

## Artykuły oryginalne

**Mutacje K-RAS i p53 oraz akumulacja białka p53  
w rakach jelita grubego**

Lech Trzeciak<sup>1</sup>, Małgorzata Przybyszewska<sup>2</sup>, Anna Nasierowska-Guttmejer<sup>3</sup>,  
Jacek Kołodziejwski<sup>1</sup>, Marek Nowacki<sup>4</sup>, Przemysław Janik<sup>2</sup>, Jerzy Ostrowski<sup>1</sup>

*Wstę p.* Rak jelita grubego jest drugą (według częstości) przyczyną zgonów na choroby nowotworowe w Polsce. Podłożem rozwoju tego nowotworu jest akumulacja mutacji różnych genów w komórkach nabłonka jelita, jednak występowanie tych mutacji w populacji polskiej jest niedostatecznie zbadane. Celem niniejszej pracy było zatem określenie częstości mutacji genów K-RAS i p53 w rakach jelita grubego wśród pacjentów polskich.

*Materiał i metody.* 55 próbek guza i tkanki prawidłowej jelita grubego pobranych od pacjentów operowanych z powodu raka jelita grubego. Mutacje kodonu 12 genu K-RAS wykrywano za pomocą techniki PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism). Mutacje eksonów 5÷9 genu p53 oceniano techniką PCR-SSCP (Single Stranded Conformational Polymorphism) i charakteryzowano bezpośrednim sekwencjonowaniem. Akumulację białka p53 oceniono immunohistochemicznie z użyciem przeciwciała DO-7.

*Wyniki.* Obecność mutacji kodonu 12 genu K-RAS wykryto w 17 z 55 przypadków raka jelita grubego (31%). Mutacje eksonów 5÷9 genu p53 pojawiły się w 24 z 55 przypadków (44%), z czego 23 miały charakter mutacji punktowych i najczęściej dotyczyły kodonów 175, 248 i 273 genu p53. Akumulacja białka p53 wystąpiła w 23 z 45 raków (51%).

*Wnioski.* Częstość mutacji genów K-RAS i p53 oraz profil mutacji genu p53 w rakach jelita grubego, pochodzących z populacji polskiej, są porównywalne z wynikami badań innych populacji, co pośrednio przemawia za podobną etiologią raka jelita grubego w tych populacjach.

**Mutations of genes K-RAS and p53 and p53 protein accumulation in colorectal cancer**

*Background.* Colorectal cancer is a second leading cause of death from neoplastic diseases in Poland. Colorectal cancer develops through a series of mutations of genes, however, the frequency and nature of these mutations in Polish population has not been investigated well. The aim of this study was therefore to establish the frequency and spectrum of mutations of genes K-RAS and p53 in colorectal cancer cases from Poland.

*Materials and methods.* Samples of 55 cancers and 54 matching normal tissues were collected at surgery for colorectal cancer. Mutations of codon 12 of the K-RAS gene were detected with PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism). Mutations in exons 5 to 9 of the p53 gene were assessed using PCR-SSCP (Single Stranded Conformational Polymorphism) and characterized in direct sequencing of PCR products. An accumulation of p53 protein was visualized immunohistochemically with the antibody DO-7.

*Results.* Mutations of codon 12 of the K-RAS gene were detected in 17 of 55 colorectal cancer cases (31%). Mutations of exons 5 to 9 of p53 gene were shown in 24 of 55 cases (44%); these were predominantly point mutations, often affecting „hot spot” codons 175, 248 and 273. Accumulation of protein p53 was present in 23 of 45 cancers (51%).

*Conclusions.* The frequency and spectrum of abnormalities of genes K-RAS and p53 in a series of colorectal cancers from Polish population is similar to other studied populations, which may indicate a common etiology of this cancer in these populations.

**Słowa kluczowe:** rak jelita grubego, gen p53, gen K-RAS

**Key words:** colorectal cancer, p53 gene, K-RAS gene

<sup>1</sup> Klinika Gastroenterologii, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego,

<sup>2</sup> Zakład Biologii Komórki,

<sup>3</sup> Zakład Patologii,

<sup>4</sup> Klinika Nowotworów Jelita Grubego, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, ul. Roentgena 5, 02-781 Warszawa. Praca finansowana w ramach grantu Komitetu Badań Naukowych (4 S402 131 07) oraz działalności statutowej Centrum Onkologii.

Rak jelita grubego jest w Polsce drugim – po raku płuca – najpoważniejszym problemem onkologicznym. Liczba zgonów z powodu raka jelita grubego systematycznie wzrasta i potroiła się w ciągu ostatnich 30 lat, osiągając poziom 7600 zgonów rocznie [1]. Stało się tak mimo znacznego rozwoju medycyny, w tym przede wszystkim wprowadzenia endoskopii i endoskopowej polipektomii – technik umożliwiających wykrywanie i leczenie nowotworów jelita we wczesnej fazie. Nadal jednak wiele przypadków raka rozpoznawanych jest w zaawansowanym stadium, a leczeniem z wyboru jest wtedy chirurgiczna resekcja guza (z ewentualną pooperacyjną chemioterapią). Skuteczność tego leczenia jest ograniczona przez powstawanie przerzutów, i w stadium C wg Dukes'a odsetek pięcioletnich przeżyć nie przekracza 40-50%, a w stadium D – 5%. Konieczne jest zatem opracowanie efektywniejszych metod wczesnej diagnostyki i leczenia raka jelita grubego, co wymagać będzie lepszego poznania biologii tego nowotworu.

Rak jelita grubego rozwija się w wyniku akumulacji uszkodzeń genetycznych w komórkach nabłonka jelita, wskutek czego dochodzi do selekcji klonu komórkowego, zdolnego do niepoohamowanej proliferacji, inwazji tkanek otaczających i przerzutowania do narządów odległych. Molekularny model powstawania raka jelita grubego, zaproponowany przez Fearona i Vogelsteina w 1989 roku [2], uległ z czasem znaczącym rewizjom i obecnie za najistotniejsze mechanizmy rozwoju tego nowotworu należy uznać zaburzenia metylacji DNA (w tym hipermetylację genów supresorowych, jak np. *CDNK2A/p16* [3]), mutacje genów kodujących APC i  $\beta$ -kateninę [4, 5], aktywujące mutacje genu *K-RAS* [6, 7], inaktywujące mutacje genów kodujących układ przekazania sygnału z TGF $\beta$  [8, 9] oraz mutacje genu *p53* [10]. W części przypadków (ok. 15%) za powstawanie tych i innych mutacji odpowiada uszkodzenie układu naprawy źle sparowanych zasad (mismatch repair), co objawia się niestabilnością długości licznych sekwencji mikrosatelitarnych w DNA (MSI – MicroSatellite Instability). Zaburzenie to, najczęściej wrodzone, jest przyczyną rozwoju większości wrodzonych raków jelita grubego bez polipowatości (HNPCC, Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer).

