

Роль микросателлитной нестабильности при раке толстой кишки

М.Ю. Федянин, А.А. Трякин, С.А. Тюляндин
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

Контакты: Михаил Юрьевич Федянин fedianinmu@mail.ru

Рак толстой кишки (РТК) занимает лидирующие позиции по заболеваемости и смертности от злокачественных опухолей в России и в мире. Развитие молекулярной биологии привело к расшифровке механизмов канцерогенеза и прогрессирования опухоли. Данные процессы требуют аккумуляции генетических и эпигенетических изменений в опухолевой клетке. Канцерогенез РТК характеризуется накоплением мутаций в генах, контролирующих рост и дифференцировку эпителиальных клеток, что приводит к их генетической нестабильности. Одним из вариантов данных генетических изменений является микросателлитная нестабильность, которая характеризуется нарушением механизма репарации неспаренных оснований ДНК. Это приводит к тому, что мутации в геноме клетки накапливаются со значительно большей скоростью, чем в нормальном состоянии. Эта неспособность к репарации неспаренных оснований ДНК может быть легко определена по длине микросателлитов ДНК. Данные изменения получили название микросателлитной нестабильности. Они выявляются как при наследственном РТК, так и при спорадических опухолях. Именно микросателлитной нестабильности, ее прогностическому и предикторному значению при РТК и посвящен данный обзор.

Ключевые слова: рак толстой кишки, микросателлитная нестабильность, синдром Линча

Role of microsatellite instability in colon cancer

M. Yu. Fedyanin, A. A. Tryakin, S. A. Tjulandin

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Colon cancer is among leading causes of cancer morbidity and mortality both in Russia and worldwide. Development of molecular biology lead to decoding of carcinogenesis and tumor progression mechanisms. These processes require accumulation of genetic and epigenetic alterations in a tumor cell. Colon cancer carcinogenesis is characterized by mutations accumulation in genes controlling growth and differentiation of epithelial cells, which leads to their genetic instability. Microsatellite instability is a type of genetic instability characterized by deterioration of mismatch DNA repair. This leads to faster accumulation of mutations in DNA. Loss of mismatch repair mechanism can easily be diagnosed by length of DNA microsatellites. These alterations are termed microsatellite instability. They can be found both in hereditary and sporadic colon cancers. This review covers the questions of microsatellite instability, its prognostic and predictive value in colon cancer.

Key words: colon cancer, microsatellite instability, Lynch syndrome

Введение

Канцерогенез рака толстой кишки (РТК) характеризуется накоплением мутаций в генах, контролирующих рост и дифференцировку эпителиальных клеток, что приводит к их генетической нестабильности. Описано 2 независимых патогенетических пути развития генетической нестабильности. Первый путь выявлен в большинстве злокачественных опухолей и называется хромосомной нестабильностью, которая проявляется хромосомными амплификациями, трансформациями, анеуплоидией и потерей гетерозиготности. Опухоли, развивающиеся вследствие активации 2-го пути, характеризуются нарушением механизма репарации неспаренных оснований дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Это приводит к тому, что мутации в геноме клетки накапливаются со значительно большей скоростью, чем в нормальном состоянии. Эта неспособность к репарации неспаренных оснований ДНК может быть легко определена по длине микросателлитов ДНК. Данные изменения получили на-

звание микросателлитной нестабильности (МСН). Именно МСН, ее роли при РТК и посвящен данный обзор.

Система репарации неспаренных оснований ДНК

Система репарации неспаренных оснований ДНК (mismatch repair system — MMR) ответственна за распознавание и удаление неправильно спаренных оснований, образованных в результате ошибок в процессе репликации ДНК. На 1-м этапе белковый комплекс MSH распознает неправильно спаренные основания, что инициирует присоединение к комплексу белков MLH1/PMS2 и MLH1/MLH3. Они, в свою очередь, привлекают к участию в процессе устранения ошибок экзо- и эндонуклеазы, осуществляющие удаление измененного участка ДНК. В дальнейшем рекрутируются факторы репликации, которые восстанавливают нуклеотидную последовательность цепи ДНК.

Наряду с ошибками в процессе репликации, данная репаративная система устраняет последствия экзо-

генного химического повреждения ДНК, например при действии препаратов платины. В клетках с недостаточностью данной системы репарации отмечена более высокая частота мутаций в сравнении с нормальными клетками. Генетическим биомаркером описанных нарушений репаративной системы является МСН.

