

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Ksenija V. Jakovljević

**ANALIZA UČESTALOSTI I TIPOVA  
MUTACIJA *KRAS* I *BRAF* GENA U  
KARCINOMIMA KOLOREKTUMA U  
POPULACIJI SRBIJE**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Ksenija V. Jakovljević

**FREQUENCY AND MUTATION TYPE  
ANALYSIS OF *KRAS* AND *BRAF* GENES  
IN COLORECTAL CARCINOMAS IN  
SERBIAN POPULATION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

Mentori:

dr Marina Stamenković-Radak, vanredni profesor,  
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

dr Radmila Janković, naučni saradnik,  
Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

Član komisije:

dr Emina Mališić, naučni saradnik,  
Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

Datum odbrane:

Doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za molekularnu genetiku Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije (IORS).

Zahvaljujem se dr Radmili Janković, NS, šefu Laboratorije za molekularnu genetiku na konstantnom trudu i pomoći kako pri uspostavljanju korišćene naučne metodologije, tako i pri poteškoćama u njenoj realizaciji u kliničkoj praksi. Takođe, zahvaljujem se i na stručnoj pomoći pri izradi i pisanju ovog rada.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj kolegici dr Emini Mališić, NS, na pomoći koju mi je pružila u prvim koracima mog eksperimentalnog i naučnog rada. Zahvaljujem joj se i na neizmernom strpljenju i podršci, korisnim savetima i sugestijama i uvek temeljnim, kritičkim analizama kako u svakodnevnom radu, tako i tokom izrade i pisanja doktorske disertacije.

Svom mentoru, dr Marini Stamenković-Radak, van. prof Biološkog fakulteta, zahvaljujem se na korisnim sugestijama vezanim za doktorsku tezu i ličnom angažovanju i ekspeditivnosti.

Dr Siniši Raduloviću, N Sav, rukovodiocu projekta u okviru koga je urađen ovaj rad, zahvaljujem se na pomoći pri tumačenju i analizi rezultata teze sa kliničkog aspekta.

Svojim dragim kolegicama iz Laboratorije za molekularnu genetiku Emini Mališić, Jeleni Dobričić, Mileni Čavić i Ani Krivokući, kao i bliskim kolegama iz ostalih laboratorija, iskreno se zahvaljujem na izuzetnoj kolegijalnosti i spremnosti za saradnju, divnoj atmosferi i višegodišnjem iskazanom prijateljstvu. Takođe, zahvaljujem se i svim bivšim i sadašnjim laboratorijskim tehničarima naše laboratorije na velikoj pomoći u eksperimentalnom radu tokom izrade teze. Dušici Gavrilović, dipl. matematičaru-biostatističaru se zahvaljujem na pomoći oko statističke obrade rezultata i dr Vladimiru Nikoliću na pomoći oko prikupljanja podataka o bolesnicima.

I iznad svega, od srca se zahvaljujem svojoj porodici, najbližim prijateljima i budućem suprugu Cristian-u na razumevanju, strpljenju i pruženoj podršci.

# ANALIZA UČESTALOSTI I TIPOVA MUTACIJA *KRAS* I *BRAF* GENA U KARCINOMIMA KOLOREKTUMA U POPULACIJI SRBIJE

## Rezime

**Uvod:** Kolorektalni kancer (CRC) se po svojoj učestalosti i smrtnosti nalazi u samom vrhu svih kancera kod oba pola, kako u svetu, tako i u Srbiji. Za ranu kancerogenezu ovog maligniteta karakteristične su somatske genske promene *KRAS* i *BRAF* protoonkogeni. Mutacije ovih gena predstavljaju molekularne biomarkere odgovora na ciljanu terapiju, dok su rezultati o njihovoj ulozi kao prognostičkih i prediktivnih faktora kontradiktorni. Podaci o učestalosti i tipu pojedinačnih *KRAS* i *BRAF* mutacija kod CRC-a u našoj zemlji su malobrojni, a njihova veza sa kliničko-histopatološkim karakteristikama tumora, karakteristikama bolesnika i tokom bolesti nije dovoljno ispitana.

**Cilj:** Utvrđivanje prisustva, učestalosti i tipa *KRAS* mutacija i specifične *BRAF* p.V600E mutacije kod bolesnika sa CRC-om u populaciji Srbije i povezanost prisustva i tipa ovih mutacija sa kliničko-histopatološkim karakteristikama tumora i karakteristikama bolesnika. Takođe, ispitivanje navedenih mutacija kao prediktivnih biomarkera adjuvantne i EGFR-ciljane terapije.

**Materijal i metode:** U radu je analizirano 188 parafinskih uzoraka karcinoma kolorektuma. DNK je izolovana komercijalnim kitom za izolaciju genomske DNK iz parafinskih tkiva (QIAamp® DNA FFPE Tissue kit, QIAGEN). Detekcija prisustva i tipa mutacija kodona 12 i 13 *KRAS* gena urađena je pomoću dva dijagnostički validirana testa bazirana na esaju lančane reakcije polimeraze (PCR) u realnom vremenu (DxS TheraScreen K-RAS PCR kit, QIAGEN) i PCR reakciji praćenoj reverznom hibridizacijom (*KRAS* StripAssay<sup>TM</sup>, ViennaLab Diagnostics). Detekcija p.V600E mutacije u *BRAF* genu urađena je analizom krive topljenja (HRM) PCR produkta i metodom direktnog sekvenciranja. Za statističku obradu podataka korišćeni su Fišerov egzakti,  $\chi^2$  i Log-Rank testovi.

**Rezultati:** Tačkaste mutacije u kodonima 12 i 13 *KRAS* gena su bile prisutne u 35,1% analiziranih pacijenata sa CRC-om. Distribucija detektovanih mutacija je bila sledeća: p.G12D 42,4%, p.G12V 21,2%, p.G12A 10,6%, p.G12C 7,6%, p.G12S 6,1%, p.G12R 1,5% i p.G13D 10,6 %. U grupi pacijenata sa *wild-type* (wt) *KRAS* statusom gena analiziranih na prisustvo p.V600E *BRAF* mutacije (n=101), samo jedan pacijent je bio heterozigot za datu mutaciju, dok su ostali bili wt.

Od testiranih kliničko-histopatoloških osobina tumora i osobina bolesnika, *KRAS* mutacije su se statistički značajno češće javljale kod muškaraca nego kod žena, kao i kod pacijenata sa lošijim performans statusom u odnosu na one sa boljim. Analizirajući povezanost pojedinih *KRAS* mutacija sa ispitivanim parametrima, zapazili smo statistički višu zastupljenost p.G12V mutacije kod tumora koji ne prodiru u dublje slojeve zida kolona i rektuma, u odnosu na tumore koji ih zahvataju ili probijaju serozu. Iako nije pokazana statistička značajnost, učestalost *KRAS* mutacija raste sa porastom veličine tumora, prisustvom i brojem metastaza, i oko dva puta je veća kod bolesnika sa raširenom u odnosu na lokalizovanu bolest. Povezanost *BRAF* mutacije p.V600E sa pomenutim parametrima nismo mogli da ispitamo jer je samo jedan bolesnik bio nosilac ove mutacije.

U podgrupi od 49 bolesnika koji nisu imali inicijalne metastaze i koji su primili adjuvantnu terapiju, nije postojala statistički značajna razlika u vremenu do pojave metastaza u odnosu na *KRAS* mutacioni status. Ipak, može se zapaziti trend boljeg preživljavanja bez metastaza kod pacijenata sa mutacijama *KRAS*-a (medijana 19,5 meseci) u odnosu na wt *KRAS* grupu (medijana 13,2 meseci).

U grupi pacijenata sa wt *KRAS* genom koji su primali kombinovanu EGFR-ciljanu terapiju (n=72), 15,3% je postiglo terapijski odgovor.

**Zaključak:** Na osnovu dobijenih rezultata značajna povezanost mutacionog statusa *KRAS* gena sa kliničko-histopatološkim karakteristikama CRC-a i karakteristikama obolelih nije utvrđena. Zastupljenost i distribucija mutacija u ovom genu su u skladu sa rezultatima drugih studija u svetu. Prediktivni značaj *KRAS* gena u odgovoru na adjuvantnu terapiju nije pokazan, ali je zapažen trend boljeg preživljavanja bez metastaza kod nosilaca *KRAS* mutacija. Zbog malog procenta *BRAF* p.V600E mutacije u našoj grupi nismo mogli da proverimo njen značaj kao biomarkera ispitivanog maligniteta. Određivanje i drugih, dodatnih genskih alteracija bi bilo od velike koristi za

preciznije definisanje genskog profila kolorektalnog tumora i individualizaciju terapijskog pristupa.

***Ključne reči:*** kolorektalni karcinom, *KRAS* gen, *BRAF* gen, mutacije

***Naučna oblast:*** Molekularna biologija

***Uža naučna oblast:*** Molekularna genetika

***UDK broj:*** 575.224.2: 616-006.6 (043.3)

# **FREQUENCY AND MUTATION TYPE ANALYSIS OF *KRAS* AND *BRAF* GENES IN COLORECTAL CARCINOMAS IN SERBIAN POPULATION**

## **Abstract**

**Introduction:** Colorectal cancer (CRC) incidence and mortality rates are among the highest in both sexes worldwide, as well as in Serbia. The early carcinogenesis of this malignancy is characterized by somatic gene alterations of *KRAS* and *BRAF* protooncogenes. Mutations of these genes represent molecular biomarkers of response to targeted therapy, while their roles as prognostic and predictive factors are still contradictory. There are few data about the frequency and types of single *KRAS* and *BRAF* mutations in CRC in our country, and their correlation with clinicohistopathological characteristics of tumor, characteristics of patients and the course of disease is still to be established.

**Aim:** Determination of presence, frequency and types of *KRAS* mutations and specific *BRAF* p.V600E mutation in CRC patients in Serbian population and correlation of presence and types of these mutations with tumor clinicohistopathological characteristics and patient characteristics. Also, the examination of specified mutations as potential predictive biomarkers of adjuvant and EGFR-targeted therapy.

**Material and methods:** In this study 188 CRC paraffin samples were analyzed. DNA was extracted using the commercial kit for genomic DNA isolation from paraffin tissues (QIAamp® DNA FFPE Tissue kit, QIAGEN). Detection of presence and types of *KRAS* codon 12 and 13 mutations was performed with two validated diagnostic tests based on real-time polymerase chain reaction (PCR) assay (DxS TheraScreen K-RAS PCR kit, QIAGEN) and PCR reaction followed by reverse hybridization (KRAS StripAssay™, ViennaLab Diagnostics). *BRAF* p.V600E mutation was assessed by high resolution melting (HRM) analysis of PCR products and automatic DNA sequencing. Fisher exact,  $\chi^2$  and Log-Rank tests were used for statistical analysis.

**Results:** *KRAS* point mutations in codons 12 and 13 were present in 35.1% of analyzed CRC patients. The frequency distribution of detected mutations was as follows: p.G12D



42.4%, p.G12V 21.2%, p.G12A 10.6%, p.G12C 7.6%, p.G12S 6.1%, p.G12R 1.5% and p.G13D 10.6%. In the group of samples with wild-type (wt) *KRAS* gene status analyzed for the presence of the *BRAF* p.V600E mutation (n=101), only one patient was heterozygote for the specified mutation, while all the rest were wt.

Among tested clinicohistopathological characteristics of tumor and characteristics of patients, *KRAS* mutations were significantly more common in males than in females, as well as in patients with worse performance status than in those with better one. Analyzing the association of single *KRAS* mutations with the investigated parameters, we noticed that the frequency of p.G12V mutation was significantly higher in tumors which do not infiltrate deeper the wall of colon and rectum, in comparison with those that penetrate in deeper layers or go through serosa. Although the statistical significance was not shown, the percentage of the *KRAS* mutations increases with the growth of tumor size, the presence and number of metastases, and it is two times higher in patients with the widespread disease in comparison with the localized one. The correlation of the *BRAF* p.V600E mutation with the mentioned parameters was not performed because only one patient carried this mutation.

In the subgroup of 49 patients with no initial metastases, who received adjuvant therapy, there was no statistically significant difference in time to metastases appearance in regard to the *KRAS* mutational status. However, the tendency of better survival without metastases in patients with the *KRAS* mutations (median 19.5 months) in comparison with those without them (median 13.2 months) was noticeable.

In the wt *KRAS* gene group of patients who were treated with combined EGFR-targeted therapy (n=72), 15.3% achieved the therapeutic response.

**Conclusion:** According to the obtained results, no significant connection between the mutational status of the *KRAS* gene and clinicohistopathological characteristics of CRC and characteristics of patients was determined. *KRAS* mutation frequency and distribution are in accordance with the results of other studies in the world. *KRAS* gene predictive significance for the response to adjuvant therapy has not been shown, although the trend of better survival without metastasis was observed in patients with the *KRAS* mutations. Owing to the small percentage of the *BRAF* p.V600E mutation in our group, we could not test its importance as a biomarker of the examined malignancy.

Determination of other, additional gene alterations would be of great importance for more precisely defining of CRC gene profile and for individual therapeutic approach.

**Keywords:** colorectal carcinoma, *KRAS* gene, *BRAF* gene, mutations

**Academic expertise:** Molecular biology

**Field of academic expertise:** Molecular genetics

**UDK number:** 575.224.2: 616-006.6 (043.3)

# **SADRŽAJ**

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 KOLOREKTALNI KANCER	1
1.1.1 Klasifikacija kolorektalnog kancera	1
1.1.2 Epidemiologija kolorektalnog kancera	5
1.1.3 Faktori rizika za nastanak kolorektalnog kancera	5
1.1.4 Faktori prognoze	7
1.1.5 Molekularna osnova kolorektalnog kancera	9
1.1.5.1 Molekularni putevi kolorektalne karcinogeneze	10
1.2. KONCEPT PERSONALIZOVANE MEDICINE U TERAPIJI KOLOREKTALNOG KANCERA	13
1.2.1 Farmakogenetika i personalizovana medicina	14
1.2.2 Molekularna ciljana terapija kolorektalnog kancera	15
1.3. KRAS PROTOONKOGEN: STRUKTURA, FUNKCIJA I MUTACIJE	16
1.3.1 KRAS protein: struktura, funkcija i regulacija aktivnosti	17
1.3.2 Mutacije <i>KRAS</i> gena u onkogenezi CRC-a	19
1.3.2.1 <i>KRAS</i> mutacioni status kao prognostički i prediktivni marker	20
1.4. BRAF PROTOONKOGEN: STRUKTURA, FUNKCIJA I MUTACIJE	22
1.4.1 BRAF protein: struktura, funkcija i regulacija aktivnosti	22
1.4.2 Mutacije <i>BRAF</i> gena u onkogenezi CRC-a	24
1.4.2.1 <i>BRAF</i> mutacioni status kao prognostički i prediktivni marker	26
<b>2. CILJ RADA</b>	<b>28</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b>	<b>29</b>
3.1 UZORCI	29
3.2 IZOLOVANJE DNK IZ KALUPA QIAamp® DNA FFPE TISSUE KIT-om	30
3.3 SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE	

	KONCENTRACIJE DNK	32
3.4	LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> - PCR)	33
3.5	ELEKTROFOREZA NA AGAROZNOM GELU	35
3.6	LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE U REALNOM VREMENU ( <i>real-time</i> PCR)	36
	3.6.1 Princip metode <i>real-time</i> PCR-a	37
	3.6.2 Detekcija mutacija u <i>KRAS</i> genu therascreen <i>KRAS</i> PCR KIT-om	38
3.7	DETEKCIJA MUTACIJA U <i>KRAS</i> GENU <i>KRAS</i> STRIPASSAY™-om	42
	3.7.1 <i>In Vitro</i> amplifikacija (PCR)	42
	3.7.2 Reverzna hibridizacija	43
3.8	ANALIZA KRIVE TOPLJENJA ( <i>High Resolution Melting</i> - HRM)	45
	3.8.1. Analiza <i>BRAF</i> p.V600E mutacije HRM-om	46
3.9	AUTOMATSKO SEKVENCIRANJE DNK	48
	3.9.1 Priprema uzoraka za automatsko sekvenciranje DNK	49
	3.9.2 Sekvenciranje DNK	51
	3.9.3 Analiza sekvenci	51
3.10	STATISTIČKA ANALIZA	52
<b>4.</b>	<b>REZULTATI</b>	53
4.1	MUTACIJE U <i>KRAS</i> GENU	53
	4.1.1 Učestalost i tip mutacija u <i>KRAS</i> genu	55
4.2	POVEZANOST MUTACIJA U <i>KRAS</i> GENU SA KLINIČKO-HISTOPATOLOŠKIM KARAKTERISTIKAMA KARCINOMA KOLOREKTUMA	57
4.3	POVEZANOST MUTACIJA U <i>KRAS</i> GENU SA KARAKTERISTIKAMA BOLESNIKA SA KOLOREKTALNIM KARCINOMOM	60
4.4	POVEZANOST p.G12V MUTACIJE <i>KRAS</i> GENA SA KLINIČKO-HISTOPATOLOŠKIM KARAKTERISTIKAMA KARCINOMA KOLOREKTUMA I KARAKTERISTIKAMA BOLESNIKA	62

4.5	POVEZANOST p.G12D MUTACIJE <i>KRAS</i> GENA SA KLINIČKO-HISTOPATOLOŠKIM KARAKTERISTIKAMA KARCINOMA KOLOREKTUMA I KARAKTERISTIKAMA BOLESNIKA	64
4.6	POVEZANOST MUTACIJA KODONA 12 I 13 <i>KRAS</i> GENA SA KLINIČKO-HISTOPATOLOŠKIM KARAKTERISTIKAMA KARCINOMA KOLOREKTUMA I KARAKTERISTIKAMA BOLESNIKA	67
4.7	UČESTALOST p.V600E MUTACIJE U <i>BRAF</i> GENU	69
4.8	POVEZANOST MUTACIJA U <i>KRAS</i> I <i>BRAF</i> GENIMA SA TOKOM MALIGNNE BOLESTI	71
<b>5.</b>	<b>DISKUSIJA</b>	76
5.1	UČESTALOST MUTACIJA U <i>KRAS</i> GENU U KARCINOMIMA KOLOREKTUMA	81
5.2	TIP MUTACIJA U <i>KRAS</i> GENU U KARCINOMIMA KOLOREKTUMA	83
5.3	UČESTALOST I TIP MUTACIJA U <i>BRAF</i> GENU U KARCINOMIMA KOLOREKTUMA	85
5.4	PROMENE <i>KRAS</i> I <i>BRAF</i> GENA U NASTANKU MALIGNOG FENOTIPA I PROGNOZI CRC-a	90
	5.4.1 Povezanost mutacija <i>KRAS</i> gena sa kliničko-histopatološkim karakteristikama karcinoma kolorektuma i karakteristikama bolesnika	94
5.5	<i>KRAS</i> I <i>BRAF</i> KAO PREDIKTIVNI MARKERI	100
	5.5.1 <i>KRAS</i> i <i>BRAF</i> mutacije u odgovoru na adjuvantnu terapiju	100
	5.5.2 <i>KRAS</i> I <i>BRAF</i> mutacije u odgovoru na EGFR-ciljanu terapiju	103
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČAK</b>	111
	<b>LITERATURA</b>	113
	<b>BIOGRAFIJA AUTORA</b>	139

## 1. UVOD

Među malignitetima gastrointestinalnog (GI) sistema kolorektalni karcinom (karcinom kolona i/ili rektuma) predstavlja ozbiljan svetski zdravstveni problem. Po svojoj učestalosti i smrtnosti nalazi se u samom vrhu svih kancera kako kod muškaraca, tako i kod žena.

Ranu kancerogenezu kolorektuma karakterišu somatske genske promene *KRAS* i *BRAF* protoonkogeni (Velho et al., 2008). Mutacije u ovim genima takođe predstavljaju molekularne biomarkere, prediktore odgovora na ciljanu terapiju. Podaci o učestalosti i tipu pojedinačnih *KRAS* i *BRAF* mutacija kod kolorektalnog karcinoma u Srbiji su malobrojni, a njihova veza sa kliničko-histopatološkim karakteristikama tumora i karakteristikama pacijenata nije dovoljno ispitana.

### 1.1 KOLOREKTALNI KANCER

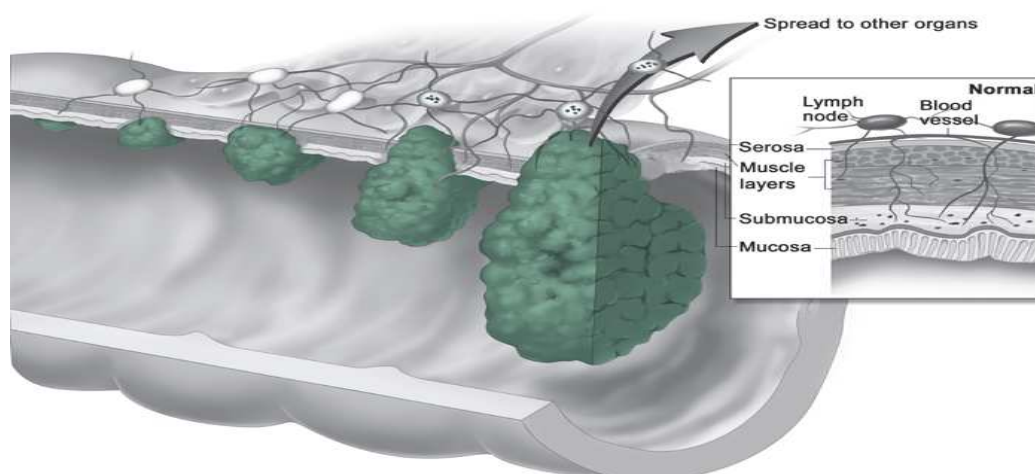
#### 1.1.1 KLASIFIKACIJA KOLOREKTALNOG KANCERA

Malignom transformacijom epitelnih ćelija kolona i/ili rektuma dolazi do nastanka kolorektalnog kancera (eng. *colorectal cancer* – CRC). Ovaj tip kancera se može odnositi samo na kancer kolona ili na kancer rektuma, u zavisnosti u kom od ovih tkiva nastane (kolon i rektum zajedno čine debelo crevo). S obzirom da ova dva tipa kancera imaju mnogo zajedničkih karakteristika, u ovom radu će generalno biti opisivani kao jedan entitet.

Kod većine ljudi CRC se razvija sporo tokom perioda od 5 do 15 godina (Kozuka et al., 1975). Najpre nastaju benigni, nekancerski polipi, od kojih neki mogu preći kasnije u maligne tumore. Verovatnoća prelaska polipa u kancer zavisi od njegovog tipa: (1) *adenomatozni (adenom)* - polip koji prelazi u kancer, često se zove i „prekancersko stanje“ i (2) *hiperplastični i inflamatorni* – polip koji generalno ne prethodi kanceru. Još jedan tip „prekancerskog stanja“ je i *displazija*, deo zida kolona ili rektuma u kojem gledano pod mikroskopom ćelije izgledaju abnormalno (ali nemaju

izgled pravih kancerskih ćelija). Displazija se češće javlja kod ljudi koji su imali ulcerozni kolitis ili Kronovu bolest (Colorectal Cancer Overview Giude, 2011).

Nakon stupnja polipa, kancerske ćelije počinju da se šire u slojeve zida kolona i/ili rektuma i formiraju maligni tumor (Slika 1). Daljim širenjem preko krvnih i limfnih sudova do udaljenih organa formiraju se metastaze. Postoji nekoliko tipova kancera koji mogu da nastanu i to: (1) *adenokarcinomi* – više od 95% CRC-a su ovog tipa; formiraju se neoplastičnom transformacijom žlezdanih ćelija koje luče mukus u lumen debelog creva (Stewart et al., 2006), (2) *karcinoidni tumori* – nastaju od specijalizovanih ćelija creva koje luče hormone, (3) *gastrointestinalni stromalni tumori (GIST)* – nastaju u *Cajal*-ovim ćelijama kolona i mogu se naći bilo gde u digestivnom traktu, (4) *limfomi* – kanceri ćelija imunog sistema koji atipično mogu da nastanu i u debelom crevu, kao i u drugim organima, (5) *sarkomi* – retki tumori koji nastaju u krvnim sudovima, mišićnom i vezivnom tkivu debelog creva (Colorectal Cancer Overview Giude, 2011).



Slika 1. Nastanak kolorektalnog kancera i metastaziranje (preuzeto iz Colorectal Cancer Facts & Figures 2011-2013, 2011).

Prilikom dijagnostike CRC-a vrši se podela na histološke tipove, graduse tumora i TNM stadijume (mogu se još uvek naći i starije *Dukes* i *Astler-Coller* klasifikacije).

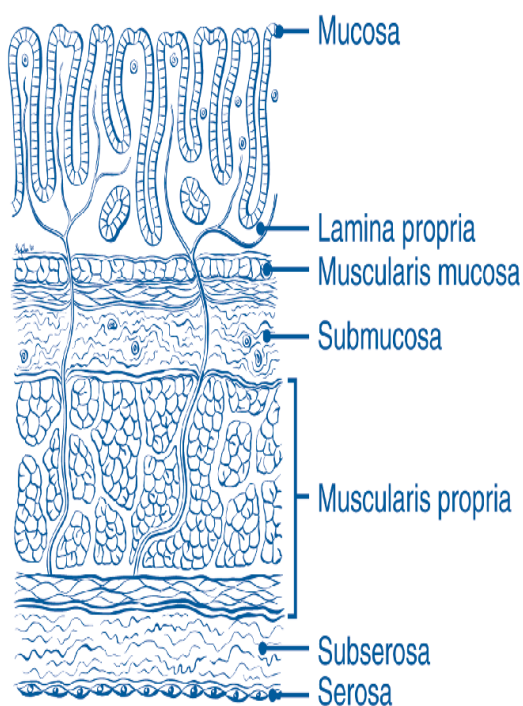
Gradusi označavaju stepen dediferenciranosti tumora, tj. pokazuju koliko je tumor sličan normalnom tkivu kolorektuma gledano pod mikroskopom. Skala koja se koristi ide od G1 (dobro diferentovan, kancer liči na normalno tkivo) do G4 (slabo

diferentovan, kancer ima abnormalan izgled). Često se gradusi pojednostavljaju u dve grupe: nizak gradus – „*low-grade*” (G1 ili G2) i visok gradus – „*high-grade*” (G3 ili G4).

Određivanje stadijuma (eng. *staging*) tumora se bazira na tome koliko duboko je tumor urastao u zid creva, da li je zahvatio okolne strukture i da li se proširio na okolne limfne čvorove i udaljene organe. Postoje dva tipa određivanja stadijuma: (1) klinički – kada lekar na osnovu pregleda, biopsije ili pomoću neke od *imaging* tehnika daje opis raširenosti bolesti, i (2) patološki - kada se nakon urađene hirurgije postavlja dijagnoza (precizniji).

AJCC/TNM (eng. *American Joint Committee on Cancer* - AJCC) klasifikacija se odnosi na oba tipa određivanja stadijuma i koristi se za klasifikaciju CRC-a.

- **T** – opisuje koliko daleko se primarni tumor raširio u zid creva ili okolne delove (Slika 2)
- **N** – opisuje stepen raširenosti u okolne (regionalne) limfne čvorove
- **M** – ukazuje da li se tumor raširio (metastazirao) na druge organe po telu



### **T kategorizacija**

**T<sub>x</sub>**: Primarni tumor ne može biti određen.

**T<sub>0</sub>**: Nema prisustva primarnog tumora.

**T<sub>is</sub>**: Karcinom *in situ*. Intraepitelni ili invazija sloja lamina propria.

**T<sub>1</sub>**: Tumor se širi u submukozu.

**T<sub>2</sub>**: Tumor se širi u sloj muscularis propria.

**T<sub>3</sub>**: Tumor se širi kroz sloj muscularis propria u perikolorektalno tkivo.

**T<sub>4a</sub>**: Tumor probija serozu (visceralni peritoneum).

**T<sub>4b</sub>**: Tumor direktno vrši invaziju ili je adheriran na druge organe ili strukture.

Slika 2. Šematski prikaz poprečnog preseka zida debelog creva (preuzeto iz AJCC Cancer Staging Manual, 2010).



## N kategorizacija

**Nx:** Regionalni limfni čvorovi ne mogu biti određeni.

**N0:** Nema tumora u regionalnim limfnim čvorovima.

**N1:** Metastaze u 1-3 regionalna limfna čvora.

- **N1a:** Tumorske ćelije nađene u 1-om regionalnom limfnom čvoru.
- **N1b:** Tumorske ćelije nađene u 2-3 regionalna limfna čvora.
- **N1c:** Tumorski depoziti u subserozi, mezenteri, ili u neperitonealnom perikolon ili perirektalnom tkivu bez metastaza u regionalnim čvorovima.

**N2:** Tumorske ćelije nađene u  $\geq 4$  regionalna limfna čvora.

- **N2a:** Tumorske ćelije nađene u 4-6 regionalnih limfnih čvorova.
- **N2b:** Tumorske ćelije nađene u  $\geq 7$  regionalnih limfnih čvorova.

## M kategorizacija

**M0:** Nema udaljenih metastaza.

**M1:** Postoje udaljene metastaze.

- **M1a:** Metastaze ograničene na 1 organ ili mesto (npr. jetra, pluća, neregionalni čvor).
- **M1b:** Metastaze u  $>1$  organu/mestu ili u peritoneumu.

Stage	T	N	M	Dukes*
0	Tis	N0	M0	–
I	T1	N0	M0	A
	T2	N0	M0	A
IIA	T3	N0	M0	B
IIB	T4a	N0	M0	B
IIC	T4b	N0	M0	B
IIIA	T1–T2	N1/N1c	M0	C
	T1	N2a	M0	C
IIIB	T3–T4a	N1/N1c	M0	C
	T2–T3	N2a	M0	C
	T1–T2	N2b	M0	C
IIIC	T4a	N2a	M0	C
	T3–T4a	N2b	M0	C
	T4b	N1–N2	M0	C
IVA	Any T	Any N	M1a	–
IVB	Any T	Any N	M1b	–

Nakon što se T, N i M kategorija utvrde (obično nakon hirurgije), te informacije se kombinuju pri određivanju stadijuma tumora. Stadijumi se označavaju Rimskim brojevima od I (najmanje uznapredovali) do IV (najviše uznapredovali). Na Slici 3 prikazana je TNM klasifikacija uporedo sa starijom *Dukes* klasifikacijom.

Slika 3. Prikaz stadijuma kolorektalnog kancera (modifikovano prema AJCC Cancer Staging Manual, 2010).

### **1.1.2 EPIDEMIOLOGIJA KOLOREKTALNOG KANCERA**

Godišnje u svetu od kolorektalnog karcinoma oboli oko 1,2 miliona, a umire oko 600 hiljada ljudi, što ga po učestalosti čini četvrtim uzrokom smrti usled kancera. Po učestalosti, CRC se nalazi na trećem mestu u svetu u muškaraca i na drugom u žena. Skoro 60% svih slučajeva obolelih se javlja u razvijenim zemljama. Najveća incidenca je procenjena u Australiji sa Novim Zelandom i zapadnoj Evropi, a najniža u Africi (izuzev južne Afrike) i južnoj i centralnoj Aziji (pregled u Boyle and Langman, 2000; GLOBOCAN, 2008; Jemal et al., 2011). Što se tiče stope mortaliteta, ona je niža u žena nego u muškaraca, osim za područje Kariba. Najveće standardizovane stope mortaliteta za oba pola procenjene su u centralnoj i istočnoj Evropi (20,1/100 000 za muškarce, 12,2/100 000 za žene), a najniže u centralnoj Africi (3,5 i 2,7 respektivno) (GLOBOCAN, 2008).

CRC predstavlja drugi najčešći uzrok smrti usled kancera u Srbiji, odmah posle raka pluća kod muškaraca i raka dojke kod žena (Nacionalni program za prevenciju kolorektalnog karcinoma). Poslednjih godina došlo je do značajnog porasta njegove incidence i sada ona iznosi 19,9/100 000 muškaraca i 11,2/100 000 žena (ASR-W), dok stopa mortaliteta iznosi 9,4/100 000 i 5,9/100 000 respektivno (ASR-W) (Registar za rak u centralnoj Srbiji, 2011). Na osnovu podataka Republičkog zavoda za statistiku u periodu od 1997-2010. godine, zapažen je porast mortaliteta usled malignih tumora kolona i rektuma za 16,0% (Republički zavod za statistiku, 2010).

### **1.1.3 FAKTORI RIZIKA ZA NASTANAK KOLOREKTALNOG KANCERA**

Epidemiološke studije su utvrdile više faktora koji doprinose nastanku CRC-a:

#### *1. Starost*

Godine predstavljaju najveći faktor rizika za obolevanje od CRC-a. Vrlo su retki slučajevi obolevanja od ovog tipa kancera kod osoba mlađih od 40 godina. Međutim, u periodu između 40-e i 50-e godine incidenca obolevanja se značajno povećava, dok se

nakon ovog perioda rizik eksponencijalno uvećava za svaku sledeću dekadu života. Čak 90% CRC-a otkrije se u osoba starijih od 50 godina (Cancer.Net Guide Colorectal Cancer; Nacionalni program za prevenciju kolorektalnog karcinoma; Kolligs et al., 2011).

## 2. Uticao sredine i stil života

Smatra se da faktori sredine (pod kojima se mogu podrazumevati i kulturološki kao i sociološki faktori) mogu imati snažan uticaj na nastanak CRC-a. Prema nekim podacima iz literature čak 70-80% svih CRC-a uzrokovano je nekim od sredinskih faktora. Etničke i rasne razlike u CRC-u, kao i studije o migracijama sugeriraju da sredinski faktori mogu igrati važnu ulogu u etiologiji ove bolesti (pregled u Boyle and Langman, 2000; McMichael and Giles, 1988). Aškenazi Jevreji imaju jedan od najvećih rizika za razvoj CRC-a od svih etničkih grupa na svetu. U Izraelu npr. muškarci koji su rođeni u Evropi ili Americi imaju veći rizik za razvoj ovog kancera od onih rođenih u Africi ili Aziji. Rizik od kancera za potomke japanske populacije koji su migrirali u Ameriku se promenio i incidenca je postala ista ili čak i veća od incidence domaćeg stanovništva, a 3-4 puta je veća nego za Japance u Japanu (pregled u Boyle and Langman, 2000).

Na povećan rizik za nastanak karcinoma debelog creva utiče i visokokalorična ishrana sa puno crvenog mesa i masti životinjskog porekla koje se prerađuje na visokoj temperaturi. Takođe, slaba fizička aktivnost, gojaznost, pušenje, konzumacija alkohola i nitriti kao konzervansi hrane, povećavaju ovaj rizik. Sa druge strane, ishrana bogata vlaknima, povrćem i voćem, hronična upotreba nesteroidnih antiinflamatornih lekova, redovna fizička aktivnost i nadoknada hormona u menopauzi smanjuju rizik od CRC (pregled u Boyle and Langman, 2000; Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a global perspective, 2007; Willett et al., 1990).

## 3. Pozitivna porodična anamneza/Nasledni faktori

Osobe sa pozitivnom porodičnom istorijom CRC-a (naročito ako je oboleo jedan ili više članova porodice u prvom stepenu srodstva, ili je bolest dijagnostikovana u ranijem

starosnom dobu) imaju veću verovatnoću da obole od ove vrste maligniteta. Članovi porodica sa specifičnim, retkim naslednim sindromima imaju takođe značajno povećan rizik za obolevanje. Smatra se da samo 5-10% CRC-a ima naslednu osnovu, dok ostali nastaju sporadično (Colorectal Cancer Overview Guide, 2011; Smith et al., 2002). Ovi sindromi uključuju: familijarnu adenomatoznu polipozu (FAP), *Gardner*-ov sindrom, nasledni nepolipozni kolorektalni kancer (HNPCC) ili *Lynch* sindrom, juvenilni polipozni sindrom (JPS), *Muir-Torre* sindrom, MYH-vezane polipoze (MAP), *Peutz-Jeghers* sindrom (PJS), *Turcot* sindrom.

#### 4. Lična istorija bolesti

Osobe sa inflamatornom bolešću creva (IBD), kao što su ulcerozni kolitis ili Kronova bolest, mogu razviti hroničnu inflamaciju debelog creva čime se povećava rizik za nastanak CRC-a (pregled u Burt, 2000). Takođe, osobe koje su imale crevne polipe (adenome) imaju povećan rizik od pojave novih polipa ili CRC-a. Na kraju, osobe sa pozitivnom istorijom CRC-a, kancera ovarijuma ili uterusu mogu lakše razviti i kolorektalni karcinom.

### 1.1.4 FAKTORI PROGNOZE

Prognoza kod pacijenata sa CRC-om je jasno povezana sa stepenom penetracije tumora kroz zid creva, zahvaćenošću limfnih čvorova i prisustvom/odsustvom udaljenih metastaza. Ove karakteristike su zapravo osnova TNM sistema za određivanje stadijuma tumora, što čini TNM stadijum glavnim prognostičkim faktorom ove bolesti. Petogodišnje preživljavanje dostiže 90% ako se kancer dijagnostikuje u ranim, lokalizovanim stadijumima (stadijum 0 i I). Ukoliko se kancer proširi na okolne limfne čvorove ili organe preživljavanje se smanjuje na 65% (stadijumi II i III). Širenjem tumora u udaljene delove tela stopa preživljavanja pada na samo 10% (stadijum IV) (pregled u Zlobec and Lugli, 2008). Ipak, kod pacijenata koji imaju jedan ili nekoliko tumora koji su se raširili sa kolona na pluća ili jetru, hirurška intervencija uklanjanja ovih tumora može u znatnoj meri da poboljša petogodišnje preživljavanje (Colorectal

Cancer Facts & Figures 2011-2013, 2011). Međutim, bolesnici sa tumorima u stadijumu IIB imaju lošiju prognozu od onih u stadijumu IIIA. Treba imati u vidu da je prognoza na osnovu TNM klasifikacije ograničena jer čak ni ishod u okviru svake grupe nije homogen (pregled u Deschoolmeester et al., 2010).

CEA (eng. *carcinoembryonic antigen* – CEA) je najčešće korišćeni tumor marker kod pacijenata sa CRC-om (Duffy, 2001). Povišen nivo CEA u serumu pre resekcije primarnog tumora može imati negativan prognostički značaj, naročito kod pacijenata sa zahvaćenim limfnim čvorovima. Ipak, CEA ne treba meriti kod pacijenata koji primaju neoadjuvantnu ili adjuvantnu terapiju. Vrednosti CEA koriste se kao dijagnostički pokazatelj odgovora na terapiju i rekurentnosti tumora nakon radikalne hirurgije.

U literaturi se pojavljuju i naznake novih prognostičkih markera koji bi mogli da uđu u kliničku praksu kao što je mikro RNK miR-141. Pokazano je da nivo miR-141 u plazmi pacijenata sa stadijumom IV CRC-a značajno raste, i da se na osnovu njega mogu razlikovati pacijenti sa udaljenim metastazama u odnosu na zdrave kontrole i pacijente sa ostalim stadijumima bolesti. Kombinovanje miR-141 sa CEA markerom se pokazalo komplementarno i može povećati preciznost detekcije udaljenih metastaza kod CRC-a (Cheng et al., 2011).

Poslednjih godina veliki broj istraživanja je bio posvećen pronalaženju novih bioloških faktora prognoze ili predikcije (Slika 4) (Conradi et al., 2011; pregled u Deschoolmeester et al., 2010; Tejpar et al., 2009; Zhao et al., 2011). Iako su stotine ovih markera bile predložene u poslednje 2-3 decenije, osim *KRAS* gena u kontekstu anti-EGFR (eng. *Epidermal Growth Factor Receptor* – EGFR) terapije za metastatsku bolest, ni jedan nije ušao u kliničku praksu (pregled u Deschoolmeester et al., 2010).

<b>Table 1. Summary of tissue-based prognostic/predictive markers most studied in colorectal cancer</b>	
Histological	TNM staging Histological grade Margins Histological type Immune response Number of affected lymph nodes Lymphovascular invasion
Tissue-based markers	
Oncogenes	Kirsten rat sarcoma gene ( <i>KRAS</i> ) Epidermal growth factor receptor ( <i>EGFR</i> ) <i>c-myc</i> Transforming growth factor $\beta$ ( <i>TGF<math>\beta</math></i> ) <i>v-raf</i> murine sarcoma viral oncogene homolog B1 ( <i>BRAF</i> )
Tumor suppressor genes/LOH	<i>p53</i> <i>p27</i> <i>p21</i> Mutated in colorectal cancer ( <i>MCC</i> ) 18q LOH deleted in colorectal cancer ( <i>DCC</i> ) SMAD family member 2 ( <i>SMAD2</i> ) SMAD family member 4 ( <i>SMAD4</i> ) 1p LOH 8p LOH 9p LOH 14p LOH
Proliferating indices	Proliferating cell nuclear antigen Ki-67 MIB-1
Genetic instability	Microsatellite instability Chromosomal instability CpG island methylator phenotype Thymidylate synthase
Apoptosis	Bcl-2 BAX Antioxidants Fas/CD95
Angiogenesis	Phosphatidylinositol 3 kinase, catalytic, $\alpha$ polypeptide Vascular endothelial growth factor Microvessel density Thymidine phosphorylase Cell adhesion molecules Thrombospondin-1
Metastasis and invasion	Matrix metalloproteinases Urokinase type plasminogen activator Plasminogen inhibitor CD44 E-cadherin Nonmetastatic protein 23
Abbreviations: LOH, loss of heterozygosity; TNM, tumor–node–metastasis.	

Slika 4. Pregled prognostičkih/prediktivnih markera najviše izučavanih kod kolorektalnog kancera (preuzeto iz Deschoolmeester et al., 2010).

### 1.1.5 MOLEKULARNA OSNOVA KOLOREKTALNOG KANCERA

Smatra se generalno da je za malignu transformaciju neophodna pojava 5-6 specifičnih promena u genomu somatske ćelije, ali noviji podaci ukazuju da možda i samo dve genske lezije mogu biti dovoljne (Stennner-Liewen and Reed, 2003).

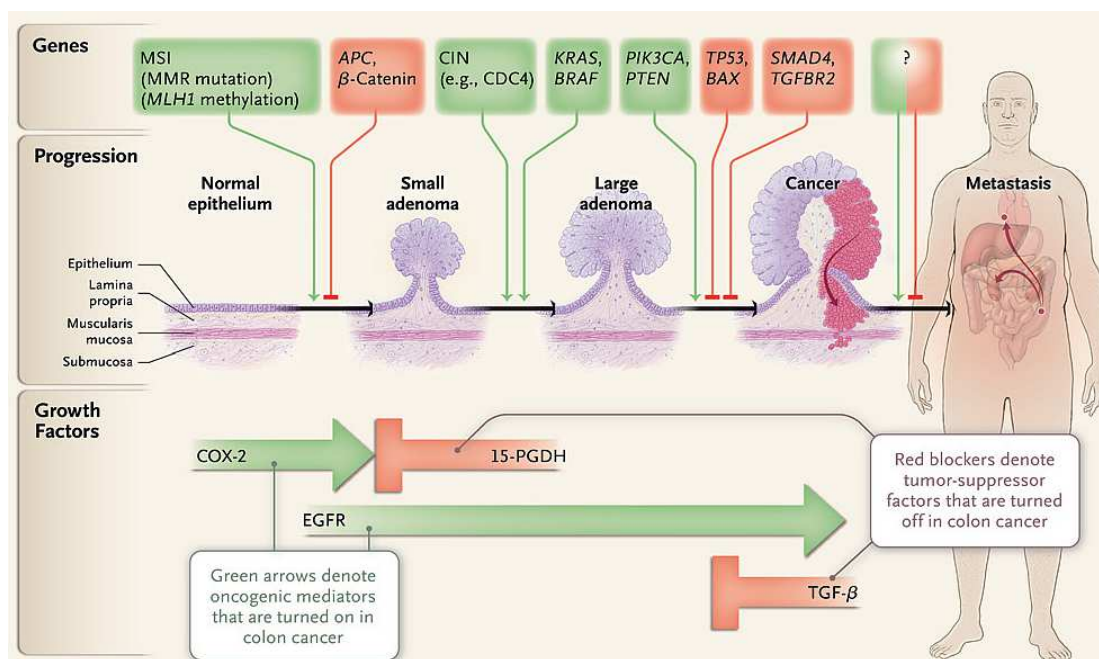
Aktivacija protoonkogena i inaktivacija tumor-supresora su ključni događaji u razvoju malignog fenotipa. Klonalnom ekspanzijom transformisane ćelije razvija se kancer, koji dalje vremenom stiče nove genetičke promene, sposobnost angiogeneze i metastatski potencijal. Pored individualne genetičke pozadine (eng. *background*), na razvoj kancera utiču i sredinski faktori.