Gen *K-RAS* (oficjalna nazwa: *KRAS2*) o lokalizacji 12p12.1 koduje białko o wielkości 188 lub 189 aminokwasów (AA) i ciężarze 21 kDa. Działanie białka RAS jest wielokierunkowe (por. przegląd [11]), a główną jego rolę wydaje się być pośredniczenie w aktywacji kaskady kinaz MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) po związaniu czynników wzrostu (jak np. EGF, Epidermal Growth Factor) do odpowiednich receptorowych kinaz tyrozynowych (np. EGF-R, Epidermal Growth Factor Receptor). Po związaniu czynnika wzrostu przez receptor dochodzi do aktywacji RAS, a następnie do łańcuchowej, aktywującej fosforylacji kolejnych kinaz kaskady MAPK: RAF, MEK, ERK i P90<sup>RSK</sup> [11]. Aktywowane kinazy ERK i P90<sup>RSK</sup> fosforylują i aktywują czynniki transkrypcyjne z grupy ETS, co uważane jest za główny mechanizm stymulacji wzrostu przez czynniki wzrostu (por. przegląd [12]). Fosforylowane są ponadto białka SMAD2

i SMAD3, co blokuje przekazanie hamującego wzrost sygnału z receptora TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor beta) [13]. Mutacje genu *K-RAS*, prowadzące do stałej (niezależnej od pobudzenia przez czynniki wzrostu) aktywności kodowanego białka K-RAS, są ważnym mechanizmem kancerogenezy. W rakach jelita grubego stwierdzano takie mutacje w 30% do 40% przypadków [14]. Uważa się, że mutacje *K-RAS* w rakach jelita grubego pojawiają się we wczesnym stadium rozwoju nowotworu. Najczęściej dotyczą one kodonu 12 (ok. 27% przypadków raka), rzadziej kodonu 13 (ok. 7% przypadków) [14].

Gen *p53* (oficjalna nazwa: *TP53*) jest w rakach jelita grubego uszkodzony częściej niż *K-RAS*, lecz do uszkodzeń tych dochodzić ma w nieco późniejszej fazie rozwoju nowotworu [15]. Gen ten, położony na chromosomie 17, koduje białko o długości 393 AA, w którego strukturze wyodrębnić można domenę transaktywacyjną (AA 1÷42), domenę wiążącą DNA (AA 102÷292) i wielofunkcyjną domenę C-końcową, zawierającą m. in. domenę oligomeryzacyjną, sygnał lokalizacji jądrowej i sygnał eksportu z jądra [16]. Dzięki takiej budowie *p53* jest zdolne do tworzenia tetramerów i regulowania transkrypcji licznych genów, w tym kodujących białka zatrzymujące cykl komórkowy (CDKN1A/P21, GADD45, RB, 14-3-3 $\rho$ ) i białka kontrolujące apoptozę (programowaną śmierć komórki – IGF-BP3, BAX, BCL-2) [16]. Ponadto może indukować apoptozę bezpośrednio, dzięki interakcjom z innymi białkami (niezależnie od transaktywacji genów). W normalnej komórce *p53* występuje w niewielkiej ilości, gdyż jest inaktywowane i wydajnie degradowane przy udziale białka MDM2. Gen *MDM2* z kolei jest transaktywowany przez *p53*, co zamyka pętlę sprzężenia zwrotnego kontrolującego poziom i aktywność *p53* w komórce [16]. W przypadkach uszkodzenia DNA, dysfunkcji wrzecionna podziałowego oraz innych zaburzeń homeostazy wewnątrzkomórkowej (np. niedotlenienia) kinazy ATM (Ataxia-Teleangiectasia Mutated) lub DNA-PK (DNA-dependent Protein Kinase) fosforylują *p53* w miejscu odpowiedzialnym za wiązanie do MDM2, co prowadzi do rozerwania wiązania i zahamowania degradacji *p53* [17-19]. Równocześnie odblokowana jest domena aktywująca transkrypcję i reaktywowana jest domena wiążąca DNA w białku *p53*. Aktywne *p53* poprzez mechanizmy zależne i niezależne od transaktywacji zatrzymuje cykl podziałowy i/lub indukuje apoptozę, przez co zapobiega replikacji uszkodzonego DNA i/lub eliminuje komórki z takimi uszkodzeniami [16].

Defekt *p53* może zatem na kilka sposobów przyspieszyć kancerogenezę: ułatwia powstawanie kolejnych mutacji i utratę diploidalności, hamuje apoptozę (w tym wywołaną niedotlenieniem, chemioterapeutykami i leczniczym napromienianiem), a także prawdopodobnie nasila neoangiogenezę. Mutacje genu *p53*, częste w wielu ludzkich nowotworach, dotyczą przeważnie eksonów 5÷8 kodujących domenę wiążącą DNA, a przez to zaburzają funkcję transaktywacyjną *p53*. Wskutek tego zatrzymana zostaje m.in. transkrypcja *MDM2*, a konsekwencją jest zahamowanie degradacji *p53*, które akumuluje się w komórce w ilościach łatwo wykrywalnych immunohistoche-

micznie. W rakach jelita grubego mutacje *p53* są szczególnie częste – dotyczą ok. 50% przypadków [20, 21].

Mutacje *K-RAS* i *p53* są zatem podstawowymi zaburzeniami genetycznymi w rakach jelita grubego. Celem niniejszej pracy było określenie częstości mutacji genów *K-RAS* i *p53* w rakach jelita grubego u pacjentów z populacji polskiej, która jest pod tym względem niedostatecznie zbadana.

