

Andrzej Tysarowski<sup>1</sup>, Anna Fabisiewicz<sup>1</sup>, Iwona Kolasa<sup>2</sup>, Jolanta Kupryjańczyk<sup>2</sup>,  
 Dorota Ściegłińska<sup>3</sup>, Marek Rusin<sup>3</sup>, Zdzisław Krawczyk<sup>3</sup>, Agnieszka Woźniak<sup>4</sup>,  
 Lucyna Morzuch<sup>4</sup>, Janusz Limon<sup>4</sup>, Oksana Kowalczyk<sup>5</sup>, Lech Chyczewski<sup>5</sup>, Piotr Wójcik<sup>6</sup>,  
 Jerzy Stachura<sup>6</sup>, Karolina Wieruszewska-Kowalczyk<sup>7</sup>, Monika Pokrzepa<sup>7</sup>,  
 Włodzimierz P. Olszewski<sup>8</sup>, Marek P. Nowacki<sup>9</sup>, Janusz A. Siedlecki<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biologii Molekularnej, Centrum Onkologii — Instytut w Warszawie

<sup>2</sup>Zakład Patologii Molekularnej, Centrum Onkologii — Instytut w Warszawie

<sup>3</sup>Zakład Biologii Nowotworów, Oddział Gliwicki, Centrum Onkologii — Instytut w Gliwicach

<sup>4</sup>Katedra i Zakład Biologii i Genetyki, Akademia Medyczna w Gdańsku

<sup>5</sup>Zakład Klinicznej Biologii Molekularnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

<sup>6</sup>Katedra Patomorfologii, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

<sup>7</sup>Amgen Sp. z o.o. w Warszawie

<sup>8</sup>Zakład Patologii, Centrum Onkologii — Instytut w Warszawie

<sup>9</sup>Klinika Nowotworów Jelita Grubego, Centrum Onkologii — Instytut w Warszawie

## Walidacja wybranych technik molekularnych oznaczania mutacji w kodonie 12 i 13 genu *K-RAS* przeprowadzona w pięciu ośrodkach badawczo-naukowych Polski

Validation of selected molecular methods for the mutations determination  
 in codons 12 and 13 of *K-RAS* gene in five Polish oncological research centers

### Adres do korespondencji:

dr n. biol. Anna Fabisiewicz  
 Zakład Biologii Molekularnej,  
 Centrum Onkologii — Instytut  
 ul. Roentgena 5, 02-781 Warszawa  
 Tel.: (+48 22) 644 02 09  
 e-mail: fabisiewicz@coi.waw.pl

### STRESZCZENIE

Chorzy na raka jelita grubego z przerzutami mogą osiągnąć korzyść z leczenia panitumumabem jedynie, jeśli w guzie nie stwierdzono mutacji w genie *K-RAS*. W związku z tym konieczne jest zbadanie statusu tego genu w celu wyłonienia chorych, którzy mogą być poddani takiemu leczeniu.

Celem pracy było opracowanie standardowej procedury oznaczania statusu genu *K-RAS* w materiale izolowanym z blozków parafinowych. Kolejnym celem była walidacja wybranych technik molekularnych oznaczania mutacji w pięciu ośrodkach w Polsce, w których odbywa się leczenie chorych na raka jelita grubego. Ocenie poddano cztery różne techniki oznaczania mutacji: SSCP, DHPLC, RFLP/PCR i bezpośrednie sekwencjonowanie.

Stwierdzono, że wszystkie jednostki uczestniczące w procesie walidacji są odpowiednio przygotowane do podjęcia działalności diagnostycznej w zakresie oznaczania statusu genu *K-RAS*. Przyjęto następujące zalecenia dla laboratoriów diagnostycznych: 1. Materiał do izolacji DNA powinien zawierać przynajmniej 70% tkanki nowotworowej; 2. Ujednoczenie procedury izolacji DNA ze skrawków parafinowych wymaga stosowania gotowego zestawu do izolacji DNA; 3. W przypadku braku jednoznacznego wyniku konieczne jest stosowanie dwóch metod oznaczania mutacji, przy czym jedną z nich powinno być sekwencjonowanie bezpośrednie.

**Słowa kluczowe:** rak jelita grubego z przerzutami, mutacja *K-RAS*, status *K-RAS*, panitumumab

**ABSTRACT**

Metastatic colorectal cancer patients will benefit from treatment with panitumumab only when they don't have mutation in *K-RAS* gene. Therefore, estimation of mutational status of *K-RAS* is necessary for the selection of patients, who should be treated with panitumumab.

The aim of this study was to evolve a standard method of estimation of *K-RAS* mutational status in the material isolated from paraffin blocs. The second aim was the validation of selected molecular methods of *K-RAS* mutation evaluation in five Polish oncological centers where mCRC patients are treated. Four methods were evaluated: SSCP, DHPLC, RFLP/PCR and direct sequencing.

We found that all groups in five selected oncological centers, who took part in the validation process, were well prepared for molecular diagnosis of *K-RAS* mutational status. The following recommendations for diagnostic laboratories were approved: 1. At least 70% of cancer cells should be present in a tissue for DNA isolation; 2. The method of DNA isolation should be standardized, the most appropriate is usage of DNA isolation kits; 3. In case of equivocal results two independent molecular methods should be employed, one of them should be direct sequencing.

**Key words:** metastatic colorectal cancer, *K-RAS* mutation, *K-RAS* mutational status, panitumumab

Onkol. Prak. Klin. 2008; 6: 232–244

**Wstęp**

Powstanie nowotworu wiąże się z akumulacją zmian w genomie komórki. Ich wynikiem są zaburzenia w obrębie ekspresji wielu genów w tym genów odpowiedzialnych za utrzymanie równowagi między czynnikami wzrostowymi i antywzrostowymi. W prawidłowo funkcjonującej komórce ta równowaga odpowiada za utrzymanie pod kontrolą procesów proliferacyjnych [1]. W komórkach nowotworowych w wyniku zmian w genomie następuje silne przesunięcie równowagi w kierunku proliferacji. Prowadzi to do zahamowania procesu apoptozy oraz nabycia przez komórki nowotworowe zdolności do rozprzestrzeniania się po organizmie i zasiedlania nowych obszarów zajmowanych w prawidłowych warunkach przez inne typy komórek. Jedną z obecnie stosowanych metod terapii celowanej jest użycie leków, które zapobiegają przesunięciu równowagi i przywracają kontrolę nad proliferacją. Do takich leków zalicza się inhibitory aktywności szlaków przekazywania sygnałów. Mogą to być zarówno inhibitory drobnocząsteczkowe, jak i przeciwciała monoklonalne. W obu przypadkach stosowane leki ukierunkowane są na hamowanie zdolności przekazywania sygnałów przez różnego typu receptory o aktywności kinazy tyrozynowej. Jednym z podstawowych szlaków przekazywania sygnału jest szlak naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR, *endothelial growth factor receptor*) [2]. Rodzina receptorów EGFR zbudowana jest z 4 białek EGFR1, 2, 3 i 4 (inne nazwy dla tych receptorów to: HER1, 2, 3 i 4 lub ERB B1, 2, 3 i 4). Receptor, łącząc się z ligandem, ulega dimeryzacji, a następnie autofosforylacji. W wyniku dimeryzacji mogą powstać zarówno homodimery, jak i heterodimery. Receptory może aktywować kilka różnych ligandów (EGF, TGF $\beta$ , HB-EGF, amfireguliny, hereguliny, neureguliny, betaceluliny) Może więc

powstać potężna sieć informacyjna napędzająca proliferację [2, 3].

Zahamowanie głównego przekaźnika sygnału, jakim jest EGFR, za pomocą leku celowanego może jednak okazać się nieskuteczne, gdy dalsze elementy tego szlaku nie działają prawidłowo. W komórce prawidłowej sygnał z EGFR jest przekazywany na jeden z trzech podstawowych szlaków metabolicznych: szlak RAS/RAF/MAPK/ERK, szlak PI3K/AKT i szlak STAT. Sygnały przebiegające tymi drogami sterują takimi procesami, jak proliferacja, angiogeneza, apoptoza i przerzutowanie.