Dostupnošću tehnike sekvenciranja humanog genoma i razvitkom *omics* tehnologija omogućeno je analiziranje čitavog genoma kancera, a samim tim i utvrđivanje spektra somatskih mutacija koje doprinose patogenezi CRC-a. Ovakvim pristupima otkriven je evolucioni diverzitet kancera i implicirano je postojanje većeg repertoara kancerskih gena nego što je to ranije pretpostavljano (pregled u Greenman et al., 2007). Na osnovu studije u kojoj je sekvencirano više hiljada gena u serijama CRC-a, pokazano je da je 69 gena značajno za patogenezu ovog kancera, dok su individualni tumori imali u proseku po 9 mutiranih gena. Štaviše, svaki ispitivani tumor je imao različit mutacioni genski profil (Sjöblom et al., 2006; Wood et al., 2007). Međutim, samo mali broj somatskih mutacija koje su prisutne u svakom tumoru zapravo vodi proces kancerogeneze (eng. *drivers*). Ove *driver* mutacije su pozitivno selektovane tokom onkogeneze jer daju prednost tumorskoj ćeliji, npr. promovisanjem ćelijskog rasta ili izbegavanjem apoptoze (pregled u Martini et al., 2012). S obzirom da postoji veliki broj gena sa niskom stopom mutacija, teško je razlikovati koje od tih mutacija su *driver*-i, a koje se javljaju naknadno (eng. *passengers*) i ne utiču na progresiju tumora (pregled u Greenman et al., 2007). Postoje i brojni dokazi koji ukazuju da *driver* mutacije često čine kancerske ćelije fiziološki zavisnim od konstitutivne aktivacije onkogena, odgovornih za održavanje njihovog malignog fenotipa (npr. mutacije *PIK3CA* u kolorektalnim ćelijskim linijama). Ovaj fenomen je poznat kao „onkogeno zavisnost“ (eng. *oncogene addiction*) (pregled u Jonkers and Berns, 2004; Samuels et al., 2005; Weinstein, 2002).

#### 1.1.5.1 MOLEKULARNI PUTEVI KOLOREKTALNE KARCINOGENEZE

Kolorektalna neoplastična transformacija je višestepen proces koji najčešće traje godinama i praćena je nizom karakterističnih genetičkih promena. U tom procesu dolazi

do patološke transformacije normalnog epitela kolona prvo u adenomatozni polip, a zatim u maligni karcinom koji ima invazivni potencijal (Slika 5). Kolorektalna karcinogeneza se karakteriše sukcesivnom akumulacijom mutacija u genima koji kontrolišu rast i diferencijaciju epitelnih ćelija, što za posledicu ima genomsku nestabilnost (Goel et al., 2003).



Slika 5. Genetičke promene tokom kolorektalne karcinogeneze (preuzeto iz Markowitz and Bertagnolli, 2009).

Genomska nestabilnost predstavlja važan događaj u kolorektalnoj progresiji i na osnovu nje mogu se razlikovati dva puta nastanka CRC-a, *supresorski (tradicionalni)* i *mutatorski* put (pregled u Deschoolmeester et al., 2010). Poslednjih godina predložen je i treći molekularni put karcinogeneze kolona, *metilatorski* put (Jass et al., 2002). Dakle, sa molekularne tačke gledišta klasifikacija CRC-a se bazira na ćelijskim događajima koji karakterišu ova tri puta kancerogeneze: hromozomskoj nestabilnosti (eng. *chromosome instability* - CIN), mikrosatelitskoj nestabilnosti (eng. *microsatellite instability* - MSI) i metilatorskom fenotipu CpG ostrvaca (eng. *CpG island methylator phenotype* - CIMP) (pregled u Perea et al., 2011).



### 1. Supresorski put kolorektalne karcinogeneze

Supresorski ili tradicionalni put kolorektalne karcinogeneze predložen je još 90-tih godina prošlog veka od strane Fearon-a i Vogelstein-a (Fearon and Vogelstein, 1990). Ovaj klasični model nastanka tumora od adenoma do mikrosatelitski stabilnih (MSS) karcinoma se može uočiti kod 60-85% sporadičnih CRC-a, a takođe i kod slučajeva sa FAP-om u nekih 15% (pregled u Grady, 2004; pregled u Perea et al., 2011; Snover, 2011). Molekularni profil ovih tumora karakteriše se hromozomskom nestabilnošću koja uključuje gubljenje ili amplifikaciju hromozoma, aneuploidiju, translokacije, gubitak heterozigotnosti (eng. *loss of heterozygosity* - LOH) i to najčešće za: 5q (*APC* gen), 8p, 17 p (*TP53* gen) i 18q (geni *DCC*, *SMAD2* i *SMAD4*). Inicijatorom ovog puta smatra se gubitak ili mutacija u tumor-supresor *APC* (eng. *Adenomatous Polyposis Coli* - *APC*) genu, ali karakteristične su i mutacije protoonkogeno *KRAS*. Gubitkom gena *DCC*, *SMAD2* i *SMAD4* dolazi do dalje progresije tumora i to onemogućavanjem apoptoze. Mutacije *TP53* gena se dešavaju kasnije, tokom prelaska benigne lezije u invazivnu bolest (pregled u Worthley et al., 2007).

### 2. Mutatorski put kolorektalne karcinogeneze

Kanceri koji nastaju ovim putem imaju oštećen mehanizam za popravku pogrešno sparenih baza u DNK (eng. *Mismatch Repair Mechanism* – MMR), čime je omogućeno nakupljanje mutacija. MMR je pod kontrolom nekoliko gena pri čemu su najčešći *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*. Nemogućnost popravke *mismatch*-a se može lako uočiti jer rezultuje u varijabilnosti dužina kratkih, ponovljenih nukleotidnih sekvenci u DNK (mikrosatelita) od ćelije do ćelije, tj. u mikrosatelitskoj nestabilnosti. Kao posledica, geni koji imaju mikrosatelite, kao što su *TGFβRII*, *EGFR* ili *BAX*, su često mutirani u CRC-ima (pregled u Liefers and Tollenaar, 2002). Dok 10-15% sporadičnih CRC-a ima MSI, najčešće uzrokovanu hipermetilacijom promotora *MLH1* gena, većina HNPCC-a se karakteriše MSI fenotipom (mutacije MMR gena u germinativnim ćelijama) (pregled u Deschoolmeester et al., 2010; Grady, 2004; pregled u Perea et al., 2011).

### 3. Metilatorski put kolorektalne karcinogeneze

Pažljiva karakterizacija epigenetskih faktora, naročito metilacija promotorskih sekvenci gena, dovela je do definicije CIMP kancera (pregled u Worthley et al., 2007). Oko 40%

genskih promotora sisara sadrži CpG ostrvca koja su nemetilovana kod eksprimiranih gena (pregled u Perea et al., 2011). U karcinogenezi, epigenetsko utišavanje genske transkripcije ovih sekvenci metilacijom biološki je ekvivalentno nastanku inaktivacione mutacije. Kod CRC-a može se videti globalna hipometilacija genoma (najviše kod ponovljenih DNK sekvenci) paralelno sa hipermetilacijom promotorskih regiona „strateških“ gena, kao što je npr. *MLHI* (pregled u Bariol et al., 2003). Više od polovine tumor-supresor gena koji imaju ulogu u kancerogenezi familijarnih kancer sindroma, zbog mutacija u germinativnim ćelijama, je pronađeno utišano kod sporadičnih CRC-a (pregled u Deschoolmeester et al., 2010). Smatra se da mehanizam metilacije promotorskih regiona igra ulogu u nastanku oko 35% CRC-a. Za razliku od tradicionalnog „adenom-karcinom“ puta nastanka tumora, metilatorski put započinje od prekursorskih lezija zvanih „sesilni rečkasti adenomi/polipi“ (eng. *sessil serrated adenoma/polyp*), pa se često i sam put naziva eng. *serrated pathway*. Karcinomi nastali ovim putem sa molekularnog aspekta se karakterišu visokim prisustvom *BRAF* mutacija (90%), kao inicijatora koji dovode do CIMP fenotipa, a mogu biti i MSI-H (eng. *microsatellite instability - high - MSI-H*) i MSS (eng. *microsatellite stable - MSS*) (pregled u Perea et al., 2011; Snover, 2011). Prisustvo CIMP-a se može zapaziti i kod tumora koji nose *KRAS* mutacije, ali u mnogo manjem procentu, što govori u prilog tome da polipi koji nose *BRAF*, odnosno *KRAS* mutacije najverovatnije imaju različit *serrated* put nastanka (pregled u Huang et al., 2011; Rosenberg et al., 2007; Shen et al., 2007).

## **1.2 KONCEPT PERSONALIZOVANE MEDICINE U TERAPIJI KOLOREKTALNOG KANCERA**

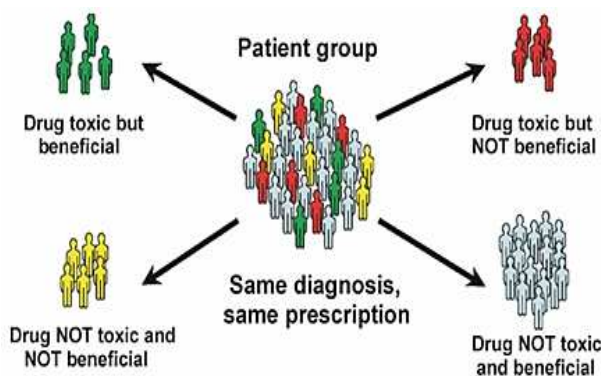
Personalizovana medicina predstavlja nov medicinski model prilagođavanja i primene najbolje moguće terapije za svakog pojedinačnog bolesnika. Primena koncepta personalizovane medicine se odnosi kako na unapređenje prevencije, tako i na lečenje bolesti. Dobro je poznato da različiti bolesnici reaguju na različite načine na isti lek. Individualne razlike u farmakološkom odgovoru bolesnika na primenjene lekove

dovode do ozbiljnih kliničkih problema, od kojih su najvažniji otežano lečenje, neželjene reakcije na lekove i interakcije među lekovima.

### 1.2.1 FARMAKOGENETIKA I PERSONALIZOVANA MEDICINA

Iako mnogi faktori utiču na efekte lekova, uključujući starost, funkcionalno stanje organa, terapiju drugim lekovima, interakcije lekova, prirodu oboljenja, postoje mnogi slučajevi gde su međusobne razlike u farmakokinetici i farmakodinamici lekova genetički determinisane. Varijacije u sekvencama gena koji kodiraju sintezu enzima uključenih u metabolizam lekova, transportera lekova ili ciljnih molekula za dejstvo lekova, se smatraju odgovornim za pomenute razlike (pregled u Evans and Johnson, 2001). Procenjuje se da genetički faktori mogu uticati sa 20-95% u varijabilnosti efekata lekova (Kalow et al., 1998). Većina studija koje danas ispituju vezu između gena i terapijskog odgovora na lek je u osnovi farmakogenetička.

Farmakogenetika je oblast medicine koja izučava povezanost genetičkih osobina pojedinca sa efikasnošću i toksičnošću lekova (Slika 6). Za razliku od farmakogenomike koja ispituje čitav niz gena koji u međusobnoj interakciji određuju efikasnost i bezbednost leka, farmakogenetika se bavi monogenским varijacijama. Cilj farmakogenetike jeste optimizacija terapije prema individualnom genotipu bolesnika i minimiziranje neželjenih dejstava leka (pregled u Evans and McLeod, 2003).



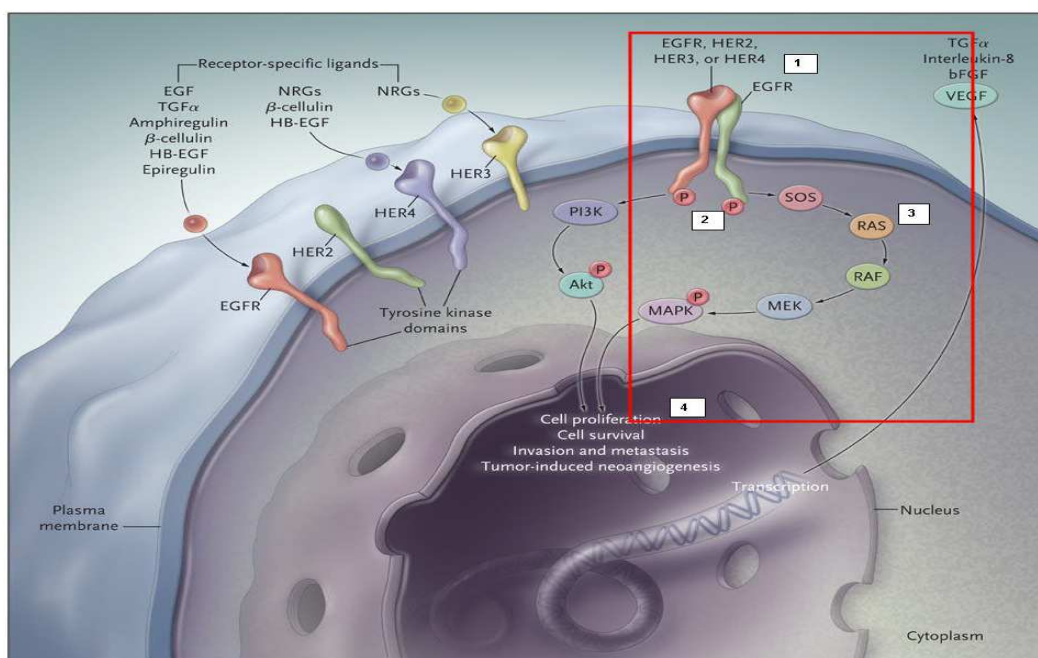
Slika 6. Farmakogenetika - povezanost genotipova sa efikasnošću i toksičnošću lekova (Preuzeto iz Justin, 2007).

## 1.2.2 MOLEKULARNA CILJANA TERAPIJA KOLOREKTALNOG KANCERA

U poslednjih deset godina terapija pacijenata sa kancerom je značajno poboljšana zahvaljujući boljem razumevanju molekularne osnove bolesti, optimizaciji hemioterapije i uvođenju ciljne terapije (pregled u Martini et al., 2012). Danas je poznato da je CRC vrlo heterogen na molekularnom nivou i da to u mnogome doprinosi različitoj prognozi i ishodu lečenja pacijenata (Li et al., 2011). Pored toga, ukazuje i na potrebu za personalizovanim terapijama. Farmakološka blokada onkogenih događaja u kancerskim ćelijama često vodi „zavisničkom šoku“ (eng. *addiction shock*), koji za posledicu ima ćelijsku smrt ili zaustavljanje rasta. „Paradigma zavisnosti“ je iskorišćena u farmakologiji i dizajnirani su lekovi koji specifično ciljaju izmenjene proteine, tj. omogućena je primena molekularne ciljne (eng. *target*) terapije (pregled u Martini et al., 2012). Primena molekularne ciljne terapije u svakodnevnoj kliničkoj praksi je uslovljena potrebama za identifikacijom biomarkera određenih bolesti. Razvoj tumorskih biomarkera je neophodan za postizanje rane detekcije tumora (dijagnostički marker), za bolje stratifikovanje pacijenata u pogledu prognoze (prognostički marker) i za optimizaciju terapije za pojedinačnog pacijenta (prediktivni marker) (pregled u Hamilton, 2008).

Među razvijenim novim terapijama zasnovanim na ciljanim molekularnim biomarkerima nalaze se dva monoklonska antitela – Erbitux<sup>®</sup> (cetuximab) i Vectibix<sup>®</sup> (panitumumab), usmerena ka inhibiciji EGFR-a, koja su jasno pokazala efikasnost u lečenju metastatskih oblika CRC-a (mCRC). Cetuximab je himerno humano - mišje antitelo IgG1 tipa, dok je panitumumab potpuno humano IgG2 antitelo. EGFR pripada ErbB/HER porodici transmembranskih glikoproteinskih receptora sa tirozin kinaznom aktivnošću i prekomerno je ekspimiran u do 80% CRC-a, čime predstavlja adekvatan cilj za terapiju navedenim antitelima (pregled u Porebska et al., 2000). Vezivanjem odgovarajućeg liganda (EGF, TGF $\alpha$ , epiregulin, amfiregulin) za EGFR dolazi do njegove homo- ili heterodimerizacije sa nekim od članova iz iste porodice (Slika 7). Dimerizacijom se aktivira autofosforilacija unutarćelijskih tirozin kinaznih ostataka i indukuje se prenos signala preko različitih signalnih puteva, RAS/RAF/MAPK, PI3K/AKT i STAT/AKT (pregled u Patil et al., 2010). Ovi putevi imaju značajnu ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa, ćelijskoj proliferaciji i preživljavanju, adheziji,

angiogenezi, migraciji i invaziji, svim ključnim komponentama tumorske patogeneze (pregled u Spano et al., 2005). Nasuprot tome, vezivanje antitela za EGFR vodi blokiranju nizvodne signalizacije. Međutim, pokazano je da su EGFR-ciljane terapije efikasne samo u određenoj grupi pacijenata sa CRC-om (pregled u Dassonville et al., 2007). Među molekularnim biomarkerima koji definišu ovu grupu su pre svega mutacije *KRAS* i *BRAF* protoonkogeni, za koje je pokazano da predviđaju odsustvo odgovora na cetuksimab i panitumumab (Benvenuti et al., 2007; Di Nicolantonio et al., 2008; Herreros-Villanueva et al., 2011; Karapetis et al., 2008; Lièvre et al., 2006; Loupakis et al., 2009).



Slika 7. EGFR ligandi i signalni putevi u ćeliji (preuzeto sa <https://www.cobas-roche.co.uk/UserFiles/Image/EGFR%20signaling%20pathway.jpg>).

### 1.3 *KRAS* PROTOONKOGEN: STRUKTURA, FUNKCIJA I MUTACIJE

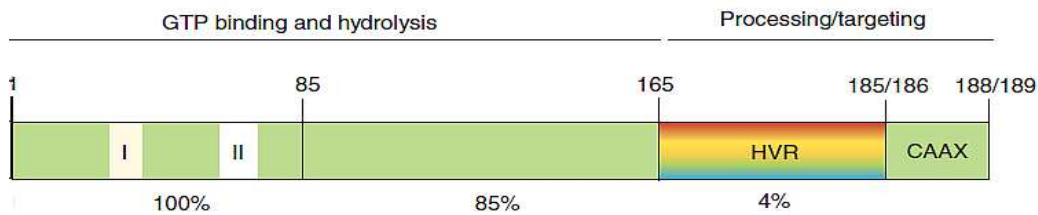
Pre više od 30 godina (1982.) Chang-a i saradnici (1982) su otkrili *Kirsten Rat Sarcoma Virus* i *Murine Sarcoma Virus* onkogene povezane sa glodarskim sarkom virusnim genima. Humani *KRAS* gen je homolog ova dva onkogeni. Ubrzo zatim

uočeno je da izmenjeni *KRAS* gen kodira abnormalne forme p21 proteina u kancerskim ćelijama i da je povezan sa karcinogenezom (Der and Cooper, 1983).

Postoje dve forme *KRAS* gena u humanom genomu, *KRAS4A* i *KRAS4B*. *KRAS4A* gen je pseudogen nastao od *KRAS4B* alternativnim iskrajanjem informacione RNK (iRNK). Glavna forma gena, *KRAS4B* (u daljem tekstu *KRAS*), se nalazi na kratkom kraku hromozoma 12 (na poziciji 12p11.1-12.1) i kodira iRNK dužine 5,5 kb (McGrath et al., 1983; Popescu et al., 1985). *KRAS* ima šest egzona od kojih su egzoni 2, 3 i 4 kodirajući (Carta et al., 2006).

### **1.3.1 KRAS PROTEIN: STRUKTURA, FUNKCIJA I REGULACIJA AKTIVNOSTI**

*KRAS* genski produkt, *KRAS* protein, pripada super-familiji malih GTP (guanin trifosfat)-vezujućih proteina (G proteini). To su monomerni proteini čije se mase kreću od 20 do 40 kDa. Mogu vezivati kako GDP (guanin difosfat), tako i GTP, a imaju i GTP-aznu hidrolitičku aktivnost. Predstavljaju ključne elemente u skoro svim signalnim putevima i do danas je pronađeno oko 150 malih G proteina klasifikovanih u 5 familija (RAS, RHO, RAB, SAR1/ARF I RAN). RAS familija uključuje *Harvey-Ras* (HRAS), *neuroblastoma-Ras* (NRAS) i *Kirsten-RAS* (KRAS) proteine. Poređenje aminokiselinskih (AK) sekvenci proteina RAS familije pokazalo je da postoji 30-55% homologije među različitim vrstama (pregled u Linardou et al., 2011). Regioni koji pokazuju najveću homologiju među članovima familije su amino (N) terminalni domen (AK 1-85) sa 100% i region od AK-e 85-165 sa 85% homologije (Slika 8) (pregled u Quinlan and Settleman, 2009). Oni su odgovorni za vezivanje GDP-a i GTP-a i zajedno čine GTP-vezujući džep. U ovom domenu se takođe nalaze i konsenzusne sekvence za interakciju sa nizvodnim efektorima (eng. *core effector region*). Sekvence locirane u karboksi (C) terminalnom domenu, hipervarijabilni region - HVR (AK 165-185/186) i C-terminalni motiv (CAAX), su odgovorne za lipidne posttranslacione modifikacije proteina koje obezbeđuju ispravnu biološku aktivnost, determinaciju ćelijske lokalizacije (citoplazmatska strana ćelijske membrane) i interakciju sa efektorim proteinima (Finegold et al., 1990; pregled u Jančík et al., 2010).



Slika 8. Struktura RAS proteina (modifikovano prema Quinlan and Settleman, 2009).

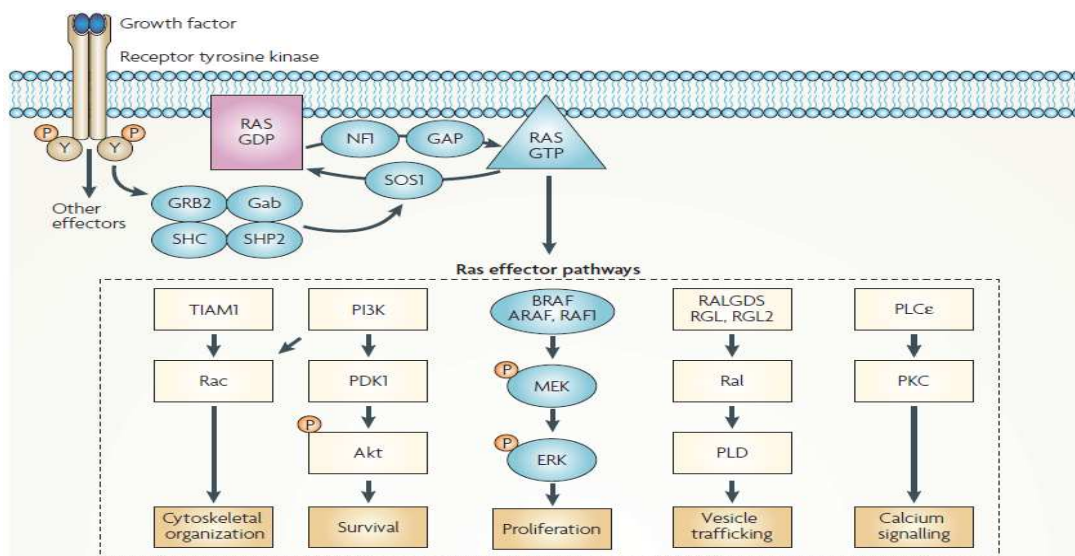
KRAS protein ima 188 aminokiselina i molekulska masu od 21,6 kDa (McGrath et al., 1983). On je u ćeliji u neaktivnom stanju dok god ne veže GTP, što je regulisano unutar- i vanćelijskim signalima. Kada se GTP veže (aktivno stanje), dolazi do aktivacije dva specifična domena proteina i njegove konformacione promene. Ovi domeni su poznati kao *Switch 1* (AK 30-38) i *Switch 2* (AK 59-67), i čine efektorsku petlju koja ima ulogu u kontrolisanju specifičnosti vezivanja KRAS GTP-aze za njene efektorske molekule (pregled u Jančík et al., 2010).

Prelazak iz neaktivnog (RAS-GDP) u aktivno (RAS-GTP) stanje je posredovan GEP proteinima (eng. *Guanine nucleotide Exchange Proteins* - GEPs) koji ubrzavaju proces disocijacije GDP-a i vezivanja GTP-a. GTP-aza aktivirajući proteini (eng. *GTPase-Activating Proteins* – GAPs) ubrzavaju GTP-aznu aktivnost samog KRAS proteina i vraćanje u prvobitno, neaktivno stanje (Gideon et al., 1992).

U mirujućim netransformisanim ćelijama u G0 fazi manje od 5% RAS proteina je u aktivnom stanju, dok se taj procenat povećava na 50% nakon stimulacije ćelije različitim mitogenima, kao što su EGF, PDGF (eng. *Platelet-Derived Growth Factor* - PDGF), interleukin 2 i 3, i GM-CSF (eng. *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor* - GM-CSF) (pregled u Adjei, 2001; Osterop et al., 1993).

Konformaciona promena KRAS proteina omogućava njegovu interakciju kao adaptera sa mnogobrojnim nizvodnim prenosiocima signala. U aktivnom GTP stanju KRAS se može vezati za: RAF (čime se pokreće *mitogen-activated protein kinase* - MAPK signalni put), PI3K - fosfatidil-inozitol-3-kinazu (čime se aktivira AKT), PLC – fosfolipazu C, RAL (čime se aktivira *Jun amino-terminal kinases* - JNK signalni put) i/ili RAC (Slika 9). Krajnji efekti aktiviranja navedenih signalnih puteva, kako u normalnim tako i u neoplastično transformisanim ćelijama, jesu: intenziviranje ćelijske proliferacije, broja deoba, preživljavanja; regulisanje diferencijacije, apoptoze i

angiogeneze; regulisanje transporta vezikula i dinamike aktina, tj. organizacije citoskeleta; aktivacija odgovarajućih mehanizama za popravku DNK; regulacija signalizacije preko kalcijuma (Ca).

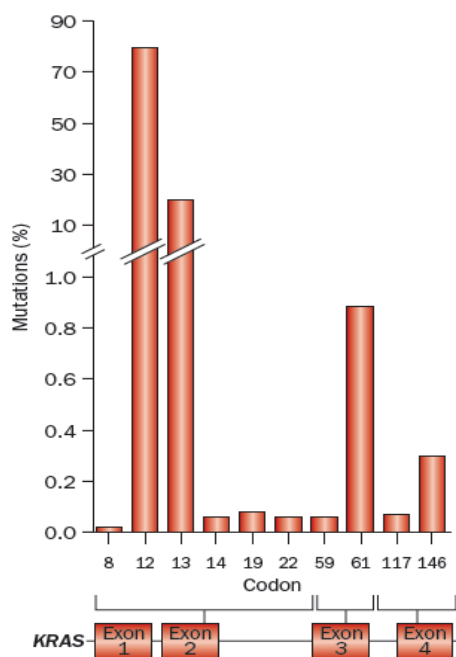


Slika 9. Šematski prikaz RAS signalnih puteva (preuzeto iz Schubbert et al., 2007).

### 1.3.2 MUTACIJE *KRAS* GENA U ONKOGENEZI CRC-a

Aktivirajuće somatske mutacije *KRAS* gena su do danas detektovane u različitim humanim malignitetima. Onkogeno forma *KRAS*-a je prevalentna u karcinomu pankreasa (>80%), kolorektalnom karcinomu (30-50%) i karcinomu pluća (30-50%), ali se takođe javlja i kod endometrijalnog i cervikalnog kancera, tumora dojke, jetre i beške, mijelodnim leukemijama (Bos, 1989; Downward, 2003; Forbes et al., 2008; Herreros-Villanueva et al., 2011). Aktivirajuće mutacije mogu dovesti do inhibicije GTP-azne funkcije *KRAS* proteina ili onemogućavati njegovu aktivaciju GAP faktorima, što rezultuje nakupljanjem samog proteina u aktivnoj, GTP formi (pregled u Schubbert et al., 2007). Konstitutivno aktiviran *KRAS* ne samo da doprinosi inicijaciji tumora, već i tumorskom rastu, preživljavanju, progresiji, invaziji lokalnog tkiva, formiranju metastaza, angiogenezi, pa čak i imunskom odgovoru (pregled u Schubbert et al., 2007; Smakman et al., 2005; pregled u Van Krieken et al., 2008). Većina mutacija





(>95%) u CRC-u koje su odgovorne za sintezu trajno aktivnog KRAS proteina su tačkaste mutacije koje menjaju značenje kodona i imaju za posledicu ugradnju druge AK-e (eng. *missense*), predominantno locirane u 12-om (oko 82%) i 13-om (oko 17%) kodonu egzona 2 (Slika 10) (Edkins et al., 2006; Kotoula et al., 2009; pregled u Linardou et al., 2011). Mutacije na drugim pozicijama, kao što su kodoni 61 i 146, su detektovane u manjem procentu (1-4%), i njihov klinički značaj nije još uvek u potpunosti ispitan (Edkins et al., 2006; Luopakis et al., 2009; Oliveira et al., 2004).

Slika 10. Šematski prikaz egzona *KRAS* gena i procenta mutacija po kodonima (preuzeto iz Martini et al., 2012).

U okviru 12-og i 13-og kodona, mutacionog „*hot spot*-a“, sledećih sedam mutacija se smatraju najčešćim: p.G12A, p.G12D, p.G12R, p.G12C, p.G12S, p.G12V i p.G13D (pregled u Forbes et al., 2008). Pretpostavlja se da mutacije u ovim kodonima imaju glavnu ulogu u progresiji CRC-a (Andreyev et al., 1998).

### 1.3.2.1 *KRAS* MUTACIONI STATUS KAO PROGNOСТИČKI I PREDIKTIVNI MARKER

S obzirom da se mutacije u *KRAS*-u smatraju ranim događajem u kolorektalnoj karcinogenezi i progresiji, i da je onkogeno aktivacija *RAS* signalnog puta uključena u mnoge aspekte malignog procesa, pretpostavlja se da *KRAS* mutacioni status može biti prognostički faktor u CRC-u. Prema nekim studijama *KRAS* mutacije su asocirane sa tumorima višeg stadijuma, povećanim metastatskim potencijalom, lošijom prognozom i smanjenim ukupnim preživljavanjem (eng. *Overall Survival* - OS) i preživljavanjem bez

progresije bolesti (eng. *Progression Free Survival* - PFS) (Andreyev et al., 1998 and 2001; Bos et al., 1987; Samowitz et al., 2000; Van Cutsem et al., 2010; Wang et al., 2006). Međutim, podaci o prognostičkoj vrednosti *KRAS* mutacija u CRC-u su kontraverzni i zahtevaju dodatne potvrde (Karapetis et al., 2008; Roth et al., 2010).

Mutacije u *KRAS* genu kompletno blokiraju normalnu funkciju RAS proteina i produžavaju njegov poluživot u aktivnom stanju, rezultujući neregulisanom stimulacijom nizvodnih puteva transdukcije signala, nezavisno od spoljašnje stimulacije. Ovakav status *KRAS* gena onemogućava delovanje inhibitora koji deluju na uzvodne komponente EGFR signalnog puta, čak i ukoliko je došlo do amplifikacije ovih komponenti. Prema literaturnim podacima, *KRAS* mutacije su povezane sa slabim odgovorom na terapiju i kraćim PFS i OS kod pacijenata sa CRC-om lečenih cetuksimabom i/ili panitumumabom, kao monoterapijama ili u kombinaciji sa hemioterapijom (Amado et al., 2008; Bokemeyer et al., 2010; De Roock et al., 2008; Di Fiore et al., 2007; Lièvre et al., 2006). Na osnovu ovih podataka, FDA (eng. *Food & Drug Administration* - FDA) i EMEA (eng. *European Medicines Agency* - EMEA) su ograničile upotrebu cetuksimaba (2004. godine) i panitumumaba (2006. godine) na bolesnike sa mCRC-om koji su imali progresiju bolesti nakon standardne hemioterapije i kod kojih nisu nađene *KRAS* mutacije (eng. *wild-type* - wt *KRAS*) (Giusti et al., 2008). Navedene odluke predstavljaju važan događaj u molekularnoj onkologiji kako u svetu tako i u našoj zemlji, jer je prvi put odobrena upotreba ciljanog molekularnog leka ograničena na pacijente sa specifičnim molekularnim profilom gena.

Uprkos wt *KRAS* statusu, utvrđeno je da će samo 40-60% bolesnika zapravo odgovoriti na terapiju (pregled u Linardou et al., 2008; Loupakis et al., 2009). Ova činjenica ukazuje na postojanje dodatnih molekularnih markera, iz istog ili nekog drugog signalnog puta, koji mogu imati ulogu u terapiji. Međutim, neki bolesnici (<10%) sa *KRAS* mutiranim tumorima mogu ipak da odgovore na EGFR-ciljanu terapiju. Nosioci p.G13D mutacije, koja je i jedna od najčešćih, imaju bolje preživljavanje u odgovoru na cetuksimab monoterapiju kao i kombinovanu terapiju (De Roock et al., 2010). Takođe, novija istraživanja pokazuju da su mutacije ovog gena specifične za tip tumora, kao i da imaju različit biološki efekat i transformišući potencijal (specifično p.G12V) (Andreyev et al., 2001; De Roock et al., 2010; Forbes et al., 2008; Miller i Miller, 2011). Zapaženo je da su mutacije detektovane u primarnim

kolorektalnim tumorima takođe prisutne i u metastazama, i da procenat te usaglašenosti ide i do 96% (Ličar et al., 2011; Santini et al., 2008).

#### **1.4 BRAF PROTOONKOGEN: STRUKTURA, FUNKCIJA I MUTACIJE**

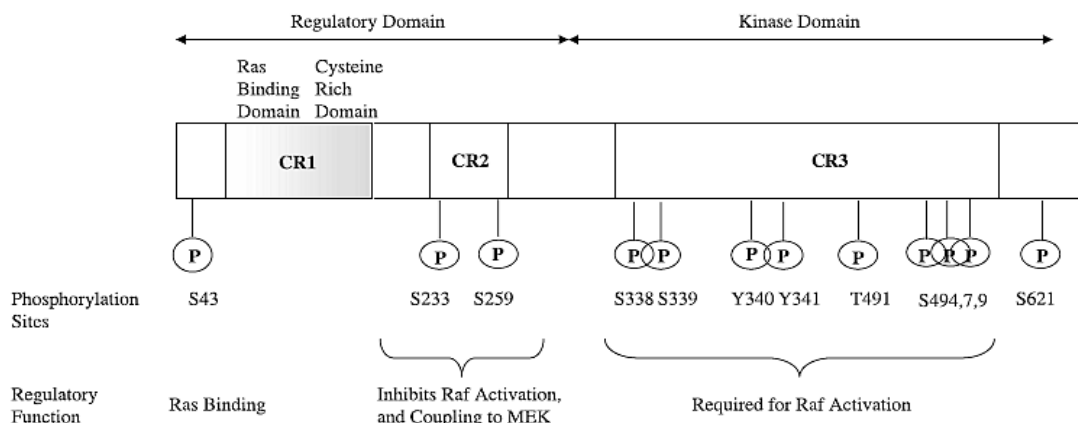
Humani protoonkogen *BRAF*, *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*, je lociran na dugom kraku hromozoma 7 na pozicija 7q34. Sastoji se od 18 egzona i kodira iRNK dužine 2478 bazna para (bp). Produkt ovog gena je protein kinaza veličine 766 AA-a i mase oko 84,4 kDa, jedna od glavnih efektora nizvodno od KRAS-a u RAS/RAF/MEK/MAPK signalnom putu (pregled u Phillips et al., 2010; Roskoski, 2010).

##### **1.4.1 BRAF PROTEIN: STRUKTURA, FUNKCIJA I REGULACIJA AKTIVNOSTI**

RAF familija proteina obuhvata tri serin/treonin protein kinaze: ARAF, BRAF i RAF-1/CRAF. Ove kinaze se aktiviraju u ćeliji na GTP-zavistan način od strane RAS proteina (pregled u Vakiani and Solit, 2011). Strukturno kod ovih proteina se mogu razlikovati dva funkcionalna domena sa tri konzervisana regiona (CR): N-terminalni regulatorni (CR1 i CR2) i C-terminalni kinazni domen (CR3) (Slika 11). U neaktivnoj konformaciji, smatra se da RAF formira zatvorenu strukturu u kojoj regulatorni domen interaguje sa kinaznim domenom (Wan et al., 2004).

Aktivirani RAS se vezuje za RAS-vezujuće mesto u CR1 regionu i približava RAF protein ćelijskoj membrani. Tu se zatim vrši fosforilacija specifičnih AA-a (treonina 599 i serina 602 kod BRAF-a) u aktivacionom segmentu CR3 regiona, čime se RAF protein aktivira. CR2 region sadrži regulatorna fosforilaciona mesta čija defosforilacija je neophodna za vezivanje RAS proteina. Neke mutantne forme BRAF-a, uključujući p.V600E, su konstitutivno aktivne i sposobne da u monomernoj formi fosforilišu MEK na RAS-nezavistan način (Wan et al., 2004). Ponekada, u zavisnosti od

ćelijskog konteksta, dalja signalizacija može ići i preko heterodimera BRAF-CRAF (Rushworth et al., 2006).



Slika 11. Struktura RAF proteina: funkcionalni domeni i regulatorna mesta fosforilacije (preuzeto iz Sridhar et al., 2005).

RAF proteini dele mnoge strukturne i biološke osobine, dok je njihova ekspresija ćelijski specifična (pregled u Sridhar et al., 2005). Postoje važne razlike među njima koje se pre svega odnose na regulaciju mesta fosforilacije proteina, tj. mogućnost njihove kinazne aktivacije (Marais et al., 1997). BRAF pokazuje veću bazalnu kinaznu aktivnost u odnosu na CRAF jer je konstitutivno fosforilisan na poziciji serina 445, nezavisno od stimulacije onkogenim RAS-om. Fosforilacija serina 445 ipak doprinosi maksimalnoj aktivaciji BRAF-a podižući bazalnu, a zatim i RAS-indukovanu aktivaciju. Fosforilacija homologe AK-ske pozicije u CRAF-u (serin 338) je pak RAS zavisna. Za maksimalnu aktivaciju CRAF-a neophodna je i dodatna fosforilacija od strane SRC-a na poziciji tirozina 341 (Mason et al., 1999). ARAF protein se slično ponaša CRAF-u; slabo je aktiviran RAS-om, a mnogo jače SRC-om. Ova dva signala zapravo deluju sinergistički kako bi obezbedili maksimalnu aktivaciju proteina. S obzirom da jedino BRAF ne zahteva aktivaciju pomoću dva proteina (lakše se aktivira), može se pretpostaviti da je on glavni aktivator nizvodnog MEK-a i primarni cilj onkogenog RAS-a (Marais et al., 1997). Navedene regulatorne razlike daju biološku osnovu razlika efekata pojedinačnih mutacija. Smatra se da mutacija kodona 600 oponaša fosforilaciju AK-a u aktivacionoj petlji i rezultuje konstitutivnom aktivacijom

BRAF-a, dok mutacija homologe pozicije u CRAF-u nema isti efekat. Takođe, ove razlike mogu dati i potencijalno objašnjenje činjenice da je BRAF najviše mutiran od svih članova RAF familije u kancerima (Davies et al., 2002; pregled u Mercer and Pritchard, 2003).

Smatra se da je većina funkcija RAF proteina posredovana fosforilacijom i aktiviranjem MAPK signalnog puta. MAPK je inicijalno bila poznata i kao ERK 1/2 (eng. *extracellular signal-regulated kinases 1 and 2* - ERK 1/2). Nizvodno od RAF-a prvo se fosforiliše MEK1/2, a zatim ova kinaza na isti način aktivira MAPK, koja reguliše ćelijske funkcije direktnom fosforilacijom nukleusnih (transkripcioni faktori - ETS, ELK, MYC) i/ili citosolnih ( $p90^{RSK}$ ) supstrata. MAPK signalna kaskada omogućava prenos signala od receptora na membrani ćelije do transkripcionih faktora koji regulišu ekspresiju gena. U zavisnosti od tipa stimulusa i ćelije, ovim putem se prenose signali koji regulišu ćelijsku diferencijaciju, proliferaciju, apoptozu i angiogenezu (pregled u Sridhar et al., 2005; pregled u Vakiani and Solit, 2011).

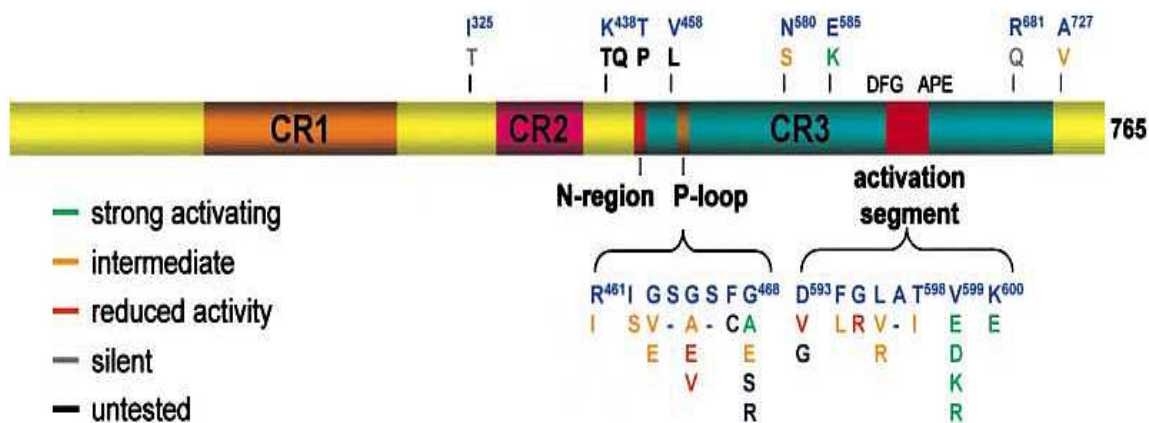
#### **1.4.2 MUTACIJE *BRAF* GENA U ONKOGENEZI CRC-a**

Somatske tačkaste mutacije u *BRAF* genu su zapažene u različitim tipovima tumora. Izmenjena forma *BRAF*-a je detektovana u oko 70% melanoma, 30-69% tiroidnih tumora, 15-30% ovarijalnih, 10-15% kolorektalnih, kao i u manjem procentu u drugim kancerima (pluća, akutne leukemije, limfomi itd.) (Cohen et al., 2003; Davies et al., 2002; Herreros-Villanueva et al., 2011; Kumar et al., 2003; Rajagopalan et al., 2002; Singer et al., 2003; Wellbrock et al., 2004). Visoka stopa *BRAF* mutacija u humanim kancerima sugeriše da *BRAF* ima onkogenu funkciju u karcinogenezi (pregled u Pratilas et al., 2011).

U okviru CRC-a incidenca *BRAF* mutacija varira i u zavisnosti od tipa tumora. MSI-H/CIMP-H tumori kolona imaju visoku stopu *BRAF* mutacija, dok je ona jako niska kod MSS/CIMP-negativnih tumora. Stopa mutacija *KRAS* gena u ovim tipovima tumora je potpuno obrnuta; niska kod MSI-H/CIMP-H tumora, a visoka kod MSS/CIMP-negativnih tumora (Sanchez et al., 2009). Za razliku od sporadičnih MSI tumora, HNPCC sindromi se odlikuju odsustvom *BRAF* genskih promena (pregled u

Vakiani and Solit, 2011). U rektalnim kancerima takođe, mutacije *BRAF*-a su jako retke (Kalady et al., 2009). *BRAF* mutacije se smatraju ranim događajem u karcinogenezi kolona (dešavaju se na nivou polipa) i verovatno zahtevaju dodatne genske promene za indukciju ćelijske transformacije (pregled u Pratilas et al., 2011).

Mutacije u *BRAF* genu su predominantno locirane u dva regiona kinaznog domena: petlji bogatoj glicinom (P-petlja) u egzonu 11 i aktivacionom segmentu u egzonu 15 (Slika 12). Međutim, substitucija valina u kodonu 600 egzona 15 glutamatskom kiselinom (p.V600E) čini oko 90% svih *BRAF missense* mutacija (oko 65 poznatih) koje se javljaju u humanim malignitetima (Davies et al., 2002; Kumar et al., 2003; Roskoski et al., 2010). Strukturna analiza pretpostavlja da p.V600E mutacija onemogućava inhibitornu interakciju između P-petlje i aktivacionog segmenta, što vodi konstitutivnoj kinaznoj aktivaciji BRAF-a (Wan et al., 2004). Mutacija uvodi negativno naelektrisanu AK-u u aktivacioni segment što favorizuje aktivnu konformaciju proteina. Do 2004. godine smatralo se da se ova mutacija nalazi na kodonu 599 usled greške u sekvenciranju (Wellbrock et al., 2004). Pored ove substitucije na istoj poziciji se mogu nekada naći i sledeće promene: p.V600A, p.V600D, p.V600G, p.V600K, p.V600M i p.V600R (pregled u Mercer and Pritchard, 2003).



Slika 12. Šematski prikaz domena BRAF proteina i pozicija aminokiselinskih izmena asociranih sa kancerima (modifikovano prema Wan et al., 2004).

#### 1.4.2.1 *BRAF* MUTACIONI STATUS KAO PROGNOŠTIČKI I PREDIKTIVNI MARKER

Rezultati različitih studija sprovedenih do sada pokazuju da je mutirani *BRAF* marker lošije prognoze. Neki autori su utvrdili značajnu asocijaciju mutacija u *BRAF*-u sa kolorektalnim tumorima koji se javljaju na desnoj strani (eng. *right-sided*), starijom starosnom dobi (>60 godina), višim gradusom, ženskim polom i MSI-H tumorima (Roth et al., 2010; Sanchez et al., 2009). Asocijacija *BRAF* p.V600E mutacije sa lošim kliničkim ishodom pacijenata (značajno smanjenim PFS i OS) je takođe primećena bez obzira na vrstu terapije, naročito kod MSI-S tumora stadijuma II-IV (Roth et al., 2010; Samowitz et al., 2005).