## Materiały i metody

Próbki raka i sąsiadującej prawidłowej błony śluzowej pochodziły od 54 chorych (25 kobiet i 29 mężczyzn w wieku od 28 do 82 lat), operowanych z powodu raka jelita grubego w Klinice Nowotworów Jelita Grubego Centrum Onkologii w Warszawie. U jednego z chorych obecne były dwa synchroniczne raki. W każdym przypadku uzyskano histologiczne potwierdzenie rozpoznania gruczolakoraka z określeniem jego cech mikroskopowych oraz oceną stopnia zaawansowania nowotworu. Próbki tkanek przechowywano w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$ . Genomowe DNA izolowano z tkanki metodą trawienia proteinazą K z następczą ekstrakcją fenol-chloroformu [22].

### PCR-RFLP dla kodonu 12 genu *K-RAS*

Fragment genu *K-RAS* obejmujący kodon 12 namnażano z 300 ng całkowitego genomowego DNA w łańcuchowej reakcji polimerazy (Polymerase Chain Reaction, PCR). Mieszanina reakcyjna o całkowitej objętości 25  $\mu\text{l}$  zawierała ponadto firmowy PCR Buffer 1 $\times$ , 0,1% Triton X-100, 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , trifosfodeoksynukleotydy (dNTP) po 0,2 mM, 1 j. polimerazy Taq (odczynniki firmy PE Biosystems), oraz po 40 ng/ $\mu\text{l}$  oligonukleotydów *K-RAS-L* (5'-ACTGAATATAAACTTGTGGTGGTGGACCT-3') *K-RAS-R* (5'-TCAAAGAATGGTCTCGGACC-3'). Mieszaniny reakcyjne poddawano 35 cyklom polimeryzacji ( $94^{\circ}\text{C}$  przez 45 s,  $56^{\circ}\text{C}$  przez 30 s i  $72^{\circ}\text{C}$  przez 30 s) w aparacie GeneAmp 2400 (PE Biosystems). Następnie 10  $\mu\text{l}$  mieszaniny po reakcji trawiono dwukrotnie enzymem MvaI (Roche) w odpowiednim firmowym buforze reakcyjnym, dodając każdorazowo po 10 j. enzymu i inkubując przez 60 min w  $37^{\circ}\text{C}$ . Produkty trawienia rozdzielano elektroforetycznie w żelu agarozowym 3% i barwiono bromkiem etydyny [23].

### PCR fragmentów genu *p53*

Fragmenty genu *p53* obejmujące poszczególne eksony 5, 6, 7, 8, 9 oraz bloki eksonów 2÷4, 5÷6 i 7÷9 namnażano z 20 ng lub 100 ng całkowitego genomowego DNA w łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Mieszanina reakcyjna o całkowitej objętości 30  $\mu\text{l}$  zawierała ponadto odpowiedni firmowy PCR Buffer 1 $\times$ , dNTP po 0,2 mM, 1 j. polimerazy Taq oraz  $\text{MgCl}_2$  (odczynniki firmy MBI Fermentas lub PE Biosystems) i odpowiednie oligonukleotydy po 0,6  $\mu\text{M}$ . Reakcje prowadzono w aparacie GeneAmp 2400; mieszaniny reakcyjne poddawano 40 cyklom polimeryzacji ( $94^{\circ}\text{C}$  przez 10 s, wiązanie oligonukleotydów przez 10 s i  $72^{\circ}\text{C}$  przez 30 s). Sekwencje oligonukleotydów oraz pozostałe warunki reakcji opisano uprzednio [24] i dostępne są one na życzenie u autorów [LT].

### SSCP eksonów 5÷9 genu *p53*

Fragmenty genu *p53*, obejmujące pojedyncze eksony 5÷9, otrzymano jako produkty PCR; 10  $\mu\text{l}$  nie oczyszczonego produktu mieszało z 10  $\mu\text{l}$  buforu denaturującego o składzie 0,1 M NaOH / 10 mM EDTA i inkubowano w  $50^{\circ}\text{C}$  przez 10 min. Po zakończeniu inkubacji dodawano 6  $\mu\text{l}$  obciążającego buforu denaturującego o składzie: 0,1% błękit bromofenolowy i 0,1% błękit ksylenowy w formamidzie. Rozdziału próbek dokonywano w żelu

poliakryloamidowym 10% (stosunek akryloamidu do 4,4-N,N'-bis-akryloamidu wynosił 40:1) z dodatkiem 10% glicerolu. Elektroforezę prowadzono w buforze TBE 0,5 $\times$  (45 mM Tris, 45 mM kwas borowy, 1 mM EDTA, pH=8,0) w aparacie The Sturdier (Amersham-Pharmacia), droga rozdziału wynosiła 14 cm, napięcie 300 V, czas rozdziału 8 h, a temperatura  $4^{\circ}\text{C}$  i  $30^{\circ}\text{C}$  dla eksonu 5 (konieczne jest przeprowadzenie dwóch rozdziałów),  $18^{\circ}\text{C}$  dla eksonu 6,  $22^{\circ}\text{C}$  dla eksonów 7 i 8 oraz  $4^{\circ}\text{C}$  i  $24^{\circ}\text{C}$  dla eksonu 9. Parametry elektroforezy SSCP dobrano na podstawie próbnych rozdziałów znanych mutantów, testując zakres napięć 100÷800 V i temperatur 4÷ $30^{\circ}\text{C}$ . Stabilizację temperatury uzyskano umieszczając cały zestaw do SSCP w inkubatorze do hodowli bakterii (Reciprocating/Orbital Shaking Incubator Rosi1000, Thermolyne) ustawionym w chłodni.

Po zakończeniu elektroforezy żele akryloamidowe utrwalano w 20% kwasie trichlorooctowym przez 5 min., a następnie płukano jeden raz w roztworze o składzie 10% etanol / 5% kwas octowy i temperaturze  $50^{\circ}\text{C}$  przez 4 min., i dwukrotnie w wodzie o temp.  $50^{\circ}\text{C}$  przez 2 min. Utrwalone żele traktowano 0,01% roztworem tiosiarczanu sodowego ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) przez 1 min., i po dwukrotnym płukaniu w wodzie (po 30 sek. każde) barwiono w 4% roztworze azotanu srebra ( $\text{AgNO}_3$ ) o temp.  $40^{\circ}\text{C}$  przez 10 min. Następnie żele płukano dwukrotnie w wodzie przez 10 sek. i wywoływano w 2,5% roztworze węglańku sodu ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), zawierającym 0,015% aldehyd mrówkowy (HCHO) i 0,0003% tiosiarczanu sodowego ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ). Wywoływanie prowadzono do uzyskania wyraźnych prążków DNA, zwykle przez ok. 10 min.. Następnie żele płukano w wodzie przez 10 sek., traktowano 1,6% roztworem  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  przez 1 min. i 10% roztworem glicerolu o temp.  $50^{\circ}\text{C}$  przez 1 min. Po odwodnieniu w 70% metanolu przez 30 min. żele suszono między dwiema warstwami celofanu i skanowano w aparacie Personal Densitometer (Molecular Dynamics).

