

유전자 불안정성의 기전과 임상적 적용

경희대학교 의과대학 외과학교실

이 석 환

Mechanism of Genomic Instability and Its Clinical Applications

Suk-Hwan Lee, M.D., Ph.D.

Department of Surgery, Kyung Hee University College of Medicine, Seoul, Korea

Multiple genetic alterations are common prerequisite for carcinogenesis including colorectal cancers (CRCs). Recently, mutations within microsatellites have been described as a result of defective DNA mismatch repair (MMR) mechanisms, resulting in the phenomenon of microsatellite instability (MSI). This has been implicated in the etiology of hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) and significant portions of sporadic colorectal cancers. However, the mechanisms underlying the MSI are different from hereditary CRCs and sporadic CRCs. While the germline mutation of MMR genes is responsible for HNPCC, the hypermethylation of MLH1 gene promoter regions, an epigenetic, not inherited alteration is responsible for most sporadic CRCs showing MSI. MSI tumors exhibit characteristic clinicopathologic features, i.e, tumors are preferentially located to proximal to splenic flexure, poorly differentiated, mucinous cell type, frequently showing peritumoral lymphocytic infiltration, and, of importance, showing better survival in stage-matched cases. In this article, the results of recent investigations about MSI and its clinical applications are comprehensively reviewed. Knowledge of these biochemical mechanisms are likely to lead to more effective diagnosis and therapy of CRCs in the future. **J Korean Soc Coloproctol 2004;20:64-73**

Key Words: Genomic instability, Microsatellite instability, Hereditary non-polyposis colorectal cancer, Epigenetic alteration

유전자 불안정성, 현미부수체 불안정성, 가족성 비용종증대장암, 에피제네틱 변화

책임저자: 이석환, 서울시 동대문구 회기동 1번지
경희의료원 외과(우편번호: 130-702)
Tel: 02-958-8266, Fax: 02-966-9366
E-mai: leeshdr@khu.ac.kr

서 론

인간은 외부의 환경과 상호 관계를 통해 끊임없는 진화의 과정을 밟아 왔으며, 이러한 진화는 유전자의 자연의 선택(evolution by natural selection)의 결과이다. 진화 과정은 먼저 유전 정보의 무작위 변이가 일어나 후대로 전해지며, 변이된 유전 정보가 생체의 생존과 번식을 위해 선택적으로 변화되는 것이다(clonal selection). 분자생물학 연구 기법의 발달로 암 역시 이러한 유전자의 변화에 의해 일어나는 질환으로 인식되고 있다.

정상세포가 암세포로 되기까지는 유전자에 여러가지 변화를 일으켜야 한다. 즉 성장억제 또는 활성인자에 독립적이어야 하며, 이상 클론의 선택과 확장(clonal selection and expansion), 불멸화(immortalization), 세포고사 기전의 불활성화, 혈관 신생, 세포 분화와 노화 기전의 회피 및 전이라는 다단계의 과정을 거쳐야 한다고 알려져 있다.¹

정상세포의 경우, 돌연변이원(mutagen)이 완전히 배제된 환경하에서 우발적인 돌연변이의 발생 확률은 $1.4 \times 10^{-10} \sim 10^{-6}$ mutations/base pair/cell generation 정도로 매우 낮다. 누드 마우스를 이용한 동물실험의 경우에는 2개 내지 3개의 돌연변이만으로도 암 발생이 가능하다. 그러나 인간의 암세포에서 보이는 평균 100,000개 정도의 수많은 돌연변이는 일반적인 산술 계산으로는 설명이 불가능한 경우가 된다.²

Loeb는 인간 세포에서 일어나는 일상적인 돌연변이율에 비추어 볼 때, 종양세포에서 발견되는 수많은 돌연변이의 집적은 산술적으로 불가능한 일임을 지적하였으며, 이러한 불가능한 상황이 발생하는 원인을 '과돌연변이성(hypermutable)' '유전자 불안정성(genetic instability)' 또는 '돌연변이 표현형(mutator phenotype)'이라는 가설로 설명하였다. 즉 정상 세포가 종양세포로 변하기 위해서는 우선 세포 내의 유전자들이 쉽게 돌연변이를 일으키는 상

태, 즉 불안정한 상태로 변해야 한다는 것이다.³

본문에서는 유전자 불안정의 기전 중 현미부수체 불안정성(microsatellite instability, 이하 MSI)과 이들의 임상적 적용에 대해 최근 연구들을 중심으로 기술하고자 한다.