Uz retke izuzetke, *BRAF* p.V600E i *KRAS* mutacije su isključive (eng. *mutually exclusive*) u CRC-u, što se dugo smatralo znakom funkcionalne redundantnosti (Popovici et al., 2012). Činjenica da se navedene mutacije ne javljaju zajedno u istim histološkim tipovima CRC-a sugerise da ove genske promene aktiviraju zajednički set nizvodnih efektorskih molekula koji utiču na transformaciju ćelije (pregled u Vakiani and Solit, 2011). Pokazana je i prilična razlika u prognozi pacijenata sa *KRAS* i *BRAF* mutiranim mCRC-om, sa jasno lošijom prognozom bolesti kod *BRAF* mutanata (Roth et al., 2010). Smatra se da kod njih to može biti posledica višeg nivoa aktivacije MAPK (pregled u Pratilas et al., 2011). Za razliku od većine *KRAS* mutiranih CRC-a, *BRAF* mutirani mCRC-i nemaju dobar odgovor ni na jednu trenutnu hemioterapiju, i ishod tih pacijenata je sličan onome netretiranih pacijenata (Popovici et al., 2012).

Kada je u pitanju EGFR-ciljana terapija antitelima, smatralo se da je *BRAF* mutacioni status pre prognostički nego prediktivni marker odgovora na cetuksimab u pogledu PFS-a i OS-a (Tol et al., 2009). Ipak, neke od studija pokazuju da je wt*BRAF* genotip neophodan za odgovor na cetuksimab i panitumumab, bilo u mono- ili kombinovanoj terapiji (Di Nicolantonio et al., 2008; Loupakis et al., 2009). Pacijenti sa mutiranim statusom ovog gena imaju kraći PFS i OS. Štaviše, na osnovu meta-analize Mao-a i saradnika, u neselektovanoj grupi pacijenata sa mCRC-om utvrđeno je da nema asocijacije *BRAF* p.V600E mutacije sa nedostatkom odgovora na EGFR-ciljanu terapiju antitelima, dok u selektovanoj grupi (samo wt *KRAS* pacijenti) ova mutacija ima negativan efekat na terapijski odgovor (Mao et al., 2011).

*BRAF* genotipizacija nije još uvek uvrštena u standardnu, obaveznu kliničku praksu kako u svetu, tako ni u Srbiji. Na osnovu rezultata studija koje su sprovedene do sada, kao i na osnovu NCCN (eng. *National Comprehensive Cancer Network* - NCCN) preporuka, *BRAF* p.V600E mutacija bi mogla da bude jedan od dodatnih molekularnih biomarkera kod wt *KRAS* pacijenata sa mCRC-om (NCCN Guidelines<sup>®</sup>). Određivanje mutacionog statusa ovog gena bi u mnogome doprinelo boljoj selekciji pacijenata za EGFR-ciljanu terapiju.



## 2. CILJ RADA

S obzirom na nedovoljno objašnjenu povezanost mutacija *KRAS* i *BRAF* gena sa kliničko-histopatološkim karakteristikama karcinoma kolorektuma (stadijum bolesti, primarna lokalizacija, histološki gradus, veličina tumora, zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova, prisustvo inicijalnih metastaza) i karakteristikama bolesnika sa ovim karcinomom (starosna dob, pol, performans status), kao i na povezanost pomenutih potencijalnih biomarkera sa adjuvantnom hemioterapijom i EGFR-ciljanom terapijom, ciljevi doktorske disertacije bili su:

- Utvrđivanje prisustva, učestalosti i tipa *KRAS* mutacija (deset najčešćih mutacija u egzonima 12 i 13) kod pacijenata sa kolorektalnim kancerom u populaciji Srbije.
- Ispitivanje povezanosti prisustva i tipa *KRAS* mutacija sa kliničko-histopatološkim karakteristikama karcinoma kolorektuma i karakteristikama bolesnika.
- Utvrđivanje prisustva i učestalosti *BRAF* p.V600E mutacije kod podgrupe bolesnika sa kolorektalnim kancerom koji imaju wt *KRAS* status.
- Ispitivanje povezanosti prisustva *BRAF* p.V600E mutacije sa kliničko-histopatološkim karakteristikama karcinoma kolorektuma i karakteristikama bolesnika.
- Ispitivanje kliničke upotrebljivosti *KRAS* i *BRAF* p.V600E mutacija kao mogućih prediktivnih biomarkera adjuvantne terapije. Prediktivni značaj je procenjivan kroz povezanost mutacija sa dužinom preživljavanja do pojave metastaza (TTM).
- Ispitivanje prediktivnog značaja *BRAF* p.V600E mutacije kod podgrupe pacijenata sa wt *KRAS* statusom u odgovoru na specifičnu EGFR-ciljanu terapiju kolorektalnog karcinoma.
- Procena adekvatnosti ispitivanih markera za subgrupisanje bolesnika sa kolorektalnim karcinomom.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1 UZORCI

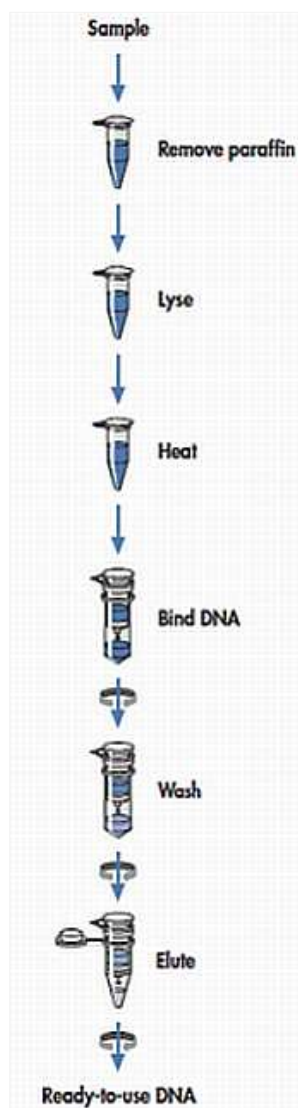
U radu su korišćeni formalinom fiksirani i parafinom ukalupljeni (eng. *Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded* - FFPE) uzorci tkiva kolona i rektuma 188 pacijenata obolelih od kolorektalnog kancera. Karakteristike bolesnika i kliničko-histopatološke karakteristike tumora date su u Tabeli 1.

Tabela 1. Karakteristike bolesnika i kliničko-histopatološke karakteristike karcinoma kolorektuma.

Karakteristike	Broj bolesnika (n=188)	Karakteristike	Broj bolesnika (n=188)
<b>Pol</b>		<b>M kategorija</b>	
muški	117	M0	89
ženski	71	M1	99
<b>Starost (godine)</b>		<b>T kategorija</b>	
opseg	27-80	T2	9
medijana	60	T3	98
prosečna starost	58,5	T4	37
nije određen	2	nije određen	44
<b>Performans status</b>		<b>N kategorija</b>	
0	57	N0	21
1	106	N1	52
2	9	N2	66
nije određen	16	nije određen	49
<b>Histološki tip/ Primarna lokacija</b>		<b>Dukes</b>	
kolon	95	B	11
rektum	80	C	58
rektosigmoidni prelaz	12	D	91
nije određen	1	nije određen	28
<b>Gradus</b>			
G1	25		
G2	108		
G3	12		
nije određen	43		

Parafinski kalupi tkiva su sečeni mikrotomom na ljustice debljine oko 30  $\mu\text{m}$  na odeljenju Patologije Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije. U zavisnosti od početne količine tumorskog tkiva, jedna do šest ljustica je stavljana u ependorficu i čuvana na temperaturi od + 4°C do izolacije DNK.

### 3.2 IZOLOVANJE DNK IZ KALUPA QIAamp<sup>®</sup> DNA FFPE TISSUE KIT-om



*QIAamp<sup>®</sup> DNA FFPE Tissue Kit* (QIAGEN, UK) omogućava efikasnu izolaciju DNK iz parafinskih kalupa (šematski prikaz procedure na Slici 13). Ovom procedurom najpre se uklanja parafin iz pojedinačnog uzorka korišćenjem ksilola. Zatim se liziranje ćelija odvija u denaturišućim uslovima (inkubacijom uzoraka na 56°C) korišćenjem proteinaze K i *ATL* pufera. Zaostali tragovi parafina se dalje uklanjaju inkubacijom uzoraka na 90°C pri čemu dolazi i do parcijalnog uklanjanja formaldehidnih promena nukleinskih kiselina. Nakon ovog koraka, DNK se vezuje za silika membranu afinitetnih kolonika. Ispiranje uzoraka *AW1* i *AW2* puferima kroz ovaj tip membrane omogućava selektivno vezivanje samo DNK molekula na njenu površinu, dok se nečistoće sakupljaju na dnu ependorfice i odbacuju se. Odvajanje DNK od površine silika membrane postiže se elucijom sa *ATE* puferom.

Pre nego što se započne sa procedurom, neophodno je puferu pripremiti prema uputstvu proizvođača i ekvilibrisati na sobnoj temperaturi.

Slika 13. Šematski prikaz procedure izolacije DNK *QIAamp<sup>®</sup> DNA FFPE Tissue Kit*-om (preuzeto iz *QIAamp<sup>®</sup> DNA FFPE Tissue Handbook*, 2010).

## Procedura:

- Parafinske uzorke isečene na tanke ljustice staviti u ependorfice od 2 mL. Potom dodati 1 mL ksilola. Zatvoriti ependorficu i vorteksovati snažno 10 sekundi.
- Centrifugirati na maksimalnoj brzini 2 minuta na sobnoj temperaturi. Pipetom ukloniti supernatant.
- Dodati 1 mL etanola (96-100%) na talog i vorteksovati. Etanol uklanja zaostali ksilol iz uzorka.
- Centrifugirati na maksimalnoj brzini 2 minuta na sobnoj temperaturi. Pipetom ukloniti supernatant.
- Otvoriti ependorficu i inkubirati na sobnoj temperaturi (15-25°C) 10 minuta ili do potpunog isparenja etanola.
- Resuspendovati talog u 180 µL *ATL* pufera. Dodati 20 µL proteinaze K i vorteksovati.
- Inkubirati na 56°C sat vremena (ili do kompletne lize uzorka).
- Inkubirati na 90°C jedan sat. Ovaj korak osim kompletne lize ćelija, omogućava i raskidanje formaldehidnih promena nukleinskih kiselina, koje su posledica čuvanja uzorka u parafinu.
- Dodati 200 µL *AL* pufera u uzorak, vorteksovati. Potom, dodati 200 µL etanola (96-100%), vorteksovati.
- Pažljivo preneti ceo lizat na *QIAamp*® *MinElute* kolonicu, bez kvašenja oboda, zatvoriti poklopac i centrifugirati 1 minut na 6000 *x g*. Prebaciti *QIAamp*® *MinElute* kolonicu u čistu ependorficu od 2 mL, a eluat odbaciti. Ukoliko lizat nije potpuno prošao kroz membranu kolonice nakon centrifugiranja, ponoviti ovaj korak na većoj brzini centrifugiranja dok se kolonica ne isprazni.
- Dodati 500 µL *AW1* pufera u *QIAamp*® *MinElute* kolonicu, bez kvašenja oboda i centrifugirati 1 minut na 6000 *x g*. Prebaciti *QIAamp*® *MinElute* kolonicu u čistu ependorficu od 2 mL, a eluat odbaciti. Poželjno je izbegavati kontakt između kolonice i eluata.
- Dodati 500 µL *AW2* pufera u *QIAamp*® *MinElute* kolonicu, bez kvašenja oboda i centrifugirati 1 minut na 6000 *x g*. Prebaciti *QIAamp*® *MinElute* kolonicu u

čistu ependorficu od 2 mL, a eluat odbaciti.

- Centrifugirati 3 minuta na 20000  $x$  g dok se membrana ne osuši. Ovaj korak je neophodan pošto prisustvo etanola može uticati na dalje korake izolacije.
- Staviti *QIAamp*® *MinElute* kolonicu u čistu ependorficu od 1,5 mL. U *QIAamp*® *MinElute* kolonicu dodati 20 - 100  $\mu$ L ATE pufera na centar membrane. Zapreminu odrediti u zavisnosti od potreba daljih metoda (u ovom radu korišćena je zapremina od 50  $\mu$ L ATE pufera).
- Zatvoriti poklopac i inkubirati na sobnoj temperaturi 1 minut. Centrifugirati 1 minut na 20000  $x$  g. Na ovaj način vrši se elucija DNK sa kolonice u ependorficu.

### 3.3 SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE DNK

Spektrofotometrijskom metodom se može odrediti količina i čistoća izolovane DNK. Prema Lambert-Beer-ovom zakonu, frakcija upadne svetlosti koja se apsorbuje od strane nekog rastvora zavisi od koncentracije supstance u rastvoru koja apsorbuje svetlost, debljine sloja rastvora kroz koji svetlost prolazi i od hemijske prirode supstance u rastvoru. Određena supstanca apsorbuje samo deo svetlosti koja se kroz nju propušta. Zavisno od količine supstance čiju koncentraciju merimo, rastvor će apsorbovati veću ili manju količinu svetlosti određene talasne dužine, pri čemu se apsorpcija rastvarača uzima kao nulta vrednost apsorpcije.

Prinos i čistoća DNK rastvora može se odrediti merenjem apsorbance ( $A$ ) na 260 i 280 nm na spektrofotometru (Eppendorf BioPhotometer, *Germany*). DNK ima maksimum apsorpcije na 260 nm, a proteini na 280 nm. Odnos  $R=A_{260}/A_{280}$  za čistu DNK je oko 1,8. Niži odnos od 1,6 ukazuje na značajno prisustvo proteina i drugih kontaminanata i takve uzorke treba, eventualno, dodatno prečistiti. Za proveru čistoće DNK trebalo bi izmeriti i apsorbancu na 230 i 320 nm. Na 230 nm apsorbuju ugljeni hidrati, peptidi, fenol i aromatične komponente, a na 320 nm soli, tako da je poželjno da su ove vrednosti što manje.

Koncentracija DNK se izračunava na osnovu formule:

$$C (\mu\text{g/l}) = (A_{260} \times R \times 50 \times \text{OP})/1000$$

$A_{260}$  - apsorbanca na 260 nm,

R - razblaženje (u ovom slučaju R = 100),

OP - optički put, tj. debljina kivete (1 cm),

50 ( $\mu\text{g/L}$ ) - molarni ekstincioni koeficijent dvolančane DNK na 260 nm i na optičkom putu od 1cm.

Na osnovu dobijene vrednosti koncentracije DNK izračunava se količina uzorka koja se koristi u daljim analizama.

### **Procedura:**

- Napraviti 100 puta razblaženje uzorka sa destilovanom vodom (1  $\mu\text{L}$  uzorka i 99  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$ ).
- Podesiti program na spektrofotometru na merenje dvolančane DNK (dsDNK) i kalibrisati blanko kivetom u kojoj je 100  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$ .
- Sipati u drugu kivetu 100  $\mu\text{L}$  razblaženog uzorka i očitati apsorbanca. Merenje se vrši u plastičnim kivetama za jednokratnu upotrebu.

### **3.4 LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE (*Polymerase Chain Reaction* - PCR)**

Lančana reakcija polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction* – PCR) je metoda kojom se selektivno *in vitro* amplifikuje određeni segment DNK. Zasniva se na ponovljenim procesima sinteze DNK pomoću dve suprotno orijentisane oligonukleotidne sekvence (prajmera) koje ograničavaju ciljnu sekvencu DNK i enzima termostabilne DNK polimeraze (najčešće korišćena *Taq* polimeraza). Svaki od sintetisanih ciljnih molekula DNK služi kao matrica za sintezu novih kopija ciljnih molekula. Za reakciju su takođe potrebni i dezoksiribonukleotid trifosfati (eng.

*deoxyribonucleotide triphosphate* – dNTP) i odgovarajući uslovi pufera (koncentracija  $Mg^{2+}$  jona) u kojem se reakcija odigrava. PCR se odvija u sukcesivnim koracima denaturacije, hibridizacije prajmera i elongacije. Naime, tokom denaturacije raskidaju se vodonične veze između komplementarnih lanaca DNK pod uticajem visoke temperature i lanci se razdvajaju, omogućavajući korišćenje jednolančane DNK (ssDNK) kao matrice za dalju amplifikaciju. U koraku hibridizacije prajmeri se komplementarno vezuju za jednolančanu matricu. DNK polimeraza u sledećem koraku elongacije sintetisuje deo DNK ograničen prajmerima po principu komplementarnosti na osnovu sekvence matrice. Ova tri koraka čine jedan ciklus PCR-a. Fragmenti DNK sintetisani u prethodnom ciklusu PCR-a služe kao matrica za DNK sintezu u sledećem ciklusu. Nakon svakog ciklusa broj produkata se duplira, tako da u reakciji dolazi do eksponencijalnog umnožavanja željenog dela DNK. Nakon poslednjeg ciklusa sledi finalna elongacija da bi se završila sinteza parcijalno amplifikovanih produkata.

Za izvođenje PCR-a korišćen je *AmpliTaq Gold PCR Master Mix* (Applied Biosystems, USA) koji sadrži dNTP-ove, *AmpliTaq Gold* DNK polimerazu i pufer optimalne jonske jačine za rad polimeraze (Tabela 2). Komponente su prisutne u dvostrukoj koncentraciji. Sekvence prajmera za *BRAF* gen (koje ograničavaju egzon 15 u kome se nalazi mutacija p.V600E) u PCR reakcionoj smeši, kao i dužina dobijenog amplifikata date su u Tabeli 3. Korišćeni prajmeri su firme Eurofins MWG operon (*Germany*), a PCR aparat Mastercycler gradient (Eppendorf, *Germany*).

Tabela 2. Spisak supstanci korišćenih za PCR, potrebna finalna koncentracija i zapremina koja je dodata u reakcionu smešu.

KOMPONENTE	FINALNO	ZAPREMINA ( $\mu$ L)
<i>AmpliTaq Gold PCR Master Mix</i>	1x	<b>10</b>
<b>Uzvodni prajmer (S)</b>	4 pmol (200 nM)	<b>1</b>
<b>Nizvodni prajmer (AS)</b>	4 pmol (200 nM)	<b>1</b>
<b>Genomska DNK</b>	200 ng	<b>x <math>\mu</math>L *</b>
<b>Voda</b>		<b>x <math>\mu</math>L **</b>
<b>Ukupna zapremina</b>		<b>20 <math>\mu</math>L</b>

\* Zapremina rastvora genomske DNK koja je potrebna za reakciju određuje se na osnovu izmerene koncentracije izolovane DNK

\*\* Voda se dodaje u odgovarajućoj zapremini tako da ukupna zapremina reakcione smeše bude 20 µL

Tabela 3. Sekvence *BRAF* prajmera u PCR reakcionoj smeši i dužina dobijenog amplifikata.

<i>BRAF</i> prajmeri	Sekvenca prajmera (5'-3')	Dužina amplifikata
<i>BRAF S</i>	5'CTCTTCATAATGCTTGCTCTGATAGG3'	250 bp
<i>BRAF AS</i>	5'TAGTAACTCAGCAGCATCTCAGG3'	

Temperaturni i vremenski profil PCR reakcije:

inicijalna denaturacija: 95°C/10 min

45 ciklusa: 95°C/10 s, *touchdown*\* 64° -54 °C /10 s (1°C/ciklusu), 72°C/20 s

hlađenje: 4°C/∞

\*temperatura hibridizacije je niža za 1°C u svakom narednom ciklusu – *touchdown PCR*

PCR-om su umnožavani kontrolni uzorci za *BRAF* p.V600E mutaciju, kolorektalna ćelijska linija LS174 (wt kontrola) i pacijent nosilac *BRAF* p.V600E mutacije (pozitivna heterozigotna kontrola), kao i uzorci za koje se analizom krive topljenja (poglavlje 3.8) smatralo da su mutirani ili izmenjeni. Dobijeni PCR produkti su dalje proveravani na agaroznom gelu (poglavlje 3.5) i analizirani metodom sekvenciranja (poglavlje 3.9).

### 3.5 ELEKTROFOREZA NA AGAROZNOM GELU

Provera uspešnosti i kvaliteta PCR-a vrši se elektroforezom na agaroznom gelu sa 0,5 µg/mL etidijum bromida u 0,5xTBE (Tris, Borna kiselina i EDTA) puferu. PCR



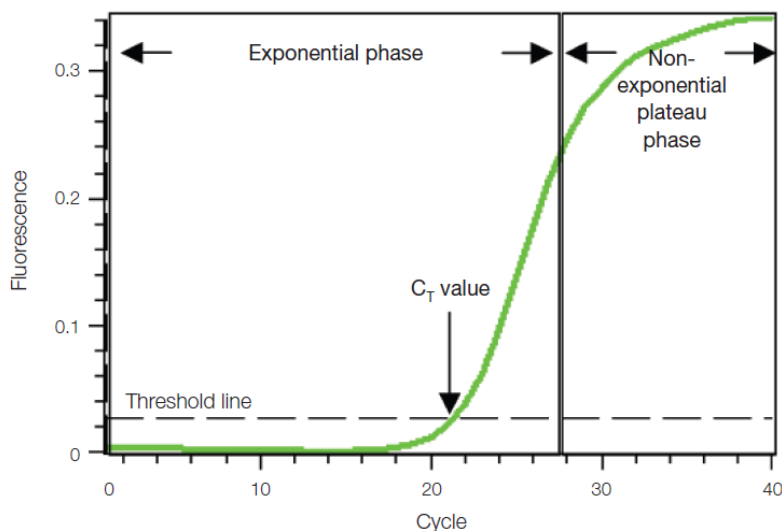
produkti (6  $\mu\text{L}$ ) se mešaju sa bojom (1,5  $\mu\text{L}$ ) i nanose u bunariće gela (aparatura GNA 100, PHARMACIA BIOTECH, *Sweden*). Boja se sastoji od 6 x ksilencijanola (0,25%) u 30% glicerolu u vodi. Elektroforeza traje 25 minuta pri jačini struje od 25 mA. Razdvojene fragmente DNK u gelu po završenoj elektroforezi posmatrati na UV transiluminatoru (MacroVue UV-25, HOEFER, *USA*). Etidijum bromid koji je interkaliran između baza u lancu DNK molekula fluorescira narandžasto-crveno kada se osvetli UV svetlošću i tako omogućava vizuelizaciju produkata PCR reakcije. Intenzitet fluorescentnih traka je proporcionalan količini i veličini fragmenata DNK. Fragmenti DNK putuju različitom brzinom zavisno od svoje dužine, tako da će kraći fragmenti putovati brže kroz gel, dok će duži zaostajati. Poređenjem brzine kretanja PCR produkta sa brzinom kretanja fragmenata DNK poznate veličine (standarda za dužinu - markera DNK) moguće je odrediti njegovu veličinu. Uspešnost PCR-a sa *BRAF* prajmerima smo proveravali na 2% agaroznom gelu.

### **3.6 LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE U REALNOM VREMENU (*real-time* PCR)**

Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (eng. *real-time Polymerase Chain Reaction* – *real-time* PCR) je metoda koja kombinuje konvencionalnu PCR amplifikaciju i fluorimetriju. Metoda je nastala sredinom devedesetih godina prošlog veka i omogućava praćenje PCR reakcije iz ciklusa u ciklus. Detekcija PCR produkata u realnom vremenu je moguća zahvaljujući fluorescentnim molekulima koji u reakciji prate povećanje količine DNK tako što proporcionalno povećavaju fluorescentni signal. Fluorescentna hemija koja se koristi u ove svrhe uključuje (1) boje koje se specifično vezuju za dvolančanu DNK i (2) specifične probe i prajmere obeležene fluorescentnim bojama. Specijalizovani aparati opremljeni detektorima fluorescencije se koriste za njeno praćenje kroz cikluse amplifikacije (u ovom radu korišćen ABI PRISM<sup>®</sup> 7500 PCR instrument, Applied Biosystems, *USA*). Rezultati *real-time* PCR-a mogu biti kvalitativni (prisustvo ili odsustvo sekvence) ili kvantitativni (broj kopija DNK). *Real-time* tehnologija danas ima široku primenu kako za kvantifikaciju genske ekspresije, tako i za detekciju mutacija i polimorfizama.

### 3.6.1 PRINCIP METODE REAL-TIME PCR-a

Princip metode *real-time* PCR-a zasniva se na kontinualnom praćenju porasta fluorescencije kroz cikluse a koja je proporcionalna umnoženom PCR fragmentu. Kao rezultat umnožavanja dobija se grafik (eng. *amplification plot*) sa amplifikacionom krivom (Slika 14).



Slika 14. Grafik amplifikacije (preuzeto iz Real-Time PCR Applications guide, Bio-Rad, 2006).

Na ovom grafiku broj ciklusa PCR-a je prikazan na x osi, a fluorescencija iz reakcije umnožavanja na y osi. Zapažaju se dve faze, eksponencijalna faza praćena plato fazom. Tokom eksponencijalne faze količina PCR produkta se približno udvostručava u svakom ciklusu. Međutim, kako reakcija napreduje komponente u reakciji se troše i neke od njih postaju ograničavajuće. Tada reakcija usporava i ulazi u plato fazu (ciklus 28-40). U inicijalnim ciklusima (ciklusi 1-18) fluorescencija ostaje na "bazalnom/pozadinskom" (eng. *background*) nivou i njeno povećanje se ne detektuje, iako se produkti reakcije eksponencijalno nakupljaju. U jednom trenutku dovoljno umnoženog produkta se nakupi da proizvede detektabilan fluorescentni signal. Ciklus u kome se ovo dešava se naziva granični (eng. *threshold*) ciklus, C<sub>t</sub>. C<sub>t</sub> vrednost je određena količinom početne matrice i ukoliko je njena količina mala više ciklusa umnožavanja će biti potrebno da fluorescentni signal pređe bazalni nivo (i sama reakcija će imati viši C<sub>t</sub>). Ovaj odnos čini osnovu kvantitativnog aspekta *real-time* PCR-a.

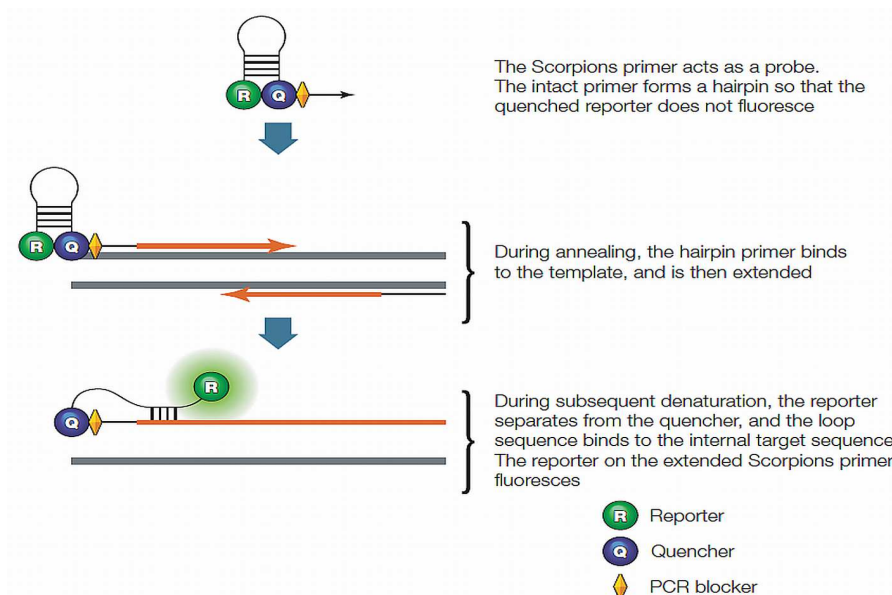
### 3.6.2 DETEKCIJA MUTACIJA U KRAS GENU THERASCREEN KRAS PCR KIT-om

Detekcija prisustva sedam najčešćih mutacija u *KRAS* genu i utvrđivanje njihovog tipa urađeni su *therascreen KRAS PCR Kit-om* (QIAGEN, UK). Ovaj test je dijagnostički validiran (eng. *CE-marked*) u skladu sa direktivom Evropske Unije (eng. European Union *in vitro* Diagnostic (IVD) Medical Device Directive 98/79/EC). Metoda je visoko selektivna i u zavisnosti od ukupne količine DNK može detektovati i 1% mutiranih alela u wt genomskoj DNK. Pri tome, dizajnirana je tako da se detektuje samo jedna mutacija po uzorku. Test predstavlja PCR esej u realnom vremenu i zasnovan je na tehnologiji alel-specifičnog PCR-a, ARMS (eng. *Amplification Refractory Mutation System* – ARMS), u kombinaciji sa molekulima „hvatačima“ (eng. *Scorpions*).

Najčešća primena ARMS metode jeste za detekciju tačkastih mutacija. *Taq* DNK polimeraza ima veliku sposobnost razlikovanja potpunog (eng. *match*) od nepotpunog (eng. *mismatch*) vezivanja 3' kraja PCR prajmera za matricu. Specifične sekvence koje nose mutaciju mogu biti selektivno umnožene čak i u uzorcima gde je većina sekvenci bez mutacije. Kada se prajmer potpuno poklapa sa sekvencom, amplifikacija se odvija krajnje efikasno. Ukoliko je 3' baza prajmera pogrešno sparena, dolazi samo do niskog nivoa *background* amplifikacije.

Molekularni škorpioni su bifunkcionalni molekuli koji se sastoje od PCR prajmera kovalentno vezanog za dvostruko obeleženu fluorescentnu probu koja ima strukturu petlje (eng. *stem-loop*) (Slika 15). Sekvenca petlje je komplementarna delu ciljne sekvence koja se amplifikuje na istom lancu. Reporterska fluorofora (eng. *reporter*) koja se nalazi na 5' kraju probe interaguje sa „utišavačem“ (eng. *quencher*) na 3' kraju, koji smanjuje fluorescenciju. Škorpion molekul takođe sadrži i PCR bloker, odmah do 3' kraja *quencher*-a, koji sprečava čitanje sekvence same probe tokom elongacije naspramnog lanca. Tokom prvog ciklusa amplifikacije dolazi do vezivanja (eng. *annealing*) i elongacije škorpion prajmera i nastanka sekvence komplementarne sekvenci petlje na istom lancu. Zatim, u koraku denaturacije dolazi i do raskidanja veza u samoj petlji probe i ona hibridizuje sa komplementarnim delom ciljne sekvence, pri čemu se reporterski molekul odvajava od *quencher*-a. Tom prilikom on počinje da

fluorescira jače, a rezultujući fluorescentni signal je proporcionalan količini amplifikovanog produkta u uzorku.



Slika 15. Molekularni škorpioni (preuzeto iz Real-Time PCR Applications guide, Bio-Rad, 2006).

*Therascreen KRAS PCR Kit* obuhvata panel od 8 eseja: jedan kontrolni i sedam eseja kojima se detektuju mutacije u kodonima 12 i 13 egzona 2 *KRAS* gena. Spisak mutacija je prikazan u Tabeli 4.

Tabela 4. Pregled *KRAS* mutacija koje se detektuju *therascreen Kit*-om.

Kodon	AK promena	Nukleotidna promena
12	Gly12Asp	GGT>GAT
12	Gly12Val	GGT>GTT
12	Gly12Ala	GGT>GCT
12	Gly12Cys	GGT>TGT
12	Gly12Ser	GGT>AGT
12	Gly12Arg	GGT>CGT
13	Gly13Asp	GGC>GAC

Reakcione smeše sadrže standardni PCR pufer, dNTP-ove, magnezijum hlorid  $MgCl_2$ , oligonukleotide i sterilnu vodu. Takođe, svaka smeša sadrži i škorpion za **egzogeni kontrolu** (unutrašnja kontrola) obeležen HEX bojom (detektuje se JOE detektorom na aparatu). Škorpion za **kontrolni esej** je obeležen FAM fluoroforom i koristi se za određivanje ukupne DNK u uzorku. U ovom eseju amplifikuje se region egzona 4 *KRAS* gena i trebalo bi da se umnoži u svakom uzorku. Prajmeri i probe su dizajnirani tako da ne „hvataju” ni jedan poznati polimorfizam *KRAS* gena. Svaki **mutacioni esej** je obeležen FAM fluoroforom i sadrži jedan škorpion i jedan ARMS prajmer, za razlikovanje wt od mutirane DNK. Ukoliko je uzorak wt, kao rezultat javiće se samo amplifikaciona kriva koja potiče od kontrolnog eseja, dok u mutacionim esejima neće biti umnožavanja. Kada uzorak nosi jednu od mutacija u *KRAS* genu javiće se dve amplifikacione krive, jedna koja potiče od kontrolnog i druga koja potiče od specifičnog mutacionog eseja. Za svaki uzorak jedan kontrolni i sedam mutacionih eseja je pripremljeno i naneseo na optičku ploču sa 96 bunara (eng. *96-well plate*) prikazan na Slici 16. Zapremina svake reakcije je bila 25  $\mu L$ : 19,8  $\mu L$  reakcionog miksa, 0,2  $\mu L$  *Taq* polimeraze i 5  $\mu L$  razblaženog uzorka DNK (koncentracija DNK: 200 ng/ $\mu L$ ). Uporedo sa uzorcima analiziraju se i standard kontrola (STD - smeša DNK koja se dobija u kit-u i služi kao pozitivna kontrola za sve eseje) i sterilna voda kao NTC kontrola (eng. *Non-Template Control*). NTC predstavlja negativnu kontrolu za sve eseje i može ukazati na njihovu eventualnu kontaminaciju.

96 well layout												
Assay	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A Control	STD	NTC	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10
B I2ALA	STD	NTC	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10
C I2ASP	STD	NTC	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10
D I2ARG	STD	NTC	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10
E I2CYS	STD	NTC	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10
F I2SER	STD	NTC	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10
G I2VAL	STD	NTC	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10
H I3ASP	STD	NTC	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10

Slika 16. Šematski prikaz *plate*-a (preuzeto iz thescreen *KRAS* PCR Kit Handbook, 2010).

Temperaturni i vremenski profil PCR reakcije dati su u Tabeli 5. Za podešavanje uslova PCR-a i analizu rezultata koristi se *7500 System Software* koji ide uz aparat.

Tabela 5. Temperaturni i vremenski profil PCR reakcije.

Temperatura	Vreme	Ciklusi	Detekcija fluorescencije
<b>Inicijalna denaturacija</b>			
95°C	4 min	1	
<b>Amplifikacija</b>			
95°C	30 s		
60°C	1 min	40	FAM, JOE

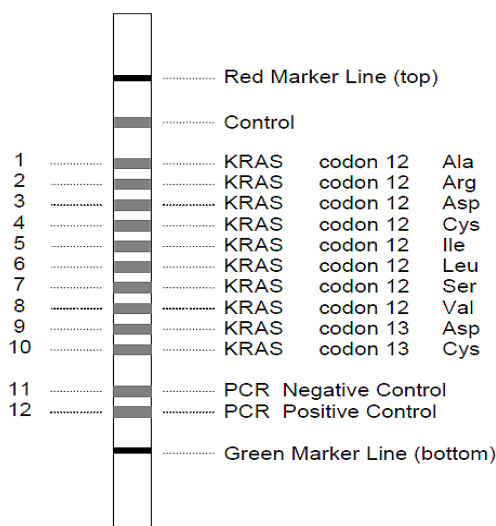
Nakon amplifikacije, za svaki uzorak, prisustvo mutacije se određuje računanjem  $\Delta C_t$  ( $\Delta C_t$ ) vrednosti između pozitivnog mutacionog eseja i kontrolnog eseja prema sledećoj formuli:

$$\Delta C_t = [\text{mutacioni } C_t \text{ uzorka}] - [\text{kontrolni } C_t \text{ uzorka}]$$

Mutacija se smatra prisutnom kada je detektovana  $\Delta C_t$  vrednost manja od datih 1% „graničnih” (eng. *cut-off*) vrednosti u kit-u. Pri tome, u NTC kontroli ne bi smelo da ima amplifikacije ni za jedan esej, a standard bi trebalo da ima  $C_t$  vrednost za kontrolni esej od 26-29. Takođe, ukoliko uzorak ima  $C_t$  vrednost za kontrolni esej  $\geq 29$  kit nije u stanju da detektuje do 1% mutacija, ali još uvek je moguće detektovati mutaciju prisutnu u većem procentu. Ako je ova vrednost pak  $\geq 38$ , smatra se da nije bilo dovoljno DNK i taj uzorak treba ponoviti. Takođe,  $C_t \geq 38$  za mutacioni esej se treba smatrati kao negativan rezultat (nepostojanje mutacije u uzorku) ili ispod nivoa detekcije ovog kit-a.

### 3.7 DETEKCIJA MUTACIJA U *KRAS* GENU *KRAS STRIPASSAY*<sup>TM</sup>-om

*KRAS StripAssay*<sup>TM</sup> (ViennaLab Diagnostics GmbH, Austria) je klinički validirana (CE-IVD) metoda za detekciju mutacija u *KRAS* genu. Bazira se na PCR reakciji (koristi prajmere obeležene biotinom) praćenju **reverznom hibridizacijom** amplifikovanih produkata na test tračice (eng. *teststrip*) sa imobilizovanim alel-



specifičnim probama u paralelnom nizu. Vezani amplifikati koji sadrže biotin se zatim detektuju streptavidin-alkalnom fosfatazom i obojenim supstratom. Esej pokriva deset mutacija u egzonima 12 i 13 *KRAS* gena. Mutirane alele je moguće detektovati čak i kada su prisutni u 1% u uzorku. Pored traka za mutacije, na *teststrip*-u se nalaze i trake koje označavaju markere za orijentaciju samog *teststrip*-a, kao i kontrolne trake (Slika 17).

Slika 17. Izgled *teststrip*-a sa spiskom mutacija u *KRAS* genu koje se detektuju *KRAS StripAssay*<sup>TM</sup>-om (preuzeto iz *KRAS StripAssay*<sup>TM</sup> Handbook, 2009).

Esej se sastoji iz dva koraka: (1) *In Vitro* amplifikacije (PCR) i (2) reverzne hibridizacije.

#### 3.7.1 *In Vitro* AMPLIFIKACIJA (PCR)

Pre početka PCR-a napravljeno je radno razblaženje *Taq* DNK polimeraze u *Taq Dilution* puferu (1:25, finalna koncentracija 0,2 U/ $\mu$ L) prema uputstvu proizvođača. Takođe, za svaki uzorak potrebno je podesiti koncentraciju DNK sa sterilnom vodom na 10 ng/ $\mu$ L. Svi koraci PCR-a izvođeni su na ledu (0-4°C). Za svaki uzorak napravljena je reakciona smeša koja se sastojala od: 15  $\mu$ L *Amplification Mix*-a, 5  $\mu$ L (1U) prethodno razblažene *Taq* DNK polimeraze i 5  $\mu$ L prethodno napravljenog razblaženja DNK

matrice. Kao proveru eventualne kontaminacije reakcije, uporedo sa uzorcima pravi se i kontrola u koju se umesto DNK dodaje sterilna voda. PCR aparat koji je korišćen za ovu reakciju je bio Mastercycler gradient (Eppendorf, *Germany*).

Vremenski i temperaturni profil PCR reakcije izgledao je ovako:

inicijalna denaturacija: 94°C/2 min

35 ciklusa: 94°C/1 min, 70°C/50 s, 56°C/50 s, 60°C/1 min

finalna elongacija: 60°C/3 min.

Provera uspešnosti i kvaliteta PCR-a vrši se elektroforezom na 3% agaroznom gelu. Nakon PCR amplifikacije u ovom eseju na gelu se mogu zapaziti fragmenti dužine 151 i/ili 204 bp.

### 3.7.2 REVERZNA HIBRIDIZACIJA

Pre početka ovog koraka potrebno je podesiti vodeno kupatilo na temperaturu od 45°C ( $\pm 0,5^\circ\text{C}$ ) i zagrejati *Hybridization Buffer* i *Wash Solution A* da bi se rastvorili nastali precipitanti. Ostatak kit-a ostaviti malo na sobnoj temperaturi. Obeležiti *teststrip*-ove za svaki uzorak pojedinačno grafitnom olovkom izvan linije za marker.

#### **Procedura:**

##### **1) Korak hibridizacije**

- Sipati po 10  $\mu\text{L}$  *DNAT*-a u donji ugao svakog kanala koji će se koristiti na kadici (eng. *Typing tray*). Dodati 10  $\mu\text{L}$  PCR produkta na isto mesto u odgovarajućem kanalu (rastvor će ostati plave boje). Ostaviti na sobnoj temperaturi 5 minuta.
- Dodati 1 mL *Hybridization Buffer*-a u svaki kanal. Blago promešati ljuljanjem kadice (plava boja će nestati).
- Uroniti potpuno *teststrip*-ove u odgovarajuće kanale i inkubirati 30 minuta na 45°C u vodenom kupatilu sa blagim ljuljanjem (oko 50 rpm-a).



- Ukloniti *Hybridization Buffer* odmah nakon isteka inkubacije. Ne dozvoliti da se *teststrip*-ovi potpuno osuše tokom procedure.

## 2) Korak ispiranja (45°C)

- Dodati po 1 mL *Wash Solution A*. Promešati kratko ljuljanjem kadice (10 sekundi). Ukloniti tečnost aspiriranjem.
- Dodati po 1 mL *Wash Solution A*. Inkubirati 15 minuta na 45°C u vodenom kupatilu sa blagim ljuljanjem. Ukloniti tečnost aspiriranjem.
- Dodati po 1 mL *Wash Solution A*. Inkubirati 15 minuta na 45°C u vodenom kupatilu sa blagim ljuljanjem. Ukloniti tečnost aspiriranjem.

## 3) Korak enzimske bojene reakcije (sobna temperatura)

- Dodati po 1 mL *Conjugate solution*-a (sadrži streptavidin-alkalnu fosfatazu). Inkubirati 15 minuta na sobnoj temperaturi na šejkeru. Ukloniti tečnost aspiriranjem.
- Dodati po 1 mL *Wash Solution B*. Promešati kratko ljuljanjem kadice (10 sekundi). Ukloniti tečnost aspiriranjem.
- Dodati po 1 mL *Wash Solution B*. Inkubirati 5 minuta na sobnoj temperaturi na šejkeru. Ukloniti tečnost aspiriranjem.
- Dodati po 1 mL *Wash Solution B*. Inkubirati 5 minuta na sobnoj temperaturi na šejkeru. Ukloniti tečnost aspiriranjem.
- Dodati po 1 mL *Color Developer*-a (sadrži *nitro blue tetrazolium* - NBT i *5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate* - BCIP). Inkubirati 15 minuta na sobnoj temperaturi u mraku na šejkeru. Ljubičasta boja će se pojaviti kod pozitivnih reakcija. Ne izlagati *teststrip*-ove jakom svetlu nakon razvijanja boje.
- Isprati *teststrip*-ove nekoliko puta destilovanom vodom. Ostaviti ih da se osuše u mraku na absorbujućem papiru.

Interpretacija rezultata se radi pomoću šematizovanog papira (eng. Collector<sup>TM</sup> sheet). *Teststrip*-ovi se lepe na odgovarajuća mesta na papiru i poravnaju se sa šematski nacrtanim markerima (gornji crveni i donji zeleni).

Pozitivna reakcija najviše kontrolne trake ukazuje da su *Conjugate Solution* i *Color Developer* pravilno „radili“. Ova traka uvek treba da bude pozitivna, tj. obojena.

Pozitivna reakcija PCR pozitivne kontrole ukazuje na prisustvo i adekvatan kvalitet komponenti PCR-a i DNK matrice za analizu mutacija *KRAS*-a. Ukoliko je ova kontrola negativna, ponoviti analizu počevši od izolacije DNK.

Negativna reakcija PCR negativne kontrole ukazuje na kompletnu supresiju wt *KRAS* amplifikacije. Ukoliko je ova kontrola pozitivna (npr. usled prevelike količine DNK matrice) senzitivnost eseja za detektovanje mutacija *KRAS*-a je smanjena.

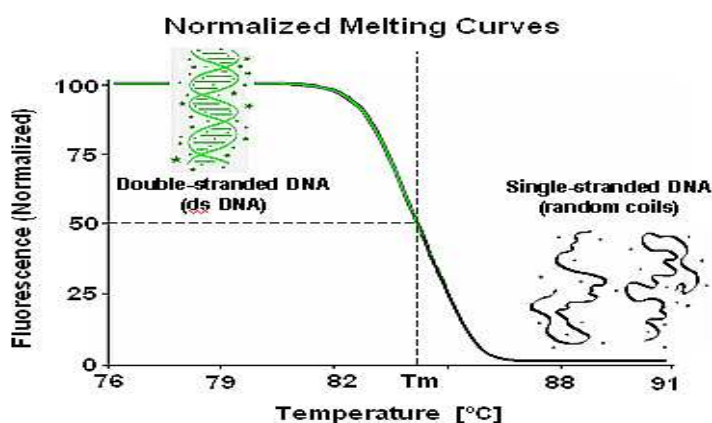
Što se prisustva mutacija u *KRAS* genu tiče, moguće je dobiti dva bojena obrasca: (1) sve probe/trake za *KRAS* negativne (nebojene), kontrole regularne kao što je gore opisano – nema prisustva *KRAS* mutacija ili (2) jedna ili više proba za *KRAS* pozitivna (obojena), kontrole regularne – specifična(e) mutacija(e) u *KRAS* genu prisutna(e).

### **3.8 ANALIZA KRIVE TOPLJENJA (*High Resolution Melting* - HRM)**

Analiza krive topljenja (eng. *High Resolution Melting* - HRM) je novija, post-PCR metoda koja omogućava analizu genskih varijacija (polimorfizama, mutacija, metilacija) u PCR produktima. HRM karakterizuje uzorke nukleinskih kiselina (NK) na osnovu njihovih kriva disocijacije/topljenja. Uzorci se mogu razlikovati na osnovu njihove sekvence, dužine, GC sastava ili komplementarnosti lanaca, čak i kada se razlikuju u samo jednoj bazi. Najznačajnija upotreba ove metode je u genskom skeniranju (eng. *Gene Scanning*), tj. utvrđivanju prisustva nepoznatih genskih varijacija u PCR amplifikatima pre sekvenciranja ili kao njegova alternativa. Varijacije u sekvencama se lako detektuju jer dovode do promene izgleda krive topljenja DNK. Aparati novije generacije kao što je LightCycler<sup>®</sup> 480 II (Roche Diagnostics GmbH, Germany), omogućavaju izvođenje *real-time* PCR-a i HRM-a na istom aparatu sukcesivno.

