význam v karcinogenezi KRK byly vícekrát popsány [30,33]. U nalezeného genu pro FABP1 byla snížená exprese již pozorována a předpokládá se, že bude mít funkci v diferenciaci enterocytů [13]. Ve většině DNA číповých studií byla pozorována snížená exprese alespoň jednoho metalothioneinu, nejčastěji MT1A. Metalothioneiny (MT) jsou ubiquitární nízkomolekulární proteiny s vysokou afinitou k dvouvázným kovům. Imunohistochemické studie na KRK prokázaly v souladu s výsledky číповých analýz signifikantně sníženou expresi MT, negativně korelující s klinickým stádiem onemocnění a postižením lymfatických uzlin [21]. Často diskutovanými markery kolorektální karcinogeneze jsou karbonát anhydrázy CA2 a CA4. Karbonát anhydrázy reverzibilně hydratují CO₂ a jejich snížené hladiny v primární nádorové tkáni souvisí s mírou angiogeneze, invazivitou KRK (i jiných typů nádorových onemocnění) a rozvojem vzdálených metastáz [34]. Patogeneze nádorové růstu je spojena s přestavbou extracelulární matrix (ECM), redistribucí adhezivních molekul a aktivací angiogeneze. Pomocí DNA číповé technologie byly nalezeny případně potvrzeny geny, které s těmito procesy souvisí. Agrawal a kol. (2002) identifikoval na souboru pacientů, kteří byli rozděleni do skupin podle jednotlivých klinických stádií onemocnění jako hlavní marker progresu kolorektálních karcinomů SSP1 (osteopontin). Osteopontin je glykoprotein vázající integriny, indukující antiapoptotické signální dráhy. Poměr hladin osteopontinu v normálním střevním epitelu (NSE) a KRK je 1:15, mezi NSE a jaterními metastázami KRK je 1:30 [35]. K nárůstu hladin osteopontinu pravděpodobně dochází stimulací Wnt signální dráhy jako u invazivních mamárních karcinomů, ovšem u KRK způsobené zvýšenou hladinou TCF/ β -kateninu následkem mutací v APC genu [32]. Mezi nejčastěji prokázané stimulatory nádorové angiogeneze patří VEGF, což potvrzují i výsledky některých DNA číповých studií. Jeho zvýšené hladiny v primárním nádoru a v krevním séru byly opakovaně pozitivně korelovány s horší prognózou nádorových onemocnění včetně KRK. VEGF hraje důležitou roli při tvorbě jaterních metastáz, ve kterých už ovšem k jeho zvýšené expresi nedochází. Vysvětluje se to hypoxickou indukci exprese VEGF v rostoucím primárním nádoru, která v dostatečně prokveném jaterním parenchymu není přítomna [32]. Matrix metaloproteinázy (MMP-1,-2,-3,-7,-11) mají komplexní úlohu v procesu nádorového růstu a metastazování, jejich zvýšené hladiny byly častokrát nalezeny v souvislosti s invazivitou a metastatickým potenciálem různých typů nádorů včetně KRK. Degradací bazálních membrán kompartmentových systémů ovlivňují nejen invazi nádoru do bezprostředního okolí nebo intra- a extravazaci nádorových buněk, ale také migraci buněk v místě tvorby vzdálených metastáz. Hrají významnou úlohu v procesu angiogeneze, a to vytvářením prostoru pro nově vznikající cévy, podporou mobility endotelií a invazi buněk nádorů do cév. Zvýšené hladiny matrix metaloproteináz u KRK jsou

v souladu s jejich biologickou funkcí [32]. Častokrát popisovaný nárůst v expresi kolagenu typu I. (COL1A2), jehož exprese je omezena pouze na fibroblasty, potvrzuje předchozí pozorování epitel-mezenchymálních interakcí u karcinomů pozorování, kde měly zásadní vliv na chování nádorových buněk, především jejich vlastnosti spojené s progresí a invazivitou [36]. DNA číповé studie prokázaly schopnost odlišit nádorovou tkáň od normálního střevního epitelu na základě rozdílných profilů genové exprese. Výsledky těchto studií korelují se současnými znalostmi molekulárně biologické podstaty kolorektálních karcinomů a obohacují je o nové poznatky.