За работу системы репарации неспаренных оснований ДНК отвечают 6 генов: *MSH2*, *MLH1*, *PMS2*, *MSH3*, *MSH6* и *MLH3*. Наличие герминальных мутаций в этих генах приводит к развитию синдрома наследственного неполипозного колоректального рака (ННКРР) (синдрома Линча) [1]. Частота наследственных мутаций в генах системы репарации составляет 2–4 % среди больных РТК, однако более 15 % всех пациентов имеют высокий уровень МСН в опухолях [2]. Таким образом, наличие фенотипа с высоким уровнем МСН чаще определяется не мутацией в соответствующих генах, а метилированием промотора гена *MLH1*. Нарушения в системе репарации неспаренных оснований ДНК приводят к образованию мутаций со сдвигом рамки считывания, что характеризуется ранним появлением стоп-кодона и инактивацией гена. В таблице представлены гены, функция которых страдает при МСН [3, 4, 5].

Несмотря на различные механизмы повреждения генома при опухолях с МСН и микросателлитной стабильностью (МСС), в итоге нарушается работа одних и тех же генов и сигнальных путей. К примеру, спорадический микросателлитно-стабильный РТК развивается в результате комбинации мутаций и потери гетерозиготности, что приводит к биаллельной инактивации гена *APC*. В то время как значительная часть опухолей с МСН имеют неизмененный ген *APC*, выявляются мутации в генах сигнального пути Wnt- β -catenin, что делает невозможным взаимодействие β -catenin и белка APC, и последний подвергается деградации [6, 7] — биологический эквивалент отсутствия белка APC.

Методы определения МСН

Как было отмечено выше, генетическим биомаркером описанных нарушений репаративной системы является МСН. Микросателлитные повторы ДНК — полиморфные последовательности ДНК, длиной в 1–5 пар оснований, которые могут повторяться 15–30 раз и распределены по всему геному. Длина таких повторов при РТК различается между опухолевыми клетками и нормальными клетками толстой кишки у одного и того же пациента [8]. В настоящее время для определения уровня МСН наиболее часто применяются следующие методы: полимеразная цепная реакция и иммуногистохимический метод.

Полимеразная цепная реакция амплифицирует микросателлитные повторы в ДНК, и путем сравнения длины микросателлитных повторов между опухолевыми и нормальными клетками может быть определен

уровень нестабильности генома. Применяемая референсная модель в 5–10 микросателлитов позволяет выделить 3 варианта МСН (MSI): MSI-H — высокий уровень — 30 % используемых маркеров нестабильны; MSI-L — нестабильны 10–30 % маркеров; MSS — MCC [9]. Альтернативой может служить иммуногистохимический метод — определяется уровень белков системы репарации неспаренных оснований ДНК. В случае дефицита белков данной репаративной системы диагностируется МСН [10].

Фенотипические характеристики опухоли с МСН

Пациенты с опухолями с высоким уровнем МСН имеют отличающие их фенотипические характеристики: проксимальная локализация первичной опухоли, низкая дифференцировка, муцинозный гистологический тип, выраженная лимфоцитарная инфильтрация опухоли, большая частота диплоидий и редкость потери гетерозиготности длинного плеча 18-й хромосомы [11]. И хотя данный фенотип подтвержден не во всех исследованиях [12, 13], тем не менее данные признаки могут быть полезны в качестве диагностических маркеров. Кроме этого, опухоли с высоким уровнем МСН и опухоли с МСС имеют различный прогноз течения болезни и, возможно, обладают различной чувствительностью к химиотерапии (ХТ) [14].

Выявлены и молекулярные особенности опухолей с МСН. По неясным пока причинам мутации гена *BRAF* часто (до 50 %) обнаруживаются в спорадических опухолях толстой кишки с МСН. Тогда как в опухолях у больных с синдромом Линча, которому свойственна МСН, мутации в гене *BRAF* не описаны [15–17]. Выделяют 2 варианта аденокарцином толстой кишки с МСН: наследственный и спорадический РТК.

