Značajnost određivanja mutacija gena KRAS i BRAF u bolesnika s karcinomom debelog crijeva

Rako, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:423924

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

UNIVERSITY OF ZAGREB
FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Ivana Rako

SIGNIFICANCE OF *KRAS* AND *BRAF* MUTATION TESTING IN COLORECTAL CANCER PATIENTS

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2012.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

IVANA RAKO

ZNAČAJNOST ODREĐIVANJA MUTACIJA GENA *KRAS* I *BRAF* U BOLESNIKA S KARCINOMOM DEBELOG CRIJEVA

DOKTORSKI RAD

Mentor: Prof. dr. sc. Jadranka Sertić

Zagreb, 2012.

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija.

Rad je izrađen u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkoga bolničkog centra Zagreb.

Zahvaljujem svima koji su stručno i financijski doprinjeli izradi moje doktorske disertacije.

Posvećujem je noni koja je umrla od raka debelog crijeva u 86. godini života.

" Meni je dovoljan misterij vječnosti života i svijesti, i naslućivanje o čudesnoj građi postojanja kao i odano stremljenje prema shvaćanju makar i posve sićušnog dijela razumnosti koja se izražava u prirodi ".

Albert Einstein ('Moj pogled na svijet')

SAŽETAK

Uvod. Učestalost i smrtnost od karcinoma debelog crijeva u stalnom je porastu i zato je ova bolest vodeći zdravstveni problem u svijetu i u Hrvatskoj. Nastaje složenim procesom tijekom kojeg dolazi do uzastopnih promjena u tumor supresorskim genima, onkogenima i genima za popravak krivo sparenih baza. Karcinom debelog crijeva može se pojaviti sporadično ili kao nasljedni oblik; u oba slučaja radi se o vrlo heterogenoj skupini zloćudnih tumora. Geni *KRAS* i *BRAF* spadaju u skupinu onkogena. Njihovi produkti posreduju u prijenosu signala od receptora za epidermalni čimbenik rasta (EGFR) na unutarstanične mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK), te na taj način sudjeluju u kontroli staničnog ciklusa. Najčešće promjene ovih gena su točkaste mutacije. Događaju se u dobroćudnoj fazi nastanka karcinoma debelog i završnog crijeva i odgovorne su za klinički značajan rast tumora. Cilj ovog rada je odrediti učestalost i vrstu mutacija gena *KRAS* i *BRAF* u uzorcima karcinoma debelog i završnog crijeva te ispitati da li postoji povezanost mutacija s patohistološkim pokazateljima lošije prognoze bolesti. **Materijali i metode.** U istraživanje je uključeno 113 arhivskih uzoraka (tkiva fiksirana u formalinu i uklopljena u parafin) karcinoma debelog i završnog crijeva osoba koje boluju od te bolesti, operiranih u razdoblju od 2009. do 2011. godine u KBC-u Zagreb. Za izdvajanje DNA korišteno je 6-10 rezova debljine 10 mikrometara svakog pojedinog tkiva. Sedam najčešćih točkastih mutacija gena *KRAS* (p.G12A, p.G12D, p.G12V, p.G12R, p.G12C, p.G12S, p.G13D) određeno je metodom kvantitativnog PCR u stvarnom vremenu, a jedna mutacija gena *BRAF* (p.V600E) metodom PCR u stvarnom vremenu uz analizu krivulje taljenja. Za svakog bolesnika prikupljeni su podaci o dobi, spolu, veličini tumora, histološkom gradusu tumora, stadiju po Dukes'u, angioinvaziji i smještaju tumora. Usporedba učestalosti mutacija u uzorcima podijeljenim po skupinama učinjena je Fisherovim testom, statističkom obradom podataka u programu MedCalc v9.3.2.0. **Rezultati.** Mutacije gena *KRAS* dokazane su u 39,8% uzoraka, a najčešće je dokazana mutacija p.G12V (42,2% uzoraka). Tranzicije i transverzije bile su podjednako zastupljene. Mutacija p.V600E gena *BRAF* dokazana je u 8,8% uzoraka i to isključivo u uzorcima s nemutiranim genom *KRAS*. Učestalost mutacija gena *BRAF* bila je viša u loše diferenciranim tumorima i tumorima klasificiranim u stadij bolesti Dukes'C ($p = 0,04$). Sve mutacije gena *BRAF* dokazane su u karcinomima debelog crijeva ($p = 0,01$). **Zaključak.** Učestalost mutacija gena *KRAS* i *BRAF* u populaciji bolesnika s karcinomom debelog i završnog crijeva iz Hrvatske nalazi se unutar granica prijavljene učestalosti istih mutacija u drugim populacijama svijeta. Ističe se visok udio mutacije p.G12V koja se povezuje s najlošijom prognozom bolesti, što bi se moglo povezati s kontinuirano visokom smrtnošću od ove bolesti u Hrvatskoj. Viša učestalost mutacija gena *BRAF* u tumorima lošije prognoze upućuje na njihovu ulogu u napredovanju bolesti.

Ključne riječi: *KRAS*, *BRAF*, točkaste mutacije, karcinom debelog i završnog crijeva, kliničko-patohistološke osobitosti, prognoza bolesti

SUMMARY

Introduction. Incidence and mortality of colorectal cancer are on constant increase and represent one of the major health problems in the world as well as in Croatia. The development of colon cancer is a multistep process which involves successive genetic alterations of tumor supressor genes, oncogenes and mismatch repair genes. Colon cancer can arise as sporadic or familial hereditary colon cancer, representing in both cases a very heterogeneous group of malignant tumors. *KRAS* and *BRAF* genes are oncogenes. Their products mediate and control cellular responses through mitogen activating protein kinase signal pathway (MAPK), downstream of epidermal growth factor receptor (EGFR). The most common activating mutations of these oncogenes are point mutations. They arise early during the development of colorectal cancer and are associated with the clinically significant tumor growth. The aim of this study was to determine the incidence of *KRAS* and *BRAF* gene mutations in colorectal cancer patients in Croatia and to assess whether they are linked with clinicopathological features of poor prognosis. **Materials and methods.** A total of 113 consecutive colorectal cancer patients were included in this research. They were operated on 2009-2011 period at University Hospital Center Zagreb. Resected tumor samples were formalin fixed and paraffin embedded and prepared for DNA extraction as four to six 10-μm sections. Seven common point mutations of *KRAS* gene (p.G12A, p.G12D, p.G12V, p.G12R, p.G12C, p.G12S, p.G13D) were identified using quantitative real-time PCR, and the most common mutation of *BRAF* gene (p.V600E) was detected using *real-time* PCR by fluorescence melting curve analysis. Clinical and pathological data such as age, sex, tumor size, histologic grade, Dukes'stage, angioinvasion and tumor position were collected for each patient. Differences in clinical and pathological variables between the groups of patients with and without *BRAF* and *KRAS* mutations were analyzed using Fisher exact tests performed using MedCalc v9.3.2.0. **Results.** *KRAS* gene mutations were detected in 39.8% samples, and the most frequent mutation was p.G12V detected in 42.2% positive samples. Transitions and transversions were equally present. *BRAF* gene mutation p.V600E was detected in 8.8% samples, exclusively in tumors without *KRAS* mutations. Incidence of *BRAF* gene mutation was higher in poor differentiated and Dukes'C tumors ($p = 0.04$). All *BRAF* gene mutations were detected in colon cancers ($p = 0.01$). **Conclusion.** The incidence of *KRAS* and *BRAF* gene mutations in colorectal cancer patients from Croatia is within commonly accepted limits. High percentage of p.G12V aggressive mutation can be related to high mortality from colorectal cancer in Croatia. High incidence of *BRAF* gene mutations in tumors with poor prognostic markers shows that *BRAF* mutations play a role in the progression of this disease.

Key words: *KRAS*, *BRAF*, point mutations, colorectal cancer, clinicopathological features, tumor prognosis

POPIS KRATICA

Kratica	Značenje
CRC	Karcinom debelog i završnog crijeva (engl. *colorectal cancer*)
KRAS	Gen (engl. *Kirsten rat sarcoma virus)*
BRAF	Gen (engl. *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*)
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organisation*)
FOBT	Test na okultno krvarenje u stolici (engl. *fecal ocult blood test*)
TNM	Klasifikacija karcinoma debelog i završnog crijeva prema proširenosti tumora (engl. *tumor, node, metastases*)
MMR	Popravak krivo sparenih baza (engl. *mismatch repair*)
APC	Gen (engl. *adenomatous polyposis coli)*
FAP	Obiteljska adenomatozna polipoza (engl. *familial adenomatous polyposis*)
c-Myc	Gen (engl. *myelocytomatosis oncogene*),
CCND1	Gen (engl. *G1/S-specific cyclin-D1*)
PPARβ/δ	Gen (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor β/δ*)
AK	Aminokiselina
pb	Parovi baza
MAPK	Mitogenom aktivirane protein kinaze
DCC	Gen (engl. *deleted in colorectal cancer)*
DPC4	Gen (engl. *deleted in pancreatic carcinoma)*
SMAD2	*Gen* (engl. *mothers against decapentaplegic homolog 2*)
TGF-β	Transformirajući čimbenik rasta (engl. *transforming growth factor-β)*
LOH	Gubitak heterozigotnosti (engl. *loss of heterozygosity*)
nm23	Gen (engl. *non-metastatic cells 1 protein NM23A*)
CDH1	Gen (engl. *epithelial cadherin*)
PTEN	Gen (engl. *phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase*)
PI3K	Gen (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*)
BAX	Gen (engl. *Bcl-2–associated X protein*)
HNPCC	Nasljedni nepolipozni karcinom debelog i završnog crijeva (engl. *hereditary non-poliposis colon cancer*)
HNPPE	polipurinski i polipirimidinski elementi jako osjetljivi na nukleazu engl. *nuclease hypersensitive polypurine-polypyrimidine element*
SCLC	Karcinom malih stanica pluća (engl. *small cell lung carcinoma*)
GTP/GDP	Gvanozin - tri(di)fosfat (engl. *guanosine tri(di)phosphates*)
GAP	GTP-aza aktivirajući proteini (engl. *GTP-ase activating proteins*)
GEF/GRF	Čimbenici izmjene / otpuštanja gvanina engl. *guanine exchanging / releasing factors)*
MSV	Mišji sarkoma virus (engl. *mouse sarcoma virus*)
CRD	Domena bogata cisteinom (engl. *cysteine rich domain*)
RBD	Domena za koju se veže protein RAS (engl. *RAS binding domain*)
EGFR	Receptor za epidermalni čimbenik rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*)
HER	Receptor za humani epidermalni čimbenik rasta (engl. *human*

	epidermal growth factor receptor)
ERK	Kinaze regulirane pomoću izvanstaničnih signala (engl. *extracellular signal-regulated kinase*
GRB	Protein koji se veže za receptor faktora rasta (engl. *growth factor receptor bound protein*)
FFPE	Fiksirano u formalin i uklopljeno u parafin (engl. *formalin fixed paraffin embedded*
ARMS	Sustav za umnažanje mutiranog slijeda (engl. *amplification refractory mutation system*)
WT	Divlji tip (engl. *wild type*)
PCR	Lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)
DNA	Deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxiribonucleic acid*)
Ct	Prag ciklusa (engl. *cycle treshold*)
NTC	Negativna kontrola (engl. *negative control*)
HEG	Heksaetilenglikol
FMCA	Analiza fluorescencije krivulje taljenja (engl. *fluorescence melting curve analysis*)
Tm	Temperatura mekšanja (engl. *melting temperature*)
EQA	Vanjska procjena kvalitete (engl. *external quality assessment*)
SNP	Polimorfizam jedne baze (engl. *single nucleotide polymorphism*)
ASCO	Američko društvo za kliničku onkologiju (engl. *American Society for Clinical Oncology*)
NCCN	Nacionalna mreža za rak (engl. *National Comprehensive Cancer Network*
CAP	Zbor američkih patologa (engl. *College of American Pathologists*)
ESP	Europsko društvo patologa (engl. *European Society of Pathology*)
CLIA	Smjernice za poboljšanje kvalitete u kliničkom laboratoriju (engl. *Clinical Laboratory Improvement Amendments guidelines*)
REMARK	Preporuke za istraživanja prognostičkih biljega u onkologiji (engl. *Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies*)
RASCAL	Suradna skupina za Kirsten ras u kolorektalnom karcinomu (engl. *The Kirsten ras in-colorectal-cancer collaborative grou*p

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Epidemiologija karcinoma debelog crijeva 1
1.2. Etiopatogeneza karcinoma debelog crijeva 5
1.3. Patohistologija karcinoma debelog crijeva 8
1.4. Molekularna genetika karcinoma debelog crijeva 10
1.5. Onkogeni 13
1.6. Gen *KRAS* 16
1.7. Proteinski produkt gena *KRAS* i njegova uloga u stanici 18
1.8. Gen *BRAF* 21
1.9. Proteinski produkt gena *BRAF* i njegova uloga u stanici 22
1.10. Signalni put kinaza MAP preko EGFR 22
1.11. Mutacije gena *KRAS* i *BRAF* u karcinomu debelog crijeva 25
1.12. Ciljevi 28
1.12.1. Hipoteza 28
2. MATERIJALI I METODE 29
2.1. Izdvajanje genomske DNA iz tkiva tumora 29
2.2. Određivanje koncentracije DNA 31
2.3. Elektroforeza u gelu agaroze 31
2.4. Određivanje prisutnosti točkastih mutacija gena *KRAS* 32
2.4.1. Komplet reagensa za detekciju mutacija u genu *KRAS* 32
2.4.2. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu – *PCR* u stvarnom vremenu 33
2.4.3. Apsolutna kvantifikacija ukupne DNA u uzorku 34
2.4.4. Metoda analize podataka – ΔCt 40
2.4.5. Certifikat 41
2.5. Određivanje prisutnosti točkaste mutacije gena *BRAF* 41
2.5.1. Metoda *PCR* u stvarnom vremenu uz analizu krivulje taljenja 41
2.5.2. Sekvenciranje regije gena *BRAF* 44
2.6. Statistička obrada rezultata 45
3. REZULTATI 46
3.1. Patohistološke karakteristike tumora 46

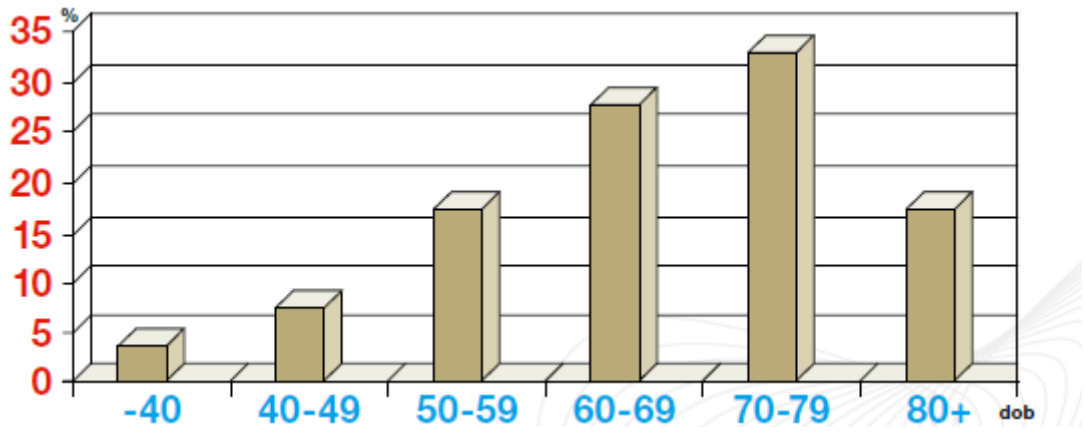
3.2. Analiza prisutnosti točkastih mutacija gena *KRAS* 50
3.2.1. Rezultati analize uzoraka na sedam točkastih mutacija gena *KRAS* – učestalost mutacija u skupini bolesnika s karcinomom debelog i završnog crijeva 52
3.2.2. Usporedba prisutnosti mutacija gena *KRAS* s dobi i spolom oboljelih osoba te kliničko-patohistološkim osobitostima tumora 52
3.3. Analiza prisutnosti točkastih mutacija gena *BRAF* 59
3.3.1. Rezultati analize uzoraka na točkastu mutaciju p.Val600Glu gena *BRAF* 60
3.3.2. Usporedba prisutnosti mutacija gena *BRAF* sa spolom i dobi oboljelih osoba i kliničko-patohistološkim osobitostima tumora 61
4. RASPRAVA 68
4.1. Prediktivna vrijednost gena *KRAS* i *BRAF* u karcinomu debelog crijeva 69
4.2. Standardizacija postupka određivanja mutacija gena *KRAS* i *BRAF* 70
4.2.1. Predanalitička faza: važnost patologa 71
4.2.2. Analitička faza: važnost metode 72
4.2.3. Postanalitička faza: važnost pravilnog izvještavanja o rezultatima 74
4.3. Učestalost i vrsta mutacija gena *KRAS* i *BRAF* u karcinomu debelog crijeva 74
4.4. Povezanost mutacija gena *KRAS* i *BRAF* s prognozom bolesti 77
5. ZAKLJUČCI 82
6. LITERATURA 83
7. ŽIVOTOPIS 96

1. UVOD

1.1. Epidemiologija karcinoma debelog crijeva

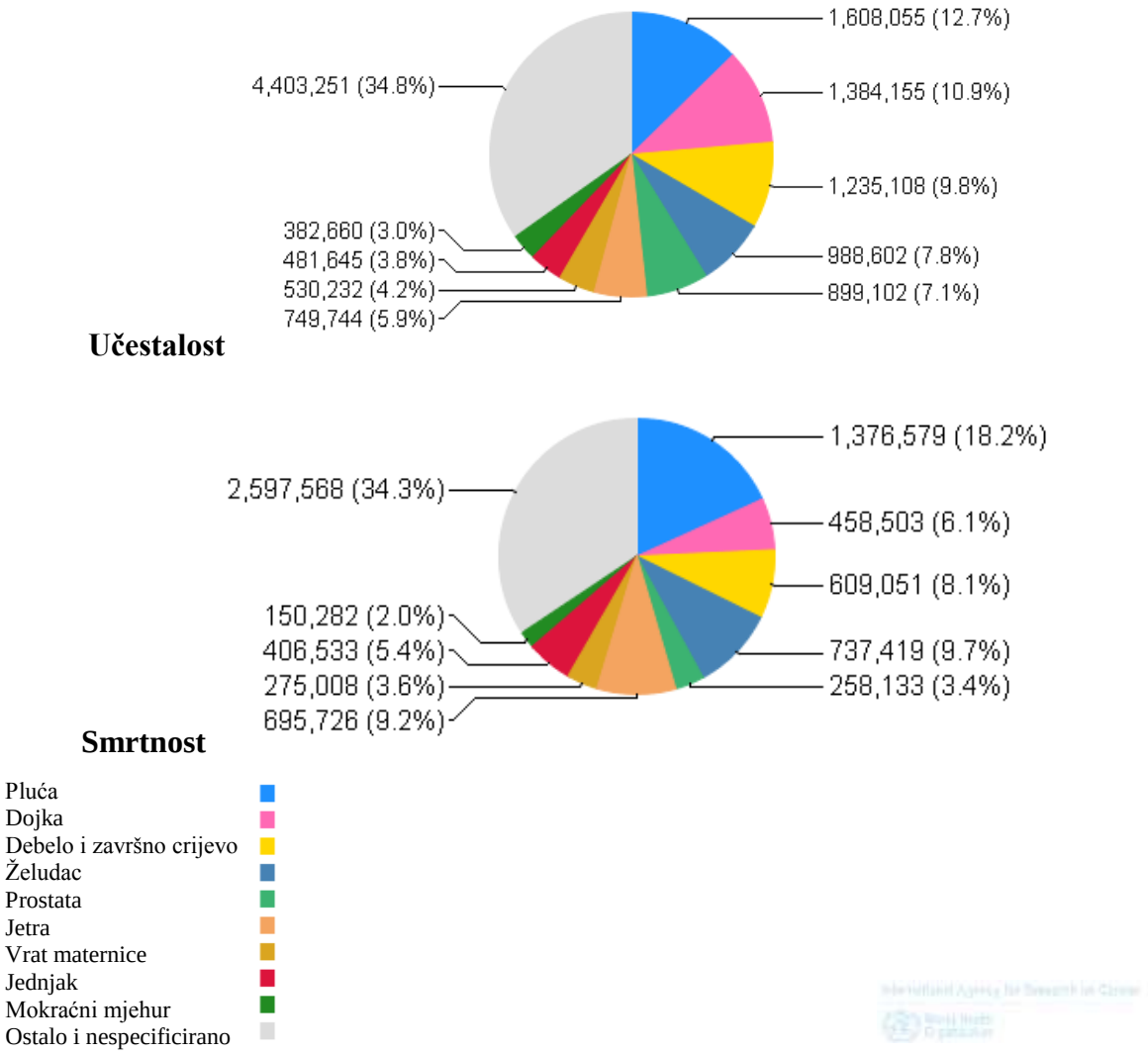
U razvijenim zemljama svijeta od ukupnog broja umrlih u jednoj godini otprilike polovicu čini smrtnost uzrokovana bolestima srca i krvožilnog sustava, oko četvrtinu karcinomima, a preostalu četvrtinu ostalim uzrocima. Od ukupnog broja svih godišnje dijagnosticiranih karcinoma u svijetu, karcinomi probavnog sustava su na vodećoj poziciji. Među njima najvišu pojavnost ima karcinom debelog i završnog crijeva (kolorektalni karcinom, CRC), što ga svrstava među vodeće zdravstvene probleme kako u svijetu tako i u Hrvatskoj (1).

Učestalost ovog oblika karcinoma ima zabrinjavajući trend porsta u populaciji iznad 50 godina starosti. Rizik od obolijevanja raste nakon 40. godine života, a 90% svih slučajeva otkrije se iza 50. godine života (slika 1.1). Vrhunac pojavnosti CRC je između 65. i 70. godine života, a češće se javlja u muškaraca (2).



Slika 1.1. Dob bolesnika u trenutku postavljanja dijagnoze karcinoma debelog crijeva. Prema Nacionalnom programu ranog otkrivanja raka debelog crijeva 2007 (2)

Prema epidemiološkim podacima Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO) za 2008. godinu, broj novooboljelih od karcinoma debelog crijeva u svijetu je 1.235.108, a broj umrlih 609.051, zbog čega se CRC ubraja u najučestalije zloćudne tumore suvremenog čovjeka (3). Ovi podaci prikazani su na slici 1.2.



Slika 1.2. Prikaz ukupnog broja i zastupljenosti (%) prema sijelima raka novodijagnosticiranih bolesnika (učestalost) i umrlih osoba (smrtnost) u ukupnoj svjetskoj populaciji za 2008. godinu; prema GLOBOCAN 2008 (3)

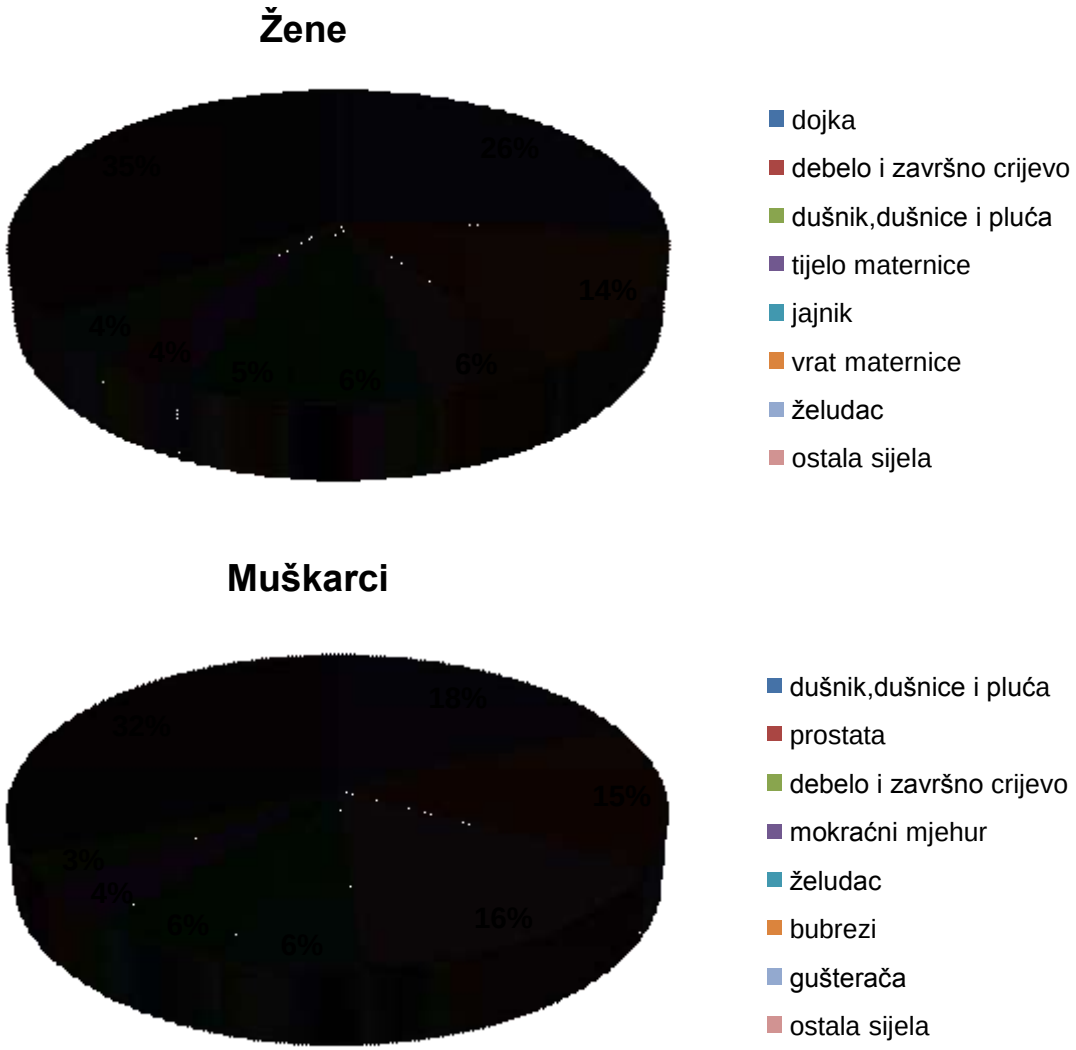
Oko 60% slučajeva karcinoma debelog crijeva pojavljuje se u razvijenim zemljama svijeta. U različitim zemljama broj novooboljelih muškaraca i žena razlikuje se i do 10 puta za oba spola. Procijenjeno je da je najveća učestalost u Australiji/Novom Zelandu i Zapadnoj Europi, najniža u Africi (osim Južne Afrike) te južnoj i središnjoj Aziji, dok je umjerena u Latinskoj Americi (3). Na ljestvici deset najučestalijih uzroka smrti u razvijenim zemljama, karcinom debelog i završnog crijeva je na sedmom mjestu (4).

U našoj zemlji situacija je slična kao i u svijetu. Prema podacima Registra za rak Republike Hrvatske, karcinom debelog i završnog crijeva je drugo najčešće mjesto pojave raka u muškaraca (iza raka pluća) i u žena (iza raka dojke). Pet najčešćih mjesta pojave raka u žena su: dojka (26%), debelo crijevo (8%), završno crijevo, sigmoidno crijevo i čmar (6%),

tijelo maternice (6%) i dušnik, dušnice i pluća (6%), što čini ukupno 52% novooboljelih žena. Pet najčešćih mjesta pojave raka u muškaraca su: dušnik, dušnice i pluća (18%), prostata (15%), debelo crijevo (9%), završno crijevo, sigmoidno crijevo i čmar (7%) i mokraćni mjehur (6%), što čini ukupno 55% novooboljelih muškaraca. Debelo, završno, sigmoidno crijevo i čmar javljaju se, zajedno, učestalošću od 16% kod muškaraca i 14% kod žena. Podaci o učestalosti karcinoma debelog i završnog crijeva u odnosu na druge karcinome za 2008. godinu prikazani su na slici 1.3.

Pojavnost i smrtnost u stalnom su porastu, iako smrtnost raste sporije. Broj novih slučajeva karcinoma debelog crijeva povećao se od 1978. do 2008. godine s 1.103 na 3.074 slučaja godišnje, a u tom je razdoblju stopa na 100.000 stanovnika porasla s 21,8 na 69,3. Broj umrlih od ovog tipa tumora povećao se u razdoblju od 1978. do 2008. godine s 668 na 1.8 slučajeva godišnje, a stopa na 100.000 stanovnika s 14,5 na 42,1 (5). Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo i Registra za rak Republike Hrvatske, godišnje u Hrvatskoj oboli oko 3.000 osoba, dok ih oko 1.800 umre. U tablici 1.1. prikazana je pojavnost, učestalost i smrtnost od karcinoma debelog i završnog crijeva u Hrvatskoj u 2008. godini (6).

Unatoč ogromnim naporima koje suvremena medicinska znanost ulaže u dijagnostiku i liječenje oboljelih od malignoma, stopa preživljavanja bolesnika s uznapredovalim stadijem bolesti nije se značajno promijenila te se posebice naglašava važnost primarne prevencije (uklanjanje rizičnih čimbenika) i sekundarne prevencije (rana dijagnostika i liječenje) (7,8). Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi Republike Hrvatske pokrenulo je Nacionalni program probira za rano otkrivanje raka debelog crijeva (od kraja 2007. godine). Koordinatori Zavoda za javno zdravstvo obavezni su osigurati provođenje Programa obavljanjem testiranja na skriveno krvarenje u stolici (engl. *Fecal occult blood test*, FOBT), nakon čega se u svih pozitivnih osoba dogovara kolonoskopija. Do kraja 2010. godine testiranju se odazvalo svega 19,3% pozvanih osoba, a probirom je otkrivena 451 osoba (5,9% FOBT pozitivnih osoba). Nažalost, u Hrvatskoj se manje od 10% karcinoma debelog crijeva otkriva u lokaliziranom stadiju bolesti i to je osnovni razlog za kontinuirano visoku smrtnost od ove bolesti (2).