### Sekwencjonowanie genu *p53*

Sekwencjonowaniu podlegały dłuższe fragmenty (bloki) genu *p53*, obejmujące eksony 5÷6 lub 7÷9, wraz z dzielącymi je intronami. Fragmenty te uzyskano w reakcjach PCR [24] (warunki reakcji i sekwencje starterów dostępne na życzenie [LT]). Produkty PCR oczyszczano na kulkach szklanych (GeneClean III, Bio101) wg zaleceń producenta: rozcieńczano 3-krotnie roztworem NaI, inkubowano z 5  $\mu\text{l}$  GlassMilk przez 5 min., wirowano i odrzucano nadsącz. Osad płukano 3 $\times$  firmowym roztworem New Wash po 400  $\mu\text{l}$  i suszono 5 min. DNA eluowano z osadu dodając 10  $\mu\text{l}$  wody, wirując i zbierając nadsącz.

Sekwencjonowanie prowadzono w automatycznym sekwencerze ABI377 (PE Biosystems), przy użyciu zestawu Dideoxyterminator Sequencing Kit (PE Biosystems), zgodnie z zaleceniami producenta. 200 fmol oczyszczonego produktu PCR łączono w próbce PCR z 8  $\mu\text{l}$  Dye Terminator Premix i 3 pmol oligonukleotydu sekwencyjnego. Objętość reakcji uzupełniano do 20  $\mu\text{l}$  i poddawano 25 cyklom sekwencjonowania ( $96^{\circ}\text{C}$  przez 10 sek.,  $50^{\circ}\text{C}$  przez 5 sek.,  $60^{\circ}\text{C}$  przez 4 min.). Stosowano następujące oligonukleotydy sekwencyjne: dla bloku eksonów 5÷6 – 5'-TGT TCA CTT GTG CCC TGA CT-3' (forward) i 5'-CTC CCA GAG ACC CCA GTT GC-3' (reverse); dla bloku eksonów 7÷9 – 5'-ATT AAC CCT CAC TAA AGG GAA TCT TGG GCC TGT GTT-3', 5'-ATT TCC TTA CTG CCT CTT GC-3' (oba forward), 5'-AGG CTG GGG CAG AGC AGG CC-3' i 5'-ACG GCA TTT TGA GTG TTA GAC TGG A-3' (oba reverse). Produkty reakcji precypitowano etanolem, rozpuszczano w buforze obciążającym (formamid z EDTA) i analizowano w automatycznym sekwencerze ABI377 na 36-cm żelu o składzie 5% LongRanger (FMC) i 8 M mocznik. Dane analizowano z wykorzystaniem oprogramowania Sequence Analysis v.3.0 (PE Biosystems) i pakietu Lasergene (DNASTar).

## Immunohistochemiczne wykrywanie akumulacji białka p53 (IHC)

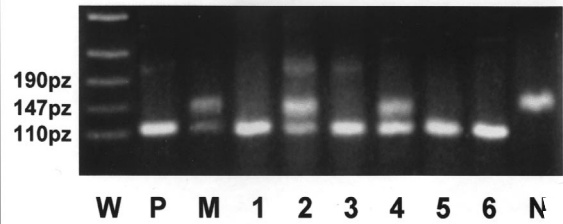
Materiał operacyjny, utrwalony w formalinie i zatopiony w parafinie, krojono na skrawki grubości 4  $\mu\text{m}$  i przeprowadzano w sposób rutynowy. Akumulację białka p53 wykrywano metodą immunohistochemiczną. Endogenną peroksydazę blokowano 3% nadlenkiem wodoru. Skrawki tkankowe inkubowano z mysim monoklonalnym przeciwciałem anti-p53 (DO-7, Dako) w rozcieńczeniu 1:100; determinanty antygenowe białka p53 odmaskowano napromienieniem tkanki w kuchence mikrofalowej (500W przez 15 min.). Następnie inkubowano skrawki z biotynizowanym przeciwciałem króliczym przeciw mysim IgG, a następnie z kompleksem streptawidyna-peroksydaza (Dako); reakcję uwidaczniano za pomocą diaminobenzydyny. Kontrolę negatywną sporządzano pomijając przeciwciało przeciw p53, a kontrolę pozytywną stanowiły próbki raka przełyku.

Reakcję oceniano, klasyfikując brązowe wybarwienie jąder komórkowych według skali: (-) brak barwienia, (+) słabe barwienie z ogniskową reakcją w <50% jąder komórkowych, (++) silne barwienie z rozlaną reakcją w większości komórek. W każdym przypadku zliczano w kilku polach widzenia łącznie po 1000 komórek.

## Wyniki

Analiza restrykcyjna produktów reakcji PCR dla genu *K-RAS* wykazała obecność mutacji kodonu 12 tego genu w 17 z 55 (31%) przypadków raka jelita grubego. Przykład analizy prezentuje Ryc. 1. Stosowana metoda nie pozwala wykrywać mutacji kodonu 13, które występują w rakach jelita grubego z mniejszą częstością. Obecność mutacji *K-RAS* nie korelowała z płcią chorych, lokalizacją i wielkością guza, jego zróżnicowaniem, obecnością prze-

rzutów do regionalnych węzłów chłonnych ani z klasyfikacją zaawansowania według Astler-Coller.



Ryc. 1. Mutacje kodonu 12 genu *K-RAS*, uwidocznione metodą RFLP. W – wzorec wielkości, P – prawidłowy gen *K-RAS*, M – gen zmutowany, 1-6 – próbki badane, N – prawidłowy nietrawiony fragment *K-RAS*. Widoczne mutacje kodonu 12 genu *K-RAS* w próbkach nr 2 i 4.