3. Kolorektální karcinomy různé anatomické lokalizace

Mnoho epidemiologických, morfologických a molekulárně biologických pozorování svědčí pro odlišnosti v karcinogenezi sporadických KRK v závislosti na jejich anatomické lokalizaci. Karcinomy levého a pravého colon mohou tvořit rozdílné skupiny nádorů díky svému rozlišnému embryonálnímu původu a díky tomu, že jsou vystaveny různému střevnímu obsahu. Pravostranné kolorektální karcinomy (PKRK) se častěji vyskytují u žen, zatímco levostranné (LKRK) jsou běžnější u mužů. PKRK a LKRK se také rozdílně klinicky manifestují a mají rozdílnou prognózu [37]. Přestože mají PKRK větší průměr a jsou hůře diferencované, vyznačují se příznivější prognózou a jsou spojeny se signifikantně lepší léčebnou odpovědí na 5-fluorouracil [15].

Studii zaměřenou pouze na porovnání LKRK a PKRK včetně přilehlého střevního epitelu (NSE) provedla Birkenkamp-Demtroderová a kol. (2005). Alterace v genové expresi našla u 186 genů v levostranných a 118 genů v pravostranných KRK. Levostranné KRK vykazovaly vůči pravostranným signifikantně nižší expresi cytokeratinů 8, 19 a 20, vyšší exprese byla pozorována u cyklooxygenázy 2 (COX2), caldesmonu 1 a transgelinu 11 [22].

Je zřejmé, že rozdíly v genové expresi mezi levostrannými a pravostrannými KRK existují, a pravděpodobně budou mít souvislost s jejich rozdílným vývojem a prognózou onemocnění. Nalézt mechanismus odpovědný za lepší léčebnou odpověď PKRK na 5-fluorouracil a přesněji charakterizovat LKRK a PKRK a jejich rozdíly na molekulární úrovni současný stav znalostí bohužel nemožňuje. Lokalizace KRK by se v budoucnosti mohla stát důležitým prognostickým a prediktivním faktorem při navrhování individuálního terapeutického plánu.

4. Srovnání kolorektálních karcinomů vzhledem k mikrosatelitní nestabilitě

Přibližně 90% hereditárních nepolypózních kolorektálních karcinomů (HNPCC) a 20% sporadických KRK vykazují tzv. mikrosatelitní nestabilitu (MSI). Četné alterace mikrosatelitů krátkých repetitivních sekvencí DNA v průběhu celého genomu jsou způsobeny replikačními chybami DNA polymerázy, které vznikají během vývoje tumoru a nebyly adekvátním způsobem opraveny. Nádory vykazující mikrosatelitní nestabili-