Синдром Линча (ННКРР)

Синдром Линча — наследственное заболевание, вызванное наличием инактивирующих герминальных мутаций в генах, кодирующих белки системы репарации неспаренных оснований ДНК [18]. Наследуется по аутосомно-доминантному типу, риск возникновения РТК составляет 23–75 % [19]. В настоящее время описаны мутации в 5 генах системы репарации. В 80–90 % случаев при синдроме Линча поражаются гены *MLH1* и *MSH2*, реже выявляются мутации в гене *MSH6* и очень редко — в гене *PMS2*. В оставшихся 3 генах герминальные мутации выявляются крайне редко — *PMS1* или вообще не описаны — *MSH3* и *MLH3* [20–26]. В 35 % опухолей выявляется мутация гена *KRAS*, но никогда — гена *BRAF*. Кроме этого, в некоторых случаях синдрома Линча не обнаружено мутаций в генах системы репарации, но отмечается МСН. Это вызвано эпигенетической инактивацией генов в результате метилирования промоторов. Эти события описываются как герминальные эпимутации — конституциональные эпимутации. Они отра-

Гены, в которых обнаружены изменения при МСН

Функциональное значение гена	Гены
Регуляция транскрипции и пролиферации	<i>GRB1, TCF-4, WISP3, activin receptor 2, insulin-like growth factor 2 receptor (IGF2R), axin-2, CDX, TAF1B, CREBBP, HDAC2, PRDM2</i>
Регуляция передачи сигналов	<i>ACVR2, TGFβR2, EPHB2, PTEN, PIK3CA, IGF2R, WISP3</i>
Регуляция клеточного цикла или апоптоза	<i>BAX, caspase-5, RIZ, BCL-10, PTEN, hG4-1 и FAS, CDC25, ATR, CHEK1</i>
Процессы репарации ДНК	<i>MRE11, POLD3, MSH3, RAD50, BRCA2, MSH6, MBD4, PRKDC, MLH3, BLM, LIGASE3, REV1L, REV3L</i>

жают aberrантное подавление экспрессии гена, который в норме активен в соматических тканях, при отсутствии мутации в этом гене. Такие конституциональные эпимутации в семьях с синдромом Линча были выявлены в генах *MLH1* [27] и *MSH2* [28, 29]. Подобно герминальным мутациям, эпимутации в *MSH2* показывают классический аутосомно-доминантный тип наследования с 50 % риском передачи последующему поколению [29].

Кроме характерных признаков микросателлитных опухолей — проксимальная локализация, муцинозный вариант, низкая степень дифференцировки, у пациентов с синдромом Линча нередко отмечается первично-множественный характер поражения, включая опухолевое поражение толстой кишки, эндометрия, желудка, яичников, мочевыводящих путей, тонкой кишки и других органов, но без увеличения частоты рака легкого, молочной железы или предстательной железы [30].

В 1991 г. были разработаны Амстердамские критерии для диагностирования данного синдрома [31]. Они включают следующие признаки:

- 3 случая РТК в семье;
- 1 родственник с опухолью должен быть 1-й степени родства по отношению к двум другим;
- РТК должен быть как минимум в 2 поколениях (в которых исключен семейный полипоз);
- как минимум 1 больной член семьи должен быть моложе 50 лет.

В 1999 г. были представлены обновленные критерии — Амстердамские критерии II, в которые добавили наличие опухолей внекишечной локализации [32]. Также с 1996 г. в клинике применяются рекомендации Bethesda, в которых в качестве дополнения к Амстердамским критериям введены новые признаки: низкая дифференцировка опухоли и опухоли внекишечной локализации [5].

Несмотря на строгость Амстердамских критериев, 40–60 % семей, подходящих по данным критериям, не имеют герминальных мутаций в генах системы репарации, и в опухолях не была выявлена МСН [27, 33]. Такой синдром получил название «семейный колоректальный рак», тип Х [33]. Эти семьи характеризуются микросателлитно-стабильными опухолями, с относи-

тельно более низким риском развития РТК, редким метастазированием и более поздним появлением новообразований. Генетического обоснования такого синдрома в настоящее время не предложено.

В настоящее время определение функции системы репарации неспаренных оснований ДНК рекомендовано NCCN (National Comprehensive Cancer Network) в США у всех пациентов моложе 50 лет с впервые диагностированным РТК или при отягощенном семейном анамнезе для исключения синдрома Линча (рекомендации NCCN, версия 2.2012).

При диагностировании синдрома Линча без клинических проявлений рекомендовано тщательное наблюдение за пациентами. Показано, что выполнение колоноскопии, начиная с возраста 20–25 лет и до 80 лет, 1 раз в 2–3 года, снижает риск РТК на 63 % и значительно редуцирует смертность от этого заболевания [19]. Для пациентов с синдромом Линча и диагностированным РТК сообщается об увеличении продолжительности жизни и снижении риска развития 2-й опухоли в толстой кишке при выполнении субтотальной колэктомии. Но учитывая значимое снижение качества жизни после такой операции, данный объем оперативного вмешательства должен обсуждаться с пациентом [19].