Do badań immunohistochemicznych dostępne były próbki 45 raków jelita grubego, spośród których 23 (51%) wykazały jądrową akumulację białka p53. Akumulacja nie korelowała z lokalizacją, wielkością, zróżnicowaniem histologicznym guza, obecnością przerzutów lokalnych ani zaawansowaniem wg Astler-Coller. Jednakże akumulacja wystąpiła w 14 z 20 raków u kobiet w porównaniu do 9 z 25 raków u mężczyzn (odpowiednio 70% i 36%,  $p=0.023$ , test  $\chi^2$ ). Ponadto, akumulacja częściej dotyczyła raków z lepszym rokowaniem wg Jass (grupa 1° and 2°), ale różnica nie była znamieną statystycznie ( $p=0,08$ ).

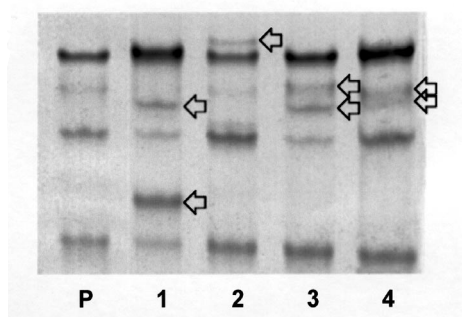
Mutacje genu *p53* wykryto w 24 z 55 badanych raków jelita grubego; SSCP uwidocznilo wszystkie 24 mutacje,

Tab. 1. Zestawienie mutacji genu *p53* wykrytych w DNA raków jelita grubego wraz z określeniem natury mutacji i wybranymi danymi klinicznymi (płeć, wiek, lokalizacja guza, zróżnicowanie histologiczne, obecność komponenty śluzowej w utkanie guza, klasyfikacja zaawansowania Astler-Coller i grupa prognostyczna Jass) oraz badaniem immunohistochemicznym (IHC).

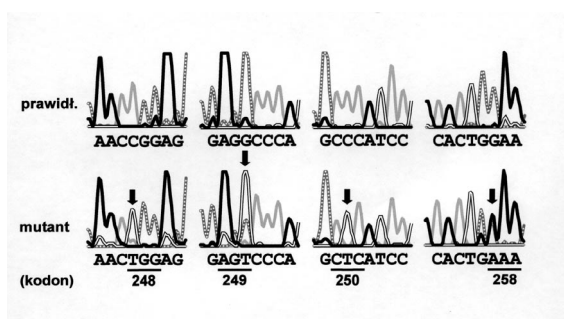
Nr	płeć	wiek	guz	zróżn.	komp. śluz.	Astler Coller	Jass	ekson	kodon	zmiana nukleotydu	zmiana aminokwasu	IHC
109	M	66	lo	G2		B2	1	e5	151	CCC→CAC	Pro→His	++
034	M	75	od	G2		B1	2	e5	164	AAG→GAG	Lys→Glu	++
039	M	36	lo	G2		D1	4	e5	175	CGC→CAC	Arg→His	++
067	M	54	lo	G2	śluz	C2	4	e5	175	CGC→CAC	Arg→His	++
063	K	66	po	G2		C2	4	e6	193	CTA→TAT	His→Tyr	++
097	M	49	po	G3	śluz	C2	4	e6	213	CGA→TGA	Arg→stop	-
107	K	72	po	G2	śluz	C2	4	e6	213	CGA→TGA	Arg→stop	-
059	K	64	po	G2		C2	3	e6	217	GTG→ΔGTG	Val→ΔVal	?
046	K	56	od	G2	śluz	D1	4	e6	220	TAT→TGT	Tyr→Cys	++
038	K	63	lo	G2		B1	2	e7	248	CGG→TGG	Arg→Trp	++
101	M	82	po	G2		C2	4	e7	248	CGG→TGG	Arg→Trp	++
105	M	74	lo	G2		C2	4	e7	248	CGG→TGG	Arg→Trp	++
091	K	56	od	G2		B2	3	e7	248	CGG→CAG	Arg→Gln	?
025	M	43	lo	G1		B2	2	e7	249	AGG→AGT	Arg→Ser	++
057	K	49	lo	G2		B2	2	e7	250	CCC→CTC	Pro→Lys	++
053	M	47	od	G2		C2	4	e7	255	ATC→TTC	Ile→Phe	-
030	M	74	od	G1		B1	1	e7	258	GAA→AAA	Glu→Lys	++
024	K	72	lo	G2		B1	?	i7	n.d.	agT→aaT	składanie	?
042	K	47	od	G2		B2	2	e8	266	GGA→AGA	Gly→Arg	++
071	K	69	lo	G2	śluz	B2	2	e8	273	CGT→TGT	Arg→Cys	++
043	K	74	lo	G2		B2	2	e8	273	CGT→CAT	Arg→His	++
051	K	56	po	G2		B2	?	e8	273	CGT→CAT	Arg→His	++
045	M	61	od	G2		C1	4	e8	277	TGT→TTT	Cys→Phe	?
069	M	63	od	G2		C2	4	e8	306	CGA→TGA	Arg→stop	-

M – mężczyzna, K – kobieta; po – okrężnica strona prawa (i kątnica), lo – okrężnica strona lewa i esica, od – odbytnica; e – ekson, i – intron, n.d. – nie dotyczy, ? – nie określono

a bezpośrednio sekwencjonowanie – 21 z 24 mutacji. Jedną mutacją polegała na delecji trzech zasad GTG w ciągu GTGGTGGTG w eksonie 6, który koduje trzy kolejne waliny. Pozostałe 23 mutacje polegały na zamianie jednego nukleotydu (mutacje punktowe) z konsekwencjami w postaci zmiany kodowanego aminokwasu (mutacje zmiany sensu, 'missense', 19 z 23 przypadków) lub powstania kodonu stop (mutacje nonsensowne, 3 z 23 przypadków, 13%). W jednym przypadku zamiana dotyczyła nukleotydu bezpośrednio poprzedzającego ekson 8, co najprawdopodobniej wywołało zaburzenia składania RNA ('splicing') i wypadnięcie tego eksonu z dojrzałego mRNA. Zmiany nukleotydów w genie *p53* stwierdzone w badanym materiale były w 79% tranzycjami (tranzycje C->T w 9 przypadkach, G->A w 8 przypadkach i A->G w 2 przypadkach). Tranzykcje w miejscach CpG obecne były w 12 przypadkach (50% ogółu mutacji). Transwersje leżały u podłoża 4 mutacji. Regiony konserwatywne genu *p53* były uszkodzone w 14 z 24 przypadków (58% ogółu mutacji). Uszkodzenia *p53* najczęściej dotyczyły kodonów 175, 248 i 273 (odpowiednio 2, 4 i 3 przypadki, czyli odpowiednio 8%, 17% i 13% ogółu mutacji), znaleziono także 2 mutacje typu stop w kodonie 213. Obecność mutacji genu *p53* korelowała z akumulacją białka p53 ( $p=0.0005$ , test  $\chi^2$ ), a nie korelowała z płcią chorych, lokalizacją i wielkością guza, jego zróżnicowaniem, obecnością przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych ani z klasyfika-



Ryc. 2. Mutacje eksonu 8 genu *p53*, uwidocznione metodą PCR-SSCP. P – prawidłowy ekson 8 genu *p53*, 1-4 – próbki zawierające różne mutacje eksonu 8 genu *p53*. Strzałki wskazują fragmenty DNA o nieprawidłowym tempie migracji.