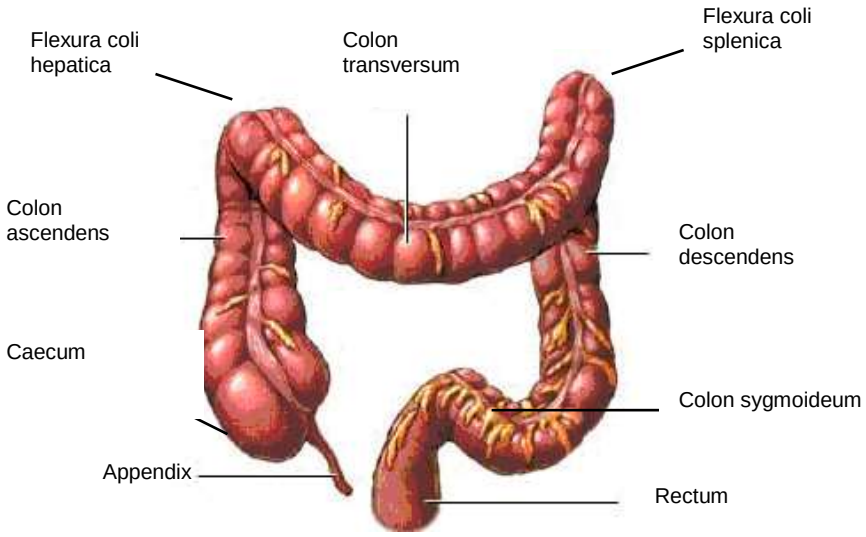
Slika 1.3. Prikaz učestalosti najčešćih sijela raka u muškaraca i žena u novodijagnosticiranih bolesnika u Hrvatskoj za 2008. godinu; prema Bilten br.33, 2008 (6)

Tablica 1.1. Brojnost, učestalost i smrtnost od karcinoma debelog crijeva u Hrvatskoj u 2008. godini (6)

	Ukupno	**Muškarci**	**Žene**
Broj novootkrivenih CRC u Republici Hrvatskoj	3.074	1.819	1.255
Udio CRC u ukupnom broju svih novootkrivenih karcinoma	15%	16%	14%
Učestalost novootkrivenih CRC na 100.000 stanovnika	69,3	85,1	54,5
Broj osoba umrlih od CRC u RH	1.855	1.052	803
Udio umrlih od CRC u ukupnoj smrtnosti od svih karcinoma	14%	14%	14%

1.2. Etiopatogeneza karcinoma debelog crijeva

Debelo crijevo predstavlja završni dio probavnog sustava, duljine je oko 150 centimetara i dijeli se na debelo i završno crijevo (slika 1.4). Debelo crijevo počinje slijepim crijevom (lat. *Appendix*) koje se nalazi ispod ileocekalne valvule u donjem desnom kvadrantu (lat. *Caekum*). Uzlazni dio debelog crijeva (lat. *Colon ascendens*) proteže se od ileocekalne valvule do desne fleksure (lat. *flexura coli hepatica*), a odatle počinje poprečni dio debelog crijeva (lat. *Colon transversum*), koji završava na lijevoj fleksuri (lat. *flexura coli splenica*); silazni dio debelog crijeva (lat. *Colon descendens*) završava u lijevom donjem kvadrantu. Sigmoidalni dio debelog crijeva (lat. *Colon sigmoideum*) dopire do ulaza u malu zdjelicu gdje postupno prelazi u završni dio, tzv. ravno (završno) crijevo (lat. *Rectum*). Prijelaz sigmoidnog kolona u rektum naziva se rektosigmoidni prijelaz. Završno crijevo, duljine je 8 do 15 cm, leži u maloj zdjelici i u bliskom je odnosu s mokraćnim mjehurom i prostatom u muškaraca te rodnicom i tijelom maternice u žena. Završno crijevo završava analnim kanalom (lat. *Canalis analis*) (9) .



Slika 1.4. Osnovni anatomski dijelovi debelog crijeva. Prema Anatomskom atlasu 2011 (9)

Karcinom može nastati u proksimalnom dijelu debelog crijeva (slijepo crijevo i uzlazni dio debelog crijeva - 15%), glavnom dijelu debelog crijeva (poprečni dio - 10%, silaznom dijelu - 5%, sigmoidnom crijevu - 25%) ili najčešće u donjem dijelu debelog crijeva (završno crijevo i čmar - 45%). Patofiziološki, u 95% slučajeva bolest nastaje zbog zloćudne preobrazbe stanica žljezdanog epitela sluznice debelog crijeva (adenokarcinom). Rjeđe su zloćudnoj preobrazbi podložne stanice pločastog epitela (planocelularni i miješani tip tumora - adenoskvamozni karcinom (2%), a iznimno se rijetko javljaju limfom (1,3%), sarkom (0,3%) i karcinoid crijeva (0,1%) (10).

Karcinom debelog crijeva može se pojaviti sporadično ili kao nasljedni karcinom; u oba slučaja radi se o fenotipski i genotipski vrlo heterogenoj skupini zloćudnih tumora (11,12). Zbog velikog utjecaja vanjskih čimbenika na njegov nastanak i razvoj (prehrana, stil života) najveći broj karcinoma debelog crijeva javlja se u sporadičnom obliku (80%), dok na nastanak ovih karcinoma do 20% utječu nasljedni čimbenici (13).

Prehrambene navike imaju veliko značenje u nastanku ove bolesti i mogu razjasniti razliku u pojavnosti CRC (engl. *colorectal cancer*) u različitim zemljama svijeta. U različitim područjima sadržaj lipida u hrani jako varira te je tako i dokazana povezanost pojave karcinoma debelog crijeva i konzumiranja veće količine crvenog mesa (14). Brojne su studije potvrdile povezanost nastanka karcinoma i prehrane koja sadrži velike količine životinjske masti i mesa. Povećana količina životinjskih masti dovodi do pojačanog lučenja žučnih kiselina koje se u prisutnosti crijevnih bakterija razgrađuju. To vjerojatno dovodi do stvaranja karcinogenih tvari od kojih su do danas otkriveni fekapenteni, 3-ketosteroidi, produkti pirolize, žučne kiseline i drugi (15). S druge strane, visoki udio ribe u prehrani smanjuje rizik

od nastanka ovog tumora (16). Prevencija razvitka ovog tumora u izravnoj je vezi s njegovom etiologijom, stoga prehrana koja sadrži mnogo vlakana (celuloze) djeluje preventivno jer ne dolazi do lučenja žučnih kiselina, a veća masa stolice i brža peristaltika razrjeđuju karcinogene i sprječavaju dugotrajniji dodir sa sluznicom debelog crijeva (17). Neka su istraživanja pokazala da vitamin D može smanjiti rizik razvitka karcinoma debelog crijeva povezanog s prehranom koja sadrži visoki udio masti (18). Prehrana bogata svježim voćem i povrćem osigurava unošenje folata (u vodi topljivi vitamin B) koji su važni za metilaciju DNA, njenu sintezu i replikaciju, kao i za epigenetsku regulaciju ekspresije gena (19,20). Nedostatak folata može izazvati genomsku nestabilnost i oštećen popravak DNA što doprinosi razvoju CRC (21). Mnoge su studije pokazale zaštitnu ulogu folata u nastanku karcinoma debelog crijeva. U prospektivnom istraživanju na skupini ispitanika koja je na početku istraživanja imala zajedničke značajke (kohorta) dokazano je da se dugogodišnjim (više od 15 godina) dodatnim unošenjem folata može reducirati rizik od nastanka CRC za 75% (22). U jednom ispitivanju provedenom na bolesnicima s karcinomom debelog crijeva pokazano je da dodatak 400 μg folne kiseline dnevnoj prehrani, tijekom 10 tjedana, povećava ukupnu metilaciju DNA u leukocitima (za 31%) i sluznici debelog crijeva (za 25%) (23). Unos folata u kombinaciji s genotipom ključnih enzima uključenih u metabolizam folata ima važnu ulogu u procjeni rizika obolijevanja od CRC (24). Konzumiranje alkohola spada u rizične čimbenike za razvoj karcinoma debelog crijeva i negativno utječe na apsorpciju folata u crijevima (25).

Karcinomi završnog i silaznog dijela debelog crijeva češće se pojavljuju u ranijoj životnoj dobi s tim da je karcinom završnog crijeva češći u muškaraca nego u žena svih dobnih skupina (26). U svijetu su dokazane veće razlike u učestalosti karcinoma debelog crijeva nego karcinoma završnog crijeva, što bi se moglo objasniti različitim utjecajem prehrane i načina života na rizik obolijevanja od jednog ili drugog karcinoma (26). Debljina i dijabetes mnogo su slabije povezani s povećanim rizikom razvitka karcinoma debelog nego završnog crijeva, dok je pojačana razina fizičke aktivnosti povezana s manjim rizikom razvitka karcinoma debelog crijeva, ali ne i karcinoma završnog crijeva (27,28). Uzimanje aspirina i drugih nesteroidnih protuupalnih lijekova smanjuje rizik nastanka CRC i adenomatoznih polipa za čak 50% na cijelom području debelog crijeva (29). Također, upotreba oralne kontracepcije i hormonskog nadomjesnog liječenja postmenopauzalnih žena smanjuje rizik razvitka oba tipa tumora (29).

1.3. Patohistologija karcinoma debelog crijeva

Nastanak karcinoma debelog crijeva može se prikazati pomoću histopatološki definiranih stadija razvoja tumora. Većina ovih tumora započinje kao dobroćudni adenom. Proces napredovanja adenoma prema zloćudnom karcinomu može trajati deset do petnaest godina, a poznat je pod nazivom adenom - karcinom slijed (sekvenca) (11,30).

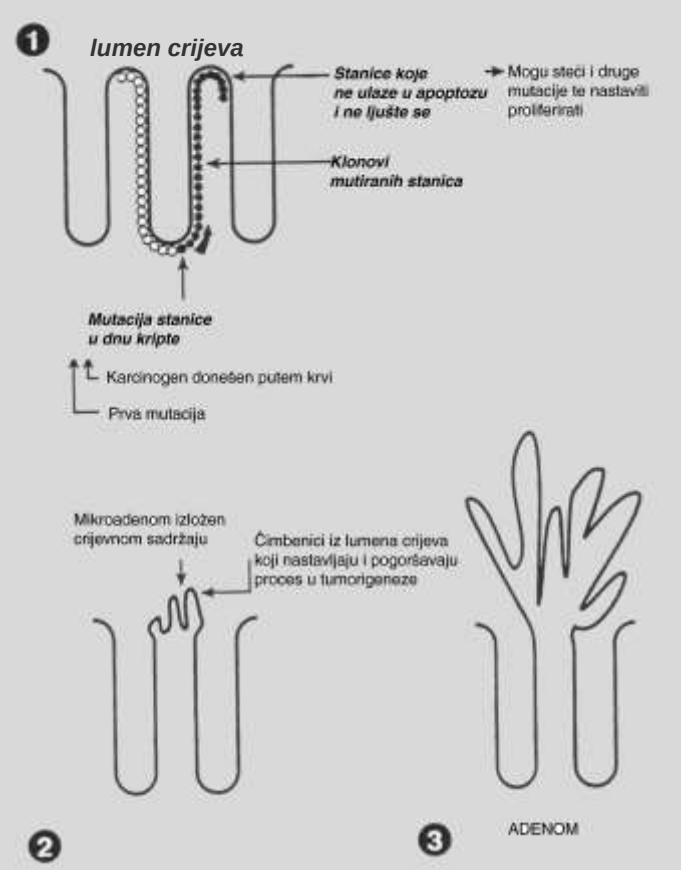
Adenomi su karakterizirani hiperproliferacijom genetički promijenjenih epitelnih stanica mukoznih žlijezda. Po definiciji su displastični, a u tom dinamičkom procesu razvijaju se od displazije niskog stupnja do displazije visokog stupnja koja napreduje prema karcinomu (30).

Karcinomi debelog crijeva nastaju kao posljedica niza genskih promjena u epitelnim stanicama sluznice debelog crijeva koje uzrokuju napredovanje procesa od hiperproliferacije sluznice preko displazije do metastatskog karcinoma. Ukupan broj genskih promjena raste s pogoršanjem histopatološke slike tumora (31).

Histološki, debelo se crijevo sastoji od sluznice, podsluznice, mišićnog sloja, subseroze i seroze. Sluznica debelog crijeva prekrivena je kriptama, a njihova mikroarhitektura ne dopušta međusobni kontakt između stanica u dnu kripti koje se dijele i crijevnog sadržaja. Tek kada se prestanu dijeliti, diferenciraju se i pomiču prema vrhu kripte. Da bi nastao adenom iz populacije genetički promijenjenih stanica, to moraju biti jako mlade stanice smještene u dnu kripte i pogođene prvom genskom promjenom. Tako dobivamo stanice promijenjenog fenotipa koje se i dalje umnažaju, što povećava mogućnost druge genske promjene. Genski promijenjene stanice sve više postaju potisnute u lumen i tako stvaraju polip ili mikroadenom (slika 1.5) (32). Za nastanak adenomatoznog polipa dovoljno je da se u normalnoj stanici epitela sluznice debelog crijeva dogodi jedna genska promjena tumor supresorskog gena *APC* (engl. *adenomatous polyposis coli*) (27).

Prvo patohistološko određivanje proširenosti CRC, koje je aktualno i danas, potječe iz 1932. godine prošlog stoljeća od američkog patologa Cuthbert Esquire Dukes'a. Ono se odnosilo na karcinom završnog crijeva, ali se danas primjenjuje na sve karcinome crijeva, a prema dubini invazije primarnog tumora i zahvaćenosti limfnih čvorova obuhvaća tri stadija bolesti: A, B i C. U stadij A svrstani su lokalizirani tumori koji su ograničeni na sluznicu i nisu probili stijenku crijeva, u stadij B tumori prošireni na cijelu stijenku koji su probili stijenku crijeva, a u stadij C tumori u kojih su nađene metastaze u limfnim čvorovima (33). Dukes'ova podjela je tijekom godina doživjela neke modifikacije te je zbog svoje jednostavnosti i očite vrijednosti u procjeni prognoze bolesti i danas u rutinskoj primjeni (34-36). Krajem sedamdesetih godina prošlog stoljeća uvedena je u kliničku praksu klasifikacija

TNM (engl. *tumor, node, metastasis*) prema kojoj se i danas određuje klinička proširenost tumora, odnosno klinički stadij bolesti (engl. *stage-ing*) (37).



Slika 1.5. Nastanak mikroadenoma u kripti na sluznici debelog crijeva (prema Jassu, preuzeto iz Potter, 1999.) (27)

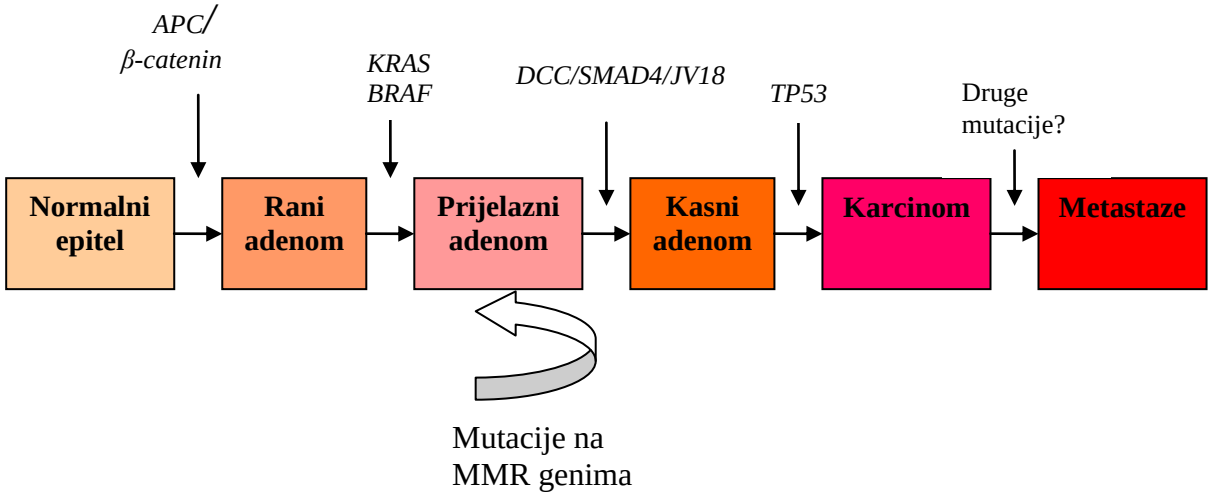
Prema očitovanju udruženja američkih patologa ("College of American Pathologists Consensus Statement") o patohistološkim karakteristikama tumora koje su u bolesnika s karcinomom debelog crijeva povezane s ishodom bolesti, prognostički biljezi su prema svojoj prognostičkoj vrijednosti svrstani u četiri kategorije (38). Danas su klasifikacija TNM i klasfikacija po Dukes'u zlatni standard u prognoziranju tijeka ove bolesti i spadaju u najjače prognostičke biljege prve kategorije zajedno s angioinvazijom i limfogenom invazijom (38,39). U prognostičke biljege druge kategorije spada stupanj diferenciranosti tumora koji se izražava kao histološki gradus (niski ili visoki) (38). Dobro do umjereno diferencirani tumori svrstavaju se u niski histološki gradus, a loše diferencirani tumori u visoki histološki gradus (38). Ako su stanice tumora slabije diferencirane, njihova je žljezdana struktura slabije izražena, a time je i zloćudni potencijal veći. Molekularni biljezi spadaju u prognostičke biljege treće kategorije, ali njihova značajnost još nije dokazana (tumor supresorski geni,

onkogeni, čimbenici rasta, receptori), dok veličina tumora spada u četvrtu kategoriju prognostičkih biljega i smatra se da nije prognostički značajna iako nedavna istraživanja dokazuju suprotno (38,40).

1.4. Molekularna genetika karcinoma debelog crijeva

Osim epidemiološkog i fiziološkog modela koji opisuju nastanak karcinoma debelog crijeva, Fearon i Vogelstein (1990) napravili su model prema kojem je nakupljanje genetičkih promjena odgovorno za uzastopno klonalno napredovanje tumora (11). To je molekularni (genetički) model koji uključuje nasljedne i stečene promjene tumor supresorskih gena, onkogena i gena za popravak krivo sparenih baza u DNA (engl. *mismatch repair genes*, geni MMR). Analiza genskih promjena u različitim histopatološkim stadijima razvitka tumora pokazala je da pojedini stadiji imaju promjene većeg broja gena (slika 1.6).

Nastanak dobroćudnog adenoma (početne lezije u karcinomu debelog crijeva) povezan je s inaktivacijom oba alela tumor supresorskog gena *APC* (41). Gen *APC* smješten je u čovjeka na položaju 5q21. Ima petnaest eksona, a njegov proteinski produkt koji se sastoji od 2.843 aminokiseline (AK) sudjeluje u regulaciji diobe, adhezije (preko β-katenina i E-kadherina) i migracije stanice. Gen *APC* je strukturno promijenjen u nasljednim i sporadičnim tumorima debelog crijeva u samom početku tumorigeneze. Nalazimo ga promijenjenog u ranim stadijima nastanka lezije na prijelazu normalne epitelne stanice u displastičnu. Njegove stečene promjene započinju većinu sporadičnih karcinoma, a nasljedne mutacije gena *APC* nađene su u oboljelih od nasljedne adenomatozne polipoze (engl. *familial adenomatous polyposis*, FAP) (42).



Slika 1.6. Prikaz ključnih genskih promjena u nastanku i napredovanju karcinoma debelog crijeva – Vogelsteinov model

Nastanak adenoma može započeti i onkogenom aktivacijom β-katenina, što dovodi do nakupljanja β-katenina u stanici te konstitutivne aktivacije signalnog puta Wnt (43,44). Aktivacija ovog signalnog puta potiče ekspresiju gena *c-Myc* (engl. *myelocytomatosis oncogene*), *CCND1* (engl. *G1/S-specific cyclin-D1*) i *PPARβ/δ* (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor β/δ*) (45). Kao posljedica toga povećava se razina odgovarajućih proteina: myc transkripcijskog čimbenika, ciklina D1 i receptora PPAR β/δ.

Daljnja klonalna ekspanzija dobroćudnih stanica tumora vezana je za mutacije gena *KRAS* i *BRAF* koji kodiraju proteine što se vežu na gvaninske nukleotide (KRAS) i citoplazmatske enzime serin/treonin kinaze (BRAF), čija povećana aktivnost dovodi do klinički značajnog rasta malog adenoma u veliki (46-48). Proteinski produkti ovih gena posreduju u odgovoru stanice na signale rasta prijenosom signala s površine stanice do jezgre, na signalnom putu mitogenom aktiviranih protein kinaza (engl. *mitogen activated protein kinases*, MAPK), te imaju važnu ulogu u kontroli proliferacije stanica (49). Prekomjerno se najčešće aktiviraju stečenim strukturnim promjenama (točkastim mutacijama) koje izazivaju pojačanu aktivnost produkata gena *KRAS* i *BRAF*. Najčešće se dokazuju točkaste mutacije u eksonu 2 gena *KRAS* i eksonu 15 gena *BRAF*.

Mutacije u nekoliko tumor supresorskih gena na kromosomu 18 i gena *p53* na kromosomu 17 javljaju se u kasnijim stupnjevima tumorigeneze i rezultiraju napredovanjem od dobroćudnog adenoma ka zloćudnom invazivnom karcinomu. Nekoliko tumor

supresorskih gena smješteno je u čovjeka na položaju 18q21. To su *DCC* (engl. *deleted in colorectal cancer*), *DPC4* (engl. *deleted in pancreatic carcinoma*) i *SMAD2* (stari naziv gena je *JV18-1*, engl. *mothers against decapentaplegic homolog 2*) koji kodiraju za transmembranski zavisni receptor (DCC) i traskripcijske faktore odnosno modulatore transkripcije (DPC4, SMAD2). Gubitak dijela kratkog kraka kromosoma 18 (18q) nađen je u 70% karcinoma debelog i završnog crijeva i 50% kasnih adenoma što upućuje na važnost ovih gena u regulaciji napredovanja od adenoma u karcinom. Produkt gena *DCC* je transmembranski receptor koji, ovisno o tome da li je na njega vezan ligand (netrin-1) ili ne, aktivira proliferaciju, migraciju ili apoptozu stanica. Gen *DCC* je ujedno tumor supresorski gen čija inaktivacija rezultira smanjenom adhezijom, povećanom pokretljivošću te invazivnim ponašanjem stanica. Ovaj je gen aktivan u sluznici debelog crijeva, ali je njegova aktivnost znatno smanjena ili potpuno izostaje u tkivu karcinoma debelog crijeva. U 75% karcinoma debelog crijeva obje su kopije ovog gena inaktivirane mutacijom. Do gubitka gena *DCC* u pravilu dolazi nakon gubitka gena *APC* te mutacije gena *KRAS*, a prethodi gubitku aktivnosti gena *p53* (engl. *tumor protein p53*) (11,47). Produkti gena *DPC4* i *SMAD2* spadaju u skupinu konzerviranih signalnih proteina koji sudjeluju u prijenosu signala preko članova obitelji transformirajućih čimbenika rasta (engl. *transforming growth factor*, TGF). TGF-β je jedan od najjačih inhibitora rasta u normalnoj stanici, dok u epitelnim stanicama karcinoma debelog crijeva, gdje su nađene strukturne promjene na genima *DPC4* i *SMAD2*, nalazimo i rezistenciju na TGF-β. Gen *DPC4* promijenjen je u oko 15% slučajeva svih karcinoma debelog crijeva (50).

Gen *p53* je tumor supresorski gen smješten u čovjeka na položaju 17p13.1 i sa svojih jedanaest eksona kodira protein građen od 393 aminokiseline, molekularne mase 53 kD. Po funkciji je regulator transkripcije drugih gena, odnosno čuvar staničnog genoma koji spriječava diobu stanice s oštećenom DNA. Mutacije gena *p53* nađene su u više od polovine svih karcinoma čovjeka (većina su točkaste mutacije) i dolaze najčešće u kombinaciji s gubitkom alela divljeg tipa, što se naziva gubitkom heterozigotnosti (engl. *loss of heterozygosity*, LOH). Gen *p53* ne može započeti proces tumorigeneze na način kako to radi *APC*; njegove promjene pojavljuju se nešto kasnije na prijelazu iz dobroćudne u zloćudnu fazu i povezane su sa zloćudnom pretvorbom adenoma u karcinom. U nastanku karcinoma debelog crijeva, LOH na dugom kraku kromosoma 17 (17p) vrlo je čest i nalazimo ga u 75% slučajeva, a smatra se kasnim događajem napredovanja tumora koji dovodi do nastanka invazivnog karcinoma. Stečene genske promjene nalaze se uglavnom u eksonima 4 i 8 i dovode do sinteze mutiranog proteina koji se može dokazati u više od 80% karcinoma

debelog crijeva, osobito u uznapredovalim karcinomima. Učestalost promjene gena *p53* otprilike je podjednaka u nasljednim i sporadičnim karcinomima debelog crijeva (51,52).

Dok pojava točkastih mutacija predstavlja najčešći mehanizam aktivacije protoonkogena, LOH predstavlja važan mehanizam vezan za poremećaj funkcije tumor supresorskih gena. To je gubitak zdravog alela, a javlja se najčešće kao drugi genski događaj uslijed čega u stanici preostaje samo jedan alel koji je već funkcionalno promijenjen (53). U razvoju karcinoma debelog crijeva LOH je najčešći na položajima 17p (*p53*), 18q (*DCC*) i 5q (*APC*) (54).

Uz ove, utvrđene su promjene i u nizu drugih gena, primjerice *nm23* (engl. *non-metastatic cells 1 protein NM23A*), *CDH1* (engl. *epithelial cadherin*), *PTEN* (engl. *phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase*), *PI3K* (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*), *BAX* (engl. *Bcl-2–associated X protein*) i drugima (55,56).

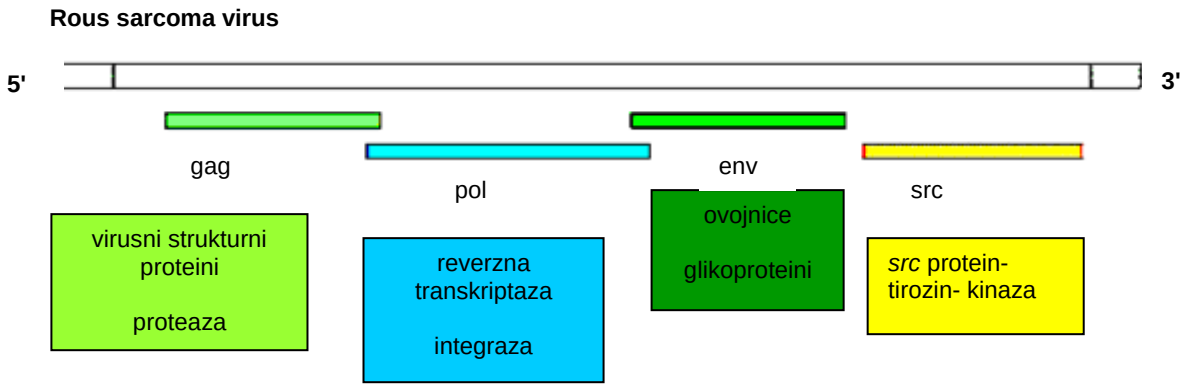
Dva su nasljedna sindroma, obiteljska adenomatozna polipoza (engl. *familial adenomatous polyposis*, FAP) i nasljedni nepolipozni karcinom debelog crijeva (engl. *hereditary nonpolyposis colon cancer*, HNPCC), povezana s povećanim rizikom obolijevanja od karcinoma debelog crijeva. Odlikuju se ranijom pojavom simptoma, prisutnošću nasljedne komponente unutar obitelji, visokim rizikom za više primarnih tumora debelog crijeva te povišenim rizikom za nastanak dobroćudnih i zloćudnih promjena izvan debelog crijeva. Sindromi FAP i HNPCC nasljeđuju se autosomno dominantno. Nasljeđivanjem jednog promijenjenog alela nasljeđuje se sklonost za razvitak FAP i HNPCC, ali ne i karcinom debelog crijeva. Potrebna je druga somatska (stečena) promjena na alelu koji je naslijeđen od zdravog roditelja (divlji tip alela) da bi započeo proces karcinogeneze (57,58). Razlika u nastanku i napredovanju karcinoma debelog crijeva proisteklih iz ova dva nasljedna oboljenja je u tome što je u FAP zbog nasljedne i stečene mutacije gena *APC* ubrzana inicijacija tumorskog procesa, dok je u sindromu HNPCC ubrzano napredovanje tumora zbog LOH gena MMR (*hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2* ili *hMSH6*) i daljnjeg nakupljanja mutacija onkogena i tumor supresorskih gena (12).

1.5. Onkogeni

Virusi su imali značajnu ulogu u otkrivanju promjena koje uzrokuju rak, iako nisu uzrok većine tumora ljudi. Peyton Rous je 1911. godine opisao prenošenje sarkoma s jednog pileta u drugo. Uzročnik je bio RNA - virus nazvan Rousov sarkomski virus (RSV) (59), prototip onkogenih retrovirusa. Temin H.M. i Baltimore D. su 1964. godine postavili "provirusnu teoriju" po kojoj bi se genom virusa u obliku DNA ugradio u genom stanice i tako

prenio na potomstvo (60,61). Teorija je prihvaćena dokazom virusno kodiranog enzima reverzne transkriptaze, polimeraze koja omogućava prijepis RNA u DNA (61,62).

Iz različitih životinja izdvojeno je više od 40 različitih onkogenih retrovirusa. Svi ti virusi sadržavali su najmanje jedan onkogen koji nije potreban za replikaciju virusa već je dovodio do preobrazbe stanice. Pokazano je da, osim divljeg tipa virusa koji nosi samo gene koji kodiraju Gag poliproteine (*gag* engl. *group-specific antigen*), multienzimski kompleks (*pol* engl. *polymerase*) i proteine ovojnice (*env* engl. *envelope)* potrebne za replikaciju RNA i umnožavanje, postoje i mutirani oblici virusa. Ti oblici virusa imaju ugrađene specifične gene, onkogene, koji mogu izazvati rak (v-*gen*). Prvi takav otkriveni gen bio je v-*src* (engl. *v-src sarcoma viral oncogene homolog*) koji kodira enzim tirozin-kinazu (slika 1.7).



Slika 1.7. Struktura genoma retrovirusa (RSV)

Otkriće da stanice sadrže homologni, iako ne posve jednaki slijed DNA nazvan protoonkogen ili stanični onkogen (c-*gen*), pojasnilo je činjenicu da su virusni onkogeni staničnog porijekla i da su to u osnovi geni očuvani tijekom evolucije. Virusi su ih, vjerojatno transdukcijom, slučajno ugradili u svoj genom i to u mutiranom obliku. Pritom su najvjerojatnije ugradili one gene koji su češće aktivni u mnogim stadijima razvoja ili u većini tkiva i organa, a to su upravo geni za proliferaciju i osnovne metaboličke funkcije stanice. Otkriven je cijeli niz gena stanice koji imaju svoje virusne homologe (63,64).