Pri ovoj analizi koriste se specifične, visoko saturišuće boje koje fluoresciraju samo u prisustvu dsDNK, kao što je LCGreen. Takođe, one se ne redistribuiraju ponovo u isti molekul tokom topljenja kao nesaturišuće boje, već se oslobađaju kako se lanci DNK polako razdvajaju. Ove boje se koriste i u samom procesu PCR-a. Kada se uzorak

zagreje do visokih temperatura dolazi do denaturacije DNK molekula, i intenzitet fluorescencije boje počinje da opada sa razdvajanjem lanaca DNK, što se prati krivom topljenja (Slika 18). Kako se različite sekvence DNK tope na različitim temperaturama, one se lako mogu uočiti i porediti ovim krivama. Promena fluorescencije tokom eksperimenta može se koristiti kako za merenje povećanja koncentracije DNK tokom PCR-a, tako i za praćenje njene disocijacije do jednolančanih molekula tokom narednog HRM koraka.



Slika 18. Prikaz krive topljenja. Fluorescentni signal sa promenom temperature prati promenu dsDNK do ssDNK (preuzeto sa <http://hrm.gene-quantification.info/>).

### 3.8.1 ANALIZA *BRAF* p.V600E MUTACIJE HRM-om

Utvrđivanje prisustva *BRAF* p.V600E mutacije izvedeno je na već pomenutom LightCycler<sup>®</sup> 480 II aparatu, pri čemu su sve reakcije rađene u duplikatu, sem reakcija za wt kontrolu (triplikat). Kao uzorci za analizu korišćene su samo DNK pacijenata (n=122) kojima je, prethodno opisanim metodama, utvrđen wt *KRAS* status. Uzorci su paralelno puštani na ploče sa 96 otvora sa tri kontrole pri svakoj analizi. Kontrole su prethodno sekvencirane (poglavlje 3.9) kako bi im se utvrdio *BRAF* p.V600E mutacioni status. DNK izolovana iz kolorektalne ćelijske linije LS174 je predstavljala homozigotnu wt kontrolu. Za pacijenta nosioca *BRAF* p.V600E mutacije (analiziran van naše laboratorije) je nakon sekvenciranja pokazano da je heterozigot za ovu mutaciju i

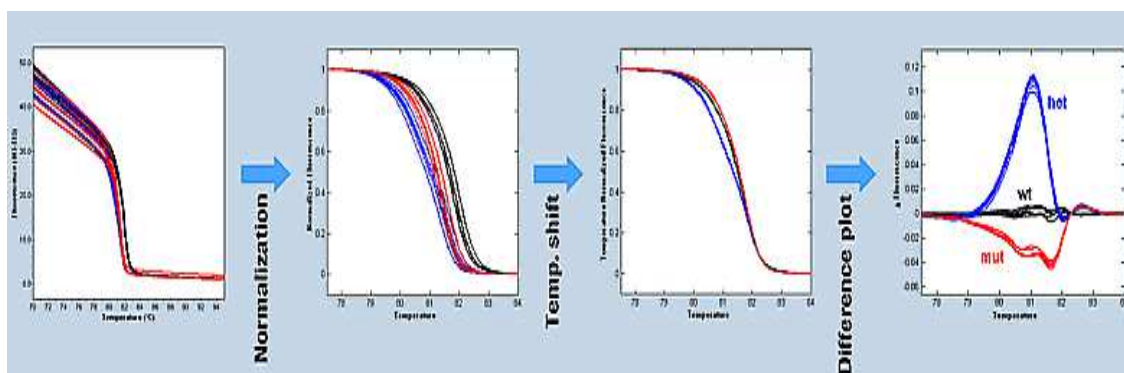
njegova DNK je korišćena kao jedna od kontrola. Kao NTC kontrola koja ukazuje na eventualnu kontaminaciju reagenasa u reakciji je korišćena sterilna voda. Prajmeri za analizu su bili isti kao za klasičan PCR (poglavlje 3.4).

Svaka reakciona smeša se sastojala od 50-100 ng DNK matrice, 200 nM prajmera (0,5 µL), 5 µL *LightCycler HRM Master Reaction Mix-a* (Roche, Germany), 3 mM MgCl<sub>2</sub> (1,2 µL) i sterilne vode do ukupne zapremine od 10 µL.

Vremenski i temperaturni profil reakcije je bio sledeći:

<b><u>PCR:</u></b>	inicijalna denaturacija: 95°C/10 min 45 ciklusa: 95°C/10 s, <i>touchdown*</i> 64°C - 54 °C /10 s (1°C/ciklusu), 72°C/20 s
<b><u>Denaturacija:</u></b>	95°C/1 min
<b><u>Hlađenje:</u></b>	40°C/1 min
<b><u>HRM:</u></b>	65°C - 95°C sa povećanjem od 1°C/s uz 25 akvizicija/°C
<b><u>Finalno hlađenje:</u></b>	40°C/10 s

Analiza kriva topljenja nakon završene reakcije se radi pomoću *Gene Scanning* softvera u tri osnovna koraka: (1) Normalizacija, (2) Temperaturno pomeranje i (3) Diferencijalni *plot* (Slika 19). U prvom koraku normalizacije svi fluorescentni signali sa početka (inicijalni, pre topljenja) i kraja reakcije (finalni, nakon topljenja) se podešavaju uniformno na skali od 0% do 100%. U drugom koraku se temperaturna osa normalizovanih kriva topljenja pomera do tačke gde su sve dsDNK kompletno denaturisane. Ovo pomeranje omogućava bolje razlikovanje heterozigotnih nosilaca neke promene od wt-ova usled razlika u izgledu njihovih kriva topljenja. Razlika u izgledu kriva topljenja se dalje analizira oduzimanjem kriva topljenja od referentne krive. Ovo pomaže automatskom grupisanju uzoraka u grupe sa sličnim krivama topljenja (npr. heterozigoti naspram homozigota).



Slika 19. *Gene Scanning* analiza: normalizacija, temperaturno pomeranje i diferencijalni *plot* (preuzeto sa <http://hrm.gene-quantification.info/>).

### 3.9 AUTOMATSKO SEKVENCIRANJE DNK

Automatsko sekvenciranje DNK metodom *cycle sequencing* zasniva se na modifikaciji metode za sekvenciranje DNK koju su razvili Sanger i saradnici 1977. godine i PCR-a. Sangerova metoda bazira se na osobini DNK polimeraze da može da inkorporira fluorescentno obojene 2',3'- dideoksi dezoksiribonukleotid trifosfate (ddNTP) na 3' kraj rastućeg DNK lanca, čime se elongacija prekida selektivno na A, C, G ili T usled odsustva 3'- hidroksilne grupe u ddNTP-ovima. PCR u automatskom sekvenciranju omogućava da se u sukcesivnim ciklusima denaturacije, hibridizacije i elongacije linearno amplifikuju ekstenzioni produkti. Rezultat reakcije je mešavina oligonukleotida različite dužine koji sadrže bojama obeležene ddNTP-ove na svojim 3' krajevima. Dobijeni obeleženi fragmenti DNK se elektroforetski razdvajaju kroz kapilaru ispunjenu separacionim matriksom. Svaka od fruorescentnih boja emituje svetlost različite talasne dužine kada se ekscitira laserom što omogućava detekciju svake od četiri baze koja je u vidu ddNTP-a ugrađena u fragment DNK.

U ovom radu su sekvencirani kontrolni uzorci za HRM analizu i uzorci koji su na HRM-u bili mutirani ili izmenjeni. Pored navedenih, uzorke za koje nismo mogli da dobijemo rezultat HRM analizom smo takođe proverili sekvenciranjem.

### 3.9.1 PRIPREMA UZORAKA ZA AUTOMATSKO SEKVENCIRANJE DNK

Priprema uzoraka za sekvenciranje podrazumeva: (1) prečišćavanje PCR produkta, (2) njegovo obeležavanje fluorescentnim bojama i (3) prečišćavanje nakon obeležavanja.

#### 1) Prečišćavanje PCR produkata korišćenjem Exo I i SAP enzima

Pre sekvenciranja, produkti PCR reakcije moraju da se prečiste od preostalih prajmera, neugrađenih nukleotida, polimeraze, soli itd. Prečišćavanje se zasniva na sposobnosti enzima egzonukleaze I (Exo I) da razgradi neugrađene prajmere i alkalne fosfataze gambora (eng. *shrimp alkaline phosphatase* - SAP) da ukloni fosfatne grupe sa dNTP-ova, ostavljajući ih u vidu nukleozida. U PCR produkt (5 µL) dodaju se enzimi Exo I (0,5 µL) i SAP (1 µL), smeša se dobro izmeša i inkubira 15 minuta na 37°C, kada enzimi svojom aktivnošću prečišćavaju uzorak. Potom se uzorak zagreje 15 minuta na 85°C da bi se enzimi inaktivirali. Ovako prečišćen uzorak spreman je za dalju pripremu za sekvenciranje.

#### 2) Reakcija obeležavanja DNK pre sekvenciranja (*cycle sequencing* reakcija)

Reakcija obeležavanja DNK pre sekvenciranja (eng. *cycle sequencing*) slična je konvencionalnom PCR-u. U toj reakciji, osim dNTP-ova koriste se i ddNTP-ovi, pri čemu je svaki od ddNTP-ova obeležen jednom od četiri fluorescentne boje koje nakon ekscitacije laserom emituju svetlost na različitim talasnim dužinama. Svi nukleotidi, *AmpliTaq* DNK polimeraza i pufer koji su potrebni za reakciju nalaze se u *BigDye Terminator Ready Reaction Kit*-u (Applied Biosystems, USA). Umesto genomske DNK koja se dodaje u klasičnu PCR reakciju, kao matrica za ovu reakciju dodaje se prečišćeni PCR produkt čiju sekvencu treba odrediti, kao i samo jedan od para prajmera koji je korišćen u PCR reakciji (u ovom radu korišćeni su prajmeri koji uokviruju *BRAF V600E* mutaciju).

Ponavljanjem ciklusa denaturacije, hibridizacije i elongacije dolazi do linearnog umnožavanja željenog DNK fragmenta. DNK polimeraza po principu komplementarnosti na određenoj poziciji nasumično ugrađuje dNTP ili ddNTP. Nakon

ugradnje ddNTP-a, usled nedostatka 3' hidroksilne grupe na njemu, onemogućena je ugradnja sledećeg nukleotida u taj molekul DNK i taj fragment ostaje obeležen fluorescentnom bojom na ddNTP-u. Rezultat reakcije cikličnog obeležavanja DNK je smeša fragmenata DNK različitih dužina, koji na svojim 3' krajevima sadrže bojama obeležene ddNTP-ove.

REAGENSI:	KOLIČINA:
<i>Ready Reaction Premix v3.1 (2.5X)</i>	0,35 µL
<i>Big Dye Sequencing Buffer (5X)</i>	0,35 µL
Prajmer (4 pmol/µL)	1 µL
PCR produkt	*
Redestilovana voda	**

\* Količina PCR produkta se dodaje u zavisnosti od dužine PCR amplifikata i to:

DUŽINA PCR AMPLIFIKATA	KOLIČINA
100-200 bp	1-3 ng
200-500 bp	3-10 ng
500-1000 bp	10-40 ng
>2000 bp	20-50 ng

\*\* Voda se dodaje tako da ukupna zapremina reakcione smeše bude 10 µL

Vremenski i temperaturni profil reakcije:

inicijalna denaturacija: 96°C/1 min

25 ciklusa: 96°C/10 s, 50°C/5 s, 60°C/4 min

### 3) Prečišćavanje korišćenjem *BigDye XTerminator Purification Kit-a*

Nakon reakcije cikličnog obeležavanja dobijeni fragmenti DNK prečišćavaju se od neugrađenih obeleženih ddNTP-ova, koji bi dali signale tokom iščitavanja sekvence na automatskom DNK sekvenatoru. Rastvori *XTerminator* (10 µL) i SAM (45 µL) se

dodaju u PCR produkt (10  $\mu$ L) prethodne reakcije. Zatim se uzorak vorteksuje 30 minuta pri čemu komponente rastvora *XTerminator* vezuju neugrađene ddNTP-ove, dNTP-ove i soli, dok rastvor SAM stabilizuje fragmente nakon prečišćavanja. Po završenom vorteksovanju uzorak se centrifugira 2 minuta na 3100 rpm. Prečišćeni DNK produkt ostaje u supernatantu, dok su u talogu vezani neugrađeni ddNTP-ovi, soli i ostale nečistoće.

### 3.9.2 SEKVENCIRANJE DNK

Nakon pripreme uzoraka dobija se smeša fragmenata DNK različitih dužina, koji na svojim 3' krajevima imaju ugrađen fluorescentno obeležen ddNTP. Da bi se dobila sekvenca DNK potrebno je fragmente razdvojiti po dužini kapilarnom elektroforezom na automatskom DNK sekvenatoru ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) i iščitati redosled ddNTP-ova na njihovim 3' krajevima. Fragmenti pod uticajem električnog polja putuju od katode prema anodi kroz kapilaru (dužine 48 cm). Kapilara je ispunjena polimerom (POP6) koji ima ulogu analognu ulozi gela u klasičnoj gel elektroforezi. Kraći fragmenti će putovati brže pa će ranije stići do prozora za detekciju (prozirnog dela kapilare). U tom trenutku laserskim zrakom se ekscitiraju fluorescetni obeleživači/boje. Pri vraćanju iz ekscitovanog u osnovno nepobuđeno stanje emituje se svetlost određene talasne dužine koja je specifična za svaku od četiri boje. CCD kamerom (eng. *Charge-Coupled Device* - CCD) detektuje se emitovana svetlost i redosled i jačina tih signala se čuva kao digitalni zapis.

U ovom radu uslovi elektroforeze bili su sledeći: 15kV, 36 minuta, 50°C (*Run module Seq POP6 Rapid 1mL E.md4*), injekciono vreme 40 sekundi na 3kV.

### 3.9.3 ANALIZA SEKVENCI

Digitalni podaci dobijeni tokom kapilarne elektroforeze obrađuju se *Sequencing Analysis* softverom i dobija se redosled nukleotida početnih DNK molekula. Dobijene sekvence se upoređuju sa referentnom sekvencom (NCBI GenBank Reference



Sequence: NG\_007873.1) za *BRAF* gen upotrebom BLAST programa (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), čime se utvrđuje prisustvo mutacija ili polimorfizama u analiziranim uzorcima. Značaj detektovanih promena se analizira u bazi *Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer* – COSMIC (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>).

### 3.10 STATISTIČKA ANALIZA

Ispitivanje povezanosti *KRAS* mutacija sa kliničko-histopatološkim karakteristikama karcinoma, kao i karakteristikama bolesnika rađeno je Fišerovim egzaktnim testom (eng. *Fisher exact test*) i  $\chi^2$  testom (eng. *Pearson Chi-square test*).

Za prikaz vremena do pojave metastaza (TTM) korišćena je Kaplan Majer-ova (eng. *Kaplan Meier*) metoda, a za njihov opis korišćene su medijane preživljavanja i 95% intervali poverenja (eng. *confidence interval* - CI). Za testiranje razlika u vremenu do pojave metastaza, u odnosu na parametre od značaja, korišćen je Log-Rank test.

Za nivo značajnosti uzimano je  $p=0,05$ .

## 4. REZULTATI

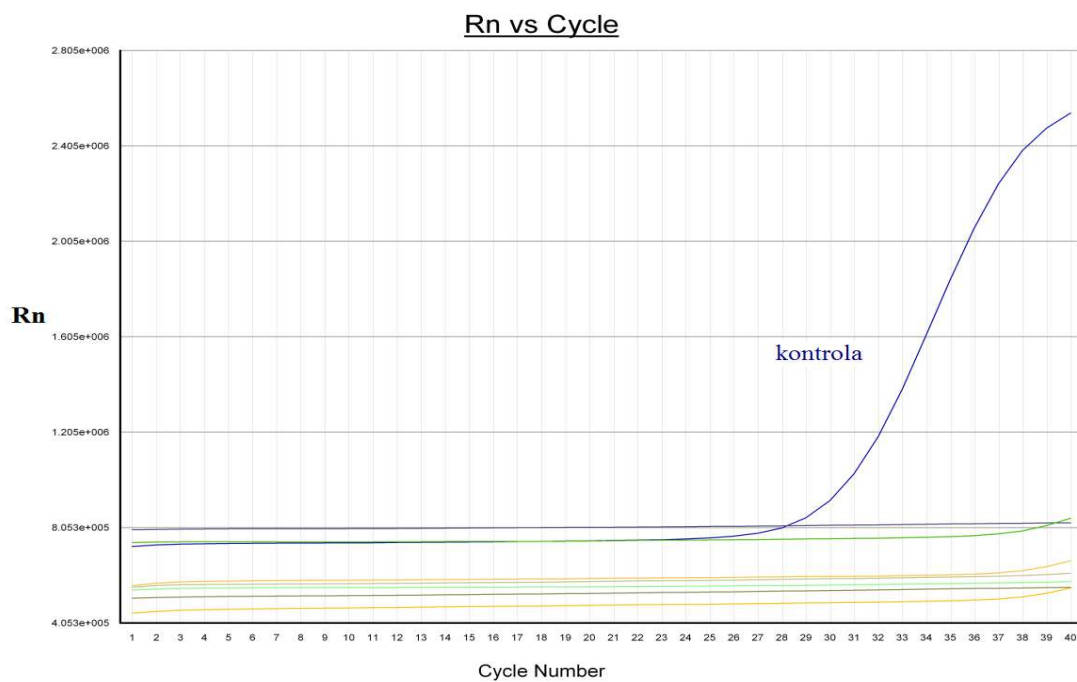
Od ukupno 188 parafinskih kalupa tumora pacijenata sa CRC-om DNK je uspešno izolovana u 100% slučajeva korišćenjem *QIAamp<sup>®</sup> DNA FFPE Tissue Kit*-a. Spektrofotometrijskim merenjem utvrđeno je da je koncentracija izolovane DNK bila zadovoljavajuća za dalje mutacione analize.

### 4.1 MUTACIJE U *KRAS* GENU

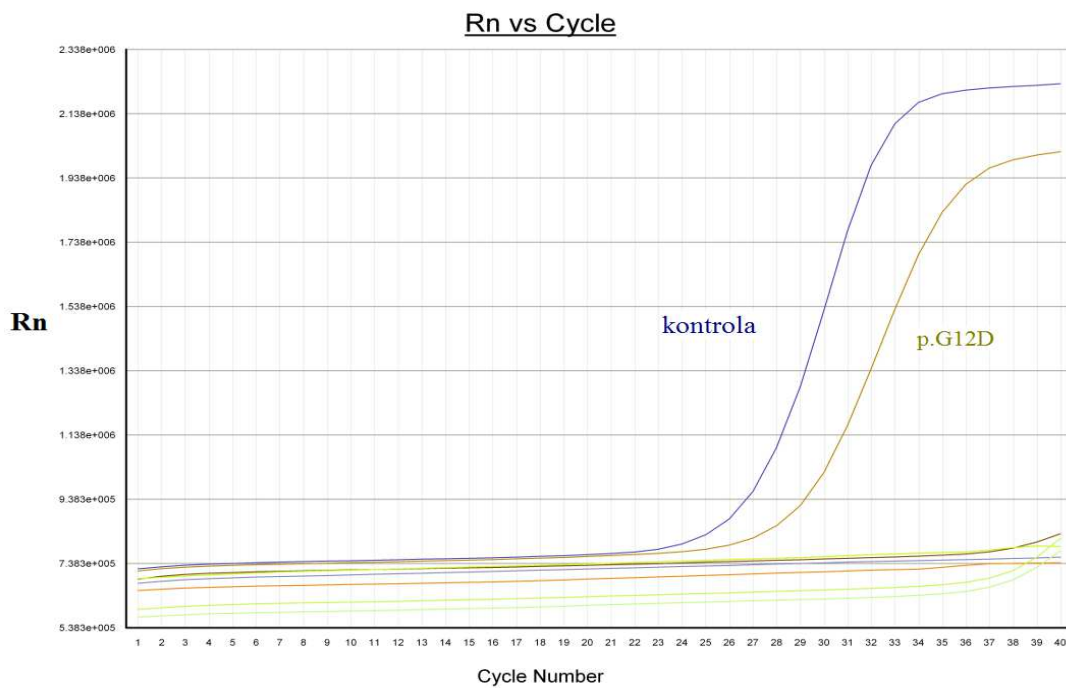
Metode koje su korišćene za detekciju mutacija su bile alel-specifični *real-time* PCR (*Therascreen KRAS PCR Kit*) i PCR u kombinaciji sa reverznom hibridizacijom (*KRAS StripAssay<sup>TM</sup>*).

Primeri rezultata dobijenih *real-time* PCR metodom (amplifikacioni *plot*) za *KRAS* wt i mutirani uzorak prikazani su Slikama 20 i 21. Na *y* osi prikazan je normalizovan signal fluorescencije ( $R_n$ ), a na *x* osi broj ciklusa.  $R_n$  predstavlja odnos intenziteta fluorescencije reporterske boje i pasivne referentne boje. Kod wt *KRAS* uzorka zapaža se samo amplifikaciona kriva kontrolnog eseja, dok se kod mutiranog uzorka pored kontrolne amplifikacione krive nalazi i kriva amplifikacije koja potiče iz specifičnog mutacionog eseja (na slici je dat primer p.G12D mutacije).

Prisustvo mutacije se određuje računanjem  $\Delta C_t$  vrednosti između pozitivnog mutacionog eseja i kontrolnog eseja. Mutacija se smatra prisutnom kada je detektovana  $\Delta C_t$  vrednost manja od datih 1% *cut-off* vrednosti u kit-u.

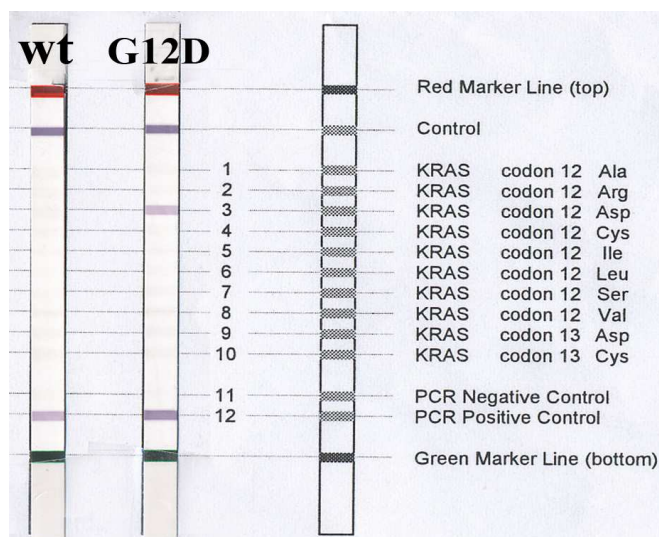


Slika 20. Amplifikacioni *plot* wt *KRAS* uzorka.



Slika 21. Amplifikacioni *plot* *KRAS* mutiranog uzorka (mutacija p.G12D).

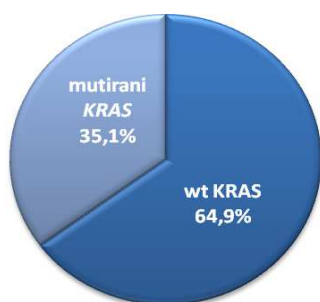
Primeri rezultata dobijenih reverznom hibridizacijom za *KRAS* wt i mutirani uzorak prikazani su na Slici 22. Pozitivna reakcija (ljubičasto obojena traka na *teststrip*-u) se može u ovom primeru uočiti u nivou p.G12D mutacije (pored obaveznih obojenih kontrolnih traka), za razliku od wt uzorka koji nema pozitivne mutacione trake.



Slika 22. Primer *teststrip* rezultata za wt i mutirani (mutacija p.G12D) *KRAS* uzorak.

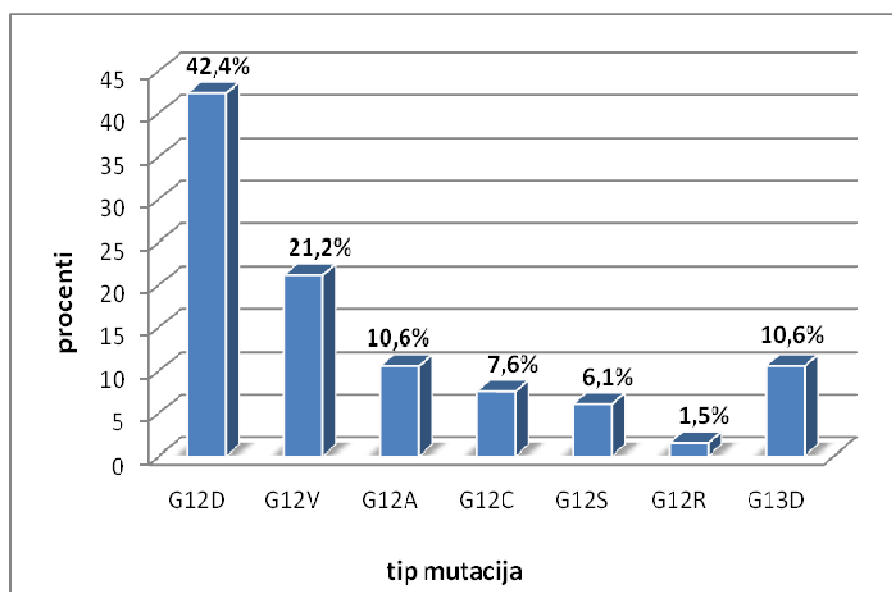
#### 4.1.1 UČESTALOST I TIP MUTACIJA U *KRAS* GENU

*KRAS* tačkaste mutacije u kodonima 12 i 13 su bile prisutne kod 66 od 188 (35,1%) analiziranih bolesnika sa CRC-om (Slika 23). Bolesnici sa dve ili više mutacija nisu nađeni.



Slika 23. Učestalost *KRAS* wt i mutiranih bolesnika.

Od deset testiranih, sedam najčešćih *KRAS* mutacija je detektovano pomoću oba kit-a. Distribucija detektovanih mutacija je bila sledeća: p.G12D 42,4% (28/66), p.G12V 21,2% (14/66), p.G12A 10,6% (7/66), p.G12C 7,6% (5/66), p.G12S 6,1% (4/66), p.G12R 1,5% (1/66) i p.G13D 10,6% (7/66) (Slika 24).



Slika 24. Distribucija *KRAS* mutacija.

Učestalost mutacija po kodonima je bila 89,4% u kodonu 12 i 10,6% u kodonu 13. Pokazano je i da četiri najčešće mutacije, p.G12D, p.G12V, p.G12A i p.G13D, čine čak 84,8% (56/66) svih detektovanih mutacija.

Stopa tranzicija (59,1%) je u našoj populaciji pacijenata koji nose *KRAS* mutaciju bila veća od stope transverzija (40,9%). Jedini detektovani tip tranzicije u oba kodona je bio G>A, pri čemu je promena 12 GGT>GAT (p.G12D) bila najčešća. Dva tipa transverzija G>T i G>C su nađena samo u kodonu 12.

## 4.2 POVEZANOST MUTACIJA U *KRAS* GENU SA KLINIČKO-HISTOPATOLOŠKIM KARAKTERISTIKAMA KARCINOMA KOLOREKTUMA

U cilju ispitivanja korelacije mutacija u *KRAS* genu sa karakteristikama tumora, u sledećim poglavljima data je distribucija detektovanih mutacija u funkciji: primarne lokalizacije tumora, veličine tumora (T), statusa regionalnih limfnih čvorova (N), prisustva inicijalnih metastaza (M), gradusa tumora (G), *Dukes* stadijuma bolesti, lokalizacije i broja metastaza. Statistička značajnost ovih distribucija testirana je  $\chi^2$  testom i Fišerovim egzaktnim testom.

### a) *Povezanost mutacija u KRAS genu sa primarnom lokalizacijom tumora*

Razmatrana je zastupljenost *KRAS* mutacija u okviru lokalizacija primarnog tumora: kolon, rektum i rektosigmoidni prelaz. Podaci o lokalizaciji tumora nisu bili dostupni za jednog bolesnika. U 34 od 95 (35,8%) tumora kolona, 26 od 80 (32,5%) tumora rektuma i 5 od 12 (41,7%) rektosigmoidnih tumora su detektovane mutacije u *KRAS* genu.

Nije pokazana statistički značajna razlika u raspodeli *KRAS* mutacija u okviru različitih tumorskih lokalizacija ( $\chi^2_2=0,477$ ;  $p>0,05$ ).

### b) *Povezanost mutacija u KRAS genu sa veličinom tumora (T)*

Od 188 ispitivanih uzoraka karcinoma ni jedan nije bio veličine T1, 9 (4,8%) je bilo veličine T2, 98 (52,1%) veličine T3, 37 (19,7%) veličine T4 i za 44 (23,4%) bolesnika veličina tumora nije bila određena. Od ukupno 66 detektovanih mutacija u svim ispitivanim uzorcima, 2 su bile locirane u okviru tumora veličine T2, 31 u okviru veličine T3, 18 u okviru veličine T4 i za njih 15 nismo imali podatak o veličini tumora.

U 22,2% (2/9) pacijenata sa T2 tumorom, u 31,6% (31/98) pacijenata sa T3 tumorom i u 48,6% (18/37) pacijenata sa T4 tumorom su detektovane mutacije u *KRAS* genu. Zastupljenost mutacija u *KRAS* genu u okviru tumora različitih veličina nije statistički značajna ( $p=0,138$ ; Fišerov egzaktni test). Iako nije pokazana statistička

značajnost, treba napomenuti da procenat *KRAS* mutacija raste kako se veličina tumora uvećava.

**c) Povezanost mutacija u *KRAS* genu sa prisustvom metastaza u regionalnim limfnim čvorovima (N)**

Podaci o limfonodusnom statusu nisu bili dostupni za 49 pacijenata. Prema tome, analizirano je ukupno 139 pacijenata od kojih 21 nije imao prisustvo metastaza u regionalnim limfnim čvorovima (N0), 52 su imale metastaze u 1-3 limfnih čvorova (N1) i 66 pacijenata su imali metastaze u  $\geq 4$  limfna čvora (N2). U grupi N0 5 pacijenata (23,8%) je imalo mutacije u *KRAS* genu, u grupi N1 21 pacijent (40,4%) i u grupi N2 21 pacijent (31,8%).

Nema statistički značajne razlike u pojavi mutacija u *KRAS* genu između N0, N1 i N2 grupe ( $\chi^2_2=2,06$ ;  $p>0,05$ ).

**d) Povezanost mutacija u *KRAS* genu sa prisustvom inicijalnih metastaza (M)**

Od 188 ispitivanih uzoraka, 89 bolesnika nije imalo metastatsku bolest pri dijagnozi (M0), dok je njih 99 imalo udaljene metastaze (M1). Od detektovanih 66 pacijenata sa mutacijama *KRAS* gena, 32 (36%) su bila u okviru M0 grupe, a 34 (34,3%) u okviru M1 grupe.

Dobijena razlika u distribuciji mutacija u *KRAS* genu u dve pomenute grupe nije statistički značajna ( $\chi^2_1=0,053$ ;  $p>0,05$ ).

**e) Povezanost mutacija u *KRAS* genu sa histološkim gradusom tumora (G)**

U 12 od 25 (48%) dobro diferentovanih tumora kolorektuma (G1), 37 od 108 (34,3%) umereno diferentovanih tumora (G2), 3 od 12 (25%) slabo diferentovanih tumora (G3) i u 14 od 43 tumora čiji gradus nije određivan detektovane su mutacije u *KRAS* genu. Ni jedan bolesnik u ovoj studiji nije imao histološki gradus tumora G4.

Razlika u distribuciji *KRAS* mutacija kod tumora različitih stepena diferentovanosti (G1 vs. G2 vs. G3) nije statistički značajna ( $p=0,336$ ; Fišerov egzakti

test). Ipak, može se zapaziti trend opadanja učestalosti mutacija sa porastom histološkog gradusa tumora.

**f) Povezanost mutacija u *KRAS* genu sa *Dukes* stadijumima bolesti**

*Dukes* stadijume bolesti nije bilo moguće odrediti za 28/188 bolesnika. Ni jedan bolesnik nije imao *Dukes* A stadijum. U grupi od 11 bolesnika sa lokalizovanom bolešću (*Dukes* B) kod 2 bolesnika (18,2%) su detektovane *KRAS* mutacije, u grupi od 58 bolesnika sa bolešću raširenom na limfne čvorove (*Dukes* C) u 24 (41,4%) i u grupi od 91-og bolesnika sa metastatskom bolešću u 33 (36,3%).

Iako je procenat mutacija oko dva puta veći kod bolesnika sa raširenom u odnosu na lokalizovanu bolest, nije pokazana statistički značajna razlika u zastupljenosti mutacija *KRAS* gena u odnosu na *Dukes* stadijume bolesti ( $p=0,360$ ; Fišerov egzaktni test).

**g) Povezanost mutacija u *KRAS* genu sa brojem metastaza**

Od ukupno 188 pacijenata za 27 nismo imali podatak o broju i lokalizaciji metastaza. Gledano prema statusu *KRAS* gena, maksimalan broj metastaza po pacijentu je u wt grupi pacijenata iznosio 3, a u mutiranoj grupi 5.

U grupi od 88 pacijenata bez prisutnih inicijalnih metastaza (M0) broj pacijenata kod kojih su detektovane *KRAS* mutacije iznosio je 32 (36,4%). Među 44 pacijenta sa prisutnom samo jednom metastazom mutacije su detektovane kod 15 (34,1%) slučajeva. U grupi od 29 pacijenata sa više od jedne metastaze detektovane su *KRAS* mutacije u 16 (55,2%) pacijenata.

Iako su *KRAS* mutacije bile procentualno više zastupljene kod pacijenata sa većim brojem prisutnih metastaza, dobijena razlika u učestalosti *KRAS* mutacija između navedenih grupa nije imala statistički značaj ( $\chi^2_2=3,885$ ;  $p>0,05$ ).



#### **h) Povezanost mutacija u *KRAS* genu sa metastazama u jetri**

S obzirom da se metastaze CRC-a najčešće javljaju u jetri, razmatrana je zastupljenost *KRAS* mutacija kod pacijenata koji su imali udaljene metastaze u ovom organu. Od 162 pacijenta za koje smo imali podatke, njih 66 je imalo metastaze prisutne u jetri. Kod 43,9% (29/66) pacijenata sa metastazama u jetri su pronađene mutacije u *KRAS* genu, dok je u grupi pacijenata bez ovih metastaza taj procenat bio 35,4% (34/96).

Razlika u zastupljenosti *KRAS* mutacija kod ove dve grupe pacijenata nije imala statistički značaj ( $\chi^2_1=1,195$ ;  $p>0,05$ ).

#### **i) Povezanost mutacija u *KRAS* genu sa metastazama u plućima**

Druga po učestalosti lokalizacija gde se metastaze CRC-a najčešće javljaju jesu pluća. Od 162 bolesnika za koje su podaci bili poznati, njih 18 je imalo metastaze u plućima. U grupi bolesnika sa metastazama u plućima *KRAS* mutacije su bile zastupljene u 55,6% (10/18), a u grupi bolesnika bez ovih metastaza u 36,8% (53/144).

Iako je učestalost mutacija u *KRAS* genu bila veća kod bolesnika sa metastazama u odnosu na one bez metastaza, razlika u zastupljenosti *KRAS* mutacija kod ove dve grupe bolesnika nije imala statistički značaj ( $\chi^2_1=2,367$ ;  $p>0,05$ ).

### **4.3 POVEZANOST MUTACIJA U *KRAS* GENU SA KARAKTERISTIKAMA BOLESNIKA SA KOLOREKTALNIM KARCINOMOM**

U cilju ispitivanja korelacije pojave mutacija u *KRAS* genu sa karakteristikama bolesnika sa CRC-om, u sledećim poglavljima data je distribucija detektovanih mutacija u funkciji: starosne dobi, pola i ECOG (eng. *Eastern Cooperative Oncology Group* - ECOG) performans statusa. Statistička značajnost ovih distribucija testirana je  $\chi^2$  testom i Fišerovim egzaktnim testom.

**a) Povezanost mutacija u KRAS genu sa starosnom dobi**

Medijana raspodele godina dijagnostikovanja karcinoma kolorektuma kod bolesnika sa mutacijama u *KRAS* genu je bila 58 godina, a kod bolesnika sa wt *KRAS*-om 60 godina.

**b) Povezanost mutacija u KRAS genu sa polom**

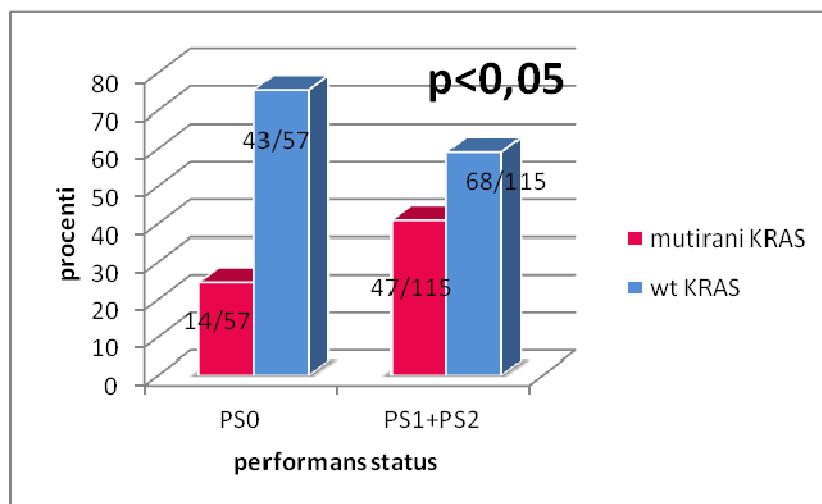
Mutacije u *KRAS* genu su detektovane kod 47/117 (40,2%) pacijenata muškog pola i kod 19/71 (26,8%) pacijenata ženskog pola. Dobijena razlika u učestalosti *KRAS* mutacija između navedenih grupa je bila na granici statističke značajnosti ( $\chi^2_1=3,488$ ;  $p=0,06$ ).

**c) Povezanost mutacija u KRAS genu sa ECOG performans statusom**

ECOG skala ili tzv. performans status (PS) predstavlja skalu i kriterijume za procenu kvaliteta života bolesnika (Oken et al., 1982). Doktori i istraživači koriste ovu skalu za procenu progresije bolesti, procenu njenog uticaja na sposobnost pacijenta da obavlja svakodnevne aktivnosti, kao i za određivanje adekvatnog lečenja i prognoze. Performans status se kreće od 0-5.

U našoj grupi bolesnika sa CRC-om (n=188) podaci o performans statusu za 16 bolesnika nisu bili dostupni. Od 172 analizirana bolesnika, 57 je bilo potpuno aktivno (PS0), a 115 je bilo pokretno ali ograničeno u fizički napornim poslovima (PS1) ili onemogućeno u obavljanju bilo kakvog posla (PS2). Mutacije u *KRAS* genu su detektovane u 24,6% (14/57) bolesnika sa PS0 i u 40,9% (47/115) bolesnika sa PS1+PS2 (Slika 25).

Razlika u učestalosti *KRAS* mutacija u grupi bolesnika sa PS0 vs. PS1+PS2 je statistički značajna ( $\chi^2_1=4,429$ ;  $p=0,035$ ).



Slika 25. Raspodela *KRAS* wt i mutiranih uzoraka u odnosu na performans status.

#### 4.4 POVEZANOST p.G12V MUTACIJE *KRAS* GENA SA KLINIČKO-HISTOPATOLOŠKIM KARAKTERISTIKAMA KARCINOMA KOLOREKTUMA I KARAKTERISTIKAMA BOLESNIKA

U okviru grupe bolesnika nosilaca mutacija u *KRAS* genu (n=66), ispitivali smo korelacije p.G12V mutacije (najagresivnije prema literaturnim podacima) u odnosu na sve ostale testirane mutacije, sa karakteristikama tumora (primarna lokalizacija tumora, veličina tumora (T), status regionalnih limfnih čvorova (N), prisustvo inicijalnih metastaza (M), gradus tumora (G), *Dukes* stadijum bolesti i broj udaljenih metastaza) i sa karakteristikama pacijenata obolelih od CRC-a (pol, starosna dob i performans status). Dobijeni rezultati za testirane parametre su prikazani u tabeli 6.

Medijana starosne dobi dijagnostikovanja karcinoma kolorektuma kod pacijenata sa p.G12V mutacijom u *KRAS* genu je bila 56 godina, a kod pacijenata sa ostalim mutacijama *KRAS*-a 59 godina.

Tabela 6. Povezanost *KRAS* mutacija (p.G12V vs. sve ostale mutacije) sa parametrima tumora i karakteristikama bolesnika sa CRC-om. Podaci u tabeli su dati kao broj (procenat).

Parametar	Ukupan broj analiziranih bolesnika	p.G12V	Sve ostale mutacije	p
<b>Lokalizacija</b>	65	14	51	<b>0,595*</b>
kolon	34	7 (20,6)	27 (79,4)	
rektum	26	7 (26,9)	19 (73,1)	
rektosigmoidni prelaz	5	0 (0,0)	5 (100,0)	
<b>Veličina tumora</b>	51	11	40	<b>0,058*</b>
T2	2	2 (100,0)	0 (0,0)	
T3	31	6 (19,4)	25 (80,6)	
T4	18	3 (16,7)	15 (83,3)	
<b>Limfonodusni status</b>	47	8	39	<b>0,633*</b>
N0	5	0 (0,0)	5 (100,0)	
N1	21	5 (23,8)	16 (76,2)	
N2	21	3 (14,3)	18 (85,7)	
<b>Udaljene metastaze</b>	66	14	52	<b>0,898**</b>
M0	32	7 (21,9)	25 (78,1)	
M1	34	7 (20,6)	27 (79,4)	
<b>Histološki gradus</b>	52	10	42	<b>0,215*</b>
G1	12	4 (33,3)	8 (66,7)	
G2	37	5 (13,5)	32 (86,5)	
G3	3	1 (33,3)	2 (66,7)	
<b>Dukes stadijum</b>	59	13	46	<b>0,854*</b>
B	2	0 (0,0)	2 (100,0)	
C	24	6 (25,0)	18 (75,0)	
D	33	7 (21,2)	26 (78,8)	
<b>Broj metastaza</b>	63	13	50	<b>0,161*</b>
0	32	7 (21,9)	25 (78,1)	

Tabela 6. nastavak

1	15	5 (33,3)	10 (66,7)	
>1	16	1 (6,3)	15 (93,8)	
<b>Pol</b>	66	14	52	<b>0,741*</b>
muški	47	11 (23,4)	36 (76,6)	
ženski	19	3 (15,8)	16 (84,2)	
<b>Performans status</b>	61	14	47	<b>0,590*</b>
PS0	14	4 (28,6)	10 (71,4)	
PS1	43	10 (23,3)	33 (76,7)	
PS2	4	0 (0,0)	4 (100,0)	

\* Fišerov egzaktni test

\*\*  $\chi^2$  test

Na osnovu rezultata u tabeli, zapaža se da svi tumori koji ne prodiru u dublje slojeve zida kolona i rektuma poseduju p.G12V mutaciju, dok je zastupljenost ove mutacije kod tumora koji zahvataju dublje slojeve kolona ili rektuma 19,4%, a kod onih koji probijaju serozu 16,7%. Ova razlika je na granici statističke značajnosti.

Iako ne statistički značajno, učestalost *KRAS* p.G12V mutacije je opadala sa porastom performans statusa i broja prisutnih metastaza. Takođe, u poređenju sa svim ostalim detektovanim mutacijama, p.G12V je bila učestalija kod muškaraca nego kod žena, i kod tumora kolona/rektuma u odnosu na rektosigmoidni prelaz.

#### 4.5 POVEZANOST p.G12D MUTACIJE *KRAS* GENA SA KLINIČKO-HISTOPATOLOŠKIM KARAKTERISTIKAMA KARCINOMA KOLOREKTUMA I KARAKTERISTIKAMA BOLESNIKA

U grupi *KRAS* mutiranih bolesnika ispitivali smo i korelacije najučestalije mutacije p.G12D, u odnosu na sve ostale analizirane mutacije, sa parametrima tumora (primarna lokalizacija tumora, veličina tumora (T), status regionalnih limfnih čvorova (N), prisustvo inicijalnih metastaza (M), gradus tumora (G), *Dukes* stadijum bolesti i

broj udaljenih metastaza) i sa karakteristikama obolelih od CRC-a (pol, starosna dob i performans status). Dobijeni rezultati za testirane parametre su prikazani u tabeli 7.

Medijane starosne dobi dijagnostikovanja karcinoma kolorektuma kod bolesnika sa p.G12D mutacijom i kod bolesnika sa ostalim mutacijama u *KRAS* genu su bile 58 godina.

Tabela 7. Povezanost *KRAS* mutacija (p.G12D vs. sve ostale mutacije) sa parametrima tumora i karakteristikama bolesnika sa CRC-om. Podaci u tabeli su dati kao broj (procenat).