Szlak sterowany przez białko K-RAS jest kluczowy dla procesu proliferacji związanego z przekaźnictwem sygnału za pośrednictwem EGFR1 [4]. W procesie transformacji gen kodujący to białko często ulega mutacjom punktowym. Zmiany te są powodem utraty prawidłowej funkcji białka RAS. Powodują one zaburzenia funkcjonowania GTP-azowej aktywności białka, co w konsekwencji prowadzi do jego aktywacji i ciągłej stymulacji efektorów RAS. Mutacje w genie RAS obserwuje się najczęściej w przypadku gruczolakoraka trzustki (90%), raka tarczycy (50%), raka jelita grubego (40%), raka płuc (30%) oraz białaczki szpikowej (30%). Nie stwierdzono obecności tych mutacji w wypadku raka piersi, prostaty, przełyku czy nowotworu pęcherzyka żółciowego. Większość mutacji (ok. 90%) w genie RAS dotyczy kodonów 12 i 13. Znacznie rzadziej obserwuje się mutacje w kodonie 61 i innych. W przypadku jelita grubego częstość mutacji w kodonie 12 i 13 jest zbliżona (w kodonie 12 — 54%, w 13 — 42%). Istnieją także przypadki, w których klon komórek nowotworowych posiada mutacje w kodonie 12 i 13 jednocześnie (4%). W większości innych nowotworów, w których stwierdza się obecność mutacji w genie RAS, przeważają klonny komórek z mutacjami w kodonie 12. Mutacje RAS są zmianami monoallelicznymi powstającymi we wcze-

nych etapach karcynogenezy (wczesne i średniozaawansowane gruczolaki) [5–9].

Rak jelita grubego jest drugą pod względem częstości występowania przyczyną zgonu zarówno w Unii Europejskiej, jak i w Stanach Zjednoczonych [10]. W ostatnich latach w leczeniu tej choroby osiągnięto znaczący postęp i dotyczył on głównie odpowiedniego doboru i dawkowania klasycznych chemioterapeutyków. Niedawno jednak pojawiły się leki nowej generacji. Są to leki ukierunkowane na hamowanie EGFR1 — receptora sterującego proliferacją nabłonka jelita grubego. Tęgo typu leki teoretycznie powinny zahamować lub w znaczący sposób ograniczyć proliferację komórek nowotworowych, czyli doprowadzić do zahamowania wzrostu nowotworu. Jednak od pewnego czasu wiadomo, że nie występuje znacząca korelacja między poziomem ekspresji EGFR1 a odpowiedzią na inhibitory aktywności tego receptora. W kilku ostatnio opublikowanych pracach [11–16] wykazano, że mutacja w genie *K-RAS* znosi terapeutyczny efekt leku nakierowanego na hamowanie aktywności EGFR. Dzieje się tak dlatego, że mutacja w genie *RAS* prowadzi do autoaktywacji kinazy RAS, czyli do niewymagającej sygnału aktywacji proliferacji. Taki efekt zaobserwowano w przypadku monoterapii panitumumabem u chorych na raka jelita grubego [12]. Podobny efekt zaobserwowano w przypadku prób monoterapii z zastosowaniem cetuksymabu u chorych na raka płuca [17].

Celem tej pracy nie jest udowodnienie roli statusu genu *K-RAS* jako wskaźnika klinicznej skuteczności przeciwciała antyEGFR czy niskocząsteczkowego inhibitora aktywności kinazującej receptora, ale opracowanie standardowej procedury oznaczania statusu tego genu w materiale pochodzącym z bloków parafinowych oraz wskazanie trudności technicznych i sposobów ich pokonania. Dodatkowym celem tej pracy jest ocena efektywności oznaczania statusu *K-RAS* za pomocą różnych technik. Ocenie poddano cztery różne techniki oznaczania mutacji: badanie poliformizmu konformacyjnego jednoniciowego (SSCP, *single strand conformation polymorphism*), techniki wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej w warunkach denaturujących (DHPLC, *denaturing high pressure liquid chromatography*), analizy długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP/PCR, *restriction fragment length polymorphism*) i bezpośrednie sekwencjonowanie.

## Materiały i metody

Dane o zespołach uczestniczących w procesie walidacji

W przeprowadzonym teście uczestniczyły następujące ośrodki: Zakład Biologii Molekularnej (ZBM) i Zakład

Patologii Molekularnej (ZPM) Centrum Onkologii — Instytut w Warszawie, Zakład Biologii Nowotworów Oddziału Gliwickiego Centrum Onkologii — Instytut (ZBN), Zakład Klinicznej Biologii Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (UMB), Katedra Patomorfologii *Collegium Medicum* UJ z Krakowa (KPCM) i Katedra i Zakład Biologii i Genetyki Akademii Medycznej w Gdańsku (AMG).

## Izolacja DNA z blozków parafinowych

Cztery różne ośrodki zajmujące się leczeniem raka jelita grubego: Centrum Onkologii — Instytut w Warszawie, *Collegium Medicum* w Krakowie, Akademia Medyczna w Gdańsku i Uniwersytet Medyczny w Białymstoku dostarczyły do Zakładu Patologii Centrum Onkologii po 10 blozków parafinowych. Każdy blok wstępnie analizowano w macierzystej jednostce i wybierano, jeśli zawierał minimum 70% utkania nowotworowego. W Zakładzie Patologii CO-I każdy z blozków powtórnie oceniał patolog (WPO). Następnie wybrano 20 blozków, z których po zaszyfrowaniu skrojono materiał do izolacji DNA. Probówkom zawierającym skrojony materiał nadano numery 1–20 w sposób przypadkowy. Jedynie patolog wybierający blozki znał sposób przyporządkowania numeru próbki numerowi blozka.

Procedurę izolacji DNA wykonano w Zakładzie Biologii Molekularnej Centrum Onkologii — Instytutu w Warszawie. DNA izolowano za pomocą zestawu MagneSil® Genomic, Fixed Tissue System (Promega). Trzy skrawki o grubości 18 mikronów z każdego blozka umieszczano w sterylnej probówce Eppendorfa o pojemności 1,5 ml i zalewano buforem inkubacyjnym w dawce 250  $\mu$ l zawierającym 0,1 mM DTT i 1,8 mg/ml proteiny K. Po energicznym wymieszaniu próbki inkubowano przez noc w temperaturze 56°C w termobloku z wytrząsaniem 1000 rpm. Następnie dodawano 500  $\mu$ l buforu lizującego i 20  $\mu$ l kuleczek magnetycznych (Resin) uprzednio energicznie wymieszanych. Po 5-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej próbki umieszczano w statywie magnetycznym (Dynal). Ostrożnie usuwano płyn z nad kuleczek i dodawano kolejną porcję (250  $\mu$ l) buforu lizującego. Powtarzano oddzielanie kuleczek w statywie magnetycznym. Roztwór usuwano, a kuleczki przemywano, używając 250  $\mu$ l buforu płuczającego. Jeśli na ściankach pozostawało dużo parafiny, kuleczki przenoszono do nowej próbki Eppendorfa i omywano jeszcze 2-krotnie buforem płuczającym. Za każdym razem dokładnie usuwano cały roztwór. Po zakończeniu procedury płukania kuleczki suszono, pozostawiając otwartą probówkę przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Do kuleczek dodawano 30  $\mu$ l buforu elucyjnego i po energicznym wymieszaniu całość inkubowano przez 5 minut w temperaturze 65°C. Następnie probówkę wstawiano do statywu

magnetycznego w celu oddzielenia kuleczek. Roztwór zawierający uwolnione z kuleczek DNA przenoszono do nowej sterylnej probówki Eppendorfa. Czystość i stężenie otrzymywanych preparatów DNA określano za pomocą spektrofotometru NanoDrop 1000.

Alternatywnie stosowano izolację DNA z użyciem zestawu Sherlock (A&A Biotechnology). Izolacja za pomocą tego zestawu prowadzi do otrzymywania większych ilości DNA o odpowiedniej czystości. Jednak użycie zestawu Sherlock wydłuża samą procedurę ze względu na konieczność wcześniejszego usunięcia parafiny.

Wszystkie zespoły uczestniczące w procesie walidacji otrzymały 0,5–1 µg każdego z 20 analizowanych preparatów DNA.

Sekwencje starterów wykorzystywanych w procesie określania statusu genu *K-RAS*

Sekwencje wszystkich użytych w tej pracy starterów przedstawiono w tabeli 1.