Normalni stanični geni od kojih su potekli retrovirusni onkogeni zovu se protoonkogeni; njihovi proteinski produkti sudjeluju u kontroli staničnog ciklusa. Poput gena *SRC* (engl. *proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src*), *KRAS* i *BRAF*, mnogi drugi protoonkogeni kodiraju proteine za koje danas znamo da su ključni dijelovi signalnih puteva kojima se kontrolira proliferacija normalnih stanica (65).

Onkogeni su promijenjeni protoonkogeni čija povećana aktivnost potiče proliferaciju i nastanak tumora. Genske promjene koje ih pretvaraju u onkogene uključuju: funkcionalno važne mutacije unutar kodirajućih sljedova, transkripcijsku aktivaciju insercijskom mutagenezom, kromosomsku translokaciju i umnažanje gena (12,66-71). Zbog tih promjena onkogeni dovode do nenormalne proliferacije stanica i nastanka tumora. Onkogeni svojstveni tumorima čovjeka prikazani su u tablici 1.2.

Premda različiti geni imaju važnu ulogu u razvoju karcinoma, tri člana porodice gena RAS (*NRAS* engl. *neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog* , *HRAS* engl. *V-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog* i *KRAS* engl. *V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) su onkogeni koji se najčešće susreću u stanicama tumora čovjeka. Njihove mutacije istražuju se intenzivno od 1982. godine i dokazane su u oko 20% svih tumora ljudi (72). U ovim onkogenima najčešće se dokazuju promjene slijeda nukleotida u molekuli DNA odnosno karakteristične točkaste mutacije koje mijenjaju funkciju njihovih proteina (66,69). Te mutacije uzrokuju promjenu aminokiseline koja vodi do izmijenjenog proteina. Posljedica tih promjena je aktivirani onkoprotein. Pri tome su često obuhvaćene upravo regulacijske regije, pa je protein stalno u aktivnom stanju. Najčešće promijenjen gen iz ove porodice je *KRAS* čije su mutacije dokazane u 60% adenokarcinoma gušterače, 32% karcinoma debelog crijeva, 33% karcinoma žučnog mjehura, 19% karcinoma pluća, 17% karcinoma jajnika (73). Mutacije su najčešće zabilježene u području eksona 2 (kodona 12 i 13), dok ostale mutacije (često u području kodona 61 i 146) čine svega oko 4% svih mutacija gena *KRAS*.

Unutar porodice gena RAF (*RAF-1* engl. *V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1, ARAF* engl. *V-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog* i *BRAF* engl. *V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*) produkt gena *BRAF* ima značajno veću razinu bazalne kinazne aktivnosti zbog čega je češće od ostalih članova porodice gena RAF uključen u nastanak tumora ljudi. Točkaste mutacije gena *BRAF*, koji također spada u skupinu onkogena, identificirane su u oko 70% zloćudnih melanoma i u 5-15% karcinoma debelog crijeva. Mali je broj mutacija dokazan i u gliomima, karcinomima pluća, sarkomima te karcinomima štitnjače, jajnika, dojke i jetre (74). Najčešća mutacija gena *BRAF* je transverzija T-A na položaju 1.799 (ekson 15, kodon 600) i čini oko 90% svih mutacija ovog gena.

Tablica 1.2. Naziv onkogena, vrsta tumora i mehanizam aktivacije onkogena svojstvenih tumorima čovjeka. Prema knjizi STANICA 2010 (65)

Onkogen	Vrsta tumora	Mehanizam aktivacije
abl	kronična mijeloična leukemija, akutna limfoblastična leukemija	translokacija
akt	karcinom dojke, jajnika, gušterače	amplifikacija
bcl-2	folikularni B-stanični limfom	translokacija
CCND1	adenom nuzštitne žlijezde, B-stanični limfom	translokacija
CCND1	planocelularni karcinom, karcinom mjehura, dojke, jednjaka, jetara, pluća	amplifikacija
Cdk4	melanom	točkasta mutacija
erb B	gliomi, veći broj različith karcinoma	amplifikacija
erb B	karcinom pluća	točkasta mutacija
erb B-2	karcinom dojke i jednjaka	amplifikacija
c-myc	Burkittov limfom	translokacija
c-myc	karcinom dojke i pluća	amplifikacija
L-myc	karcinom pluća	amplifikacija
N-myc	neuroblastom, karcinom pluća	amplifikacija
PDGFR	kronična mijelomonocitna leukemija	translokacija
PI3K	karcinom dojke	točkasta mutacija
	karcinom jajnika, želudca i pluća	amplifikacija
PML/RARα	akutna promijelocitna leukemija	translokacija
BRAF	melanom, karcinom debelog crijeva	točkasta mutacija
HRAS	karcinom štitnjače	točkasta mutacija
KRAS	karcinom debelog crijeva, pluća, gušterače i štitnjače	točkasta mutacija
NRAS	akutna mijeloična i limfoblastična leukemija, karcinom štitnjače	točkasta mutacija

1.6. Gen *KRAS*

Chang E.H. i Der C.J. su 1982. godine otkrili retrovirusne onkogene *Kirsten Rat Sarcoma Virus* (*KRAS*) i *Murine Sarcoma Virus* (*MSV*) povezane s nastankom sarkoma u glodavaca (75). U genomu čovjeka gen *KRAS* je homolog tih dvaju virusnih onkogena. Službeno je nazvan *KRAS* ili *KRAS2* (engl. *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* ili alternativno *Kirsten murine sarcoma virus 2 homolog*). U čovjeka je smješten na kromosomu 12 na položaju 12p12.1 (76). Zauzima 45.675 baznih parova genomske DNA i sastoji se od 6 eksona. Jedan je od tri gena iz porodice gena RAS.

Postoje dvije kopije gena *KRAS* u genomu čovjeka nazvane *KRAS1* i *KRAS2*. Prvi je neprocesirana kopija gena *KRAS* ili pseudogen, službeno nazvan *KRAS1P*, smješten na kromosomu 6 na položaju 6p11-12 (77,78). Analizom placentne i embrijske cDNA utvrđena je homologija u 900 baznih parova (bp) između *KRAS1* s *KRAS2*, a 300 bp gena *KRAS2* je potpuno homologno s njegovim virusnim homologom.

Sekvenciranjem je dokazano da gen *KRAS* sadrži 6 eksona od čega se drugi, treći i četvrti ekson uvijek prepisuju u proteinski produkt. Alternativnom doradom eksona 4 nastaju dvije mRNA, poznate kao 4A i 4B. Ekson 5 se ne prepisuje te nastaju dvije proteinske izoforme KRASA i KRASB. Ekson 6 kodira C-terminalnu regiju u proteinu KRASB, dok se u sintezi izoforme KRASA ne prepisuje 3' netranslatirajuća regija (3'UTR). Upravo je KRASB dominantna varijanta koja nastaje alternativnim izrezivanjem gena *KRAS* i na nju se odnosi naziv protein KRAS (79).

Ekspresija gena *KRAS* regulirana je na dva načina: vezanjem proteina na promotor za vrijeme inicijacije transkripcije i preko molekula mikroRNA koje utječu na stabilnost mRNA gena *KRAS* za vrijeme produljenja transkripcije. Promotorske regije gena *KRAS* sadrže polipurinske i polipirimidinske elemente jako osjetljive na nukleazu (engl. *nuclease hypersensitive polypurine-polypyrimidine element*, NHPPE). Onaj dio lanca, koji je bogat gvaninom, smješten je na proksimalnom dijelu promotorskog slijeda i u mogućnosti je unutar molekule napraviti tzv. *G-quadruplex*, strukturu koja prepoznaje i veže proteine jezgre uključene u suzbijanje transkripcije gena *KRAS* (80).

Transkripcija gena *KRAS* djelomično je regulirana međudjelovanjem promotorske regije i proteina ESXR1 (65 kD), a djelomično pomoću molekula mikroRNA. Protein ESXR1 ima N-terminalnu domenu u jezgri, a C-terminalnu domenu bogatu aminokiselinom prolin u citoplazmi. U jezgri se preko N-terminalne domene veže za konsenzus slijed TAATGTTATTA eksona 1 gena *KRAS* i tako inhibira sintezu mRNA (81). Molekule mikroRNA sastoje se od 21-22 nukleotida dugog nekodirajućeg slijeda nukleotida; reguliraju ekspresiju gena (82). Procijenjeno je da ima više od 500 različitih molekula mikroRNA koje reguliraju ukupno 30% svih gena čovjeka, uključujući i porodicu RAS (83). Međudjelovanje mikroRNA i mRNA smanjuje stabilnost mRNA i inhibira sintezu proteina sprječavanjem vezanja ribosoma na mRNA (84).

U karcinomima ljudi pronađeno je mnogo promijenjenih molekula mikroRNA među kojima je najviše istražena mikroRNA let-7 koja regulira diferencijaciju i proliferaciju stanice (77); negativnom regulacijom aktivnosti proteina RAS smanjuje proliferaciju stanica. Proteini KRAS, NRAS i HRAS imaju višestruka mjesta komplementarna s mikroRNA let-7 na svojim

3' netranslatirajućim regijama (85). Smanjena aktivnost mikroRNA let-7 pronađena je u adenokarcinomima pluća dok je značajno veća ekspresija proteina RAS povezana s niskom razinom mikroRNA let-7 pronađena u SCLC (engl. *squamous cell lung carcinoma*) (62).

1.7. Proteinski produkt gena *KRAS* i njegova uloga u stanici

Gen *KRAS* prepisuje se u mRNA veličine 5,5 kb koja se prevodi u protein veličine 188 ili 189 aminokiselina (AK) (86). Protein je smješten na unutrašnjoj strani membrane stanice.

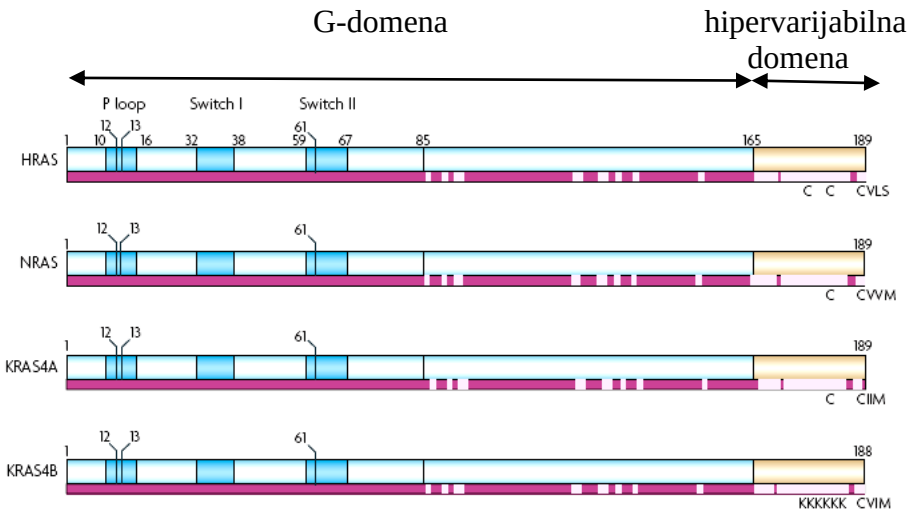
Protein KRAS pripada skupini malih proteina porodice RAS koji vežu gvanozin-trifosfat (GTP). Sve ih karakterizira katalitička G-domena. Najčešće su proučavani proteini Harvey-Ras (HRAS), neuroblastoma-Ras (NRAS) i dvije varijante Kirsten-Ras (KRAS) – prva, KRAS4A, koja je slabo izražena, i druga, dominantna varijanta KRAS4B, koja je mnogo jače eksprimirana u ljudskim stanicama. Ova četiri proteina porodice RAS imaju sličnu molekularnu masu (oko 21 kD) i sastoje se od četiri domene (slika 1.8).

Prva domena uključuje 85 aminokiselina na N-kraju i identična je kod sva tri proteina (KRAS, NRAS i HRAS). Važna je za funkciju prijenosa signala jer je to mjesto specifičnog međudjelovanja proteina KRAS s različitim regulacijskim i efektorskim molekulama. Ona uključuje efektorsku omču koja veže fosfat (engl. *phosphate-binding loop*, P-loop, obuhvaća od 10. do 16. aminokiseline) te regije Switch I (od 32. do 38. aminokiseline) i Switch II (od 59. do 67. aminokiseline). Druga domena uključuje sljedećih 80 aminokiselina i pokazuje 80-90% homologiju kod ova tri proteina. Prva i druga domena zajedno čine G-domenu (od 1. do 165. aminokiseline). Treća je domena jako varijabilna; nalazi se na C-kraju i obuhvaća regiju od 165. do 188/189. aminokiseline. Tu se događaju posttranslacijske modifikacije i time oblikuje specifično mjesto vezanja proteina KRAS za citoplazmatsku stranu stanične membrane. Proteini RAS vežu se za citoplazmatski dio membrane prenilnom skupinom vezanom na bočni lanac C-terminalnog cisteina i palmitilnom skupinom vezanom na cistein koji se nalazi 5 aminokiselina uzvodno. Posttranslacijske promjene obuhvaćaju dva procesa:

1. farnezilacija (prenilacija) - vezanje farnezilnih skupina (izopren s 15 C atoma) na C-terminalni CAAX - motiv svake izoforme proteina RAS (CVLS, CVVM, CIIM i CVIM). Ovi proteini na C-kraju završavaju cisteinskim ostatkom (Cys) iza kojeg slijede dvije alifatske aminokiseline (A) i jedna bilo koja aminokiselina (X). Prvi korak je vezanje farnezilne skupine na bočni ogranak cisteina. Zatim slijedi proteolitičko uklanjanje tri C-terminalne aminokiseline te metilacija cisteina koji se sada nalazi na C-kraju. Farnezilacija predstavlja ključnu posttranslacijsku promjenu

mnogih proteina koji sudjeluju u kontroli rasta i diferencijacije stanice, a koja im omogućava lokalizaciju na staničnoj membrani.

2. palmitoilacija – vezanje palmitinske kiseline (16 ugljikovih atoma) na sumpor bočnih ogranaka cisteina smještenih u unutrašnjem dijelu polipeptidnog lanca proteina HRAS, NRAS i KRAS4A, čime se usklađuje afinitet vezanja proteina za membranu. Vezanje proteina KRAS4B na membranu omogućeno je preko više lizinskih ostataka smještenih proksimalno od motiva CVIM.

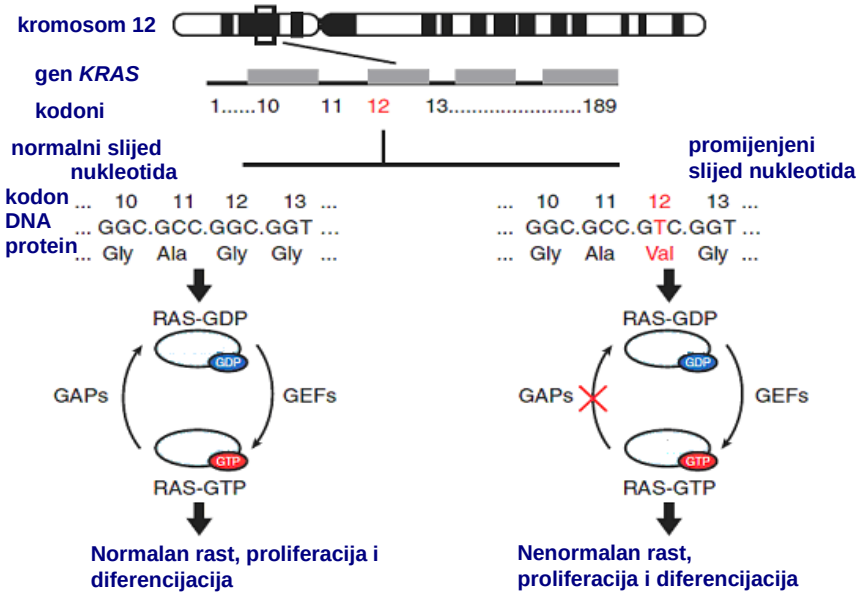


Slika 1.8. Shematski prikaz četiri izoforme proteina RAS: HRAS, NRAS, KRAS4A i KRAS4B; 1-165 AK: homologija G-domene; 1-85 AK: područje specifičnog vezanja proteina RAS za GDP i GTP (P-loop, Switch 1, Switch 2); 165-188/189 AK: C-terminalna hipervarijabilna domena koja određuje vezanje proteina RAS za membranu stanice; somatske mutacije u karcinomima najčešće uključuju supstituciju AK na položaju 12,13 i 61 (preuzeto iz Schubbert 2007 (73))

Proteini RAS imaju visok afinitet za gvaninske nukleotide i u osnovnom su stanju vezani za gvanozin-difosfat (RAS-GDP). Povremeno GDP spontano disocira iz kompleksa RAS-GDP te, ukoliko je koncentracija gvaninskih nukleotida u stanici visoka, on se ponovno veže. Obzirom na to da je koncentracija GTP u stanici obično veća od koncentracije GDP (oko 10 puta), to ponovno je vezanje uglavnom za GTP (RAS-GTP). Vezanje GTP izaziva konformacijske promjene proteina RAS koje ga aktiviraju odnosno povećavaju njegov afinitet za molekule s kojima ulazi u međudjelovanje. Promjena konformacije obuhvaća područje efektorske omče (P-loop) te regije *Switch I* i *Switch II*. Upravo na tim mjestima konformacijska promjena omogućava međuvezanje proteina KRAS s proteinima koji aktiviraju GTP-azu (engl. *GTP-ase activating proteins*, GAP) koji pojačavaju GTP-aznu

aktivnost proteina RAS 100.000 puta (87). Na taj način proteini GAP negativno reguliraju aktivnost proteina RAS. Konformacijska promjena također utječe na interakcije proteina KRAS sa čimbenicima izmjene/otpuštanja gvanina (engl. *guanine-exchanging/releasing factors*, GEFs/GRFs), što potpomaže otpuštanje GTP. Područje efektorske omče posjeduje i intrinzičku GTP-aznu aktivnost proteina KRAS koju stimuliraju proteini koji aktiviraju GTP-azu (GAP), a koja je povezana izravnom interakcijom s efektorima (88). Na taj način proteini RAS započinju aktivaciju signalnih puteva u koje su uključeni. Isto tako, proteini RAS hidroliziraju GTP u GDP čime se sami inaktiviraju, a signalizacija se u stanici prekida. Za to je dovoljna njihova unutarnja GTP-azna (hidrolitička) aktivnost. Prema tome, oni funkcioniraju kao prekidači koji u stanici cirkuliraju između inaktivnog stanja, kada su vezani za gvanozin-difosfat (RAS-GDP), i aktivnog, kada su vezani za gvanozin-trifosfat (RAS-GTP) (slika 1.9).

Mutacije pronađene u onkoproteinu KRAS oštećuju njegovu GTP-aznu aktivnost i tako onemogućavaju njegov odgovor na stimulaciju proteinima GAP. Onkoprotein ostaje vezan za GTP, čime se održava u stalno aktivnom stanju. Tako promijenjen protein KRAS remeti aktivnost drugih molekula s kojima ulazi u međudjelovanje i time utječe na nekoliko važnih staničnih signalnih puteva.



Slika 1.9. Aktivacija i inaktivacija normalnog i promijenjenog produkta gena *KRAS*. Promjena jednog nukleotida u tripletu dovodi do promjene AK u proteinu, što znači strukturno promijenjen i stalno aktivan protein KRAS (preuzeto iz Wang 2010)

1.8. Gen *BRAF*

Prvi gen iz porodice gena RAF, *v-raf*, otkriven je kao transformirajući gen virusa mišjeg sarkoma koji uzrokuje fibrosarkome i eritroleukemiju u mladih miševa. Homolog virusnog onkogena *v-raf* u genomu čovjeka je protoonkogen *RAF-1*. U ljudi su otkrivena tri gena iz ove porodice: *RAF-1*, *ARAF* i *BRAF*. Kod ostalih eukariota pronađen je samo jedan homolog gena *RAF* koji je po nukleotidnom slijedu najsličniji protoonkogenu *BRAF*.

Službeni naziv gena *BRAF* potječe od engl. *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*, a otkriven je kao aktivirani onkogen u stanicama NIH 3T3 koje su bile transformirane ljudskom DNA Ewingova sarkoma (89). U čovjeka je smješten na kromosomu 7 na položaju 7q34. Zauzima 190.753 baznih parova genomske DNA i sastoji se od 18 eksona. Jedan je od tri gena iz porodice gena RAF čiji su produkti citoplazmatske serin/treonin kinaze koje se aktiviraju procesom fosforilacije vezanjem za aktivni produkt gena *KRAS* te dalje aktiviraju kinaze MEK i ERK na istom signalnom putu MAPK.

Postoji i neprocesirana kopija gena *BRAF* ili pseudogen, službeno nazvan *BRAF2*, smješten na kromosomu X na položaju Xq13.3.

Aktivnost gena *BRAF* u uzorcima karcinoma do danas je samo djelomično istražena. Ipak, poznato je da je protein RAF-1 ispoljen u većini različitih vrsta zdravih stanica i tkiva. Protein ARAF nalazi se najčešće u tkivima mokraćno-spolnog sustava, iako ga se može naći i u drugim stanicama i tkivima. Međutim, proteinski produkt gena *BRAF* gotovo se isključivo pronalazi u neuralnom tkivu, te manje u sjemenicima i slezeni (90,91). Iz tog su se razloga sva istraživanja ispoljenosti gena *BRAF* provodila na staničnim linijama neuralnog podrijetla. Dokazano je da se protein BRAF pojavljuje u barem deset različitih izoformi nejednolike ispoljenosti u tkivima odraslog miša (91). Izoforme nastaju kao posljedica alternativne dorade eksona 8b i 10a, a dodatno se ispoljavaju i oblici proteina s dva različita N-kraja, zbog čega nastaju izoforme veličine od 67 do 99 kDa. Duži oblici proteina sadrže dodatnih 115 aminokiselina (prijepise eksona 1, 2 i dijelom eksona 3). Međutim, nije jasno nastaju li ti različiti oblici proteina BRAF zbog djelovanja različitih promotora ili različitog mjesta početka prevođenja s istim promotorima, ili zbog alternativne dorade. Prepisivanjem eksona 8a dužine 36 nukleotida nastaje izoforma proteina koje se nalazi u središnjem živčanom sustavu, srcu, jajniku, sjemeniku i slezeni. Izoforma proteina koja sadrži prijepis eksona 10a dužine 120 nukleotida ispoljena je uglavnom u neuralnom tkivu. Kratki oblici izoformi nikada ne sadrže prijepis eksona 10a (91). Alternativna dorada eksona 8b i 10a utječe na sposobnost proteina BRAF da aktivira protein MEK: prisutnost eksona 10a povećava bazalnu kinaznu aktivnost i afinitet proteina BRAF prema MEK, dok prisutnost eksona 8b ima suprotan učinak

(92). Poznato je da već i male koncentracije proteina imaju vrlo važnu MEK - kinaznu aktivnost. U fibroblastima embrija miša protein BRAF nalazi se u zanemarivim količinama, upravo suprotno od proteina RAF-1 i ARAF. Ipak, upravo protein BRAF ima značajno veću razinu biokemijske aktivnosti i čini se da je najvažniji MEK/ERK-aktivator nakon stimulacije čimbenicima rasta (93). Poznato je također da je BRAF izuzetno aktivan u melanocitima i stanicama melanoma, ali je nepoznato o kojoj se izoformi radi (94).

1.9. Proteinski produkt gena *BRAF* i njegova uloga u stanici

Gen *BRAF* prepisuje se u mRNA veličine 2.478 nukleotida koja se prevodi u protein veličine 766 aminokiselina, molekulske mase oko 84 kDa. Smješten je u citoplazmi.

Protein BRAF je serin/treonin kinaza koja pripada MAPK - signalnom putu koji prenosi mitogeni signal od stanične membrane u jezgru. Aktivacija proteina KRAS vezanjem za GTP uzrokuje fosforilaciju i aktivaciju proteina BRAF koji potom aktivira čitavu signalnu kaskadu.

Gen *BRAF* dijeli tri očuvane regije (CR1, CR2 i CR3) s drugim članovima porodice gena RAF. Regija CR1 koja se sastoji od 131 aminokiseline sadrži domenu bogatu cisteinom (engl. *cysteine rich domain*, CRD) i veći dio domene za koju se veže protein RAS (engl. *RAS binding domain*, RBD). Na te se dvije domene veže kompleks RAS-GDP. Regija CR2, koja se sastoji od 16 aminokiselina, bogata je serinskim i treoninskim ostacima uključujući S365 kao mjesto inhibicije fosforilacije. Regija CR3, koja se sastoji od 293 aminokiseline, sadrži kinaznu domenu, G-loop motiv GXGXXG (visoko očuvan u kinazama ljudi), zatim aktivacijski segment i mjesta na kojima se regulira fosforilacija – S446, S447, D448, D449, T599 i S602. Područje između regija CR2 i CR3 povezuje amino-terminalnu regulacijsku regiju i katalitičku domenu; njegova dužina varira zbog alternativne dorade eksona 8b i 10a te na taj način služi kao ključna točka za prijelaz proteina BRAF iz aktivnog u neaktivan oblik.

Onkogeni *KRAS* i *BRAF*, kao i ostali članovi njihovih porodica, aktivni su u stanicama tumora u kojima je pojačano aktivan signalni put receptora za epidermalni čimbenik rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*, EGFR).

1.10. Signalni put kinaza MAP preko EGFR

Vezanje brojnih liganada za specifične transmembranske receptore aktivira niz unutarstaničnih signalnih puteva koji nadziru gotovo sve aspekte ponašanja stanice (metabolizam, kretanje, proliferaciju, preživljenje, diferencijaciju). Učinak onkogena iz porodice RAS jasno je pokazao povezanost razvoja karcinoma u ljudi i signalnih puteva koji

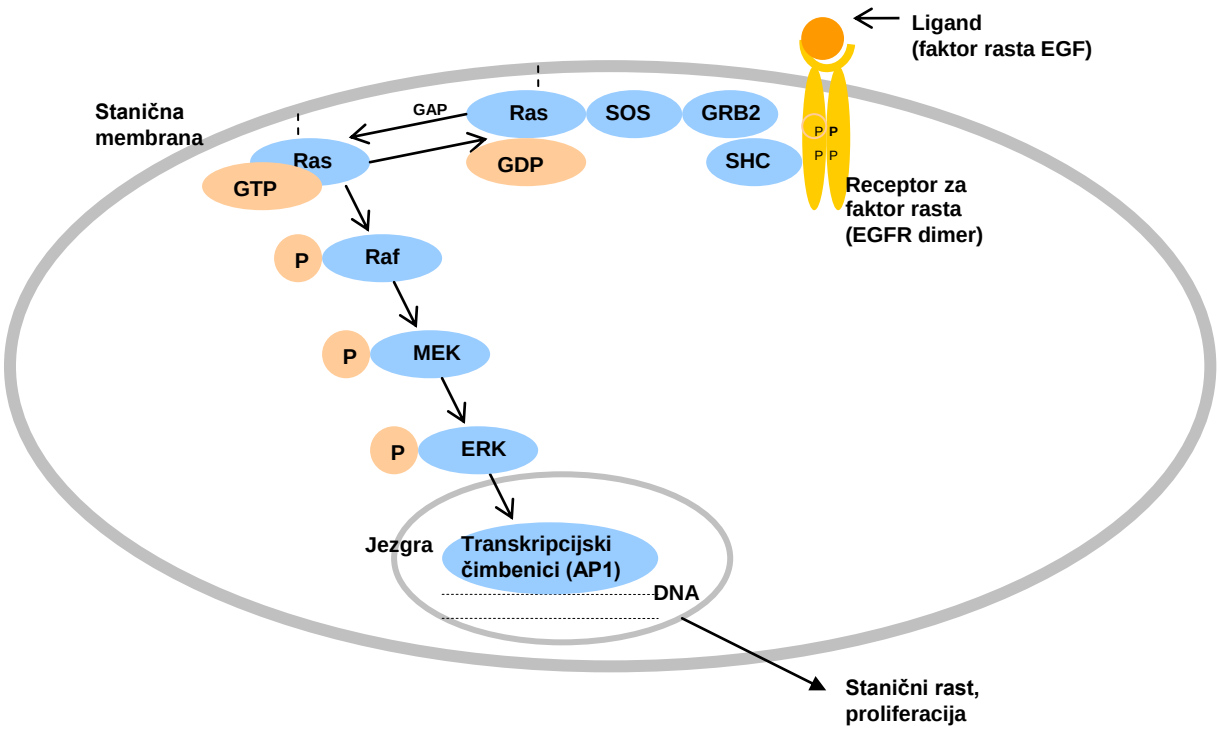
kontroliraju proliferaciju stanica. Jedan od najčešće pojačano aktivnih receptora u mnogim solidnim karcinomima jest receptor za epidermalni čimbenik rasta. To je transmembranski protein s tirozin-kinaznom aktivnosti iz porodice receptora HER (engl. *human epidermal receptor*). Prisutan je u većini epitelnih tkiva i uključen je u razvoj i napredovanje zloćudnih tumora u ljudi (95,96). Veličine je 170 kD, a sastoji se od izvanstanične domene koja veže ligand, dijela koji se proteže kroz membranu (konformacije α-uzvojnice) i citoplazmatske domene koja ima tirozin - kinaznu aktivnost. Vezanjem specifičnog liganda, primjerice čimbenika rasta za izvanstaničnu domenu aktivira se citoplazmatska domena koja uzrokuje fosforilaciju i samog receptora i unutarstaničnih ciljnih proteina, preko kojih se širi signal do ciljnih molekula uključujući i DNA. Preciznije, prijenos signala odvija se na slijedeći način. Vezanje liganda uzrokuje dimerizaciju receptora što omogućuje njegovu autofosforilaciju na tirozinskim ostacima unutarstanične domene (dva polipeptidna lanca uzajamno se fosforiliraju). Autofosforilacija ima dvije uloge: fosforilacija unutar katalitičke domene povećava aktivnost receptora, a fosforilacija izvan katalitičke domene oblikuje specifično vezno mjesto za dodatne proteine koji prenose unutarstanične signale nizvodno od aktiviranih receptora. Tako se pokreće niz promjena u citoplazmi, odnosno započinje prijenos signala preko nekoliko različitih signalnih puteva čije se komponente nalaze odmah ispod EGFR (signalni putevi RAS-MAPK, PI3K-Akt i STAT). Signal se tako prenosi od stanične membrane preko citoplazme do jezgre, gdje se konačno prenosi na transkripcijske čimbenike koji dovode do promjena u ekspresiji gena, što onda potiče proliferaciju stanice.