Спорадический РТК

Большинство опухолей толстой кишки с МСН являются спорадическими. Спорадические опухоли с МСН характеризуются отсутствием семейного онкологического анамнеза, биаллельным метилированием промотора гена *MLH1* [34, 35], отсутствием белков *MLH1* и *PMS2* и частым (до 50 %) наличием мутации в гене *BRAF* (обычно V600E) [36]. В 74 % случаев опухолевые клетки диплоидные, а пациенты со спорадическим РТК и МСН имеют более благоприятный прогноз, чем пациенты с микросателлитно-стабильными опухолями [37]. Также отмечено, что негативная ассоциация наличия мутации в гене *KRAS* проявляется в сочетании с МСН или низким уровнем МСН в опухоли, тогда как при МСН высокого уровня данное негативное воздействие нивелируется [38]. С возрастом частота потери экспрессии гена *MLH1* встреча-

ется чаще. У пациентов старше 90 лет в 50% опухолей толстой кишки отмечается потеря функции этого гена [39].

Прогностическая роль МСН

При II стадии РТК МСН выявляется в 22% случаев, при III стадии — в 12%, при IV — в 2% [40]. Эти данные доказывают, что опухоли с высоким уровнем МСН не склонны к метастазированию и имеют благоприятный прогноз. Так же в большинстве ретроспективных исследований высокий уровень МСН ассоциирован с более высокими показателями выживаемости при РТК [41, 42]. Эти находки были подтверждены результатами метаанализа 32 исследований, доказавших прогностическое значение уровня МСН у 7642 больных [43]. При этом в исследовании РЕТАСС-3 данное прогностическое значение было выше у больных со II стадией, чем с III стадией заболевания [44]. А при многофакторном анализе признаков, влияющих на риск развития рецидива, в исследовании QUASAR [45] только отсутствие МСН и показатель T4 имели независимое негативное прогностическое значение.

Предикторное значение МСН

Если уровень МСН имеет доказанное прогностическое значение, то его предикторная роль пока не полностью ясна. Система репарации неспаренных оснований ДНК эффективно распознает и устраняет нарушения в ДНК, вызванные действием алкилирующих химиопрепаратов, что в итоге приводит клетки к апоптозу. Таким образом, теоретически, опухолевые клетки с нормально функционирующей системой репарации неспаренных оснований должны обладать химиорезистентностью. И, наоборот, при дефектах в системе репарации опухолевые клетки должны быть более чувствительны к ХТ [46].

5-фторурацил

Встраивание метаболитов 5-фторурацила в цепь ДНК приводит к формированию «неправильной» пары азотистых оснований FU/G, что и определяет механизм, с помощью которого препарат оказывает свое противоопухолевое действие. Эти нарушения в цепи ДНК распознаются и устраняются с помощью системы репарации неспаренных оснований [47, 48]. В первых исследованиях было показано, что пациенты с III стадией и с высоким уровнем МСН лучше отвечают на адъювантную терапию 5-фторурацилом [49]. Однако при накоплении данных оказалось, что пациенты с МСН не имеют преимуществ от терапии 5-фторурацилом по сравнению с пациентами с МСС [50]. При II стадии пациенты с высоким уровнем МСН в опухоли имели только 3% выигрыш в общей выживаемости

при проведении адъювантной терапии 5-фторурацилом [51]. Из 4 проспективных исследований, оценивающих роль адъювантного назначения 5-фторурацила, в 2 работах выявлено отсутствие эффекта от назначения 5-фторурацила в опухолях с низким уровнем МСН или при МСС [42, 52]. В оставшихся 2 такой взаимосвязи обнаружено не было [53, 54].

В метаанализе 2010 г., включившим данные по 3690 больным РТК (810 — со II стадией, 2444 — с III стадией болезни), выделено 454 случая МСН [55]. Из всех больных 39% проводилась адъювантная ХТ 5-фторурацилом. У пациентов с МСН в опухоли не отмечено выигрыша от назначения адъювантной ХТ, тогда как у пациентов с микросателлитно-стабильными опухолями применение 5-фторурацила в адъювантном режиме привело к статистически значимому увеличению выживаемости. В другом метаанализе, включившем данные 7 исследований (2863 больных), выявлено 396 случаев микросателлитно-нестабильных опухолей. Только пациенты с МСС имели более продолжительную общую выживаемость при назначении 5-фторурацила (ОР = 0,52; 95% ДИ 0,4–0,6; $p < 0,0001$) [56].