Parametar	Ukupan broj analiziranih bolesnika	p.G12D	Sve ostale mutacije	p
<b>Lokalizacija</b>	65	27	38	<b>0,432*</b>
kolon	34	12 (35,3)	22 (64,7)	
rektum	26	12 (46,2)	14 (53,8)	
rektosigmoidni prelaz	5	3 (60,0)	2 (40,0)	
<b>Veličina tumora</b>	51	21	30	<b>0,613*</b>
T2	2	0 (0,0)	2 (100,0)	
T3	31	14 (45,2)	17 (54,8)	
T4	18	7 (38,9)	11 (61,1)	
<b>Limfonodusni status</b>	47	20	27	<b>0,536*</b>
N0	5	2 (40,0)	3 (60,0)	
N1	21	11 (52,4)	10 (47,6)	
N2	21	7 (33,3)	14 (66,7)	
<b>Udaljene metastaze</b>	66	28	38	<b>0,832**</b>
M0	32	14 (43,8)	18 (56,2)	
M1	34	14 (41,2)	20 (58,8)	
<b>Histološki gradus</b>	52	23	29	<b>0,557*</b>
G1	12	4 (33,3)	8 (66,7)	
G2	37	17 (45,9)	20 (54,1)	
G3	3	2 (66,7)	1 (33,3)	

Tabela 7. nastavak

<b>Dukes stadijum</b>	59	26	33	<b>1*</b>
B	2	1 (50,0)	1 (50,0)	
C	24	11 (45,8)	13 (54,2)	
D	33	14 (42,4)	19 (57,6)	
<b>Broj metastaza</b>	63	27	36	<b>0,638**</b>
0	32	14 (43,8)	18 (56,2)	
1	15	5 (33,3)	10 (66,7)	
>1	16	8 (50,0)	8 (50,0)	
<b>Pol</b>	66	28	38	<b>0,973**</b>
muški	47	20 (42,6)	27 (57,4)	
ženski	19	8 (42,1)	11 (57,9)	
<b>Performans status</b>	61	26	35	<b>0,590*</b>
PS0	14	7 (50,0)	7 (50,0)	
PS1	43	16 (37,2)	27 (62,8)	
PS2	4	3 (75,0)	1 (25,0)	

\* Fišerov egzaktini test

\*\*  $\chi^2$  test

Prema rezultatima iz tabele, statistički značajna povezanost p.G12D mutacije sa testiranim karakteristikama nije pokazana ni za jedan parametar. Međutim, vidi se trend porasta zastupljenosti ove mutacije sa širenjem tumora kroz zid kolona/rektuma i serozu, kao i histološkim gradusom. Porast učestalosti ove mutacije se zapaža kod distalnih tumora (rektum i rektosigmoidni prelaz) u odnosu na proksimalne (kolon) i kod bolesnika sa PS2 u odnosu na PS0 i PS1. Uočava se i trend blagog opadanja kod *Dukes C* i *D* tumora u odnosu na *Dukes B*.

#### 4.6 POVEZANOST MUTACIJA KODONA 12 I 13 KRAS GENA SA KLINIČKO-HISTOPATOLOŠKIM KARAKTERISTIKAMA KARCINOMA KOLOREKTUMA I KARAKTERISTIKAMA BOLESNIKA

Kod bolesnika sa mutacijama *KRAS* gena ispitivali smo i korelacije mutacija kodona 12 u odnosu na kodon 13, sa parametrima tumora (primarna lokalizacija tumora, veličina tumora (T), status regionalnih limfnih čvorova (N), prisustvo inicijalnih metastaza (M), gradus tumora (G), *Dukes* stadijum bolesti i broj udaljenih metastaza) i sa karakteristikama samih bolesnika (pol, starosna dob i performans status). Dobijeni rezultati za testirane parametre su prikazani u tabeli 8.

Medijana starosne dobi dijagnostikovanja karcinoma kolorektuma kod bolesnika sa mutacijama kodona 12 je bila 58 godina, a kod bolesnika sa mutacijama kodona 13 je iznosila 59 godina.

Tabela 8. Povezanost *KRAS* mutacija (kodon 12 vs. kodon 13) sa parametrima tumora i karakteristikama bolesnika sa CRC-om. Podaci u tabeli su dati kao broj (procenat).

Parametar	Ukupan broj analiziranih bolesnika	Mutacije kodona 12	Mutacije kodona 13	p
<b>Lokalizacija</b>	65	58	7	<b>0,235*</b>
kolon	34	29 (85,3)	5 (14,7)	
rektum	26	25 (96,2)	1 (3,8)	
rektosigmoidni prelaz	5	4 (80,0)	1 (20,0)	
<b>Veličina tumora</b>	51	45	6	<b>0,733*</b>
T2	2	2 (100,0)	0 (0,0)	
T3	31	28 (90,3)	3 (9,7)	
T4	18	15 (83,3)	3 (16,7)	
<b>Limfonodusni status</b>	47	42	5	<b>1*</b>
N0	5	5 (100,0)	0 (0,0)	
N1	21	19 (90,5)	2 (9,5)	
N2	21	18 (85,7)	3 (14,3)	



Tabela 8. nastavak

<b>Udaljene metastaze</b>	66	59	7	<b>1*</b>
M0	32	29 (90,6)	3 (9,4)	
M1	34	30 (88,2)	4 (11,8)	
<b>Histološki gradus</b>	52	47	5	<b>0,498*</b>
G1	12	12 (100,0)	0 (0,0)	
G2	37	32 (86,5)	5 (13,5)	
G3	3	3 (100,0)	0 (0,0)	
<b>Dukes stadijum</b>	59	53	6	<b>1*</b>
B	2	2 (100,0)	0 (0,0)	
C	24	22 (91,7)	2 (8,3)	
D	33	29 (87,9)	4 (12,1)	
<b>Broj metastaza</b>	63	56	7	<b>0,883*</b>
0	32	29 (90,6)	3 (9,4)	
1	15	13 (86,7)	2 (13,3)	
>1	16	14 (87,5)	2 (12,5)	
<b>Pol</b>	66	59	7	<b>0,663*</b>
muški	47	41 (87,2)	6 (12,8)	
ženski	19	18 (94,8)	1 (5,3)	
<b>Performans status</b>	61	54	7	<b>0,799*</b>
PS0	14	13 (92,9)	1 (7,1)	
PS1	43	37 (86,0)	6 (14,0)	
PS2	4	4 (100,0)	0 (0,0)	

\* Fišerov egzaktni test

Iako učestalost p.G13D mutacije u našem radu raste sa stepenom invazivnosti tumora kroz zid creva (veličinom tumora), *Dukes* stadijumom, prisustvom i brojem udaljenih metastaza i onih u limfnim čvorovima, statistička značajnost nije dostignuta ni za jedan od analiziranih parametara. Ova mutacija je, takođe, češća kod muškaraca u

odnosu na žene, i kod tumora kolona i rektosigmoidnog prelaza u odnosu na tumor rektuma.

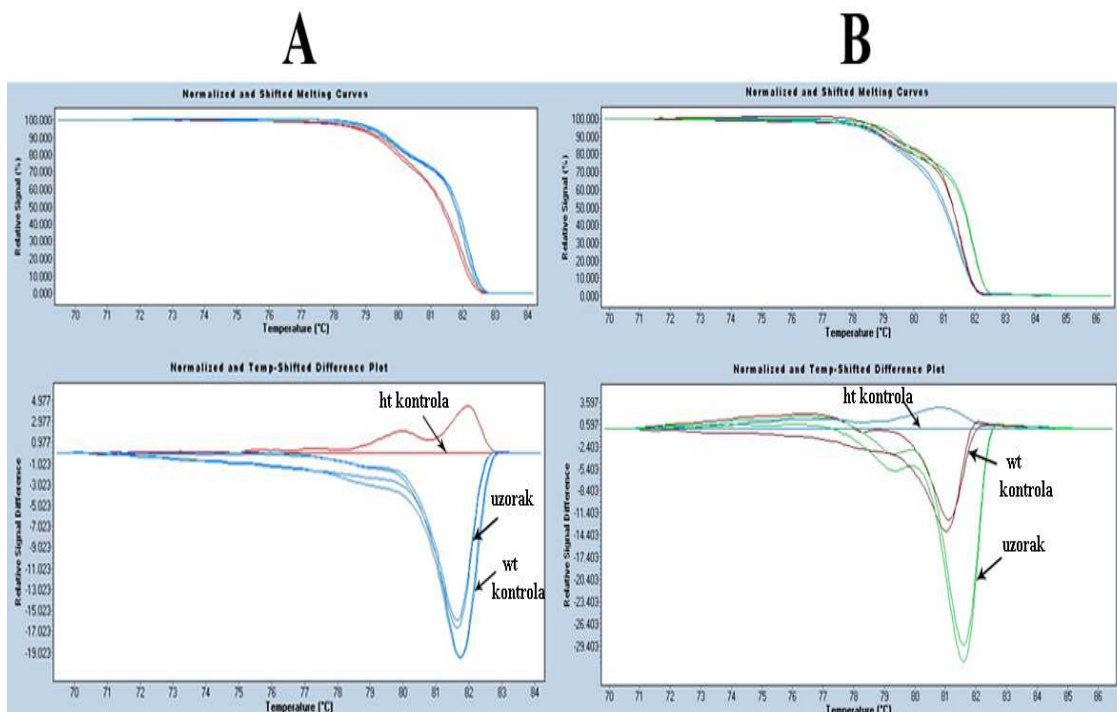
#### 4.7 UČESTALOST p.V600E MUTACIJE U *BRAF* GENU

Prisustvo p.V600E (GTG>GAG) mutacije u *BRAF* genu je proveravano metodom sekvenciranja kod uzoraka korišćenih kao kontrole. Kod ćelijske linije LS174 nije detektovana navedena mutacija (wt kontrola), a kod uzorka za koji se prethodno znalo da je mutiran je potvrđena mutacija na toj poziciji u heterozigotnoj formi (ht kontrola).

U grupi pacijenata sa wt *KRAS* statusom gena (n=122) testirano je prisustvo/odsustvo mutacije p.V600E *BRAF* gena HRM metodom. Zbog lošijeg kvaliteta ili nedostatka DNK, 21 pacijent je morao da bude isključen iz analize. Poređenjem krivih topljenja uzoraka sa krivama topljenja kontrola mogli smo da odredimo mutacioni status. U zavisnosti da li se profil krivih topljenja uzoraka grupisao i poklapao sa profilom neke od kontrola, bilo je moguće odrediti da li je uzorak wt ili heterozigot za *BRAF* p.V600E mutaciju. S obzirom da nismo imali kontrolu za mutiranog homozigota, sve uzorke koji su se razlikovali od poznate dve kontrole smo klasifikovali kao izmenjene. Iako se mutacija p.V600E javlja u oko 90% slučajeva sa mutiranim *BRAF* genom, moguće je da se na ovoj ili drugoj poziciji pojave i neke druge mutacije, ili da postoje polimorfizmi u delu sekvence koji smo umnožili. U oba slučaja došlo bi do promene izgleda krive topljenja i formiranja drugih grupa koje se razlikuju od naših kontrola. Kao rezultat HRM analize dobili smo 83 wt uzorka, 4 heterozigota za mutaciju p.V600E u *BRAF* genu i 14 izmenjenih uzoraka.

Primeri rezultata koji se dobijaju HRM metodom dati su na Slici 26. Na y osi se nalazi fluorescentni signal, a na x osi temperatura. Prikazane su normalizovane i temperaturno pomerene krive topljenja i diferencijalni *plot*-ovi za wt (A) i izmenjeni uzorak (B). U slučaju wt uzorka, jasno se razlikuju dve različito obojene grupe krivih koje potiču od ht kontrole (crvena) i wt kontrole (plava), s tim što ispitivani uzorak pripada wt kontrolnoj grupi. U slučaju izmenjenog uzorka, mogu se razlikovati tri

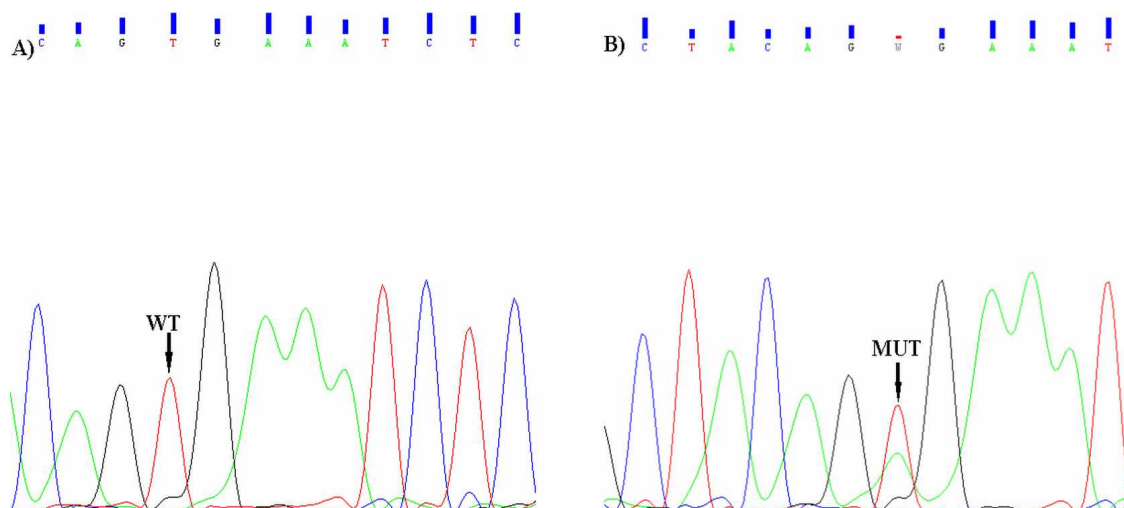
grupe krivih: ht kontrolna (plava), wt kontrolna (crvena) i grupa koja potiče od izmenjenog uzorka (zeleni).



Slika 26. Normalizovane i temperaturno pomerene krive topljenja i diferencijalni *plot*-ovi za A) wt *BRAF* uzorak i B) izmenjeni *BRAF* uzorak.

Sve mutirane i izmenjene uzorke, kao i one za koje nismo mogli da dobijemo rezultat HRM analizom, smo proveravali metodom sekvenciranja DNK. Od prethodno 4 detektovana heterozigota samo je jedan potvrđen sekvenciranjem, dok su ostala 3 uzorka imala wt status i ni jednu drugu promenu u fragmentu *BRAF* gena koji smo umnožavali. Ovaj fragment je obuhvatao ceo egzon 15 i delove introna 14 i 15. Među 14 izmenjenih uzoraka, za 3 nismo uspeli da dobijemo rezultat sekvenciranjem, a za preostalih 11 se utvrdilo da imaju wt *BRAF* mutacioni status. Takođe, u okviru ovih 11 uzoraka, samo kod jednog bolesnika su bile detektovane dve intronske promene u sekvenci (IVS14-7 A>T i IVS14-5 C>T), dok ostalih 10 bolesnika nije imalo nikakvu promenu. Od 21-og pacijenta za koje nismo inicijalno imali rezultat HRM analize, sekvenciranjem smo utvrdili wt *BRAF* status kod njih troje.

Prema tome, od početnih 122 bolesnika sa wt *KRAS* genom, 21-om bolesniku nismo uspeli da utvrdimo *BRAF* mutacioni status, 100 (99%) bolesnika je imalo wt *BRAF* i samo jedan (1%) bolesnik je bio heterozigot za p.V600E *BRAF* mutaciju. Primer rezultata sekvenciranja dat je na Slici 27. Prikazani su delovi sekvence sa pozicijom p.V600E mutacije kod wt i ht uzorka.



Slika 27. Primeri elektroferograma *BRAF* gena na poziciji mutacije p.V600E. A) Wild-type (WT) TT uzorak i B) Mutirani (MUT) AT heterozigotni uzorak.

#### 4.8 POVEZANOST MUTACIJA U *KRAS* I *BRAF* GENIMA SA TOKOM MALIGNNE BOLESTI

Od 188 bolesnika sa CRC-om, 99 je imalo prisutne metastaze pri dijagnozi ili nakon hirurgije (inicijalne metastaze). Smatra se da kod njih znaci bolesti postoje i oni se u prvoj liniji terapije podvrgavaju nekom od režima sistemske hemioterapije (HT) (5-fluorouracil - 5-FU, HT bazirana na oksaliplatinu ili irinotekanu, bevacizumab, mitomicin). Bolesnici u metastatskoj fazi bolesti i sa wt *KRAS* statusom gena mogu u drugoj (u svetu), trećoj ili nekoj kasnijoj liniji (u svetu i kod nas) primati i EGFR-ciljanu terapiju antitelima u kombinaciji sa HT-om (cetuksimab u kombinaciji sa irinotekanom).

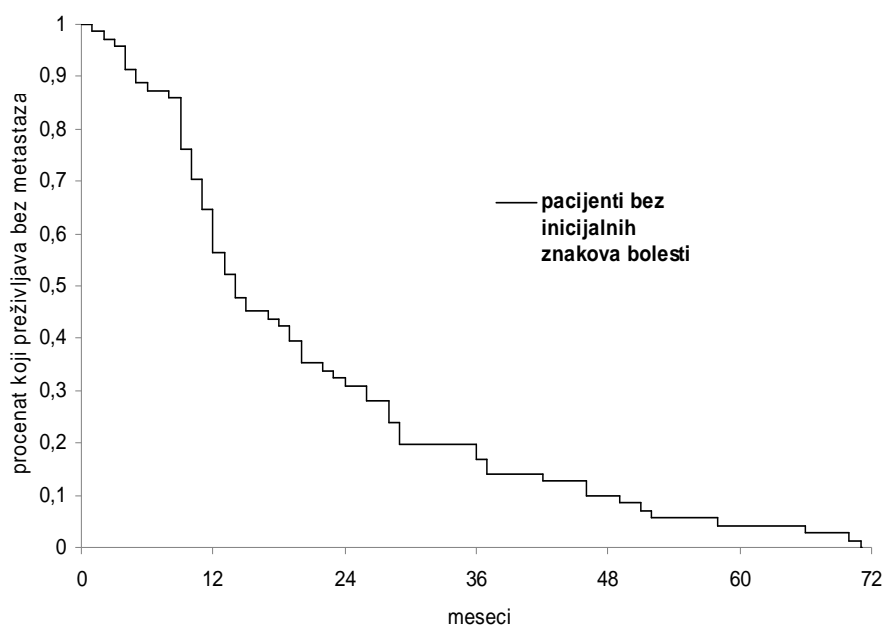
Dva bolesnika (2/188) su imala mikroskopske (rest 1) ili makroskopske (rest 2) znake tumora nakon hirurške intervencije i za njih se takođe smatra da imaju znake bolesti. Preostalih 87 bolesnika je bilo bez znakova bolesti (nisu bile prisutne metastaze, ni rest tumora) nakon hirurgije.

Pacijenti bez prisutnih metastaza, u zavisnosti od zahvaćenosti limfnih čvorova, mogu primiti adjuvantnu (dodatnu) HT-u (5-FU i leukovorin) nakon operacije da bi se uklonili eventualni nevidljivi ostaci tumora, sprečio nastanak mikrometastaza i da bi se odložilo ponovno javljanje bolesti. Ukoliko limfni čvorovi nisu zahvaćeni (N0) ne daje se ni jedna terapija sve do pojave nekih znakova bolesti, kada se uključuje sistemska HT. Ako su zahvaćeni 1-3 limfna čvora (N1), klinički se procenjuje da li pacijent ide na adjuvantnu HT-u ili ne. Kod pacijenata sa  $\geq 4$  zahvaćena limfna čvora (N2), daje se obavezno adjuvantna HT.

Odgovor na adjuvantnu HT-u i EGFR-ciljanu terapiju metastatske bolesti je praćen na osnovu dužine vremena do pojave metastaza (TTM), odnosno stepena tumorskog odgovora (eng. *response rate* - RR).

**a) *Vreme do pojave metastaza u odnosu na prisustvo/odsustvo mutacija u KRAS i BRAF genima***

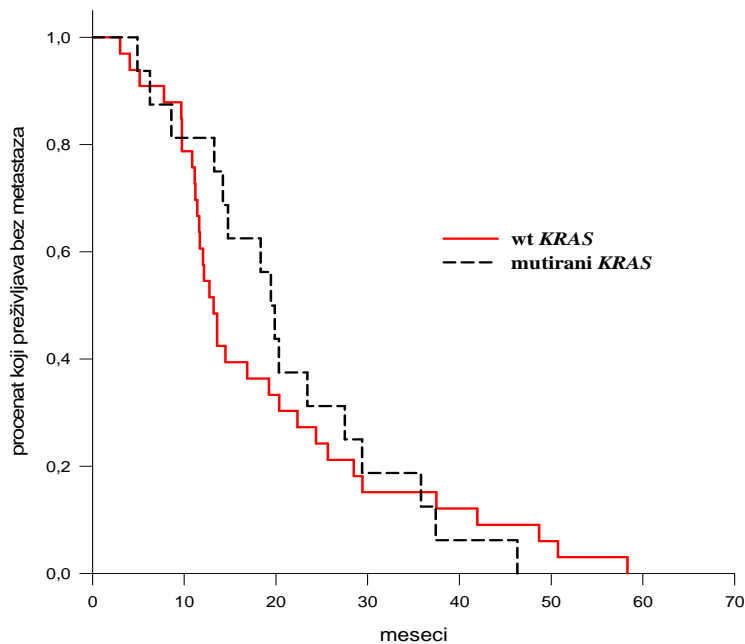
Od 87 bolesnika koji nakon hirurgije nisu imali znake bolesti, 16 bolesnika je bilo isključeno iz analize zbog nedostatka podataka, 22 bolesnika nisu primala adjuvantnu HT-u i 49 bolesnika je bilo podvrgnuto navedenom terapijskom režimu. Medijana vremena do pojave metastaza u celoj grupi (n=71) je bila 14 meseci (95% CI 12-20 meseci), s tim da se raspon kretao od jednog do 71-og meseca. Nakon 6 meseci 87,3% bolesnika je bilo bez metastaza, međutim taj broj se već nakon godinu dana smanjio na 56,3%. Posle 2 godine procenat bolesnika koji nemaju metastaze je bio 31%, nakon 3 godine 16,9%, a nakon 4 godine svega 4,2% (Slika 28).



Slika 28. Kaplan Meier kriva vremena do pojave metastaza u grupi pacijenata bez inicijalnih znakova bolesti.

Uloga prediktivnog faktora jeste da se na osnovu njegovog statusa može proceniti ishod terapijskog odgovora. S obzirom na ulogu *KRAS* i *BRAF* gena u regulaciji ćelijske proliferacije i apoptoze, pretpostavili smo da bi njihov mutacioni status mogao da bude faktor predviđanja odgovora na adjuvantnu HT-u.

U podgrupi od 49 pacijenata bez inicijalnih metastaza koji su primili adjuvantnu terapiju upoređivan je TTM kod pacijenata sa mutacijama u *KRAS* genu (n=16) u odnosu na grupu pacijenata bez mutacija u *KRAS* genu (n=33) (Slika 29). Iako je medijana vremena do pojave metastaza u grupi pacijenata sa mutacijama u *KRAS* genu bila duža u odnosu na grupu pacijenata sa wt *KRAS*-om (19,5 vs.13,2 meseci), razlika nije dostigla statističku značajnost (Log-Rank test;  $\chi^2_1=0,085$ ;  $p>0,05$ ).



Slika 29. Kaplan Meier krive vremena do pojave metastaza u odnosu na prisustvo/odsustvo mutacija u *KRAS* genu.

Kako je broj pacijenata sa mutiranim *BRAF* genom u ovom radu bio jako mali (n=1), nismo bili u mogućnosti da korelišemo mutacioni status tog gena sa TTM parametrom.

**b) Stepen tumorskog odgovora (RR) u odnosu na prisustvo/odsustvo mutacija u *BRAF* genu**

Za bolesnike koje su u toku ili po primljenoj terapiji izgubili vidljive znake bolesti kaže se da su kompletno odgovorili na terapiju (eng. *complete response* - CR), dok za one kod kojih je redukcija tumorske mase bila za 30% ili više smatra se da su delimično odgovorili na terapiju (eng. *partial response* - PR). Bolesnici kod kojih nije bilo promena ili je redukcija tumorske mase bila manja od 30% imaju stabilnu bolest (eng. *stable disease* - SD). Kod ostalih bolesnika je došlo do širenja bolesti (eng. *progressive disease* - PD). Stepenn tumorskog/terapijskog odgovora (RR) se meri kao procenat obolelih koji su u toku ili nakon primljene terapije imali CR ili PR.

Svi bolesnici u ovoj studiji su imali metastatsku bolest u trenutku kada im je testiran *KRAS* gen na prisustvo mutacija. S obzirom da su svi do tada primali neku vrstu hemioterapije i da su one bile vrlo različite u zavisnosti od bolesnika, nismo mogli da procenjujemo RR na HT-u. Međutim, svi bolesnici sa wt *KRAS* statusom gena su bili kandidati za ciljanu molekularnu terapiju cetuksimabom (u kombinaciji sa irinotekanom) i kod njih smo želeli da utvrdimo RR.

Od 122 bolesnika sa wt *KRAS*-om, za njih 50 nismo imali podatke o tome da li su počeli sa ovom terapijom ili kakav im je odgovor bio. Od preostala 72 bolesnika, ni jedan nije postigao kompletan odgovor na terapiju, 11 je imalo PR, 34 SD i 27 PD. Prema tome, 15,3% (11/72) bolesnika je postiglo terapijski odgovor (RR). S obzirom na mali broj bolesnika koji su postigli RR, kao i da je među njima svih 11 imalo wt *BRAF*, nismo bili u mogućnosti da povežemo date parametre.



## 5. DISKUSIJA

Kolorektalni kancer pripada grupi maligniteta gastrointestinalnog sistema i danas predstavlja globalni zdravstveni problem. Nalazi se na četvrtom mestu uzroka smrti usled kancera. Širom sveta CRC čini 10% svih kancera koji se javljaju u muškaraca i 9,4% u žena. Takođe je i treći najčešće dijagnostikovani kancer kod muškaraca, odmah iza kancera pluća i prostate, odnosno drugi po redu kod žena, nakon tumora dojke. Skoro 60% slučajeva se javlja u razvijenim delovima sveta (GLOBOCAN 2008).

Stope incidence variraju i do deset puta kod oba pola na svetskom nivou: najviše stope su procenjene u Australiji/Novom Zelandu, severnoj Americi i zapadnoj Evropi, najniže u Africi (izuzevši južnu Afriku) i južnoj-centralnoj Aziji, dok su u Latinskoj Americi prosečne. Pored toga, značajno su više kod muškaraca u odnosu na žene (GLOBOCAN 2008). Stope incidence CRC-a se rapidno povećavaju u nekoliko regiona koji su u prošlosti bili u manjem riziku, među kojima su Španija i zemlje istočne Azije i istočne Evrope. Značajno je i da su stope među muškarcima u Češkoj Republici i Japanu već premašile najviše stope incidence u SAD, Kanadi i Australiji, gde su one u padu ili se ustaljuju (pregled u Center et al., 2009). Smatra se da ovi nepovoljni trendovi oslikavaju kombinaciju faktora rizika: promene stila ishrane, gojaznosti i povećane rasprostranjenosti pušenja (pregled u Center et al., 2009; de Kok et al., 2008; Garcia-Alvarez et al., 2007). SAD su jedina zemlja u kojoj incidenca značajno opada poslednjih godina kod oba pola usled dobro razvijenih programa preventive i praćenja (Edwards et al., 2010).

Kada je stopa mortaliteta u pitanju, ona je nešto niža kod žena nego kod muškaraca, osim za region Kariba. Varijabilnost ove stope je manja na svetskom nivou (šest puta kod muškaraca i pet puta kod žena), pri čemu su najveće standardizovane stope mortaliteta za oba pola procenjene u centralnoj i istočnoj Evropi (20,1/100 000 za muškarce, 12,2/100 000 za žene), a najniže u centralnoj Africi (3,5 i 2,7 respektivno) (GLOBOCAN, 2008). Dok se smrtnost od CRC-a smanjuje u zemljama Zapada, uglavnom usled boljeg lečenja i ranijeg otkrivanja kancera, stope smrtnosti nastavljaju da rastu u mnogim zemljama sa ograničenim resursima i lošijim zdravstvenim

sistemom, naročito u centralnoj i južnoj Americi i istočnoj Evropi (pregled u Center et al., 2009a; Edwards et al., 2010).

U Srbiji maligni tumori kolorektuma predstavljaju drugu najčešću lokalizaciju malignih tumora i drugi najčešći uzrok smrti usled kancera, odmah posle raka pluća kod muškaraca i raka dojke kod žena (Nacionalni program za prevenciju kolorektalnog karcinoma). Stopa incidence se nalazi među višim u svetu i iznosi 19,9 na 100 000 muškaraca i 11,2 na 100 000 žena (ASR-W) (Registar za rak u centralnoj Srbiji, 2011). Na osnovu podataka iz 2008. godine, od zemalja u regionu sličnu stopu incidence imaju Rumunija, Bugarska i Makedonija, dok smo po stopi mortaliteta jedino slični Bugarskoj (GLOBOCAN, 2008). Prema podacima Republičkog zavoda za statistiku za period od 1997-2010. godine zabeležen je porast mortaliteta u našoj zemlji od 16% usled CRC-a, pri čemu standardizovane (ASR-W) stope mortaliteta iznose 9,4 na 100 000 muškaraca i 5,9 na 100 000 žena (Republički zavod za statistiku, 2010).

Nizak socijalni i ekonomski status kao i nepostojanje svesti o bolesti i edukacije stanovništva su značajni razlozi koji doprinose visokoj incidenci i mortalitetu u slabije razvijenim delovima sveta. Moguće je da su ovo neki od razloga za tako visok procenat CRC-a u Srbiji. Faktori rizika koji doprinose nastanku CRC-a su uglavnom poznati (starost, sredinski faktori, pozitivna porodična ili lična istorija bolesti), a neke od njih je moguće i modifikovati: pušenje, fizičku neaktivnost, gojaznost, ishranu crvenim obrađenim mesom i preteranu konzumaciju alkohola (pregled u Boyle and Langman, 2000; Ferrari et al., 2007). Regularni *skrining* za CRC predstavlja jedno od najmoćnijih oružja u njegovoj prevenciji. Programi ranog otkrivanja raka kolorektuma su se pokazali svrsishodnima zbog toga što se ovaj tip kancera najčešće javlja iz dobroćudnih polipa – adenoma tokom procesa kancerogeneze koji traje ne manje od deset godina. Ovakav dugotrajan proces omogućava pravovremeno otkrivanje navedenih promena. Otkrivanje bolesti u prekanceroznom stadijumu ili stadijumu lokalizovane bolesti omogućava izlečenje u više od 85% obolelih (Nacionalni program za prevenciju kolorektalnog karcinoma). U Srbiji Nacionalni program za prevenciju kolorektalnog karcinoma postoji još od 2008. godine, ali njegova primena u praksi nije još uvek zaživela.

Hirurgija predstavlja najefikasniji način lečenja ovog maligniteta, naročito kod pacijenata koji nemaju udaljene metastaze. U trenutku resekcije oko 30-40% pacijenata su dijagnostikovani u stadijumu II (Zlobec et al., 2007). Uprkos napredovanju hirurških

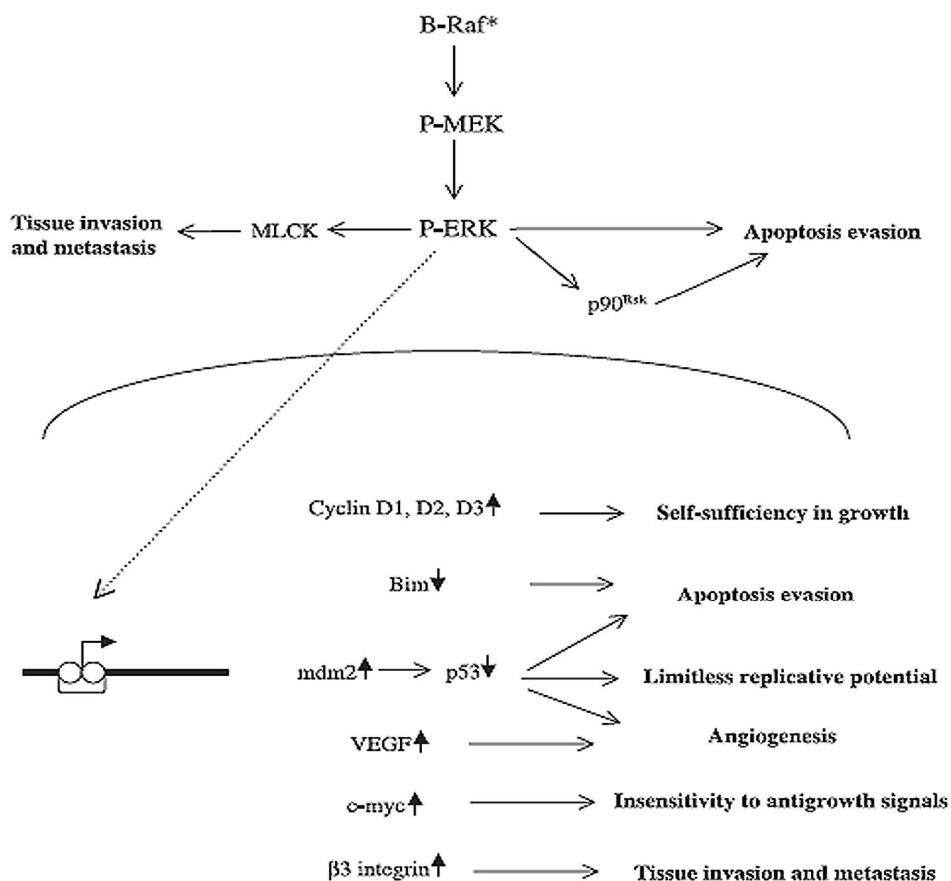
tehnika i upotrebi adjuvantne i sistemske HT-e, radioterapije i u novije vreme biološke ciljane terapije, petogodišnje preživljavanje pacijenata sa ranim stadijumom CRC-a (bez invazije i metastaza u limfnim čvorovima) je oko 90%. Međutim, ovaj procenat opada na 65% kod tumora koji su se regionalno proširili i dalje pada na 10% kod kasnih stadijuma bolesti, gde je tumor metastazirao na udaljena mesta (Zlobec and Lugli, 2008). S obzirom da je CRC vrlo heterogena bolest u svojoj osnovi, efikasnost navedenih terapijskih režima zavisi i od preciznog definisanja podgrupa pacijenata koje će imati najbolji odgovor. Razvojem molekularne dijagnostike i ciljanih terapija, lečenje kancera se polako pomera sa tradicionalnog pristupa „pokušaja i greške“ na nivo koji podrazumeva personalizovani pristup (pregled u Deschoolmeester et al., 2010). Shodno tome neophodno je identifikovati markere koji će biti pokazatelji agresivnosti tumora i prediktori odgovora na određenu vrstu terapije. Poslednjih godina je aktivna „potraga“ za biomarkerima koji bi definisali grupu pacijenata sa stadijumima II i III za adjuvantnu HT-u i grupu pacijenata sa ovim ili stadijumom IV za sistemska i/ili ciljanu molekularnu terapiju (pregled u De Roock et al., 2009). U svakodnevnoj praksi razlika između prognostičkih i prediktivnih markera često nije jednoznačna i mnogi markeri su zapravo kombinacija oba tipa. U poslednje 2 decenije je ispitivano na stotine biomarkera kod CRC-a (Uvod, Slika 4), ali samo je *KRAS* gen dospelo u kliničku praksu za terapiju metastatske bolesti (pregled u Deschoolmeester et al., 2010).

Kancerogeneza se tradicionalno smatra višestepenim procesom u kome se genskim alteracijama u svakom koraku normalne ćelije transformišu u maligne. Na molekularnom nivou ova progresija uključuje niz mutacija kojima ćelije stiču prednost u rastu i omogućava im se klonalna ekspanzija. Naposletku, mutacije mogu doprineti kako nekontrolisanoj proliferaciji tako i gubitku intraćelijske adhezije, ekspresiji enzima za razgradnju bazalne membrane, povećanoj ćelijskoj pokretljivosti i sposobnosti da preživi na udaljenim lokacijama. U najjednostavnijem slučaju prognoza tumora bi zavisila od broja i tipa mutacija koje su se akumulirale, pri čemu svaka od njih ima određenu ulogu u progresiji CRC-a (pregled u De Roock et al., 2009). Međutim, noviji podaci i otkrića o tumorskim stem ćelijama, heterogenosti tumora i odnosu tumorskih ćelija sa okolinom, ukazuju na komplikovaniji model razvoja kancera. Budućnost otkrivanja novih biomarkera bi bila klasifikacija pacijenata u podgrupe na osnovu sličnosti njihovih genskih profila, koristeći *microarray* ili druge tehnologije genskog

profilisanja. Smatra se da dve trećine sporadičnih CRC-a ima mutacije *APC* gena koje su dovoljne da pokrenu rast benignih tumora ali ne i da omoguće ovim tumorima progresiju u agresivnije forme (Segditsas and Tomlinson, 2006). Za ovaj korak neophodni su dodatni genetički i epigenetički događaji. Pokazano je da se CRC-i odlikuju dodatnom genomskom nestabilnošću (hromozomska nestabilnost i MSI) koja za posledicu ima inaktivaciju tumor-supresorskih gena i aktivaciju protoonkogenata. Među protoonkogenima koji se aktiviraju rano tokom kolorektalne kancerogeneze nalaze se dva gena iz EGFR signalnog puta, *KRAS* i *BRAF*. Ipak, primećeno je da se mutacije u ovim genima ne javljaju zajedno i da tumori koji ih nose najverovatnije nemaju isti put nastanka (pregled u Huang et al., 2011; Rosenberg et al., 2007; Shen et al., 2007). Objašnjenja ove teorije se mogu naći i u sledeće opisanim radovima. Iako biološke i kliničke osobine CRC-a povezanih sa CIMP-om nisu do kraja razjašnjene, nesumljivo je da ove epigenetske promene izdvajaju grupu tumora koja ima jedinstvene molekularne profile i etiologiju. Wynter i saradnici (2004) su ispitujući ovu grupu tumora pokazali da postoje bar dva puta nastanka kolorektalnog kancera. Jedna grupa tumora nastaje putem mutacija u *BRAF* genu i metilacije *hMLH1*, dok se druga karakteriše mutacijama *KRAS*-a umesto *BRAF*-a i hipermetilacijom promotora *MGMT* gena umesto *hMLH1*. Takođe je pokazano i da je metilacija *MGMT* gena povezana sa MSI-L (eng. *microsatellite instability - low* - MSI-L) (Whitehall et al., 2001), kao i da je pojava *KRAS* mutacija retka kod MSI-H tumora (Samowitz et al., 2001).

Wang i saradnici (2006) su u svojoj studiji na uzorcima kolorektalnih adenoma predložili da aktivirani *KRAS* onkogen može igrati veoma važnu ulogu u daljoj kolorektalnoj karcinogenezi preko svojih nizvodnih ciljnih molekula. Analizom genske ekspresije su utvrdili grupu od šest gena (*BCL2*, *H2AFZ*, *RAP1B*, *TBX19*, *E2F4*, *MMP1*) visoko eksprimiranih u adenomima, za koje je poznato da učestvuju u regulaciji ćelijskog rasta i diferencijacije. Na osnovu uloge koju imaju u ćeliji, pretpostavili su da ovi geni mogu značajno doprineti mehanizmu koji leži u osnovi tumorogeneze CRC-a. Haigis i saradnici (2008) su pronašli u svom radu da ekspresija mutiranog *KRAS*-a indukuje hiperproliferaciju u epitelu kolona, ali da nije dovoljna da dovede do neoplazije. U kombinaciji sa mutacijom *APC* gena, mutirani *KRAS* ipak promoviraju tumorsku progresiju, što je u skladu sa prethodno pomenutom činjenicom da se mutacije *KRAS* gena javljaju nakon promena u *APC*-u.

Aktivirani *BRAF* aleli mogu konstitutivno da vrše aktivaciju MEK/ERK (MAPK) puta, što utiče na tumorsku progresiju na transkripcionom i netranskripcionom nivou (Slika 30).



Slika 30. Uloga aktiviranih *BRAF* alela u procesima nastanka kancera (preuzeto iz pregleda u Mercer and Pritchard, 2003).

ERK u citoplazmi može da fosforiliše p90RSK, koji dalje inaktivacijom BAD-a i aktivacijom CREB-a (transkripcioni faktori uključeni u indukciju ekspresije gena vezanih sa ćelijskim preživljavanjem) omogućava izbegavanje apoptoze. Aktivirani ERK može i da interaguje sa lakim lancem miozin kinaze (MLCK), što ima efekte na tkivnu invaziju i metastaziranje. U jedru, ERK protein utiče na ekspresiju različitih gena koji regulišu glavne procese u kancerogenezi. Preko povećane ekspresije ciklina D tipa reguliše se rast ćelija, preko c-MYC-a nesenzitivnost na signale koji sprečavaju rast, preko VEGF-a kontroliše se angiogeneza i preko integrina invazivni potencijal, dok smanjivanje ekspresije *BIM* gena ima uticaj na preživljavanje i apoptozu. Nivo

ekspresije *TP53* gena je regulisan ERK-om preko indukcije ekspresije MDM2, proteina uključenog u inhibiciju *TP53* aktivnosti (pregled u Mercer and Pritchard, 2003).

U ovoj disertaciji smo se opredelili za izučavanje promena u *KRAS* i *BRAF* genu zbog njihove uloge u regulaciji širokog opsega ćelijskih procesa čijim nepravilnim odvijanjem može nastati maligni fenotip. Takođe, mutacije ovih gena predstavljaju molekularne markere odgovora na ciljanu terapiju metastatskog CRC-a antitelima prvenstveno, dok su rezultati o njihovoj ulozi kao prognostičkih i prediktivnih faktora adjuvantne i sistemske HT-e kontradiktorni. Povezanost prisustva/odsustva i tipova mutacija u navedenim genima sa kliničko-histopatološkim karakteristikama karcinoma kolorektuma i tokom bolesti nije razjašnjena.

## **5.1 UČESTALOST MUTACIJA U *KRAS* GENU U KARCINOMIMA KOLOREKTUMA**

Mutacije u *KRAS* genu igraju važnu ulogu u patogenezi mnogih tipova kancera. Prema literaturnim podacima, mutirana forma *KRAS* gena je zastupljena u preko 80% karcinoma pankreasa, u 30-70% kolorektalnih karcinoma i karcinoma pluća, i u manjim procentima kod endometrijalnog kancera i kancera grlića materice, tumora dojke, jetre i bešike, mijelodnim leukemijama (Bos, 1989; Downward, 2003; Forbes et al., 2008; Herreros-Villanueva et al., 2011). Na osnovu integrisanih podataka iz literature objedinjenih u COSMIC bazi procenat zastupljenosti *KRAS* mutacija u kancerima je nešto drugačiji: 57% kod kancera pankreasa, 35% kod kolorektalnog kancera, 28% u kanceru žučnog trakta, 16% u kanceru pluća itd. (Forbes et al., 2008). Mogući razlog ovih procentualnih razlika jeste korišćenje različitih metoda detekcije mutacija.

Mutacije koje se javljaju kod CRC-a su u preko 95% slučajeva locirane u dva susedna kodona drugog egzona, 12-om i 13-om, i to u oko 82% i 17% respektivno (Edkins et al., 2006; Kotoula et al., 2009; pregled u Linardou et al., 2011; pregled u Van Krieken et al., 2008). Kada je u pitanju detekcija mutacija, metoda izbora „zlatni standard“ jeste direktno sekvenciranje. Ovom metodom moguće je ispitati ceo gen na prisustvo kako poznatih, tako i novih genskih alteracija. S obzirom da je metoda dosta skupa, dugotrajna i da je za detekciju mutacija neophodno 10-30% mutiranog tkiva, u

novije vreme su sve češće u upotrebi metode bazirane na PCR-u (Kotoula et al., 2009). Takođe, u slučaju *KRAS* gena postoji mutacioni „*hot spot*“ u kome su locirane skoro sve mutacije koje se javljaju kod CRC-a, pa nema potrebe kontrolisati celu sekvencu gena. Treba napomenuti i činjenicu da je DNK iz trajnih histoloških preparata, koji predstavljaju najčešći izvor tkiva za analizu CRC-a, lošijeg kvaliteta i ponekada malog kvantiteta (u zavisnosti od procenta tumorskog tkiva). Imajući sve pomenuto u vidu, u ovom radu smo se opredelili za metode koje detektuju i 1% mutanata u okviru wt genomske DNK, čije je vreme izvođenja kraće i čija je upotreba dijagnostički validirana, metode alel-specifičnog *real-time* PCR-a i PCR-a u kombinaciji sa reverznom hibridizacijom. Studije koje su se bavile ispitivanjem učestalosti mutacija u *KRAS* genu u CRC-u pokazale su širok opseg vrednosti, od 20 do 61%, kao i raznovrsnost korišćenih tehnika. Pregled ovih studija dat je u Tabeli 9.

Analizom 188 parafinskih uzoraka CRC-a u ovom radu dobijena je učestalost *KRAS* mutacija od 35,1% u sekvencama kodona 12 i 13. Procenat mutacija po kodonima je bio 89,4% u kodonu 12 i 10,6% u kodonu 13. Dobijene učestalosti su u skladu sa literaturnim podacima.

Tabela 9. Učestalost mutacija u *KRAS* genu u kolorektalnim karcinomima i metode detekcije - pregled literature. Metode za detekciju mutacija *KRAS* gena bile su: PCR; DS (eng. *direct sequencing*); SSCP (eng. *single-strand conformation polymorphism*); AS-PCR (eng. *allele specific PCR*); RFLP (eng. *restriction fragment length polymorphism*); REMS-PCR (eng. *restriction endonuclease-mediated specific PCR*); TMA (eng. *tissue microarray*); qRTPCR (eng. *quantitative real-time PCR*); LDR (eng. *ligase detection reaction*).