Signalni put MAP - kinaze (MAPK) je kaskada evolucijski očuvanih protein-kinaza koje imaju ključnu ulogu u prijenosu signala. Središnji element tog puta su protein-serin/treonin - kinaze koje se aktiviraju u odgovoru na različite čimbenike rasta i druge signalne molekule, a pripadaju porodici kinaza reguliranih s pomoću izvanstaničnih signala, odnosno porodici ERK (engl. *extracellular signal-regulated kinase*).

U karcinomu debelog crijeva signalni putevi preko EGFR pojačano su aktivni u više od 80% slučajeva (97). Proteinski produkti gena *KRAS* i *BRAF* imaju važnu ulogu u prijenosu signala od EGFR preko signalnog puta MAPK, jednog od signalnih puteva koji se pokreću aktivacijom EGFR. Aktivacijom EGFR stvara se kompleks sastavljen od različitih proteina koji prihvaćaju signal i prenose ga do proteina KRAS koji se u inaktivnom stanju (KRAS-GDP) nalazi vezan za unutarstanični dio stanične membrane. Protein GRB2 (engl. *growth factor receptor-bound protein 2*) veže se svojom domenom –SH2 (engl. *SRC Homology 2*) za specifične fosforilirane tirozinske ostatke na tirozin kinaznoj domeni aktiviranog receptora, a domenom –SH3 (engl. *SRC Homology 3*) za regiju bogatu aminokiselinom prolin na proteinu

SOS iz skupine čimbenika koji sudjeluju u izmjeni gvanina (engl. *guanine-exchanging factor*, GEF). Tada protein SOS aktivira protein KRAS – stimulira ga da otpusti GDP i veže GTP. Neki tirozin - kinazni receptori uključuju i druge adapterske molekule, primjerice protein SHC (engl. *SH2-containing protein*) koji se veže i za aktivirani receptor i za protein GRB2 (slika 1.10).

Aktivacija proteina RAS uzrokuje aktivaciju protein-serin/treonin-kinaze RAF, a protein RAF potom fosforilira i aktivira drugu protein-kinazu nazvanu MEK (engl. *MAP kinase/ERK kinase*). MEK je proteinska - kinaza dvostruke specifičnosti koja aktivira članove porodice ERK tako da fosforilira i treoninske i tirozinske ostatke koji su međusobno odvojeni jednom aminokiselinom. Jednom kad se aktivira, ERK fosforilira druge proteinske - kinaze i transkripcijske čimbenike te dovodi do promjene u ekspresiji gena. Onkoproteini FOS i JUN podjedinice su transkripcijskog čimbenika AP1 (engl. *activator protein 1*) koji se ovim putem aktivira, a potom aktivira transkripciju brojnih ciljnih gena (75).



Slika 1.10. Prijenos signala preko MAPK: aktivacija površinskog receptora EGFR pokreće kaskadnu aktivaciju signalnih molekula; protein SHC se veže za aktivirani receptor EGFR i protein GRB2; za GRB2 se veže protein SOS koji dalje stimulira proteine RAS da vežu GTP; aktivirani protein RAS lančano aktivira kinaze RAF, MEK i ERK što dovodi do aktivacije transkripcijskih čimbenika AP1 u jezgri i do transkripcije. Prema Jančik (75)

1.11. Mutacije gena *KRAS* i *BRAF* u karcinomu debelog crijeva

Mutacije koje pretvaraju protoonkogene *RAS* u onkogene dovode do konstitutivne aktivacije proteina RAS, što uzrokuje aktivaciju velikog broja staničnih procesa kao što su prepisivanje, prevođenje, napredovanje staničnog ciklusa, apoptoza ili preživljenje stanice. Među proteinima *RAS*, upravo aktivirani *KRAS* stimulira hiperproliferaciju epitelnih stanica u sluznici debelog crijeva te, uz mutirani gen *APC*, inhibira diferencijaciju i potiče pojačanu diobu stanica karcinoma (98). Do danas je dokazano oko 3.000 različitih točkastih *„missense“* mutacija gena *KRAS* u uzorcima karcinoma debelog i završnog crijeva (99). One dovode do zamjene samo jedne aminokiseline u proteinu i u većini su slučajeva nezavisne od mutacija receptora za EGF. Najčešće su zabilježene u eksonu 2 na kodonima 12 i 13 (oko 90%), dok ostale mutacije (često u području kodona 61 i 146) čine svega oko 4% ukupnih mutacija gena *KRAS* te je njihova korelacija s pojavom CRC za sada nejasna (99,100). Mutacije u kodonima 12 i 13 mogu se dokazati u preko 30% svih CRC i povezuju se s povećanim rizikom od smrti odnosno gubitkom odgovora na terapiju lijekovima koji su po svojoj funkciji inhibitori receptora za EGF te je njihovo određivanje u bolesnika s CRC od iznimnog kliničkog i terapijskog značenja (101-104). Kodoni 12 i 13 kodiraju dva susjedna glicina koji se nakon točkaste mutacije gena na bilo kojem nukleotidu u tripletima zamjenjuju nekom drugom aminokiselinom osim prolinom (105). U karcinomu debelog crijeva dokazano je sedam najčešće prisutnih mutacija gena *KRAS* i to: p.Gly12Asp (c.35G>A), p.Gly12Val (c.35G>T), p.Gly12Cys(c.34G>T), p.Gly12Ser (c.34G>A), p.Gly12Ala (c.35G>C), p.Gly12Arg (c.34G>C) i p.Gly13Asp (c.38G>A) (106,107). Najčešći tipovi mutacija su tranzicije G-A i transverzije G-T (102). Stečene mutacije gena *KRAS* smatraju se ranim događajem u karcinogenezi te se u primarnom tumoru i metastazama gotovo uvijek dokazuje isti mutacijski status gena *KRAS* (108).

Članovi porodice gena *RAF* (*RAF-1*, *ARAF* i *BRAF*) također su podložni točkastim onkogenim mutacijama koje dovode do poremećaja regulacije aktivnosti kinaze *RAF*. Među njima, produkt gena *BRAF* ima najveću biokemijsku aktivnost zbog čega je češće od ostalih članova te porodice uključen u nastanak tumora u ljudi. U tablici 1.3. prikazana je učestalost mutacija ovih onkogena u karcinomima ljudi.

Tablica 1.3. Učestalost mutacija onkogena *HRAS*, *KRAS*, *NRAS* i *BRAF* u karcinomima ljudi. Podaci o mutacijama dobiveni su na web stranici iz baze podataka Sanger Institute Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (109)

KARCINOM	*HRAS(%)*	*KRAS(%)*	*NRAS(%)*	*BRAF(%)*
Bilijarnog sustava	0	33	1	14
Mokraćnog mjehura	11	4	3	0
Dojke	0	4	0	2
Vrata maternice	9	9	1	0
Debelog crijeva	0	32	3	14
Endometrija	1	15	0	1
Bubrega	0	1	0	0
Jetre	0	8	10	3
Pluća	1	19	1	2
Melanom	6	2	18	43
Mijeloidna leukemija	0	5	14	1
Jajnika	0	17	4	15
Gušterače	0	60	2	3
Štitnjače	5	4	7	27

Davies H. i suradnici su 2002. godine identificirali aktivirajuće točkaste mutacije gena *BRAF* u ~15% karcinoma debelog i završnog crijeva čovjeka (74). Od toga je u čak 92% CRC nađena mutacija p.Val600Glu (c.T1799A), u kodonu 600, eksonu 15, čime je aminokiselina valin zamijenjena glutaminskom kiselinom na položaju 600 (p.Val600Glu) u proteinu BRAF (74). Od ukupno više od 30 identificiranih različitih točkastih mutacija gena *BRAF* koje obuhvaćaju 24 različita kodona i koje su većinom smještene unutar kinazne domene proteina BRAF, p.Val600Glu (p.V600E) je najčešća; povećava kinaznu aktivnost mutiranog proteina BRAF za više od 10 puta (109,110).

U različitim tumorima u istom signalnom putu nalaze se različite mutacije koje mogu imati sličan učinak na nastanak tumora. Za razliku od mutacija gena *KRAS*, za koje se smatra da nastaju djelovanjem vanjskih čimbenika, mutacije gena *BRAF* događaju se u tumorima s

oštećenim popravkom DNA i često se dokazuju u sporadičnom karcinomu debelog crijeva s visokim stupnjem mikrosatelitne nestabilnosti. Manje od 1% karcinoma pokazuje istovremeno mutacije gena *BRAF* i *KRAS*, ali se oba gena pojavljuju promijenjena u istim tipovima premalignih lezija i u istom stadiju prijelaza adenoma u karcinom (111). Može se zaključiti da su onkogeni *KRAS* i *BRAF* uključeni u razvoj CRC i da imaju podjednake učinke na tumorigenezu.

1.12. Ciljevi

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Ispitati vrstu i učestalost mutacija gena *KRAS* i *BRAF* u populaciji bolesnika s karcinomom debelog i završnog crijeva u Hrvatskoj.
2. Usporediti rezultate analize mutacija gena *KRAS* i *BRAF* s kliničkim karakteristikama oboljelih (dob, spol) te patohistološkim karakteristikama njihovih tumora s ciljem dobivanja boljeg uvida u povezanost prisutnih mutacija u navedenim genima s poznatim prognostičkim biljezima: klasifikacijom po Dukes'u, angioinvazijom, histološkim stupnjem diferencijacije tumora, veličinom i smještajem tumora.
3. Utvrditi postoji li statistički značajno češća pojava mutacija gena *KRAS* i *BRAF* u tumorima s lošijom prognozom.

1.12.1. Hipoteza

Hipoteza predstavljenog istraživanja jest da je prisutnost mutacija gena *KRAS* i *BRAF* u karcinomu debelog i završnog crijeva povezana s prognostičkim biljezima lošije prognoze.

2. MATERIJALI I METODE

Uzorci karcinoma debelog i završnog crijeva preuzeti su iz Kliničkoga zavoda za patologiju i citologiju Kliničkoga bolničkog centra Zagreb (KBC Zagreb) gdje se nalazi i baza podataka o patohistološkoj dijagnozi, veličini i stupnju diferencijacije tumora, angioinvaziji tumora i klasifikaciji po Dukes'u. Uzorci su uzeti tijekom operacijskog zahvata bolesnika s dijagnozom karcinoma debelog i završnog crijeva nakon čega su fiksirani u formalinu i uklopljeni u parafinske blokove (engl. *formalin fixed paraffin embedded*, FFPE) prema standardnom protokolu Kliničkoga zavoda za patologiju i citologiju Kliničkoga bolničkog centra Zagreb. Dijagnoza je postavljena standardnim postupcima i potvrđena patohistološki. U skladu s etičkim načelima Helsinške deklaracije u ovom istraživanju poštivana su načela čuvanja liječničke tajne i anonimnosti podataka o bolesniku tako da se osobni podaci o bolesniku nisu prikazivali. Predstavljeno istraživanje odobrilo je Povjerenstvo za etičnost eksperimentalnog rada KBC Zagreb i Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, a prikupljeni su i informirani pristanci bolesnika čiji su uzorci tumora korišteni. U ovom je radu analizirano 113 uzoraka karcinoma debelog i završnog crijeva prikupljenih prospektivno od 2009. do 2011. godine u KBC Zagreb. Istraživanjem je obuhvaćeno 49 žena (43,4%) i 64 muškarca (56,6%) u dobi od 25 do 84 godine (srednja životna dob 61 godina). Za četiri bolesnika, uz uzorak primarnog tumora dodatno su analizirane i pridružene metastaze (jedna metastaza iz limfnog čvora i tri metastaze iz jetre).

2.1. Izdvajanje genomske DNA iz tkiva tumora

Za izdvajanje ukupne DNA iz tkiva tumora, koje je nakon fiksiranja u formalinu uklopljeno u parafinske blokove, koristili smo komplet reagensa QIAmp®DNA FFPE Tissue Kit proizvođača QIAGEN, GmbH (Njemačka). Ovaj komplet reagensa optimiran je za izdvajanje i pročišćavanje DNA iz tkiva tumora fiksiranog u formalinu i uklopljenog u parafinske blokove. Komplet reagensa QIAmp®DNA FFPE Tissue Kit koristi QIAmp DNA mikro-tehnologiju na mini-kolonama za pročišćivanje genomske DNA iz male količine početnog uzorka kombiniranjem sljedećih postupaka:

1. uklanjanje parafina: parafin se otapa u ksilenu i uklanja
2. liza stanica: uzorak se lizira u optimiziranim uvjetima korištenjem pufera za liziranje uz razgradnju proteinazom K
3. zagrijavanje: inkubacija pri 90 ºC uklanja preostali vezani formalin s DNA

4. vezanje DNA za mini-kolonu: zahvaljujući selektivnim vezujućim svojstvima silikatne memebrane u koloni, molekula DNA veže se za membranu

5. ispiranje zaostalih nečistoća: puferima za ispiranje uklanjaju se proteini, enzimi i ostala onečišćenja s membrane

6. eluiranje čiste, koncentrirane DNA s membrane: korištenjem pufera za eluiranje (100 µL).

Iz uzorka tkiva karcinoma debelog i završnog crijeva uklopljenog u parafinske blokove (tkivo FFPE), izrezano je iz svakog bloka 6 - 10 rezova debljine 10 µm. Rezovi su napravljeni prema procjeni patologa tako da je za izdvajanje ukupne genomske DNA odabran uzorak uklopljenog tkiva koji sadrži više od 50% stanica tumora.

Svježim rezovima doda se 1 mL ksilena koji otapa i uklanja parafin. Uzorak se snažno promiješa 10 sekundi pomoću miješalice (vortex) i centrifugira 2 min pri sobnoj temperaturi brzinom 20.000 *g* (14.000 rpm). Tekuća faza (supernatant) se ukloni pipetiranjem te se na preostali talog doda 1 mL 96%-tnog etanola i izmiješa na miješalici. Centrifugira se 2 min pri sobnoj temperaturi brzinom 20.000 *g* (14.000 rpm). Nakon centrifugiranja ukloni se tekuća faza u kojoj se nalaze etanol i zaostali ksilen iz uzorka, a preostali talog se suši pri sobnoj temperaturi (15-25 ºC) dok etanol iz uzorka potpuno ne ishlapi (~ 10 min). Na talog se doda 180 µL pufera za lizu tkiva (Tissue Lysis Buffer, ATL) i 20 µL otopine proteinaze K za denaturaciju, sve se dobro izmiješa na miješalici i inkubira 1 sat pri 56 ºC (odnosno dok uzorak ne bude potpuno liziran). Inkubacija se nastavlja još 1 sat pri 90 ºC čime se uklanja preostali formalin s nukleinskih kiselina; duža inkubacija može rezultirati povećanom fragmentacijom DNA. Nakon toga, uzorak se ohladi na sobnu temperaturu, doda se 2 µL RNase A (100 mg/mL; 7.000 IU/mL) i inkubira 2 min pri sobnoj temperaturi. U isti se uzorak doda 200 µL pufera za lizu (Lysis Buffer, AL), dobro izmiješa na miješalici, zatim se doda 200 µL 96%-tnog etanola te ponovno dobro izmješa kako bi se dobila homogena otopina (lizat). Lizat se pažljivo prebaci u mini-kolonu QIAmp za eluiranje, eluat se sakuplja centrifugiranjem na 6.000 *g* (8.000 rpm) 1 min i baci. U mini-kolonu se doda 500 µL pufera za ispiranje (Wash Buffer 1, AW1), i drugi eluat se sakuplja centrifugiranjem na 6.000 *g* (8.000 rpm) 1 min te također baci. U mini- kolonu se zatim doda 500 µL pufera za ispiranje (Wash Buffer 2, AW2) te ponovi cijeli postupak. Na ovaj se način s kolone eluiranjem uklanjaju onečišćenja sve dok na koloni ne ostane vezana čista DNA. Konačno se mini-kolona centrifugira na 20.000 *g* (14.000 rpm) 3 min kako bi se membrana potpuno osušila odnosno uklonio sav etanol. Na kraju se u središte membrane na koloni doda 100 µL pufera za eluiranje vezane DNA s membrane (Buffer ATE), inkubira pri sobnoj temperaturi 1 min, te centrifugira na 20.000 *g* (14.000 rpm) 1 min. Tako dobivamo oko 100 µL otopine čiste DNA

u puferu, koncentracije od 50 do 200 ng/μL, ovisno o količini FFPE tkiva s kojim smo krenuli u izdvajanje. Dobivena DNA može se odmah koristiti za analizu ili čuvati na -20ºC.

Opisanim postupkom se stanična liza i oslobađanje genomske DNA iz tkiva FFPE postižu u specijalno optimiranim uvjetima bez potrebe inkubiranja preko noći. Obzirom na to da je sastav pufera koji se koriste u ovom kompletu za izdvajanje zaštićen od strane proizvođača, nije bilo moguće specificirati koncentraciju pojedinih sastojaka i pH svakog pojedinog pufera. Inkubacija na povišenoj temperaturi nakon razgradnje proteinazom K djelomično uklanja veze formalina s oslobođenom DNA povećavajući ukupnu količinu izdvojene DNA. Izdvojena DNA iz tkiva FFPE manje je molekularne mase nego DNA dobivena iz svježe smrznutih uzoraka tkiva, ali je očišćena od proteina, nukleaza i drugih nečistoća. Stupanj fragmentacije ovisi o vrsti i starosti uzorka kao i o uvjetima pod kojim je fiksiran u formalin.

2.2. Određivanje koncentracije DNA

Koncentracija DNA u uzorcima određena je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 260 nm. Pomoću izmjerene optičke gustoće (OD) izračunata je masena koncentracija DNA u uzorku prema formuli

$$\gamma = OD \times R \times \varepsilon$$

gdje je:

γ - masena koncentracija (ng/μL),

R - razrjeđenje u kiveti,

OD - optička gustoća očitana pri valnoj duljini od 260 nm,

ε - ekstinkcijski koeficijent za DNA (50 ng/μL).

Kvaliteta izdvojene DNA provjerena je u 1%-tnom gelu agaroze.

2.3. Elektroforeza u gelu agaroze

Izdvojena DNA analizirana je u 1%-tnom gelu agaroze. Za elektroforezu je korišten 1xTBE pufer (10xTBE: TRIS 0,89 mol/L, H_3BO_3 0,89 mol/L, EDTA-Na_2 0,02 mol/L; pH 8,2) koji je korišten i za izradu gela. Za vizualizaciju nukleinskih kiselina u gelove dodan je etidijev-bromid (1μg/mL). Elektroforeza se odvijala pri naponu od 120 V, tijekom 30-45 minuta. Za detekciju i fotografiranje gelova pri 250 nm korišten je uređaj G-BOX (Syngene, G-box).

2.4. Određivanje prisutnosti točkastih mutacija gena *KRAS*

Nakon izdvajanja DNA određena je prisutnost sedam točkastih mutacija u eksonu 2 gena *KRAS:* p.Gly12Ala (c.35G>C), p.Gly12Asp (c.35G>A), p.Gly12Val (c.35G>T), p.Gly12Arg (c.34G>C), p.Gly12Cys (c.34G>T), p.Gly12Ser (c.34G>A), p.Gly13Asp (c.38G>A). Za određivanje navedenih mutacija korištena je metoda lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu uz apsolutnu kvantifikaciju DNA u uzorku (engl. *quantitative real-time polymerase chain reaction, Q-real time PCR*).

Za određivanje ovih mutacija korišten je komplet reagensa TheraScreen®: K-RAS Mutation Kit CE-IVD, proizvođača DxS Diagnostics (Manchester, Velika Britanija), na uređaju Roche LightCycler®480 real-time *PCR* System, proizvođača Roche Diagnostics Ltd. Ovaj komplet reagensa koji nosi oznaku *CE-IVD* proizveden je u skladu s direktivom Europske Unije *European Union in vitro Diagnostic Medical Device Directive* 98/79/EC, a namijenjen je određivanju prisutnosti sedam najčešćih točkastih mutacija gena *KRAS* kvalitativnim mjerenjem mutacijskog statusa u uzorcima dobivenim izdvajanjem DNA iz tkiva uklopljenog u parafinske blokove. Detekcija mutacija metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu uz apsolutnu kvantifikaciju DNA u uzorku, zahvaljujući kombinaciji specifičnih PCR-početnica *ARMS* (engl. *amplification refractory mutation system*) i bifunkcionalnih molekula *Scorpions* koje sadrže PCR-početnice kovalentno vezane obilježenim probama, izuzetno je osjetljiva i ovisno o ukupnoj količini analizirane DNA, može detektirati 1% genetski promijenjene DNA (mutirane DNA) u pozadini normalne genomske DNA (divlji tip, engl. *wild-type*, WT).

2.4.1. Komplet reagensa za detekciju mutacija u genu *KRAS*

Komplet reagensa TheraScreen®: K-RAS Mutation Kit CE-IVD, proizvođača DxS Diagnostics (Manchester, Velika Britanija) sastoji se od jedne reakcijske smjese PCR-početnica/proba za kontrolnu reakciju i sedam različitih reakcijskih smjesa specfičnih PCR-početnica/proba za sedam mutacijskih reakcija. Jedan komplet reagensa dostatan je za ukupno 20 reakcija (slika 2.1). Materijal za kvantifikaciju uzorka DNA i detekciju mutacija u genu *KRAS*, osim kompleta reagensa TheraScreen®: K-RAS Mutation Kit CE-IVD podrazumijeva:

- Uređaj LightCycler® 480 Instrument II
- LightCycler®Instrument Software od Roche Diagnostics
- Reakcijske PCR-pločice s 96 jažica volumena 0,2 mL
- Sterilne epruvete za pripravu reakcijske smjese

- Pipete za pripremu reakcijske smjese za PCR
- Sterilnu vodu

Sve reakcije odvijaju se u jažicama volumena 0,2 mL na reakcijskoj pločici s 96 jažica.

Reagensi u TheraScreen®: K-RAS Mutation Kit CE-IVD	**Volumen (µL)**
Kontrolna reakcijska smjesa	1300
reakcijska smjesa12ALA	650
reakcijska smjesa12ASP	650
reakcijska smjesa12ARG	650
reakcijska smjesa12CYS	650
reakcijska smjesa12SER	650
reakcijska smjesa12VAL	650
reakcijska smjesa13ASP	650
Miješani standard	300
polimeraza *Taq* DNA	60

Slika 2.1. Sastav kompleta reagensa TheraScreen®: K-RAS Mutation Kit CE-IVD za kvantifikaciju i detekciju sedam različitih mutacija gena *KRAS* u uzorcima CRC

2.4.2. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu – *PCR* u stvarnom vremenu

Lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) je metoda koja omogućuje eksponencijalno umnažanje ciljanog dijela DNA u uvjetima *in vitro*. Preduvjet za njezinu primjenu je poznavanje slijeda nukleotida koji se želi umnožiti. Na osnovi tih podataka prema graničnim dijelovima slijeda nukleotida koji se želi umnožiti konstruiraju se PCR-početnice. Reakcijom PCR umnažaju se oba lanca DNA i to između slijeda nukleotida na koje su se vezale PCR-početnice. Reakcija teče zahvaljujući enzimu DNA-polimerazi u prisustnosti slobodnih nukleotida i optimalne koncentracije iona Mg^{2+} u reakcijskoj smjesi. Reakcija PCR sastoji se od većeg broja ciklusa, od 20 do 60, ovisno o zastupljenosti slijeda nukleotida u materijalu koji se koristi u reakciji. Svaki ciklus sastoji se od tri faze: (1) denaturacije koja se odvija pri temperaturi od 93-96 °C i dovodi do razdvajanja dvostrukih

molekula DNA, (2) sparivanja u kojoj se početni oligonukleotidi vežu na komplementarne jednolančane molekule DNA i (3) sinteze komplementarnih lanaca DNA u kojoj povišenje temperature na 72 °C aktivira enzim Taq-polimerazu (DNA-polimeraza otporna na povišene temperature). Po završetku reakcije uzorak bi trebao sadržavati 2^n kopija DNA slijeda nukleotida koji se želi umnožiti, pri čemu je *n* broj ciklusa. Kako bi se na uređaju omogućilo praćenje nastalog produkta PCR unutar određenog vremena i njegova analiza, klasični PCR je unaprijeđen korištenjem novih tehnologija. Tehnologija LightCycler (Roche Diagnostics) razvijena 1997. godine, vrlo je učinkovita u otkrivanju promjene jednog nukleotida u molekuli DNA, a najvažnija značajka ove tehnologije je odvijanje umnažanja i analize u istoj reakcijskoj posudi, što smanjuje rizik od kontaminacije. Tehnologija LightCycler kombinira brze temperaturne cikluse, koji se koriste i u standardnoj metodi PCR, s mjerenjem fluorescencije dobivenih produkata. Željeni ulomak DNA umnaža se i kvantificira u stvarnom vremenu pa je metoda nazvana lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *real-time PCR*). Produkt koji nastaje umnažanjem (amplikon) istovremeno se detektira oslobađanjem fluorescencije koja potječe od fluorescentno obilježenih proba ili DNA boje. Pod izrazom "u stvarnom vremenu" podrazumijeva se mogućnost procjene umnažanja željenog ulomka DNA nakon svakog ciklusa umnažanja. Dva su opća pristupa u izvedbi *PCR* u stvarnom vremenu: upotreba alel-specifičnih probi ili analiza krivulje taljenja nakon PCR (113). Ovisno o izvedbi uređaja i njegovoj programskoj podršci, mogu se koristiti različite analitičke metode. LightCycler je uređaj za PCR u kombinaciji s mikrovolumnim fluorimetrom, opremljen prikladnim programom za brzu i točnu analizu podataka. Reakcija se može pratiti na zaslonu za vrijeme ciklusa kao prikaz fluorescencije nastalih produkata PCR.

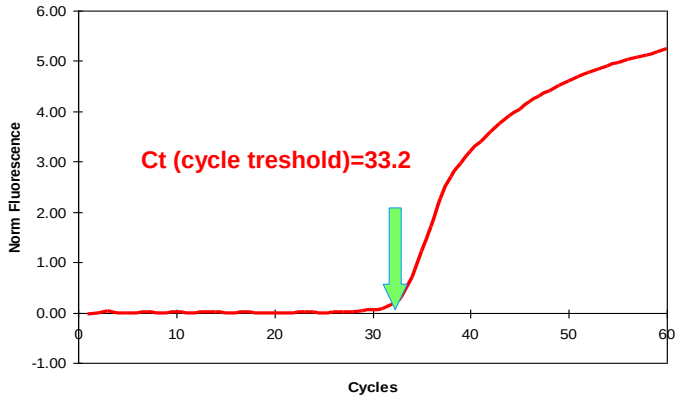
2.4.3. Apsolutna kvantifikacija ukupne DNA u uzorku

Kako bi se odredila količina ukupne izdvojene genomske DNA u uzorku kojeg želimo analizirati na mutacije na uređaju LightCycler®480 Instrument II radi se apsolutna kvantifikacija bez standarda. U ovom kompletu reagensa ne nude se vanjski standardi poznate koncentracije DNA preko kojih bi se odredila apsolutna koncentracija DNA u našem uzorku, već se pomoću softverske aplikacije LightCycler®Instrment Software početna količina DNA u uzorku automatski izračunava metodom drugoga derivacijskog maksimuma (engl. *second derivative maximum*) i izražava kao broj ciklusa PCR u kontrolnoj reakciji (slika 12).

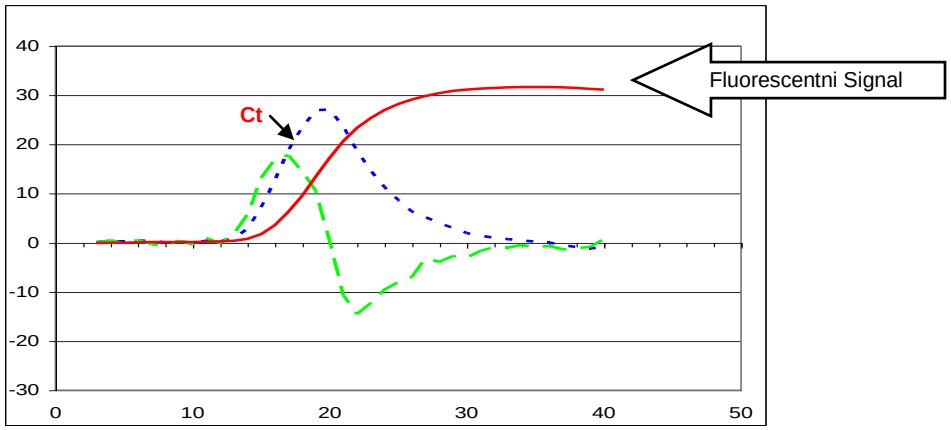
Za kvantifikaciju uzorka, volumen reakcijske smjese je 25 μL, a sastoji se od 19,8 μL kontrolne reakcijske smjese (PCR-početnica specifična za ekson 4 gena *KRAS* i

bifunkcionalne molekule *Scorpions* za kontrolnu reakciju) i 0,2 μL Taq-polimeraze. U prvu jažicu dodaje se 5 μL pozitivne kontrole, u drugu 5 μL negativne kontrole, a zatim po 5 μL uzorka izdvojene DNA koja se stavlja u svaku sljedeću jažicu. Nakon pipetiranja, pločica s reakcijskim smjesama stavlja se u uređaj LightCycler®480 Instrument II i pokreće se program za apsolutnu kvantifikaciju. Prvi korak je zagrijavanje i denaturacija uzorka 4 min pri 95 °C. Drugi korak je umnažanje kroz 45 ciklusa s denaturacijom od 30 s pri 95 °C i sparivanjem od 1 min pri 60 °C. Nakon sparivanja fluorescentno obilježene probe i produkta PCR, reakcijska smjesa se obasjava svjetlom i emitira se fluorescencija koja se mjeri pomoću kombiniranih filtra pri valnim duljinama 465-510 nm i 533-580 nm.

