

## Status genu *K-RAS* jako czynnik prognostyczny i predykcyjny w raku jelita grubego

Malwina Bartczak, Aleksandra Sałagacka, Marek Mirowski, Ewa Balcerczak

*Na przełomie ostatnich lat nastąpił duży postęp w rozpoznawaniu i leczeniu nowotworów jelita grubego. Jednakże w związku z rosnącą zachorowalnością na nowotwory złośliwe istnieje potrzeba poszukiwania nowych czynników prognostycznych i predykcyjnych, w oparciu o które zostaną opracowane nowe testy diagnostyczne. Takim czynnikiem wydaje się być gen *K-RAS*. Wieloośrodkowe badania wskazują na małą wartość prognostyczną tego genu w monitorowaniu postępu choroby, jednakże ocena jego statusu daje możliwość indywidualizacji terapii wykorzystującej przeciwciała monoklonalne. Określenie genotypu genu *K-RAS* pozwala na wyselekcjonowanie pacjentów z rakiem jelita grubego, u których leczenie cetuksymabem przyniesie oczekiwany efekt terapeutyczny, jakim jest wydłużenie czasu przeżycia.*

### ***K-RAS* gene –prognostic and predictive factor in colon cancer**

*Over the last few years we have observed significant developments in the diagnosis and treatment of large intestine tumours. However, due to the increased number of malignancies it is necessary to seek new prognostic and predictive factors which could determine new diagnostic tests. The *K-RAS* gene appears to be such a factor. Multi-centered studies stress the low prognostic value of this gene in monitoring disease progression, but the evaluation of its status raises possibilities regarding the individualisation of therapies with monoclonal antibodies. Determining the *K-RAS* genotype allows to select colon cancer patients in whom cetuximab treatment will provide the expected therapeutic effect, i.e. prolong survival.*

**Słowa kluczowe:** polimorfizm, *K-RAS*, indywidualizacja terapii, rak jelita grubego

**Key words:** polymorphism, *K-RAS*, individualisation of therapy, colorectal cancer

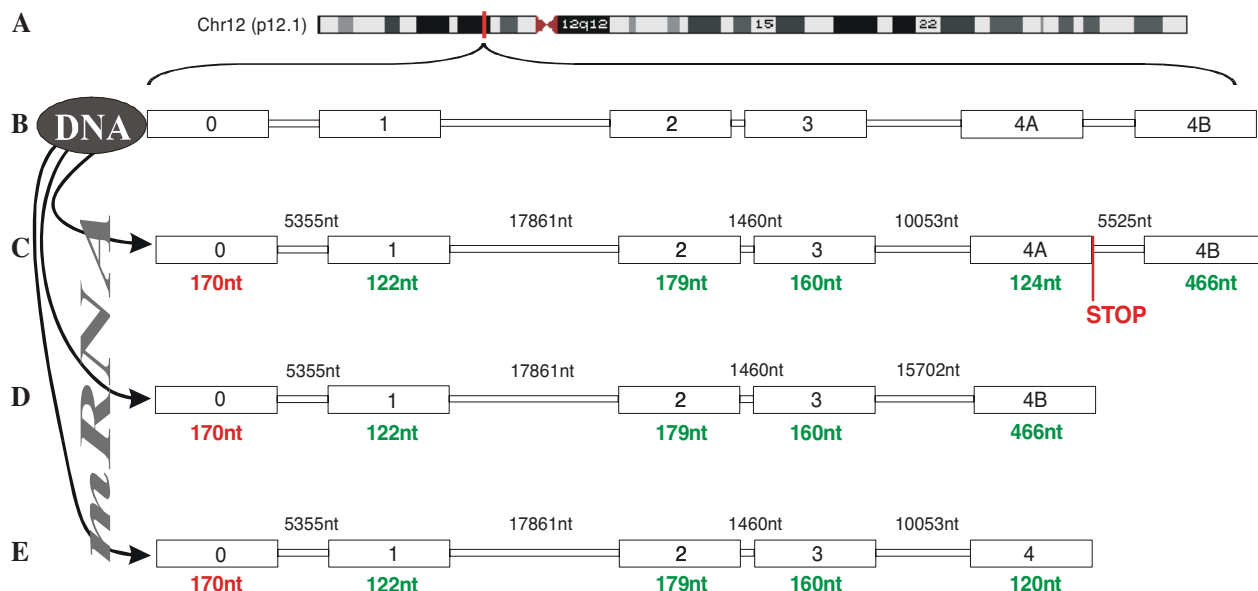
### **Wprowadzenie**

Okolo 150 ludzkich białek zaliczanych jest do nadrodziny białek RAS. Nadrodzina ta podzielona jest na podstawie sekwencji i podobieństwa pełnionych funkcji na 5 głównych rodzin: RAS, RHO, RAB, RAN i ARF. Onkoproteiny RAS należą do rodziny RAS (liczącej 36 białek) i stanowią obiekt wielu badań naukowych, ze względu na ich kluczową rolę w procesie ludzkiej onkogenezy. Nowotworem, w przebiegu którego gen kodujący białko *K-RAS* ma szczególne znaczenie zarówno w ocenie progresji, jak i wyborze terapii, jest rak jelita grubego. Nowotwór ten stanowi poważny problem społeczny. Rokowanie w odniesieniu do tego nowotworu zależy od wielu czynników, jakimi są między innymi: zaawansowanie kliniczne, lokalizacja guza, stopień zróżnicowania G, naciekanie naczyń krwionośnych i limfatycznych, wiek, płeć, a także odpowiedź na zastosowaną terapię. Główną metodą leczenia raka jelita grubego jest chirurgia, uzupełniana

w określonych przypadkach neoadiuwantową lub adjuwantową chemio- i/lub radioterapią. Mimo ogromnych postępów w tych formach terapii raka jelita grubego u 30 do 50% chorych, w różnych stopniach zaawansowania, dochodzi do wznowy miejscowej lub uogólnionej. Dlatego też nową, obiecującą formą leczenia staje się immunoterapia, wykorzystująca przeciwciała monoklonalne. Zastosowanie tej terapii powinno być rozpatrywane indywidualnie dla każdego z pacjentów. W przypadku cetuksymabu, wykorzystywanego w leczeniu raków jelita grubego, wymagane jest wykonanie analiz molekularnych genu *K-RAS*, w celu uzyskania pełnej efektywności zastosowanej terapii.

### **Struktura genu *K-RAS***

Gen *K-RAS* stanowi jeden z najczęściej ulegających mutacji protoonkogenów w ludzkich nowotworach: jelita grubego, trzustki, płuc. Zlokalizowany jest na ramieniu krótkim chromosomu 12 locus 12.1. Gen zbudowany jest z 6 eksonów, przy czym pierwszy ekson (oznaczony 0) stanowi obszar nieulegający translacji, tzw. region UTR (*untranslated region*), natomiast pozostałe 5 eksonów to eksony kodujące (oznaczane od 1 do 4). Gen zawiera



Ryc. 1. Lokalizacja chromosomowa i budowa genu (*K-RAS*)

- (A) lokalizacja chromosomowa genu *K-RAS*
- (B) struktura genu *K-RAS*
- (C, D, E) możliwe transkrypty genu *K-RAS*
  - (C) izoforma *K-RAS* 4A
  - (D) izoforma *K-RAS* 4B
  - (E) dodatkowa izoforma

Prostokąty na rycinie B-E oznaczają eksony, łączące je linie oznaczają introny.

Liczby poniżej prostokątów wskazują na ich długość; zielone liczby to eksony kodujące, czerwone to UTR.

Długość intronów podana jest powyżej linii łączących prostokąty.