Studija	Broj pacijenata	Metodologija	% <i>KRAS</i> mutacija
Halter et al., 1992	71	DS	54
Benhattar et al., 1993	99	PCR	71
Bell et al., 1993	100	SSCP	24
Lee et al., 1996	64	PCR/DS	20
Ahnen et al., 1998	229	SSCP/DS	40
Cerottini et al., 1998	989	AS-PCR/SSCP	29,6
Hardingham et al., 1998	100	SSCP/DS	35

Tabela 9. nastavak

Liang et al., 1999	166	RFLP	43
Tortola et al., 1999	140	RFLP	41
Pajkos et al., 2000	88	PCR	61,3
Samowitz et al., 2000	1413	DS	31,8
Belly et al., 2001	106	REMS-PCR	43,3
Esteller et al., 2001	115	SSCP	38
Font et al., 2001	114	PCR/alel-specificna hibridizacija	29
Bazan et al., 2002	160	PCR/SSCP	46
Linnemann et al., 2004	121	PCR/RFLP	44,6
González-Aguilera et al., 2004	77	RFLP/PCR	35
Poehlmann et al., 2007	65	Pirosekvenciranje	29
Di Fiore et al., 2007	59	DS	37
Frattini et al., 2007	27	DS	37
De Roock et al., 2008	113	DS	40,7
Lièvre et al., 2008	89	Esej alelske diskriminacije	27
Etienne-Grimaldi et al., 2008	93	PCR/RFLP	38,7
Karapetis et al., 2008	394	DS	42,3
Freeman et al., 2008	62	DS	38,7
Sartore-Bianchi et al., 2009	132	DS	26,5
Sohn et al., 2009	66	DS	40,9
Richman et al., 2009	711	Pirosekvenciranje	43
Abubaker et al., 2009	285	DS/TMA/qRT-PCR	28,1
Nash et al., 2010	188	PCR/LDR	27
Nash et al., 2010a	532	PCR/LDR	36

## 5.2 TIP MUTACIJA U *KRAS* GENU U KARCINOMIMA KOLOREKTUMA

Spektar mutacija koje se javljaju u *KRAS* genu je specifičan za tip tumora. Iako CRC-i imaju mutacije u kodonima 12 i 13, mutirani tumori pankreasa skoro uvek nose mutacije samo u kodonu 12, dok u slučaju nesitnoćelijskog kancera pluća preko 90% njih je locirano takođe u ovom kodonu (De Roock et al., 2010).

Mutacije *KRAS* gena koje se javljaju u CRC-ima su u preko 99,6% slučajeva tipa *missense* substitucija (COSMIC baza) (Forbes et al., 2008). Ove mutacije menjaju značenje kodona i dovode do ugradnje druge AK-e u protein. Kao što je već pomenuto,



u skoro svim slučajevima mutacije se javljaju u dva susedna kodona koja kodiraju za dva uzastopna glicinska ostatka u katalitičkom domenu KRAS proteina (Sameer et al., 2009). U zavisnosti kojom AK-om je izvršena zamena, može doći do promene GTP-azne aktivnosti proteina i/ili njegove sposobnosti da interaguje sa svojim regulatornim proteinima. Svaka od ovih promena rezultuje permanentno aktivnom formom KRAS proteina. Za razliku od wt proteina koji se inaktivira za kratko vreme, mutirana forma je sposobna da kontinuirano aktivira nizvodni signalni put i u odsustvu uzvodnog stimulusa.

U našoj studiji detektovano je sedam od deset testiranih tipova *KRAS* mutacija, od toga šest u kodonu 12 i jedna u kodonu 13. Inače, ovih sedam mutacija su i najčešće analizirane i detektovane prema literaturnim podacima. Raspodela mutacija koje smo identifikovali je takođe bila u skladu sa drugim studijama (Andreyev et al., 2001; Herreros-Villanueva et al., 2011; Ličar et al., 2011).

Tranzicije i transverzije predstavljaju generalno dve različite klase substitucija baznih parova koje mogu oslikavati razlike u genskim putevima signalizacije i/ili izloženosti karcinogenima. S toga, one mogu definisati različite grupe kolorektalnih kancera u pogledu biološkog ponašanja i drugih kliničkih parametara (Greenblatt et al., 1994). Najčešće detektovani tipovi mutacija u *KRAS* genu u svim humanim kancerima su G>A tranzicije i G>T transverzije (Liu et al., 2011). U našoj studiji na CRC-ima jedini detektovani tip tranzicije u oba kodona je bio G>A (59,1%), pri čemu je promena glicina u aspartat p.G12D (42,4%) bila najčešća od svih detektovanih mutacija. Dva tipa transverzija, G>T (28,8%) i G>C (12,1%), su nađena samo u kodonu 12, pri čemu je promena glicina u valin p.G12V (G>T) zauzimala drugo mesto po učestalosti (21,2%), dok je substitucija glicina argininom p.G12R (G>C) bila najmanje zastupljena (1,5%) među ukupnim detektovanim mutacijama. Dobijeni rezultati potvrđuju gore navedeni podatak iz rada Liu-a i saradnika, a u skladu su i sa podacima COSMIC baze vezanim za učestalost tranzicija i transverzija u CRC-ima (G>A – 53,3%; G>T – 36,3%; G>C – 9,3%) (Forbes et al., 2008).

Većina studija i terapijskih pristupa tretira *RAS* mutacije kao jedan entitet - gen je ili mutiran ili *wild-type*. Međutim, različiti tipovi *KRAS* mutacija mogu pokazivati suptilne razlike u svojoj sposobnosti signaliziranja sa nizvodnim efektorima, što može imati uticaj na proces kancerogeneze, njihovu ulogu kao „*driver*” mutacija i tumorski

odgovor na nove terapijske agense. Ipak, intermedijerni koraci između *KRAS* mutacija i finalne smrti kancerskih ćelija su još uvek nedovoljno ispitani kod CRC-a i potrebna su dalja istraživanja na ovom polju.

Kako je *RAS* gen jedan od najčešće mutiranih gena u humanim kancerima i signalizira u mnoštvu ćelijskih procesa, vrlo je verovatno da će pacijenti čiji tumori nose specifične mutacije ovog gena pokazivati razlike u preživljavanju, tumorskoj agresivnosti i odgovoru na hemioterapeutike. Razumevanje osobina pojedinačnih *RAS* mutacija u specifičnim tkivima će u budućnosti u mnogome pomoći da se personalizuje terapija kancera i da se obezbedi najbolji mogući ishod za pacijente.

### **5.3 UČESTALOST I TIP MUTACIJA U *BRAF* GENU U KARCINOMIMA KOLOREKTUMA**

Mutacije *BRAF* gena mogu se detektovati u širokom spektru tumora. Pregledom literature može se zaključiti da su *BRAF* mutacije identifikovane u oko 70% malignih melanoma, 10-15% CRC-a, i u manjim procentima kod glioma, sarkoma, kancera pluća, jajnika, štitne žlezde, dojke i jetre (Cohen et al., 2003; Davies et al., 2002; Herreros-Villanueva et al., 2011; Kumar et al., 2003; pregled u Vakiani and Solit, 2011; Rajagopalan et al., 2002; Singer et al., 2003; Wellbrock et al., 2004). Prema podacima COSMIC baze, 99% svih detektovanih *BRAF* mutacija je *missense* tipa. Najčešće su detektovane u kancerima kože (42%), štitne žlezde (38%), jajnika (12%), genitalnog trakta (12%), kolorektuma (12%), dok su u ostalim tipovima ređe (Forbes et al., 2008).

Iako su ove mutacije detektovane kod mnogih kancera, postoji trend u njihovoj pojavi kod tipova kancera u kojima je značajan procenat slučajeva sa *RAS* mutacijama (melanomi, CRC, granični kancer jajnika). Očigledna asocijacija između prisustva *RAS* i *BRAF* mutacija u sličnim tumorima sugeriše da se aktivacija RAS-RAF-MAP kinaznog puta može postići na različitim nivoima i da je ovaj put signalizacije aktiviran u značajnom broju slučajeva sa navedenim tipovima kancera. Manje od 1% uzoraka kancera sa *BRAF* mutacijama istovremeno ima *RAS* mutacije, pri čemu kod tih 1% kancera *BRAF* mutacije skoro nikada ne obuhvataju p.V600E mutaciju. S obzirom da se mutacije ovih gena ne javljaju u istom tumoru i da regulišu aktivaciju istog signalnog

puta, pretpostavlja se da *BRAF* i *KRAS* geni imaju isti tumorski efekat (Davies et al., 2002).

Visoka učestalost *BRAF* mutacija u melanomima može biti povezana sa biologijom samih melanocita. U melanocitima izmenjena regulacija cikličnog adenzin monofosfata (cAMP) vodi povećanoj proliferaciji i melanogenezi u odgovoru na UVB radijaciju (Halaban, 2000). Ova cAMP-zavisna signalna kaskada aktivira *BRAF* gen i dalje MAPK-u. Dakle, zbog uloge koju *BRAF* gen ima u glavnoj melanocitnoj signalnoj kaskadi koja kontroliše proliferaciju i diferencijaciju ćelija i zbog činjenice da je upravo ovaj gen mutiran u najvećem broju melanoma, moguće je da su zato njegove mutacije procentualno mnogo više zastupljene u melanomima u odnosu na druge tipove kancera (Davies et al., 2002).

U okviru CRC-a incidenca *BRAF* mutacija varira u zavisnosti od tipa tumora. Tumori kolona sa MSI-H/CIMP-H fenotipom imaju visoku stopu *BRAF* mutacija, dok je ona jako niska kod MSS/CIMP-negativnih tumora. Stopa mutacija *KRAS* gena u ovim tipovima tumora je potpuno obrnuta; niska kod MSI-H/CIMP-H tumora, a visoka kod MSS/CIMP-negativnih tumora (Sanchez et al., 2009). *BRAF* mutacije karakterišu *serrated*/CIMP put nastanka tumora i javljaju se u 90% sesilnih rektastih adenoma, primarnih prekursora lezija koje vode razvoju karcinoma (pregled u Worthley and Leggett, 2010). Iako se CIMP može detektovati i kod *KRAS* mutiranih tumora, obrazac osobina i nastanka je različit u odnosu na *BRAF* mutirane. Drugim rečima, *BRAF* mutacije mogu biti dominantne u mnoštvu "rektastih" kancera kolona, ali nisu jedine (Faris and Ryan, 2012). Za razliku od sporadičnih MSI tumora, HNPCC sindromi se odlikuju odsustvom *BRAF* genskih promena (pregled u Vakiani and Solit, 2011), a retke su i u rektalnim kancerima (Kalady et al., 2009). *BRAF* mutacije se smatraju ranim događajem u kolorektalnoj karcinogenezi i verovatno zahtevaju dodatne genske promene da bi dovele do ćelijske transformacije (pregled u Pratilas et al., 2011).

Mutacije u *BRAF* genu su najčešće lokalizovane u petlji bogatoj glicinom (P-petlja) u egzonu 11 i aktivacionom segmentu u egzonu 15 kinaznog domena. Substitucija valina u kodonu 600 egzona 15 glutamatskom kiselinom (p.V600E) čini oko 90% svih *BRAF missense* mutacija (oko 65 poznatih) koje se javljaju u humanim malignitetima (Davies et al., 2002; Kumar et al., 2003; pregled u Mercer and Pritchard, 2003; Roskoski et al., 2010). Ova mutacija uvodi negativno naelektrisanje u aktivacioni

segment proteina, što imitira fosforilaciju koja se tu inače odvija. Na ovaj način se favorizuje aktivna konformacija proteina (pregled u Mercer and Pritchard, 2003; Wan et al., 2004). Na osnovu rezultata genske ekspresione analize, pokazan je drugačiji spektar gena koji su asocirani sa p.V600E mutacijom u CRC-u u odnosu na onaj u melanomima (Popovici et al., 2012). Ovakav rezultat ukazuje da postoji potreba za boljim razumevanjem tkivno-specifične biologije, a shodno tome i za primenom različite ciljane terapije. Nije čudno da *BRAF*-specifični inhibitori mogu biti jako uspešni u lečenju melanoma, a potpuno nekorisni u terapiji CRC-a (Kefford et al., 2010; Kopetz et al., 2010).

U vremenu ciljane kancerske terapije, molekularna detekcija pojedinih genetičkih markera u tumorima omogućava individualizaciju lečenja pacijenata. Zbog značaja detekcije *BRAF* mutacija pri dijagnozi kancera, prognozi i potencijalnoj prediktivnoj ulozi, pouzdan dijagnostički test može uticati na pravilnu kliničku dijagnozu i odluke u budućem lečenju. Do sada je u literaturi opisano više metoda detekcije ove mutacije u CRC-ima uključujući: SSCP, sekvenciranje, *TaqMan*-bazirani i alel-specifični *real-time* PCR, pirosekvenciranje i oligonukleotidni *microarray* (Benlloch et al., 2006; Domingo et al., 2005; Jarry et al., 2004; Ikehara et al., 2005; Kim et al., 2007). Kao što smo već pomenuli, najčešća metoda izbora pri detekciji mutacija uopšte je direktno sekvenciranje, međutim kako se u najvećem broju slučajeva detektuje samo p.V600E mutacija nije neophodno analizirati ceo gen. S obzirom na vreme neophodno za njeno izvođenje i na cenu analize, odlučili smo se da sve uzorke prvo proverimo analizom krive topljenja (HRM). Ova metoda je razvijena poslednjih godina i pokazala se primenljivom u detekciji klinički važnih mutacija (Holden et al., 2007; Simi et al., 2008; Vandersteen et al., 2007; Willmore-Payne et al., 2005). Metoda se izvodi u zatvorenom sistemu, ne zahteva post-PCR analize, omogućava istovremeno testiranje velikog broja uzoraka u kratkom vremenskom periodu i cena je pristupačnija. Studije više autora pokazuju da se senzitivnost ove metode može porediti sa senzitivnošću alel-specifičnog *real-time* PCR-a, i da obe metode mogu detektovati i 1% mutirane DNK kada se radi sa ćelijskim linijama (Jarry et al., 2004; Pichler et al., 2009). Međutim, kritičan korak u HRM analizi mutacija iz tumora jeste optimizacija PCR reakcije. Za jasno razlikovanje mutiranog od wt uzorka važno je da se topi visoko specifičan PCR produkt. Prisustvo nespecifičnih produkata, inhibitora ili previsoke

koncentracije soli može u mnogome poremetiti ponašanje krive topljenja. Ovo je naročito važno u analizi tkiva koja imaju mali procenat DNK, kao i tkiva iz parafinskih kalupa u kojima je DNK hemijski modifikovana u procesu fiksacije formalinom (Srinivasan et al., 2002). U radu Do-a i saradnika (2008) je pokazano prisustvo lažno pozitivnih rezultata HRM analize *KRAS* i *EGFR* mutacija u parafinskom tkivu kancera pluća. Njihovi rezultati naglašavaju važnost korišćenja kraćih amplifikata iz parafinskog tkiva kako bi se povećala pouzdanost ove metode. U svom drugom radu, gde su testirali razlike u dobijenim rezultatima HRM metodom i sekvenciranjem, su zaključili da one potiču od PCR artefakata kod HRM-a (Do and Dobrovic, 2009). Ovi artefakti nastaju zbog lošijeg kvaliteta DNK u analizi ili male količine uzorka. Tom prilikom se umnožava samo mali broj kopija što rezultuje najčešće kasnom amplifikacijom i heterogenošću kriva topljenja. Korišćenjem kvalitetnije DNK (iz periferne krvi ili svežeg tkiva tumora) nema pojave PCR artefakata. Ovako dobijene rezultate treba ponoviti iz nezavisno umnoženih uzoraka i potvrditi sekvenciranjem. Dok većina autora koristi metodu HRM-a kao preoskrining, a dobijene pozitivne uzorke proverava i potvrđuje sekvenciranjem (Cacev et al., 2011; Do et al., 2008; Ličar et al., 2011; Pichler et al., 2009), neki od autora zastupaju stav da metoda sekvenciranja sa svojom senzitivnošću nije adekvatna za ovu potvrdu (Borràs et al., 2011). Do i kolege (2009) su u svom, već pomenutom, radu zaključili da se dobrom optimizacijom PCR-a kod problematičnih uzoraka može dobiti produkt koji je adekvatan za sekvenciranje.

U našoj studiji preoskrining mutacije *BRAF* p.V600E urađen je HRM metodom u grupi bolesnika sa CRC-om kojima je prethodno potvrđen wt *KRAS* status. Kao rezultat ovog koraka smo dobili 83 wt *BRAF* uzorka, 4 heterozigota i 14 izmenjenih uzoraka za koje nismo imali adekvatnu kontrolu kako bi ih identifikovali. Takođe, ovom metodom nismo uspeli da dobijemo rezultat za neke pacijente (n=21). Razlog nemogućnosti detektovanja mutacija kod ovih pacijenata je verovatno loš kvalitet izolovane DNK iz parafina. S obzirom da su prajmeri koji su korišćeni u analizi obuhvatali ceo egzon 15 i delove introna, prepostavili smo da je moguće da se kod pacijenata čiji se profili krive topljenja razlikuju od naših kontrola jave neke druge mnogo ređe mutacije na istoj ili različitoj poziciji, ili da postoje polimorfizmi ove sekvence. Bilo koja promena u umnoženoj sekvenci može dovesti do drugačijeg izgleda krive topljenja. Takođe, usled nedostatka pozitivne kontrole za homozigota nismo mogli

da budemo sigurni da neki od izmenjenih uzoraka možda ne nosi ovu kombinaciju mutiranih *BRAF* alela.

U sledećem koraku, metodom sekvenciranja smo proveravali sve bolesnike kod kojih smo detektovali mutaciju ili promenu, kao i one za koje nismo uopšte dobili rezultat. Uspeli smo da potvrdimo samo jedan heterozigot (od 4), dok su preostala 3 bila wt za p.V600E mutaciju. Od 14 izmenjenih uzoraka, 11 je bilo wt za datu mutaciju, a kod 3 uzorka nismo uspeli da dobijemo rezultat. Među izmenjenim uzorcima detektovali smo dve intronske promene (IVS14-7 A>T i IVS14-5 C>T) kod jednog wt *BRAF* bolesnika koje su mogle da dovedu do promene profila krive topljenja na HRM-u. Pregledom literature nismo pronašli klinički značaj ovih promena. Od 21-og bolesnika za kojeg nismo imali rezultat prethodne metode, sekvenciranjem smo utvrdili samo za 3 bolesnika wt status ove mutacije, dok kod ostalih analiza nije uspela. Dakle, od početnih 122 bolesnika sa wt *KRAS* genom, 21-om bolesniku nismo uspeli da utvrdimo *BRAF* mutacioni status, 100 (99%) bolesnika je imalo wt *BRAF* i samo jedan (1%) bolesnik je bio heterozigot za p.V600E *BRAF* mutaciju.

Rezultat koji smo dobili za našu populaciju se donekle razlikuje od rezultata ostalih studija gde se u proseku ove mutacije detektuju u 10-15% slučajeva sa CRC-om (COSMIC baza). U literaturi ima i studija koje su detektovale *BRAF* p.V600E mutaciju u manjem procentu (3-5%) (Cacev et al., 2011; Ličar et al., 2011; Pichler et al., 2009). Dobijena razlika u procentu mutacija može biti zbog primene različitih metoda detekcije mutacija u studijama. Kako HRM analiza ima veliku senzitivnost, naročito kada se koriste ćelijske linije, mi smo se u ovom radu opredelili za njenu primenu pri detekciji mutacije u *BRAF* genu. Međutim, zbog lošijeg kvaliteta DNK i njene male količine u pojedinim uzorcima (u zavisnosti od veličine tumorskog tkiva) odlučili smo da nejasne rezultate proverimo metodom sekvenciranja. Razlike koje se uočavaju u rezultatima primenjenih metoda u našoj analizi moguće je da potiču od nedovoljne senzitivnosti metode sekvenciranja da detektuje sve prethodno pronađene promene HRM analizom. S toga, dobijene rezultate bi trebalo uzeti sa rezervom.

## 5.4 PROMENE *KRAS* I *BRAF* GENA U NASTANKU MALIGNOG FENOTIPA I PROGNOZI CRC-a

Mnogobrojne studije koje su do sada ispitivale prognostički značaj *KRAS* mutacija su dale konfliktne rezultate (pregled u Deschoolmeester et al., 2010). Većina njih je pokazala da su mutacije *KRAS* gena indikator lošije prognoze, ukazujući na potrebu za adjuvantnom terapijom, ali postoji velika varijabilnost među njima u specifičnim rezultatima. Pregled nekih od studija koje su se bavile ovom tematikom i rezultata do kojih su došle dat je u tabeli 10.

Tabela 10. Pregled studija u kojima je *KRAS* negativan prognostički faktor.

Studija	Prognostički značaj
<b>Stadijum-zavisne</b>	
Halter et al., 1992	Loša prognoza u stadijumu IV
Benhattar et al., 1993	Samo kod uznapredovale bolesti
Lee et al., 1996	Samo kod stadijuma I i II
Ahnen et al., 1998	Samo kod stadijuma II
Pajkos et al., 2000	Loša prognoza u <i>Dukes</i> B i C stadijumu
Belly et al., 2001	<i>KRAS</i> mutacije kod N0 pacijenata sa stadijumom II mogu identifikovati subgrupu sklonu rekurentnoj ili metastatskoj bolesti
Font et al., 2001	Kod agresivnije bolesti, uglavnom u stadijumu II
Richman et al., 2009	Mutacije u <i>KRAS</i> -u loš prognostički faktor za OS
<b>Tip mutacije</b>	
Moerkerk et al., 1994	G>T i G>C transverzije povezane sa metastatskim ponašanjem CRC-a; tip i broj <i>KRAS</i> mutacija utiče na biološko ponašanje CRC-a
Andreyev et al., 1998	Mutacija p.G12V značajno povećava rizik od recidiva i smrti
Cerottini et al., 1998	Mutacije kodona 12 i 13 imaju prognostički značaj
Samowitz et al., 2000	Mutacije češće zastupljene u desnom nego u levom CRC-u; kodon 13 G>A promena najavljuje goru prognozu
Andreyev et al., 2001	Mutacija p.G12V značajno povećava rizik od recidiva i smrti, pri čemu je taj efekat veći kod <i>Dukes</i> C tumora
Bazan et al., 2002	Kodon 12 mutacije igraju ulogu kod mucinoznog tipa CRC-a; kodon 13 mutacije mogu imati značaja po pitanju ishoda bolesti
Poehlmann et al., 2007	Mutacije kodona 12 povezane sa lošijom prognozom
Abubaker et al., 2009	Kodon 12 mutacije asocirane sa lošijim ishodom

Tabela 10. nastavak

<b>Recidiv bolesti</b>	
Linnemann et al., 2004	Pacijenti sa mutacijama u primarnom tumoru imaju značajno nižu verovatnoću preživljavanja i veći rizik za javljanje sekundarnog CRC-a
Nash et al., 2010	Mutacije asocirane sa bržim i agresivnijim ponašanjem kolorektalnih metastaza u jetri
<b>Kombinacija <i>KRAS</i> mutacija sa drugim molekularnim promenama</b>	
Bell et al., 1993	Samo mutacije kodona 12 analizirane; kombinacija <i>KRAS</i> i <i>TP53</i> mutacija daje lošiju prognozu
Hardingham et al., 1998	Pacijenti sa <i>KRAS</i> i <i>TP53</i> mutacijama imaju lošiju prognozu u odnosu na samo <i>TP53</i> pozitivne
Liang et al., 1999	Samo rektalni kanceri analizirani; kombinacija <i>KRAS</i> i <i>TP53</i> mutacija je jači negativni prediktor nego samo <i>TP53</i>
Tortola et al., 1999	Preživljavanje je značajno povezano sa mutacijama samo u <i>TP53</i> geni ili u kombinaciji sa <i>KRAS</i> genom, ali ne sa samo <i>KRAS</i> mutacijama
Esteller et al., 2001	Kombinacija <i>KRAS</i> i <i>p16</i> mutacija povezana sa lošijim preživljavanjem
Nash et al., 2010a	<i>KRAS</i> mutacije i MSI status odlični prognostički markeri stadijuma I i II CRC-a

N0 - nodusni status; ne postoje metastaze u regionalim limfnim čvorovima

Dakle, može se zapaziti da *KRAS* mutacije imaju prognostički značaj samo u određenim stadijumima bolesti, kada su asocirane sa specifičnim tipom mutacije (tranzicije, transverzije, specifični kodoni), kada su povezane sa određenim tipom rekurentnosti tumora ili pak u kombinaciji sa nekim drugim molekularnim markerom. Pored ovih, postoje i radovi koji ukazuju da prisustvo *KRAS* mutacija doprinosi lošijoj prognozi pacijenata sa CRC-om nezavisno od stadijuma tumora (Conlin et al., 2005), odnosno da prognostički značaj ovih mutacija može zavisiti i od lokacije tumora (proksimalni vs. distalni) (Pajkos et al., 2000; Samowitz et al., 2000). Sa druge strane, znatan broj studija koje su ispitivale mutacije *KRAS* gena kao prognostičkog markera, bilo pojedinačno ili u kombinaciji sa nekim drugim genom, nije uspeo da potvrdi prognostički značaj (Andersen et al., 1997; Bleeker et al., 2001; Clarke et al., 2001; Losi et al., 2004; Ogino et al., 2009; Roth et al., 2010).

Interpretacija rezultata publikovanih studija o prognostičkoj ulozi *KRAS* gena je zapravo vrlo teška zbog različitih mutacija koje se javljaju u genu, mnoštva metoda



kojima se one detektuju, razlika u broju pacijenata uključenih u studije i načina prikupljanja podataka, kao i razlika u *staging* tehnikama koje su korišćene. U cilju rasvetljavanja ovog problema, u budućnosti bi bilo neophodno dizajnirati prospektivne studije sa standardizovanim esejima za detekciju.

Što se tiče transformišućeg fenotipa, pokazano je u literaturi da različite mutacije *KRAS* gena mogu imati različite efekte. Ispitivanja na ćelijskim linijama su pokazala da mutacije p.G12V i p.G12R daju agresivan transformišući fenotip, dok p.G12D i G12S imaju manje upečatljiv morfološki efekat (Seeburg et al., 1984). Zamena glicina 12 bilo kojom AK-om, osim prolinom, dovodi do smanjenja GTP-azne funkcije *KRAS* proteina i do njegove biohemijske aktivacije. Glicin na poziciji 12 je lociran blizu prstaste petlje *GAP* proteina koja upotpunjuje aktivno mesto *RAS* proteina. Bilo koja mutacija na ovoj poziciji bi imala za posledicu ugradnju AK-e sa bočnim lancima (glicin je jedina AK koja nema bočne lance), a što bi geometrijski interferiralo sa tranzicionim stanjem u kome je GTP hidrolizovan u prisustvu *GAP* prstaste petlje (Scheffzek et al., 1997; pregled u Schubbert et al., 2007). Substitucija glicina 12 prolinom čini *RAS* protein rezistentnim na katalizu *GAP* proteinima, ali mu se povećava sopstvena GTP-azna funkcija, što je biološki značajno za vraćanje u neaktivno stanje. Stoga, ovaj fenotip nije u osnovi agresivan (Franken et al., 1993). Nekoliko grupa istraživača je koristeći *HRAS* gen pokazalo da valin na poziciji 12 pokazuje 5-10 puta manju GTP-aznu aktivnost nego wt alel (Manne et al., 1985; McGrath et al., 1984; Sweet et al., 1984). Smatrali su da relativni nivo GTP-azne aktivnosti može biti razlog različitom transformišućem potencijalu pojedinačnih mutiranih alela. Međutim za razliku od njih studije Der-a i Colby-ja nisu pronašle nikakvu asocijaciju između transformišućeg potencijala i GTP-azne aktivnosti različitih alela (Colby et al., 1986; Der et al., 1986). Neka istraživanja su ukazala i na mogućnost cisteina na poziciji 12 da obezbedi novi redoks aktivni cisteinski motiv u *RAS* proteinu, koji različito odgovara na povećani oksidativni stres okruženja kancerske ćelije u odnosu na način kojim to rade drugi mutirani aleli (Davis et al., 2011; Williams et al., 2003). Efekat p.G12C mutacije je ispitivan i u *in vivo* modelima tumora pluća gde je pokazana prevalentnost p.G12V mutacije u agresivnijim tumorima, dok je u benignim lezijama i hiperplazijama preovladavala p.G12C (Jennings-Gee et al., 2006). Iako precizni molekularni i ćelijski mehanizmi putem kojih se ispoljava onkogeni efekat aktivirajućih *KRAS* mutacija nisu još razjašnjeni kod

humanih kancera, *in vitro* i studije na životinjama pokazuju da su geni koji su regulisani p.G12V mutacijom uključeni u signalizaciju citokinima, ćelijsku adheziju, proliferaciju, apoptozu i razvoj kolona (Downward, 2003; pregled u Malumbres i Barbacid, 2003).

Kada su u pitanju studije na humanim uzorcima, tu su rezultati često kontradiktorni. Razlike nastaju najverovatnije usled činjenice da u trenutku kada se tumori dijagnostikuju mnoštvo genskih promena je već u njima prisutno. Vrlo je verovatno da tumori sa slabo transformišućim *KRAS* alelima zahtevaju i dodatne promene na drugim onkogenim lokusima kako bi vodili tumorogenezu (Miller i Miller, 2011). Dakle, u nekim slučajevima mutacije kao što su p.G12V se mogu ponašati kao „*driver*” mutacije, dok u drugim slučajevima, kada je prisutna p.G12C, mutacije u drugim genima mogu biti „*driver*”-i nastanka i progresije kancera. Do sada studije koje bi pokušale da povežu specifične mutacija *KRAS* gena sa prisustvom ili odsustvom drugih „*driver*” mutacija nisu objavljene. Na osnovu toga Miller i Miller (2011) smatraju da pokušaji asociiranja pojedinih mutacija *KRAS* gena sa ishodom pacijenata ili preživljavanjem možda neće moći zapravo da pokažu relativan doprinos pojedinačnih mutacija procesu kancerogeneze. Takođe, neki od razloga nedostatka tačnog mehanizma koji leži u osnovi pomenutih fenotipskih razlika je i postojanje različitih efekata mutiranih alela na mnoge signalne puteve, bilo na nivou transkriptoma ili proteoma, kao i ćelijski i tkivno specifični efekti na mutirani *KRAS* gen.

U studiji koja je ispitivala kolorektalne adenome i kancere u ranom stadijumu, Kobayashi sa saradnicima (1996) je pokazao asocijaciju *KRAS* mutacija sa difuznim tipom proliferacije, poliploidnim rastom i visokim citološkim gradusom. Rezultati više studija pokazuju i povećanu mitotsku aktivnost kod *KRAS* mutiranih CRC-a za razliku od wt *KRAS* tumora (Bazan et al., 2002; Haigis et al., 2008; Kobayashi et al., 1996; Liu et al., 2011). Liu i saradnici (2011) su u svom radu pored povišene proliferativne aktivnosti, pokazali i povišenu kratku apoptotsku aktivnost mutiranih *KRAS* kolorektalnih tumora. Sa ovim je i u skladu raniji podatak da su *KRAS* G>A tranzicije asociirane sa povećanom apoptozom (Risio et al., 2005). Tačan mehanizam kojim aktivirajuće *KRAS* mutacije vode ćelije u relativno brzu, spontanu apoptozu u CRC-ima je još uvek nepoznat. Inicijalno se smatralo da postoji progresivna inhibicija apoptoze tokom kolorektalne kancerogeneze (Bedi et al., 1995), međutim novi podaci ukazuju da mutacija p.G13D može da promoviše indukciju apoptoze u Reovirusom T3D

inficiranim ili oksaliplatinom tretiranim tumorskim ćelijama. U ovim ćelijama se aktivira njihova unutrašnja apoptotska kaskada i povećava im se osetljivost na 5-FU-indukovanu apoptozu (Klampfer et al., 2005; Smakman et al., 2006). *In vitro* eksperimenti na ćelijskim linijama pluća su pokazali da p.G12V mutanti povećavaju nivo COX-2, peroksidaza i oštećenja DNK, što upravo vodi unutrašnjoj apoptotskoj kaskadi (Maciag et al., 2004).

Kada su u pitanju *BRAF* mutacije i njihov prognostički značaj, većina studija pokazuje njihovu karakterističnu asocijaciju sa lošijim kliničkim ishodom, što sugerira potrebu primene adjuvantne terapije (Ogino et al., 2009a; Richman et al., 2009; Souglakos et al., 2009). Dok su *BRAF* mutacije vezane za lošije preživljavanje pacijenata sa MSS tumorima, prisustvo CIMP-H izgleda kao da eliminiše bar delimično štetan efekat mutacije. Zapaženo je takođe da dobra prognoza MSI-H tumora može biti pogoršana u prisustvu *BRAF* mutacije (Ogino et al., 2009a). Nasuprot ovim analizama, Samowitz i Roth su u nezavisnim studijama pronašli da su mutacije ovog gena asocirane sa značajno kraćim preživljavanjem pacijenata sa MSS tumorima, ali da nisu imale nikakav efekat na odličnu prognozu pacijenata sa MSI kancerima (Roth et al., 2010; Samowitz et al., 2005). S toga, pretpostavlja se da nisu *BRAF* mutacije same te koje obezbeđuju lošu prognozu, već da mutacija može imati različit efekat u zavisnosti u kom genetičkom kontekstu je nastala (Samowitz et al., 2005).

Kao i u slučaju *KRAS* gena, sve ove zaključke treba proveriti u prospektivnim studijama koje bi obuhvatale zajedničko ispitivanje *BRAF* i *KRAS* mutacija, CIMP i MSI, kako bi se odgonetnula njihova molekularna uloga kako u biološkom, tako i u kliničkom ispoljavanju tumora (Ogino et al., 2009a).

#### **5.4.1 POVEZANOST MUTACIJA *KRAS* GENA SA KLINIČKO-HISTOPATOLOŠKIM KARAKTERISTIKAMA KARCINOMA KOLOREKTUMA I KARAKTERISTIKAMA BOLESNIKA**

Iz obilja literaturnih podataka još uvek se ne mogu izvući definitivni zaključci koji se tiču povezanosti učestalosti i tipa *KRAS* mutacija sa kliničko-histopatološkim karakteristikama karcinoma kolorektuma i osobinama samih bolesnika. Jedan od ciljeva

ovog rada je bio da se na uzorku od 188 pacijenata obolelih od CRC-a u Srbiji proveri da li postoji povezanost pomenutih parametara.

Kada je u pitanju *KRAS* mutacioni status uopšte, od svih testiranih osobina pacijenata jedino su pol i ECOG performans status bili na granici ili statistički značajno povezani sa prisustvom mutacija.

Razlika u zastupljenosti mutacija *KRAS* gena kod muškaraca (40,2%) i žena (26,8%) je, iako procentualno očigledna, bila na granici statističke značajnosti ( $p=0,06$ ). Neki autori ukazuju na višu učestalost *KRAS* mutacija kod žena u odnosu na muškarce, i to 65,2% vs. 36,1% (Krtolica et al., 2007). Moguće je da neki od faktora stila života kojima su muškarci i žene različito izloženi, kao što su upotreba alkohola i cigareta, tipovi ishrane ili hormonska terapija, povećava ili smanjuje verovatnoću pojave mutacija (Samowitz et al., 2000). Za razliku od ovih rezultata, mnogi radovi nisu pokazali statistički značajnu povezanost *KRAS* mutacija sa polom (Andreyev et al., 1998; Cejas et al., 2009; Karapetis et al., 2008; Samowitz et al., 2000; Wadler et al., 1997).

U podgrupi od 172 analizirana bolesnika, mutacije u *KRAS* genu su detektovane u manjem procentu (24,6%) kod bolesnika koji su potpuno aktivni (PS0) i u značajno većem procentu (40,9%) kod bolesnika koji su pokretni ali ograničeni u fizički napornim poslovima (PS1) ili onemogućeni u obavljanju bilo kakvog posla (PS2). Na osnovu dobijenog rezultata možemo pretpostaviti da su mutacije *KRAS* gena povezane sa lošijim opštim stanjem obolelih od CRC-a. Analizirajući pojedinačne grupe pacijenata sa ova tri PS-a, studija Karapetis-a (2008) i saradnika nije pokazala vezu između mutacija *KRAS* gena i ovog parametra.

Kada se posmatraju pojedinačne mutacije (p.G12V, p.G12D i p.G13D) u asocijaciji sa polom i ECOG performans statusom, ne dobija se statistička značajnost ni za jedan od ovih parametara. Prema literaturnim podacima asocijacije pojedinih tipova *KRAS* mutacija sa ovim parametrima nisu rađene.

Medijana starosne dobi dijagnostikovanja karcinoma kolorektuma kod bolesnika sa mutacijama u *KRAS* genu je bila približna vrednosti medijane kod bolesnika sa wt *KRAS*-om (58 vs. 60 godina). Ovo ukazuje da mutacije u *KRAS* genu ne doprinose ranijem javljanju bolesti.

U odnosu na primarnu lokalizaciju tumora, zastupljenost *KRAS* mutacija je bila približno slična u kanceru kolona (35,8%), rektalnom kanceru (32,5%) i u rektosigmoidnom kanceru (41,7%). Nije pokazana značajnost u zastupljenosti mutacija u različitim tumorskim lokalizacijama. Razlike u zastupljenosti pojedinačnih mutacija koje smo testirali takođe nisu bile značajne, mada je mutacija p.G13D bila mnogo češća kod kancera kolona (14,7%) i rektosigmoidnog prelaza (20%) nego kod rektalnog kancera (3,8%). Većina studija takođe nije pokazala statistički značajnu razliku u zastupljenosti mutacija *KRAS* gena u različitim lokalizacijama tumora, pri čemu se često kolon deli na proksimalni i distalni (Cejas et al., 2009; Karapetis et al., 2008; Krtolica et al., 2007; Minoi et al., 2010). Ipak, u studiji Samowitz-a i saradnika (2000), koja predstavlja prvu i najveću populacionu studiju koja nije po tipu meta analize, *KRAS* mutacije su bile značajno češće u proksimalnom tumoru nego u distalnom, 36.0% vs. 26.8%. Štaviše, svi tipovi *KRAS* mutacija su imali značajno veću tendenciju javljanja u tumorima proksimalnog kolona, osim mutacija kodona 13. U našoj studiji, kao što smo već naznačili, mutacija kodona 13 je bila češća u kanceru kolona u odnosu na kancer rektuma. Pored pomenute, i studije Frattini-ja (2004) i Elnatan-a (1996) su pokazale isti rezultat - značajnu prevalentnost *KRAS* mutacija kod kancera kolona u odnosu na rektum, i to prevashodno u proksimalnom delu. Pri tome mutacije *KRAS* protoonkogena su bile asocirane sa značajno lošijom prognozom pacijenata sa tumorima na levom kolonu (Elnatan et al., 1996). Neslaganje dobijenih rezultata moguće je da potiče od male veličine uzoraka u samim studijama koje nisu imale dovoljnu snagu da pokažu relativno male razlike u zastupljenosti mutacija koje se uočavaju. Poredeći somatske promene DNK, Slattery i saradnici (2009) su u svom radu predložili različite mutacione puteve koji karakterišu tumore proksimalnog kolona u odnosu na tumore distalnog kolona i rektuma. Oni smatraju da zbog sličnosti u mutacionom statusu tumora distalnog kolona i rektuma, moguće je da oni dele i više molekularnih i etioloških sličnosti nego što ih imaju tumori proksimalnog i distalnog kolona. Pokazali su da kanceri proksimalnog kolona češće imaju MSI, CIMP i *KRAS* mutacije, dok su rektalni i kanceri distalnog kolona skloniji *TP53* mutacijama.

Ako se uzmu u obzir povezanosti svih ostalih testiranih kliničko-histopatoloških parametara (veličina tumora tj. dubina do koje tumor prodire kroz zid kolona, limfonodusni status, histološki gradus, prisustvo i lokalizacija inicijalnih metastaza) sa

prisustvom/odsustvom i tipom mutacija *KRAS* gena i uporede sa literaturnim podacima drugih studija, može se zapaziti sličnost u dobijenim rezultatima. U većini radova značajna asocijacija ne postoji ili je pokazana tek za poneki od datih parametara. U narednim pasusima izdvojeni su neki od značajnijih primera.

U kolaborativnim RASCAL studijama istraživači širom sveta su bili pozvani da podele svoje podatke o kliničkim, histološkim i parametrima vezanim za ishod bolesti pacijenata sa CRC-om kojima je određivan mutacioni status *KRAS* gena. U prvoj RASCAL studiji analiziran je 2721 pacijent iz 22 centra iz 13 različitih nacija. Autori su pokazali da su mutacije ovog gena važne za progresiju i ishod CRC-a, s tim što je mutacija p.G12V imala važniju prognostičku ulogu od drugih mutacija. Po prvi put je pokazano da različite genske mutacije mogu imati različit uticaj na ishod bolesti, čak i kada se javljaju na istom mestu u genomu (Andreyev et al., 1998). Kako bi se ispitali efekti *KRAS* mutacija u različitim stadijumima CRC-a u RASCAL II studiji su sakupljeni podaci o 3439 slučajeva iz 35 centara iz 19 različitih nacija. Oko 9% ukupnih mutacija je činila p.G12V. Nije pronađena ni jedna asocijacija *KRAS* mutacija sa kliničko-histopatološkim parametrima. Utvrđeno je i da bilo koja promena guanina (G) u timin (T), ali ne i u adenin (A) ili citozin (C), povećava rizik od smrti za 44%. Specifično, mutacija glicina u valin (p.G12V) u 12-tom kodonu *KRAS* gena je zapravo promena G>T koja ima predispoziciju ka agresivnijem biološkom ponašanju kod pacijenata sa *Dukes C* tumorima. Ova mutacija je kod njih asocirana sa 50% većim rizikom od relapsa ili smrti. Dakle, ova studija je istakla da prisustvo p.G12V mutacije nije samo važno za progresiju kancera, već da može i da ima predispoziciju za agresivnije biološko ponašanje kod pacijenata sa uznapredovalim stadijumom CRC-a (Andreyev et al., 2001). U našoj studiji navedena mutacija se nalazi na drugom mestu po učestalosti (21.2%). Međutim, razlika u njenoj zastupljenosti u odnosu na ostale detektovane mutacije kod *Dukes* stadijuma bolesti nije bila statistički značajna.

Rezultati studije Moerkerk-a i saradnika (1994) ukazuju da *Dukes B* i *C* tumori imaju značajne razlike u genskom profilu. Koncept po kome svi *Dukes C* tumori u nekom trenutku evoluiraju iz *Dukes B* tumora po njima je suviše pojednostavljen. Naime, verovatnije je da je metastatski potencijal ovih tumora povezan sa prirodom genskih promena u kodonu 12 *KRAS*-a, G>T i/ili G>C transverzijama koje obezbeđuju tumorskim ćelijama kapacitet za metastaziranje. Zbog toga, *Dukes B* tumori koji imaju

G>T promene bi progredirali u *Dukes C* stadijum, dok oni sa samo G>A tranzicijama ne progrediraju u više stadijume zbog nedostatka metastatskog potencijala. Takođe, i broj različitih mutacija *KRAS* gena je bio značajno veći kod *Dukes C* tumora, što implicira postojanje heterogene populacije tumorskih ćelija. Ovo bi moglo i da oslika povećanje genetske nestabilnosti tumora sa uznapredovalim stadijumom progresije.

Za razliku od prethodnih studija, Conlin i saradnici (2005) su u svom radu ispitujući mutacije u *APC*, *TP53* i *KRAS* genima kod pacijenata sa CRC-om pokazali da je *KRAS* nezavistan prognostički faktor bez obzira na stadijum bolesti. Dok mutacije *APC* i *TP53* gena nisu imale klinički značaj, mutacije *KRAS*-a predstavljaju marker agresivnijeg tumorskog fenotipa, mogu definisati podgrupu kancera koja nastaje nezavisno od *TP53* mutacija i asocirane su sa lošijom prognozom u svim stadijumima bolesti.

Analizirajući povezanost specifično p.G12V (G>T) mutacije sa parametrima oboljenja zapazili smo razliku (na granici statističke značajnosti) u njenoj zastupljenosti kod T2 tumora (100%), koji ne prodiru u dublje slojeve zida kolona i rektuma, u odnosu na T3 (19,4%) i T4 (16,7%) tumore, koji zahvataju dublje slojeve ili probijaju serozu. Dobijeni rezultat je u suprotnosti sa navedenim rezultatima drugih autora jer ne ukazuje da ova mutacija doprinosi agresivnijem fenotipu i većem metastatskom potencijalu u odnosu na sve ostale testirane mutacije. Kako je u našem uzorku pacijenata sa *KRAS* mutacijama bilo malo u T2 kategoriji tumora, ovaj rezultat treba uzeti sa rezervom i proveriti ga u bolje definisanoj grupi pacijenata u pogledu zastupljenosti svih T kategorija tumora.

Dosta radova u literaturi se bavilo ispitivanjem povezanosti pojedinih mutacija sa pomenutim parametrima. Bazan i saradnici (2002) su u svom radu zaključili da su mutacije kodona 12 značajno asocirane sa mucinoznim histološkim tipom kancera, što sugeriše da one utiču na signalni put regulacije produkcije mucina u mukozi ćelija i da nisu povezane sa proliferacijom. Za razliku od toga, mutacije kodona 13 su povezane sa višim kliničkim stadijumima (*Dukes C* i *D*) i prisustvom metastaza u limfnim čvorovima. Takođe, pokazali su i asocijaciju ovih mutacija sa SPF-om (eng. *S phase fraction* - SPF), čime se potvrđuje da konstitutivno aktivan RAS dereguliše ćelijski ciklus i rezultira hiperproliferacijom. Dobijene asocijacije ukazuju da su mutacije 13-og kodona uključene u tumorsku progresiju ili da se alternativno mogu desiti kasnije u

uznapredovalim stadijumima ili čak da mogu biti asocirane sa formom bolesti koja je već uznapredovala. U svom kasnijem radu iz 2005. godine ista grupa autora je potvrdila da je mutacija kodona 13, p.G13D, sama ili u kombinaciji sa *TP53* mutacijama prognostički marker lošijeg preživljavanja (Bazan et al., 2005).