U kontrolnoj reakciji normalne PCR-početnice vežu se za normalni slijed DNA u eksonu 4 gena *KRAS* jer se smatra da u tom eksonu nema nepoznatih polimorfizama, a molekule *Scorpions* osim kao početnice služe za obilježavanje reakcije fluorescencijom. Koristeći PCR-početnice komplementarne normalnom slijedu nukleotida u molekuli DNA na eksonu 4 gena *KRAS* i molekule *Scorpions* (bifunkcionalne molekule koje sadrže PCR-početnice kovalentno vezane probama obilježenima s FAM engl. *phosphoramidite*), umnoži se zadani slijed eksona 4, pri čemu se određuje broj ciklusa PCR potrebnih da se početna DNA uzorka umnoži toliko da se pojavi fluorescentni signal krivulje nastajanja produkta (engl. *amplification curve*) u uzorku iznad baznog signala bazne krivulje nastajanja, što je ujedno i mjera ciljnih molekula DNA prisutnih u uzorku (slika 2.2). Točka u kojoj se taj signal detektira naziva se Ct (engl. *cycle threshold*) i izračunava se pomoću programa LightCycler®Instrument Software (slika 2.3). Uzorak se prihvaća ukoliko je Ct uzorka u kontrolnoj reakciji od 24 do 38 jer to znači da u početnom uzorku imamo dovoljno DNA za analizu prisutnosti mutacija (ako je veći, tada se neće moći detektirati 1% mutirane DNA u uzorku, a ako je manji, uzorak je potrebno razrijediti). Preporučena optimalna koncentracija DNA je ekvivalentna vrijednosti Ct unutar intervala od 24 do 29 u kontrolnoj reakciji za uzorak. Ako je taj interval od 29 do 35, tada je moguće da se neće detektirati mali broj mutacija u uzorku, a ako je od 35 do 38 tada je prisutan mali broj kopija traženog odsječka u uzorku te će se mutacije otkriti samo ako je većina kopija mutirana.



Slika 2.2. Točka u kojoj započinje eksponencijalni porast fluorescencije produkta PCR nastalog u reakciji zove se *cycle treshold* i izračunava se pomoću programa LightCycler® Instrument Software



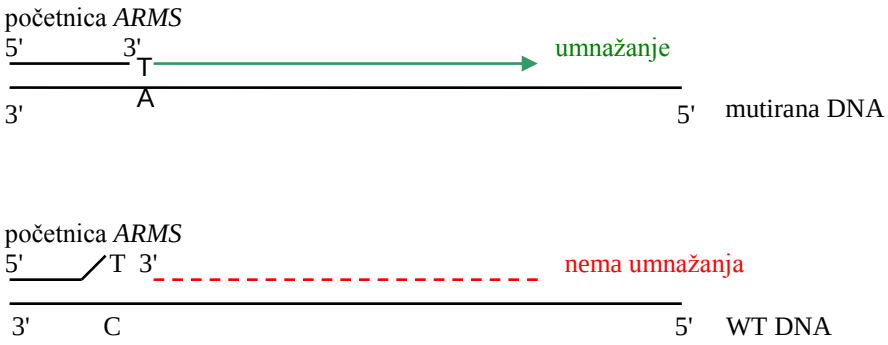
Slika 2.3. Automatsko izračunavanje broja ciklusa PCR nakon kojeg započinje eksponencijalni rast fluorescencije produkta PCR, metodom prvog (plava linija) i drugog (zelena linija) derivativnog maksimuma (prema Uputama za korištenje uređaja (114))

U postupku kvantifikacije, osim uzoraka humane genomske DNA, istovremeno se koriste negativna (engl. *No Template Control*, kratica NTC) i pozitivna kontrola (engl. *Mixed Standard*). Negativna kontrola je sterilna voda. Pozitivna kontrola je tzv. miješani standard, ponuđen od proizvođača, a sadrži sve genski promijenjene (mutirane) sekvence koje se ovom metodom mogu identificirati. Izmjerene vrijednosti Ct u kontrolnoj reakciji negativne kontrole ne smiju pokazivati umnažanje (FAM Ct>40, HEX Ct≠0). Pozitivna kontrola u kontrolnoj reakciji mora dati Ct (FAM) ≤ 29 na uređaju LightCycler®480 Instrument II. Podaci se ne smiju koristiti za daljnju obradu ako ove dvije kontrole nisu zadovoljene. FAM i

HEX su dvije različite fluorescentne boje kojima su obilježene probe, a njihova fluorescencija koja se oslobađa u reakciji PCR mjeri se pri različitim valnim duljinama.

U kontrolnoj reakcijskoj smjesi, kao i u ostalim mutacijskim reakcijskim smjesama, nalazi se i unutarnja kontrola (engl. *internal control*). Pomoću reakcijske krivulje unutarnje kontrole potvrđuje se točnost rada i uspješnost testa i provjerava prisutnost inhibitora u reakciji, zbog čega rezultat može biti lažno negativan. Kao unutarnja kontrola koristi se sintetska ciljna DNA (plazmidna DNA), specifična PCR-početnica *ARMS* i *Scorpions* PCR-početnica obilježena s HEX (engl. *hexachloro-fluorescein*), za razliku od *Scorpions*-molekula u kontrolnoj i mutacijskoj reakciji koje su obilježene s FAM (engl. *phosphoramidite*), čime je omogućeno da se fluorescencija čita na dva različita kanala (HEX i FAM), odnosno na različitim filtrima .

Nakon postupka kvantifikacije, samo oni uzorci koji sadrže dovoljno početne DNA koriste se za određivanje prisutnosti mutacija. Na normalni slijed DNA, veže se normalna PCR-početnica koja služi u kontrolnoj reakciji za kvantifikaciju DNA u uzorku, dok se na slijed koji nosi točkastu mutaciju vežu PCR-početnice *ARMS* specifične za svaku pojedinu mutaciju i služe za određivanje prisutnih mutacija. Dakle, umnažanje genski promijenjene DNA moguće je samo kada se specifična PCR-početnica *ARMS* u potpunosti podudara s DNA-kalupom (slika 2.4). Na 3' kraju PCR-početnice *ARMS* nalazi se nukleotid komplementaran promijenjenom nukleotidu u sekvenci DNA (DNA-kalupu) na koju se početnica specifično veže.



Slika 2.4. Specifične PCR-početnice *ARMS* vežu se na mjesto gdje je prisutna točkasta mutacija (promijenjena baza) u smjeru 3'-5'.

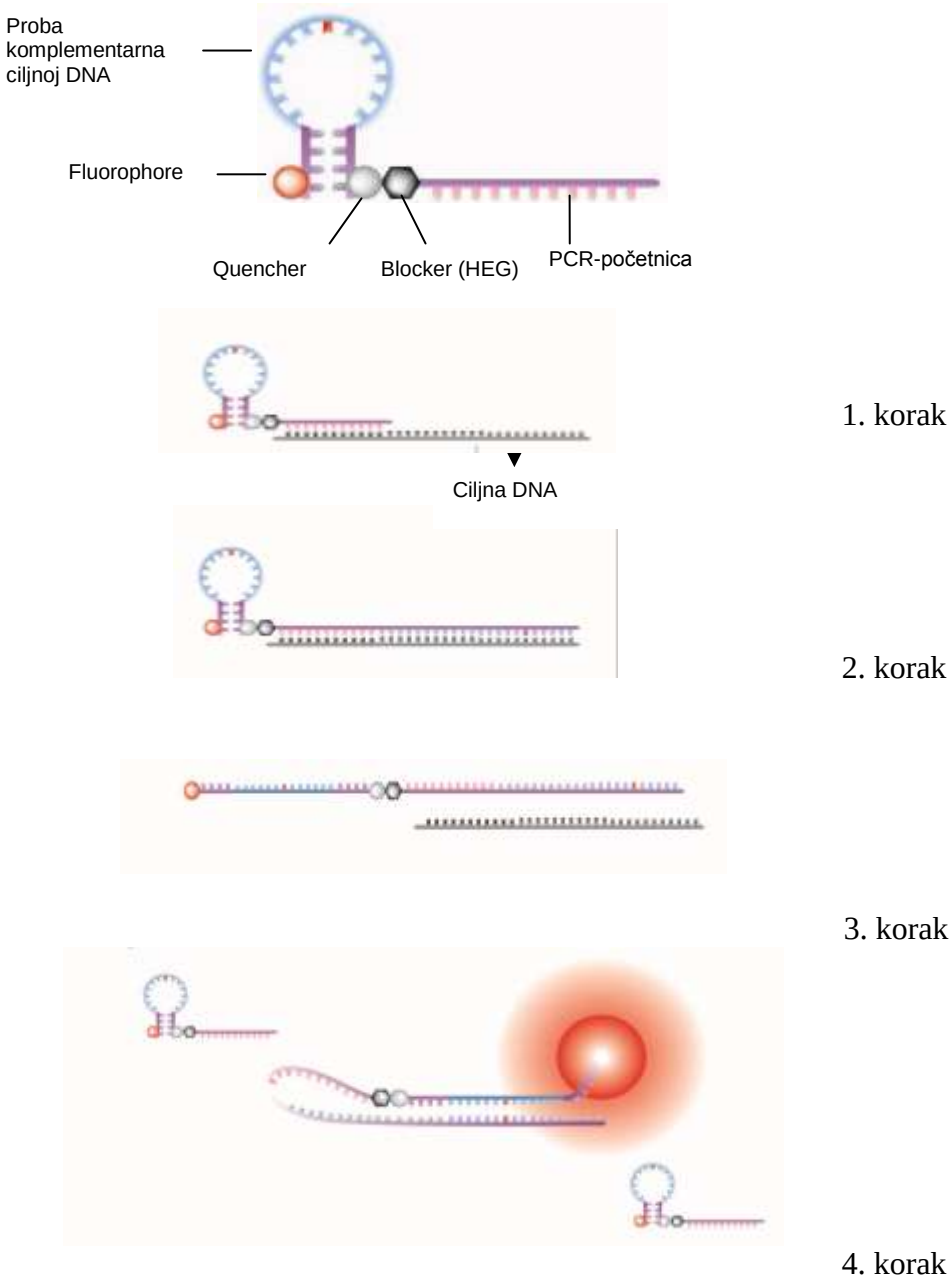
Za identifikaciju sedam različitih mutacija korištenjem PCR-početnica i proba *ARMS* i *Scorpions* koristili smo sedam različitih specifičnih PCR-početnica *ARMS*. Kako bi se postiglo potpuno iskorištenje kompleta reagensa, istovremeno se stavlja u uređaj i pokreće reakcija za pozitivnu kontrolu (MIX Stand), negativnu kontrolu (NTC) i 10 uzoraka tumora, čime se ispuni cijela reakcijska PCR-pločica s 96 jažica, kao što je prikazano na slici 2.5.

Reakcijska pločica s 96 jažica												
TEST	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A Kontrola	MIX Stand	NTC	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3	Uzorak 4	Uzorak 5	Uzorak 6	Uzorak 7	Uzorak 8	Uzorak 9	Uzorak 10
B Gly12Ala	MIX Stand	NTC	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3	Uzorak 4	Uzorak 5	Uzorak 6	Uzorak 7	Uzorak 8	Uzorak 9	Uzorak 10
C Gly12Asp	MIX Stand	NTC	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3	Uzorak 4	Uzorak 5	Uzorak 6	Uzorak 7	Uzorak 8	Uzorak 9	Uzorak 10
D Gly12Arg	MIX Stand	NTC	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3	Uzorak 4	Uzorak 5	Uzorak 6	Uzorak 7	Uzorak 8	Uzorak 9	Uzorak 10
E Gly12Cys	MIX Stand	NTC	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3	Uzorak 4	Uzorak 5	Uzorak 6	Uzorak 7	Uzorak 8	Uzorak 9	Uzorak 10
F Gly12Ser	MIX Stand	NTC	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3	Uzorak 4	Uzorak 5	Uzorak 6	Uzorak 7	Uzorak 8	Uzorak 9	Uzorak 10
G Gly12Val	MIX Stand	NTC	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3	Uzorak 4	Uzorak 5	Uzorak 6	Uzorak 7	Uzorak 8	Uzorak 9	Uzorak 10
H Gly13Asp	MIX Stand	NTC	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3	Uzorak 4	Uzorak 5	Uzorak 6	Uzorak 7	Uzorak 8	Uzorak 9	Uzorak 10

Slika 2.5. Pripremljena reakcijska PCR-pločica koja se stavlja u uređaj za određivanje mutacija gena *KRAS* u uzorcima CRC

Na mjesto umnažanja željenog odsječka, osim specifične PCR-početnice *ARMS* koja se veže za promijenjeni slijed nukleotida (za mutiranu sekvencu) u smjeru 3'-5' (engl. *forward*), sa suprotne strane u smjeru 5'-3' (engl. *reverse*) veže se i PCR-početnica *Scorpions* koja je preko molekule koja blokira fluorescenciju (engl. *blocker*) vezana za strukturu poput petlje (engl. *stem-loop structure*). Blokirajuća molekula je po svojoj strukturi heksaetilen-glikol (HEG) i osigurava PCR-početnici jednolančani oblik. Osim PCR-početnice, petlja sadrži i molekulu koja fluorescira (engl. *fluorophor*) i molekulu koja blokira fluorescenciju (engl. *quencher*). Sve zajedno čini *Scorpion*-molekulu. Kada je sekundarna struktura molekule postojana kao na slici 2.6, fluorescencija se ne emitira. U početku reakcije PCR proba ne fluorescira jer se molekula koja fluorescira (*Fluorophore*) i molekula koja blokira fluorescenciju (*Quencher*) nalaze jako blizu. Tek na kraju reakcije, kad se te molekule

razdvoje uslijed interne reorganizacije *Scorpions*-molekule, dolazi do emisije svjetla (slika 2.6).



Slika 2.6. Struktura bifunkcionalne *Scorpions*-molekule koja služi kao PCR-početnica i kao fluorescentno obilježena proba; preuzeto iz LC480 Training Manual

Specifične PCR-početnice *ARMS* vežu se na DNA-kalup u smjeru 3'-5', dok se PCR-početnice *Scorpions* vežu u suprotnom smjeru 5'-3'. U svim reakcijama koriste se iste *Scorpions*-molekule osim u kontrolnoj reakciji gdje se koriste *Scorpions*-molekule koje stvaraju kraće umnožene produkte od onih u mutacijskim rekcijama. PCR-početnica

Scorpions veže se u smjeru 5'-3' od ciljne sekvence (1. korak). Kada se PCR-početnica *Scorpions* produži djelovanjem DNA-polimeraze, tada se kopira ciljni slijed. Taj kopirani slijed komplementaran je probi koja se nalazi u petlji *Scorpions*-molekule. Nakon kopiranja ciljnog slijeda, blokirajuća skupina zaustavlja DNA-polimerazu (2. korak). Porastom temperature u reakciji PCR dolazi do denaturacije PCR-početnice *Scorpions* (3. korak). Hlađenjem reakcije PCR dolazi do reorganizacije denaturirane *Scorpions*-molekule na način da se hibridizira sa samom sobom na mjestu gdje je proba komplementarna ciljnom DNA slijedu. Time dolazi do udaljavanja *fluorophora* i *quenchera* te započinje emisija svjetla. Preostale nedenaturirane *Scorpions*-molekule ponovno zauzimaju svoju sekundarnu strukturu i ne emitiraju svjetlo (4. korak).

2.4.4. Metoda analize podataka – ΔCt

Određivanje prisutnosti mutacija metodom kvantitativnog *PCR* u stvarnom vremenu uz korištenje početnica/proba *ARMS* i *Scorpions* temelji se na broju ciklusa PCR potrebnih da se u reakciji pojavi fluorescentni signal iznad baznog signala, koji je mjera ciljnih molekula DNA prisutnih u uzorku. Točka u kojoj se taj signal detektira naziva se *cycle threshold* (Ct) i izračunava se pomoću programa LightCycler®Instrument Software. I kontrolna i mutacijska reakcija svakoga pojedinog uzorka imaju svoj Ct. Za svaki uzorak izračunava se razlika između Ct mutacijske i kontrolne reakcije, odnosno ΔCt. Prema vrijednosti ΔCt uzorci se klasificiraju kao pozitivni ili negativni za svaku pojedinu mutaciju. Za svaku mutacijsku reakciju postavljena je granična brojčana vrijednost (engl. *cut-off*) koja predstavlja 1% ΔCt. Uzorci kod kojih je vrijednost ΔCt mutacijske reakcije manja od vrijednosti 1% ΔCt za tu reakciju smatraju se pozitivnim za dotičnu mutaciju. I obrnuto, ako je vrijednost ΔCt mutacijske reakcije veća od 1% ΔCt za tu reakciju, uzorak se smatra negativnim za dotičnu mutaciju, odnosno uzorak može sadržavati manje od 1% mutiranih stanica koje se ovom metodom ne mogu detektirati (ispod granice osjetljivosti). Vrijednosti 1% ΔCt zadane su od proizvođača.

Zahvaljujući programu koji izračunava ΔCt i 1% ΔCt te ih izražava kao brojčane vrijednosti, nema ni najmanje subjektivnosti u interpretaciji rezultata za mutacije *KRAS* koje se dokazuju kompletom reagensa TheraScreen®K-RAS Mutation Kit CE-IVD na uređaju LightCycler®480 Instrument II.

2.4.5. Certifikat

S ciljem da se u Europi osigura pouzdano, ujednačeno i vjerodostojno testiranje gena *KRAS* na mutacije, postavljena je shema za provođenje vanjske kontrole kvalitete u kojoj je 2009. godine po prvi put sudjelovalo 59 laboratorija iz osam europskih zemalja (EQA). Laboratorij u kojem se radi testiranje na mutacije gena *KRAS* mora sudjelovati u vanjskoj kontroli kvalitete (engl. *External Quality Assessment*, kratica EQA) i imati certifikat za obavljanje te pretrage. Klinička jedinica za molekularnu dijagnostiku Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb sudjeluje u vanjskoj, međunarodnoj kontroli kvalitete i posjeduje međunarodni certifikat ovlaštenog laboratorija KRAS-Expert Laboratory^{LMU} (*Pathologisches Institut, Ludwig-Maximilians Universität München*).

2.5. Određivanje prisutnosti točkaste mutacije gena *BRAF*

Za određivanje prisutnosti jedne najčešće točkaste mutacije u eksonu 15 gena *BRAF* tj. p.Val600Glu (c.1799T>A), korištena je metoda lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *real-time polymerase chain reaction, PCR* u stvarnom vremenu) i komplet reagensa LightMix®KitBRAF V600E (TIB MOLBIOL, Njemačka), na uređaju LightCycler 2.0 real-time PCR System, proizvođača Roche, Njemačka. Kao rezultat analize fluorescencije krivulje taljenja (engl. *fluorescence melting curve analysis*, FMCA) pomoću programa LightCyclerSoftwere LCS4.1.1.21 dobivaju se temperature taljenja preko kojih se identificira mutirani, odnosno divlji tip željenog ulomka gena *BRAF*. Mutacija p.Val600Glu gena *BRAF* određena je iz istog početnog uzorka DNA koji je kvantificiran i iz kojeg su prethodno određene mutacije gena *KRAS*. Koncentracija DNA u uzorku za analizu mutacije gena *BRAF* izmjerena je spektrofotometrijski pri valnoj duljini 260 nm i bila je od 50 ng/µL do 200 ng/µL. Reakcija PCR rađena je s volumenom uzorka 5 µL, što znači da je u reakciji bilo ukupno od 250-1000 ng početne DNA.

2.5.1. Metoda *PCR* u stvarnom vremenu uz analizu krivulje taljenja

U ovoj metodi se koriste specifične PCR-početnice koje omogućuju umnažanje željenog ulomka te hibridizacijske probe obilježene bojama Fluorescein i LightCycler®Red 640, koje služe za obilježavanje nastalog produkta fluorescencijom.

Sve reakcije PCR izvode se u ukupnom volumenu od 20 µL u originalnim staklenim kapilarama koje kasnije idealno služe kao kivete za mjerenje fluorescencije. Slijed nukleotida u PCR-početnicama zaštićen je od strane proizvođača i nismo ga u mogućnosti specificirati.

Reakcija PCR odvijala se u volumenu od 20 µL kojeg je činilolo 10,4 µL redestilirane vode, 1,6 µL 25mM otopine $MgCl_2$ i 2,0 µL FastStart Taq DNA-polimeraze (LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe, Roche), 1,0 µL smjese specifičnih PCR-početnica i hibridizacijskih proba (LightMix®KitBRAF V600E, TIB MOLBIOL), te 5 µL izdvojene DNA u puferu. Prema programu na uređaju LightCycler 2.0 Real-time PCR System, umnažanje željenog ulomka veličine 212 pb odvijalo se u četiri koraka: (1) pre-inkubacija 10 min pri 95 ºC prije početka ciklusa umnažanja, (2) umnažanje ciljne DNA kroz 50 ciklusa PCR, a svaki ciklus PCR podrazumijeva 5 sekundi denaturacije pri 95 ºC, sparivanje PCR-početnica s komplementarnim sljedovima u jednolančanoj molekuli DNA 15 sekundi pri 58 ºC (engl. *annealing*), te sinteza komplementarnih lanaca, odnosno polimerizacija Taq-polimerazom 50 sekundi pri 72 ºC (elongacija), (3) vezanje hibridizacijskih proba za nastale produkte PCR: nakon denaturacije koja traje 20 sekundi pri 95 ºC, dolazi do hlađenja rekacijske smjese pri čemu se hibridizacijske probe vežu za umnoženi jednolančani ulomak DNA na specifični slijed tijekom 20 sekundi pri 58 ºC i 20 sekundi pri 40 ºC – tada su boje najbliže jedna drugoj, dolazi do prijenosa energije i pojave fluorescencije, nakon toga temperatura ponovno raste na 85 ºC, hibridizacijske se probe odvajaju od produkta PCR, njihovo međusobno udaljavanje dovodi do padanja intenziteta fluorescencije, odnosno tzv. taljenja (engl. *melting*), (4) hlađenje reakcijske smjese 30 sekundi pri 40 ºC (engl. *cooling*).

Korištene su dvije različito obilježene hibridizacijske probe: jedna hibridizacijska proba obilježena je na 3'-kraju bojom Fluorescein (boja donor), a druga hibridizacijska proba na 5'-kraju bojom LightCycler®Red 640 (boja akceptor). Probe se vežu za specifični slijed nastalog produkta PCR po sistemu 'glava-rep', pri čemu dvije boje dolaze u neposrednu blizinu. Fluorescein se ekscitira svjetlom LED-diode na LightCycleru i emitira zeleno fluorescentno svjetlo (λ = 500-560 nm)) čija energija zatim ekscitira boju LC Red 640 koja onda emitira crveno fluorescentno svjetlo (λ = 640-780 nm). Taj proces prijenosa energije s jedne boje na drugu naziva se FRET (engl. *fluorescence resonance energy transfer*). Intenzitet svjetla koje oslobađa boja LC Red 640 mjeri se u optičkoj jedinici uređaja Light Cycler 2.0 pri 640 nm; sa svakim porastom temperature od 0,2 ºC, taj intenzitet dostiže svoj maksimum na kraju svakog sparivanja tijekom jednog ciklusa PCR. Nakon sparivanja hibridizacijskih probi i produkta PCR (engl. *annealing*), temperatura reakcije raste i hibridizacijske se probe otpuštaju s produkta PCR za vrijeme produljivanja lanca Taq-polimerazom (elongacija) dok se konačno toliko ne udalje da međusobno ne mogu prenositi energiju i emitirati fluorescenciju.

Svaki produkt PCR koji se sastoji od dvolančane molekule DNA ima svoju specifičnu temperaturu taljenja (engl. *melting temperature*, Tm) koja se definira kao temperatura na kojoj 50% molekula dvolančane DNA poprimi jednolančani oblik. Najvažniji čimbenik koji određuje temperaturu taljenja je sadržaj nukleotida GC u produktu PCR kojeg analiziramo. Nakon sparivanja hibridizacijskih probi i produkta PCR, reakcijska smjesa postupno se sporo zagrijava do 95 ºC pri čemu se, u intervalima, mjeri nastala fluorescencija i nastaje krivulja taljenja. Kako se veći broj molekula dvolančane DNA denaturira, tako fluorescencija počinje naglo nestajati. Temperatura taljenja vizualizira se korištenjem prve negativne derivacije krivulje taljenja (-dF/dT). Negativnom derivacijom fluorescencije koja nestaje prilikom reakcije taljenja dobivamo vrh mekšanja (engl. *melting peak*) na specifičnoj temperaturi. Obilježena proba jače se veže za mutirani alel te je točka mekšanja, odnosno temperatura razdvajanja fluorescentne hibridizacijske probe i produkta PCR za nemutirani alel gena *BRAF* niža i iznosi 53 ^{o}C, dok je za mutirani viša i iznosi 61 ^{o}C. U svakoj pokrenutoj seriji uzoraka imali smo negativnu (DNA zdrave sluznice debelog crijeva) i pozitivnu kontrolu (plazmidna DNA ponuđena od proizvođača).

Metoda *PCR* u stvarnom vremenu koju smo koristili za detekciju mutacije p.Val600Glu gena *BRAF* modificirana je dodavanjem specifične molekule u reakciju PCR (engl. *locked DNA*, lDNA) čiji je slijed nukleotida komplementaran nemutiranom slijedu nukleotida (WT). Na taj se način sprječava umnažanje alela WT i povećava osjetljivost detekcije mutiranog alela gena *BRAF*. Uvođenjem takve modifikacije gdje se metodom kompeticije sprječava umnažanje WT alela (engl. PCR-*clamp approach*), postiže se osjetljivost manja od 1%. Prijavljena osjetljivost kompleta reagensa LightMix®KitBRAF V600E (TIB MOLBIOL, Njemačka) je 0,2% mutirane DNA u odnosnu na normalnu. Kao rezultat ovakvog pristupa nastaju krivulje umnažanja i taljenja samo za produkt koji je nastao umnažanjem mutiranog alela (Tm 61 ^{o}C). Međutim, kada nema signala za WT, teško je razlučiti rezultat za WT od neuspješnog umnažanja zbog nedovoljne količine DNA u uzorku ili prisutnosti inhibitora reakcije. Samo onda kada je količina lDNA nedovoljna za blokiranje umnažanja velike količine WT u uzorku, dobivaju se rezultati i za WT (Tm 53 ^{o}C). U uzorcima u kojima rezultat za WT nije bio jasan, kao i u svim uzorcima u kojima je dobiven pozitivan rezultat za mutaciju p.Val600Glu metodom *PCR* u stvarnom vremenu, kao potvrdna metoda korištena je metoda direktnog sekvenciranja po Sangeru.

2.5.2. Sekvenciranje regije gena *BRAF*

Metoda sekvenciranja molekule DNA zasniva se na zaustavljanju enzimske sinteze lanca DNA ugradnjom dideosiribonukleozid-trifosfata pa se ova metoda, osim Sangerovom, naziva još i enzimskom dideoksi-metodom. Prirodni supstrati za sintezu DNA su deoksiribonukleozid-trifosfati (dNTP) dATP, dCTP, dGTP i dTTP. Sinteza DNA odvija se u 5' → 3' smjeru, a preduvjet za sintezu je postojanje početnice koja pronalazi sebi homologan slijed i čijim produžavanjem nastaje novi lanac DNA. DNA-polimeraze, enzimi koji sintetiziraju DNA, mogu ugraditi u rastući lanac i analoge dNTP-ova, dideoksiribonukleozid-trifosfate (ddNTP) koji nemaju hidroksilnu skupinu na 3'-položaju deoksiriboze pa nakon njihove ugradnje, zbog nemogućnosti uspostavljanja nove fosfodiesterske veze, dolazi do zaustavljanja daljnje sinteze DNA.

Regija gena *BRAF* (ekson 15) umnožena je početnicama BRAF 15F (5'-TCA TAA TGC TTG CTC TGA TAG GA) i BRAF 15R (5'-GGCCAA AAA TTT AAT CAG TGG)[111]. Reakcija je sadržavala reakcijski pufer1X Promega GoTaq, 3 mM $MgCl_2$, 0,1 mM koncentraciju svakog deoksinukleotida (dNTP, odnosno dATP, dGTP, dCTP i dTTP), 0,2 μM koncentraciju svake početnice, 100 ng genomske DNA, te 0,125 U GoTaq DNA-polimeraze (Promega). Reakcija PCR provedena je pod sljedećim uvjetima: 3 min pri 94 ^{o}C, 40 ciklusa koji su uključivali 20 sekundi pri 94 ^{o}C, 20 sekundi pri 60 ^{o}C, 30 sekundi pri 72 ^{o}C, te završno produljenje od 7 min pri 72 ^{o}C. Umnoženi ulomci su veličine 224 pb, analizirani su u 2%-tnom gelu agaroze te su pročišćeni kolonicama (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega). Slijed nukleotida pročišćenih produkata PCR određen je na uređaju *ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer* DNA sekvenatoru (Applied Biosystems).

Za sekvenciranje pročišćenog produkta PCR (ulomak od interesa) koristi se komplet reagenasa *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* s fluorescentno obilježenim dideoksinukleotidima i metoda kapilarne elektroforeze za razdvajanje ulomaka DNA. Tijekom reakcije sekvenciranja na produkt PCR nasumično se vežu deoksinukleotidi i dideoksinukleotidi, a svaki od četiri vrste dideoksinukleotida obilježen je različitom fluorescentnom bojom (Big-d110, R6G, Big-dTAMRA i Big-dROX). Prilikom vezivanja fluorescentno označenih dideoksinukleotida na kalup DNA prekida se sinteza komplementarnog lanca DNA (engl. *chain termination method*). Na taj način svaki novostvoreni lanac ima fluorescentno obilježen nukleotid na svom kraju. Postupak sekvenciranja odvija se u nekoliko koraka.

Reakcija sekvenciranja: Sekvenciranje svakog ulomka DNA provodi se u oba smjera. Reakcija se odvija u termobloku u 25 ciklusa pod sljedećim uvjetima: početna denaturacija 1 min pri 96 ^{o}C, 25 ciklusa koji su uključivali denaturaciju 10 sekundi pri 96 ^{o}C, sparivanje početnica 5 sekundi pri 50 ^{o}C i produljivanje lanca 4 min pri 60 ^{o}C.

Pročišćavanje produkta reakcije sekvenciranja: Po završetku reakcije sekvenciranja u reakcijsku smjesu se dodaje 2 μL 3 M natrij-acetat, 2 μL 125 mM EDTA (etilen-diamino-tetraoctena kiselina) i 50 μL 100% etanola, što uklanja ostatke kompleta za sekvenciranje i višak dNTP, te taloži DNA. Dobiveni talog se resuspendira u 10% formamidu. Prije nanošenja, dobiveni uzorak se denaturira 2 min pri 95 ^{o}C, nakon čega uzorci ostaju u ledu sve do nanošenja u uređaj za kapilarnu elektroforezu.