По-видимому, различия в полученных результатах обусловлены одновременным включением в исследование пациентов со II и III стадиями заболевания, объединением в анализе больных раком прямой и ободочной кишки, а также значительной методологической гетерогенностью в работах [10, 55, 56].

При метастатическом РТК у пациентов с МСН, в отличие от ранних стадий болезни, отмечается ответ на ХТ 5-фторурацилом [57, 58]. Более того, в 2 исследованиях отмечена более высокая эффективность терапии 5-фторурацилом и лейковорином больных метастатическим РТК именно с МСН. В наиболее крупном из исследований, включившем 244 пациента, отмечено необычно высокая частота МСН для пациентов с метастатической болезнью (20% больных). Медиана продолжительности жизни пациентов с высоким МСН составила 24 мес против 13 мес ($p = 0,0001$). Также в 2 раза был выше и объективный ответ на ХТ [57].

Оксалиплатин

Оксалиплатин приводит к образованию внутри- и межцепочечных сшивок ДНК, что прекращает репликацию в опухолевых клетках. По данным предклинических и клинических исследований, МСН не снижает эффективности оксалиплатина [59–61]. Выявлено, что система репарации неспаренных оснований ДНК способна распознавать повреждения, вызванные цисплатином, карбоплатином, но не оксалиплатином [62]. Известно, что только последний эффективен при РТК. Также резистентность к окса-

липлатину не связана с нарушениями в системе репарации неспаренных оснований ДНК.

При ретроспективном анализе результатов адьювантной терапии режимом FOLFOX 135 больных не отмечено различий в безрецидивной выживаемости и продолжительности жизни пациентов в зависимости от статуса системы репарации неспаренных оснований ДНК [63]. В другом исследовании 3-летняя безрецидивная выживаемость была статистически значимо выше у пациентов с III стадией болезни и МСН в опухоли, получавших режим FOLFOX в сравнении с пациентами, которым проводилась терапия 5-фторурацилом с лейковорином ($p = 0,01$). Интересно, что у пациентов с микросателлитно-стабильными опухолями добавление оксалиплатина к фторпиримидинам также увеличивало безрецидивную выживаемость, но не достоверно ($p = 0,15$) [64]. Данные находки требуют подтверждения в рандомизированных проспективных исследованиях либо анализа данных уже проведенных проспективных рандомизированных исследований по адьювантной терапии РТК.

При изучении роли МСН при метастатическом РТК и эффективности оксалиплатин-содержащей ХТ 1-й линии, ни в одном из исследований не было продемонстрировано различий в достижении объективного эффекта, времени до прогрессирования и продолжительности жизни между пациентами с высоким уровнем МСН и МСС в опухоли [5].

Иринотекан

Иринотекан — ингибитор топоизомеразы I, фермента, который вовлечен в процессы репарации, репликации, транскрипции, рекомбинации и хромосомной сегрегации. Клеточные линии с МСН более чувствительны к ингибиторам топоизомеразы I [65, 66], хотя это подтверждено и не во всех исследованиях [67]. Интересны в этой связи результаты поданализа исследования GALGB 89803. Во всей группе больных РТК III стадии эффективность терапии FOLFIRI не превосходила режима 5-фторурацила с лейковорином. Только пациенты с МСН выигрывали в выживаемости от назначения ХТ по схеме FOLFIRI. Таких различий в группе с 5-фторурацилом и лейковорином отмечено не было [51].

D. Fallik et al. оценили влияние высокого уровня МСН на объективный эффект ХТ 2-й линии с включением иринотекана и 5-фторурацила у 72 больных с метастатическим РТК [61]. Объективный эффект был статистически значимо выше у больных с высоким уровнем МСН. Однако небольшое количество больных и отсутствие данных по выживаемости не позволило сделать однозначный вывод. Позднее был проведен дополнительный анализ данных исследования CAIRO — рандомизированного исследования III фазы

по сравнению последовательного назначения капецитабина в 1-й линии — иринотекана во 2-й линии — капецитабина с оксалиплатином в 3-й линии против назначения комбинированной терапии: капецитабин с иринотеканом в 1-й линии, капецитабин с оксалиплатином во 2-й линии. У 3,5% больных выявлен высокий уровень МСН. В 1-й линии терапии не отмечено статистически значимых различий между режимами в зависимости от МСН опухолей ни в объективном ответе, ни в выживаемости [40]. Только в одном исследовании сообщено о тенденции к статистически значимому выигрышу во времени до прогрессирования у больных с МСН, получавших иринотекан-содержащую ХТ в 1-й линии: 8,8 мес против 6,8 мес в группе с МСН ($p = 0,09$) [68].