Zgodnie z danymi zawartymi w bazie Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org))

dwie alternatywne formy eksonu 4 – 4A i 4B. Ich obecność sprawia, że gen ulega ekspresji w postaci dwóch różnych białek, nazywanych K-RAS 4A (189aa) i K-RAS 4B (188 aa). Wariant *K-RAS* 4A złożony jest z 6 eksonów, natomiast w przypadku wariantu *K-RAS* 4B wycięciu ulega ekson 4A, a zatem złożony jest on z 5 eksonów. Dokładną budowę genu przedstawia Rycina 1. Warto nadmienić, iż 90-95% transkryptów genu *K-RAS* w komórkach i tkankach ukierunkowuje syntezę izoformy 4B [1].

Promotor genu *K-RAS* jest zlokalizowany powyżej miejsca inicjacji transkrypcji (-327->-296) [2]. Jest on bogaty w pary GC, brak natomiast kasety TATA i CCAAT, stanowiącej cechę charakterystyczną genów zaliczanych do grupy genów metabolizmu podstawowego (*housekeeping genes*), do której należy gen *K-RAS*, ze względu na obecność ekspresji w większości komórek [3]. Istnieje również trzeci *splice* wariant genu *K-RAS*, jednak nie poświęca mu się uwagi w pracach naukowych.

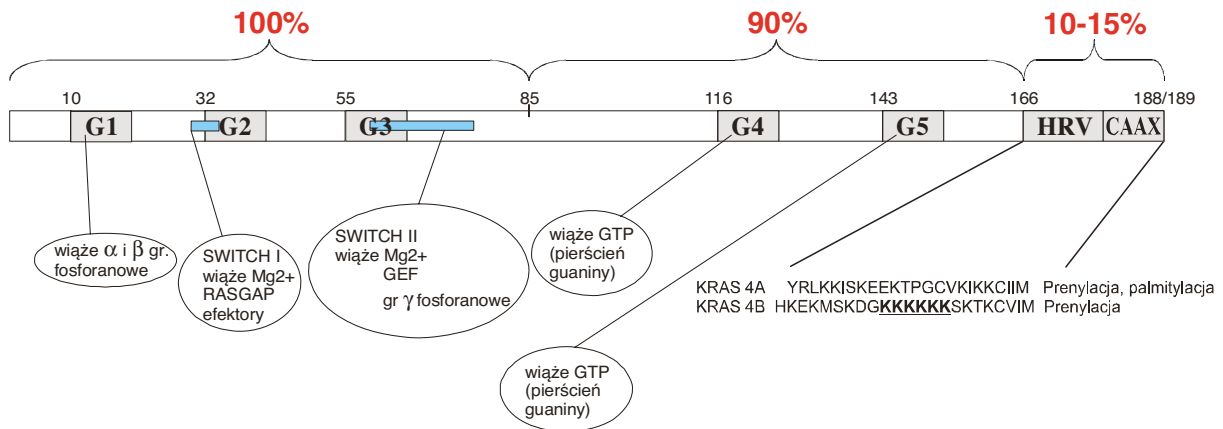
W obrębie promotora znajduje się element poli-purynowy, wrażliwy na nukleazy NHE (*nuclease hypersensitive element*), odgrywający kluczową rolę w procesie transkrypcji [2]. Badania Cogai i wsp. (2008 r.) nad tym elementem w ludzkim genie *K-RAS* wskazują, iż jest to miejsce strukturalnie polimorficzne, które w określonych warunkach może odwracalnie przyjąć formę *G-quadruplexu* (G4-DNA), co skutkuje zahamowaniem transkrypcji genu. Schemat kontroli procesu transkrypcji, zaproponowany przez Cogai i wsp. (2008 r.), daje nowe możliwości molekularnego hamowania ekspresji *K-RAS* w komórkach nowotworowych [2].

## Struktura białek rodziny RAS

Monomeryczne białka rodziny RAS, o średniej masie 21 kDa, zbudowane są z 188 aminokwasów. Wyjątek stanowi izoforma K-RAS 4B, składająca się ze 189 aminokwasów. Schematyczną budowę białka rodziny RAS przedstawia Rycina 2.

W strukturze białek rodziny RAS wyróżnia się dwie podstawowe domeny: domenę katalityczną G, zlokalizowaną na końcu N oraz domenę C, zlokalizowaną na końcu C białka.

Domena G, obejmująca fragment białka od 1 do 165 aminokwasu, uchodzi za wysoce konserwatywną w obrębie białek rodziny RAS. Pierwsze 164 aminokwasu są homologiczne wśród 4 białek tej rodziny, przy czym pierwsze 86 aminokwasów od N – końca są identyczne, natomiast kolejnych 78 aminokwasów wykazuje podobieństwo do 90% [4]. II-rzędową strukturę domeny G tworzy hydrofobowy rdzeń złożony z 6  $\beta$ -harmonijek, które połączone są 5 hydrofilnymi łańcuchami  $\alpha$ -helis oraz 5 pętłami G (*loop*) [5, 6]. Na szczególną uwagę zasługują łańcuchy polipeptydowe tworzące pętle G, z uwagi na ich kluczową rolę w procesie wiązania i wymiany GDP/GTP oraz interakcji pomiędzy białkiem-białkiem. Badania krystalograficzne, mające na celu ustalenie budowy przestrzennej białek RAS zarówno w postaci nieaktywnej, tj. związanej z GDP, jak i postaci aktywnej, związanej z GTP, wyróżniły dwa dodatkowe elementy znajdujące się w domenie G. Nazwano je przełącznikami (*switch*). To w ich obrębie występują największe różnice



Ryc. 2. Schematyczna budowa białek rodziny RAS

Fragmenty białka objęte klamrami wskazują na stopień homologii pomiędzy kolejnymi członkami białek rodziny RAS

G1-G5 to pętle G (*loop*) – szare kwadraty

Przełączniki (*switch*) – niebieskie prostokąty

HRV – fragment hiperzmienny

CAAX – fragment podlegający zmianom potranslacyjnym

między strukturami RAS, związanymi z GDP i GTP. Przełącznik I (*switch* I), zwany niekiedy domeną/ pętlą efektorową, znajdujący się w obrębie pętli G2 (32-38aa), jest regionem wiążącym efekторы białek RAS. Przełącznik II (*switch* II), znajdujący się wewnątrz pętli G3 i drugiej  $\alpha$ -helisy (56-67 aa), jest zaangażowany w wiązanie nukleotydów guaniny, grup fosforanowych i/lub jonów magnezu [4, 7].

Domena C obejmuje C-końcowy fragment białka, liczący 25 aminokwasów. W przeciwieństwie do domeny G, ten fragment białka wykazuje najmniejszą homologię wśród członków rodziny RAS; podobieństwo wynosi około 10-15%. Z tego powodu nosi nazwę regionu wysoce zmiennego HVR (*hypervariable region*). HRV zawiera dwie sekwencje sygnałowe, ulegające zmianom potranslacyjnym [8]. Pierwsza z tych sekwencji sygnałowych to CAAX, natomiast druga w białku K-RAS 4B to fragment zbudowany z 6 aminokwasów lizyny.

### Zmiany potranslacyjne białka i lokalizacja komórkowa

Białka RAS produkowane są jako cząsteczki prekursorowe w cytoplazmie na wolnych polisomach [9]. Nabycie aktywności biologicznej i pełnienie swoich funkcji przez białka RAS staje się możliwe dopiero po przyłączeniu do cytozolowej powierzchni błony komórkowej. Z tego powodu białka te ulegają serii zmian potranslacyjnych.