Sa druge strane, Chang (2009) je u svom radu pronašao značajnu asocijaciju između *KRAS* mutacija kodona 12 sa lošijim preživljavanjem i zahvaćenošću limfnih čvorova, dok su mutacije kodona 13 korelisale sa veličinom tumora.

Pokazano je još i da su mutacije kodona 12 učestalije kod metastatskih CRC-a (naročito p.G12D u udaljenim depozitima, dok je p.G12V bila lokalizovana u perikolorektalnim limfnim čvorovima), dok su mutacije kodona 13 nađene uglavnom u neinvazivnim kancerima (Finkelstein et al., 1993).

Iako procenat p.G13D mutacije u našem radu raste sa stepenom invazivnosti tumora kroz zid creva (veličinom tumora), *Dukes* stadijumom, prisustvom i brojem udaljenih metastaza i onih u limfnim čvorovima, ne može se reći da ova mutacija ima ulogu u progresiji i agresivnom fenotipu tumora. Kada je u pitanju p.G12D mutacija (najčešća mutacija kodona 12 i uopšte), vidi se trend blagog opadanja njene zastupljenosti kod *Dukes* C i D tumora u odnosu na *Dukes* B. Procentualni porast ove mutacije se zapaža kod tumora višeg histološkog gradusa, kod distalnih tumora (rektum i rektosigmoidni prelaz) u odnosu na proksimalne (kolon), kod bolesnika sa PS2 u odnosu na PS0 i PS1, kao i sa širenjem tumora kroz zid kolona/rektuma i serozu. Uočava se i trend blagog opadanja kod *Dukes* C i D tumora u odnosu na *Dukes* B.

Interesantno je pomenuti i rezultate do kojih je došla grupa italijanskih naučnika poredeći genske ekspresione profile adenokarcinoma kolona sa metastatskom sposobnošću sa profilima odgovarajućih metastaza u jetri i sa profilima tumora koji nisu razvili metastaze tokom petogodišnjeg perioda praćenja. Pokazali su da nemetastazirajući tumori imaju značajno različite transkripcione profile od parova primarnog tumora i odgovarajuće metastaze. Štaviše, obzirom na transkripcionu sličnost između metastatskih ćelija sa njihovim ishodnim tumorskim ćelijama, autori smatraju da najverovatnije veće ćelijske frakcije, pre nego retke sporadične ćelije primarnog tumora, imaju metastatsku sposobnost. Ovakav rezultat ukazuje da genski ekspresioni profil može biti koristan u pravilnom određivanju klinički značajnih podgrupa pacijenata sa CRC-om. Specifično, identifikacija i validacija metastatskog „otiska“



(eng. *fingerprint*) ranije u razvoju tumora može doprineti određivanju pacijenata stadijuma II CRC-a sa visokim rizikom za razvoj metastaza, koji bi imali koristi od adjuvantne terapije (D'Arrigo et al., 2005). Mi smo u našem radu želeli da proverimo da li postoji neka razlika u zastupljenosti mutacija u *KRAS* genu kod tumora koji inicijalno nisu imali udaljene metastatske depozite u odnosu na one koji su ih imali. Takođe, proveravali smo da li postoji i neka razlika kada se uzmu u obzir samo pojedine lokacije razvoja metastaza (jetra i pluća), ili samo pojedine mutacije *KRAS* gena. *KRAS* mutacije su generalno i pojedinačno bile podjednako zastupljene kod pacijenata sa metastazama i onih bez njih. Zatim, mutacije su više bile prisutne kod metastaza u jetri ili plućima u odnosu na tumore bez metastaza, međutim ta razlika nije bila značajna.

Iako zbog relativno malog broja uzoraka u ranijem stadijumu CRC-a u našoj studiji rezultate asocijacija koje smo ispitivali treba proveriti u uniformnijoj grupi pacijenata, oni su ipak generalno u saglasnosti sa drugim studijama (Andreyev et al., 2001; Liu et al., 2011; Samowitz et al., 2000). Iz svega navedenog vidi se da je ovo polje koje zahteva dalja istraživanja na velikom broju uzoraka.

## **5.5 *KRAS* I *BRAF* KAO PREDIKTIVNI MARKERI**

### **5.5.1 *KRAS* I *BRAF* MUTACIJE U ODGOVORU NA ADJUVANTNU TERAPIJU**

Poslednjih godina fokus na *KRAS* genu se pomerio sa njegove prognostičke uloge na prediktivnu. Dok su napretci u personalizovanoj, tumor-specifičnoj terapiji poboljšali preživljavanje pacijenata sa mCRC-ima, standard u lečenju pacijenata sa tumorima u ranim stadijumima se bazira na adjuvantnoj terapiji zasnovanoj primarno na određivanju tumorskog stadijuma. Međutim, ovakav pristup ostavlja mogućnost da se možda pacijenti kojima je dovoljna samo hirurgija (u stadijumu II) izlože toksičnosti ove terapije. *Quasar* studija je pokazala duži DFS i OS kod pacijenata sa stadijumom II koji su primali 5-FU/leukovorin (LV), dok su ostale analize imale vrlo konfliktne rezultate (Quasar, 2007). Ni NSABP-C07 studija nije pokazala značajnu korist 5-FU/LV terapije sa oksaliplatinom u odnosu na samo 5-FU/LV kod grupe pacijenata sa istim stadijumom (Kuebler et al., 2007). Slično, IMPACTB2 analiza na preko 1000 pacijenata sa stadijumom II bolesti nije dobila značajno povećanje OS-a kod pacijenata

na 5-FU/LV terapiji (IMPACT, 1999). Nasuprot ovoj, analiza Gill-a i saradnika (2004) kod preko 3300 pacijenata je sugerisala korist adjuvantne terapije kod iste grupe pacijenata, ali u manjem stepenu nego kod pacijenata sa stadijumom III. Sve navedene studije generalno sugerišu postojanje podgrupe pacijenata sa stadijumom II koji imaju veći rizik za ponovnu pojavu bolesti i koji bi mogli da imaju korist od adjuvantne terapije. Zna se da pacijenti sa stadijumom IIb imaju kraće petogodišnje preživljavanje od onih u stadijumu IIIa (Gill et al., 2004). Nedostatak markera odgovora na ovu terapiju trenutno onemogućava predviđanje ishoda pacijenata.

5-FU je antimetabolit koji se koristi kao hemioterapeutik pored CRC-a i u širokom spektru drugih kancera. U kombinaciji sa leukovorinom je postao standard u terapiji pacijenata sa stadijumima II i III CRC-a (Wolmark et al., 1999). Mehanizam citotoksičnosti ovog leka uključuje inhibiciju timidilat sintaze (TS), ugradnju njenih metabolita u RNK i DNK molekule, deprivaciju timidina, indukciju apoptoze i zaustavljanje ćelijskog ciklusa (Etienne-Grimaldi et al., 2008). Ipak, terapijski odgovor na 5-FU kod pacijenata sa CRC-om je nizak i kreće se od 10% do 20% (Jones et al., 1995). Antitumorska aktivnost 5-FU-a se može poboljšati kombinacijom sa drugim agensima (LV, irinotekan, metotreksat), a naročito dodatkom EGFR-ciljane terapije (Van Cutsem et al., 2007). Nekoliko biomarkera se pokazalo prediktivno u odgovoru na 5-FU kao što su TS, timidin fosforilaza (TP), dihidropirimidin dehidrogenaza (DPD), *TP53*, *c-MYC*, MSI (pregled u Gangadhar and Schilsky, 2010).

Povezanost mutacija *KRAS* gena sa odgovorom na hemioterapiju nije ispitivana u velikom broju slučajeva. S obzirom na visoku učestalost i rano javljanje *KRAS* mutacija u CRC-u, može se pretpostaviti da takva povezanost postoji. Eksperimentalni podaci studije Houghton-a i kolega (1998) na TS-deficijentnim ćelijama su pokazali da transfekcija mutiranim *KRAS*-om značajno smanjuje sposobnost ćelija da uđu u apoptozu kao odgovor na deprivaciju timidina. To uvodi mogućnost da *KRAS* mutacije mogu redukovati kapacitet ćelija da odgovore na hemioterapeutike koji ciljaju TS protein, kao što je 5-FU. Međutim, studija Klampfer-a i saradnika (2005) je poredeći stepen 5-FU-indukovane apoptoze u HCT116 i Hke3 ćelijskim linijama kolona (razlikuju se samo u prisustvu mutiranog *RAS* alela u prvoj) pokazala proapoptotsku ulogu *KRAS* mutacija. Signalizacija onkogenim *RAS*-om dovodi do akumulacije TP53 u odgovoru na 5-FU, tj. do situacije koja favorizuje apoptozu u odnosu na zastoj u

ćelijskom rastu. Studije Etienne-Grimaldi-ja (2008) i Rosty-ja (2001) su pokazale da mutacije *KRAS* gena nemaju značajan uticaj na preživljavanje pacijenata koji su primali navedenu terapiju. Takođe, studija Saltz-a (2007) je pokazala da nema razlike u odgovoru na 5-FU/LV terapiju sa ili bez irinotekana kod pacijenata sa stadijumom III CRC-a nosilaca *KRAS* mutacija i onih bez mutacija. Ni studija Ogino-a i kolega (2009) na pacijentima sa istim stadijumom kancera nije pokazala prognostički značaj *KRAS* markera.

Druge molekularne promene koje se trenutno ispituju kod CRC-a uključuju *BRAF* mutacije, MSI i CIMP. Ove pojave su često asocirane sa tumorima koji imaju slične fenotipove i mogu biti istovremeno prisutne u istom tumoru. Na osnovu literaturnih podataka *BRAF* mutacije predstavljaju biomarkere lošije prognoze, ali njihova klinička upotrebljivost je još nedovoljno ispitana (Ogino et al., 2009). U studijama koje su ispitivale interakciju ova tri markera kod CRC-a u odgovoru na 5-FU-baziranu terapiju pokazano je da tumori sa MSI imaju bolji klinički ishod od MSS tumora, da su mutacije *BRAF*-a loš prognostički marker i da kada su u kombinaciji sa MSI-H doprinose lošijem ishodu tih pacijenata, čija je prognoza inače bolja (Faris and Ryan, 2012). Takođe, i MSS tumori koji su mutirani u *BRAF*-u ili im je detektovano prisustvo CIMP-a imaju lošiju prognozu (Lee et al., 2008; Popovici et al., 2012; Samowitz et al., 2005). Studija Hutchins-a iz 2011. godine je pokazala da mutacije *BRAF* gena u kombinaciji sa MSI nisu bile prediktivne u odgovoru na 5-FU-baziranu terapiju (Hutchins-a et al., 2011). Iako ne statistički značajno, u studiji Ogino-a iz 2012. godine zapažen je trend boljeg odgovora na kombinovanu terapiju 5-FU, leukovorinom i irinotekanom (IFL) kod MSI/wt *BRAF* i MSS/ mutiranih *BRAF* tumora (Ogino et al., 2012).

U želji da u našoj populaciji pacijenata sa CRC-om ispitamo prediktivnu ulogu *KRAS* i *BRAF* markera pratili smo vreme do pojave metastaza (TTM) samo kod pacijenata koji ih inicijalno nisu imali. Pretpostavili smo da zbog brojnih pomenutih uloga ovih gena u ćelijskim procesima, njihova deregulacija usled pojave mutacija u tumorima može igrati ulogu u metastatskom potencijalu malignih ćelija. Pojava metastaza u celokupnoj grupi bez inicijalnih metastaza (n=71) se dešavala u rasponu od jednog do 71-og meseca od operacije, sa medijanom od 14 meseci. Procenat pacijenata sa metastazama se relativno brzo uvećavao; nakon 6 meseci metastaze je dobilo njih

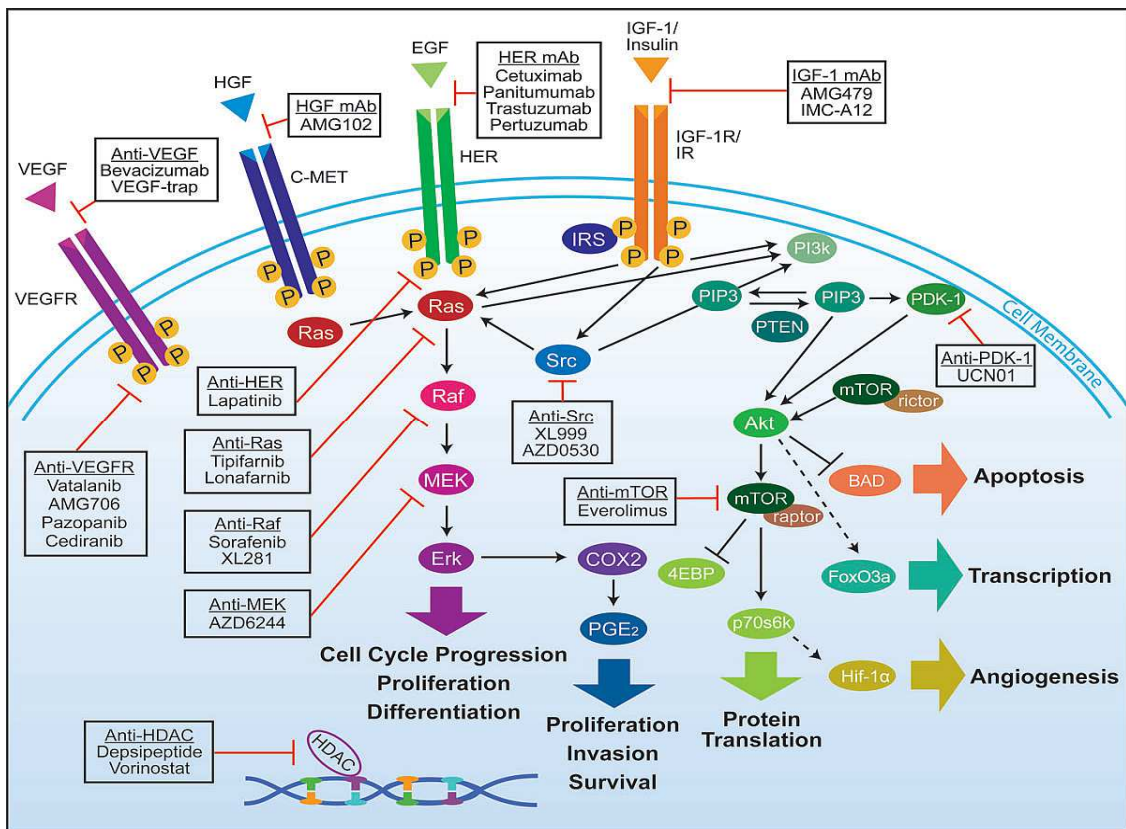
12,7%, nakon godinu dana 43,7%, a nakon 2 godine više od polovine (69%). *KRAS* mutacije, gledano samo u podgrupi od 49 bolesnika koji su primili adjuvantnu terapiju, nisu doprinosile smanjenju/povećanju vremena do pojave metastaza. Ipak, može se zapaziti trend boljeg preživljavanja bez metastaza kod bolesnika sa mutacijama *KRAS*-a u odnosu na wt *KRAS* grupu. Medijana TTM u grupi *KRAS* mutiranih bolesnika je bila veća nego u grupi bolesnika sa wt *KRAS* genom (19,5 vs. 13,2 meseci). Kako su svi bolesnici u analiziranoj grupi imali wt *BRAF* status gena nismo mogli da povežemo ovaj marker sa TTM.

### **5.5.2 *KRAS* I *BRAF* MUTACIJE U ODGOVORU NA EGFR-CILJANU TERAPIJU**

Iako se mutacije *KRAS*-a trenutno ne mogu koristiti za selekciju pacijenata za adjuvantnu hemioterapiju, one su dobar prediktivni marker kod pacijenata sa mCRC-om kojima se uključuje anti-EGFR terapija monoklonskim antitelima. Kao što je već pomenuto, cetuksimab (ER-K0034, Erbitux<sup>®</sup>, Merck-Serono KgaA, Darmstadt, Germany; ImClone Systems Inc, New York, NY) i panitumumab (ABX-EGF, Vectibix<sup>®</sup>; Amgen Inc, Thousand Oaks, CA) su se pokazali efikasnim u lečenju mCRC-a, bilo kao monoterapije ili u kombinaciji sa citotoksičnim agensima (Lièvre et al., 2006). Antikancerski efekat cetuksimaba je posredovan različitim mehanizmima, uključujući inhibiciju progresije kroz ćelijski ciklus i zaustavljanje ćelija u G1 fazi, inhibiciju angiogeneze, inhibiciju metastaziranja smanjivanjem proizvodnje matriksnih metaloproteinaza, inhibiciju apoptoze i potencijaciju antitumorske aktivnosti hemio- i radioterapije (pregled u You and Chen, 2012). Panitumumab može da dovede do zaustavljanja ćelijskog ciklusa i rasta kancera, ali ne dovodi do antitelom zavisne ćelijske citotoksičnosti (eng. *antibody dependent cell cytotoxicity* - ADCC) jer je potpuno humano antitelo tipa IgG2, za razliku od humano/mišjeg himernog IgG1 cetuksimaba (Rivera et al., 2008). Oba leka imaju sličnu efikasnost, postižući skroman ali klinički značajan RR od oko 10% kada se primenjuju kao monoterapija, odnosno oko 23% u kombinaciji sa HT-om, kod pacijenata koji ekspimiraju EGFR i ne odgovaraju na hemioterapiju (Cunningham et al., 2004; Hecht et al., 2007). Pozitivna

ekspresija EGFR proteina, koja se najčešće određuje imunohistohemijski, je inicijalno smatrana početnim kriterijumom u studijama koje su procenjivale EGFR inhibitore. Pretpostavljalo se da je senzitivnost na ove agense povezana sa ekspresijom EGFR molekula. Međutim, pokazalo se da ni tumorska ekspresija ovog receptora, ni broj kopija gena nemaju značajnu asocijaciju sa odgovorom na EGFR-ciljanu terapiju.

Za rast mnogih tumora zaslužna je konstitutivna aktivacija signalnih puteva nizvodno od EGFR-a. Na slici 31 prikazana je interakcija različitih signalnih puteva uključenih u tumorsku proliferaciju i progresiju. Bliske interakcije među ovim putevima mogu obezbediti „mehanizam za beg“ koji omogućava tumoru da zaobiđe put koji je prethodno farmakološki blokiran (pregled u Siena et al., 2009).



Slika 31. Povezanost ćelijskih signalnih puteva koji učestvuju u proliferaciji i progresiji kolorektalnog kancera i terapeutici koji su bili ili su trenutno u fazama kliničkih ispitivanja (preuzeto iz pregleda Siena et al., 2009).

Povezanost RAS-MAPK i PI3K signalnih puteva igra važnu ulogu u kancerogenezi kroz fosforilaciju brojnih proteina i transkripcionih faktora koji direktno kontrolišu ćelijski rast, diferencijaciju, proliferaciju i ćelijsku smrt. Mutacije *KRAS*, *BRAF* i *PIK3CA* gena rezultuju kontinuiranom aktivacijom navedenih puteva signalizacije, nezavisno od aktivacije ili blokade EGFR molekula. Ovakva aktivacija pospešuje transkripciju različitih onkogeno, uključujući *MYC*, *CREB* i *NFκB* (Barault et al., 2008). *KRAS* je najčešće mutirani gen u *EGFR* putu kod CRC-a (u proseku u 35-45%), a zatim slede mutacije *PIK3CA* (oko 20%) i *BRAF* mutacije (<15%) (Barault et al., 2008; Benvenuti et al., 2007; Lièvre et al., 2006). Mutacije u *PIK3CA* i *KRAS*-u ili *BRAF*-u se mogu javiti zajedno u istom tumoru, ali *KRAS* i *BRAF* mutacije su mutaciono isključive (Barault et al., 2008).

Brojne retrospektivne analize na uzorcima bolesnika sa mCRC-om koji su primali anti-EGFR terapiju antitelima su pokazale da bolesnici sa mutacijama u *KRAS* genu nemaju koristi od ove terapije (Tabela 11). Lièvre i saradnici (2006) su bili prvi koji su predložili da aktivirajuće mutacije *KRAS*-a mogu biti odgovorne za aktivaciju RAS-RAF-MAPK puta nezavisno od ligandom-indukovane aktivacije EGFR-a, čime dovode do rezistencije na cetuksimab terapiju. Sistematski pregled 15 randomizovanih kliničkih studija (predstavljen na *American Society of Clinical Oncology (ASCO)* kongresu 2009. godine) pokazuje da je primena anti-EGFR terapije mAb-ima asocirana sa ukupnim smanjenjem rizika od relapsa za 39%, kao i da bolesnici sa wt *KRAS* genom imaju poboljšanje PFS-a za 57%, dok bolesnici sa mutiranim *KRAS*-om nemaju nikakvu korist od primenjene terapije (Allegra et al., 2009).

Na osnovu ovih podataka i potvrda mnogih drugih istraživača, danas se po preporukama EMEA i FDA u rutinskoj kliničkoj praksi obavezno vrši testiranje na prisustvo *KRAS* mutacija pre uključivanja terapije sa navedenim antitelima. Interesantno je da su u drugim solidnim tumorima EGFR inhibitori (inhibitori tirozin kinaza ili cetuksimab) pokazali minimalnu aktivnost i to kod karcinoma pankreasa, gde su inače mutacije *KRAS* gena jako zastupljene (Moore et al., 2007; Philip et al., 2007), i kod kancera pluća koji su mutirani u *KRAS* genu (Pao et al., 2005).

Tabela 11. Pregled studija u kojima su mutacije *KRAS* gena prediktivni faktor odgovora na anti-EGFR terapiju antitelima.

Studija	Prediktivni značaj
Moroni et al., 2005	Nema značajne korelacije <i>KRAS</i> mutacija sa odgovorom na cetuksimab; primećen trend ka boljem RR kod pacijenata sa wt <i>KRAS</i> -om
Lièvre et al., 2006	<i>KRAS</i> mutacije asocirane sa rezistencijom na cetuksimab
Di Fiore et al., 2007	<i>KRAS</i> mutacije značajno asocirane sa rezistencijom na cetuksimab+HT; <i>KRAS</i> mutacije identične u primarnom tumoru i metastazama
Benvenuti et al., 2007	<i>KRAS</i> i <i>BRAF</i> mutacije asocirane sa rezistencijom na anti-EGFR terapiju mAb-ima; ipak, nekoliko <i>KRAS</i> mutanata pokazalo odgovor na terapiju
Frattini et al., 2007	Pacijente sa visokom polizomijom ili <i>EGFR</i> amplifikacijom, wt <i>KRAS</i> -om i normalnom ekspresijom <i>PTEN</i> gena treba uzeti u razmatranje za cetuksimab terapiju
De Roock et al., 2008	wt <i>KRAS</i> u kombinaciji sa ranom redukcijom tumorske veličine su dobri prediktori značajno dužeg PFS i OS kod irinotekan-rezistentnih pacijenata
Amado et al., 2008	<i>KRAS</i> status treba uzeti u obzir pri odabiru pacijenata sa mCRC-om za terapiju panitumumabom
Cappuzzo et al., 2008	Prisustvo <i>KRAS</i> mutacija najjači prediktor neuspeha terapije cetuksimabom kod EGFR+ pacijenata sa CRC-om
Etienne-Grimaldi et al., 2008	Bilo koji prediktivni/prognostički značaj <i>KRAS</i> mutacija u kombinovanoj terapiji mAb-ima sa 5-FU treba isključivo vezati sa prisustvom anti-EGFR agensa
Lurje et al., 2008	<i>KRAS</i> mutacije značajno asocirane sa rezistencijom na cetuksimab; polimorfizmi <i>COX-2</i> , <i>EGF</i> i <i>EGFR</i> identifikovani kao potencijalni markeri
Karapetis et al., 2008	Pacijenti sa mutiranim <i>KRAS</i> -om nisu imali nikakvu korist od terapije cetuksimabom
Freeman et al., 2008	Pacijenti sa mCRC-om sa aktivirajućim mutacijama <i>KRAS</i> gena slabije odgovaraju na terapiju samo panitumumabom
Tol et al., 2008	Mutacioni status <i>KRAS</i> gena je prediktor ishoda u grupi koja prima cetuksimab
Garm Spindler et al., 2009	Kombinovana analiza <i>KRAS</i> mutacija i <i>EGFR</i> polimorfizama je prediktivna za odgovor na cetuksimab
Sartore-Bianchi et al., 2009	Istovremena ekspresija <i>PTEN</i> -a i mutacija <i>KRAS</i> -a, <i>BRAF</i> -a i <i>PIK3CA</i> čini i do 70% pacijenata sa mCRC-om rezistentnima na anti-EGFR terapiju

S obzirom da je veliki deo našeg uzorka imao wt *KRAS* mutacioni status (n=122) i da su razvili metastatsku bolest, samim tim ovi bolesnici su bili dobri kandidati za ciljanu terapiju antitelima. Podatke o primljenoj terapiji (cetuksimab+irinotekan) smo imali za 72 bolesnika kod kojih smo proveravali terapijski odgovor. Ni jedan bolesnik nije postigao kompletan odgovor na terapiju, 11 je imalo PR, 34 SD i 27 PD. Dakle, 15,3% (11/72) bolesnika je postiglo terapijski odgovor (RR). U pregledu De Roock-a (2009) izdvojene su studije koje su ispitivale mutacioni status *KRAS* gena kao markera odgovora na ciljanu terapiju kod bolesnika sa mCRC-om rezistentnih na HT-u. Među studijama koje su analizirale terapiju cetuksimabom/panitumumabom u kombinaciji sa HT-om u grupi bolesnika sa wt *KRAS* genom RR se kretao u rasponu od 20,3% do 53% (Benvenuti et al., 2007; Cunningham et al., 2004; De Roock et al., 2008; Di Fiore et al., 2007; Frattini et al., 2007; Lièvre et al., 2006; Lièvre et al., 2008; Moroni et al., 2005). U studijama koje su se bazirale samo na monoterapijama ovim antitelima procenti RR-a su se kretali od 10% do 17% (Amado et al., 2008; Karapetis et al., 2008; Khambata-Ford et al., 2007). Dobijeni procenat bolesnika koji su dobro odgovorili na kombinovanu terapiju (CR+PR) u našoj studiji je niži u odnosu na rezultate ostalih pomenutih studija. Razlika u dobijenom RR moguće je da potiče od odabira pacijenata u studijama, tj. od terapijske linije u kojoj je uključivan cetuksimab. U našem radu kombinovana ciljana terapija je davana tek u trećoj ili i kasnijim linijama, dok je u navedenim radovima ova terapija primenjivana i u prvoj liniji, što može uticati na bolji terapijski odgovor. Moguće je i da wt *KRAS* status nije jedini uslov za dobar odgovor na EGFR-ciljanu terapiju i da deregulacija nekog drugog, nizvodnog člana istog signalnog puta leži u osnovi lošijeg terapijskog odgovora. CRC je u svojoj prirodi vrlo heterogen, a kako se radi o pacijentima sa tumorima u metastatskoj fazi, možemo pretpostaviti da je kod njih došlo do nakupljanja dodatnih promena na molekularnom nivou, nevezanih za EGFR put signalizacije.

Rezultati iz kliničke prakse pokazuju da će oko polovine pacijenata sa wt *KRAS* genom zapravo odgovoriti na terapiju antitelima, što ukazuje na potrebu pronalaženja dodatnih markera efikasnosti ove terapije (pregled u Linardou et al., 2008; Loupakis et al., 2009; pregled u Deschoolmeester et al., 2010). Promene drugih nizvodnih EGFR efektor, kao i alternativne *KRAS* mutacije (u kodonima 61 i 146) mogu biti odgovorne



za rezistenciju na EGFR-ciljanu terapiju (Laurent-Puig et al., 2009; Loupakis et al., 2009; Sartore-Bianchi et al., 2009).

S obzirom na već iznete podatke o različitim biološkim efektima i transformišućem potencijalu pojedinih mutacija i o specifičnosti njihove pojave u pojedinim tkivima, neke istraživačke grupe su pretpostavile mogućnost odgovora na terapiju u grupama pacijenata sa pojedinim tipovima *KRAS* mutacija (Benvenuti et al., 2007; Frattini et al., 2007). Pokazano je da je procenat pacijenata sa *KRAS* mutiranim tumorima koji mogu ipak da odgovore na EGFR-ciljanu terapiju manji od 10%. Kod ovih tumora mutacije kodona 13 su bile značajno više zastupljene nego ostali tipovi mutacija. Takođe, mutacije ovog kodona su imale i manju *in vitro* transformišuću aktivnost od mutacija kodona 12 (Guerrero et al., 2000).

U velikoj, retrospektivnoj, opservacionoj studiji De Roock-a i saradnika (2010) po prvi put je pokazana pozitivna asocijacija p.G13D mutacije i terapije cetuksimabom, kod pacijenata sa CRC-ima rezistentnim na HT-u. Bolje preživljavanje je bilo zapaženo kako u cetuksimab monoterapiji, tako i u kombinovanom režimu sa HT-om. Tumori sa ovom mutacijom su se ponašali različito u odnosu na tumore sa drugim *KRAS* mutacijama, a nešto malo drugačije od wt *KRAS* tumora. Rezultati ove studije ukazuju da pacijenti nosioci p.G13D mutacije odgovaraju na cetuksimab, iako je taj odgovor niži od onog kod pacijenata sa wt *KRAS* statusom. Duži PFS i OS kod p.G13D-mutiranih tumora u poređenju sa tumorima sa drugim mutacijama verovatno nije postignut zbog realnog smanjenja tumorske mase, već zbog odlaganja progresije. Moguće objašnjenje ovog zapažanja jeste da p.G13D-mutirani tumori nakon blokade EGFR molekula ne ulaze u proces apoptoze (citotoksičan efekat), već im se proliferacija inhibira (citostatski efekat). Eksperimentima na izogenim ćelijskim linijama su proverili efekat cetuksimaba na ćelijsku proliferaciju. Dok su p.G12V ćelijske linije bile nesenzitivne na tretman cetuksimabom, p.G13D-mutirane ćelije su pokazivale skoro pa isti odgovor kao i wt ćelije. Dobijeni rezultati ukazuju na potrebu za prospektivnim, randomizovanim studijama koje bi potvrdile potencijalni benefit od primene cetuksimaba kod pacijenata sa mCRC-om rezistentnih na HT-u.

U nedavno objavljenom apstraktu sa ASCO kongresa, Tejpar i saradnici (2011) su retrospektivno analizirali uticaj *KRAS* p.G13D mutacije na efikasnost terapije sa cetuksimabom u prvoj liniji sistemske terapije i poredili ga sa objedinjenim rezultatima

randomizovanih studija CRYSTAL i OPUS. Bolesnici sa ovom mutacijom kodona 13 su imali znatno niži terapijski efekat u poređenju sa bolesnicima sa wt *KRAS* tumorima, ali i pored toga su imali korist od terapije sa cetuksimabom.

Rezultati jedne male studije od 74 pacijenta, vođene od strane Loupakisa i kolega (2009) su sugerisali da retke *KRAS* mutacije u kodonima 61 i 146 mogu biti odgovorne za rezistenciju na EGFR-ciljanu terapiju antitelima. Nasuprot njima, u velikoj retrospektivnoj studiji De Roock-a zaključeno je da mutacije kodona 146 nisu imale uticaj na odgovor na cetuksimab, a da su pacijenti sa mutacijama kodona 61 u tumoru imali niži terapijski odgovor (De Roock et al., 2010a).

Jedan od potencijalnih dodatnih biomarkera odgovora na EGFR-ciljanu terapiju koji se poslednjih godina sve intenzivnije ispituje je i mutacioni status *BRAF* gena. Iako su *KRAS*- i *BRAF*-kodirani proteini često mutirani u istim tipovima tumora, istovremene mutacije ovih gena se jako retko sreću (pregled u You and Chen., 2012; Philips et al., 2010). Razlog tome je što oba gena podležu mutacijama sa sticanjem funkcije (eng. *gain-of-function*) i tako predstavljaju različite mehanizme aktivacije istog signalnog puta (pregled u Deschoolmeester et al., 2010). Među pacijentima sa wt *KRAS* genom, nosioci *BRAF* mutacija imaju lošiji ishod u poređenju sa onima sa wt *BRAF* statusom gena. Na primer, Di Nicolantonio i saradnici (2008) su pokazali u njihovoj studiji na 113 bolesnika sa mCRC da ni jedan bolesnik sa mutiranim *BRAF*-om nije odgovorio na terapiju cetuksimabom ili panitumumabom, a da među onima koji su odgovorili na terapiju ni jedan nije imao mutacije ovog gena. U drugoj retrospektivnoj studiji na 86 bolesnika, *BRAF* mutacije su bile nezavistan negativni prediktivni faktor PFS-a i OS-a kod bolesnika sa wt *KRAS*-om tretiranih cetuksimabom i irinotekanom (Cremolini et al., 2009). Analiza 724 bolesnika tretirana prethodno navedenom terapijom je pokazala da je *BRAF* mutiran u 5% slučajeva i da je asociiran sa smanjenim odgovorom u poređenju sa nosiocima wt *BRAF* gena (6% vs. 24%) (Tejpar et al., 2009a). Već pomenuta objedinjena analiza CRYSTAL i OPUS trajala je potvrdila da pacijenti sa mutiranim *BRAF* genom imaju mnogo lošiju prognozu nego oni sa wt *BRAF*-om (Bokemeyer et al., 2010). Nasuprot navedenim radovima, rezultati studije Tol-a i saradnika (2009a) predlažu *BRAF* kao prognostički, ali ne i kao prediktivni faktor efikasnosti cetuksimaba.

Kao što smo opisali, podaci iz literature još uvek nisu do kraja potvrđeni kada je u pitanju prediktivna uloga *BRAF* gena i uvođenje testiranja mutacija u kliničku praksu.

U podgrupi pacijenata sa wt *KRAS* genom želeli smo da proverimo da li postoji značajna razlika u procentu postignutog terapijskog odgovora (RR) na kombinovanu EGFR-ciljanu terapiju kod nosilaca najčešće *BRAF* mutacije u odnosu na one sa wt *BRAF* statusom. Kako smo dobili mali broj bolesnika koji su postigli RR (n=11), koji su pritom svi imali wt *BRAF*, nismo mogli da testiramo date parametre.

## 6. ZAKLJUČAK

Iz rezultata doktorske disertacije možemo da zaključimo sledeće:

- Učestalost *KRAS* mutacija (u egzonima 12 i 13) u našoj populaciji bolesnika obolelih od karcinoma kolorektuma je 35,1%, što je u skladu sa podacima iz literature. 89,4% *KRAS* mutacija detektovano je u kodonu 12 i 10,6% u kodonu 13.
- Spektar detektovanih tipova *KRAS* mutacija, kao i njihova učestalost, su takođe u saglasnosti sa podacima prikazanim u literaturi. Četiri najčešće mutacije, (p.G12D, p.G12V, p.G12A i p.G13D) su činile 84,8% svih detektovanih mutacija.
- Statistički značajno više *KRAS* mutacija je detektovano kod bolesnika sa PS1 i PS2 ECOG performans statusom u odnosu na PS0 bolesnike, te možemo pretpostaviti da su mutacije *KRAS*-a povezane sa lošijim opštim stanjem bolesnika sa CRC-om.
- Mutacije u *KRAS* genu nisu statistički značajno povezane sa ostalim testiranim kliničko-histopatološkim karakteristikama tumora, ali je uočena viša zastupljenost *KRAS* mutacija u karcinomima koji dublje prodiru kroz zid kolorektuma (većim tumorima), kao i kod bolesnika sa više metastaza u odnosu na one bez i sa samo jednom metastazom. Takođe, zapažen je i trend opadanja učestalosti ovih mutacija sa porastom histološkog gradusa tumora.
- *KRAS* mutacije u našoj populaciji su se češće javljale kod muškaraca (40,2%) u odnosu na žene (26,8%) i ta razlika je bila na granici statističke značajnosti.
- Uočen je trend opadanja *KRAS* mutacije p.G12V u odnosu na sve ostale detektovane mutacije sa porastom veličine tumora (T parametar).
- Učestalost *BRAF* mutacije p.V600E u našoj populaciji bolesnika sa kolorektalnim kancerom wt *KRAS* statusa je 1%, što je nešto niže u odnosu na literaturne podatke.
- Prediktivni značaj *KRAS* mutacija, procenjivan upoređivanjem vremena do pojave metastaza (TTM) kod pacijenata sa i bez *KRAS* mutacija posle adjuvantne terapije, nije utvrđen. Zapažen je trend boljeg preživljavanja bez

metastaza kod pacijenata sa mutacijama *KRAS*-a u odnosu na wt *KRAS* grupu.

- Terapijski odgovor (RR) na kombinovanu EGFR-ciljanu terapiju kod pacijenata sa wt *KRAS* statusom dobijen je u 15,3% slučajeva.

Na osnovu dobijenih rezultata možemo zaključiti da značajna povezanost mutacionog statusa *KRAS* gena sa kliničko-histopatološkim karakteristikama CRC-a i karakteristikama obolelih nije utvrđena za populaciju Srbije. Zastupljenost i distribucija mutacija u ovom genu su u skladu sa rezultatima drugih studija u svetu. Prediktivni značaj *KRAS* gena u odgovoru na adjuvantnu terapiju nije pokazan, ali je zapažen trend boljeg preživljavanja bez metastaza kod nosilaca *KRAS* mutacija. Zbog malog procenta *BRAF* p.V600E mutacije u našoj grupi nismo mogli da proverimo njen značaj kao biomarkera ispitivanog maligniteta. Pored ovih, određivanje i drugih, dodatnih genskih alteracija bi bilo od velike koristi za preciznije definisanje tumorskog genskog profila i individualizaciju terapije.

## LITERATURA

- Abubaker J, Bavi P, Al-Haqawi W, Sultana M, Al-Harbi S, Al-Sanea N et al. Prognostic significance of alterations in KRAS isoforms KRAS-4A/4B and KRAS mutations in colorectal carcinoma. *J Pathol* 2009; 219:435-45.
- Adjei AA. Blocking Oncogenic Ras Signaling for Cancer Therapy. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(14):1062-74.
- Ahnen DJ, Feigl P, Quan G, Fenoglio-Preiser C, Lovato LC, Bunn PA Jr et al. Ki-ras mutation and p53 overexpression predict the clinical behavior of colorectal cancer: A Southwest Oncology Group study. *Cancer Res* 1998; 58:1149-58.
- Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol* 2009; 27(12):2091-6.
- Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26:1626–34.
- American Cancer Society. Colorectal Cancer Facts & Figures 2011-2013. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2011.
- American Cancer Society. Colorectal Cancer Overview Guide, Atlanta: American Cancer Society, 2011.  
<http://www.cancer.org/Cancer/ColonandRectumCancer/OverviewGuide/index>
- American Joint Committee on Cancer. Colon and rectum in: AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010, 143-164.
- Andersen SN, Løvig T, Breivik J, Lund E, Gaudernack G, Meling GI et al. K-ras mutations and prognosis in large-bowel carcinomas. *Scand J Gastroenterol* 1997; 32(1):62-9.
- Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter “RASCAL” study. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:675–84.

- Andreyev HJN, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer* 2001; 85:692–6.
- Barault L, Veyrie N, Jooste V, Lecorre D, Chapusot C, Ferraz JM et al. Mutations in the RAS-MAPK, PI(3)K (phosphatidylinositol-3-OH kinase) signaling network correlate with poor survival in a population-based series of colon cancers. *Int J Cancer* 2008; 122:2255-9.
- Bariol C, Suter C, Cheong K, Ku SL, Meagher A, Hawkins N et al. The relationship between hypomethylation and CpG island methylation in colorectal neoplasia. *Am J Pathol* 2003; 162:1361-71.
- Bazan V, Agnese V, Corsale S, Calo V, Valerio MR, Latteri MA et al. Specific TP53 and/or Ki-ras mutations as independent predictors of clinical outcome in sporadic colorectal adenocarcinomas: results of a 5-year Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale (GOIM) prospective study. *Ann Oncol* 2005; 16 (Supplement 4):iv50-iv55.
- Bazan V, Migliavacca M, Zanna I, Tubiolo C, Grassi N, Latteri MA et al. Specific codon 13 K-ras mutations are predictive of clinical outcome in colorectal cancer patients, whereas codon 12 K-ras mutations are associated with mucinous histotype. *Ann Oncol* 2002; 13:1438-46.
- Bedi A, Pasricha PJ, Akhtar AJ, Barber JP, Bedi GC, Giardiello FM et al. Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer. *Cancer Res* 1995; 55:1811-6.
- Bell SM, Scott N, Cross D, Sagar P, Lewis FA, Blair GE et al. Prognostic value of p53 overexpression and c- Ki-ras gene mutations in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1993; 104:57– 64.
- Belly RT, Rosenblatt JD, Steinmann M, Toner J, Sun J, Shehadi J et al. Detection of mutated K12- ras in histologically negative lymph nodes as an indicator of poor prognosis in stage II colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2001; 1:110-6.
- Benhattar J, Losi L, Chaubert P, Givel JC, Costa J. Prognostic significance of K-ras mutation in colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 1993; 104:1044-8.

- Benlloch S, Paya A, Alenda C, Bessa X, Andreu M, Jover R et al. Detection of BRAF V600E mutation in colorectal cancer: comparison of automatic sequencing and realtime chemistry methodology. *J Mol Diagn* 2006; 8:540-3.
- Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Zanon C, Moroni M, Veronese S et al. Oncogenic Activation of the RAS/RAF Signaling Pathway Impairs the Response of Metastatic Colorectal Cancers to Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Antibody Therapies. *Cancer Res* 2007; 67(6):2643-8.
- Bleeker WA, Hayes VM, Karrenbeld A, Hofstra RM, Verlind E, Hermans J et al. Prognostic significance of K-ras and TP53 mutations in the role of adjuvant chemotherapy on survival in patients with Dukes C colon cancer. *Dis Colon Rectum* 2001; 44:358–363.
- Bokemeyer C, Kohne C, Rougier P, Stroh C, Schlichting M, Van Cutsem E. Cetuximab with chemotherapy (CT) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer (mCRC): Analysis of the CRYSTAL and OPUS studies according to KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol* 2010; 28:15s (suppl; abstr 3506).
- Borràs E, Jurado I, Hernan I, Gamundi MJ, Dias M, Martí I, Mañé B et al. Clinical pharmacogenomic testing of KRAS, BRAF and EGFR mutations by high resolution melting analysis and ultra-deep pyrosequencing. *BMC Cancer* 2011; 11:406.
- Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ et al. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature*. 1987; 327:293–7.
- Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989; 49(17):4682-9.
- Boyle P, Langman JS. ABC of Colorectal Cancer Epidemiology. *BMJ* 2000; 321:805-8.
- Burt RW. Colon Cancer Screening. *Gastroenterol* 2000; 119:837-53.
- Cacev T, Bulat S, Kapitanovic S. High resolution melting (HRM) analysis of BRAF V600E mutation in sporadic colon cancer. 2011; Program number: 1204W.



- Cancer.Net Guide Colorectal Cancer.  
<http://www.cancer.net/patient/Cancer+Types/Colorectal+Cancer?sectionTitle=Risk%20Factors%20and%20Prevention>
- Cappuzzo F, Varella-Garcia M, Finocchiaro G, Skokan M, Gajapathy S, Carnaghi C et al. Primary resistance to cetuximab therapy in EGFR FISH-positive colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 2008; 99:83-89.
- Carta C, Pantaleoni F, Bocchinfuso G, Stella L, Vasta I, Sarkozy A et al. Germline missense mutations affecting KRAS Isoform B are associated with a severe Noonan syndrome phenotype. *Am J Hum Genet* 2006; 79(1):129-35.
- Cejas P, López-Gómez M, Aguayo C, Madero R, de Castro Carpeño J, Beldaniesta C et al. KRAS Mutations in Primary Colorectal Cancer Tumors and Related Metastases: A Potential Role in Prediction of Lung Metastasis. *PLoS ONE* 2009; 4(12):e8199.
- Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E. Worldwide variations in colorectal cancer. *CA Cancer J Clin* 2009a; 59:366-78.
- Center MM, Jemal A, Ward E. International Trends in Colorectal Cancer Incidence Rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18:1688-94.
- Cerottini JP, Caplin S, Saraga E, Givel JC, Benhattar J. The type of K-ras mutation determines prognosis in colorectal cancer. *Am J Surg* 1998; 175:198-202.
- Chang EH, Gonda MA, Ellis RW, Scolnick EM, Lowy DR. Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79(16):4848-52.
- Chang YS, Yeh KT, Chang TJ, Chai C, Lu HC, Hsu NC et al. Fast simultaneous detection of K-RAS mutations in colorectal cancer. *BMC Cancer* 2009; 9:179.
- Cheng H, Zhang L, Cogdell DE, Zheng H, Schetter AJ, Nykter M et al. Circulating plasma MiR-141 is a novel biomarker for metastatic colon cancer and predicts poor prognosis. *PLoS One* 2011; 17(6):e17745.
- Clarke GA, Ryan E, Crowe JP, O'Keane JC, MacMathúna P. Tumour-derived mutated K-ras codon 12 expression in regional lymph nodes of stage II colorectal cancer patients is not associated with increased risk of cancer-related death. *Int J Colorectal Dis* 2001; 16:108-11.