Таким образом, опухоли с МСН из-за своих особенностей канцерогенеза, фенотипических свойств необходимо выделять в отдельную группу. В первую очередь определение МСН показано при подозрении на синдром Линча, у пациентов со II стадией болезни, а также при свойственных для МСН клинико-патологических характеристиках (проксимальная локализация первичной опухоли, муцинозный гистотип, низкодифференцированные опухоли, лимфоцитарная инфильтрация опухоли).

Большинство исследователей, соглашаясь с прогностической ролью МСН при раннем РТК, не рекомендуют использовать данный показатель в качестве предиктора эффективности адьювантной ХТ. Однако, основываясь на вышеприведенных фактах, у пациентов с III стадией РТК следует назначать адьювантную ХТ всегда, независимо от статуса системы репарации неспаренных оснований. У пациентов со II стадией заболевания при наличии факторов риска прогрессирования заболевания также следует назначать адьювантную ХТ, однако выбор режима адьювантной ХТ будет определяться наличием МСН в опухоли. При МСН предпочтительнее назначать комбинации оксалиплатина и фторпиримидинов (FOLFOX, XELOX), чем монотерапию фторпиримидинами. При сочетании РТК II стадии, при наличии факторов риска прогрессирования и МСС возможно назначать как фторпиримидины в монорежиме, так и комбинации фторпиримидинов и оксалиплатина. Роль МСН при метастатическом РТК пока не полностью ясна.

Определение дальнейших молекулярных особенностей этих опухолей поможет выделить подгруппы больных, которые, вероятно, будут по-разному отвечать на ХТ. В заключение можно сказать, что МСН, как отражение нарушений в системе репарации неспаренных оснований ДНК, является одним из многообещающих маркеров, изучающихся в настоящее время при РТК.