Jak wspomniano wcześniej, zmianom tym ulega wysoce zmienny obszar białka – HVR, zakończony przez motyw CAAX (C – cysteina, A – aminokwas alifatyczny, X – jakkolwiek inny aminokwas). Miejsce to podlega modyfikacjom na skutek działania trzech kolejnych enzymów. Pierwszy etap przemian – prenylacja – katalizowany jest przez transferazę farnezyli (FT-aza) i transferazę geranylgeranyli (GGT-aza). O aktywności poszczególnych enzymów decyduje ostatni aminokwas w sekwencji CAAX. Gdy X odpowiada leucynie lub rzadziej fenylalaninie, reakcja katalizowana jest przez GGT-azę,

w innym wypadku pracuje FT-aza [10]. Wadno zauważyć, że K-RAS 4A, jak i K-RAS 4B może podlegać działaniu obu tych enzymów, podczas gdy H-RAS podlega tylko działaniu GGT-azy [11]. Prenylacja oznacza kowalencyjne przyłączenie 15-węglowego pirofosforanu farnezyli (gdy działa FT-aza), bądź 20-węglowego pirofosforanu geranylgeranylowego (gdy działa GGT-aza), do cysteiny motywu CAAX [10]. Ułatwia to przyłączenie białka RAS do błony *retikulum* endoplazmatycznego, gdzie zachodzą kolejne etapy zmian – proteoliza i metylacja. Prenylowane białko staje się substratem dla endopeptydazy Rce1 (*Ras converting enzyme*), która odpowiada za usunięcie fragmentu AAX z motywu CAAX. W ten sposób nowopowstały koniec C białka RAS jest miejscem działania dla metylotransferazy Icmt (*isoprenyl cyteine carboxymethyl transferase*). Zadaniem tego enzymu jest przyłączenie grupy metylowej do grupy  $\alpha$  karboksylowej prenylocysteiny [10]. Ostatecznym rezultatem modyfikacji potranslacyjnej jest uzyskanie z hydrofilowego końca C białka RAS hydrofobowej domeny, co umożliwi białku słabe wiązanie z błoną komórkową.

W 1990 r. Hancock i wsp. [12] zasugerowali, że modyfikacja w obrębie CAAX jest konieczna, ale niewystarczająca do połączenia białka RAS z błoną komórkową. Drugą sekwencją sygnałową, znajdującą się w obrębie HVR, niezbędną do stabilnego połączenia K-RAS z błoną cytoplazmatyczną, jest w przypadku izoformy K-RAS 4A aminokwas cysteina, który ulega w pozycji 180 palmitylacji (enzym katalizujący tę reakcję – palmitylotransferaza – zlokalizowany jest w obrębie błon aparatu Golgiego). Dla izoformy K-RAS 4B jest to sekwencja wielozasadowa bogata w aminokwas – lizynę, która oddziałuje elektrostatycznie z ujemnie naładowaną błoną komórkową [12].

Mechanizm transportu białek K-RAS z błony *retikulum* do wewnętrznej powierzchni błony cytoplazmatycznej nie został dotąd dokładnie poznany [10].

## Aktywacja białek RAS

Białka K-RAS należą do tzw. rodziny małych białek G. Mają wysoką zdolność wiązania guanozynydifosforanu (GDP – *guanosine diphosphate*) i guanozotrifosforanu (GTP – *guanosine triphosphate*) oraz niską aktywność hydrolizy guanozotrifosforanu. Aktywacja białek RAS wymaga zajścia odwracalnego procesu oddysocjowania GDP od nieaktywnej formy białka i przyłączenia GTP, co uaktywnia RAS i umożliwia jego interakcję z efektorami. Kontrolę nad cyklicznymi przemianami GDP/GTP, pomiędzy formą aktywną białka a formą nieaktywną, sprawują białka regulatorowe.

Zalicza się do nich:

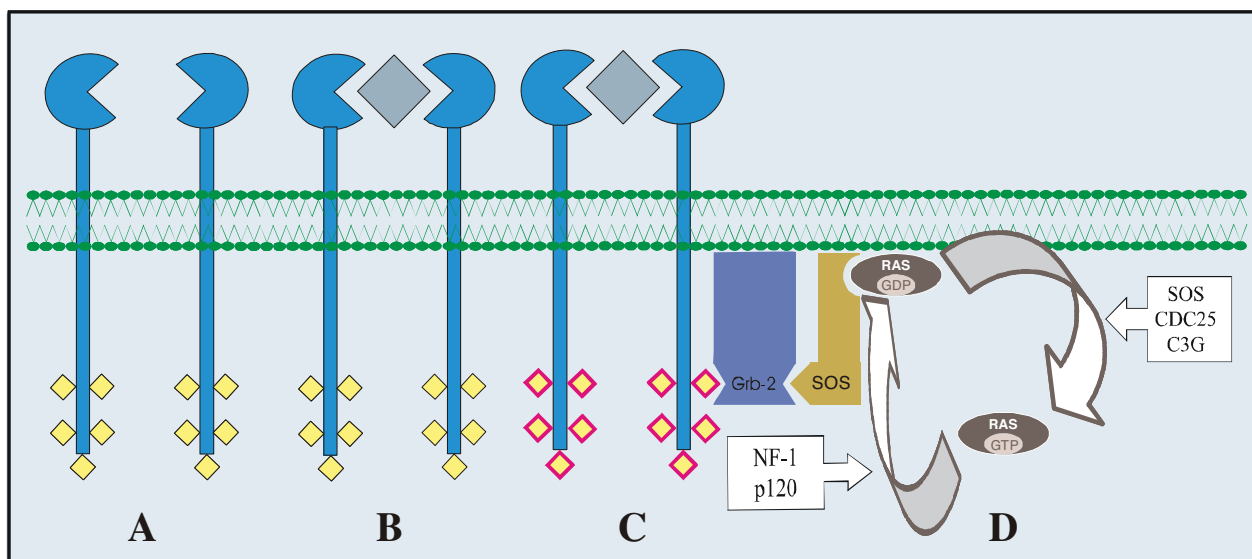
- GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*), np. SOS odpowiadające za odłączenie GDP i włączenie GTP, uznawane za aktywatory małych białek G;
- GAPs (*GTP-ase-activating proteins*), np. NF1, p120 opowiadające za aktywowanie wewnętrznej aktywności GTP-azowej małych białek G.

Regulatory pozostają pod wpływem receptorów różnorodnie rozmieszczonych na powierzchni błony komórkowej, takich jak receptor naskórkowego czynnika wzrostu EGFR (*epidermal growth factor receptor*), receptor płytkowego czynnika wzrostu (*platelet derived growth factor receptor-PDGF*), heterotrimeryczne białko G połączone z receptorami integrynowymi oraz receptor dla cytokin, np. interleukiny-2 (IL-2) [13]. Wyżej wymienione receptory są receptorowymi lub niereceptorowymi

kinazami tyrozynowymi, biorącymi udział w przekazywaniu informacji do jądra komórkowego. Przykładowy mechanizm aktywowania białka RAS, poprzez EGFR, przedstawia Rycina 3. Stymulacja receptorów przez odpowiadające im ligandy powoduje pobudzenie serii różnych (zależnych od liganda) cytoplazmatycznych ścieżek aktywacyjnych. Na tych szlakach białka RAS pełnią rolę swoistego punktu węzłowego. Oznacza to, że pobudzenie obojętnie którego z wyżej wymienionych receptorów zawsze prowadzi do aktywacji białek RAS, które wiążą i aktywują liczne efekторы [13, 14].

Efektor białek RAS wiąże się z formą aktywną białka. Interakcja pomiędzy RAS i efektorom jest możliwa dzięki oddziaływaniom między domeną efektorową RAS (32-40 aa), a domeną wiążącą RAS RBD (*Ras-binding domain*) lub domeną RA (*Ras-association*), obecną w większości białek efektorowych RAS [15]. Dotychczas zidentyfikowano co najmniej 10 białek efektorowych RAS [16], spośród których wyróżnia się trzy, tj. rodzinę kinaz serynowo-treoninowych Raf, RAL-GEFs i kinazę 3fosfotydyloinozytolu PI3-K.