#### Oznaczenie mutacji *K-RAS* metodą PCR-RFLP

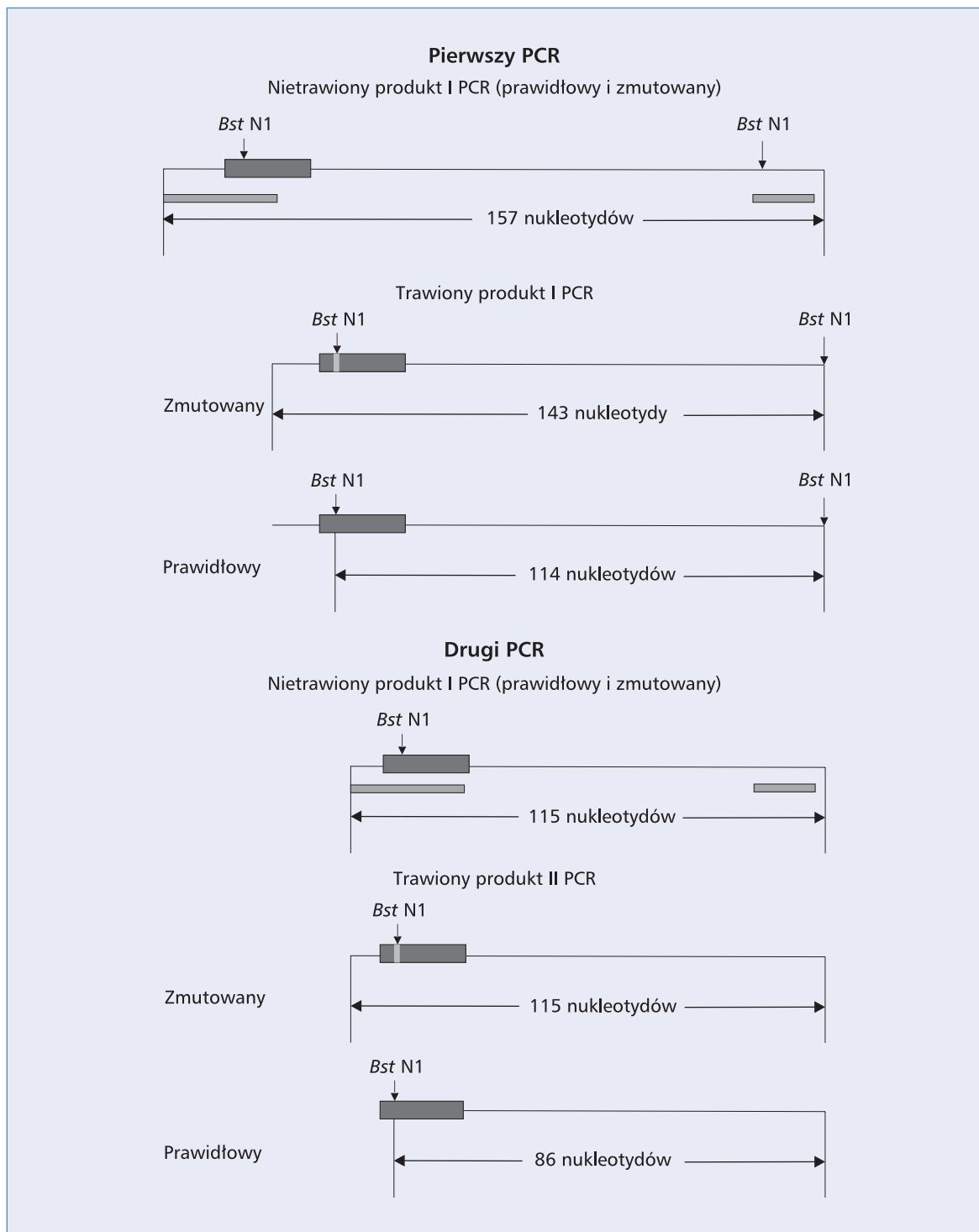
Zespoły: warszawski (ZBM) i białostocki (UMB) do identyfikacji mutacji *K-RAS* wykorzystwały zmodyfikowaną metodę opisaną przez Banerjee i wsp. [19]. Metoda ta pozwala na identyfikację mutacji jedynie w kodonie 12. Opiera się ona na 2-stopniowej reakcji polimerazy łańcuchowej (PCR, *polymerase chain reaction*) i trawieniu restrykcyjnym. Startery w pierwszej reakcji PCR zaprojektowano tak, aby stworzyć dwa miejsca restrykcyjne dla endonukleazy restrykcyjnej *Bst*NI w produkcie amplifikacji. Jedno obejmujące rejon kodonu 12 (GGT) i drugie w końcowym odcinku produktu PCR, będące wewnętrzną kontrolą reakcji trawienia restrykcyjnego (ryc. 1). Mieszanina reakcyjna w końcowej formie przy objętości 25 µl zawierała: 1 × PCR bufor (Applied Biosystems), 200 µM każdego z dNTP, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 nM startera F1, 300 nM startera R1, 50 ng matrycowego DNA i 0,5 jednostki polimerazy DNA AmpliTaq Gold (Applied Biosys-

**Tabela 1. Sekwencje starterów wykorzystywane w różnych laboratoriach**

**Table 1. The sequences of primers used in different laboratories**

Ośrodek	Metoda	Nazwa startera	5'- Sekwencja startera
ZBM , UMB	PCR/RFLP	F1	AGTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT
ZBM	PCR/RFLP	R1	TCAAAGAATGGTCCTGGACC
ZBM	PCR/RFLP	R2	CTCTATTGTTGGATCATATT
UMB	PCR/RFLP	R3	TGATGAAAATGGTCAGAGAA
AMG	DHPLC	F2	AAGGTAAGTGGTGGAGTATTTGATAGTG
AMG	DHPLC	R2	TCATGAAAATGGTCAGAGAAACC
KPCM	SSCP	F	GACTGAATATAAACTTGTGG
KPCM	SSCP	R	CTGTATCAAAGAATGGTCCT
ZPM	SSCP	SF1	AACCTTATGTGTGACATGTTT
ZPM	SSCP	SR1	TGTATCAAAGAATGGTCCTG
ZBM	Sekwencjonowanie	SF1	AACCTTATGTGTGACATGTTT
ZBM	Sekwencjonowanie	SR1	TGTATCAAAGAATGGTCCTG
ZBM	Sekwencjonowanie	SF2	GCCTGCTGAAAATGACTGAA
ZBM	Sekwencjonowanie	SR2	AGAATGGTCCTGCACCAGTAA

ZBM — Zakład Biologii Molekularnej, Centrum Onkologii — Instytut w Warszawie; UMB — Zakład Klinicznej Biologii Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku; AMG — Katedra i Zakład Biologii i Genetyki Akademii Medycznej w Gdańsku; KPCM — Katedra Patomorfologii Collegium Medicum UJ z Krakowa; ZPM — Zakład Patologii Molekularnej, Centrum Onkologii — Instytut w Warszawie; PCR/RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) — analiza długości fragmentów restrykcyjnych; DHPLC (*denaturing high pressure liquid chromatography*) — technika wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej w warunkach denaturujących; SSCP (*single strand conformation polymorphism*) — badanie polimorfizmu konformacyjnego jednoniciowego



Rycina 1. Schemat reakcji gniazdowego PCR/RFLP  
 Figure 1. Schematic depicting the nested PCR/RFLP method

tem). Warunki reakcji PCR były następujące: temperatura 95°C przez 5 min, 40 cykli (94°C przez 30 s, 56°C przez 30 s, 72°C przez 30 s), 72°C, 7 min. Produkt PCR poddano trawieniu za pomocą endonukleazy restryk-

cyjnej *BstN1*. W efekcie mieszanina reakcyjna przy objętości 20  $\mu$ l zawierała: 1  $\times$  bufor dla *BstN1*, BSA (100  $\mu$ g/ml), 2,5  $\mu$ l produktu PCR i 5 jednostek *BstN1*. Całość inkubowano 3 godziny w temperaturze 60°C.

Mieszaninę po trawieniu (15  $\mu$ l) poddano elektroforze w 8-procentowym roztworze żelu poliakrylamidowego.