tu většinou nejsou spojeny s mutacemi onkogenu RAS a nádorového supresoru p53, mají lepší prognózu a léčebnou odpověď a jejich expresní profily jsou odlišné od nádorů MSI-. Mori a kol. (2003) zjišťoval vliv mikrosatelitní nestability na profily genové exprese a srovnával jeho významnost s jinými molekulárními (status p53, mutace k-RAS, MLH1, MSH2) a klinickými charakteristikami (lokalizace, grade, věk, pohlaví, klinické stádium) pomocí vícerozměrné statistické analýzy PCA (analýza hlavních komponent). Z nalezených komponent korelujících s molekulárními a klinickými vlastnostmi měla největší vliv na variabilitu expresních profilů komponenta schopná signifikantně odlišit fenotyp MSI+ od MSI- ($p < 0,0001$). Pomocí této komponenty bylo možné statisticky významně rozlišit také anatomickou lokalizaci nádoru a histopatologický grade, které byly již dříve ve stavem MSI asociovány. Nádory s fenotypem MSI+ byly méně diferencované a byly lokalizovány napravo. Několik genů tvořících tuto komponentu bylo již dříve v souvislosti s MSI zkoumáno nebo potvrzeno. Například snížená exprese genu MLH1, který je součástí systému zodpovědného za opravy chybného párování bází, proapoptického genu BAX nebo zvýšená exprese genů pro glykoproteiny mucin 1 a mucin 5 [38]. Další specifickou vlastností MSI+ nádorů je častá infiltrace lymfocyty. Lymfocyty infiltrující nádorový epitel (IELs) jsou převážně cytotoxické, aktivované a uvolňují mediátory buněčné smrti. Fenotyp apoptotických MSI+ je spojen se zvýšenou apoptickou aktivitou, ale souvislost mezi IELs a apoptózou zatím nebyla prokázána. Někteří se domnívají, že IELs je pouze sekundární jev bez jakékoliv biologické relevance. DNA čipová studie provedená Banerjeem a kol. (2004) spíše potvrzuje imunogenní vlastnosti KRK s mikrosatelitní nestabilitou. Zvýšená exprese velkého množství genů prozánětlivých faktorů (interleukin 8 a 18, granulysin, HSP70, HSP110) a apoptotických genů (TNF induced protein, TRAIL), svědčí pro spojení IELs s aktivní imunitní odpovědí [39]. Follow-up analýzy potvrdily lepší celkové přežití u pacientů s tímto typem nádoru. Další možné vysvětlení lepší prognózy pacientů s KRK fenotypu MSI+ a jejich zvýšené apoptotické aktivity vychází z koncepce tzv. „oslabené malignity“, která je založena na předpokladu, že akumulace chyb způsobených špatným párováním bází může překonat svůj karcinogenní potenciál a v důsledku oslabit životaschopnost nádorových buněk [39]. Zvýšená apoptotická aktivita nádorů s MSI+ fenotypem bude ovšem ovlivněna spíše oběma výše uvedenými mechanismy než výhradně jedním z nich.

5. Primární nádory ve vztahu k rozvoji regionální a vzdálenostní progresse

V současné době se předpokládá, že schopnost metastázování získává pouze malá subpopulace buněk primárního nádoru somatickými mutacemi během nádorového růstu, odhadem méně než jedna na 10 miliónů nádorových buněk. Tuto představu o ojedinělých metastatických buňkách v mase primárního nádoru zpochybněla zásadní práce Ramaswamy a kol. (2002). Identifikovala skupinu 128 genů asociovaných s metastatickou tkání, které ji odlišovaly od tkáně primárního nádoru. Tento metastatický genový profil byl ovšem přítomen také v některých testovacích primárních nádorech, které byly chybně identifikovány jako metastatické ložisko. Na dalších 279 primárních adenokarcinomech různého původu byl metastatický genový profil signifikantně asociován s nádory, u kterých došlo k rozvoji metastáz a měly horší prognózu. Ramaswamy formulovala hypotézu, že program genové exprese metastatického onemocnění může být přítomen již v molekulární výbavě primárního nádoru, a proto identifikovatelný v době diagnózy [36]. Postižení regionálních lymfatických uzlin je jedním z nejdůležitějších prognostických faktorů KRK a klíčovým kritériem klinických klasifikačních systémů. Jejich předoperační diagnostika má význam pro indikaci neoadjuvantní chemoradio-terapie u rektálních karcinomů a radikalitu chirurgického zákro-

ku. Bohužel citlivost standardních zobrazovacích metod (CT, PET) se pohybuje pouze mezi 50 a 60%. Bertucci a kol. (2004) identifikoval sadu 46 genů se statisticky významně rozdílnou expresí v primárních nádorech spojených s metastatickým postižením regionálních uzlin. Tato sada genů souvisela také s relapsem nádorového onemocnění [20]. Na klinické využití čipové technologie v diagnostice postižení regionálních uzlin se zaměřil Croner a kol. (2005). Srovnával schopnost předoperační predikce regionálních metastáz pomocí expresních profilů a konvenčních zobrazovacích metod. Po doplnění výsledků čipové studie ke standardním diagnostickým algoritům se jejich senzitivita zvýšila přibližně o 12% [40]. Přítomnost molekulárního profilu spojeného s rozvojem jaterních metastáz v primárních KRK ověřoval Li a kol. (2004). Identifikoval soubor 429 genů se signifikantně rozdílnou expresí mezi nádory nemetastazujícími a metastazujícími do jater [41]. U studií s pokročilými kolorektálními karcinomy bohužel není možné rozlišit jestli k alteracím v jejich expresních profilech došlo v časných nebo pozdních stádiích karcinogeneze. Proto jejich klinické využití pro prognózu a predikci diseminace je diskutabilní. K relevantním výsledkům by bylo možné dospět pouze pomocí velkého souboru prospektivně sledovaných pacientů.