Kapilarna elektroforeza: Kapilarna elektroforeza odvija se na uređaju *ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer*. Tijekom elektroforeze negativno nabijeni ekstenzijski produkti nastali reakcijom sekvenciranja ulaze u kapilaru kao posljedica elektrokinetičke injekcije. Ekstenzijski produkti putuju kroz kapilaru ispunjenu tekućim polimerom kao medijem za razdvajanje ulomaka DNA po veličini. Malo prije dolaska do pozitivne elektrode, fluorescentno obilježeni ulomci DNA prolaze dio kapilare kojeg osvjetljuje laserski snop. Laserska zraka uzrokuje fluorescenciju obilježenih dideoksinukleotida u ulomcima DNA. Optički detektor na instrumentu bilježi tu fluorescenciju. CCD kamera pretvara informaciju o fluorescenciji u elektronički signal koji se prenosi na računalo i obrađuje *ABI-PRISM-Avant Genetic Analyzer Data Collection Software Version 2.0*, te prikazuje u obliku kromatograma. Ovaj proces elektroforeze može razdvojiti ekstenzijske produkte po veličini u rezoluciji jedne baze.

2.6. Statistička obrada rezultata

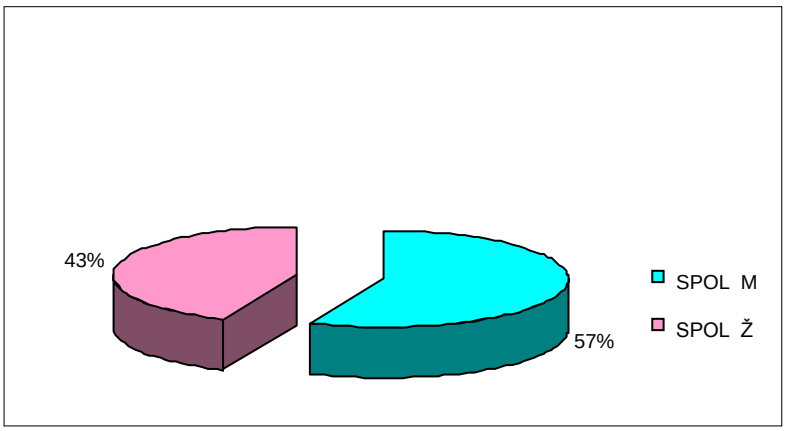
Rezultati analize prisutnosti mutacija gena *KRAS* i *BRAF* u uzorcima tumora uspoređivani su s obzirom na spol i dob oboljelih, veličinu tumora, stadij bolesti po Dukes'u, histološki stupanj diferencijacije tumora (gradus), prisutnost angioinvazije u tumoru i smještaj primarnog tumora. Rezultati ovih analiza prikazani su u tablicama i grafikonima. Za ispitivanje normalnosti raspodjele podataka o dobi bolesnika i veličini tumora primjenjen je Kolmogorov-Smirnovljev test. Za ispitivanje razine značajnosti razlike između dviju skupina nezavisnih kategoričkih podataka gdje su očekivane frekvencije vrlo male (pa čak i ako je u pojedinoj skupini očekivana frekvencija 0) primjenjen je Fisherov test, statističkom obradom podataka u programu MedCalc v9.3.2.0. Razina statističke značajnosti je 0,05, a rezultat testiranja $p < 0,05$ smatra se statistički značajnim.

3. REZULTATI

3.1. Patohistološke karakteristike tumora

Istraživanje se temelji na analizi 113 uzoraka karcinoma debelog i završnog crijeva. Za svaki uzorak poznati su podaci o dobi i spolu oboljele osobe, veličini tumora, stadiju bolesti po Dukes'u, histološkom stupnju diferencijacije tumora, prisutnosti angioinvazije u tumoru i smještaju primarnog tumora.

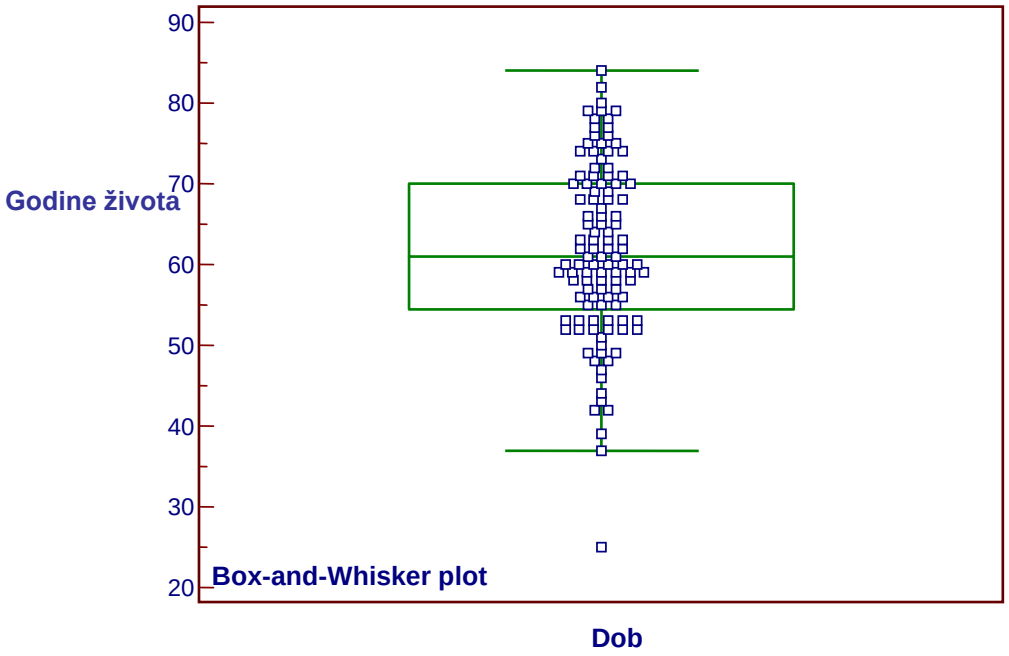
Od 113 oboljelih osoba 57% (64/113) ih je bilo muškog, a 43% (49/113) ženskog spola, u dobi od 25. do 84. godine života (slike 3.1 i 3.2).



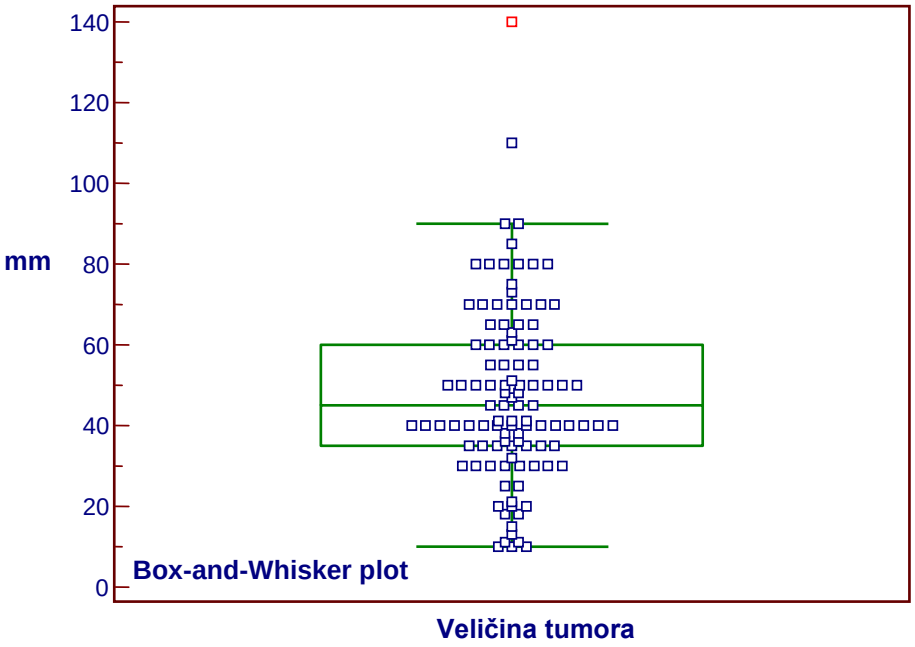
Slika 3.1. Raspodjela uzoraka karcinoma prema spolu oboljelih osoba

Prema Kolmogorov-Smirnovom testu, raspodjela uzoraka karcinoma prema dobi oboljelih osoba slijedila je normalnu razdiobu (min = 25, max = 84, srednja vrijednost = 61,6, SD = 10,8) (slika 4.2).

Veličina karcinoma debelog crijeva bila je poznata za 107 uzoraka; iznosila je 10-140 mm. Prema Kolmogorov-Smirnovom testu, raspodjela uzoraka karcinoma prema veličini slijedila je normalnu razdiobu (min = 10, max = 140, srednja vrijednost = 47,7, SD = 22) (slika 3.3).



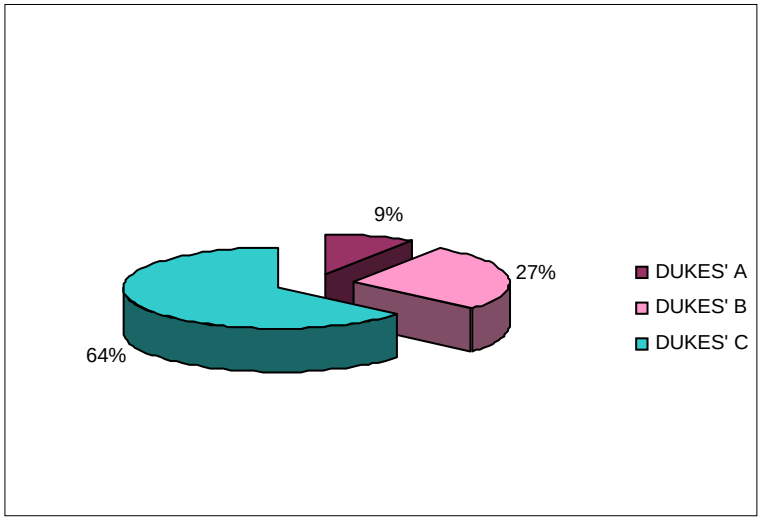
Slika 3.2. Raspodjela uzoraka tumora prema dobi oboljelih osoba



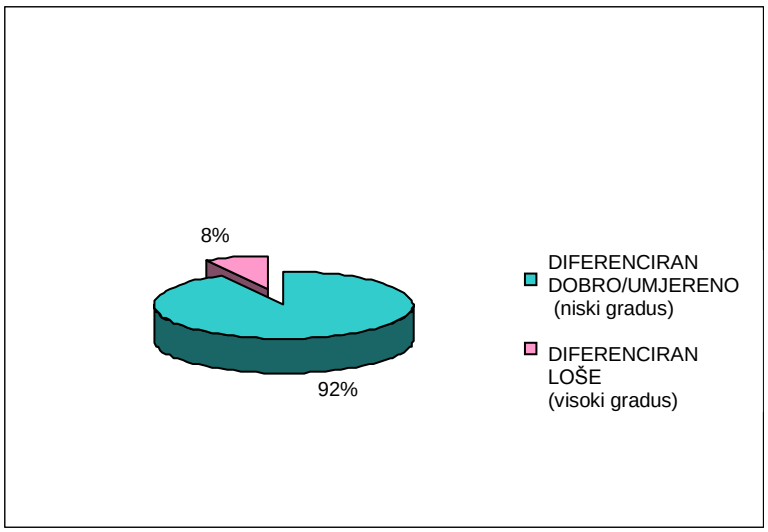
Slika 3.3. Raspodjela uzoraka tumora prema veličini

Od ukupno 113 uzoraka za šest uzoraka uzetih biopsijom nije bilo moguće odrediti stadij po Dukes'u. Od preostalih uzoraka 9% (10/107) ih je klasificirano u stadij Dukes'A, 27% (29/107) u stadij Dukes'B i, najviše uzoraka, u stadij Dukes'C 64% (68/107) (slika 3.4).

Od ukupnog broja uzoraka za dva, uzeta biopsijom, nije bio poznat histološki gradus. Raspodjelom preostalih uzoraka prema histološkom gradusu, nađeno je da ih je čak 92% (102/111) bilo niskog gradusa (dobro do umjereno diferencirani tumori), a 8% (9/111) visokog gradusa (loše diferencirani tumori) (slika 3.5).



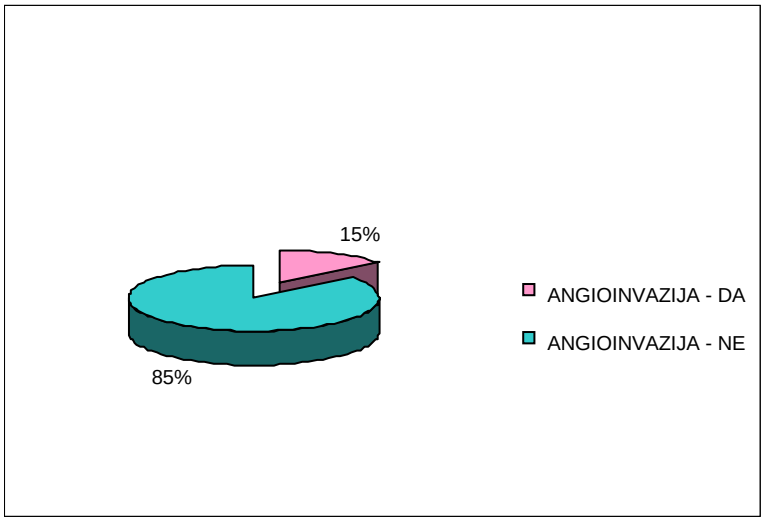
Slika 3.4. Raspodjela uzoraka tumora prema stadiju po Dukes'u



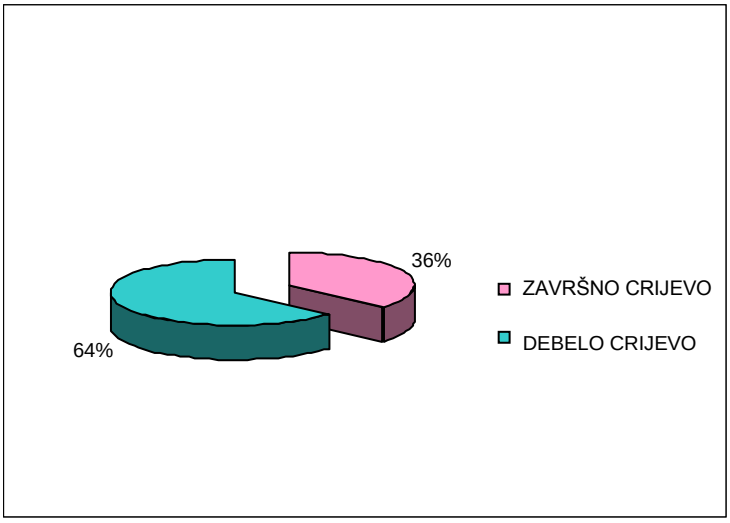
Slika 3.5. Raspodjela uzoraka tumora prema histološkom gradusu

Prisutnost angioinvazije analizirana je patohistološki i određena u 103 uzorka tumora. Nađena je u samo 15% (15/103) uzoraka. U ostalim uzorcima, 85% (88/103), nije nađena angioinvazija (slika 3.6).

Od ukupnog broja analiziranih tumora 36% (41/113) su bili karcinomi završnog, a 64% (72/113) karcinomi debelog crijeva (slika 3.7).



Slika 3.6. Raspodjela uzoraka prema prisutnosti angioinvazije



Slika 3.7. Raspodjela uzoraka prema smještaju primarnog tumora

3.2. Analiza prisutnosti točkastih mutacija gena *KRAS*

Prisutnost sedam točkastih mutacija gena *KRAS* utvrđena je analizom 113 karcinoma debelog i završnog crijeva. U tablici 3.4 prikazani su nazivi i položaj mutacije u kodirajućoj DNA.

Tablica 3.4. Sedam analiziranih točkastih mutacija gena *KRAS*

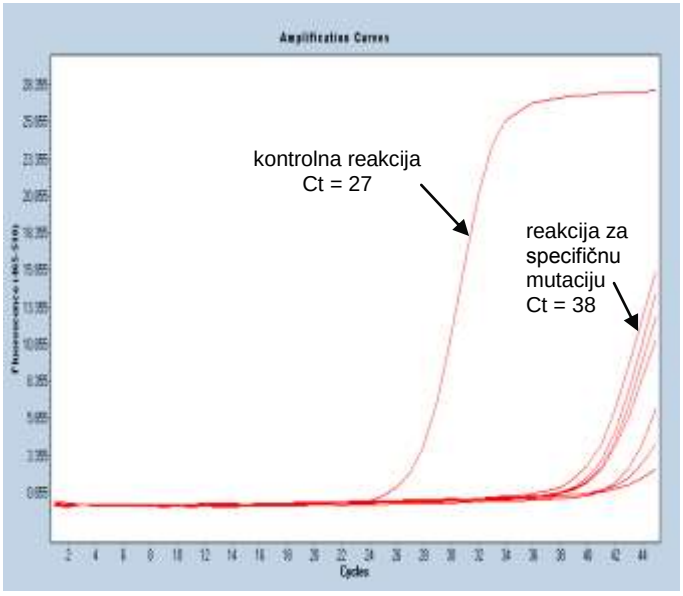
NAZIV MUTACIJE	PROMJENA BAZE
kodon 12	
p.Gly12Ala (p.G12A)	c.35G>C (G**G**T>G**C**T)
p.Gly12Asp (p.G12D)	c.35G>A (G**G**T>G**A**T)
p.Gly12Val (p.G12V)	c.35G>T (G**G**T>G**T**T)
p.Gly12Arg (p.G12R)	c.34G>C (**G**GT>**C**GT)
p.Gly12Cys (p.G12C)	c.34G>T (**G**GT>**T**GT)
p.Gly12Ser (p.G12S)	c.34G>A (**G**GT>**A**GT)
kodon 13	
p.Gly13Asp (p.G13D)	c.38G>A (G**G**C>G**A**C)

Za svaki uzorak dobiva se 8 reakcijskih krivulja. Svaka reakcijska krivulja ima izračunatu brojčanu Ct vrijednost. Razlika između Ct vrijednosti kontrolne reakcije i svake pojedine specifične mutacije je ΔCt. Proizvođač je odredio brojčanu vrijednost za donju granicu (1% ΔCt) za svaku pojedinu mutaciju, i rezultat manji od te vrijednosti smatra se pozitivnim, a rezultat veći od te vrijednosti negativnim za dotičnu mutaciju (tablica 3.5).

Tablica 3.5. Granične vrijednosti (1% ΔCt)

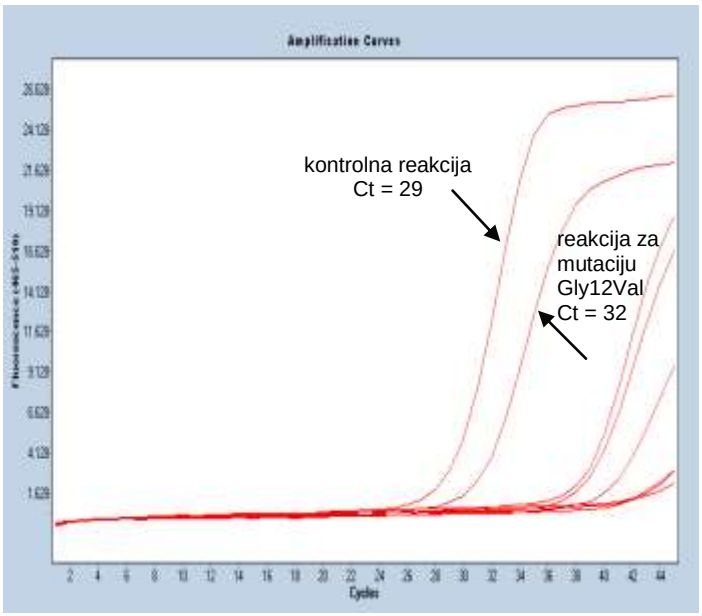
	1% ΔCt
p.Gly12Ala	**6,25**
p.Gly12Asp	**7,72**
p.Gly12Arg	**6,83**
p.Gly12Cys	**6,95**
p.Gly12Ser	**8,9**
p.Gly12Val	**6,5**
p.Gly13Asp	**9,09**

Kvantitativni *PCR* u stvarnom vremenu i krivulje nastajanja za uzorak negativan za svih sedam mutacija gena *KRAS* prikazani su na slici 3.8. Ct za kontrolnu reakciju je 27, a za najbližu reakcijsku krivulju mutacije je 38; razlika je 11 (ΔCt = 11). Vrijednost ΔCt je veća od 1% ΔCt za svaku mutaciju, što znači da je uzorak negativan na svih sedam mutacija gena *KRAS*.



Slika 3.8. Kvantitativni *PCR* u stvarnom vremenu za uzorak negativan za mutacije gena *KRAS*

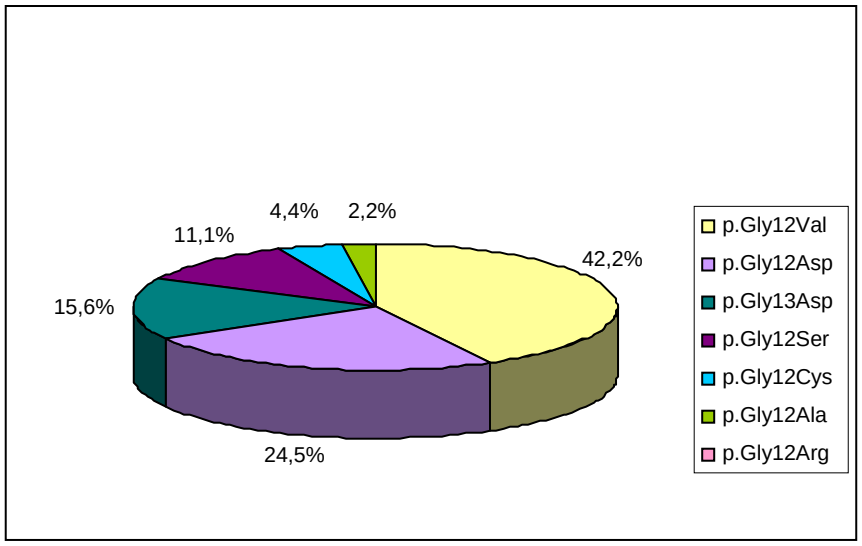
Kvantitativi *PCR* u stvarnom vremenu za uzorak pozitivan na najčešću mutaciju p.Gly12Val (c.35G>T) gena *KRAS* prikazan je na slici 3.9. Ct za kontrolnu reakciju je 29, a za specifičnu mutaciju p.Gly12Val je 32; razlika je 3 (ΔCt=3). Vrijednost ΔCt je manja od 1% ΔCt za mutaciju p.Gly12Val, što znači da je uzorak pozitivan na tu mutaciju.



Slika 3.9. Kvantitativni *PCR* u stvarnom vremenu za uzorak pozitivan za mutaciju p.Gly12Val

3.2.1. Rezultati analize uzoraka na sedam točkastih mutacija gena *KRAS* – učestalost mutacija u skupini bolesnika s karcinomom debelog i završnog crijeva

Od ukupno 113 uzoraka tumora mutacija gena *KRAS* dokazana je u 39,8% (45/113) uzoraka. Od toga je najviše uzoraka (42,2%; 19/45) imalo mutaciju p.Gly12Val (c.35G>T), 24,5% (11/45) uzoraka mutaciju p.Gly12Asp (c.35G>A), 15,6% (7/45) uzoraka mutaciju p.Gly13Asp (c.38G>A), 11,1% (5/45) uzoraka mutaciju p.Gly12Ser (c.34G>A), 4,4% (2/45) uzoraka mutaciju p.Gly12Cys (c.34G>T) i 2,2% (1/45) uzoraka mutaciju p.Gly12Ala (c.35G>C). Mutacija p.Gly12Arg (c.34G>C) nije pronađena (slika 3.10).

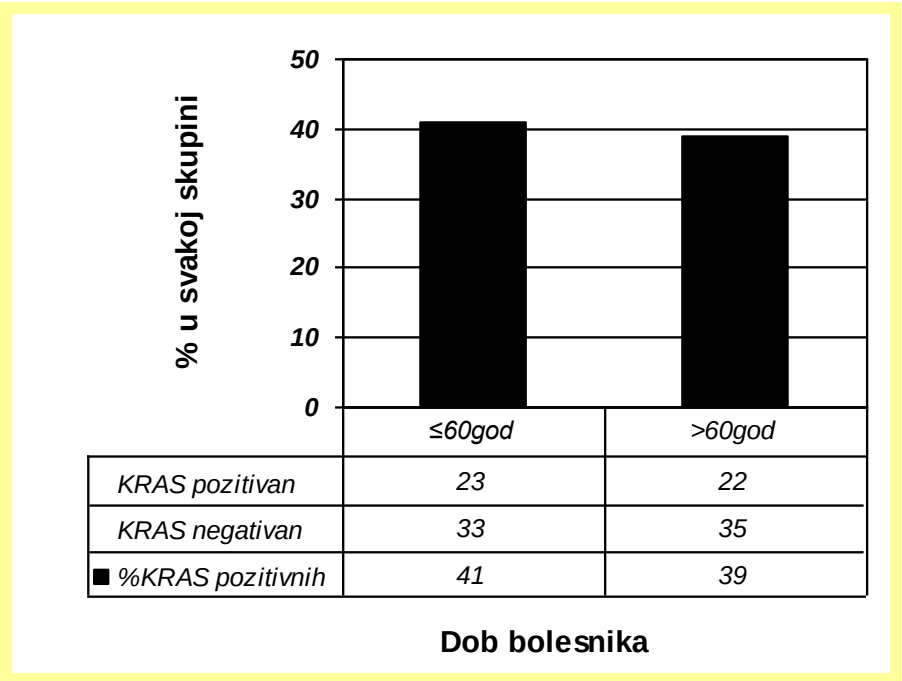


Slika 3.10. Učestalost pojedinih mutacija gena *KRAS* u uzorcima karcinoma debelog i završnog crijeva

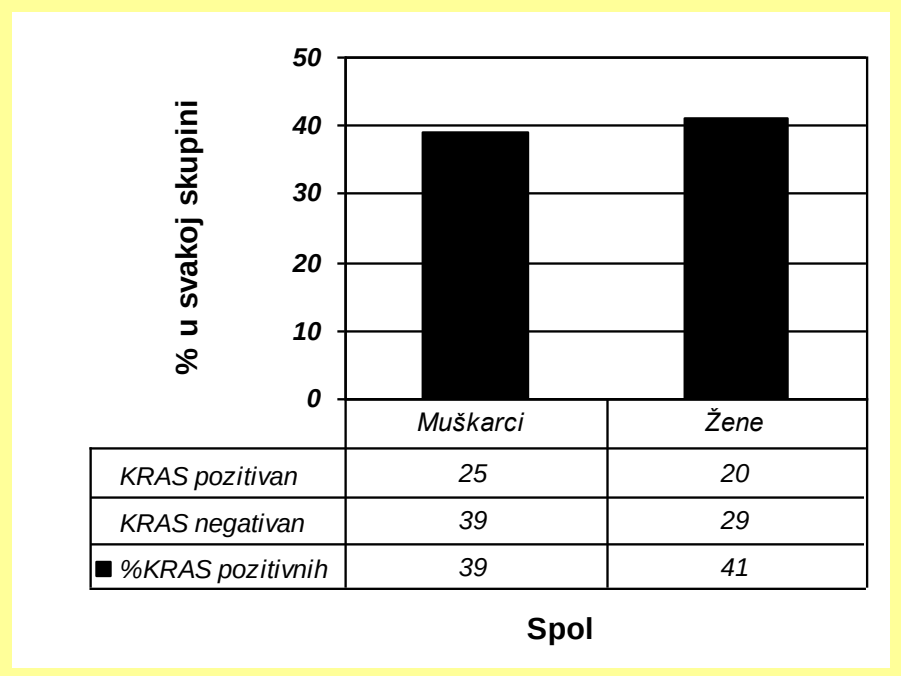
3.2.2. Usporedba prisutnosti mutacija gena *KRAS* s dobi i spolom oboljelih osoba te kliničko-patohistološkim osobitostima tumora

Mutacije gena *KRAS* dokazane su u podjednakom broju uzoraka s obzirom na dob oboljelih osoba: u 23 uzorka osoba mlađih od 60 godina (23/56; 41%) i u 22 uzorka osoba starijih od 60 godina (22/57; 39%). U skupini mlađih bolesnika bila su 33 negativna uzorka, a u skupini starijih 35. Nije dokazana statistički značajna razlika u prisutnosti mutacije gena *KRAS* u odnosu na dob oboljelih osoba ($p = 0,84$) (slika 3.11).

S obzirom na spol, mutacije gena *KRAS* dokazane su u 25 muškaraca i 20 žena. U skupini muškaraca bilo je 25 negativnih uzoraka, a u skupini žena 29 uzoraka negativnih na mutaciju gena *KRAS*. Mutacije gena *KRAS* dokazane su u gotovo jednakom postotku s obzirom na spol bolesnika: u 39% (25/64) muškaraca i 41% (20/49) žena ($p = 1,0$) (slika 3.12).