Na rodzinę kinaz serynowo-treoninowych RAF składają się: c-RAF1, ARAF, BRAF. Jako efekторы białek RAS posiadają domenę RBD, dzięki której mogą oddziaływać z białkiem RAS. Do pełnej aktywacji RAF niezbędna jest dodatkowo interakcja pomiędzy RAS, a regionem białka RAF bogatym w cysteinę (tj. 139-184 aa). Do chwili obecnej nie ustalono, która część białka Ras jest zaangażowana w tę interakcję [13]. Kinazy RAF biorą



Ryc. 3. Mechanizm aktywowania białka RAS

- Receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu EGFR (*epidermal growth factor receptor*), należący do receptorów o aktywności kinazy tyrozynowej. Główne elementy budujące te receptory to część zewnątrzkomórkowa (odpowiada za wiązanie ligandu i dimeryzację kompleksów ligand-receptor), transbłonowa (zakotwicza receptor w błonie) oraz wewnątrzkomórkowa (zawiera domenę kinazy tyrozynowej i reszty tyrozyny ulegające fosforylacji)
- Przyłączenie liganda do receptora o aktywności kinazy tyrozynowej powoduje jego dimeryzację
- Pobudzenie wewnętrznej aktywności enzymatycznej. W efekcie dochodzi do autofosforylacji aminokwasów tyrozyny zlokalizowanych w części wewnątrzkomórkowej receptora, które służą jako miejsce wiążące dla białek tzw. adaptorowych, posiadających domenę SH2 oraz SH3 (*Src homology*)
- Nadrzędnym białkiem adaptorowym w przypadku białka Ras jest Grb-2. Domeną SH2 łączy się z ufosforylowaną tyrozyną, natomiast domeną SH3 wychwytuje bogate w prolinę fragmenty białka SOS (*son of sevenless*), należącego do rodziny białek GDS. Umożliwia to oddziaływanie SOS (białko cytoplazmatyczne) z RAS (białko błonowe), co skutkuje zmianą konformacji białka RAS, uwolnieniem GDP, przyłączeniem GTP i aktywacją efektorów RAS



udział w regulowaniu ścieżki sygnalizacyjnej MAP. Białka RAS, za pośrednictwem białek RAF, kontrolują procesy proliferacji i różnicowania komórek (poprzez determinowanie aktywności czynników transkrypcyjnych, biorących udział w nadzorowaniu ekspresji genów zaangażowanych w te procesy) [17]. Uzyskane dotychczas wyniki badań sugerują, że kompleks RAS/RAF może wpływać na apoptozę zarówno hamująco, jak i aktywująco, w zależności od typu komórek [18].

Kolejnym efektem RAS jest kinaza 3-fosfatydyloinozytolu (*phosphoinositide 3-kinases PI 3K*). Rodzina PI3K złożona jest z trzech klas, przy czym głównie klasa I jest aktywowana przez białka RAS. W tej grupie białek domenę RBD stanowi podjednostka p110. Rodzina tych enzymów katalizuje reakcje, w których powstaje PIP3, działający jak przekaźnik II-rzędu. Ma on zdolność wiązania szeregu kinaz, powodując zmianę ich konformacji, aktywując je oraz zmieniając ich lokalizację komórkową. Dodatkowo PI3-K aktywuje kinazę białkową A PKB/Akt. Skutkuje to fosforylacją proapoptotycznych białek z rodziny BAD, co ostatecznie hamuje proces apoptozy [17, 18].

Efektem RAS, którego funkcja biochemiczna nie jest do końca ustalona, jest rodzina białek GEFs, które służą jako aktywatory białek RAL. Ta ścieżka sygnałowa moduluje aktywność takich białek jak: RHO, RAC Cdc42. Za ich pośrednictwem białka RAS odgrywają rolę w modelowaniu cytoszkieletu komórkowego i regulowaniu aktywności czynników transkrypcyjnych [17].

## Polimorfizmy genu *K-RAS*

Białka rodziny RAS stanowią obiekt wielu intensywnych badań naukowych, od kiedy – ponad 40 lat temu – została po raz pierwszy zidentyfikowana u szczurów ich właściwość onkogenna. Mutacje punktowe genów *RAS* powodują, że występują one w formie aktywnej (związanej z GTP) w sposób ciągły. Oznacza to, że nieprzerwanie wysyłają sygnał do jądra komórkowego o proliferacji i/lub różnicowaniu komórki, niezależnie od obecności zewnętrznej stymulacji. Szacuje się, że średnio około 30% komórek nowotworowych ma mutacje w genach *RAS*.

Jak wskazuje szereg badań, mutacja/e genów kodujących poszczególnych członków rodziny RAS (określonej izoformy RAS) są powiązane z typem nowotworu. Gen kodujący białko *K-RAS* ulega mutacji w 20 do 50% przypadków raka jelita grubego [19]. Na taką rozbieżność wyników badań może mieć wpływ między innymi:

- różnorodność technik stosowanych do wykrywania mutacji (Tab. I.);
- różnice w badanym regionie genu, tj. kodon 12 i/lub 13 i lub 61;
- różnice w wyborze i liczebności populacji badanej.

Większość (ponad 90%) mutacji dotyczy kodonów 12 (ok. 82%), 13 (ok. 17%) w eksonie 1 i kodonu 61 (ok. 1%) w eksonie 2, rzadziej mutacje występują w kodonie 59, 63 eksonu 2 [28, 31-33]. Rozpatrując jedynie dwa najczęściej zmutowane kodony, tj. 12 i 13, uzyskujemy częstość występowania odpowiednio 70% i 30% [33].

**Tab. I. Techniki wykorzystywane do wykrywania mutacji w genie *K-RAS* w nowotworach jelita grubego**

| Nazwa techniki                                       | Materiał badany wykorzystywany do izolowania DNA | Zastosowanie |
|--|--|--------------|
| SSCP [20]  | Parafinowe i mrożone skrawki tkankowe            | B            |
| TTGE [21]  | Parafinowe i mrożone skrawki tkankowe<br>Biopaty | B            |
| DGGE [22]  | Parafinowe i mrożone skrawki tkankowe            | B            |
| TheraScreen kit                                      | Parafinowe skrawki tkankowe                      | D            |
| K-ras mutation test kit<br>Amoy Diagnostics Co., Ltd | Parafinowe i mrożone skrawki tkankowe            | K            |
| Enriched-PCR-RFLP [23]                               | Parafinowe i mrożone skrawki tkankowe            | B            |
| SOMA [24]  | Biopaty  | B            |
| PCR-LCR [25, 33]                                     | Parafinowe skrawki tkankowe                      | B            |
| Sekwencjonowanie                                     | Parafinowe i mrożone skrawki tkankowe<br>Biopaty | B            |
| PyroMark KRAS v2.0 test                              | Parafinowe i mrożone skrawki tkankowe            | K            |
| Multiplex PCR [28]                                   | Mrożone skrawki tkankowe                         | B            |
| LCD-Array K-RAS 1.4                                  | Parafinowe skrawki tkankowe                      | K            |
| HRM [29]   | Parafinowe i mrożone skrawki tkankowe            | B            |
| FLAG assay [30]                                      | Parafinowe skrawki tkankowe                      | B            |

B – metody wykorzystywane w laboratoriach badawczych

K – testy komercyjne, nieprzeznaczone do użytku w laboratoriach diagnostycznych

D – testy diagnostyczne

Tab. II. Zidentyfikowane mutacje w obrębie kodonu 12 i 13 genu *K-RAS*

| Forma niezmutowana | KODON 12            |                          | Forma niezmutowana | KODON 13            |                          |
|--------------------|---------------------|--------------------------|--------------------|---------------------|--------------------------|
|                    | Sekwencja zmutowana | Substytucja aminokwasowa |                    | Sekwencja zmutowana | Substytucja aminokwasowa |
| GGT                | ΔGT                 | Gly→Ser                  | GGC                | ΔGC                 | Gly→Ser                  |
|                    | CGT                 | Gly→Arg                  |                    | CGC                 | Gly→Arg                  |
|                    | TGT                 | Gly→Cys                  |                    | TGC                 | Gly→Cys                  |
|                    | GΔT                 | Gly→Asp                  |                    | GΔC                 | Gly→Asp                  |
|                    | GCT                 | Gly→Ala                  |                    | GCC                 | Gly→Ala                  |
|                    | GTT                 | Gly→Val                  |                    | GTC                 | Gly→Val                  |

Prace naukowe wymieniają również mutacje w kodonach 10, 11, 15, 18, 19, 22, jednak ich znaczenie biologiczne nie jest do tej pory poznane. Istnieją także badania, których wyniki sugerują, iż duże znaczenie posiada mutacja kodonu 146 w eksonie 3. Stwierdzono ją u 4% pacjentów z rakiem jelita grubego, co wskazuje, iż zmiana ta ma większe znaczenie w raku jelita grubego niż mutacja w kodonie 61 [34]. Wszystkie dotychczas zidentyfikowane mutacje, obecne w kodonie 12 i 13, przedstawia Tab. II.