본 론

1) 현미부수체(microsatellite), 현미부수체 불안정성(microsatellite instability)의 정의

현미부수체는 유전체(genome)에 광범위하게 분포하고 있는 1~5 bp의 DNA 조각들이다. 전체 유전체의 30%가 현미부수체로 이루어져 있다. 대표적인 mononucleotide microsatellite는 13개의 adenine이 반복된 형태이며 (A)₁₃이라고 표시한다. 사람에게서 가장 흔한 현미부수체는 dinucleotide인 cytosine과 adenine의 반복으로 (CA)_n이라고 표시한다. 또한 trinucleotide 반복은 감수분열시기에 주로 확장되는데, trinucleotide 반복에 이상이 초래될 경우 Huntington's disease나 fragile X syndrome과 같은 질병을 유발한다.⁴ 이러한 현미부수체 중 유전되며, 개개인에 따른 차이를 보이는 경우를 다형성 현미부수체(polymorphic microsatellite)라 하며, 다형성 현미부수체는 매우 중요한 유전적 표지자의 역할을 하는데, 법의학 분야에서 친자구별을 하거나, 암을 비롯한 다양한 질병의 원인 유전자를 찾는 데 이용된다.

현미부수체 불안정성(MSI)이란 부정합 교정 유전자(mismatch repair gene 이하 MMR gene)의 배선 돌연변이

반복염기 서열인 현미부수체에 삽입, 탈락과 같은 체성 돌연변이(somatic mutation)가 일어나 DNA의 길이가 달라지는 현상을 말한다. MSI는 replication error (RER)+, MIN (mutational instability) 등으로 혼동하여 사용되지만 본문에서는 MSI로 표기하도록 한다.

현미부수체 불안정성을 측정하기 위해서는 여러가지 종류의 현미부수체 표지자를 이용할 수 있으나 대장암의 경우는 National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability에서는 5개의 현미부수체 표지자(BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250)를 반드시 검사할 것을 권장하고 있으며,⁵ 5개의 표지자 중 2개 이상에서 불안정성을 보일 경우를 MSI-high (MSI-H), 5개 중 1개에서만 불안정성을 보일 경우를 MSI-low (MSI-L), 불안정성이 없는 경우를 MSS (microsatellite stable) 등으로 정의하고 있다 (Fig. 1~3).

MMR gene의 이상으로 생기는 돌연변이는 점상 돌연변이(point mutation), 염기쌍의 삽입 및 탈락, 염색체 분절이나 전체 소실, 전위, 중복과 같이 매우 다양하며 유전자 검사는 비용과 시간이 매우 많이 소요되고 적절한 유전학적 상담이 요구되므로 임상에서 유전자 검사를 받아야 하는 환자군을 선택하는 것은 매우 중요하다. 이를 위해 1991년 International Collaborative Group on HNPCC에서 가족성 비용종증 대장암(Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer, 이하 HNPCC) 환자군의 선별을 위한 Amsterdam criteria를 발표하였다.⁶ 그러나 이 기준 역시 환자군의 선별에 너무 엄격하다는 비판이 있어 최근 International