6. Využití mikročipů ke stanovení prognózy

Prognosticky odlišné skupiny pacientů s kolorektálními karcinomy se v současnosti vymezují na základě histologické klasifikace, gradingu, klinického rozsahu a ojedinělých molekulárních markerů. Tyto faktory jsou pro chirurgicky vyléčené pacienty rozhodující z hlediska indikace adjuvantní chemoterapie. Jejich prediktivní síla ovšem není dostatečná a 25-30% pacientů v klinickém stádiu (dále jen stádium) Dukes B umírá do pěti let na relaps nádorového onemocnění. Racionální přístup k indikaci adjuvantní léčby nabízí molekulární charakterizace této vysoce rizikové podskupiny pomocí technologie DNA čipů.

Nadějně výsledky přinesla studie zaměřená na hledání nových prognostických markerů relapsu onemocnění využitím oligonukleotidových mikročipů Affymetrix U133a. Na souboru 74 pacientů ve stádiu Dukes B byla identifikována sada 23 genů, která na nezávislém validačním souboru 36 pacientů predikovala relaps s přesností 78% [45].

DNA mikročipy byly použity k vytvoření molekulárního stagingu KRK, který měl výrazně vyšší prognostický potenciál než standardní Dukesova klasifikace [46]. Pro 78 vzorků kolorektálních karcinomů byly získány expresní profily, z nichž se pomocí klastrové analýzy podařilo identifikovat sadu 43 genů, která umožňovala nezávisle na klinické klasifikaci rozdělit pacienty na dvě prognostické skupiny ve vztahu k celkovému přežití. Při cross-validaci byla tato sada genů, obsahující mimo jiné také geny pro osteopontin a neuregulin, schopná předpovědět 36 měsíční přežití s přesností 90% ($p < 0,001$). Na základě molekulární klasifikace byla navíc ze skupiny pacientů ve stádiu Dukes B vyčleněna podskupina, která měla horší prognózu než část pacientů ve stádiu Dukes C. Prognostická síla této skupiny genů byla validována na nezávislé skupině 95 pacientů z jiné než testovací populace s využitím rozdílné čipové platformy. Konverze mezi jednotlivými technologiemi znamenala redukci genové sady z 43 na 26 genů a její schopnost predikce 36 měsíčního přežití byla 78% [46]. Pro dobrou reprodukovatelnost a vysoký prognostický potenciál tohoto souboru genů svědčí nejen zachování vysoké predikční síly při validaci na velkém souboru jiné populace při použití jiné čipové technologie, ale také výskyt genů již dříve asociovaných s progresí onemocnění v tomto souboru.

Retrospektivní studii zaměřenou na predikci relapsu onemocnění provedl na souboru 25 pacientů klinického stádia Dukes C, u kterých byl jedinou léčebnou modalitou radikální chirurgický zákrok Arango a kol. (2005). Je to jediná práce, ve které byla vstupním materiálem RNA izolovaná z tkání fixovaných ve formalinu a uložených v parafinových bločcích

(FFPE). Podmínkou studií založených na FFPE je důkladná kontrola kvality vstupního materiálu (u této studie znamenala redukci z 91 na 25 vzorků). Získaný klasifikátor tvořený 17 geny byl schopný při cross-validaci správně zařadit 88% pacientů a rozdělit je z hlediska dlouhodobého DFS na hladině pravděpodobnosti ($p < 0,0001$) [47]. Tato práce dokazuje, že je možné provádět retrospektivní čipové studie založené na formalinem fixovaných tkáních, ale musí být dodržena přísná kritéria pro kontrolu kvality vstupního materiálu.