Są to mutacje monoalleliczne, punktowe, zazwyczaj somatyczne, pojawiające się na wczesnym etapie kancerogenezy [25, 35, 36]. Z badań przeprowadzonych w różnych populacjach na świecie wynika, że najczęstszą mutacją w obrębie kodonów 12 i 13 jest tranzycja guaniny na adeninę oraz transwersja guaniny na tyminę [37] (wyjątek stanowią mieszkańcy byłej Jugosławii, u których zdecydowanie dominuje transwersja guaniny na tyminę, natomiast tranzycja guaniny na adeninę występuje niezwykle rzadko [38]). Punktowe mutacje kodonów 12 i 13 w genie *K-RAS* w pozycji pierwszej i drugiej tripletu skutkują zmienioną sekwencją aminokwasową w białku (Tab. II). Najczęściej stwierdza się zmianę glicyny na asparaginian oraz glicyny na walinę [37, 39].

Triplet GGT kodonu 12 oraz triplet GGC kodonu 13 odpowiadają za włączenie do tworzącego się w procesie translacji białka *K-RAS* glicyny (aminokwas nieposiadający łańcucha bocznego). Glicyna w pozycji 12 leży w przestrzennej bliskości z pętlą, do której przyłącza się białko GAP. Jakakolwiek mutacja w tej pozycji spowoduje włączenie aminokwasu posiadającego łańcuch boczny, co z kolei przestrzennie uniemożliwi przejście białka do stanu nieaktywnego, tj. związanego z GDP w obecności przyłączonego białka GAP. Mutacje w obrębie *K-RAS* powodują zatem nieprzerwany stan aktywacji tego białka. W konsekwencji dochodzi do niekontrolowanego wzrostu i podziału komórek [40].

### Materiał do badań

Materiałem najczęściej stosowanym do izolowania DNA i oceny mutacji są bloczki parafinowe, rzadziej mrożone skrawki jelita grubego [24]. Podjęte zostały również działania zmierzające do wykorzystania stolca jako materiału do izolowania DNA, ze względu na fakt, iż jego pobra-

nie nie wymaga metod inwazyjnych [41]. W zależności od materiału wybranego do badania różna będzie jego heterogenność. Ilość materiału o charakterze nienowotworowym i nowotworowym może różnić się w kolejnych próbkach, a co za tym idzie procentowy udział DNA o typie niezmutowanym i zmutowanym nie będzie taki sam. Dodatkowo w przypadku stolca trzeba uwzględnić fakt, że tylko od 0,5% do 5% wyizolowanego DNA jest pochodzenia ludzkiego [42]. Wyniki przeprowadzonego w Polsce procesu walidacji metod do oznaczania mutacji w genie *K-RAS* w kodonie 12 i 13 sugerują, że materiał do izolacji DNA powinien zawierać co najmniej 70% utkania nowotworowego [43]. Wyniki badań Santini i wsp. (2008 r.) wykazały, że obecność mutacji w genie *K-RAS*, w materiale pochodzącym z guza pierwotnego, wiąże się w 96% przypadków z jej obecnością także w materiale przerzutowym. Jak wskazują autorzy, ocenę statusu genu *K-RAS* wystarczy przeprowadzić tylko w jednym z wyżej wymienionych materiałów, ze względu na wysoki stopień zgodności otrzymanych wyników [44].

### Metody oceny mutacji genu *K-RAS*

Obecnie istnieje wiele dostępnych technik służących do wykrywania mutacji zdefiniowanych, jakimi są zmiany obecne w genie *K-RAS*. Różnorodność wykorzystywanych metod prezentuje Tab. I. Wszystkie oparte są o reakcję PCR, ze względu na jej wysoką czułość i możliwość automatyzacji. Jednak konieczność rozróżnienia typu niezmutowanego od różnych alleli zmutowanych, a więc dokładna ocena genotypu, wymaga użycia analiz modyfikujących reakcję PCR. W chwili obecnej użyteczność diagnostyczną ma jedynie informacja o rodzaju allele – zmutowany czy niezmutowany. W badaniach naukowych określany jest dokładny typ mutacji. Z uwagi na predykcyjne znaczenie statusu genu *K-RAS* pojawia się coraz więcej testów diagnostycznych do jego oceny. Jedynie dwa są oznaczone znakiem CE, a więc spełniają wymagania dyrektyw Unii Europejskiej (TheraScreen<sup>®</sup> firmy DxS Ltd dostępny od stycznia 2008 r. oraz KRAS Light mix firmy TIB MolBiol, dostępny od maja 2009 r.). Dotychczas za najbardziej wiarygodną metodę wykrywania mutacji w genie *K-RAS* uważa się sekwencjonowanie, złoty standard wykrywania mutacji [32]. Przewagę nad

tradycyjną metodą, wykorzystującą dideoksynukleotydy terminujące, zyskało pirosekwencjonowanie, którego jedną z zalet jest większa czułość w wykrywaniu mutacji *K-RAS* w mieszaninie zawierającej allele typu niezmutowanego. W przypadku gdy materiał zmutowany stanowi jedynie 5% całej próbki, metoda pirosekwencjonowania pozwoli wykryć go w 96 na 100 badanych przypadków, podczas gdy metoda dideoksy wykryje tylko 33 na 100. Pirosekwencjonowanie daje również możliwość uzyskania informacji o ilości zmutowanego allelu, co jest przydatne w procesie walidacyjnym, czy też w ocenie jakości kontroli [27].

Obecnie pojawia się coraz większa liczba nowych metod do oznaczania mutacji w genie *K-RAS*, które mogą w przyszłości być wykorzystywane w rutynowej diagnostyce. Metoda Real-Time PCR z nowym sposobem generowania sygnału – HRM (*High Resolution Melting*) może być stosowana jako badanie przesiewowe, przed podjęciem decyzji o wykonaniu sekwencjonowania. Technika ta umożliwia genotypowanie pojedynczych zmian nukleotydowych SNP poprzez bardzo dokładne analizowanie krzywej topnienia. Jest to możliwe dzięki zastosowaniu specjalnych barwników LC Green i prowadzeniu denaturacji z bardzo wysoką rozdzielczością. Jej główne zalety to jednoetapowość, krótki czas oznaczenia, stosunkowo niski koszt, wysoka czułość zbliżona do czułości pirosekwencjonowania [29]. Metoda ta jednak nie określa szczegółowo typu zamiany, ponadto każda nieprawidłowość w analizowanym amplikonie będzie powodowała powstawanie dodatkowego punktu w krzywej topnienia, co wymaga przeprowadzenia sekwencjonowania, celem jej dokładnej oceny [32].