Ryc. 3. Określenie natury mutacji dla eksonu 7 genu *p53* w automatycznym sekwencjonowaniu. Górne wykresy przedstawiają sekwencje prawidłowe, dolne – sekwencje zmutowane (zmutowany kodon podkreślono). Strzałki wskazują mutacje.

cją zaawansowania według Astler-Coller. Wyniki badań genu i białka p53 podsumowuje Tabela 1. Przykładowe obrazy mutacji genu *p53* w SSCP prezentuje Ryc. 2, a sekwencjonowanie – Ryc. 3.

## Omówienie

Zapadalność na raka jelita grubego znacznie różni się w poszczególnych regionach geograficznych świata, a Polska w ostatnich latach przesuwa się z grupy o średniej do grupy o wysokiej zapadalności. Odzwierciedla to ogólną korelację między zapadalnością na raka jelita grubego a poziomem rozwoju socjoekonomicznego. Szczegółowe mechanizmy tej korelacji nie są znane. Można przypuszczać, że różne populacje w różnym stopniu narażone są na działanie różnych czynników kancerogennych, a zatem i molekularna charakterystyka nowotworów w tych populacjach może się różnić. Jednak dla raków jelita grubego jedynie nieliczne badania prowadziły do takiego wniosku. Częstość mutacji *K-RAS* dla różnych populacji jest według większości autorów zbliżona i wynosi ok. 30÷40%, a choć porównanie wyników poszczególnych ośrodków wykazało znamienne statystycznie różnice, to przyczyny tych różnic są bardziej natury metodycznej niż geograficznej [14, 25]. Również dla genu *p53* częstość mutacji w rakach jelita grubego jest w większości badań podobna (~50% [20, 21]), choć rozrzut skrajnych wyników jest znaczny – od 18% [26] do 70% [15]. Z uwagi na bardzo szerokie spektrum mutacji w genie *p53* w tym przypadku szczególną rolę odgrywa prawidłowa implementacja metody badawczej. Większość badaczy posługuje się techniką SSCP, której czułość znacznie zmienia się wraz z temperaturą elektroforezy, a ta rzadko jest precyzyjnie stabilizowana. Zatem, podobnie jak dla *K-RAS*, również dla *p53* zróżnicowanie metodologiczne może prowadzić do uzyskiwania nieporównywalnych wyników przy badaniu porównywalnych populacji.

W naszych badaniach do oceny *K-RAS* stosowaliśmy technikę PCR-RFLP, która jest wysoce powtarzalna, zaś gen *p53* ocenialiśmy dwutorowo: metodą SSCP ze stabilizacją temperatury oraz w drodze bezpośredniego sekwencjonowania. Ponadto określiliśmy częstość akumulacji białka p53 jako pośredni wskaźnik dysfunkcji układu p53. Mutacje kodonu 12 genu *K-RAS* wystąpiły w 31% przypadków, a więc porównywalnie do wieloośrodkowego badania RASCAL, gdzie odsetek ten wyniósł 27% [14]. Akumulacja białka p53 wystąpiła w 51% przypadków, co odpowiada wynikom uzyskiwanym w dużych badaniach na świecie [27-29]. Mutacje eksonów 5÷8 genu *p53* znaleziono w 44% przypadków, co jest prawie identyczne z odsetkiem 46% z największej opublikowanej pracy [20]. Również charakterystyka tych mutacji – z przewagą mutacji punktowych (najczęściej tranzycji) w regionach konserwatywnych z „gorącymi miejscami” w kodonach 175, 248 i 273 (2, 4 i 3 przypadki, czyli odpowiednio 8%, 17% i 13% ogółu mutacji) odpowiada typowemu spektrum ustalonym na podstawie bazy wszystkich opublikowanych mutacji *p53* w ludzkich nowotworach (gdzie mutacje genu *p53* w rakach jelita grubego dotyczą kodonu 175

w 10%, kodonu 248 w 13% przypadków i kodonu 273 w 8%) [30]. Połowa mutacji punktowych w badanym materiale to tranzycje w potencjalnie metylowanych miejscach CpG, co również odpowiada danym światowym i sugeruje dominujący wpływ endogennej mutagenyzy w etiopatogenezie tego nowotworu. Zatem – mimo pewnych odrębności epidemiologicznych – molekularny profil raków jelita grubego w Polsce nie różni się istotnie od światowego. Nie można jednak na tej podstawie orzec, że w różnych populacjach działają te same czynniki kancerogene, gdyż – w odróżnieniu od spektrum mutacji *p53* dla endemicznego raka wątroby [31] czy nowotworów skóry [32] – spektrum mutacji *p53* w rakach jelita grubego jest nie charakterystyczne.

W badanym materiale obecność mutacji w genie *p53* korelowała z akumulacją białka p53. Jednak mutacje prowadzące do skrócenia kodowanego białka nie prowadziły do jego akumulacji. Ponadto, w pojedynczych przypadkach obserwowano akumulację p53, nie wykrywając mutacji genu *p53*. Niezgodności takie są typowo stwierdzane w badaniach łączących IHC oraz techniki molekularne i dotyczą 20-30% badanych przypadków [33, 34]. Podczas gdy brak akumulacji skróconego białka jest najpewniej wynikiem utraty sygnału lokalizacji jądrowej, to nie jest jasne, czy dodatni wynik IHC przy braku wykrywalnej mutacji *p53* oznacza fałszywie ujemny wynik badania mutacji, czy fałszywie dodatni wynik IHC, czy też jest efektem tzw. zmian epigenetycznych.