7. Využití mikročipů k predikci léčebné odpovědi a její molekulární charakterizaci

Současná klinická onkologie staví na výsledcích randomizovaných klinických studií a za léčebný standard je přijímán statisticky nejlepší léčebný postup. Přitom se nebere ohled na skutečnost, že i chemoterapie dosahující statisticky horšího výsledku může být individuálně účinnější. Současné možnosti prediktivní onkologie bohužel nenabízejí dostatečně senzitivní testy schopné predikovat léčebnou odpověď v rutinní klinické praxi. Doposud prováděné testování ojedinělých např. metabolických markerů cytotatik jako je tymidylát syntáza (TS), tymidin fosforyláza (TP) a dihydroypyrimidin dehydrogenáza (DPD), se ukázalo jako nedostatečně účinné. Hned první DNA čipové studie na buněčných liniích kolorektálních karcinomů potvrdily, že mechanismus nádorové rezistence je značně komplexnější problém, když různá cytostatika indukovala expresi řádově až stovek genů [48, 49]. Nejčastěji zkoumaným cytostatikem je 5-fluorouracil (5-FU), který přestože je společně s leukovorinem léčbou první volby při adjuvantní chemoterapii kolorektálních karcinomů, má léčebný efekt pouze u přibližně 20% pacientů. Mariadason a kol. (2003) identifikoval 50 genů korelujících s apoptózou indukovanou účinkem 5-FU na 30 buněčných liniích KRK. Tento soubor genů byl schopný předikovat léčebnou odpověď signifikantně účinněji než používané prediktory jako jsou TS, TP, DPD, status p53 nebo mikrosatelitní nestabilita [48].

Inhibitor topoisomerázy I, irinotekan se indikuje samostatně u 5-FU rezistentních pacientů nebo v kombinaci s 5-FU a leukovorinem (režim FOLFIRI) při léčbě pokročilého KRK. Nové mechanismy účinku irinotekanu (jeho aktivního derivátu SN-38) byly studovány na buněčné linii SW-620. Indukce více než dvojnásobné změny exprese byla pozorována u 192 genů [50].

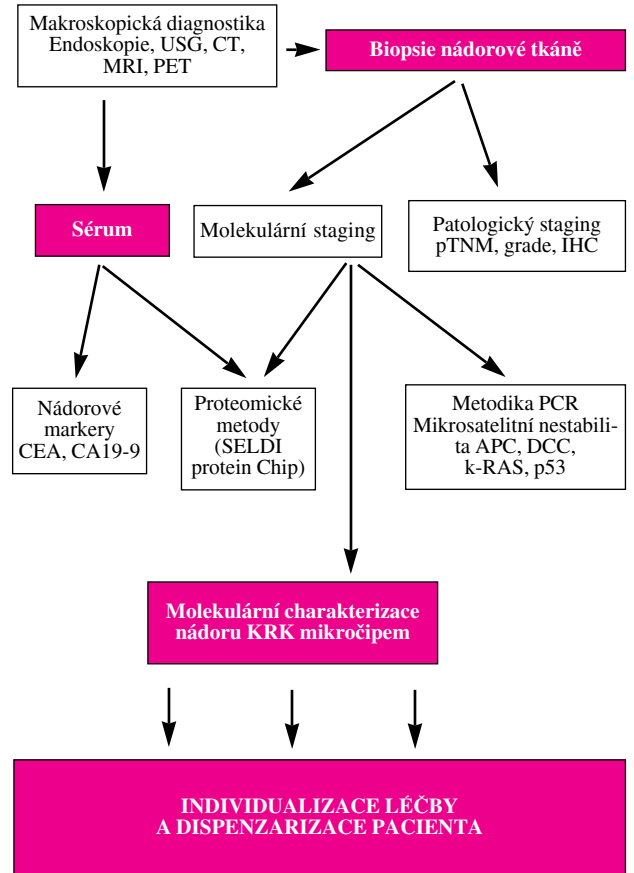
Dalším lékem používaným v kombinaci s 5-FU a leukovorinem je oxaliplatin (režim FOLFOX). Vystavení nádorových buněk účinku oxaliplatinu vede k zablokování G2/M přechodu buněčného cyklu a indukci apoptózy. Na 30 KRK buněčných liniích našel Arango a kol. (2004) soubor genů, mj. obsahující geny zapojené do apoptózy a oprav DNA, schopný predikovat léčebnou odpověď na oxaliplatinu s vyšší senzitivitou než mutační status p53. Schopnost predikce při cross-validaci byla statisticky významná na hladině pravděpodobnosti $p=0,002$ [49].