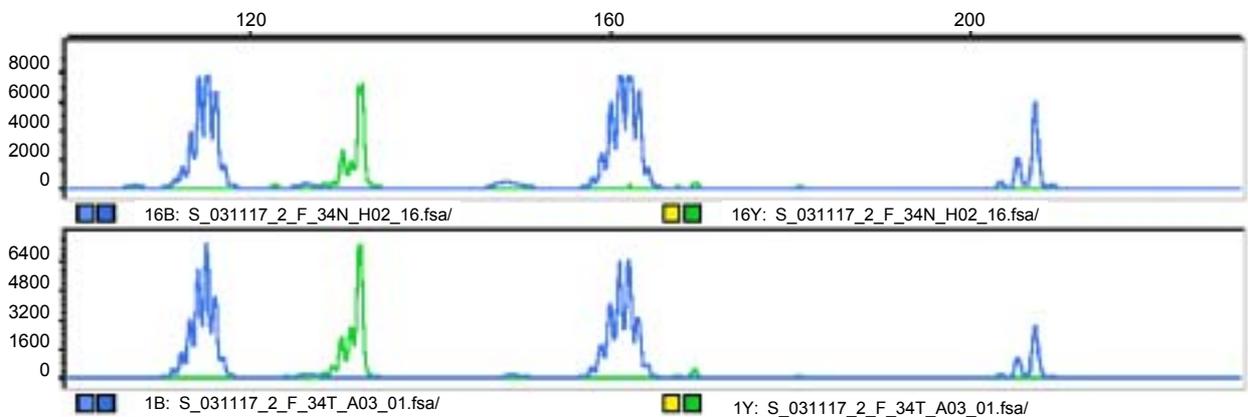


Fig. 1. Example of microsatellite stable (MSS) tumor. All 5 markers from normal colonic mucosa (upper) and tumor tissue (lower) showed same DNA fragment pattern. (germline mutation)로 인해 유전자 전체에 걸쳐 존재하는 International Collaboration Group에서는 대장암 뿐 아니라 소장암, 자

Table 2. Comparison of two pathways

Feature	CIN*	MSI [†]
Frequency	85%	15%
Genomic instability	Chromosomal	Microsatellite
Ploidy	Aneuploid	Diploid
LOH [‡]	Common	Rare
Mutations in genes	Point mutation, deletion, insertion	Insertion or deletion in repetitive sequences
Tumor location	66% left-sided	80~90% right-sided
Age	Older	Younger & very elderly
Prognosis	Poor	Good

*CIN = chromosomal instability; [†] MSI = microsatellite instability; [‡] LOH = loss of heterozygosity.

단백질 기능이 변화되어 암이 발생하는 것이다. 가장 대표적인 예가 BAX 유전자와 transforming growth factor II receptor (이하 TGFIIIR) 유전자이다. BAX 유전자는 단백질 해독 부위에(G)₈의 현미부수체를 포함하고 있으며, MMR gene의 이상이 있는 경우 DNA 복제 과정 중 한 개 혹은 두 개의 guanine의 탈락이 일어나며 이로 인해 틀변이(frame shift)가 일어나 BAX 유전자의 기능이 소실되며, 이로 인해 Bcl-2 매개의 세포 고사 경로가 억제되어 암이 발생한다. TGFIIIR 의 경우에도(A)₁₀ 현미부수체를 포함하고 있으며 불활성화될 경우 암화 과정 중 가장 중요한 암 억제 유전자의 기능 소실이 일어난다.

3) 현미부수체 불안정성의 기전

(1) 부정합 교정 유전자의 배선 돌연 변이: HNPCC는 가족성 대장암의 한 유형으로 일반 대장암에 비해 젊은 나이에 발생하며, 동시성 대장암(synchronous colorectal cancer)과 이시성 대장암(metachronous colorectal cancer)의 발생빈도가 높고, 우측 대장에 호발하며, 분화도가 나쁜 대장암의 비율이 높고, 예후가 좋으며, 자궁내막암, 난소암, 위암, 간담도암 등 extracolonic tumor가 발생한다고 하여 진단 및 치료에 매우 중요한 의미가 있다.¹ 그러나 진단을 위해서는 가족성 용종증과 달리 질병의 특징적인 표현형인 용종증이 없으므로 전적으로 환자의 가족력에 의존하여 진단해야 하는 문제점이 있다. HNPCC 환자의 50~70%에서 hMLH1이나 hMSH2의 배선 돌연변이가 있다고 알려지고 있으며, 이와 같은 배선 돌연변이가 있

는 경우의 90%에서 MSI 형질을 획득하게 되고 상기한 바와 같이 exon 부위에 현미부수체 구조를 가진 일련의 유전자들이 체성 돌연변이를 일으키면서 빠른 속도로 암이 발생하게 된다.^{5,11-14}