Badania molekularnego podłoża raka jelita grubego mają na celu nie tylko wyjaśnienie etiopatogenezy tego nowotworu, ale mogą mieć istotne implikacje kliniczne. Obecność mutacji w określonych genach oznacza bowiem zaburzenia czynności kodowanych przez nie białek, a to teoretycznie determinuje biologiczne własności nowotworu. Można na przykład oczekiwać, że mutacje *K-RAS* zwiększą tempo proliferacji w komórkach nowotworowych, a mutacje *p53* osłabią ich zdolność do utrzymania diploidalności i do apoptozy (a przez to zmniejszą ich podatność na chemio- i radioterapię). W praktyce oznaczałoby to szybszy wzrost guza i/lub mniejszą podatność na leczenie, a ostatecznie – zależność indywidualnego rokowania od molekularnego podłoża raka u danego pacjenta. Stwierdzenie takiej zależności wymagać może zbadania bardzo licznej grupy chorych; wg studium RASCAL dla wykrycia 10% różnicy w przeżyciu między dwoma grupami chorych z rakiem jelita grubego trzeba zgromadzić ok. 1000 przypadków. Analizy takiej nie prowadzono w niniejszej pracy, zależności takie badano jednak w piśmiennictwie światowym.

I tak obecność mutacji *K-RAS* najczęściej nie wykazywała związku z przeżyciem chorych z rakiem jelita grubego, choć w jednym z większych badań stwierdzono znamienne większą częstość mutacji *K-RAS* w przypadkach raka jelita grubego dających wznowę ( $p < 0.0001$ ) [35]. Jednak wielośrodkowa analiza dokonana na grupie 2700 pacjentów z rakiem jelita grubego (studium RASCAL) wykazała, że obecność mutacji *K-RAS* zwiększa ryzyko zgonu 1,25x, przy czym dla mutacji G->T oraz dla mutacji kodonu 12 z Gly na Val ryzyko to wynosi 1,43x w po-

równaniu do pozostałych chorych [14]. W innej pracy stwierdzono również, że obecność mutacji *K-RAS* koreluje z gorszą odpowiedzią na 5-fluorouracyl i lewamizol w III stopniu zaawansowania raka jelita grubego (ryzyko zgonu wzrasta 2,5x) [36].

Dla genu *p53* związek obecności mutacji z przeżyciem chorych jest bardziej kontrowersyjny niż dla *K-RAS*, z uwagi na duże rozbieżności między badaniami i brak wielośrodkowego badania podsumowującego, takiego jak RASCAL. W kilku pracach stwierdzono, że obecność mutacji *p53* koreluje z gorszym przeżyciem [20, 21, 37] lub gorszą odpowiedzią na 5-fluorouracyl [38], ale w wielu innych pracach takiej korelacji nie ma. Część badań immunohistochemicznych potwierdza korelację akumulacji p53 (mającej pośrednio świadczyć o obecności mutacji *p53*) ze skróceniem przeżycia. Jednak wg Bosari i wsp. wskaźnikiem krótszego przeżycia jest akumulacja cytoplazmatyczna, a nie jądrowa [29]; zaś kilku innych autorów wykazywało, że obecność akumulacji białka p53 korelowała z dłuższym przeżyciem [36, 39]. Ostateczne rozstrzygnięcie wątpliwości przyniesie zapewne dopiero praca wielośrodkowa, podobna do badania RASCAL dla genu *K-RAS*, która wymagać będzie analizy wielu tysięcy przypadków. Warto zauważyć, że dla *K-RAS* niektóre typy mutacji nie korelowały ze skróceniem przeżycia [14] – podobnie dla *p53* sugerowano, że jedynie mutacje regionów konserwatywnych albo mutacje w regionie kodującym pętlę L3 domeny wiążącej DNA mogą wpływać na skrócenie przeżycia chorych z rakiem jelita grubego [20, 37] i innych nowotworów [40].

W przyszłości główną korzyścią z badania molekularnego profilu danego nowotworu będzie zapewne możliwość celowanego doboru leczenia. Wspomniano już o możliwym związku mutacji *K-RAS* i *p53* z gorszą skutecznością klasycznej chemio- lub radioterapii. W oparciu o badania molekularne rozwijane są też nowe, nie klasyczne metody lecznicze. Na przykład białko RAS do uzyskania pełnej aktywności wymaga modyfikacji (tzw. farnesylicacji) – dotyczy to również białka zmutowanego. Opracowano zatem farmakologiczne inhibitory farnesylicacji, cechujące się dużą rozpiętością dawki terapeutycznej i efektywnym działaniem przeciwnowotworowym w zwierzęcych modelach nowotworów [41]. Trwają również próby opracowania efektywnych metod terapii genowej. Należy zatem oczekiwać, że w niedalekiej przyszłości analiza mutacji *K-RAS*, *p53* czy innych genów związanych z nowotworzeniem stanie się elementem rutynowej diagnostyki onkologicznej, a nie – jak dotąd – domeną badań podstawowych.

## Wnioski

Podsumowując, obecność mutacji kodonu 12 genu *K-RAS* wykryto w 17 z 55 przypadków raka jelita grubego (31%). Mutacje eksonów 5÷9 genu *p53* pojawiły się w 24 z 55 przypadków (44%), a akumulacja białka p53 wystąpiła w 23 z 45 raków (51%). Częstość tych zaburzeń oraz profil mutacji genu *p53* w badanym materiale są porównywalne z publikowanymi w piśmiennictwie światowym, co

pośrednio przemawia za podobną etiologią raka jelita grubego w różnych populacjach, mimo zróżnicowania sytuacji epidemiologicznej w tych populacjach.