8. Souhrn - klinické využití mikročipové technologie u pacientů s kolorektálními karcinomy

DNA čipové studie prokázaly schopnost odlišit nádorovou tkáň od normálního střevního epitelu na základě rozdílných profilů genové exprese, a výsledky těchto studií korelují se současnými znalostmi molekulárně biologické podstaty KRK a obohacují je o nové poznatky. Profily genové exprese podpořily hypotézu o rozdílném mechanismu karcinogeneze v levé

a pravé části tlustého střeva a význam anatomické lokalizace nádoru pro prognózu onemocnění a predikci léčebné odpovědi. KRK byly molekulárně charakterizovány z hlediska mikrosatelitní nestability. V karcinogenním procesu nádorů MSI- a MSI+ byly identifikovány rozdíly, které korelují s anatomickou lokalizací nádoru. Nádory MSI+ jsou převážně pravostranné a mají lepší prognózu. V primárních nádorech se podařilo identifikovat znaky regionálních a vzdálených metastáz. Průměrná senzitivita predikce relapsu nádorového onemocnění a délky celkového přežití byla u obou parametrů přibližně 80%. Výzkum predikce léčebné odpovědi byl doposud prováděn především na buněčných liniích a DNA čipy zde prokázaly velice dobré analytické vlastnosti.

Obrázek 1.: Návrh doplněného diagnostického schématu pacientů s kolorektálními karcinomy



Výsledky DNA čipových studií společně se současnými poznatky o molekulární biologii nádorů by v budoucnu mohly sloužit k návrhu specifického KRK nízkohustotního DNA čipu, schopného molekulárně charakterizovat daný nádor a to především z hlediska jeho invazivních vlastností, metastatického potenciálu a rezistence na běžně používaná cytostatika. Získaný expresní profil by zapojením do standardního diagnostického schématu (viz obr. č. 1) umožňoval společně s proteomickými metodami a ostatními používanými diagnostickými kritérii přesnější staging více korelující s klinickým stavem pacienta a biologii nádoru, odhad pravděpodobnosti relapsu onemocnění a parametru celkového přežití a citlivosti nádorových buněk k různým chemoterapeutickým režimům. Klinické využití profilů genové exprese bude znamenat zásadní krok vedoucí směrem k individualizaci léčby a dispensarizace pacientů s kolorektálními karcinomy.

Poděkování

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NR/9076 - 4.