Pozostałe po trawieniu 5  $\mu$ l próbki rozcieńczano 10-krotnie. Jeden  $\mu$ l tak rozcieńczonej próbki stosowano jako matrycę w drugim PCR. Mieszanina reakcyjna w drugim PCR w końcowej formie przy objętości 25  $\mu$ l zawierała: 1  $\times$  PCR bufor (Applied Biosystems), 200  $\mu$ M każdego z dNTP, 1,5 mM  $MgCl_2$ , 200 nM starterów F1 i R2 i 0,5 jednostki polimerazy DNA AmpliTaq Gold (Applied Biosystem). Warunki reakcji były następujące: 95°C przez 5 min, 25 cykli (94°C przez 30 s, 55°C przez 30 s, 72°C przez 30 s), 72°C przez 7 min. Po amplifikacji 5  $\mu$ l produktu drugiego PCR trawiono za pomocą 5 jednostek *Bst*N1 w warunkach opisanych wcześniej i następnie analizowano w 8-procentowym roztworze żelu poliakrylamidowego.

Aby dodatkowo zweryfikować wyniki cięcia restrykcyjnego po drugim PCR, prążek odpowiadający formie zmutowanej wycinano z żelu, oczyszczano za pomocą zestawu NucleoSpin Extract (Macherey-Nagel) i poddano sekwencjonowaniu ze starterem R2.

#### Oznaczenie mutacji w *K-RAS* metodą SSCP

Zespół krakowski zastosował procedurę opartą na metodzie opisanej przez Garcia-Rostan i wsp. [4]. Mieszanina reakcyjna zawierała 1  $\times$  bufor PCR GoldTaq (Applied Biosystem), 200  $\mu$ M dNTP, 1,5 mM  $MgCl_2$ , 200 nM starterów R i F, 0,2 jednostki polimerazy DNA AmpliTaq Gold (Applied Biosystem) i 200 ng matrycowego DNA. Reakcję prowadzono w termocyklerze typ T3 (Biometra). Warunki reakcji PCR były następujące: 95°C przez 7 min, 40 cykli (95°C przez 30 s, 55°C przez 40 s, 72°C przez 30 s), 72°C przez 7 min. Produkty PCR mieszano z formamidem w proporcji 1:1. Próbkę denaturowano przez 12 minut w temperaturze 95°C i schładzano na lodzie. Zespół krakowski do rozdzielania używał żelu MDE firmy LONZA. Elektroforezę przeprowadzono w aparacie Protean II XI Cell (Bio-Rad Laboratories) w buforze 1  $\times$  TBE. Stałą temperaturę żeli osiągnięto poprzez zastosowanie systemu chłodzenia MultiTemp III (Amersham Pharmacia Biotech). Warunki elektroforezy były następujące: stałe napięcie wynosiło 170 V, czas elektroforezy — 19 godzin, stała temperatura — 19°C. Prążki DNA wizualizowano metodą srebrową.

Zespół warszawski amplifikował DNA w objętości 12,5  $\mu$ l w mieszaninie reakcyjnej zawierającej 1  $\times$  bufor II do PCR, 2,5 mM  $MgCl_2$ , 0,2 mM dNTP, 0,2  $\mu$ M każdego ze starterów, 20–50 ng matrycy oraz 0,325 U polimerazy AmpliTaq Gold. Warunki reakcji były następujące: 95°C przez 10 min, a następnie 35 cykli obejmujących: 30 s w temperaturze 94°C, 30 s w 52°C i 30 s w 72°C. Reakcję kończono przez 7-minutową inkuba-

cję w temperaturze 72°C. Analizę prowadzono przy użyciu żelu poliakrylamidowego (39:1) zawierającego glicerol w stężeniu 10%. Produkt PCR (10  $\mu$ l) mieszano z 10  $\mu$ l roztworu zawierającego 0,1 M NaOH i 2 mM EDTA i denaturowano w temperaturze 50°C w bloku grzejnym przez 15 minut. Próbkę uzupełniano formamidem w dawce 4  $\mu$ l zmieszany z barwnikiem, który nakładano na żel. Elektroforezę prowadzono w buforze 1  $\times$  TBE przy napięciu 200 V, a po upływie pierwszej godziny — przy napięciu 110 V przez 19 godzin. Prążki wizualizowano metodą srebrową z wykorzystaniem zestawu firmy Amersham. Żel suszono między dwoma warstwami folii za pomocą zestawu Dryout firmy Kucharczyk.

#### Oznaczenie mutacji w *K-RAS* za pomocą DHPLC

Zespół gdański wykorzystał do oznaczania metodę wysokosprawnej denaturującej chromatografii cieczowej (DHPLC). Ta pośrednia metoda wykrywania mutacji punktowych polega na rozdzieleniu hetero- i homodupleksów. Rozdział następuje w kolumnie chromatograficznej, w warunkach częściowej denaturacji, z zastosowaniem gradientu buforów zawierających TEAA oraz acetonitryl, w optymalnej, dobranej empirycznie temperaturze rozdzielania. Zamplifikowane technika PCR fragmenty denaturuje się w temperaturze 95°C, a następnie powoli renaturuje w celu uzyskania hetero- i homodupleksów. Heterodupleksy posiadają mniejsze powinowactwo do złoża kolumny, dlatego szybciej niż homodupleksy ulegają elucji z kolumny chromatograficznej. Detekcja fragmentów zachodzi za pomocą spektrometru UV-VIS. Czulość wykrywania mutacji punktowych za pomocą DHPLC przy optymalnie ustawionej temperaturze rozdzielania określa się na 95–99%.

Produkt PCR rozdzielano, stosując DHPLC w temperaturze 60°C (WAVE System 3500 z oprogramowaniem Navigator Software, TRANSGENOMIC®). Fragmenty o odmiennym profilu elucji poddawano następnie sekwencjonowaniu bezpośredniemu za pomocą sekwencjonatora automatycznego Genetic Analyzer ABI 310 wraz z odpowiednim oprogramowaniem (Applied Biosystem), a elektroforegramy analizowano przy wykorzystaniu oprogramowania Sequencher (Gene Codes Corporation), stosując jako wzorcową sekwencję ENSP00000256078 ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)).

#### Bezpośrednie sekwencjonowanie

Do sekwencjonowania wykorzystano startery SF1 i SR1 (tab. 1). Mieszanina reakcyjna (25  $\mu$ l) zawierała: 1  $\times$  bufor PCR, 200  $\mu$ M każdego dNTP, 2  $\mu$ M  $MgCl_2$ , 0,4  $\mu$ M starterów SF1 i SR1, 50–100 ng matry-

cowego DNA oraz 0,5 jednostki polimerazy AmpliTaq Gold (Applied Biosystems). Reakcję przeprowadzano w termocyklerze GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). Warunki reakcji były następujące: 95°C przez 5 min, 40 cykli (94°C przez 30 s, 56°C przez 30 s, 72°C przez 30 s), 72°C przez 7 min. Produkty reakcji PCR rozdzielano w 2-procentowym roztworze żelu agarozowego w buforze TBE przy napięciu 5 V/cm (60–80 V).

W przypadku trudności z otrzymaniem produktu z wyżej wymienionymi starterami stosowano drugą parę starterów (SF2, SR2) dającą krótszy produkt amplifikacji drugiego eksonu. Skład mieszaniny oraz warunki reakcji były takie same jak opisane powyżej.

Produkt PCR oczyszczano na kolumnach Montage PCR Filter Units (Millipore). Stężenie produktu oznaczano spektrofotometrycznie. Dziesięć ng produktu PCR znakowano przy użyciu zestawu BigDye® Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) według zaleceń producenta. Warunki reakcji były następujące: 95°C przez 2 min, 25 cykli (96°C przez 10 s, 55°C przez 5 s, 60°C przez 4 min). Produkt reakcji wytrącano etanolem, płukano w 70-procentowym roztworze etanolu, suszono w speedvacu i zawieszano w formamidzie. Sekwencjonowanie prowadzono w aparacie Abi Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, Stany Zjednoczone).