Inne podejście proponuje Giulia Amicarelli i wsp. (2007 r.). Metoda FLAG (*fluorescent amplicon generation*) umożliwia dokładną ocenę zmiany pojedynczego nukleotydu, co eliminuje konieczność sekwencjonowania. Technika wykorzystuje termostabilny enzym restrykcyjny PspGI, który początkowo uniemożliwia amplifikację materiału o typie niezmutowanym. Wstępna selekcja materiału predysponuje do dalszej analizy jedynie materiał zmutowany, który jest poddawany amplifikacji ze starterami wyznakowanymi barwnikami fluorescencyjnymi, z których jeden spełnia funkcję wygaszacza w stosunku do drugiego. Aktywność PspGI umożliwiła generowanie sygnału fluorescencyjnego po odcięciu wygaszacza z końca 5' startera. Ocena poszczególnych genotypów kodonu 12 jest możliwa dzięki zastosowaniu polipeptydowych kwasów nukleinowych (PNA), które są sprzęgnięte z konkretną sekwencją, komplementarną do poszczególnych zmutowanych sekwencji kodonu 12 [30]. Zaletą tej metody jest jednoetapowość, brak konieczności detekcji powstałego produktu przeprowadzonej reakcji PCR, co skraca czas analizy, wysoka czułość i specyficzność rzędu 0,1%. Jednak jest ona przeznaczona jedynie do analizy mutacji w kodonie 12, dlatego wymaga zaadoptowania i optymalizacji do poszukiwania pozostałych mutacji, wykrywanych w obrębie genu *K-RAS*.

Ciekawe podejście w jednoczesnym analizowaniu mutacji w kodonie 12, 13, 61 i 146 zaproponowali

naukowcy z Tajwanu. Metoda oparta jest o wykorzystanie techniki *multiplex* PCR. W pierwszym etapie w jednej próbówce amplifikacji poddawany jest ekson 1, 2, 3 genu *K-RAS*. Produkty są następnie oczyszczane z niewykorzystanych w reakcji starterów, dNTP i poddawane specjalnej analizie wydłużania starterów ze znakowanymi fluorescencyjnie ddNTP. Ostatni etap to automatyczny rozdział elektroforetyczny. Technika nie wymaga sekwencjonowania, wykrywa i identyfikuje jednocześnie wszystkie możliwe zmiany w kodonach 12, 13, 61, 146 [28].

Rosnące zainteresowanie mutacjami w obrębie genu *K-RAS* sprawia, że pojawia się coraz to więcej technologii ukierunkowanych na ich ocenę, w tym większa liczba dostępnych komercyjnie testów (np. LCR *array* KIT *K-RAS* 1.4 firmy Chipron), które skracają czas analizy do niezbędnego minimum, przyciągają wysoką specyficznością i czułością. Poddane są procesowi walidacyjnemu, co dodatkowo zwiększa ich wiarygodność, jednak z drugiej strony znacznie podwyższa koszt badań, w porównaniu z oznaczeniami wykonanymi metodami opracowanymi we własnych laboratoriach naukowych.

### Mutacja *K-RAS* w raku jelita grubego

Mutacje w genie *K-RAS* uważane są za wczesny marker rozwoju raka jelita grubego, jednak przydatność ich oznaczania w tym aspekcie ma sens wówczas, gdy równocześnie oznaczana będzie prawidłowość innych genów, podlegających mutacji w czasie kancerogenezy [45].

### Udział w kancerogenezie

Zgodnie ze schematem wielostopniowego modelu kancerogenezy jelita grubego, w sekwencji zdarzeń od gruczolaka do raka, dochodzi do powstawania i kumulacji mutacji w szeregu różnych genów. Według licznych badań w rozwoju raka jelita grubego, na wczesnych jego etapach, dochodzi do aktywacji onkogenu *K-RAS* [46].

Kodony najczęściej podlegające mutacjom w genie *K-RAS* to 12 i 13 w eksonie 1. Badania Bazan i wsp. (2002 r.) [35] wskazują, że zależnie od tego, który z nich ulegnie mutacji, dojdzie do innych biologicznych następstw. Wykazali, iż mutacja w kodonie 12 jest powiązana ze śluzowym typem histopatologicznym raka jelita, natomiast mutacja w kodonie 13 jest związana z bardziej agresywnym typem guza oraz większym potencjałem do przerzutowania [35]. Wydaje się także prawdopodobne, iż mutacje genu *K-RAS* indukują bardziej inwazyjne zachowanie komórek nowotworowych. Oliveira i wsp. wykazali bowiem, że częstość mutacji jednocześnie w obu genach *K-RAS* i *BRAF* zwiększa się wraz z głębokością nacieku. Poza tym badania wykazują, że mutacje *K-RAS* stwierdza się częściej w przypadku obecności przerzutów do węzłów chłonnych i przerzutów odległych, co także potwierdza hipotezę o zwiększonej mobilności komórek w przypadku mutacji *K-RAS* [47].

## Znaczenie prognostyczne

Wieloośrodkowe badanie RASCAL, którego wyniki zostały opublikowane w 1998 r., miały na celu wyjaśnić wartość prognostycznego znaczenia obecności mutacji w genie *K-RAS*. Wskazano wówczas, że stwierdzenie mutacji w protonkogenie *K-RAS* związane jest z bardziej agresywnym przebiegiem choroby. Aż o 25% rośnie ryzyko śmierci u pacjentów ze zmutowanym genem, w porównaniu do osób o genotypie typu niezmutowanego. Znaczenie prognostyczne ma jedynie wykrycie substytucji guaniny na tyminę, zarówno w kodonie 12, jak i 13. Jak wykazały analizy statystyczne, zmiana ta związana jest z 44% wzrostem ryzyka śmierci pacjenta. Wyniki te wskazują również, że różne typy mutacji mają różne następstwa kliniczne. Substytucja guaniny na adeninę bądź cytozynę nie koreluje ze zwiększoną śmiertelnością pacjentów z rakiem jelita grubego, a zatem nie wpływa na agresywność przebiegu choroby. Niezależnym czynnikiem ryzyka nawrotu choroby i śmierci jest zmiana glicyny na walinę, wykryta jedynie u około 7% pacjentów, odpowiadająca kodonowi 12 [39]. Badanie RASCAL wykazało, że nie każda mutacja w kodonie 12 i 13 ma taki sam wpływ na postęp choroby. W szeregu prac badano częstość mutacji onkogenu *K-RAS* w skrawkach tkankowych jelita grubego, zajętych przez proces nowotworowy, sklasyfikowanych według skali Dukes'a. Wyniki tych badań są zróżnicowane. Jedne wskazują, że mutacja *K-RAS* częściej występuje w bardziej zaawansowanych stadiach guza [38, 48], podczas gdy inne nie znajdują takiej zależności [37, 49, 50]. Brink i wsp. (2003 r.) sugerują, że mutacja w obrębie genu *K-RAS* nie jest zaangażowana w proces progresji gruczolakoraka oraz, że aberracje genetyczne, pojawiające się w zaawansowanych stadiach tego nowotworu, nie zależą od tej mutacji. Badanie RASCAL II, opublikowane w 2001 r., wykazało istotną statystycznie zależność pomiędzy mutacją kodonu 12 GGT→GTT (Gly→Val), którą wykryto w 8,6% analizowanych przypadków, a gorszą prognozą dla pacjentów (krótszy czas bez nawrotu choroby oraz krótszy czas przeżycia) w stanie zaawansowania Dukes' C, ale nie Dukes' B [51]. U pacjentów, u których występowały czynniki genetyczne predysponujące do wystąpienia raka jelita grubego, mutacja onkogenu *K-RAS* była wykrywana z podobną częstością, jak u pacjentów ze sporadycznym rakiem jelita [37, 39]. Autorzy sugerują, że dieta, styl życia i czynniki środowiskowe mogą mieć wpływ na ujawnienie się mutacji *K-RAS* na wczesnych etapach powstawania raka [37]. Lièvre (2008) wskazuje, że status genu *K-RAS* (jakakolwiek mutacja kodonu 12 lub 13) nie jest czynnikiem prognostycznym w IV stadium raku jelita grubego [52].