HNPCC는 hMLH1, hMSH2, hPMS1, hPMS2, hMSH6와 같은 MMR gene의 배선 돌연 변이에 의해 유발되며, 90% 이상에서 MSI를 보인다고 하여 HNPCC 진단의 효율성을 높이기 위해 고위험군 환자에서 MSI assay를 권장하고 있다.^{5,15}

HNPCC 환자에서 발견되는 대부분의 배선 돌연변이는 hMLH1과 hMSH2 유전자라고 알려지고 있으나, 최근 들어 MSI-L를 보이는 경우 MSH6 유전자의 배선 돌연변이를 보인다는 보고도 있다.¹⁶⁻¹⁹ MSS tumor와 MSI-H tumor는 상기한 바와 같이 서로 상이한 임상적 특징을 보이지만 아직까지 MSI-L tumor의 역할에 대해서는 많이 알려져 있지 않다. Jass 등은 대장암의 전암단계인 증식성용종이나 serrated adenoma에서 MSI-L를 보이는 경우가 많으며 이는 MSS tumor와 MSI tumor의 중간 정도인 ‘mild mutator pathway’의 증거라고 주장하였다.²⁰⁻²² 그러나 MSI assay에 사용된 현미부수체 표지자의 수가 증가함에 따라 MSI-L 표현형을 보이는 대장암의 비율이 증가하므로 아직까지 MSI-L tumor의 생화학적, 임상적 의미에는 논란이 많다.²³

(2) CpG island mutator pathway: 대장암의 가족력이 없는 산발성 대장암의 15% 정도가 MSI를 보이지만 대부분의 경우 MMR gene의 배선 돌연변이를 발견할 수 없다. 산발성 대장암 중 MSI tumor 역시 HNPCC와 유사한 임상적 특성을 보인다. 즉 우측 대장암의 빈도가 높으며, 여자에서 호발하고, 미분화암의 분포가 높으며, 병기에 따른 예후가 우수하다는 것이다. 산발성 대장암 중 MSI tumor는 hMLH1 단백질의 면역조직화학 염색에서 단백질의 발현이 안 되는 경우가 많으며, 그 기전으로서 hMLH1 유전자의 촉진자(promoter) 부위에 CpG island의 cytosine 메틸화에 의한 것이라고 한다(Fig. 4).²⁴⁻²⁷ 유전자의 기능 소실이 단백질의 발현과 관련된 유전자의 변이 없이 촉진자의 과메틸화에 의해 단백질의 기능이 소실되는 현상을 epigenetic pathway라고 하며, 이러한 경우를 “CpG island methylator phenotype (CIMP) 또는 hypermethylator phenotype”이라고 칭한다.^{28,29} 촉진자 부위의 메틸화는 5-aza-2'-dexocytidine과 같은 methyl transferase inhibitor에 의해 가역적으로 단백질이 재발현 된다고 하며 이를 치료에 이용하려는 시도가 많이 있다.³⁰

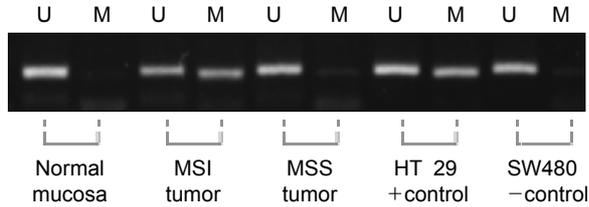


Fig. 4. Methylation of CpG islands in the MLH1 promoter was determined by a methylation-specific PCR assay using bisulfate DNA modification. This reaction replaces cytosine with uracil in unmethylated DNA. Methylated DNA sequences remain unaltered. The presence of a visible PCR product in those lanes marked M indicates the presence of methylated alleles. Normal colonic mucosa is unmethylated (U). DNA from HT 29 cells served as positive controls; from SW 480 cells, as negative controls.