Literatura

1. Svoboda M, Michálek J: Úvod do technologie DNA čipů. *Lék. a Techn.* 35:67-75, 2004
2. Pospíšilová, Mayer J: DNA čipy - moderní metodika analýzy diferencíální genové exprese a její význam pro diagnostiku a léčbu nádorových onemocnění. *Cas Lek ces* 144:11-17, 2005
3. Gabriele L, Moretti F, Pierotti MA, et al: The use of microarray technologies in clinical oncology. *J Transl Med* 4:8, 2006
4. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al: Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286:531-7, 1999
5. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al: Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415:530-6, 2002
6. Liefers GJ, Tollenaar RA: Cancer genetics and their application to individualised medicine. *Eur J Cancer* 38:872-9, 2002
7. Croner RS, Foertsch T, Brueckl WM, et al: Common denominator genes that distinguish colorectal carcinoma from normal mucosa. *Int J Colorectal Dis* 20:353-62, 2005
8. Jansová E, Koutná I, Krontorad P, et al: Comparative transcriptome maps: a new approach to the diagnosis of colorectal carcinoma patients using cDNA microarrays. *Clin Genet* 69:218-27, 2006
9. Kitahara O, Furukawa Y, Tanaka T, et al: Alterations of gene expression during colorectal carcinogenesis revealed by cDNA microarrays after laser-capture microdissection of tumor tissues and normal epithelia. *Cancer Res* 61:3544-9, 2001
10. Notterman DA, Alon U, Sierk AJ, et al: Transcriptional gene expression profiles of colorectal adenoma, adenocarcinoma, and normal tissue examined by oligonucleotide arrays. *Cancer Res* 61:3124-30, 2001
11. Okuno K, Yasutomi M, Nishimura N, et al: Gene expression analysis in colorectal cancer using practical DNA array filter. *Dis Colon Rectum* 44:295-9, 2001
12. Pinheiro NA, Caballero OL, Soares F, et al: Significant overexpression of oligophrenin-1 in colorectal tumors detected by cDNA microarray analysis. *Cancer Lett* 172:67-73, 2001
13. Takemasa I, Higuchi H, Yamamoto H, et al: Construction of preferential cDNA microarray specialized for human colorectal carcinoma: molecular sketch of colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 285:1244-9, 2001
14. Tsunoda T, Nakamura T, Ishimoto K, et al: Upregulated expression of angiogenesis genes and down regulation of cell cycle genes in human colorectal cancer tissue determined by cDNA macroarray. *Anticancer Res* 21:137-43, 2001
15. Birkenkamp-Demtroder K, Christensen LL, Olesen SH, et al: Gene expression in colorectal cancer. *Cancer Res* 62:4352-63, 2002
16. Lin YM, Furukawa Y, Tsunoda T, et al: Molecular diagnosis of colorectal tumors by expression profiles of 50 genes expressed differentially in adenomas and carcinomas. *Oncogene* 21:4120-8, 2002
17. Saito A, Fujii G, Sato Y, et al: Detection of genes expressed in primary colon cancers by in situ hybridisation: overexpression of RACK 1. *Mol Pathol* 55:34-9, 2002
18. Zou TT, Selaru FM, Xu Y, et al: Application of cDNA microarrays to generate a molecular taxonomy capable of distinguishing between colon cancer and normal colon. *Oncogene* 21:4855-62, 2002
19. Williams NS, Gaynor RB, Scoggin S, et al: Identification and validation of genes involved in the pathogenesis of colorectal cancer using cDNA microarrays and RNA interference. *Clin Cancer Res* 9:931-46, 2003
20. Bertucci F, Salas S, Eysteris S, et al: Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histoclinical parameters. *Oncogene* 23:1377-91, 2004
21. Jansová E, Krontorad P, Svoboda Z, et al: Nové možnosti v diagnostice kolorektálního karcinomu s využitím technologie DNA mikročipů. *Klinická onkologie* 17:203-207, 2004
22. Birkenkamp-Demtroder K, Olesen SH, Sorensen FB, et al: Differential gene expression in colon cancer of the caecum versus the sigmoid and rectosigmoid. *Gut* 54:374-84, 2005
23. Chiu ST, Hsieh FJ, Chen SW, et al: Clinicopathologic correlation of up-regulated genes identified using cDNA microarray and real-time reverse transcription-PCR in human colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:437-43, 2005
24. Tibshirani R: A simple method for assessing sample sizes in microarray experiments. *BMC Bioinformatics* 7:106, 2006