## Wyniki

Analizie poddano status mutacji genu *K-RAS* w 20 różnych preparatach DNA wyizolowanych z blozków parafinowych chorych na raka jelita grubego. Analizowano jedynie obecność mutacji w kodonach 12 i 13 DNA izolowano za pomocą zestawu MagneSil® Genomic, Fixed Tissue System (Promega). Otrzymane preparaty DNA cechował duży stopień czystości. Wartość  $A_{260}/A_{280}$  we wszystkich przypadkach była wyższa niż 1,75. Stężenie otrzymanych preparatów wynosiło 40–120 ng/ $\mu$ l. Wszystkie preparaty przed rozesłaniem do zespołów testujących poddano wstępnie amplifikacji ze starterami F1 i R1. We wszystkich przypadkach, stosując polimerazę DNA AmpliTaq Gold (Applied Biosystem), uzyskano produkty amplifikacji. Zespołom testującym pozostawiono swobodę w zakresie wyboru metody oznaczania statusu genu *K-RAS*. Wszystkie 20 preparatów DNA poddano bezpośrednio sekwencjonowaniu nici sensownej i antysensownej w Zakładzie Biologii Molekularnej Centrum Onkologii w celu ustalenia wzorca statusu genu *K-RAS*. Spośród 20 analizowanych preparatów DNA w 12 nie wykryto mutacji w kodonach 12/13. Mutację w kodonie 12 wykryto w 4 przy-

padkach (próbki nr 5, 6, 14 i 18). W czterech przypadkach obserwowano mutację w kodonie 13 (próbki nr 1, 4, 8 i 9). W przypadku sekwencjonowania, na 8 próbek, w których znaleziono mutacje, w 5 obserwowano duże tło będące wynikiem obecności drugiego niezmutowanego allelu i/lub komórek bez mutacji. Niskie tło obserwowano jedynie w próbkach nr 6, 14 i 18. Wyniki przedstawiono w tabeli 2.

## Metoda PCR/RFLP

Dwa zespoły: warszawski (ZBM) i białostocki (UMB) posługiwały się techniką PCR/RFLP. Metoda ta pozwala na wykrycie mutacji jedynie w kodonie 12. W obu przypadkach użyto tego samego enzymu (*Bst*-NI). Zespół ZBM stosował dwuetapowy PCR, ze starterami F1 i R1 w pierwszym etapie i starterami F1 i R2 w drugim etapie, podczas gdy zespół UMB stosował jednoetapowy PCR, a do amplifikacji użył starterów F1 i R3. Zespół warszawski (ZBM) wykrył mutację w 10 przypadkach (nr 1, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 14, 18, 20), w 5 (nr 1, 5, 6, 14 i 18), uzyskując wynik pozytywny już po pierwszym PCR, natomiast w pozostałych 5 przypadkach (nr 3, 4, 9, 10 i 20) dopiero po kolejnym zastosowaniu PCR (ryc. 2). Dodatkowo sekwencjonowanie produktu cięcia restrykcyjnego po kolejnym PCR pozwoliło na potwierdzenie obecności niewielkiego klonu komórek nowotworowych zawierających mutację w genie *K-RAS* w kodonie 12 (próbka nr 1) oraz klonu zawierającego mutację w kodonie 12 i 13 równocześnie (próbka nr 4). W trzech próbkach (nr 3, 10 i 20), w których bezpośrednio sekwencjonowanie nie wykazało obecności mutacji, po drugim etapie amplifikacji i cięciu restrykcyjnym obserwowano bardzo słaby prążek wskazujący na obecność niewielkich ilości komórek z mutacją w kodonie 12. Sekwencjonowanie produktu cięcia restrykcyjnego wyizolowanego z żelu ujawniło bardzo niską zawartość klonu z mutacją w kodonie 12 (próbki nr 3 i 10 — G12V i próbka nr 20 — G12D).

Grupie białostockiej nie udało się uzyskać amplifikacji 3 spośród 20 preparatów DNA (próbki nr 5, 7 i 13). Z pozostałych 17 próbek DNA mutację w kodonie 12 znaleziono w 3 przypadkach (próbki nr 6, 14 i 18). Grupa białostocka nie obserwowała mutacji po jednostopniowym PCR w próbce nr 1. Wyniki uzyskane przez zespół białostocki, który stosował jednostopniowy PCR, były zbliżone do uzyskanych przez zespół warszawski (ZBM) przy jednostopniowym PCR.

## Metoda SSCP

Dwa zespoły: warszawski (ZPM) i krakowski (KPCM) wykorzystały metodę SSCP do oznaczania statusu mutacji w genie *K-RAS*. Zastosowana meto-

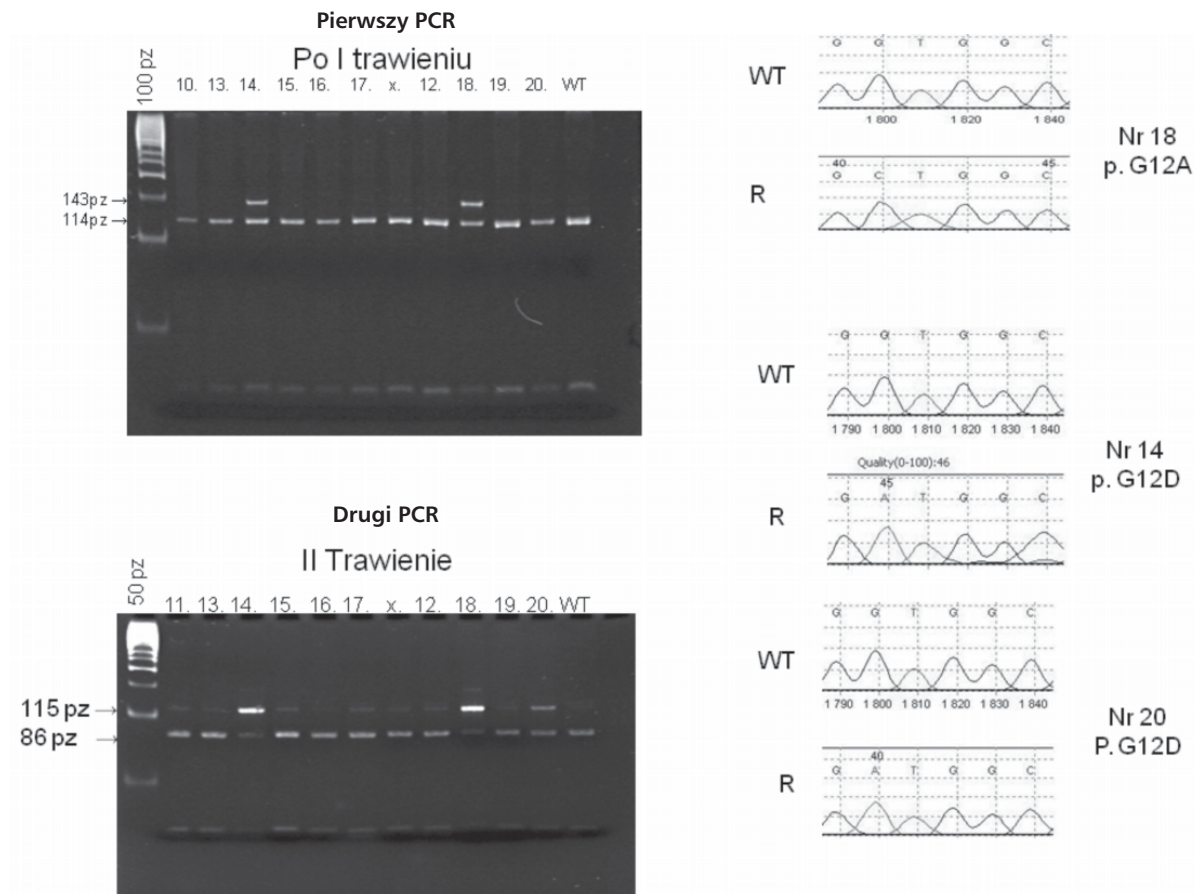
Tabela 2. Zestawienie wyników walidacji

Table 2. Summary of validation results

Nr próbki	Bezpośrednie sekwencjonowanie (wzorzec) <sup>1</sup>	Gniazdowy PCR/RFLP <sup>1</sup>	PCR/RFLP <sup>2</sup>	SSCP <sup>3</sup>	SSCP <sup>4</sup>	DHPLC + bezpośrednie sekwencjonowanie <sup>5</sup>	Bezpośrednie sekwencjonowanie <sup>6</sup>	Podsumowanie
1	p. G13D	+ p.G12S	-	+	+	p. G13D	p. G13D	+
2	WT	-	-	-	-	WT	WT	-
3	WT	(+) p. G12V	-	-	-	WT	Brak wyniku	-
4	p. G13D	(+) p. G12S p. G13D	-	+	+	p. G13D	p. G13D	+
5	p. G12V	+ p. G12D p. G12V	Brak wyniku	-	+	p. G12V	WT	+
6	p. G12V	+ p. G12V	+	+	+	p. G12V	p. G12V	+
7	WT	+ p. G12V	Brak wyniku	-	-	WT	-	-
8	p. G13D	-	-	+	+	p. G13D	p. G13D	+
9	p. G13D	(+) p. G12D	-	+	-	p. G13D	p. G13D	+
10	WT	(+) p. G12V	-	-	-	WT	Brak wyniku	-
11	WT	-	-	-	-	WT	WT	-
12	WT	-	-	-	-	WT	WT	-
13	WT	-	Brak wyniku	-	-	WT	WT	-
14	p. G12D	+ p. G12D	+	+	+	p. G12D	p. G12D	+
15	WT	-	-	-	-	WT	WT	-
16	WT	-	-	-	-	WT	WT	-
17	WT	-	-	-	-	WT	WT	-
18	p. G12A	+ p. G12A	+	+	+		p. G12A	+
19	WT	-	-	-	-	WT	WT	-
20	WT	(+) p. G12D	-	-	-	WT	WT	-