**Prof. dr hab. med. Jerzy Ostrowski**

Klinika Gastroenterologii Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego

Centrum Onkologii, ul. Roentgena 5, 02-781 Warszawa

email: jerzyo@atos.warman.com.pl

## Piśmiennictwo

- Zatoński W, Tyczyński J. *Nowotwory złośliwe w Polsce w 1996 r.* Warszawa: Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie; 1999.
- Fearon ER i Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 5: 759-67.
- Herman JG, Merlo A, Mao L i wsp. Inactivation of the *CDKN2/p16/MTS1* gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 1995; 55: 4525-30.
- Miyoshi Y, Ando H, Nagase H i wsp. Germ-line mutations of the *APC* gene in 53 familial adenomatous polyposis patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4452-4456.
- Iwao K, Nakamori S, Kameyama M i wsp. Activation of the beta-catenin gene by interstitial deletions involving exon 3 in primary colorectal carcinomas without adenomatous polyposis coli mutations. *Cancer Res* 1998; 58: 1021-6.
- Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR i wsp. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 1987; 327: 293-297.
- Forrester K, Almoguera C, Han K i wsp. Detection of high incidence of *K-ras* oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature* 1987; 327: 298-303.
- Schutte M, Hruban RH, Hedrick L i wsp. *DPC4* gene in various tumor types. *Cancer Res* 1996; 56: 2527-30.
- Grady WM, Myeroff LL, Swinler SE i wsp. Mutational inactivation of *Transforming Growth Factor  $\beta$  Receptor Type II* in microsatellite stable colon cancers. *Cancer Res* 1999; 59: 32904
- Baker SJ, Fraron ER, Nigro JM i wsp. Chromosome 17 deletions and *p53* gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989; 244: 217-221.
- Campbell SL, Khosravi Far R, Rossman KL i wsp. Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* 1998; 17: 1395-413.
- Wasyluk B, Hagman J i Gutierrez Hartmann A. Ets transcription factors: nuclear effectors of the Ras-MAP-kinase signaling pathway. *Trends Biochem Sci* 1998; 23: 213-6.
- Kretschmar M, Doody J, Timokhina I i Massagué J. A mechanism of repression of TGF $\beta$ /Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev* 1999; 13: 804-816.
- Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D i wsp. *Kirsten ras* mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter „RASCAL” study. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 675-84.
- Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM i wsp. *p53* gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 1990; 50: 7717-7722.
- Ko LJ i Prives C. *p53*: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 1996; 10: 1054-72.
- Banin S, Moyal L, Shieh S i wsp. Enhanced phosphorylation of *p53* by ATM in response to DNA damage. *Science* 1998; 281: 1674-7.
- Khanna KK, Keating KE, Kozlov S i wsp. ATM associates with and phosphorylates *p53*: mapping the region of interaction. *Nat Genet* 1998; 20: 398-400.
- Shieh S-Y, Taya Y i Prives C. DNA damage-inducible phosphorylation of *p53* at N-terminal sites including a novel site, Ser20, requires tetramerization. *EMBO J* 1999; 18: 1815-23.
- Borresen Dale AL, Lothe RA, Meling GI i wsp. *TP53* and long-term prognosis in colorectal cancer: mutations in the L3 zinc-binding domain predict poor survival. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 203-10.
- Hamelin R, Laurent PP, Olschwang S i wsp. Association of *p53* mutations with short survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1994; 106: 42-8.
- Maniatis T, Fritsch EF i Sambrook J. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- Kopreski MS, Benko FA, Kwee C i wsp. Detection of mutant *K-ras* DNA in plasma or serum of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 1997; 76: 1293-9.
- Trzeciak L. *Mutacje genu p53 w rakach jelita grubego.* Rozprawa doktorska. Warszawa: Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego; 1999, stron 99.
- Bjorheim J, Lystad S, Lindblom A i wsp. Mutation analyses of *KRAS* exon 1 comparing three different techniques: temporal temperature gradient electrophoresis, constant denaturant capillary electrophoresis and allele specific polymerase chain reaction. *Mut Res* 1998; 403: 103-12.
- Pauly M, Schmitz M, Kayser I i wsp. *Ki-ras* oncogene and *p53* tumour suppressor gene mutations in colorectal carcinomas from the European Saar-Luxembourg region are less frequent than predicted by the classic adenoma-carcinoma sequence model. *Eur J Cancer* 1997; 33: 2265-72.
- Sun XF, Carstensen JM, Zhang H i wsp. Prognostic significance of cytoplasmic *p53* oncoprotein in colorectal adenocarcinoma. *Lancet* 1992; 340: 1369-73.
- Starzynska T, Bromley M, Ghosh A i Stern PL. Prognostic significance of *p53* overexpression in gastric and colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 1992; 66: 558-62.
- Bosari S, Viale G, Bossi P i wsp. Cytoplasmic accumulation of *p53* protein: an independent prognostic indicator in colorectal adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 681-7.
- Hainaut P, Hernandez T, Robinson A i wsp. IARC Database of *p53* gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisation tools. *Nucl Acid Res* 1998; 26: 205-13.
- Hsu IC, Metcalf RA, Sun T i wsp. Mutational hotspot in the *p53* gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* 1991; 350: 427-8.
- Brash DE, Rudolph JA, Simon JA i wsp. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced *p53* mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 10124-8.
- Cripps KJ, Purdie CA, Carder PJ i wsp. A study of stabilisation of *p53* protein versus point mutation in colorectal carcinoma. *Oncogene* 1994; 9: 2739-43.
- Bertorelle R, Esposito G, Del Mistro A i wsp. Association of *p53* gene and protein alterations with metastases in colorectal cancer. *Am J Surg Pathol* 1995; 19: 463-71.
- Benhattar J, Losi L, Chaubert P i wsp. Prognostic significance of *K-ras* mutations in colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 1993; 104: 1044-8.
- Ahnen DJ, Feigl P, Quan G i wsp. *Ki-ras* mutation and *p53* overexpression predict the clinical behavior of colorectal cancer: a Southwest Oncology Group study. *Cancer Res* 1998; 58: 1149-58.
- Goh HS, Yao J i Smith DR. *p53* point mutation and survival in colorectal cancer patients. *Cancer Res* 1995; 55: 5217-21.
- Benhattar J, Cerottini JP, Saraga E i wsp. *p53* mutations as a possible predictor of response to chemotherapy in metastatic colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 1996; 69: 190-2.
- Dix BR, Robbins P, Soong R i wsp. The common molecular genetic alterations in Dukes' B and C colorectal carcinomas are not short-term prognostic indicators of survival. *Int J Cancer* 1994; 59: 747-51.
- Borresen AL, Andersen TI, Eyfjord JE i wsp. *TP53* mutations and breast cancer prognosis: particularly poor survival rates for cases with mutations in the zinc-binding domains. *Genes Chromosomes Cancer* 1995; 14: 71-5.
- Barrington RE, Subler MA, Rands E i wsp. A farnesyltransferase inhibitor induces tumor regression in transgenic mice harboring multiple oncogenic mutations by mediating alterations in both cell cycle control and apoptosis. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 85-92.

Otrzymano: 8 października 1999 r.

Przyjęto do druku: 21 stycznia 2000 r.