1. Modrich P. Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. *J Biol Chem* 2006; 281:30305–9.
2. Liu B., Nikolaides N.C., Markowitz S. et al. Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nat Genet* 1995; 9(1):48–55.
3. Wang J., Sun L., Myeroff L. et al. Demonstration that mutation of the type II transforming growth factor beta receptor inactivates its tumor suppressor activity in replication error-positive colon carcinoma cells. *J Biol Chem* 1995;270:22044–9.
4. Duval A., Hamelin R. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res* 2002;62(9):2447–54.
5. Zaanan A., Meunier K., Sangar F. et al. Microsatellite instability in colorectal cancer: from molecular oncogenic mechanisms to clinical implications. *Cell Oncol* 2011;34(3):155–76.
6. Mirabelli-Primdahl L., Gryfe R., Kim H. et al. Beta-catenin mutations are specific for colorectal carcinomas with microsatellite instability but occur in endometrial carcinomas irrespective of mutator pathway. *Cancer Res* 1999;59(14):3346–51.
7. Miyaki M., Iijima T., Kimura J. et al. Frequent mutation of beta-catenin and APC genes in primary colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res* 1999; 59(18):4506–9.
8. Thibodeau S.N., Bren G., Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993;260:816–9.
9. Umar A., Boland C.R., Terdinam J.P. et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:261–8.
10. Boland C.R., Thibodeau S.N., Hamilton S.R. et al. A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58(22):5248–57.
11. Tejpar S. The multidisciplinary management of gastrointestinal cancer. The use of molecular markers in the diagnosis and treatment of colorectal cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2007;21:1071–87.
12. Benatti P., Gafà R., Barana D. et al. Microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *Clin Cancer Res* 2005; 11:8332–40.
13. Raut C., Pawlik T., Rodriguez-Bigas M.A. Clinicopathologic features in colorectal cancer patients with microsatellite instability. *Mutat Res* 2004; 568:275–82.
14. Warusavitarne J., Schnitzler M. The role of chemotherapy in microsatellite unstable (MSI-H) colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2007;22(7):739–48.
15. Ogino S., Noshio K., Kirkner G.J. et al. CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut* 2009;58:90–6.
16. Nagasaka T., Koi M., Kloor M. et al. Mutations in both KRAS and BRAF may contribute to the methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology* 2008; 134:1950–60.
17. Rajagopalan H., Bardelli A., Lengauer C. et al. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch repair status. *Nature* 2002; 418:934.
18. Boland C.R. Evolution of the nomenclature for the hereditary colorectal cancer syndromes. *Fam Cancer* 2005; 4:211–8.
19. Vasen H.F., Möslein G., Alonso A. et al. Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). *J Med Genet* 2007;44(6):353–62.
20. Peltomäki P. Lynch syndrome genes. *Fam Cancer* 2005;4(3):227–32.
21. Peltomäki P., Vasen H.F. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 1997;113(4):1146–58.
22. Huang J., Kuismanen S.A., Liu T. et al. MSH6 and MSH3 are rarely involved in genetic predisposition to nonpolyposis colon cancer. *Cancer Res* 2001;61(4):1619–23.
23. de Jong A.E., van Puijenbroek M., Hendriks Y. et al. Microsatellite instability, immunohistochemistry, and additional PMS2 staining in suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:972–80.
24. Halvarsson B., Lindblom A., Rambaek E. et al. The added value of PMS2 immunostaining in the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Fam Cancer* 2006;5:353–8.
25. Hendriks Y.M., Jagmohan-Changur S., van der Klift H.M. et al. Heterozygous mutations in PMS2 cause hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome). *Gastroenterology* 2006;130:312–22.
26. Hienonen T., Laiho P., Salovaara R. et al. Little evidence for involvement of MLH3 in colorectal cancer predisposition. *Int J Cancer* 2003;106:292–6.
27. Llor X., Pons E., Xicola R.M. et al. Differential features of colorectal cancers fulfilling Amsterdam criteria without involvement of the mutator pathway. *Clin Cancer Res* 2005;11:7304–10.
28. Gazzoli I., Loda M., Garber J. et al. A hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma case associated with hypermethylation of the MLH1 gene in normal tissue and loss of heterozygosity of the unmethylated allele in the resulting microsatellite instability-high tumor. *Cancer Res* 2002;62:3925–8.
29. Ligtenberg M.J., Kuiper R.P., Chan T.L. et al. Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat Genet* 2009;41(1):112–7.
30. Watson P., Vasen H.F., Mecklin J.P. et al. The risk of extra-colonic, extra-endometrial cancer in the Lynch syndrome. *Int J Cancer* 2008;123:444–9.
31. Vasen H.F., Mecklin J.P., Khan P.M. et al. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991;34(5):424–5.
32. Vasen H.F., Watson P., Mecklin J.P. et al. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999;116:1453–6.
33. Lindor N.M., Rabe K., Petersen G.M. et al. Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. *JAMA* 2005; 293:1979–85.
34. Kane M.F., Loda M., Gaida G.M. et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res* 1997;57:808–11.
35. Veigl M.L., Kasturi L., Olechnowicz J. et al. Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(15):8698–702.
36. Wang L., Cunningham J.M., Winters J.L. et al. BRAF mutations in colon cancer are not likely attributable to defective DNA mismatch repair. *Cancer Res* 2003;63:5209–12.
37. Sinicrope F.A., Rego R.L., Halling K.C. et al. Prognostic impact of microsatellite