촉진자의 메틸화에 의한 단백질 발현의 억제는 주로 hMLH1 gene에서 일어나며, hMSH2 gene에서는 매우 드문 것으로 알려지고 있다. Wheeler 등의 연구에 의하면, MSI tumor의 50%에서 hMLH1 유전자의 촉진자 과메틸화가 있는 데 반해 MSS tumor 경우에는 단지 6%에서만 부분적인 메틸화가 있으며, 이러한 경우는 단백질 발현의 소실은 없다고 한다.³¹

4) 유전자 불안정성의 임상적 적용

유전자 불안정성은 암발생의 첫번째 과정이며, 필수조건이다. 유전자 불안정성은 현재 대장암을 포함한 많은 종류의 암에서 진단, 예후 예측, 치료의 표적 또는 치료 예측인자로 이용하기 위한 많은 시도가 이루어지고 있다. 유전자 불안정성에 관여하는 기전들의 수많은 단백질들의 상호 과정으로 이루어져 있으며, 이러한 단백질 중 상당수는 암 치료의 표적으로도 이용될 수 있다. 유전자 불안정성의 임상 적용 예들을 진단, 예후 및 치료의 세 부분으로 나누어 기술하고자 한다.

(1) 진단: HNPCC는 전체 대장암의 13% 정도를 차지하는 것으로 알려지고 있으며, 동시성 및 이시성 대장암의 발생 빈도가 높으므로 정확한 진단에 의거한 수술적 치료 및 술 후 추적관찰이 필요하다. 그러나 상기한 바와 같이 용종증과 같은 임상에서 쉽게 찾을 수 있는 표현형이 없으므로 진단에 많은 어려움이 있다. 모든 대장암 환자에게 MMR gene의 배선돌연 변이 검사를 하는 것은 불가능하며, 유전자 검사의 결과가 환자들의 일상생활에 불리하게 작용할 가능성도 있으므로 유전자 검사는 매우 신중하게 진행을 하여야 한다. HNPCC 환자군의 선별을

Fig. 5. The expression of MLH1 (A and B) and MSH2 (C and D) was determined by immunohistochemistry using the Avidin-Biotin-Peroxidase method. Sections were incubated overnight at 4°C with anti-MLH1 (dilution 1 : 50, Clone G168-15, PharMingen, San Diego, CA) and MSH2 (dilution 1 : 50, Clone G168-15, PharMingen, San Diego, CA). Representative samples of tumors which expressed MLH1 (A) and MSH2 (D). In tumors did not express the MLH1 and MSH2, only the normal colonic mucosa was stained as shown and considered as internal positive controls. For the diagnosis of MSI, the expression of MLH1 and MSH2 in the tumor cells is important. In the absence of MLH1 and MSH2 expression, the diagnosis of MSI is difficult. In MSI assay, the expression of MLH1 and MSH2 in the tumor cells is important. In the absence of MLH1 and MSH2 expression, the diagnosis of MSI is difficult. In MSI assay, the expression of MLH1 and MSH2 in the tumor cells is important. In the absence of MLH1 and MSH2 expression, the diagnosis of MSI is difficult.

유전자 불안정성을 포함한 대장암에서 흔히 발견되는 분자생물학적 이상들은 대장암의 조기 검진에도 이용할

수 있는데, 최근 분변 DNA를 이용한 대장암의 선별검사가 가능하게 되었으며 현재 대규모 인구 집단을 대상으로 한 임상연구가 진행되고 있다.^{34,35} 대장암에서 흔히 발견되는 K-ras, p53, APC 유전자 및 MSI 표지자인 BAT 26를 이용한 최근의 연구 결과에 의하면, 대장암 선별의 감수성이 91%이며, 특이도는 93~100%로 보고하고 있어 향후 연구 결과가 주목된다.³⁴

(2) 예후 예측: HNPCC를 포함한 MSI tumor가 MSS tumor 보다 예후가 좋다는 것으로 알려지고 있다. 그러나 전통적인 예후인자들과 분자생물학적 예후인자 간의 상관성에는 아직까지 설명할 수 없는 부분들이 많이 있다. 세포의 분화도가 나쁜 대장암 즉 미분화암이나 점액성 대장암은 일반적으로는 예후가 나쁜 것으로 알려지고 있으나, MSI tumor들은 이러한 비분화암의 분포가 높으면서도 좋은 예후를 보이고 있다.