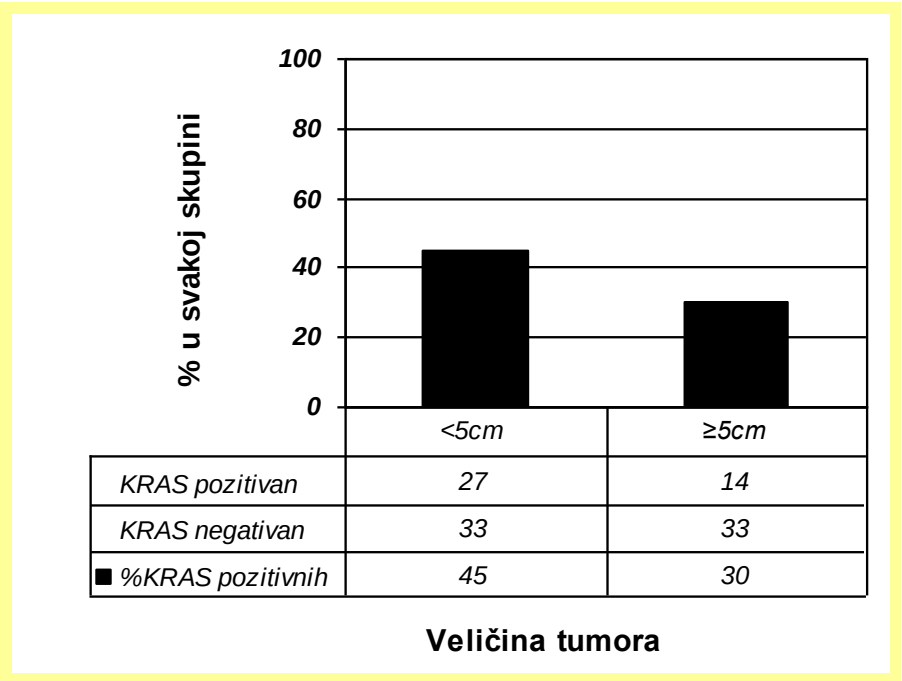


Slika 3.11. Broj uzoraka i udio tumora s mutacijom gena *KRAS* u odnosu na dob oboljelih osoba



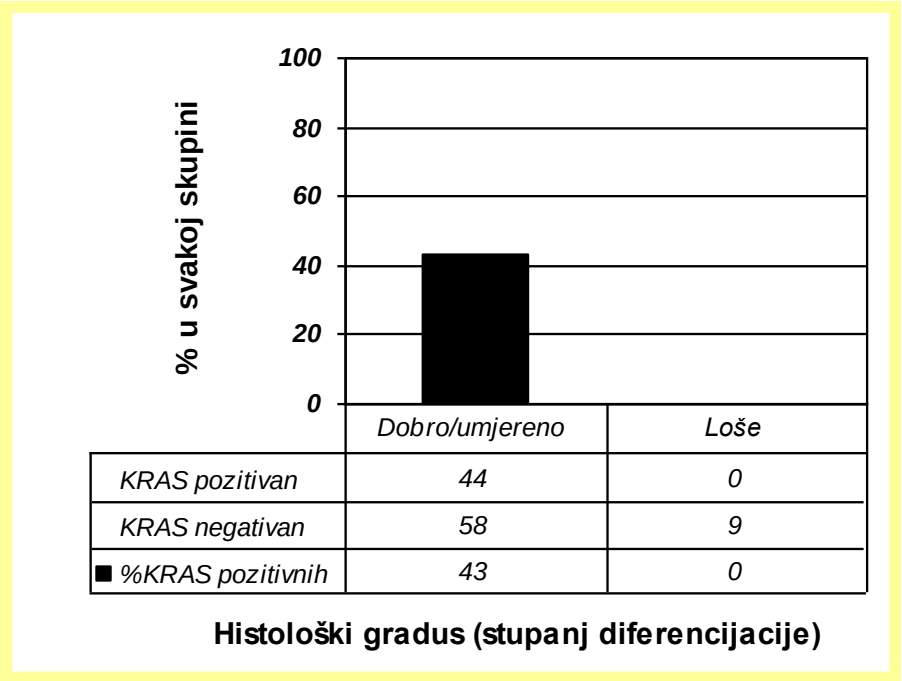
Slika 3.12. Broj uzoraka i udio tumora s mutacijom gena *KRAS* u odnosu na spol oboljelih osoba

Mutacije gena *KRAS* dokazane su u 27 uzoraka tumora manjih od 5 cm (27/60; 45%) i u 14 uzoraka tumora većih od 5 cm (14/47; 30%); statistički značajna razlika nije utvrđena (p = 0,11). U svakoj skupini bila su po 33 negativna uzorka (slika 3.13).



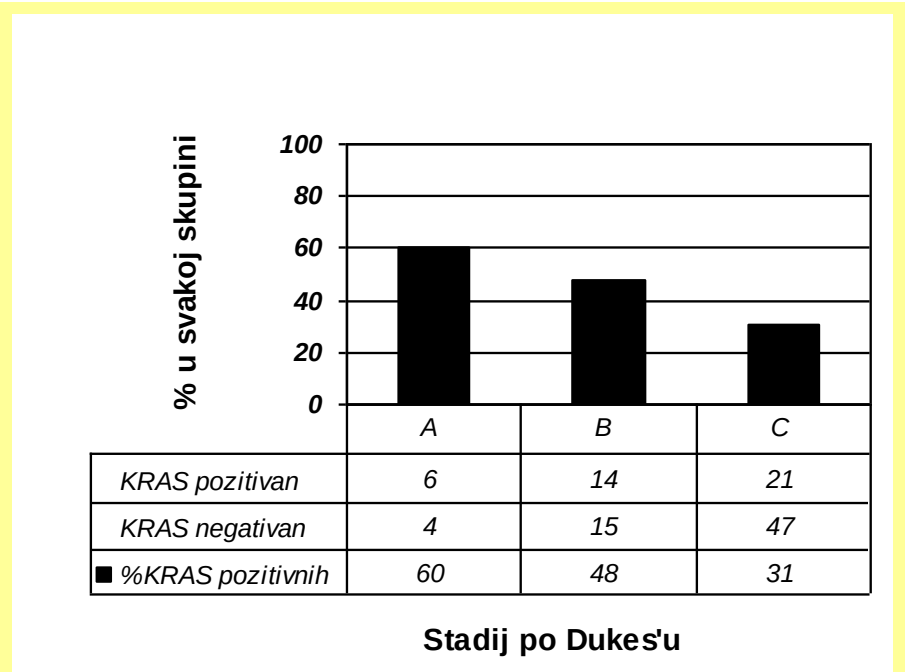
Slika 3.13. Broj uzoraka i udio tumora s mutacijom gena *KRAS* u odnosu na veličinu tumora

Mutacije gena *KRAS* su dokazane u 44 uzorka dobro/umjereno diferenciranih tumora (niski gradus) i u niti jednom loše diferenciranom tumoru (visoki gradus). U skupini tumora niskog gradusa bilo je 58 negativnih uzoraka, a u skupini visokog gradusa 9 negativnih (slika 3.14).



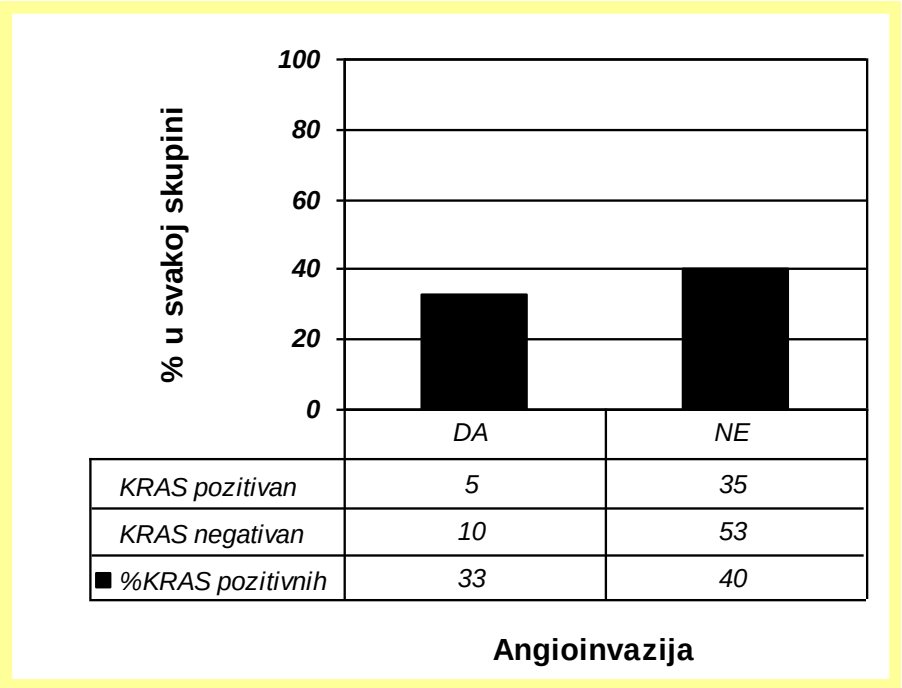
Slika 3.14. Broj uzoraka i udio tumora s mutacijom gena *KRAS* u odnosu na stupanj diferencijacije tumora (histološki gradus)

Mutacije gena *KRAS* dokazane su u 6 uzorka (6/10; 60%) tumora klasificiranih kao Dukes'A, 14 uzoraka (14/29; 48%) Dukes'B i u 21 uzorku (21/68; 31%) Dukes'C (slika 3.15). Najučestalije su u tumorima klasificiranim kao Dukes'A.



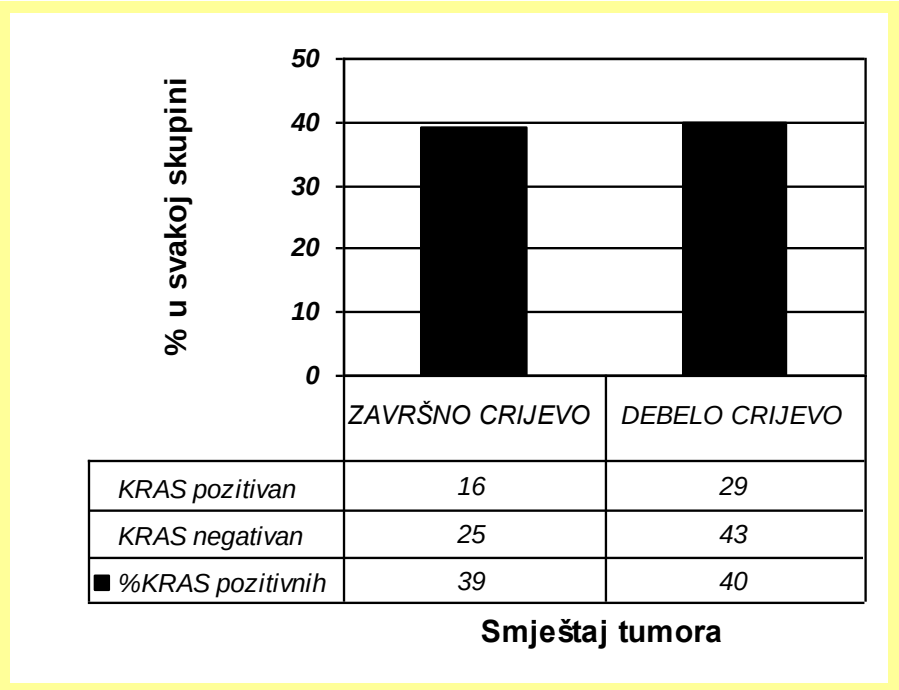
Slika 3.15. Broj uzoraka i udio tumora s mutacijom gena *KRAS* u odnosu na stadij po Dukes'u

Mutacije gena *KRAS* dokazane su u 5 uzoraka (5/15; 33%) tumora s angioinvazijom i 35 uzoraka (35/88; 40%) tumora u kojima nije pronađena angioinvazija (slika 3.16). Između ove dvije skupine nema statistički značajne razlike.



Slika 3.16. Broj uzoraka i udio tumora s mutacijom gena *KRAS* u odnosu na prisutnost angioinvazije

Mutacije gena *KRAS* dokazane su u 16 uzoraka (16/41; 39%) karcinoma završnog i 29 uzoraka (29/72; 40%) karcinoma debelog crijeva (slika 3.17). U oba tipa tumora javljaju se jednakom učestalošću.



Slika 3.17. Broj uzoraka i udio tumora s mutacijom gena *KRAS* u odnosu na smještaj primarnog tumora

Usporedba učestalosti mutacija gena *KRAS* po skupinama i p-vrijednost prikazani su u tablici 3.6.

Tablica 3.6. Povezanost prisutnosti mutacija gena *KRAS* s kliničkim i patohistološkim osobitostima oboljelih osoba i njihovih tumora

		mutacija gena *KRAS*		
Osobitost	Broj oboljelih (%)	Negativan broj (%)	Pozitivan broj (%)	p-vrijednost
Dob (godina)				
≤60	56 (49,6)	33 (59,0)	23 (41,0)	p = 0,84
>60	57 (50,4)	35 (61,4)	22 (38,6)	
Spol				
Muški	64 (57,0)	39 (61,0)	25 (39,0)	p = 1,00
Ženski	49 (43,0)	29 (59,2)	20 (40,8)	
Veličina tumora (cm)				
<5,0	60 (56,0)	33 (55,0)	27 (45,0)	p = 0,11
≥5,0	47 (44,0)	33 (70,2)	14 (29,8)	
Histološki gradus (stupanj diferencijacije)				
Niski	102 (91,9)	58 (56,9)	44 (43,1)	p = 0,01
Visoki	9 (8,1)	9 (100)	0 (0,0)	
Dukes′				
A	10 (9,3)	4 (40,0)	6 (60,0)	
B	29 (27,1)	15 (51,7)	14 (48,3)	p = 0,09
C	68 (63,6)	47 (69,1)	21 (30.9)	
Angioinvazija				
DA	15 (14,6)	10 (66,7)	5 (33,3)	p = 0,78
NE	88 (85,4)	53 (60,2)	35 (39,8)	
Smještaj tumora				
Završno crijevo	41 (36,3)	25 (61,0)	16 (39,0)	p = 1,00
Debelo crijevo	72 (63,7)	43 (59,7)	29 (40,3)	

p-vrijednost dobivena Fisherovim testom

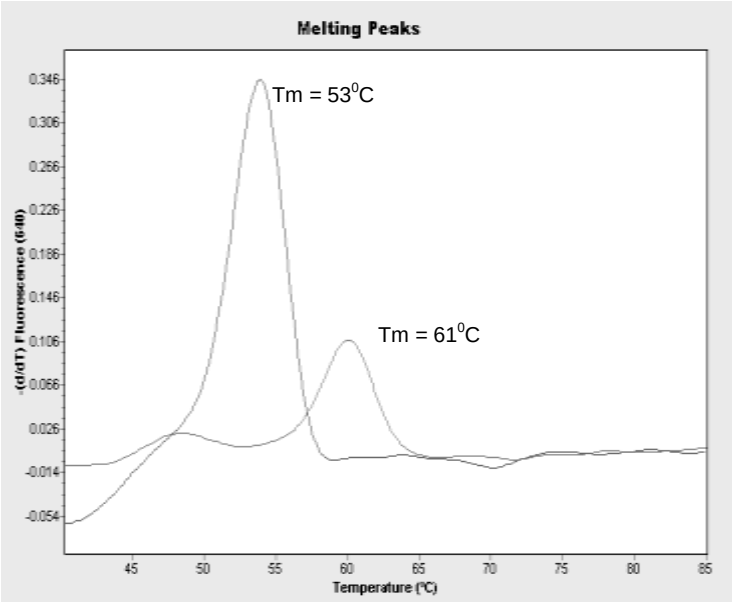
Od ukupno 45 uzoraka karcinoma debelog i završnog crijeva pozitivnih na mutaciju gena *KRAS* podjednako su prisutne tranzicije i transverzije. Tranzicije (G>A) su dokazane u 23 uzorka, a transverzije u 22 uzorka (jedna G>C i dvadeset i jedna G>T). Najčešće su transverzije G>T (46,7%) i tranzicije G>A (35,6%). Od toga je 15,5% (7/45) uzoraka imalo mutaciju u kodonu 13, a većina uzoraka (84,5%; 38/45) u kodonu 12. Broj i vrsta tranzicija i transverzija u uzorcima tumora prikazani su u tablici 3.7.

Tablica 3.7. Broj i vrsta mutacija gena *KRAS* (tranzicije, transverzije), kodoni koji su zahvaćeni mutacijom i promijenjena aminokiselina.

Kodon	Vrsta mutacije (supstitucija)	Broj mutacija (%)	Slijed nukleotida u kodonu (AK)	Promjena nukleotida u kodonu (AK)	Broj promijenjenih AK
12	G>A	16 (35,6%)	G<u>G</u>T (Gly) <u>G</u>GT (Gly)	G<u>A</u>T (Asp) <u>A</u>GT (Ser)	11 5
12	G>T	21 (46,7%)	G<u>G</u>T (Gly) <u>G</u>GT (Gly)	G<u>T</u>T (Val) <u>T</u>GT (Cys)	19 2
12	G>C	1 (2,2%)	G<u>G</u>T (Gly)	G<u>C</u>T (Ala)	1
13	G>A	7 (15,5%)	G<u>G</u>C (Gly)	G<u>A</u>C (Asp)	7

3.3. Analiza prisutnosti točkastih mutacija gena *BRAF*

Prisutnost jedne točkaste mutacije gena *BRAF* p.Val600Glu (c.1799T>A) odredili smo u 113 uzoraka karcinoma debelog i završnog crijeva. Na slici 3.18. prikazani su vrhovi krivulja taljenja za dva uzorka: negativna kontrola (zdrava sluznica debelog crijeva) ima vrh taljenja na 53 ^{o}C, što znači prisutnost stanica koje imaju isključivo nemutirani alel, a uzorak karcinoma ima vrh taljenja na 61 ^{o}C, što znači prisutnost stanica koje imaju traženu mutaciju (na jednom i/ili oba alela). U uzorku karcinoma ne vidi se nemutirani alel jer je njegovo umnažanje spriječeno kompetitorom (lDNA).

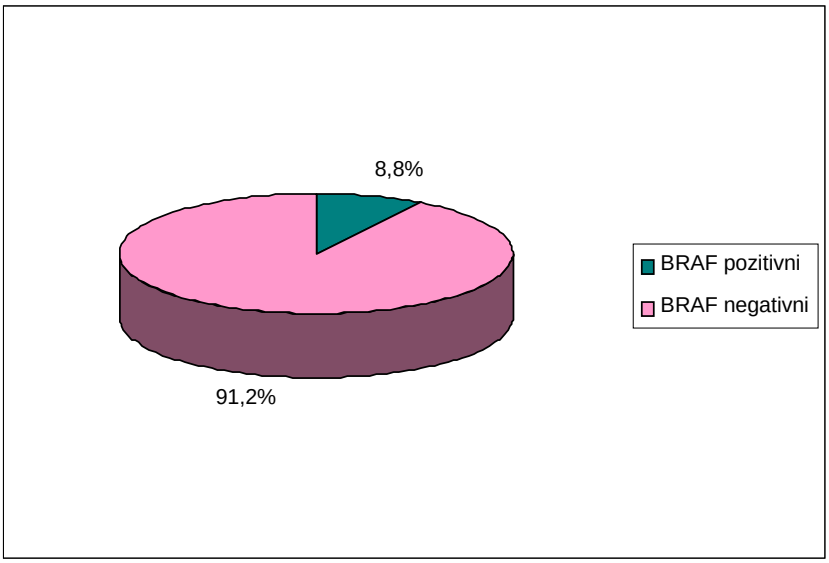


Slika 3.18. Krivulje i vrhovi taljenja za pozitivan (Tm = 61^0C) i negativan(Tm = 53^0C) uzorak na mutaciju p.Val600Glu

3.3.1. Rezultati analize uzoraka na točkastu mutaciju p.Val600Glu gena *BRAF*

Od ukupno 113 uzoraka karcinoma debelog i završnog crijeva, mutaciju gena *BRAF* dokazali smo u 8,8% (10/113) uzoraka (slika 3.19).

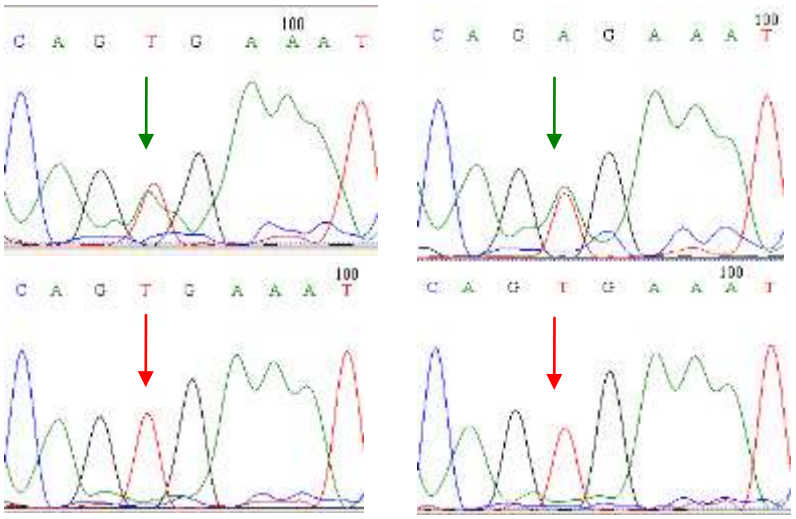
Na 30 uzoraka napravili smo potvrdu rezultata metodom sekvenciranja po Sangeru i na taj način potvrdili svih 10 pozitivnih i 20 negativnih rezultata dobivenih *PCR* u stvarnom vremenu (slika 3.20).



Slika 3.19. Udio pozitivnih i negativnih uzoraka tumora na mutaciju gena *BRAF*

A)

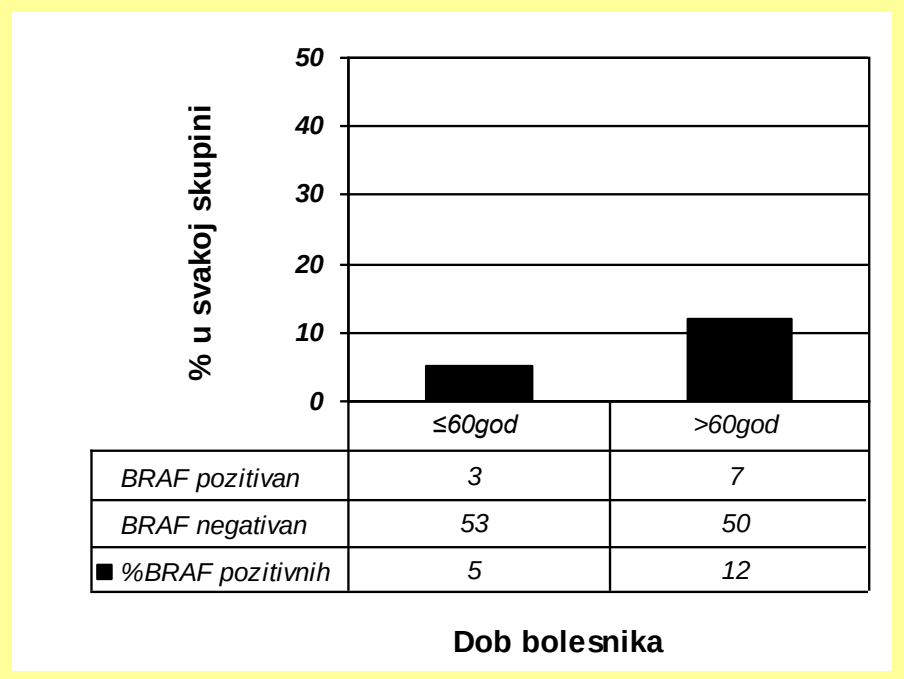
B)



Slika 3.20. A) Kromatogrami uzoraka s mutacijom u genu *BRAF* (c.1799T>A; GTG>GAG) i B) uzorci s divljim tipom gena *BRAF* (GTG)

3.3.2. Usporedba prisutnosti mutacija gena *BRAF* sa spolom i dobi oboljelih osoba i kliničko-patohistološkim osobitostima tumora

Mutacija gena *BRAF* dokazana je u 3 uzorka oboljelih osoba mlađih od 60 godina (3/56; 5%) i u 7 uzoraka oboljelih starijih od 60 godina (7/57; 12%). Nije utvrđena statistički značajna razlika u pojavljivanju mutacije u odnosu na dob (p = 0,32) (slika 3.21).

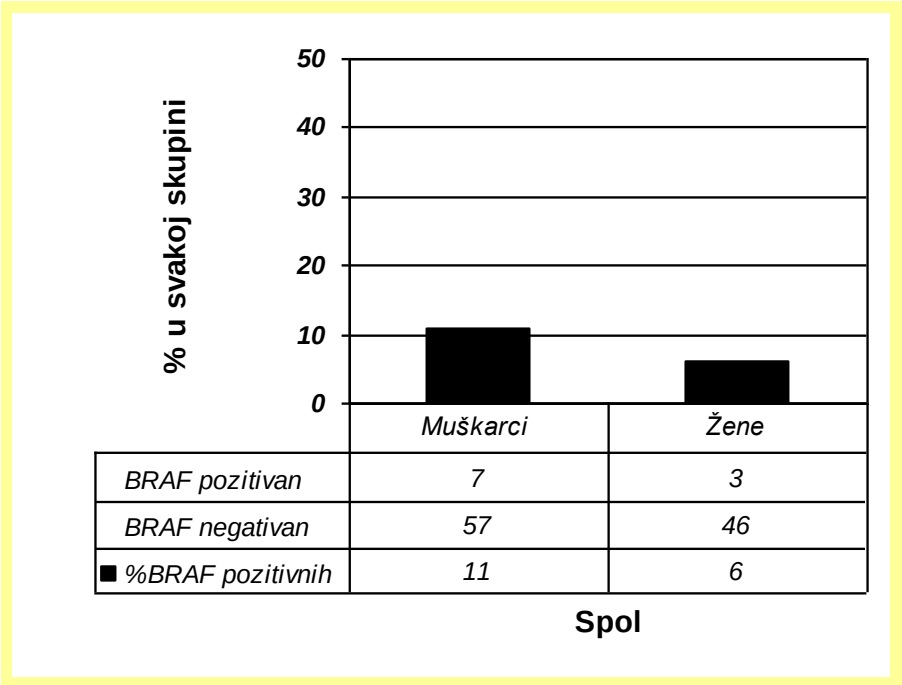


Slika 3.21. Broj uzoraka i udio tumora s mutacijom gena *BRAF* u odnosu na dob oboljelih osoba

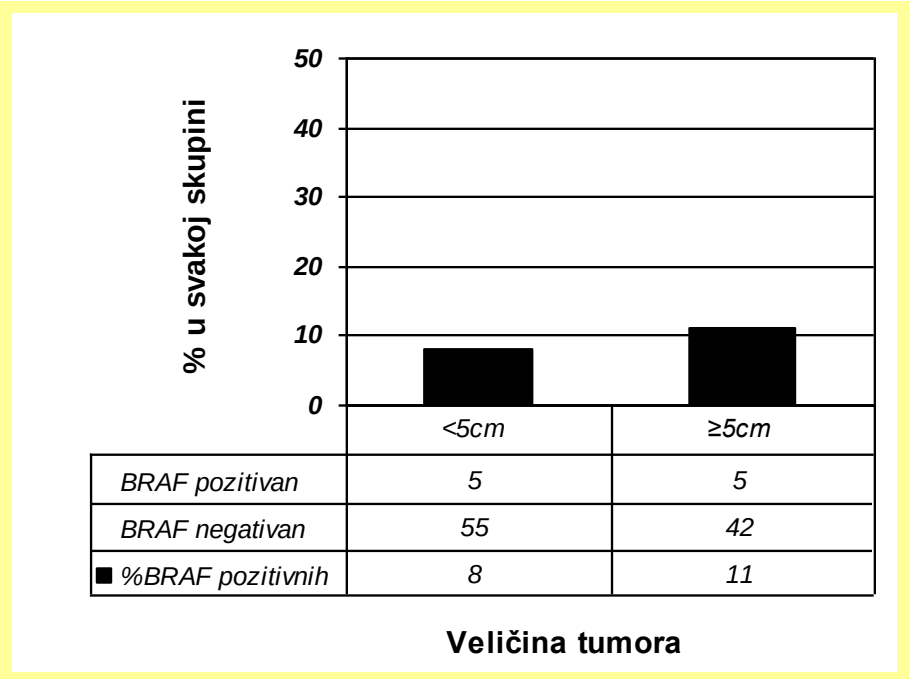
S obzirom na spol, mutacija gena *BRAF* dokazana je u 7 (7/64; 11%) muškaraca i 3 (3/49; 6%) žene. Premda se mutacija gena *BRAF* češće dokazuje u muškaraca nema statistički značajne razlike u pojavljivanju mutacije kod muškaraca i žena (p = 0,51) (slika 3.22).

Mutacije gena *BRAF* dokazane su u 5 uzoraka tumora manjih od 5 cm (5/60; 8%) i u 5 uzoraka tumora većih od 5 cm (5/47; 11%). Statistički značajna razlika nije dokazana (p = 0,74) (slika 3.23).

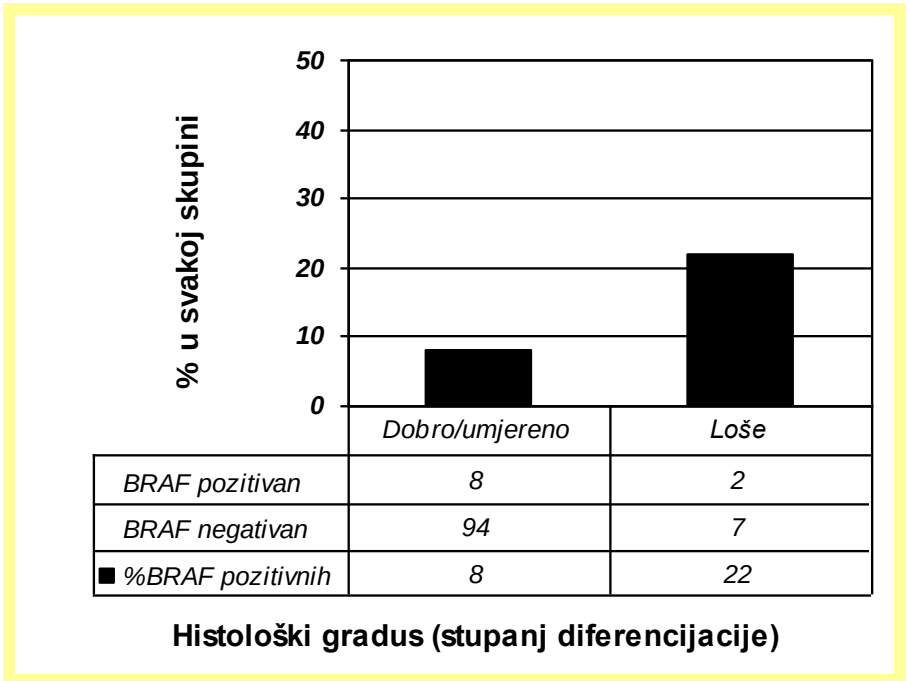
Mutacije gena *BRAF* dokazane su u 8 uzoraka dobro/umjereno diferenciranih tumora (niski gradus) (8/102; 8%) i u 2 loše diferencirana tumora (visoki gradus) (2/9; 22%). U skupini tumora niskog gradusa bila su 94 negativna uzoraka, a u skupini visokog gradusa 7 negativnih uzoraka na traženu mutaciju (slika 3.24). Statistički značajna razlika nije dokazana (p = 0,19).