## Znaczenie predykcyjne

W ostatnich latach wyniki szeregu badań wskazują na potencjalną predykcyjną wartość oznaczenia mutacji w genie *K-RAS* w przypadku terapii celowanej, wykorzystującej przeciwciała skierowane przeciwko receptorowi naskórkowego czynnika wzrostu EGFR.

Lek pod nazwą Erbitux, zawierający substancję czynną w postaci cetuksymabu, został w 2004 r. zarejestrowany przez Europejską Agencję Leków (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products – EMEA) do leczenia pacjentów cierpiących na zaawansowanego raka jelita grubego (wykazującego ekspresję EGFR), w skojarzeniu z chemioterapią i w monoterapii po niepowodzeniu leczenia oksaliplatiną i irinotekaniem oraz u chorych, u których występuje nietolerancja irinotekanu. W 2008 r. zastrzeżono dodatkowo, iż preparat jest wskazany jedynie u pacjentów, u których w badaniach molekularnych stwierdza się niezmutowaną postać genu *K-RAS*.

Cetuksymab, monoklonalne, chimeryczne przeciwciało klasy IgG<sub>1</sub>, jest lekiem wskazanym m. in. w leczeniu pacjentów z rakiem jelita grubego z przerzutami. Powoduje on zablokowanie zewnątrzkomórkowej części receptora naskórkowego czynnika wzrostu, hamując aktywność katalityczną kinazy tyrozynowej. Zablokowanie EGFR powoduje jednocześnie zablokowanie przewodzenia w szlakach sygnalizacyjnych, związanych z kontrolą długości życia komórki, angiogenezą i zdolnością komórek do migracji. Cetuksymab oddziałuje również na komórki cytotoksyczne, ukierunkowując je na komórki z wysoką ekspresją EGFR.

Odpowiedź na cetuksymab uzyskuje się w 10-30% przypadków, w zależności od tego, czy jest on stosowany w monoterapii, czy w połączeniu z innym schematem leczenia stosowanym w leczeniu pacjentów z przerzutami raka jelita grubego. Słaba odpowiedź na leczenie skłoniła naukowców do poszukiwania mechanizmu odpowiedzialnego za ten fakt.

Lièvre i wsp. założyli w swoich badaniach, iż obecność mutacji w jednym z efektorów wewnątrzkomórkowego szlaku sygnalizacyjnego, zapoczątkowanym przez przyłączenie liganda do EGFR, będzie skutkować brakiem efektu terapeutycznego po zastosowaniu cetuksymabu u pacjentów z rakiem jelita grubego z przerzutami. Wśród 30 leczonych pacjentów, odpowiedź na cetuksymab otrzymano u 11, przy czym u żadnego z nich nie wykryto obecności mutacji w genie *K-RAS*. Brak odpowiedzi na lek stwierdzono u 19 leczonych, u 13 z nich stwierdzono mutację w genie *K-RAS*. Badania te wskazały, że stwierdzenie niezmutowanej formy genu *K-RAS* u pacjentów z rakiem jelita grubego z przerzutami daje większe szanse na pomyślne leczenie cetuksymabem [53]. Ten sam zespół badaczy w 2008 r. opublikował wyniki badań przeprowadzonych w grupie 89 pacjentów, które jednoznacznie potwierdziły wcześniejsze obserwacje. Wśród pacjentów, u których wykryto mutację w *K-RAS*, nie osiągnięto odpowiedzi na leczenie cetuksymabem.

Christos S. Karapetis i wsp. również wskazują na predykcyjne znaczenie określenia statusu genu *K-RAS*. Efektywność cetuksymabu zależała od obecności mutacji w genie *K-RAS*. Zastosowanie tego leku u pacjentów z niezmutowaną formą genu w większości przypadków skutkowało wydłużeniem czasu przeżycia (*overall survival*) oraz wydłużeniem czasu wolnego od choroby (*progression-free survival*). W grupie pacjentów z mutacją



w obrębie genu *K-RAS* stwierdzono brak takich zależności [54].

Podczas 44. konferencji ASCO (Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology) w 2008 r. *K-RAS* został uznany za molekularny marker nowotworowy, wykorzystywany do wyboru terapii celowanej u pacjentów z rakiem jelita grubego z przerzutami. Na podstawie badań III fazy CRYSTAL i OPUS określono zależności pomiędzy czasem wolnym od postępu choroby (*progress free survival* – PFS) i współczynnikiem odpowiedzi na leczenie (*response rate* – RR) w grupie pacjentów z typem niezmutowanym lub zmutowanym genu *K-RAS* oraz określonym schematem leczenia w połączeniu z cetuksymabem lub bez niego.

W próbie klinicznej III fazy CRYSTAL (schemat FOLFIRI, tj. irynotecan, leukoworyna, fluorouracyl) i OPUS (schemat FLOFOX, tj. oksaliplatyna, leukoworyna, fluorouracyl) zaobserwowano, iż korzyści z leczenia standardowego w połączeniu z cetuksymabem czerpali jedynie pacjenci z typem niezmutowanym genu *K-RAS*. Sprzeczne z powyższymi wyniki uzyskano na bazie próby klinicznej III fazy CAIRO 2 (schemat: kapecytabina, oksaliplatyna, bewacizumab). Dodanie cetuksymabu do powyższego schematu leczenia u pacjentów z genotypem niezmutowanym nie wydłużyło PSF i nie powodowało wzrostu RR. Dodatkowo zaobserwowano, że leczenie cetuksymabem pacjentów z genotypem zmutowanym prowadziło do skrócenia PSF. Stanowi to kolejny dowód na konieczność genotypowania pacjentów z rakiem jelita grubego z przerzutami, przed włączeniem do terapii cetuksymabu.

## Podsumowanie

Z zebranych powyżej informacji wynika, że status genu *K-RAS* nie posiada istotnego znaczenia jako czynnik prognostyczny w raku jelita grubego. Natomiast stwierdzenie mutacji w obrębie allele/alleli genu *K-RAS* jest markerem braku odpowiedzi na terapię skierowaną przeciwko EGFR, a więc negatywnym czynnikiem predykcyjnym u pacjentów z rakiem jelita grubego z przerzutami. Należy podkreślić, że istnieje udowodniony związek między korzystną odpowiedzią na leczenie cetuksymabem, a typem niezmutowanym genu *K-RAS*. W tej grupie chorych na raka jelita grubego rozważane jest także stosowanie innego przeciwciała przeciwko EGFR – panitumumabu. Decyzja o rozpoczęciu terapii wykorzystującej przeciwciała monoklonalne powinna być zawsze poprzedzona molekularnym badaniem genu *K-RAS*. Analizy wyników badań klinicznych wskazują na korzyści dla pacjenta, płynące z wykorzystania zależności między występowaniem określonego typu genu *K-RAS*, a odpowiedzią na zindywidualizowane leczenie.