- instability and DNA ploidy in human colon carcinoma patients. *Gastroenterology* 2006; 131:729–37.
38. Roth A.D., Tejpar S., Delorenzi M. et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol* 2010;28(3):466–74.
39. Kakar S., Burgart L.J., Thibodeau S.N. et al. Frequency of loss of hMLH1 expression in colorectal carcinoma increases with advancing age. *Cancer* 2003;97:1421–7.
40. Koopman M., Kortman G.A., Mekenkamp L. et al. Deficient mismatch repair system in patients with sporadic advanced colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009;100:266–73.
41. Gryfe R., Kim H., Hsieh E.T. et al. Tumour microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000;342:69–77.
42. Ribic C.M., Sargent D.J., Moore M.J. 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(3):247–57.
43. Popat S., Hubner R., Houlston R.S. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2005;23:609–18.
44. Roth A.D., Tejpar S., Yan P. et al. Stage-specific prognostic value of molecular markers in colon cancer: Results of the translational study on the PETACC3 — EORTC 40993-SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol* (meeting abstract) 2009;27:4002.
45. Kerr D., Gray R., Quirke P. et al. A quantitative multigene RT-PCR assay for prediction of recurrence in stage II colon cancer: selection of the gene in four large studies and results of the independent, prospectively designed QUASAR validation study. *J Clin Oncol* 2009;25(15 Suppl):169s.
46. Sargent D.J., Marsoni S., Monges G. et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol* 2010;28(20):3219–26.
47. Carethers J.M., Chauhan D.P., Fink D. et al. Mismatch repair proficiency and in vitro response to 5-fluorouracil. *Gastroenterology* 1999;117(1):123–31.
48. Fischer F., Baerenfaller K., Jiricny J. 5-Fluorouracil is efficiently removed from DNA by the base excision and mismatch repair systems. *Gastroenterology* 2007; 133(6):1858–68.
49. Elsaleh H., Iacopetta B. Microsatellite instability is a predictive marker for survival benefit from adjuvant chemotherapy in a population-based series of stage III colorectal carcinoma. *Clin Colorectal Cancer* 2001;1(2):104–9.
50. Jover R., Zapater P., Castells A. et al. The efficacy of adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil in colorectal cancer depends on the mismatch repair status. *Eur J Cancer* 2009;45:365–73.
51. Bertagnolli M.M., Niedzwiecki D., Compton C.C. et al. Microsatellite instability predicts improved response to adjuvant therapy with irinotecan, fluorouracil, and leucovorin in stage III colon cancer: Cancer and Leukemia Group B Protocol 89803. *J Clin Oncol* 2009;27(11):1814–21.
52. Carethers J.M., Smith E.J., Behling C.A. et al. Use of 5-fluorouracil and survival in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. *Gastroenterology* 2004; 126(2):394–401.
53. Barratt P.L., Seymour M.T., Stenning S.P. et al. DNA markers predicting benefit from adjuvant fluorouracil in patients with colon cancer: a molecular study. *Lancet* 2002;360(9343):1381–91.
54. Storojeva I., Boulay J.L., Heinimann K. et al. Prognostic and predictive relevance of microsatellite instability in colorectal cancer. *Oncol Rep* 2005;14(1):241–9.
55. Des Guetz G., Schischmanoff O., Nicolas P. et al. Does microsatellite instability predict the efficacy of adjuvant chemotherapy in colorectal cancer? A systematic review with meta-analysis. *Eur J Cancer* 2009;45(10):1890–6.
56. Guastadisegni C., Colafranceschi M., Ottini L. et al. Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: meta-analysis of colorectal cancer survival data. *Eur J Cancer* 2010; 46(15):2788–98.
57. Liang J.T., Huang K.C., Lai H.S. et al. High-frequency microsatellite instability predicts better chemosensitivity to high-dose 5-fluorouracil and leucovorin chemotherapy for stage IV sporadic colorectal cancer after palliative bowel resection. *Int J Cancer* 2002;101(6):519–25.
58. Kim G.P., Colangelo L.H., Wieand H.S. et al. 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(7):767–72.
59. Fink D., Zheng H., Nebel S. et al. In vitro and in vivo resistance to cisplatin in cells that have lost DNA mismatch repair. *Cancer Res* 1997;57(10):1841–5.
60. Vilar E., Scaltriti M., Balmaña J. et al. Microsatellite instability due to hMLH1 deficiency is associated with increased cytotoxicity to irinotecan in human colorectal cancer cell lines. *Br J Cancer* 2008;99(10):1607–12.
61. Fallik D., Borriani F., Boige V. et al. Microsatellite instability is a predictive factor of the tumor response to irinotecan in patient with advanced colorectal cancer. *Cancer Res* 2003;63(18):5738–44.
62. Mishima M., Samimi G., Kondo A. et al. The cellular pharmacology of oxaliplatin resistance. *Eur J Cancer* 2002; 38(10):1405–12.
63. Kim S.T., Lee J., Park S.H. et al. Clinical impact of microsatellite instability in colon cancer following adjuvant FOLFOX therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 66:659–67.
64. Zaan A., Cuilliere-Dartigues P., Guilloux A. et al. Impact of p53 expression and microsatellite instability on stage III colon cancer disease-free survival in patients treated by 5-fluorouracil and leucovorin with or without oxaliplatin. *Ann Oncol* 2010; 21(4):772–80.
65. Jacob S., Aguado M., Fallik D. et al. The role of the DNA mismatch repair system in the cytotoxicity of the topoisomerase inhibitors camptothecin and etoposide to human colorectal cancer cells. *Cancer Res* 2001;61(17):6555–62.
66. Prolla T.A. DNA mismatch repair and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10(3): 311–6.
67. Fedier A., Schwarz V.A., Walt H. et al. Resistance to topoisomerase poisons due to loss of DNA mismatch repair. *Int J Cancer* 2001;93(4):571–6.
68. Kim J., Hong Y., Lee J. et al. Association between deficient mismatch repair system and efficacy to irinotecan containing first-line chemotherapy in patients with sporadic metastatic colorectal cancer. *ASCO Annual Meeting* 2010, Abstract 3579.