WT — brak mutacji; + — obecność mutacji; (+) — mutacja ujawniona dopiero po drugim PCR; - — brak mutacji; <sup>1</sup>Zakład Biologii Molekularnej, Centrum Onkologii — Instytut w Warszawie; <sup>2</sup>Zakład Klinicznej Biologii Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku; <sup>3</sup>Zakład Patologii Molekularnej, Centrum Onkologii — Instytut w Warszawie; <sup>4</sup>Katedra Patomorfologii Collegium Medicum UJ w Krakowie; <sup>5</sup>Katedra i Zakład Biologii i Genetyki Akademii Medycznej w Gdańsku; <sup>6</sup>Zakład Biologii Nowotworów Centrum Onkologii — Instytut w Gliwicach; PCR/RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) — analiza długości fragmentów restrykcyjnych; DHPLC (*denaturing high pressure liquid chromatography*) — wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa w warunkach denaturujących





Rycina 2. Analiza próbek oznaczanych metodą PCR/RFLP. Obraz trawienia restrykcyjnego endonukleazą restrykcyjną *Bst* NI próbek od 11 do 20 po pierwszym PCR i drugim PCR. Brak trawienia (górnny prążek) obrazuje mutację w kodonie 12. Widoczna zmiana mutacyjna w próbce nr 14, 18 oraz obecność niewielkiego klonu komórek z mutacją w kodonie 12. w próbce nr 20. Flurogramy są wynikiem sekwencjonowania prążka wyciętego z żelu wskazującego na mutację (próbki nr 14, 18, 20). WT — postać prawidłowa; R — nić antysens; pz. — pary zasad; 50 pz. i 100 pz. — wskaźniki wielkości

Figure 2. Analysis of samples determined with PCR/RFLP method. Gel electrophoresis of samples no.11 to no.20 digested with restriction endonuclease *Bst*NI after first PCR and second PCR. No digestion (upper band) indicates mutation in codon 12. Visible mutation — samples no.14 and 18; minor clone with mutation in codon 12 — sample no. 20. Fluorograms are the results of sequencing of the band isolated from the gel indicating mutation (samples no. 14, no. 18, no. 20). WT — wild type; R — antisense strand, pz — base pairs; 50 pz and 100 pz — molecular size markers

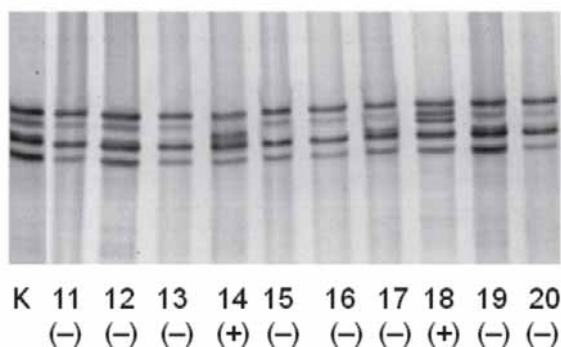
da pozwala na rozpoznanie mutacji zarówno w kodonie 12 jak, i 13. Oba zespoły wykryły obecność mutacji w 7 preparatach DNA (próbki nr 1, 4, 6, 8, 9, 14 i 18) (ryc. 3).

#### Metoda DHPLC

W badaniach prowadzonych przez zespół gdański, który jako jedyny dysponował zautomatyzowanym aparatem do wysokosprawnej chromatografii cieczowej, wykazano obecność mutacji w kodonie 12 w próbkach nr 5, 6, 14 i 18, a w kodonie 13 w próbkach nr 1, 4, 8 i 9 (ryc. 4).

#### Sekwencjonowanie

W ramach walidacji bezpośrednie sekwencjonowanie wszystkich 20 próbek DNA wykonały jeszcze 3 zespoły: warszawski (ZBM), gliwicki (ZBN) i gdański (AMG). Zespołowi gliwickiemu nie udało się zamplifikować próbek nr 3 i 10 oraz wykazać mutacji w kodonie 12 w próbce nr 5. W pozostałych próbkach zespół gliwicki wykazał obecność mutacji w 7 przypadkach, w tym — w kodonie 12 w próbkach nr 6, 14 i 18, a w kodonie 13 w próbkach nr 1, 4, 8, 9. Wyniki uzyskane przez zespół gdański były zgodne z wynikami wzorca otrzymanymi w ZBM (ryc. 5).



Rycina 3. Przykładowy wynik reakcji SSCP. Widoczne zmiany w układzie prążków w stosunku do kontroli w próbce nr 14 i 18. K — kontrola bez mutacji; (+) — mutacja; (-) — brak mutacji

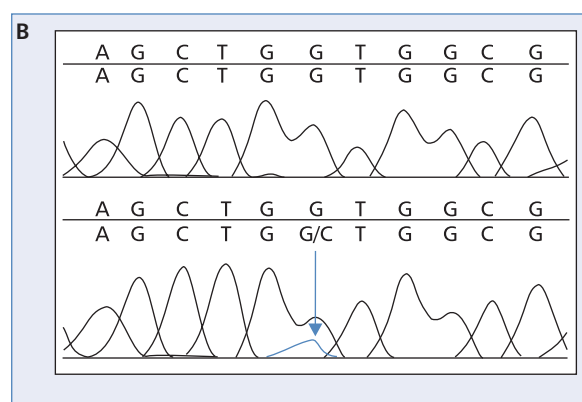
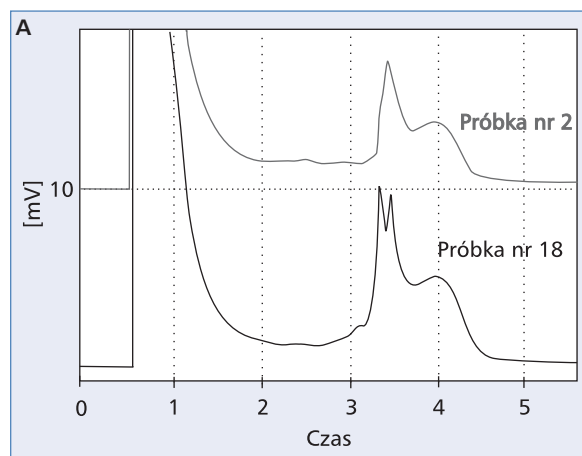
Figure 3. An example of the result of a SSCP assay. Visible changes in bands pattern in samples 14 and 18 compared to the control. K — control without mutation; (+) — mutation; (-) — no mutation

## Dyskusja

W piśmiennictwie pojawia się coraz więcej doniesień o skuteczności leczenia chorych na raka jelita grubego z wykorzystaniem panitumumabu jedynie w grupie pacjentów bez mutacji w genie *K-RAS* [12, 13]. W związku z tym przed przystąpieniem do leczenia z zastosowaniem tego preparatu konieczne należy zbadać status genu *K-RAS*. Autorzy niniejszej pracy podjęli próbę sprawdzenia, czy ośrodki, w których odbywa się leczenie chorych na raka jelita grubego, są w stanie wykonywać rutynowe oznaczenia statusu mutacji w tym genie dla celów diagnostycznych.

W procesie walidacji uczestniczyło 6 zespołów z 5 różnych ośrodków w kraju (Warszawę reprezentowały dwa ośrodki). W sumie do wykrywania mutacji wykorzystano cztery różne metody: PCR/RFLP, SSCP, DHPLC i sekwencjonowanie. Metoda PCR/RFLP pozwalała na wykrycie mutacji jedynie w kodonie 12. Pozostałe trzy metody wykrywały mutacje zarówno w kodonie 12, jak i 13.