- Cohen Y, Xing M, Mambo E, Guo Z, Wu G, Trink B et al. BRAF Mutation in Papillary Thyroid Carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95:625–7.
- Colby WW, Hayflick JS, Clark SG, Levinson AD. Biochemical characterization of polypeptides encoded by mutated human Ha-ras1 genes. *Mol Cell Biol* 1986; 6:730-4.
- Conlin A, Smith G, Carey F, Wolf CR, Steele RJ. The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut* 2005; 54:1283-6.
- Conradi LC, Bleckmann A, Schirmer M, Sprenger T, Jo P, Homayounfar K et al. Thymidylate synthase as a prognostic biomarker for locally advanced rectal cancer after multimodal treatment. *Ann Surg Oncol* 2011; 18(9):2442-52.
- Cremolini C, Loupakis F, Perrone G, Ruzzo A, Rulli E, Garavaglia D et al. BRAF V600E mutation and Amphiregulin (AR) immunohistochemical expression in the prediction of benefit from cetuximab plus irinotecan in KRAS wild-type metastatic colorectal cancer (mCRC) patients. *Proceedings of the 2009 ECCO-ESMO Congress* 2009; Abstract P-6113.
- Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351(4):337-45.
- D'Arrigo A, Belluco C, Ambrosi A, Digito M, Esposito G, Bertola A et al. Metastatic transcriptional pattern revealed by gene expression profiling in primary colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 2005; 115(2):256-62.
- Dasonville O, Bozec A, Fischel JL, Milano G. EGFR targeting therapies: Monoclonal antibodies versus tyrosine kinase inhibitors. Similarities and differences. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 62:53–61.
- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J et al. Mutations of the *BRAF* gene in human cancer. *Nature* 2002; 417:949–954.
- Davis MF, Vigil D, Campbell SL. Regulation of Ras proteins by reactive nitrogen species. *Free Radic Biol Med* 2011; 51:565-75.
- de Kok IM, Wong CS, Chia KS, Sim X, Tan CS, Kiemeny LA et al. Gender differences in the trend of colorectal cancer incidence in Singapore, 1968-2002. *Int J Colorectal Dis* 2008; 23(5):461-7.

- De Roock W, Biesmans B, De Schutter J, Tejpar S. Clinical biomarkers in oncology: focus on colorectal cancer. *Mol Diagn Ther* 2009; 13(2):103-14.
- De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilias G et al. Effect of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol* 2010a; 11:753-62.
- De Roock W, Jonker DJ, Di Nicolantonio F, Sartore-Bianchi A, Tu D, Siena S et al. Association of KRAS p.G13D Mutation With Outcome in Patients With Chemotherapy-Refractory Metastatic Colorectal Cancer Treated With Cetuximab. *JAMA* 2010; 304:1812-20.
- De Roock W, Piessevaux H, De Schutter J, Janssens M, De Hertogh G, Personeni N et al. KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann Oncol* 2008; 19:508-15.
- Der CJ, Cooper GM. Altered gene products are associated with activation of cellular *ras<sup>k</sup>* genes in human lung and colon carcinomas. *Cell*. 1983; 32(1):201-8.
- Der CJ, Finkel T, Cooper GM. Biological and biochemical properties of human *rasH* genes mutated at codon 61. *Cell* 1986; 44:167-76.
- Deschoolmeester V, Baay M, Specenier P, Lardon F, Vermorken JB. A review of the most promising biomarkers in colorectal cancer: one step closer to targeted therapy. *Oncologist* 2010; 15(7):699-731.
- Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F, Le Pessot F, Lamy A, Galais MP et al. Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy. *Br J Cancer* 2007; 96(8):1166-9.
- Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F, Le Pessot F, Lamy A, Galais MP et al. Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by cetuximab plus chemotherapy. *Br J Cancer* 2007; 96:1166-9.
- Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P et al. Wild-Type BRAF Is Required for Response to Panitumumab or Cetuximab in Metastatic Colorectal Cancer. *JCO* 2008; 26(35):5705-12.

- Do H, Dobrovic A. Limited copy number-high resolution melting (LCN-HRM) enables the detection and identification by sequencing of low level mutations in cancer biopsies. *Molecular Cancer* 2009; 8:82.
- Do H, Krypuy M, Mitchell PL, Fox SB, Dobrovic A. High resolution melting analysis for rapid and sensitive EGFR and KRAS mutation detection in formalin fixed paraffin embedded biopsies. *BMC Cancer* 2008; 8:142.
- Domingo E, Niessen RC, Oliveira C, Alhopuro P, Moutinho C, Espin E et al. BRAF-V600E is not involved in the colorectal tumorigenesis of HNPCC in patients with functional MLH1 and MSH2 genes. *Oncogene* 2005; 24:3995-8.
- Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature Rev Cancer* 2003; 3:11–22.
- Duffy MJ. Carcinoembryonic Antigen as a Marker for Colorectal Cancer: Is It Clinically Useful? *Clinical Chemistry* 2001; 47(4):624–630.
- Edkins S, O'Meara S, Parker A, Stevens C, Reis M, Jones S et al. Recurrent KRAS codon 146 mutations in human colorectal cancer. *Cancer Biol Ther* 2006; 5(8):928-32.
- Edwards BK, Ward E, Kohler BA, Ehemann C, Zauberg AG, Anderson RN et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer* 2010; 116(3):544-73.
- Elnatan J, Goh HS, Smith DR. c-Ki-ras activation and the biological behaviour of proximal and distal colonic adenocarcinomas. *Eur J Cancer* 1996; 32A(3):491-7.
- Esteller M, González S, Risques RA, Marcuello E, Mangués R, Germà JR et al. K-ras and p16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19:299-304.
- Etienne-Grimaldi MC, Formento JL, Francoual M, François E, Formento P, Renée N et al. K-Ras mutations and treatment outcome in colorectal cancer patients receiving exclusive fluoropyrimidine therapy. *Clin Cancer Res* 2008; 14:4830-5.

- Evans WE, Johnson JA. Pharmacogenomics: the inherited basis for interindividual differences in drug response. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2001; 2:9-39.
- Evans WE, McLeod HL. Pharmacogenomics – drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med* 2003; 348:538-49.
- Faris JE, Ryan DP. Trees, Forests, and Other Implications of a *BRAF* Mutant Gene Signature in Patients With *BRAF* Wild-Type Disease. *JCO* 2012; 30(12):1255-7.
- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61:759-67.
- Ferrari P, Jenab M, Norat T, Moskal A, Slimani N, Olsen A et al. Lifetime and baseline alcohol intake and risk of colon and rectal cancers in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *Int J Cancer* 2007; 21(9):2065-72.
- Finegold AA, Schafer WR, Rine J, Whiteway M, Tamanoi F. Common modifications of trimeric G proteins and ras protein: involvement of polyisoprenylation. *Science* 1990; 249(4965):165–9.
- Finkelstein SD, Sayegh R, Christensen S, Swalsky PA. Genotypic classification of colorectal adenocarcinoma. Biologic behavior correlates with K-ras-2 mutation type. *Cancer* 1993; 71:3827-38.
- Font A, Abad A, Monzó M, Sanchez JJ, Guillot M, Manzano JL et al. Prognostic value of K-ras mutations and allelic imbalance on chromosome 18q in patients with resected colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2001; 44:549-57.
- Forbes SA, Bhamra G, Bamford S, Dawson E, Kok C, Clements J et al. The Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC). *Curr Protoc Hum Genet* 2008; Chapter 10:Unit10.11. <http://www.sanger.ac.uk/perl/genetics/CGP/cosmic?action=bygene&ln=KRAS&start=1&end=189&coords=AA:AA>
- Franken SM, Scheidig AJ, Krengel U, Rensland H, Lautwein A, Geyer M et al. Three-dimensional structures and properties of a transforming and a nontransforming glycine-12 mutant of p21H-ras. *Biochemistry* 1993; 32(33):8411-20.

- Frattini M, Balestra D, Suardi S, Oggionni M, Alberici P, Radice P et al. Different Genetic Features Associated with Colon and Rectal Carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2004; 10:4015-21.
- Frattini M, Saletti P, Romagnani E, Martin V, Molinari F, Ghisletta M et al. PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 2007; 97:1139-45.
- Freeman DJ, Juan T, Reiner M, Hecht JR, Meropol NJ, Berlin J et al. Association of K-ras mutational status and clinical outcomes in patients with metastatic colorectal cancer receiving panitumumab alone. *Clin Colorectal Cancer* 2008; 7:184-90.
- Gangadhar T, Schilsky RL. Molecular markers to individualize adjuvant therapy for colon cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2010; 7:318-325.
- Garcia-Alvarez A, Serra-Majem L, Ribas-Barba L, Castell C, Foz M, Uauy R et al. Obesity and overweight trends in Catalonia, Spain (1992-2003): gender and socio-economic determinants. *Public Health Nutr* 2007; 10:1368-78.
- Garm Spindler KL, Pallisgaard N, Rasmussen AA, Lindebjerg J, Andersen RF, Crüger D et al. The importance of KRAS mutations and EGF61A>G polymorphism to the effect of cetuximab and irinotecan in metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2009; 20:879-84.
- Gideon P, John J, Frech M, Lautwein A, Clark R, Scheffler JE et al. Mutational and kinetic analyses of the GTPase-activating protein (GAP)-p21 interaction: the C-terminal domain of GAP is not sufficient for full activity. *Mol Cell Biol* 1992; 12(5):2050.
- Gill S, Loprinzi CL, Sargent DJ, Thomé SD, Alberts SR, Haller DG et al. Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much? *J Clin Oncol* 2004; 22:1797-1806.
- Giusti RM, Shastri K, Pilaro AM, Fuchs C, Cordoba-Rodriguez R, Kotiet K et al. U.S. food and drug administration approval: panitumumab for epidermal growth factor receptor-expressing metastatic colorectal carcinoma with progression following fluoropyrimidine-, oxaliplatin-, and irinotecan-containing chemotherapy regimens. *Clin Cancer Res* 2008; 14(5):1296–1302.

- Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, Chang DK, Ricciardiello L, Carethers JM et al. Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability. *Cancer Res* 2003; 63(7):1608-14.
- González-Aguilera JJ, Oliart S, Azcoita MM, Fernández-Peralta AM. Simultaneous mutations in K-ras and TP53 are indicative of poor prognosis in sporadic colorectal cancer. *Am J Clin Oncol* 2004; 27:39–45.
- Grady WM. Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004; 23:11-27.
- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the *p53* tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54:4855-78.
- Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G et al. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 2007; 446:153-8.
- Guerrero S, Casanova I, Farre´ L, Mazo A, Capellà G, Mangués R. *K-ras* codon 12 mutation induces higher level of resistance to apoptosis and predisposition to anchorage-independent growth than codon 13 mutation or proto-oncogene overexpression. *Cancer Res* 2000; 60(23):6750-6.
- Haigis KM, Kendall KR, Wang Y, Cheung A, Haigis MC, Glickman JN et al. Differential effects of oncogenic *K-Ras* and *N-Ras* on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nat Genet* 2008; 40:600-8.
- Halaban R. The regulation of normal melanocyte proliferation. *Pigment Cell Res* 2000; 13:4–14.
- Halter SA, Webb L, Rose J. Lack of ras mutations and prediction of longterm survival in carcinoma of the colon. *Mod Pathol* 1992; 5:131-4.
- Hamilton SR. Targeted therapy of cancer: new roles for pathologists in colorectal cancer. *Mod Pathol* 2008; 21:23-30.
- Hardingham JE, Butler WJ, Roder D, Dobrovic A, Dymock RB, Sage RE et al. Somatic mutations, acetylator status, and prognosis in colorectal cancer. *Gut* 1998; 42:669-72.

- Hecht JR, Patnaik A, Berlin J, Venook A, Malik I, Tchekmedyian S et al. Panitumumab monotherapy in patients with previously treated metastatic colorectal cancer. *Cancer* 2007; 110(5):980-8.
- Herreros-Villanueva M, Rodrigo M, Claver M et al. KRAS, BRAF, EGFR and HER2 gene status in a Spanish population of colorectal cancer. *Mol Biol Rep* 2011; 38:1315–20.
- Holden JA, Willmore-Payne C, Coppola D, Garrett CR, Layfield LJ. High-resolution melting amplicon analysis as a method to detect c-kit and platelet-derived growth factor receptor alpha activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Am J Clin Pathol* 2007; 128:230-8.
- Houghton JA, Ebanks R, Harwood FG, Tillman DM. Inhibition of apoptosis after thymineless stress is conferred by oncogenic K-Ras in colon carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1998; 4:2841-8.
- Huang CS, Farraye FA, Yang S, O'Brien MJ. The clinical significance of serrate polyps. *Am J Gastroenterol* 2011; 106:229-40.
- Hutchins G, Southward K, Handley K, Magill L, Beaumont C, Stahlschmidt J et al. Value of Mismatch Repair, KRAS, and BRAF Mutations in Predicting Recurrence and Benefits from Chemotherapy in Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29:1261-70.
- Ikehara N, Semba S, Sakashita M, Aoyama N, Kasuga M, Yokozaki H. BRAF mutation associated with dysregulation of apoptosis in human colorectal neoplasms. *Int J Cancer* 2005; 115:943-50.
- International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2008 Cancer Fact Sheet. Colorectal Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2008 Summary. <http://globocan.iarc.fr>
- International Multicenter Pooled Analysis of B2 Colon Cancer Trials (IMPACT B2) investigators. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in B2 colon cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17:1356–1363.
- Jančík S, Drábek J, Radzioch D, Hajdúch M. Clinical Relevance of KRAS in Human Cancers. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010:150960.



- Jarry A, Masson D, Cassagnau E, Parois S, Laboisie C, Denis MG. Real-time allele-specific amplification for sensitive detection of the BRAF mutation V600E. *Mol Cell Probes* 2004; 18:349-52.
- Jass JR, Whitehall VL, Young J, Leggett BA. Emerging concepts in colorectal neoplasia. *Gastroenterology* 2002; 123(3):862-76.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61:69–90.
- Jennings-Gee JE, Moore JE, Xu M, Dance ST, Kock ND, McCoy TP, Carr JJ, Miller MS. Strain-specific induction of murine lung tumors following in utero exposure to 3-methylcholanthrene. *Mol Carcinog* 2006; 45:676-84.
- Jones Jr DV, Winn RJ, Brown BW, Levy LB, Pugh RP, Wade III JL, et al. Randomized phase III Study of 5-fluorouracil plus high dose folinic acid versus 5-fluorouracil plus folinic acid plus methyl-lomustine for patients with advanced colorectal cancer. *Cancer* 1995; 76:1709-14.
- Jonkers J, Berns A. Oncogene addiction: sometimes a temporary slavery. *Cancer Cell* 2004; 6(6):535-8.
- Justin C. Genomic Variation: The Search for Our Past and Our Future. *The Journal of Young Investigators* 2007; 16(5).
- Kalady M, Sanchez J, Manilich E, Hammel J, Casey G, Church JM. Divergent oncogenic changes influence survival differences between colon and rectal adenocarcinomas. *Dis Colon Rectum* 2009; 52:1039-45.
- Kalow W, Tang BK, Endrenyi L. Hypothesis: comparisons of inter- and intra-individual variations can substitute for twin studies in drug research. *Pharmacogenetics* 1998; 8(4):283-9.
- Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008; 359(17):1757-65.
- Kefford R, Arkenau H, Brown MP, Millward M, Infante JR, Long GV et al. Phase I/II study of GSK2118436, a selective inhibitor of oncogenic mutant BRAF kinase, in patients with metastatic melanoma and other solid tumors. *J Clin Oncol* 2010; 28:611s (suppl: abstr 8503).

- Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, Basik M, Harbison CT, Wu S et al. Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2007; 25:3230-7.
- Kim IJ, Kang HC, Jang SG, Ahn SA, Yoon HJ, Park JG. Development and applications of a BRAF oligonucleotide microarray. *J Mol Diagn* 2007; 9:55–63.
- Klampfer L, Swaby LA, Huang J, Sasazuki T, Shirasawa S, Augenlicht L. Oncogenic Ras increases sensitivity of colon cancer cells to 5-FU-induced apoptosis. *Oncogene* 2005; 24:3932-41.
- Kobayashi M, Watanabe H, Ajioka Y, Honma T, Asakura H. Effect of K-ras mutation on morphogenesis of colorectal adenomas and early cancers: relationship to distribution of proliferating cells. *Hum Pathol* 1996; 27:1042-9.
- Kolligs FT, Crispin A, Munte A, Wagner A, Mansmann U, Göke B. Risk of advanced colorectal neoplasia according to age and gender. *PLoS One* 2011; 6(5):e20076.
- Kopetz S, Desai J, Chan E, Hecht JR, O'Dwyer PJ, Lee RJ et al. PLX4032 in metastatic colorectal cancer patients with mutant BRAF tumors. *J Clin Oncol* 2010; 28:269s (suppl: abstr 3534).
- Kotoula V, Charalambous E, Biesmans B, Malousi A, Vrettou E, Fountzilias G et al. Targeted KRAS Mutation Assessment on Patient Tumor Histologic Material in Real Time Diagnostics. *PLoS ONE* 2009; 4:e7746.
- Kozuka S, Nogaki M, Ozeki T, Masumori S. Premalignancy of the mucosal polyp in the large intestine. II. Estimation of the periods required for malignant transformation of mucosal polyps. *Dis Colon Rectum* 1975; 18:494–500.
- Krtolica K, Krajnovic M, Usaj-Knezevic S, Babic D, Jovanovic D, Dimitrijevic B. Comethylation of p 16 and MGMT genes in colorectal carcinoma: Correlation with clinicopathological features and prognostic value. *World J Gastroenterol* 2007; 13(8):1187-94.
- Kuebler JP, Wieand HS, O'Connell MJ, Smith RE, Colangelo LH, Yothers G et al. Oxaliplatin combined with weekly bolus fluorouracil and leucovorin as

surgical adjuvant chemotherapy for stage II and III colon cancer: results from NSABP C-07. *J Clin Oncol* 2007; 25:2198-204.

- Kumar R, Angelini S, Czene K, Sauroja I, Hahka-Kemppinen M, Pyrhonen S et al. BRAF mutations in metastatic melanoma: a possible association with clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2003; 9(9):3362-8.
- Laurent-Puig P, Cayre A, Manceau G, Buc E, Bachet JB, Lecomte T et al. Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27:5924-30.
- Lee JC, Wang ST, Lai MD, Lin YJ, Yang HB. K-ras gene mutation is a useful predictor of the survival of early stage colorectal cancers. *Anticancer Res* 1996; 16:3839-44.
- Lee S, Cho N-Y, Choi M, Yoo EJ, Kim JH, Kang GH. Clinicopathological features of CpG methylator phenotype-positive colorectal cancer and its adverse prognosis in relation to KRAS/BRAF mutation. *Pathol Int* 2008; 58:104-13.
- Li Z, Jin K, Lan H, Teng L. Heterogeneity in Primary Colorectal Cancer and its Corresponding Metastases: A Potential Reason of EGFR-Targeted Therapy Failure? *Hepato-Gastroenterology* 2011; 58(106):411-16.
- Liang JT, Cheng YM, Chang KJ, Chien CT, Hsu HC. Reappraisal of K-ras and p53 gene mutations in the recurrence of Dukes' B2 rectal cancer after curative resection. *Hepatogastroenterology* 1999; 46:830-7.
- Ličar A, Cerkovnik P, Novakovic S. Distribution of some activating KRAS and BRAF mutations in Slovene patients with colorectal cancer. *Med Oncol* 2011; 28:1048-53.
- Liefers GJ, Tollenaar RA. Cancer genetics and their application to individualized medicine. *Eur J Cancer* 2002; 38:872-9.
- Lièvre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2008; 26:374-9.
- Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006; 66:3992-5.

- Linardou H, Briasoulis E, Dahabreh IJ, Mountzios G, Papadimitriou C, Papadopoulos S et al. All about KRAS for clinical oncology practice: gene profile, clinical implications and laboratory recommendations for somatic mutational testing in colorectal cancer. *Cancer Treat Rev* 2011; 37(3):221-33.
- Linardou H, Dahabreh IJ, Kanaloupiti D, Siannis F, Bafaloukos D, Kosmidis P et al. Assessment of somatic k-RAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol* 2008; 9:962-72.
- Linnemann U, Schimanski CC, Gebhardt C, Berger MR. Prognostic value of disseminated colorectal tumor cells in the liver: Results of follow-up examinations. *Int J Colorectal Dis* 2004; 19:380-6.
- Liu X, Jakubowski M, Hunt JL. KRAS gene mutation in colorectal cancer is correlated with increased proliferation and spontaneous apoptosis. *Am J Clin Pathol* 2011;135(2):245-52.
- Losi L, Luppi G, Benhattar J. Assessment of K-ras, Smad4 and p53 gene alterations in colorectal metastases and their role in the metastatic process. *Oncol Rep* 2004; 12:1221-5.
- Loupakis F, Ruzzo A, Cremolini C, Vincenzi B, Salvatore L, Santini D et al. KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009; 101(4):715-21.
- Lurje G, Nagashima F, Zhang W, Yang D, Chang HM, Gordon MA et al. Polymorphisms in cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor are associated with progression-free survival independent of K-ras in metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab. *Clin Cancer Res* 2008; 14:7884-95.
- Maciag A, Sithanandam G, Anderson LM. Mutant K-rasV12 increases COX-2, peroxides and DNA damage in lung cells. *Carcinogenesis* 2004; 25:2231-7.
- Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev* 2003; 3:7-13.

- Manne V, Bekesi E, Kung HF. Ha-ras proteins exhibit GTPase activity: point mutations that activate Ha-ras gene products result in decreased GTPase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:376-80.
- Mao C, Liao RY, Qiu LX, Wang XW, Ding H, Chen Q. BRAF V600E mutation and resistance to anti-EGFR monoclonal antibodies in patients with metastatic colorectal cancer: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2011; 38(4):2219-23.
- Marais R, Light Y, Paterson HF, Mason CS, Marshall CJ. Differential Regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by Oncogenic Ras and Tyrosine Kinases. *J Biol Chem* 1997; 272(7):4378-83.
- Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular Basis of Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 2009; 361:2449-60.
- Martini M, Vecchione L, Siena S, Tejpar S, Bardelli A. Targeted therapies: how personal should we go? *Nat Rev Clin Oncol* 2012; 9:87-97.
- Mason CS, Springer CJ, Cooper RG, Superti-Furga G, Marshall CJ, Marais R. Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *EMBO J* 1999; 18(8):2137-48.
- McGrath JP, Capon DJ, Goeddel DV, Levinson AD. Comparative biochemical properties of normal and activated human ras p21 protein. *Nature* 1984; 310:644-9.
- McGrath JP, Capon DJ, Smith DH, Chen EY, Seeburg PH, Goeddel DV et al. Structure and organization of the human Ki-ras proto-oncogene and a related processed pseudogene. *Nature* 1983; 304:501-6.
- McMichael AJ, Giles GG. Cancer in Migrants to Australia: Extending the Descriptive Epidemiological Data. *Cancer Res* 1988; 48:751-6.
- Mercer KE, Pritchard CA. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1653(1):25-40.
- Miller MS, Miller LD. RAS mutations and oncogenesis: not all RAS mutations are created equally. *Front Genet* 2011; 2:100.
- Mino P, Zlobec I, Peterson M, Terracciano L, Lugli A. Characterization of rectal, proximal and distal colon cancers based on clinicopathological, molecular and protein profiles. *Int J Oncol* 2010; 37:707-18.

- Moerkerk P, Arends JW, van Driel M, de Brulne A, de Goeij A, ten Kate J. Type and number of Ki-ras point mutations relate to stage of human colorectal cancer. *Cancer Res* 1994; 54:3376-8.
- Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S et al. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 2007; 25(15):1960-6.
- Moroni M, Veronese S, Benvenuti S, Marrapese G, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F et al. Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: A cohort study. *Lancet Oncol* 2005; 6:279-86.
- Nacionalni program za prevenciju kolorektalnog karcinoma. <http://www.minzdravlja.info/downloads/Zakoni/Strategije/Nacionalni%20Program%20Za%20Prevenciju%20Kolorektalnog%20Karcinoma.pdf>
- Nash GM, Gimbel M, Cohen AM, Zeng ZS, Ndubuisi MI, Nathanson DR et al. KRAS mutation and microsatellite instability: Two genetic markers of early tumor development that influence the prognosis of colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2010a; 17:416-24.
- Nash GM, Gimbel M, Shia J, Nathanson DR, Ndubuisi MI, Zeng ZS et al. KRAS mutation correlates with accelerated metastatic progression in patients with colorectal liver metastases. *Ann Surg Oncol* 2010; 17:572-8.
- National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines<sup>®</sup>). Available at: [www.nccn.org](http://www.nccn.org) Accessed: March 14, 2012.
- Ogino S, Meyerhardt JA, Irahara N, Niedzwiecki D, Hollis D, Saltz LB et al. KRAS mutation in stage III colon cancer and clinical outcome following intergroup trial CALGB 89803. *Clin Cancer Res* 2009; 15:7322-9.
- Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, Kawasaki T, Meyerhardt JA, Loda M et al. CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut* 2009a; 58:90-96.

- Ogino S, Shima K, Meyerhadt J, McCleary NJ, Ng K, Hollis D et al. Predictive and Prognostic Roles of BRAF Mutation in Stage III Colon Cancer: Results from Intergroup Trial CALGB 89803. *Clin Cancer Res* 2012; 18:890-900.
- Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET et al. Toxicity And Response Criteria Of The Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol* 1982; 5:649-55.
- Oliveira C, Westra JL, Arango D, Ollikainen M, Domingo E, Ferreira A et al. Distinct patterns of KRAS mutations in colorectal carcinomas according to germline mismatch repair defects and hMLH1 methylation status. *Human Molecular Genetics* 2004; 13 (19):2303–11.
- Osterop AP, Medema RH, vd Zon GC, Bos JL, Moller W, Maassen JA. Epidermal growth-factor receptors generate Ras GTP more efficiently than insulin receptors. *Eur J Biochem* 1993; 212:477–82.
- Pajkos G, Kiss I, Sándor J, Ember I, Kisházi P. The prognostic value of the presence of mutations at the codons 12, 13, 61 of K-ras oncogene in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2000; 20:1695-1701.
- Pao W, Wang TY, Riely GJ, Miller VA, Pan Q, Ladanyi M et al. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med* 2005; 2(1):e17.
- Patil DT, Fraser CR, Plesec TP. KRAS Testing and Its Importance in Colorectal Cancer. *Curr Oncol Rep* 2010; 12:160–7.
- Perea J, Lomas M, Hidalgo M. Molecular basis of colorectal cancer: Towards an individualized management? *Rev Esp Enferm Dig* 2011; 103(1):29-35.
- Philip PA, Benedetti J, Fenoglio-Preiser C, Zalupski M, Lenz H, O'Reilly E et al. Phase III study of gemcitabine [G] plus cetuximab [C] versus gemcitabine in patients [pts] with locally advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma [PC]: SWOG S0205 study [2007 ASCO Meeting abstracts]. *J Clin Oncol* 2007; 25(18):LBA4509.
- Phillips B, Kalady M, Kim R. BRAF Testing in Advanced Colorectal Cancer: Is It Ready for Prime Time? *Clin Adv Hematol Oncol* 2010; 8:437-44.

- Pichler M, Balic M, Stadelmeyer E, Ausch C, Wild M, Guelly C et al. Evaluation of high-resolution melting analysis as a diagnostic tool to detect the BRAF V600E mutation in colorectal tumors. *J Mol Diagn* 2009; 11(2):140-7.
- Poehlmann A, Kuester D, Meyer F, Lippert H, Roessner A, Schneider-Stock R et al. K-ras mutation detection in colorectal cancer using the Pyrosequencing technique. *Pathol Res Pract* 2007; 203:489-97.
- Popescu NC, Amsbaugh SC, DiPaolo JA. Chromosomal localization of three human ras genes by in situ molecular hybridization. *Somatic Cell and Molecular Genetics* 1985; 11(2):149–55.
- Popovici V, Budinska E, Tejpar S, Weinrich S, Estrella H, Hodgson G et al. Identification of a Poor-Prognosis BRAF-Mutant-Like Population of Patients With Colon Cancer. Published online before print March 5, 2012; doi: 10.1200/JCO.2011.39.5814.
- Porebska I, Harlozińska A, Bojarowski T. Expression of the tyrosine kinase activity growth factor receptors (EGFR, ERB B2, ERB B3) in colorectal adenocarcinomas and adenomas. *Tumour Biol* 2000; 21(2):105-15.
- Pratilas CA, Xing F, Solit DB. Targeting oncogenic BRAF in human cancer. *Curr Top Microbiol Immunol* Published online before print August 5, 2011.
- Quasar collaborative group. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *Lancet* 2007; 370:2020-9.
- Quinlan MP, Settleman J. Isoform-specific ras functions in development and cancer. *Future Oncology* 2009; 5(1):105-16.
- Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 2002; 418:934.
- Registar za rak u centralnoj Srbiji. Incidencija i mortalitet od raka u centralnoj Srbiji 2009. Institut za zaštitu zdravlja Srbije “Dr Milan Jovanović - Batut” 2011.
- Richman SD, Seymour MT, Chambers P, Elliott F, Daly CL, Meade AM et al. KRAS and BRAF mutations in advanced colorectal cancer are associated with poor prognosis but do not preclude benefit from oxaliplatin or irinotecan: Results from the MRC FOCUS trial. *J Clin Oncol* 2009; 27:5931-7.



- Risio M, Malacarne D, Giaretti W. *KRAS* transitions and villous growth in colorectal adenomas. *Cell Oncol* 2005; 27:363-6.
- Rivera F, Vega-Villegas ME, Lopez-Brea MF, Marquez R. Current situation of Panitumumab, Matuzumab, Nimotuzumab and Zalutumumab. *Acta Oncol* 2008; 47:9 19.
- Rosenberg DW, Yang S, Pleau DC, Greenspan EJ, Stevens RG, Rajan TV et al. Mutations in *BRAF* and *KRAS* differentially distinguish serrated versus non-serrated hyperplastic aberrant crypt foci in humans. *Cancer Res* 2007; 67:3551-4.
- Roskoski Jr R. RAF protein-serine/threonine kinases: Structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 399:313-7.
- Rosty C, Chazal M, Etienne MC, Letoublon C, Bourgeon A, Delpero JR et al. Determination of microsatellite instability, P53 and K-Ras mutations in hepatic metastases from patients with colorectal cancer: relationship with response to 5-fluorouracil and survival. *Int J Cancer* 2001; 95:162-7.
- Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, Yan P, Fiocca R, Klingbiel D 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.
- Rushworth LK, Hindley AD, O'Neill E, Kolch W. Regulation and Role of Raf-1/B-Raf Heterodimerization. *Mol Cell Biol* 2006; 26(6):2262-72.
- Saltz LB, Niedzwiecki D, Hollis D, Goldberg RM, Hantel A, Thomas JP et al. Irinotecan fluorouracil plus leucovorin is not superior to fluorouracil plus leucovorin alone as adjuvant treatment for stage III colon cancer: results of CALGB 89803. *J Clin Oncol* 2007; 25:3456-61.
- Sameer AS, Chowdhri NA, Abdullah S, Shah ZA, Siddiqi MA. Mutation pattern of K-ras gene in colorectal cancer patients of Kashmir: A report. *Indian J Cancer* 2009; 46(3):219-25.
- Samowitz WS, Curtin K, Schaffer D, Robertson M, Leppert M, Slattery ML. Relationship of Ki-ras mutations in colon cancers to tumor location, stage, and survival: a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9(11):1193-7.

- Samowitz WS, Holden JA, Curtin K, Edwards SL, Walker AR, Lin HA, Robertson MA, Nichols MF, Gruenthal KM, Lynch BJ, Leppert MF, Slattery ML. Inverse relationship between microsatellite instability and K-ras and p53 gene alterations in colon cancer. *Am J Pathol* 2001; 158:1517-24.
- Samowitz WS, Sweeney C, Herrick J, Albertsen H, Levin TR, Murtaugh MA et al. Poor Survival Associated with the BRAF V600E Mutation in Microsatellite-Stable Colon Cancers. *Cancer Res* 2005; 65:6063-69.
- Samuels Y, Diaz LA Jr, Schmidt-Kittler O, Cummins JM, DeLong L, Cheong I et al. Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell* 2005; 7(6):561-73.
- Sanchez JA, Krumroy L, Plummer S, Aung P, Merkulova A, Skacel M et al. Genetic and epigenetic classifications define clinical phenotypes and determine patient outcomes in colorectal cancer. *Br J Surg* 2009; 96(10):1196-204.
- Santini D, Loupakis F, Vincenzi B, Floriani I, Stasi I, Canestrari E et al. High Concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice. *Oncologist* 2008; 13:1270-5.
- Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Nichelatti M, Molinari F, De Dosso S, Saletti P et al. Multi-determinants analysis of molecular alterations for predicting clinical benefit to EGFR-targeted monoclonal antibodies in colorectal cancer. *PLoS ONE* 2009; 4:e7287.
- Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, Veronese S, Nichelatti M, Artale S et al. PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. *Cancer Res* 2009; 69:1851-7.
- Scheffzek K, Ahmadian MR, Kabsch W, Wiesmüller L, Lautwein A, Schmitz F et al. The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* 1997; 277(5324):333–8.
- Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(4):295-308.
- Seeburg PH, Colby WW, Capon DJ, Goeddel DV, Levinson AD. Biological properties of human c-Ha-ras1 genes mutated at codon 12. *Nature* 1984; 312(5989):71-5.

- Segditsas S, Tomlinson I. Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene* 2006; 25:7531–7.
- Shen L, Toyota M, Kondo Y, Lin E, Zhang L, Guo Y et al. Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *PNAS* 2007; 104(47):18654-9.
- Siena S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Balfour J, Bardelli A. Biomarkers Predicting Clinical Outcome of Epidermal Growth Factor Receptor–Targeted Therapy in Metastatic Colorectal Cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101:1-17.
- Simi L, Pratesi N, Vignoli M, Sestini R, Cianchi F, Valanzano R et al. High-resolution melting analysis for rapid detection of KRAS, BRAF, and PIK3CA gene mutations in colorectal cancer. *Am J Clin Pathol* 2008; 130:247-53.
- Singer G, Oldt R 3rd, Cohen Y, Wang BG, Sidransky D, Kurman RJ et al. Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(6):484-6.
- Sjöblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 2006; 314(5797):268-74.
- Slattery ML, Curtin K, Wolff RK, Boucher KM, Sweeney C, Edwards S et al. A comparison of colon and rectal somatic DNA alterations. *Dis Colon Rectum* 2009; 52(7):1304-11.
- Smakman N, Borel Rinkes IH, Voest EE, Kranenburg O. Control of colorectal metastasis formation by K-Ras. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1756:103-14.
- Smakman N, van den Wollenberg DJM, Elias SG, Sasazuki T, Shirasawa S, Hoeben RC et al. *KRASD13* promotes apoptosis of human colorectal tumor cells by ReovirusT3D and oxaliplatin but not by tumor necrosis factor–related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Res* 2006; 66:5403-8.
- Smith G, Carey F, Beattie J, Wilkie MJV, Lightfoot TJ, Coxhead J et al. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53-alternative genetic pathways to colorectal cancer. *PNAS* 2002; 99(14):9433-8.
- Snover DC. Update on serrated pathway to colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 2011; 42(1):1-10.

- Sohn BS, Kim TW, Lee JL, Ryu MH, Chang HM, Kang YK et al. The role of KRAS mutations in predicting the efficacy of cetuximab-plus-irinotecan therapy in irinotecan-refractory Korean metastatic colorectal cancer patients. *Oncology* 2009; 77:224-30.
- Souglakos J, Philips J, Wang R, Marwah S, Silver M, Tzardi M et al. Prognostic and predictive value of common mutations for treatment response and survival in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009; 101:465-72.
- Spano JP, Fagard R, Soria JC, Rixe O, Khayat D, Milano G. Epidermal growth factor receptor signaling in colorectal cancer: preclinical data and therapeutic perspectives. *Ann Oncol* 2005; 16:189–94.
- Sridhar SS, Hedley D, Siu LL. Raf kinase as a target for anticancer therapeutics. *Mol Cancer Ther* 2005; 4(4):677-85.
- Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol* 2002; 161:1961-71.
- Stewart SL, Wike JM, Kato I, Lewis DR, Michaud F. A population-based study of colorectal cancer histology in the United States, 1998-2001. *Cancer* 2006; 107(5 Suppl):1128-41.
- Sweet RW, Yokoyama S, Kamata T, Feramisco JR, Rosenberg M, Gross M. The product of ras is a GTPase and the T24 oncogenic mutant is deficient in this activity. *Nature* 1984; 311:273-5.
- Tejpar S, Bosman F, Delorenzi M, Fiocca R, Yan P, Klingbiel D et al. Microsatellite instability (MSI) in stage II and III colon cancer treated with 5-FU-LV or 5FULV and Irinotecan (PETACC 3-EORTC 40993-SAKK 60/00 trial). *Proc ASCO Meeting Abstract* 2009; 27: 4001.
- Tejpar S, Bukemeyer C, Celik I, Schlichting M, Sartorius U, Van Cutsem E et al. Influence of KRAS G13D mutations on outcome in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with first-line chemotherapy with or without cetuximab. *ASCO* 2011 [abstract 3511].
- Tejpar S, De Roock W. PIK3CA, BRAF and KRAS mutations and outcome prediction in chemorefractory metastatic colorectal cancer (mCRC) patients treated with EGFR targeting monoclonal antibodies (MoAbs): results of a

European Consortium. *Proceedings of the 2009 ECCO-ESMO Congress 2009a*; Abstract O-6005.

- Tol J, Dijkstra J, Vink-Börger M, et al. BRAF mutation is associated with a decreased outcome in patients (pts) with advanced colorectal cancer (ACC) treated with chemotherapy and bevacizumab with or without cetuximab. *Proceedings of the 2009 ECCO-ESMO Congress 2009a*; Abstract O-6002.
- Tol J, Koopman M, Rodenburg CJ, Cats A, Creemers GJ, Schrama JG et al. A randomised phase III study on capecitabine, oxaliplatin and bevacizumab with or without cetuximab in first-line advanced colorectal cancer, the CAIRO2 study of the Dutch Colorectal Cancer Group (DCCG). An interim analysis of toxicity. *Ann Oncol* 2008; 19:734-8.
- Tol J, Nagtegaal ID, Punt CJ. BRAF mutation in metastatic colorectal carcinoma. *N Engl J Med* 2009; 361:98-9.
- Tortola S, Marcuello E, González I, Reyes G, Arribas R, Aiza G et al. p53 and K-ras gene mutations correlate with tumor aggressiveness but are not of routine prognostic value in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17:1375-81.
- Vakiani E, Solit D. KRAS and BRAF: drug targets and predictive biomarkers. *J Pathol* 2011; 223:219–29.
- Van Cutsem E, Lang I, Folprecht G, Nowacki M, Cascinu S, Shchepotin I et al. Cetuximab plus FOLFIRI in the treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC): the influence of *KRAS* and *BRAF* biomarkers on outcome: updated data from the CRYSTAL trial. *American Society of Clinical Oncology 2010 Gastrointestinal Cancers Symposium (GCS)*. 2010; Abstract No. 281.
- Van Cutsem E, Nowacki M, Lang I, S Cascinu, I Shchepotin, J Maurel et al. Randomized phase III study of irinotecan and 5FU/FA with or without cetuximab in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: The CRYSTAL study [abstract 4000]. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2007; 25:4000.
- Van Krieken JHJM, Jung A, Kirchner T, Seruca R, Bosman FT, Quirke P et al. KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program. *Virchows Arch* 2008; 453:417–31. Vandersteen JG, Bayrak-Toydemir P, Palais

- RA, Wittwer CT. Identifying common genetic variants by high-resolution melting. *Clin Chem* 2007; 53:1191-8.
- Velho S, Moutinho C, Cirnes L, Albuquerque C, Hamelin R, Schmitt F et al. *BRAF*, *KRAS* and *PIK3CA* mutations in colorectal serrated polyps and cancer: Primary or secondary genetic events in colorectal carcinogenesis? *BMC Cancer* 2008; 8:255.
  - Wadler S, Bajaj R, Neuberger D, Agarwal V, Haynes H, Benson AB 3rd. Prognostic implications of c-Ki-ras2 mutations in patients with advanced colorectal cancer treated with 5-fluorouracil and interferon: a study of the eastern cooperative oncology group (EST 2292). *Cancer J Sci Am* 1997; 3(5):284-8.
  - Wan PTC, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM et al. Mechanism of Activation of the RAF-ERK Signaling Pathway by Oncogenic Mutations of B-RAF. *Cell* 2004; 116:855–67.
  - Wang JY, Wang YH, Jao SW, Lu CY, Kuo CH, Hu HM et al. Molecular mechanisms underlying the tumorigenesis of colorectal adenomas: correlation to activated K-ras oncogene. *Oncol Rep* 2006; 16(6):1245-52.
  - Weinstein IB. Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science* 2002; 297(5578):63-4.
  - Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5(11):875-85.
  - Whitehall VL, Walsh MD, Young J, Leggett BA, Jass JR. Methylation of O-6-methylguanine DNA methyltransferase characterizes a subset of colorectal cancer with low-level DNA microsatellite instability. *Cancer Res* 2001; 61:827-30.
  - Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE. Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N Engl J Med* 1990; 323:1664-72.
  - Williams JG, Pappu K, Campbell SL. Structural and biochemical studies of p21Ras S-nitrosylation and nitric oxide-mediated guanine nucleotide exchange. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:6376-81.

- Willmore-Payne C, Holden JA, Tripp S, Layfield LJ. Human malignant melanoma: detection of BRAF- and c-kit-activating mutations by highresolution amplicon melting analysis. *Hum Pathol* 2005; 36:486-93.
- Wolmark N, Rockette H, Mamounas E, Jones J, Wieand S, Wickerham DL et al. Clinical trial to assess the relative efficacy of fluorouracil and leucovorin, fluorouracil and levamisole, and fluorouracil, leucovorin, and levamisole in patients with Dukes' B and C carcinoma of the colon: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project C-04. *J Clin Oncol* 1999;17:3553-9.
- Wood LD, Williams Parsons D, Jones S, Lin J, Sjöblom T, Leary RJ et al. The Genomic Landscapes of Human Breast and Colorectal Cancers. *Science* 2007; 318(5853):1108-13.
- World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Food, nutrition, physical activity and the prevention of cancer: a global perspective. *AICR*, 2007.
- Worthley DL, Leggett BA. Colorectal cancer: Molecular features and clinical opportunities. *Clin Biochem Rev* 2010; 31:31-8.
- Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ, Leggett BA. Colorectal carcinogenesis: Road maps to cancer. *World J Gastroenterol* 2007; 13(28):3784-91.
- Wynter CV, Walsh MD, Higuchi T, Leggett BA, Young J, Jass JR. Methylation patterns define two types of hyperplastic polyp associated with colorectal cancer. *Gut* 2004; 53:573-80.
- Zhao DB, Chandler I, Chen ZM, Pan HC, Popat S, Shao YF et al. Mismatch repair, minichromosome maintenance complex component 2, cyclin A, and transforming growth factor  $\beta$  receptor type II as prognostic factors for colorectal cancer: results of a 10-year prospective study using tissue microarray analysis. *Chin Med J (Engl)* 2011; 124(4):483-90.
- Zlobec I, Lugli A. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 2008; 61:561-9.
- Zlobec I, Steele R, Terracciano L, Jass JR, Lugli A. Selecting immunohistochemical cut-off scores for novel biomarkers of progression and survival in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 2007; 60:1112-6.

## **BIOGRAFIJA AUTORA**

Ksenija Jakovljević je rođena 1. jula 1981. godine u Beogradu. Petu beogradsku gimnaziju, prirodno-matematičkog smera je završila 2000. godine. Iste godine je upisala Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija. Diplomirala je 2006. godine u okviru izborne oblasti Eksperimentalna biomedicina sa prosečnom ocenom 8,71. Doktorske studije je upisala na istom fakultetu 2006/2007 godine na smeru Molekularna biologija.

Zaposlena je na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije, u okviru Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju, u Laboratoriji za molekularnu genetiku od 2007. godine, gde je i uradila eksperimentalni deo svoje doktorske teze. Zvanje istraživača pripravnika stekla je 2007. godine, a zatim i zvanje istraživača saradnika od 2010. godine na projektima Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije (broj projekta 145035), odnosno Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije (broj projekta 41026).



## Изјава о ауторству

Потписани-а Јаковљевић Ксенија

број уписа ИО 060031

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Анализа учесталости и типова мутација *KRAS* и *BRAF* гена у карциномима

колоректума у популацији Србије

---

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда



---

У Београду, \_\_\_\_\_

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије  
докторског рада**

Име и презиме аутора Ксенија Јаковљевић

Број уписа ИО 060031

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада Анализа учесталости и типова мутација *KRAS* и *BRAF* гена у  
карциномима колоректума у популацији Србије

Ментор др Марина Стаменковић-Радак, ванредни професор

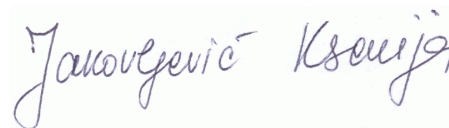
Потписани Ксенија Јаковљевић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

  
\_\_\_\_\_

У Београду, \_\_\_\_\_

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Анализа учесталости и типова мутација *KRAS* и *BRAF* гена у карциномима колоректума у популацији Србије

---

која је моје ауторско дело.

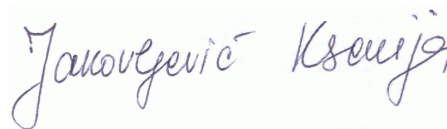
Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

**Потпис докторанда**



---

У Београду, \_\_\_\_\_

1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.