### Prof. Marek Mirowski

Pracownia Biologii Molekularnej i Farmakogenomiki  
Zakład Biochemii Farmaceutycznej  
Uniwersytet Medyczny  
90-151 Łódź  
ul. Muszyńskiego 1  
e-mail: marek.mirowski@umed.lodz.pl

## Piśmiennictwo

- Wang Y, You M, Wang Y. Alternative splicing of the K-ras gene in mouse tissues and cell lines. *Exp Lung Res* 2001; 27: 255-67.
- Cogoi S, Paramasivam M, Spolaore B i wsp. Structural polymorphism within a regulatory element of the human KRAS promoter: formation of G4-DNA recognized by nuclear proteins. *Nucleic Acids Res* 2008; 36: 3765-80.
- Jordano J, Perucho M. Chromatin structure of the promoter region of the human c-K-ras gene. *Nucleic Acids Res* 1986; 14: 7361-78.
- Crespo P, León J. Ras proteins in the control of the cell cycle and cell differentiation. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 1613-36.
- Milburn MV, Tong L, deVos AM i wsp. Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science* 1990; 247: 939-45.
- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 1991; 349: 117-27.
- Stouten PF, Sander C, Wittinghofer A i wsp. How does the switch II region of G-domains work? *FEBS Lett* 1993; 320: 1-6.
- Prior IA, Hancock JF. Compartmentalization of Ras proteins. *J Cell Sci* 2001; 114: 1603-1608.
- Philips MR. Compartmentalized signalling of Ras. *Biochem Soc Trans* 2005; 33: 657-61.
- Wright LP, Philips MR. Thematic review series: lipid posttranslational modifications. CAAX modification and membrane targeting of Ras. *J Lipid Res* 2006; 47: 883-91.
- Konstantionopoulos PA, Karamouzis MV, Papavassiliou AG. Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6: 541-55.
- Hancock JF, Paterson H, Marshall CJ. A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21<sup>ras</sup> to the plasma membrane. *Cell* 1990; 63: 133-9.
- Ellis CA, Clark G. The importance of being K-Ras. *Cell Signal* 2000; 12: 425-34.
- Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL i wsp. Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* 1998; 17: 1395-413.
- Herrmann C. Ras-effector interactions: after one decade. *Curr Opin Struct Biol* 2003; 13: 122-9.
- Repasky GA, Chenette EJ, Der CJ. Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? *Trends Cell Biol* 2004; 14: 639-47.
- Macaluso M, Russo G, Cinti C. Ras family genes: an interesting link between cell cycle and cancer. *J Cell Physiol* 2002; 192: 125-30.
- Downward J. Ras signalling and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8: 49-54.
- Omerovic J, Laude AJ, Prior IA. Ras proteins: paradigms for compartmentalised and isoform-specific signalling. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64: 2575-89.
- Yamashita K, Tatebayashi T, Shinoda H i wsp. Simplified rapid non-radioactive PCR-SSCP method applied to K-ras mutation analysis. *Pathol Int* 1996; 46: 801-4.
- Kressner U, Biorheim J, Westring S i wsp. Ki-ras mutations and prognosis in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1998; 34: 518-21.
- Hayes VM, Westra JL, Verlind E i wsp. New comprehensive denaturing-gradient-gel-electrophoresis assay for KRAS mutation detection applied to paraffin-embedded tumours. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 29: 309-14.
- Levi S, Urbano-Ispizua A, Gill R i wsp. Multiple K-ras codon 12 mutations in cholangiocarcinomas demonstrated with a sensitive polymerase chain reaction technique. *Cancer Res* 1991; 51: 3497-502.
- Leonart ME, Ramon Cajal S, Groopman JD i wsp. Sensitive and specific detection of K-ras mutations in colon tumors by short oligonucleotide mass analysis. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: e53.
- Lehman TA, Scott F, Seddon M i wsp. Detection of K-ras Oncogene Mutations by Polymerase Chain Reaction-Based Ligase Chain Reaction. *Anal Biochem* 1996; 239: 153-159.
- Khanna M, Park P, Zirvi M i wsp. Multiplex PCR/LDR for detection of K-ras mutations in primary colon tumors. *Oncogene* 1999; 18: 27-38.
- Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M i wsp. Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by Pyrosequencing. *J Mol Diagn* 2005; 7: 413-21.
- Chang Y, Yeh K, Chang T i wsp. First simultaneous detection of K-RAS mutations in colorectal cancer. *BMC Cancer* 2009; 9: (wersja elektroniczna).
- Do H, Krypuy M, Mitchell PL i wsp. High resolution melting analysis for rapid and sensitive EGFR and KRAS mutation detection in formalin

- fixed paraffin embedded biopsies. *BMC Cancer* 2008; 8:142. (wersja elektroniczna).
30. Amicarelli G, Shehi E, Makrigiorgos GM i wsp. FLAG assay as a novel method for real-time signal generation during PCR: application to detection and genotyping of KRAS codon 12 mutations. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: e131.
  31. Frattini M, Balestra D, Suardi S i wsp. Different genetic features associated with colon and rectal carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4015-21.
  32. Jimeno A, Messersmith WA, Hirsch FR i wsp. KRAS mutations and sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in colorectal cancer: practical application of patient selection. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1130-6.
  33. Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F i wsp. Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by cetuximab plus chemotherapy. *Br J Cancer* 2007; 96: 1166-9.
  34. Edkins S, O'Meara S, Parker A i wsp. Recurrent KRAS codon 146 mutations in human colorectal cancer. *Cancer Biol Ther* 2006; 5: 928-32.
  35. Bazan V, Migliavacca A, Zanna I i wsp. 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.
  36. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-67.
  37. Brink M, de Goeij AF, Weijnenberg MP i wsp. K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis* 2003; 24: 703-10.
  38. Urosević N, Krtolica K, Skaro-Milić A i wsp. Prevalence of G-to-T transversions among K-ras oncogene mutations in human colorectal tumors in Yugoslavia. *Int J Cancer* 1993; 54: 249-54.
  39. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D i wsp. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 675-84.
  40. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 459-65.
  41. Mixich F, Ioana M, Voinea F i wsp. Noninvasive detection through REMS-PCR technique of K-ras mutations in stool DNA of patients with colorectal cancer. *J Gastrointest Liver Dis* 2007; 16: 5-10.
  42. Rennert G, Kislitsin D, Brenner DE i wsp. Detecting K-ras mutations in stool from fecal occult blood test cards in multiphasic screening for colorectal cancer. *Cancer Lett* 2007; 253: 258-64.
  43. Tysarowski A, Fabisiwicz A, Kolasa I i wsp. Walidacja wybranych technik molekularnych oznaczania mutacji w kodonie 12 i 13 genu *K-RAS* przeprowadzona w pięciu ośrodkach badawczo-naukowych Polski. *Onkologia Kliniczna w Praktyce* 2008; 4: 232-244.
  44. Santini D, Loupakis F, Vincenzi B i wsp. High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice. *Oncologist* 2008; 13: 1270-5.
  45. Srivastava S, Verma M, Henson DE. Biomarkers for early detection of colon cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1118-26.
  46. Michor F, Iwasa Y, Lengauer C i wsp. Dynamics of colorectal cancer. *Semin Cancer Biol* 2005; 15: 484-93.
  47. Oliveira C, Velho S, Moutinho C i wsp. KRAS and BRAF oncogenic mutations in MSS colorectal carcinoma progression. *Oncogene* 2007; 26: 158-63.
  48. Moerkerk P, Arends JW, van Driel M i wsp. Type and number of Ki-ras point mutations relate to stage of human colorectal cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 3376-8.
  49. Kressner U, Bjørheim J, Westring S i wsp. Ki-ras mutations and prognosis in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1998; 34: 518-21.
  50. Baisse B, Bouzourene H, Saraga EP i wsp. Intratumor genetic heterogeneity in advanced human colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2001; 93: 346-52.
  51. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D i wsp. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the "RASCAL II" study. *Br J Cancer* 2001; 85: 692-6.
  52. Lièvre A, Bachet JB, Boige V i wsp. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2008; 26: 374-9.
  53. Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D i wsp. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 3992-5.
  54. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ i wsp. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008; 359: 1757-65.
  55. Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ i wsp. 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.
  56. De Roock W, Piessevaux H, De Schutter J i wsp. 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.
  57. Balko JM, Black EP. A gene expression predictor of response to EGFR-targeted therapy stratifies progression-free survival to cetuximab in KRAS wild-type metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer* 2009; 9: 145.

Otrzymano: 22 lipca 2009 r.

Przyjęto do druku: 9 września 2009 r.