25. Shih W, Chetty R, Tsao MS: Expression profiling by microarrays in colorectal cancer (Review). *Oncol Rep* 13:517-24, 2005
26. Kim BS, Kim I, Lee S, et al: Statistical methods of translating microarray data into clinically relevant diagnostic information in colorectal cancer. *Bioinformatics* 21:517-28, 2005
27. Draghici S, Khatri P, Eklund AC, et al: Reliability and reproducibility issues in DNA microarray measurements. *Trends Genet* 22:101-9, 2006
28. Moreau Y, Aerts S, De Moor B, et al: Comparison and meta-analysis of microarray data: from the bench to the computer desk. *Trends Genet* 19:570-7, 2003
29. Wang D, Yang W, Du J, et al: MGSA/GRO-mediated melanocyte transformation involves induction of Ras expression. *Oncogene* 19:4647-59, 2000
30. Galamb O, Sipos F, Fischer K, et al: The results of the expression array studies correlate and enhance the known genetic basis of gastric and colorectal cancer. *Cytometry B Clin Cytom* 68:1-17, 2005
31. Watson AJ: An overview of apoptosis and the prevention of colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 57:107-21, 2006
32. Bird NC, Mangnall D, Majeed AW: Biology of colorectal liver metastases: A review. *J Surg Oncol* 94:68-80, 2006
33. Yeh CS, Wang JY, Cheng TL, et al: Fatty acid metabolism pathway play an important role in carcinogenesis of human colorectal cancers by Microarray-Bioinformatics analysis. *Cancer Lett*, 2005
34. Bekku S, Mochizuki H, Yamamoto T, et al: Expression of carbonic anhydrase I or II and correlation to clinical aspects of colorectal cancer. *Hepato-gastroenterology* 47:998-1001, 2000
35. Agrawal D, Chen T, Irby R, et al: Osteopontin identified as lead marker of colon cancer progression, using pooled sample expression profiling. *J Natl Cancer Inst* 94:513-21, 2002
36. Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, et al: A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* 33:49-54, 2003
37. Iacopetta B: Are there two sides to colorectal cancer? *Int J Cancer* 101:403-8, 2002
38. Mori Y, Selaru FM, Sato F, et al: The impact of microsatellite instability on the molecular phenotype of colorectal tumors. *Cancer Res* 63:4577-82, 2003
39. Banerjee A, Ahmed S, Hands RE, et al: Colorectal cancers with microsatellite instability display mRNA expression signatures characteristic of increased immunogenicity. *Mol Cancer* 3:21, 2004
40. Croner RS, Peters A, Brueckl WM, et al: Microarray versus conventional prediction of lymph node metastasis in colorectal carcinoma. *Cancer* 104:395-404, 2005
41. Li M, Lin YM, Hasegawa S, et al: Genes associated with liver metastasis of colon cancer, identified by genome-wide cDNA microarray. *Int J Oncol* 24:305-12, 2004
42. Yanagawa R, Furukawa Y, Tsunoda T, et al: Genome-wide screening of genes showing altered expression in liver metastases of human colorectal cancers by cDNA microarray. *Neoplasia* 3:395-401, 2001
43. Barrier A, Lemoine A, Boelle PY, et al: Colon cancer prognosis prediction by gene expression profiling. *Oncogene* 24:6155-64, 2005
44. Inoue Y, Shirane M, Miki C, et al: Gene expression profiles of colorectal carcinoma in response to neo-adjuvant chemotherapy. *Int J Oncol* 25:1641-9, 2004
45. Wang Y, Jatko T, Zhang Y, et al: Gene expression profiles and molecular markers to predict recurrence of Dukes' B colon cancer. *J Clin Oncol* 22:1564-71, 2004
46. Eschrich S, Yang I, Bloom G, et al: Molecular staging for survival prediction of colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 23:3526-35, 2005
47. Arango D, Laiho P, Kokko A, et al: Gene-expression profiling predicts recurrence in Dukes' C colorectal cancer. *Gastroenterology* 129:874-84, 2005
48. Mariadason JM, Arango D, Shi Q, et al: Gene expression profiling-based prediction of response of colon carcinoma cells to 5-fluorouracil and camptothecin. *Cancer Res* 63:8791-812, 2003
49. Arango D, Wilson AJ, Shi Q, et al: Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. *Br J Cancer* 91:1931-46, 2004
50. Souza V, Dong YB, Zhou HS, et al: SW-620 cells treated with topoisomerase I inhibitor SN-38: gene expression profiling. *J Transl Med* 3:44, 2005
51. Ghadimi BM, Grade M, Difilippantonio MJ, et al: Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy. *J Clin Oncol* 23:1826-38, 2005