예후에 관한 초기 연구들은 MSI tumor의 병기가 대개 낮으며, 원격전이가 적다고 보고하고 있으나, 병기별로 비교한 결과에서도 분명히 생존율이 높은 것으로 나타나며,³⁶ 예후인자들의 다변량 분석 결과 MSI tumor의 상대 위험도가 0.67이라고 하는데 이는 진단 후 사망률이 MSS tumor에 비해 2/3 정도 수준이라는 것을 의미한다.³⁷

MSI tumor의 예후가 좋은 생물학적 원인 규명은 아직까지 불충분하지만, 크론병에서 보이는 양상과 유사한 중앙 주변 림프구의 침윤이 면역체계의 방어 기전의 한 가지일 것이라는 주장이 있으며,³⁸ Shibata 등은 이들 중앙이 덜 공격적이라고 하였다.³⁹

(3) 치료: MSI와 관련된 in vitro 연구들은 MSI tumor가 alkylating agent에 잘 반응하지 않으며 예후도 나쁜 것으로 보고하였으나, 최근의 대규모 임상 연구 결과들은 MSI tumor의 양호한 예후와 항암제 감수성과 관련이 있다고 한다.^{40-43,45}

여러 연구 결과에서 아직까지는 논란의 여지가 많지만 MSI 표현형을 보이는 암이 5-Fluorouracil (이하 5-FU) based chemotherapy에 반응성이 우수한 것으로 알려지고 있다.^{40,42,46}

Watanabe 등의 보고에 의하면 5-FU based chemotherapy를 받은 460명의 Dukes 병기 2기와 3기 환자의 생존율 비교 연구 결과, MSI군의 5년 생존율이 64%, MSS군의 5년 생존율이 49%로 통계학적으로 유의한 차이가 있었으며, 다변량 분석을 통하여 MSI와 TGF β 1의 돌연변이가 독립적인 예후인자라고 주장하였으며, 이러한 경우 5-FU based chemotherapy에 감수성이 높아져 향상된 예후

를 보일 것이라고 추정하였다.⁴⁷

또한 Hemminki 등은 95명의 5-FU based chemotherapy를 받은 Dukes 병기 C 환자를 대상으로 한 연구에서 MSI군의 3년 무병생존율이 90%로 MSS군의 43%에 비해 월등히 좋은 예후를 보였다고 보고하면서 MSI군의 환자들이 5-FU based chemotherapy에 우수한 반응을 보인 결과라고 하였다.⁴²

원격 전이가 있는 4기 대장암 환자들을 대상으로 한 고용량 항암요법을 실시한 nonrandomized prospective study에서 MSI군의 생존기간의 중앙치가 24개월로 MSS군의 13개월보다 통계학적으로 월등히 길었으며, 고용량 항암제의 반응을 역시 65.7%와 35.1%로 유의한 차이가 있었다고 한다. 다변량 분석 결과, 고용량 항암요법과 MSI 표현형이 환자들의 생존율에 관계하는 독립적인 예후인자였다고 보고하면서 MSI tumor의 예후가 좋은 원인은 암종의 생물학적 공격성이 낮다기 보다는 항암제 감수성이 우수한 결과라고 주장하였다.⁴⁶

그러나, 대장암 환자들만을 대상으로 한 가장 최근 연구에 의하면, MSI 표현형을 보이는 대장암 환자들이 오히려 5-FU 항암요법에서 생존율이 낮았다고 보고하는 등 MSI 표현형을 포함한 분자 생물학적 표지자들과 항암제 감수성 간에는 아직까지 논란이 많은 실정이다.⁴⁸ 대부분의 연구들이 후향적 연구이며 환자군의 선택에 편견이 개입될 가능성이 있으며, MSI 검사에 사용된 표지자들이 연구마다 상이하므로, MSI의 정의에도 차이를 보이는 경우도 있으므로 결과의 해석에는 주의를 기울여야 할 것이다.