Wzorec statusu mutacji we wszystkich 20 preparatach DNA opracowano w Zakładzie Biologii Molekularnej Centrum Onkologii — Instytucie (tab. 2). Do oznaczenia obecności mutacji wykorzystano 2 niezależne metody: metodą PCR/RFLP i sekwencjonowanie obu nici. Pozwoliło to na ustalenie, iż 8 spośród 20 preparatów DNA zawiera mutacje w genie *K-RAS*. Mutacje w kodonie 12 odnotowano w czterech próbkach (nr 5, 6, 14 i 18), a mutację w kodonie 13 również w czterech próbkach (nr 1, 4, 8, 9). Ponadto w próbce nr 1 obserwowano obecność niewielkiego klonu komórek zawierających mutację w kodonie 12. Klon ten był na tyle mały,

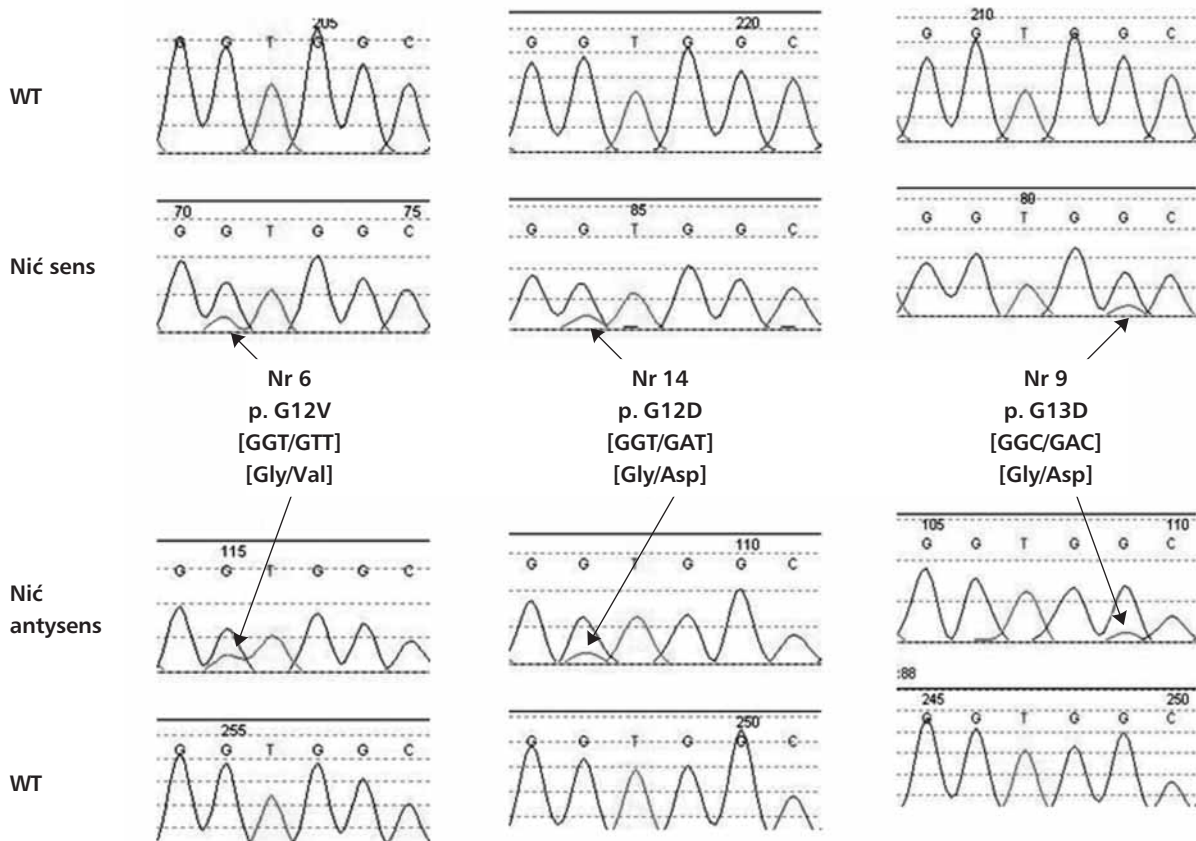


Rycina 4. Przykładowy elektroforogram uzyskany metodą DHPLC. A. Profil elucji dla próbki nr 2 (brak mutacji) oraz próbki nr 18 [mutacja w kodonie 12 *K-RAS*: (p.G12A)]. B. Fluorogram sekwencji obszaru 12 i 13 kodonu genu *K-RAS*, strzałką zaznaczono zmianę w kodonie 12. Górny wiersz — sekwencja prawidłowa, dolny wiersz — sekwencja badana. Widoczna mutacja w postaci dodatkowego pików — kolor niebieski

Figure 4. An example of an electropherogram obtained with DHPLC. A. Elution profile for sample no. 2 (wild type) and sample no. 18 [mutation in codon 12 *K-RAS*: (p.G12A)]. B. Fluorogram of sequence in the region of codon 12 and 13 of *K-RAS*, arrow depicts change in codon 12

że bezpośrednio sekwencjonowanie nie pozwalało na potwierdzenie jego obecności.

Wszystkie testujące zespoły bez problemu wykryły jedynie mutacje w próbkach: nr 6 (G12V), 14 (G12D) i 18 (G12A). Najtrudniej było wykryć mutację w próbce nr 5. Zespołowi białostockiemu nie powiodła się amplifikacja tego DNA, a zespół gliwicki pomimo skutecznej amplifikacji nie wykazał mutacji w tej próbce. Zespół warszawski stosujący technikę gniazdowego PCR/RFLP wykazał obecność niewielkich ilości komórek



Rycina 5. Bezpośrednie sekwencjonowanie nici sens i antysens. Przykładowy fluorogram przedstawiający mutację w kodonie 12 i 13 genu *K-RAS*. WT — postać prawidłowa

Figure 5. Direct sequencing of a sense and antisense strand. An example of a fluorogram of mutation in codon 12 and 13 *K-RAS*. WT — wild type

zawierających mutacje w kodonie 12 w kilku dodatkowych próbkach (nr 1, 3, 4, 5, 9, 10, 20). Obecność mutacji w tych próbkach ujawniono dopiero po zastosowaniu drugiego etapu PCR i ponownym trawieniu restrykcyjnym. Na podstawie tych danych można wnioskować, że w co najmniej kilku przypadkach istnieją niewielkie populacje komórek ze zmutowanym kodonem 12 w populacji komórek bez mutacji lub z mutacją w innym kodonie. Wielkość frakcji komórek z mutacją jest jednak zbyt mała, aby ich obecność można było wykazać mniej czułymi metodami, takimi jak SSCP, DHPLC czy bezpośrednie sekwencjonowanie. Metoda gniazdowego PCR/RFLP okazała się więc najbardziej czułą ze wszystkich zastosowanych technik. Dodatkowo obecność komórek ze zmianami w kodonie 12 potwierdzono poprzez sekwencjonowanie produktu wyciętego z żelu (ryc. 2).

Ponadto w próbkach nr 4 i 5 wykazano obecność dwóch populacji zmutowanych komórek. W próbce nr 5, poza klonem (zawierającym mutację G12V) zidentyfikowanym za pomocą innych metod, wykryto klon z mutacją G12D. Natomiast w przypadku próbki nr 4, gdzie do-

minował klon komórek G13D, zidentyfikowano również komórki z jednoczesną mutacją w kodonie 12 i 13 (G12S i G13D). Wykrycie mutacji w kodonie 13 z zastosowaniem wykorzystanej w tej pracy metody PCR/RFLP jest możliwe jedynie wtedy, gdy występuje ona równocześnie z mutacją w kodonie 12. Obecność klonów zawierających dwie mutacje wykazano również w innych pracach [5]. Obecność dwóch klonów potwierdzono przez sekwencjonowanie prążka po drugim trawieniu restrykcyjnym. Na podstawie zebranych danych nie można wykluczyć, że w preparacie, z którego izolowano DNA, obecne są dwa klony: jeden z mutacją w kodonie 13, a drugi z mutacją w kodonach 12 i 13. Na podstawie powyższych danych można wnioskować, że zastosowanie gniazdowego PCR/RFLP w rutynowej diagnostyce stanowi utrudnienie i przysparza problemów z interpretacją wyniku. Tak duża czułość może prowadzić do wykrywania niewielkich populacji komórek z mutacją w guzie składającym się głównie z komórek bez mutacji. W takim przypadku nie należy pozbawiać pacjenta dodatkowej możliwości leczenia. Podsumowując, w przypadku metody gniazdowego PCR/RFLP naj-

bardziej poprawne wydaje się stosowanie 1-etapowego jej wariantu. Natomiast ze względu na obecność znacznego odsetka mutacji w kodonie 13 w wypadku raka jelita grubego sposób ten powinien być uzupełniony o dowolną inną metodę wykrywającą mutacje w obu eksonach. Autorzy niniejszej pracy zalecają jako optymalne rozwiązanie dodanie metody sekwencjonowania do metody PCR/RFLP.