결 론

대장암 발암과정에 있어 유전자 불안정성은 가장 기본적인 변화이다. 이러한 변화의 올바른 이해는 대장암 발암과정에 대한 폭 넓은 연구를 통해 새로운 원인 유전자의 규명을 가능케할 뿐 아니라 대장암의 조기 진단, 치료 및 예후 예측을 가능하게 할 것이며 머지않은 미래에 환자 개개인에게 특성화된 치료(tailored treatment)에도 이용될 전망이다.

REFERENCES

1. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. Cell 1996;87:159-70.

2. Boland CR, Ricciardiello L. How many mutations does it take to make a tumor? *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:14675-7.
3. Loeb LA. Microsatellite instability: marker of a mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* 1994;54:5059-63.
4. de la Chapelle A. Microsatellite instability. *N Engl J Med* 2003;349:209-10.
5. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:5248-57.
6. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991;34: 424-5.
7. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999;116:1453-6.
8. Park JG, Vasen HF, Park YJ, Park KJ, Peltomaki P, de Leon MP, et al. Suspected HNPCC and Amsterdam criteria II: evaluation of mutation detection rate, an international collaborative study. *Int J Colorectal Dis* 2002;17:109-14.
9. Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, et al. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1758-62.
10. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988;319:525-32.
11. Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R, Ruschoff J. Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res* 1997;57:4749-56.
12. Calistri D, Presciuttini S, Buonsanti G, Radice P, Gazzoli I, Pensotti V, et al. Microsatellite instability in colorectal-cancer patients with suspected genetic predisposition. *Int J Cancer* 2000;89:87-91.
13. Liu B, Farrington SM, Petersen GM, Hamilton SR, Parsons R, Papadopoulos N, et al. Genetic instability occurs in the majority of young patients with colorectal cancer. *Nat Med* 1995;1:348-52.
14. Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaides NC, Lynch HT, Watson P, et al. Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med* 1996;2:169-74.
15. Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, Canzian F, Hemminki A, Peltomaki P, et al. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 1998;338:1481-7.
16. Wu Y, Berends MJ, Mensink RG, Kempinga C, Sijmons RH, van Der Zee AG, et al. Association of hereditary nonpolyposis colorectal cancer-related tumors displaying low microsatellite instability with MSH6 germline mutations. *Am J Hum Genet* 1999;65:1291-8.
17. Parc YR, Halling KC, Wang L, Christensen ER, Cunningham JM, French AJ, et al. HSMH6 alterations in patients with microsatellite instability-low colorectal cancer. *Cancer Res* 2000;60:2225-31.
18. Plaschke J, Kruppa C, Tischler R, Bocker T, Pistorius S, Dralle H, et al. Sequence analysis of the mismatch repair gene hMSH6 in the germline of patients with familial and sporadic colorectal cancer. *Int J Cancer* 2000;85:606-13.
19. Fishel R. The selection for mismatch repair defects in hereditary nonpolyposis colorectal cancer: revising the mutator hypothesis. *Cancer Res* 2001;61:7369-74.
20. Iino H, Jass JR, Simms LA, Young J, Leggett B, Ajioka Y, et al. DNA microsatellite instability in hyperplastic polyps, serrated adenomas, and mixed polyps: a mild mutator pathway for colorectal cancer? *J Clin Pathol* 1999;52:5-9.
21. Jass JR, Biden KG, Cummings MC, Simms LA, Walsh M, Schoch E, et al. Characterisation of a subtype of colorectal cancer combining features of the suppressor and mild mutator pathways. *J Clin Pathol* 1999;52:455-60.
22. Jass JR. Hyperplastic polyps of the colorectum-innocent or guilty? *Dis Colon Rectum* 2001;44:163-6.
23. Jass JR, Walsh MD, Barker M, Simms LA, Young J, Leggett BA. Distinction between familial and sporadic forms of colorectal cancer showing DNA microsatellite instability. *Eur J Cancer* 2002;38:858-66.
24. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:6870-5.
25. Ahuja N, Mohan AL, Li Q, Stolker JM, Herman JG, Hamilton SR, et al. Association between CpG island methylation and microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1997;57:3370-4.
26. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:2545-50.
27. Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, 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.

28. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8681-6.
29. Kuismanen SA, Holmberg MT, Salovaara R, Schweizer P, Aaltonen LA, de La Chapelle A, et al. Epigenetic phenotypes distinguish microsatellite-stable and -unstable colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:12661-6.
30. Deng G, Chen A, Hong J, Chae HS, Kim YS. Methylation of CpG in a small region of the hMLH1 promoter invariably correlates with the absence of gene expression. *Cancer Res* 1999;59:2029-33.
31. Wheeler JM, Beck NE, Kim HC, Tomlinson IP, Mortensen NJ, Bodmer WF. Mechanisms of inactivation of mismatch repair genes in human colorectal cancer cell lines: the predominant role of hMLH1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:10296-301.
32. Cawkwell L, Gray S, Murgatroyd H, Sutherland F, Haine L, Longfellow M, et al. Choice of management strategy for colorectal cancer based on a diagnostic immunohistochemical test for defective mismatch repair. *Gut* 1999;45:409-15.
33. Terdiman JP, Gum JR, Jr., Conrad PG, Miller GA, Weinberg V, Crawley SC, et al. Efficient detection of hereditary non-polyposis colorectal cancer gene carriers by screening for tumor microsatellite instability before germline genetic testing. *Gastroenterology* 2001;120:21-30.
34. Ahlquist DA, Skoletsky JE, Boynton KA, Harrington JJ, Mahoney DW, Pierceall WE, et al. Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: feasibility of a multitarget assay panel. *Gastroenterology* 2000;119:1219-27.
35. Dong SM, Traverso G, Johnson C, Geng L, Favis R, Boynton K, et al. Detecting colorectal cancer in stool with the use of multiple genetic targets. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:858-65.
36. Liang JT, Huang KC, Cheng AL, Jeng YM, Wu MS, Wang SM. Clinicopathological and molecular biological features of colorectal cancer in patients less than 40 years of age. *Br J Surg* 2003;90:205-14.
37. Levin B. Why hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma patients appear to have better survival than patients with sporadic colorectal carcinoma. *Cancer* 1998;83:201-3.
38. Graham DM, Appelman HD. Crohn's-like lymphoid reaction and colorectal carcinoma: a potential histologic prognosticator. *Mod Pathol* 1990;3:332-5.
39. Shibata D, Peinado MA, Ionov Y, Malkhosyan S, Perucho M. Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation. *Nat Genet* 1994;6:273-81.
40. Elsaleh H, Powell B, Soontrapornchai P, Joseph D, Gorla F, Spry N, et al. p53 gene mutation, microsatellite instability and adjuvant chemotherapy: impact on survival of 388 patients with Dukes' C colon carcinoma. *Oncology* 2000;58:52-9.
41. Elsaleh H, Powell B, McCaul K, Grieco F, Grant R, Joseph D, et al. P53 alteration and microsatellite instability have predictive value for survival benefit from chemotherapy in stage III colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:1343-9.
42. Hemminki A, Mecklin JP, Jarvinen H, Aaltonen LA, Joensuu H. Microsatellite instability is a favorable prognostic indicator in patients with colorectal cancer receiving chemotherapy. *Gastroenterology* 2000;119:921-8.
43. Aebi S, Kurdi-Haidar B, Gordon R, Cenni B, Zheng H, Fink D, et al. Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. *Cancer Res* 1996;56:3087-90.
44. Fink D, Nebel S, Aebi S, Zheng H, Cenni B, Nehme A, et al. The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Res* 1996;56:4881-6.
45. Fink D, Aebi S, Howell SB. The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clin Cancer Res* 1998;4:1-6.
46. Liang JT, Huang KC, Lai HS, Lee PH, Cheng YM, Hsu HC, et al. High-frequency microsatellite instability predicts better chemosensitivity to high-dose 5-fluorouracil plus leucovorin chemotherapy for stage IV sporadic colorectal cancer after palliative bowel resection. *Inter J Cancer* 2002;101:519-25.
47. Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, Ueki T, Satriano R, Haller DG, et al. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *New England J of Med* 2001;344:1196-206.
48. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ,

Goldberg RM, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003;349:247-57.