Zespoły stosujące SSCP w oznaczaniu mutacji w genie *K-RAS* potwierdziły, że metoda ta może być wykorzystywana do badania przesiewowego, ale trzeba pamiętać, że cechuje ją ograniczona czułość. Oba zespoły: warszawski (ZPM) i krakowski (KPCM) wykryły 7 spośród 8 zmian. Znacznie bardziej precyzyjna okazała się metoda DHPLC. Stosujący tę technikę zespół gdański wykrył wszystkie 8 mutacji. Dodatkowo miejsce zmiany zweryfikowano poprzez sekwencjonowanie produktu rozdziału.

Reakcja bezpośredniego sekwencjonowania jest techniką najlepiej obrazującą występowanie zmian w 12 i 13 kodonie genu *K-RAS* i umożliwiającą dokładne opisanie zmiany z uwzględnieniem nukleotydowego wariantu mutacji. Należy jednak uwzględnić fakt, że produkty uzyskane po amplifikacji materiału wyizolowanego z parafiny przeznaczone do sekwencjonowania nie powinny przekraczać 200 pz. Jest to istotne, gdyż jakość preparatów parafinowych, na którą laboratorium diagnostyczne nie ma wpływu, może być bardzo niska. Objawia się to brakiem amplifikacji lub brakiem możliwości przeanalizowania wyniku sekwencjonowania ze względu na bardzo wysokie, niespecyficzne tło (będące wynikiem degradacji DNA). Ponadto należy pamiętać, że klony komórek z mutacjami w 12 i 13 kodonie mogą występować w małej ilości, co objawia się obecnością niewielkich pików na fluorografie sekwencji słabo wyróżniających się z tła (sygnał z komórek z mutacją jest zdominowany przez sygnał z komórek nowotworowych bez mutacji lub komórek zdrowej tkanki obecnych w preparacie) (ryc. 5). Dlatego sekwencjonowanie obu nici sensownej i antysensownej wydaje się najwłaściwsze w przypadkach, gdy klon zawierający mutację występuje w niewielkiej ilości.

Reakcja bezpośredniego sekwencjonowania nie jest tak czuła jak technika gniazdowego PCR/RFLP. Jednak ze względów opisanych powyżej (idealne obrazowanie molekularne, ryzyko zbyt dużej czułości) jest techniką dobrze nadającą się do oznaczania mutacji w *K-RAS*.

## Podsumowanie

Wszystkie jednostki uczestniczące w procesie walidacji w końcowym efekcie w sposób prawidłowy oznaczyły status genu *K-RAS* we wszystkich 20 preparatach DNA. W praktyce oznacza to, że są one odpowiednio przygo-

towane do tego, aby podjąć działalność diagnostyczną w zakresie oznaczania statusu genu *K-RAS*. Proces walidacji ujawnił jednak potrzebę uwiarygodnienia stosowanych w diagnostyce molekularnej procedur. Okazało się, że nawet jeżeli w badaniach naukowych powszechnie wykorzystuje się metody molekularne, to stosowane procedury nie są na tyle ujednoczone, aby możliwe było ich wykorzystanie w rutynowej diagnostyce klinicznej. Wynikiem przeprowadzonego procesu walidacji są następujące zalecenia dla laboratoriów diagnostycznych:

- materiał do izolacji DNA powinien zawierać nie mniej niż 70% utkania nowotworowego. W przypadku izolacji materiału z bloczków parafinowych patolog powinien ocenić preparat, zanim jego skrawki przekaże się do izolacji (w celu uzyskania jak najlepszego preparatu do analizy optymalne jest użycie mikrodissektora, jednak koszt aparatu i jego dostępność uniemożliwia zalecenie takiej metody. Inną metodą jest wydlubywanie materiału z bloczku parafinowego. Ponieważ jest to niszczenie materiału biologicznego, również nie może być przyjęte jako zalecana procedura);
- powinno się ujednoczyć procedury izolacji DNA ze skrawków parafinowych. W tym celu zaleca się skorzystanie z gotowego zestawu do izolacji DNA ze skrawków parafinowych;
- w przypadku braku jednoznacznego wyniku, uwzględniając czułość i precyzję stosowanych metod, powinno się wykorzystać dwie metody oznaczania mutacji. Stosując zasady dobrej praktyki laboratoryjnej, zaleca się, aby jednego z wykonywanych oznaczeń dokonywano przy wykorzystaniu metody sekwencjonowania bezpośredniego przynajmniej z jednej nici — oprócz metody PCR/RFLP, SSCP lub DHPLC.

## Podziękowania

Autorzy pragną wyrazić podziękowanie firmie Amgen Sp. z o.o. za inicjatywę przeprowadzenia procesu walidacji i pokrycie jego kosztów.

## Piśmiennictwo

1. Siedlecki J.A. Choroby nowotworowe. W: Bal J. (red.). Biologia molekularna w medycynie: Elementy genetyki klinicznej. Wydawnictwa naukowe PWN, 2006: 336–397.
2. Hynes N.E., Lane H.A. ERBB receptors and cancer: Complexity of targeted inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* 2005; 5: 341–354.
3. Kumar A., Petri E.T., Halmos B. i wsp. Structure and clinical relevance of the epidermal growth factor receptor in human cancer. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26:1742–1751.
4. Schubert S., Shannon K., Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nature Rev.* 2007; 7: 295–308.

5. Capella G., Cronauer-Mitra S., Peinado M.G., Perucho M. Frequency and Spectrum of Mutations at Codons 12 and 13 of the C-K-RAS. In Gene in Human Tumors. The National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) 1991.
6. Bos J.L. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 1989; 49:4682–4689.
7. Bazan V., Migliavacca M., Zanna I. i wsp. A 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: 1438–1446.
8. Senagore A.J., Biener J.T. A newly identified pattern of K-RAS mutations at codons 12 and 13 is associated with long-term survival in colorectal cancer. *Surgery* 1997; 122: 765–770.
9. Helbig G., Hołowiecki J. Droga sygnałowa RAS jako cel działania inhibitorów transferazy farnesyli — nowe, obiecujące możliwości leczenia chorób nowotworowych. *Wiad. Lek.* 2004; LVII: 9–10.
10. Didkowska J., Wojciechowska U., Tarkowski W., Zatoński W. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2005 roku. Wydawnictwo Centrum Onkologii — Instytut, Warszawa 2007.
11. Baselga J., Rosen N. Determinants of RASistance to anti-epidermal growth factor receptor agents. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26: 1582–1584.
12. Amado R.G., Wolf M., Peeters M., Van Cutsem E. i wsp. Wild type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26: 1626–1634.
13. Lievre A., Bachet J.B., Boige V. i wsp. KRAS mutation as an independent prognostic factor in patients in advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26: 374–379.
14. Lièvre A., Bachet J.B., Le Corre D. i wsp. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* 2006; 66: 3992–3995.
15. Garcia-Rostan G., Zhao H., Camp R.L. i wsp. RAS mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer. *J. Clin. Oncol.* 2003; 21: 3226–3235.
16. Lièvre A., Laurent-Puig P. Predictive factors of response to anti-EGFR treatments in colorectal cancer. *Bull. Cancer* 2008; 95: 133–140.
17. 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: 1166–1169.
18. De Roock W., Piessevaux H., De Schutter J. i wsp. KRAS wild type state predict survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann. Oncol.* 2008; 19: 508–515.
19. Benerjee S.K., Makdisi W.F., Weston A.P. i wsp. Two step enriched-nested PCR technique enhances sensitivity for detection of codon 12 K-ras mutations in pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 1997; 15: 16–24.