Slika 3.22. Broj uzoraka i udio tumora s mutacijom gena *BRAF* u odnosu na spol oboljelih osoba

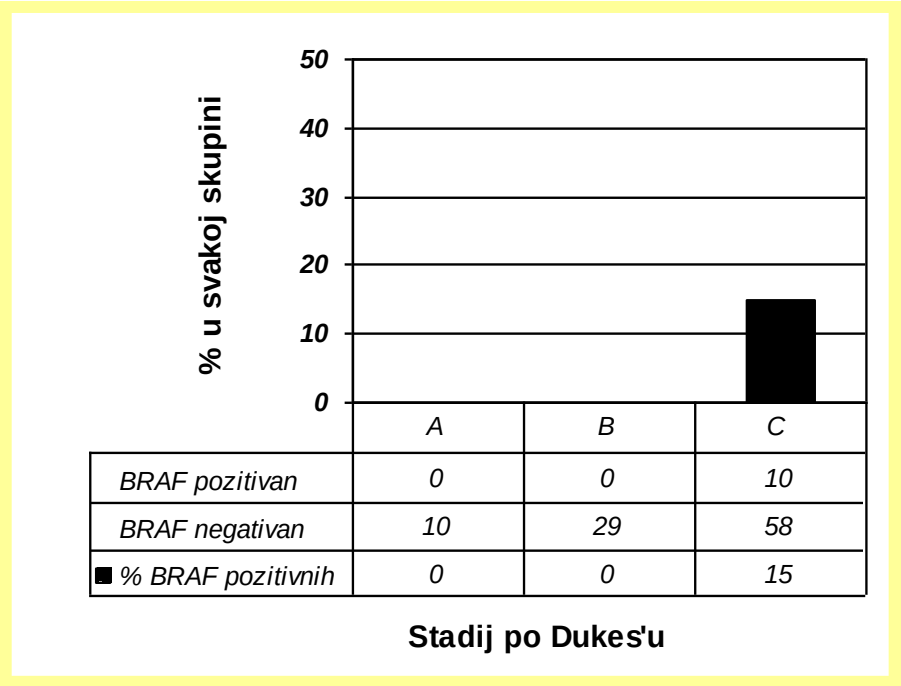


Slika 3.23. Broj uzoraka i udio tumora s mutacijom gena *BRAF* u odnosu na veličinu tumora



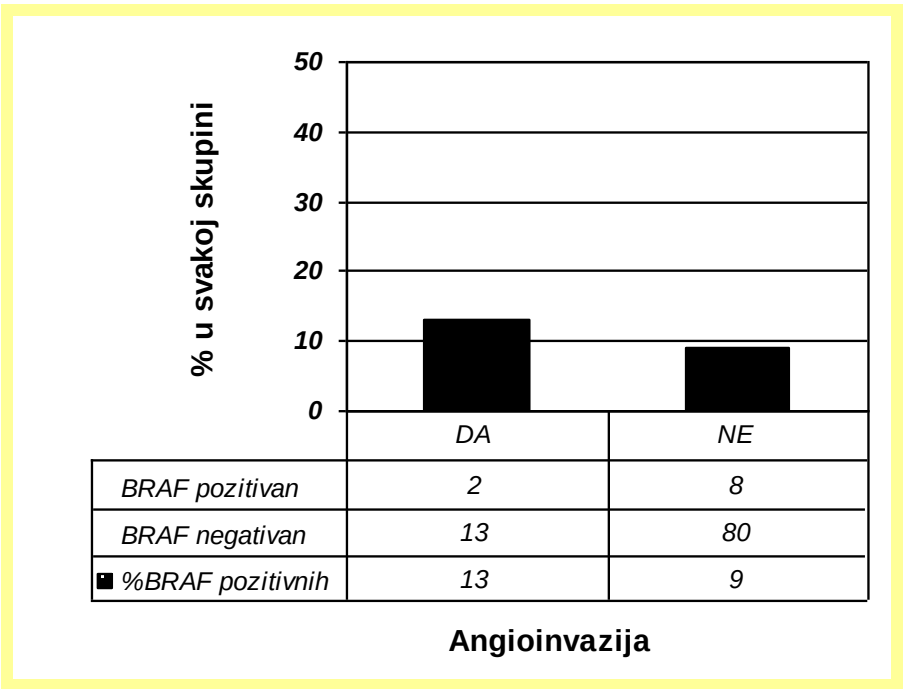
Slika 3.24. Broj uzoraka i udio tumora s mutacijom gena *BRAF* u odnosu na histološki gradus tumora

Mutacije gena *BRAF* dokazane su samo u uzorcima tumora klasificiranim kao Dukes'C; nađeno je 10 pozitivnih uzoraka (10/68; 15%) (slika 3.25). Niti u jednom od 10 analiziranih uzoraka tumora klasificiranih kao Dukes'A i 29 uzoraka klasificiranih kao Dukes'B nije nađena mutacija.



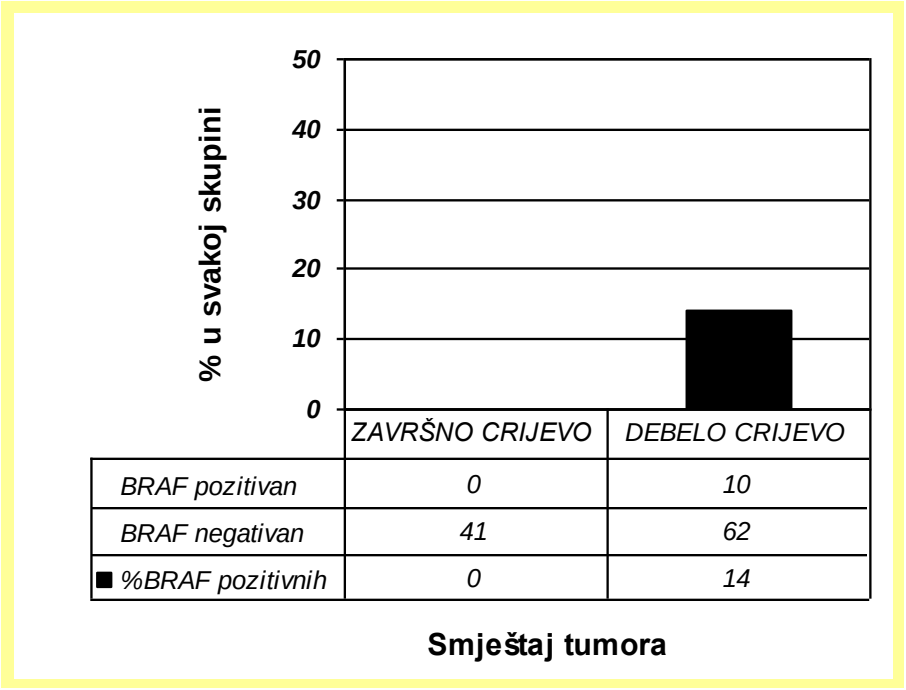
Slika 3.25. Broj uzoraka i udio tumora s mutacijom gena *BRAF* u odnosu na stadij po Dukes'u

Mutacija gena *BRAF* dokazana je u 2 uzorka (2/15; 13%) tumora s angioinvazijom i 8 uzoraka (8/88; 9%) tumora u kojima nije pronađena angioinvazija (slika 3.26). Nije dokazana statistički značajna razlika u prisutnosti mutacije gena *BRAF* u tumorima sa i bez angioinvazije ($p = 0,63$).



Slika 3.26. Broj uzoraka i udio tumora s mutacijom gena *BRAF* u odnosu na prisutnost angioinvazije u tumoru

Mutacija gena *BRAF* nije dokazana u uzorcima karcinoma završnog crijeva (0/41). Svih 10 uzoraka pozitivnih na mutaciju gena *BRAF* bili su uzorci karcinoma debelog crijeva (10/72; 14%) (slika 3.27).



Slika 3.27. Broj uzoraka i udio tumora s mutacijom gena *BRAF* u odnosu na smještaj primarnog tumora

Usporedba učestalosti mutacija gena *BRAF* po skupinama i p-vrijednost prikazani su u tablici 3.8.

Tablica 3.8. Povezanost prisutnosti mutacije gena *BRAF* s kliničkim i patohistološkim osobitostima oboljelih osoba i njihovih tumora

		mutacija gena *BRAF*		
Osobitost	Broj oboljelih (%)	Negativan broj (%)	Pozitivan broj (%)	p-vrijednost
Dob (godina)				
≤60	56 (49,6)	53 (94,6)	3 (5,4)	p = 0,32
>60	57 (50,4)	50 (87,7)	7 (12,3)	
Spol				
Muški	64 (56,6)	57 (89,1)	7 (10,9)	p = 0,51
Ženski	49 (43,4)	46 (93,9)	3 (6,1)	
Veličina tumora (cm)				
<5,0	60 (56,0)	55 (91,7)	5 (8,3)	p = 0,74
≥5,0	47 (44,0)	42 (89,4)	5 (10,6)	
Histološki gradus (stupanj diferencijacije)				
Niski	102 (91,9)	94 (92,2)	8 (7,8)	p = 0,19
Visoki	9 (8,1)	7 (77,8)	2 (22,2)	
Dukes′				
A	10 (9,3)	10 (100)	0 (0,0)	
B	29 (27,1)	29 (100)	0 (0,0)	p = 0,04
C	68 (63,6)	58 (85,3)	10 (14,7)	
Angioinvazija				
DA	15 (14,6)	13 (86,7)	2 (13,3)	p = 0,63
NE	88 (85,4)	80 (90,9)	8 (9,1)	
Smještaj tumora				
Završno crijevo	41 (36,3)	41 (100)	0 (0,0)	p = 0,01
Debelo crijevo	72 (63,7)	62 (86,1)	10 (13,9)	

p-vrijednost dobivena Fisherovim testom

U našem uzorku, kod tri oboljele osobe testirali smo primarni karcinom i jetrene metastaze istih tumora, a kod jednog bolesnika primarni karcinom i metastazu limfnog čvora. U sva četiri primarna tumora dokazali smo mutaciju gena *KRAS*; u jednom mutaciju p.Gly12Cys, u drugom p.Gly12Val, a u trećem i četvrtom mutaciju p.Gly12Ser. Isti rezultat dobili smo u jetrenim metastazama koje su uzete biopsijom i to u prvom slučaju 2 godine nakon operacije primarnog tumora, u drugom slučaju 1 godinu nakon operacije primarnog tumora i u trećem slučaju 2 godine nakon operacije primarnog tumora. Za četvrtog bolesnika istovremeno su kirurški odstranjeni i primarni tumor i limfni čvor u kojima je dokazana ista mutacija. Mutacija p.Val600Glu gena *BRAF* nije dokazana niti u primarnom tumoru niti u metastazama ovih bolesnika (tablica 3.9).

Tablica 3.9. Prisutnost mutacija gena *KRAS* i *BRAF* u primarnim tumorima i pridruženim metastazama

Redni broj uzorka	**Vrsta uzorka**	**Mutacija gena *KRAS***	**Mutacija gena *BRAF* p.Val600Glu**
1.	Primarni tumor	p.Gly12Cys	nije dokazana
	Metastaza jetre	p.Gly12Cys	nije dokazana
2.	Primarni tumor	p.Gly12Val	nije dokazana
	Metastaza jetre	p.Gly12Val	nije dokazana
3.	Primarni tumor	p.Gly12Ser	nije dokazana
	Metastaza jetre	p.Gly12Ser	nije dokazana
4.	Primarni tumor	p.Gly12Ser	nije dokazana
	Metastaza limfnog čvora	p.Gly12Ser	nije dokazana

4. RASPRAVA

Karcinomi nastaju nakupljanjem mutacija u genima ključnim za funkcioniranje staničnog ciklusa, čime se mijenja normalan stanični ciklus i potiče karcinogeneza. Upravo su karcinomi debelog crijeva vrlo pogodan model za proučavanje genske podloge nastanka i napredovanja raka jer se razvijaju sporo i većina ih je rezultat dugogodišnjega stupnjevitog procesa tijekom kojeg iz dobroćudnoga malog adenoma, kao posljedica nasljednih i/ili stečenih mutacija, nastaje zloćudni invazivni tumor (12). Polazeći od osnovnog genetičkog modela karcinogeneze debelog i završnog crijeva (poznat kao 'Vogelsteinov model' i 'adenom-karcinom slijed') i proučavanjem tumora debelog i završnog crijeva u različitim stadijima razvitka od adenoma do karcinoma dokazano je da je u većini slučajeva potrebno najmanje pet ili više različitih genskih promjena kako bi iz adenoma nastao karcinom (11). Taj model koji uključuje samo ključne genske promjene u procesu nastanka CRC (točkaste mutacije gena *KRAS* i *p53*, LOH na 5q i 18q) s vremenom je nadopunjen i danas je potpuno jasno da ove tumore treba promatrati kao heterogenu bolest koja nastaje po različitim genskim obrascima (engl. *multipathway disease*), što potvrđuje činjenica da histološki identični tumori imaju različitu prognozu i različito reagiraju na liječenje (116-119). Za razvitak individualiziranog pristupa u liječenju ove bolesti potrebno je utvrditi snažne i neovisne prognostičke biljege prema kojima bi se oboljele osobe svrstale u skupine za koje bi se primjenjivao optimalan način liječenja. Također, potrebno je utvrditi i prediktivne biljege odgovora na specifično liječenje, kao i biljege koji bi pokazali kolika je mogućnost da se razviju nuspojave ili toksičnost lijeka.

Proteklih su godina najviše istraživane mutacije gena/proteina uključenih u signalne puteve u stanicama karcinoma čovjeka. U mnogim solidnim tumorima dokazana je pojačana ekspresija receptora za EGF (EGFR), a time i pojačana aktivnost signalnih puteva koji se pokreću njegovom aktivacijom (120,121). Jedan od takvih puteva je signalni put MAPK koji upravlja temeljnim staničnim procesima kao što su proliferacija, diferencijacija, preživljenje i programirana stanična smrt (122). Ključne signalne molekule na tom putu su produkti onkogena *KRAS* i *BRAF*. Pojačana aktivnost EGFR dokazana je u oko 80% karcinoma debelog crijeva i povezuje se s lošijom prognozom bolesti, zbog čega se ovaj signalni put našao u žarištu razvoja novih lijekova (123-125).

4.1. Prediktivna vrijednost gena *KRAS* i *BRAF* u karcinomu debelog crijeva

U svrhu određivanja prediktivne i prognostičke vrijednosti pojedinih genskih biljega u karcinomima debelog i završnog crijeva najviše su proučavane somatske mutacije gena *KRAS*, *APC* i *p53*, a potom i gena *PIK3CA* i *BRAF* koje su glavni razlog nastanka tumora debelog i završnog crijeva (48). Među njima jedino je gen *KRAS* prihvaćen kao prediktivni biljeg odgovora na terapiju novim lijekovima, monoklonskim protutijelima usmjerenim na vanjsku domenu receptora za EGF (cetuksimab i panitumumab) jer je dokazano da bolesnici koji nemaju mutaciju gena *KRAS* u CRC imaju statistički značajno duži period bez progresije bolesti, odnosno duže ukupno preživljenje, dok bolesnici u čijim se karcinomima nalazi jedna od klinički značajnih mutacija gena *KRAS* ne odgovaraju na terapiju ovim lijekovima (126-129). Gen *KRAS* je gotovo idealan prediktivni biljeg s obzirom da se više od 90% mutacija nalazi u uskom području eksona 2, s obzirom da ima visoku negativnu prediktivnu vrijednost (99% bolesnika s mutacijom gena *KRAS* ne odgovara na inhibiciju EGFR novim lijekovima), a učinci samih mutacija dobro su razjašnjeni i poznati (39,100,127,130). Zbog svoje učestalosti, kao i zbog učinka u stanici koji je povezan s nemogućnošću inaktivacije proteina KRAS, značajnim se smatraju točkaste *missens* mutacije u eksonu 2 koje dovode do zamjene aminokiseline glicin (kodirane kodonima 12 i 13) u proteinu, dok su ostale mutacije gena *KRAS* rjeđe i nemaju dokazano kliničko značenje (100). Danas se, prema odredbi Američkog društva za kliničku onkologiju (ASCO) i udruženja *National Comprenhensive Cancer Network* (NCCN), zahtjeva testiranje gena *KRAS* na mutacije za svakog bolesnika s karcinomom debelog i završnog crijeva koji je kandidat za liječenje monoklonskim protutijelima, inhibitorima receptora za EGF (95,131,132). Cilj takvog pristupa u liječenju metastatskog CRC je poboljšanje ukupnoga kliničkog statusa bolesnika, izbjegavanje nepotrebne toksičnosti i nuspojava lijekova, te suvišnih materijalnih troškova. Međutim, dokazano je da svi bolesnici koji nemaju mutaciju gena *KRAS* ne odgovaraju na liječenje anti-EGFR monoklonskim protutijelima (128). Ovisno o kombinaciji anti-EGFR i drugih oblika liječenja, različiti autori objavili su rezultate prema kojima otprilike 20-50% bolesnika koji nemaju mutaciju gena *KRAS* odgovara na terapiju novim lijekovima (133-136). Očito je da promjene ostalih molekula koje sudjeluju u prijenosu signala od EGFR prema jezgri mogu također uzrokovati rezistenciju na anti-EGFR liječenje (137). Sljedeći u nizu signalnih molekula nakon EGFR koje se aktiviraju međudjelovanjem s proteinom KRAS su produkti gena *BRAF* i *PI3K*.

Za razliku od aktivacije gena *KRAS* koja je temeljito istražena, aktivacija gena *BRAF* i njegova uloga u stanici još nije u potpunosti istražena. Protein BRAF nalazi se na signalnom putu MAPK, odmah nakon proteina KRAS od kojeg preuzima signal. Premda je njegova uloga ključna u prijenosu signala od proteina KRAS prema jezgri, njihov međusobni odnos nije razjašnjen kao ni klinička značajnost mutacija gena *BRAF* u CRC. Istraživanja su pokazala da aktivacija gena *BRAF* dovodi do pojačane aktivnosti puta MAPK neovisno o aktivaciji gena *KRAS*, odnosno da se njihove mutacije međusobno isključuju (138,139). Zato je udruženje NCCN preporučilo testiranje gena *BRAF* u svim tumorima u kojima nema mutacije gena *KRAS* (140). Prediktivna vrijednost gena *BRAF* u odgovoru na liječenje anti-EGFR monoklonskim protutijelima još nije utvrđena zbog retrospektivnih istraživanja i malog broja uzoraka CRC koji imaju mutaciju ovog gena. Jedna skupina autora objavila je da se mutacije gena *KRAS* i *BRAF* međusobno isključuju te da bolesnici koji nemaju mutaciju gena *KRAS*, a imaju mutaciju gena *BRAF*, neće odgovoriti na terapiju novim lijekovima (141,142). Podaci druge skupine autora okupljene oko istraživanja CRYSTAL upućuju na to da će u istoj kombinaciji, normalan *KRAS* i mutirani *BRAF*, ishod biti suprotan, odnosno da će bolesnici odgovoriti na liječenje (143). Nasuprot tome, nedavno je dokazano i objavljeno da se najčešća mutacija gena *BRAF* p.V600E može pojaviti zajedno s mutacijama gena *KRAS* u uznapredovalim karcinomima debelog i završnog crijeva i njihovim metastazama u limfnim čvorovima, što pojačava progresiju bolesti, odnosno potvrđuje njihovu sinergiju u tumorima koji imaju mutaciju oba gena (144,145).

U ovom istraživanju potvrđeno je da se mutacije ovih dvaju gena međusobno isključuju, odnosno da se mutacije gena *BRAF* dokazuju isključivo u tumorima koji nemaju mutaciju gena *KRAS*.

4.2. Standardizacija postupka određivanja mutacija gena *KRAS* i *BRAF*

Određivanje genskih promjena u tkivu tumora zahtjeva pravilan izbor reprezentativnog uzorka za analizu. S obzirom da određivanje mutacija gena *KRAS* u metastatskom CRC ima prediktivnu vrijednost jer predviđa odgovor na liječenje anti-EGFR lijekovima cetuksimabom i panitumumabom, postavljene su smjernice prema kojima je cijeli postupak multidisciplinaran i nastoji se standardizirati. Obuhvaća predanalitičku fazu (odabir i priprema tkiva za analizu), analitičku fazu (odabir metode, pouzdanost rezultata) i poslijeanalitičku fazu (izvještavanje rezultata i interpretacija nalaza).

4.2.1. Predanalitička faza: važnost patologa

Za konačni rezultat važnu ulogu ima patolog prilikom postavljanja patohistološke dijagnoze i u odabiru reprezentativnog uzorka tkiva tumora koje će biti podvrgnuto analizi. Uzorak tkiva tumora u kojem se određuje mutacija treba sadržavati što što je manje moguće primjesa upalnog ili nekrotičnog tkiva. Udruge patologa u Americi i Europi (*College of American Pathologists, CAP,* te *European Society of Pathology, ESP*) nedavno su iznijeli svoje preporuke u kojima naglašavaju važnost patologa u odabiru i pripremi uzorka za analizu, važnost laboratorija u izboru analitičke metode i izvještavanju o rezultatima, te važnost interpretacije nalaza od strane onkologa (146). Prema smjernicama patologa, kao i prema istraživanjima koja uspoređuju različite metode određivanja mutacija, najvažniji kriterij za pouzdanost rezultata je broj/udio stanica tumora u početnom uzorku (112,147). Ovisno o osjetljivosti analitičke metode potreban je veći ili manji udio tumorskih stanica u početnom uzorku. Europske se smjernice posebno bave predanalitičkom fazom. Ističu važnost analize primarnog tumora ili metastaza nasuprot ispitivanja adenoma ili neinvazivng karcinoma (jer u tim stadijima bolesti nije indicirano liječenje novim lijekovima), a ukoliko tumor pokazuje značajnu genotipsku heterogenost tada treba odabrati tkivo iz više različitih parafinskih blokova (148). S obzirom da se mutacije gena *KRAS* pojavljuju rano tijekom zloćudne preobrazbe, još u stadiju adenoma, one se nalaze (ili ne nalaze) u metastazama i u primarnom tumoru, zbog čega nije potrebno testirati oba uzorka (149). Nekoliko je studija pokazalo prisutnost istih mutacija u primarnom tumoru i u metastazama, što upućuje na stabilnost mutacija u procesu metastaziranja, odnosno na metastatski potencijal stanica koje nose mutaciju (112). Izostanak podudarnosti tih rezultata uglavnom se tumači kao posljedica loše osjetljivosti i specifičnosti korištene metode, ali i genotipske heterogenosti tumora pogotovo kada su u pitanju točkaste mutacije i gubitak heterozigotnosti (LOH). Genotipska heterogenost češće je prisutna u ranim stadijima tumora (90%) u odnosu na kasnije stadije tumora (69%) i može biti uzrok različitih rezultata testiranja u primarnom tumoru i metastazi (112,148). Češće su razlike u rezultatima testiranja LOH, primjerice tumor-supresorskih gena (58%-67%), nego točkastih mutacija, primjerice u onkogenima (20%) (112,117). Jedna je skupina autora određivala mutacije gena *KRAS* i *BRAF* u središtu tumora, rubovima invazije tumora, metastazama limfnih čvorova i udaljenim metastazama. Dokazali su da se rezultati za *KRAS* i *BRAF* mutacije u središtu tumora i rubovima invazije razlikuju u 8% i 1% uzoraka, primarnom tumoru i metastazama limfnih čvorova u 31% i 4% uzoraka te u primarnom tumoru i udaljenim metastazama u 10% i 0% uzoraka (150). Druga skupina autora dokazala je

podudarnost rezultata analize gena *KRAS* na mutacije između primarnih CRC i pridruženih udaljenih metastaza u 95% uzoraka (151).

U skupini naših bolesnika u četiri oboljele osobe istovremeno smo testirali primarni karcinom i metastazu (u jetri ili limfnom čvoru) te dokazali prisutnost istih mutacija u uzorku primarnog tumora kao i u metastazi. Jednake rezultate testiranja mutacija gena *KRAS* i *BRAF* u primarnim tumorima i pridruženim metastazama objavili su i drugi autori u svojim radovima (149).

Određivanje mutacija u tumorskom tkivu uklopljenom u parafinske blokove pokazalo se jednako vrijedno kao i u svježem uzorku tumora, a prema nekim autorima čak i vrijednije zbog mogućnosti uzorkovanja s više mjesta u tumoru (više različitih parafinskih blokova) (152).

4.2.2. Analitička faza: važnost metode

Osim što se u uzorku DNA koji se koristi za detekciju mutacija nalazi određeni omjer ne-tumorskog i tumorskog tkiva, sve stanice tumora nemaju isti genotip te postoji mogućnost da samo mali broj stanica ima gensku promjenu koju pokušavamo odrediti. Upravo je zbog toga, uz odabir reprezentativnog uzorka tkiva, odabir dovoljno osjetljive metode drugi važan čimbenik koji bitno utječe na konačni rezultat. Karakteristikama odabrane metode bave se CAP i ESP i upućuju na smjernice CLIA (engl. *Clinical Laboratory Improvement Amendments guidelines)* za procjenu laboratorijskih testova. Metoda mora proći sve provjere i imati sve potrebne potvrde (biti validirana), prihvatljivu osjetljivost, specifičnost, stupanj iskorištenja i cijenu, a mora biti u mogućnosti detektirati najmanje 7 najčešćih mutacija gena *KRAS* u kodonima 12 i 13. Najčešće korištene metode za detekciju mutacija *KRAS* su PCR u stvarnom vremenu i direktno sekvenciranje. Danas se direktno sekvenciranje smatra zlatnim standardom u detekciji mutacija, ali zbog slabe osjetljivosti to se ne može reći i za detekciju u tkivu tumora. Premda je velika prednost sekvenciranja u tome što može dokazati sve moguće mutacije na umnoženom ulomku (primjerice u eksonu 2 i 3 gena *KRAS*, kodoni 12, 13 i 61), za pouzdano određivanje mutacija u tumorima direktno ima slabu osjetljivost od 10-30% zbog čega su mogući lažno negativni rezultati (113,128,153). Metode *PCR* u stvarnom vremenu imaju izvrsnu osjetljivost od 1-5%, brze su, jednostavne i odvijaju se u zatvorenom PCR-sustavu, pa je smanjena mogućnost kontaminacije (113). Zlatni standard za detekciju mutacija u tumorima trebala bi biti metoda koja je u mogućnosti kvantificirati početni uzorak DNA prije detekcije mutacija. U Sjedinjenim Američkim Državama se određivanje mutacija gena

KRAS korištenjem komercijalnog kompleta reagensa TheraScreen® K-RAS Mutation Kit CE-IVD, metodom kvantitativnog *PCR* u stvarnom vremenu uz početnice i probe *ARMS* i *Scorpions*, smatra zlatnim standardom u detekciji sedam mutacija u kodonu 12 i 13 gena *KRAS* (107). Korištenje istog reagensa odobreno je i u Europskoj Uniji, Kanadi i Australiji (154). Taj komplet reagensa validiran je u akreditiranom laboratoriju u Belgiji prema standardima *Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines* i korišten je u istraživanjima koja su neposredno utjecala na odluku komisije *European Committee for Medicinal Products for Human Use* o odobrenju lijeka panitumumab za bolesnike s metastatskim CRC (112,113,126). U našem su radu korištni upravo taj komercijalni komplet i metoda, jer omogućavaju kvantifikaciju DNA u početnom uzorku. Detekcija mutacija radi se samo u onim uzorcima koji imaju dovoljnu količinu početne DNA. Korištenjem specifičnih PCR-početnica *ARMS* omogućeno je određivanje mutacija koje uključuju promjenu jedne baze u slijedu nukleotida (engl. *single nucleotide polimorphism*, kratica SNP) ili malih delecija. Osnovna karakteristika specifičnih PCR-početnica *ARMS* jest ta da su specifične za određeni slijed nukleotida na kojem se pojavljuje promjena (engl. *sequence-specific ARMS primers* ili *allel-specific ARMS primers*) te na taj način omogućavaju umnažanje analizirane DNA samo onda kada u uzorku postoji ciljna mutacija. Prema tome, nastanak produkta PCR znači postojanje mutacije u uzorku, i obrnuto. Na 3' kraju PCR-početnice *ARMS* nalazi se nukleotid komplementaran promijenjenom nukleotidu u sekvenci DNA na koju se početnica specifično veže. Taq-polimeraza je enzim izrazito učinkovit u prepoznavanju i razlikovanju podudarnosti tražene sekvence i 3' kraja PCR-početnice. Specifično promijenjeni slijed nukleotida selektivno će se umnožiti jer postoji podudarnost s 3' krajem PCR-početnice *ARMS*, čak i onda kada velika većina molekula DNA iz uzorka nema mutaciju. Zato je ova metoda jako specifična i izuzetno osjetljiva (106,155).

U našim uzorcima, prema procjeni patologa, bilo je više od 50% stanica tumora što je osiguralo dovoljnu količinu tumorske DNA u početnom uzorku s obzirom da se za detekciju mutacija koristi metoda izuzetne osjetljivosti (153,154). U odnosu na druge metode koje se koriste za identifikaciju točkastih mutacija u onkogenu *KRAS*, metoda koja je korištena u ovom istraživanju ima najveću osjetljivost, od 1%. Ona osigurava pouzdano određivanje prisutnosti sedam različitih točkastih mutacija u heterogenom uzorku tkiva tumora s malim brojem stanica koje imaju mutaciju gena *KRAS*, bez potrebe potvrđivanja rezultata metodom direktnog sekvenciranja (131,153). Osjetljivost se metode definira kao najmanji postotak mutacija koji se može detektirati u uzorku ukupne analizirane genomske DNA, što znači da se ovom metodom može detektirati 1% genski promijenjenih stanica u odnosu na ukupan broj

stanica u uzorku. U ostalim metodama osjetljivost je 5-30% (106,128,155). Kvantifikacija uzorka osigurava pouzdanu i točnu detekciju mutacija prema prijavljenoj osjetljivosti, čime se izbjegavaju lažno negativni rezultati.

Za detekciju mutacija gena *BRAF* danas ne postoji validirani komercijalni komplet reagensa. U upotrebi su samo testovi koji se mogu koristiti u istraživačke svrhe. Koriste se različite metode: *PCR* u stvarnom vremenu, SSCP (engl. *single strand conformation polymorphism*), RFLP (engl. *restriction fragment length polymorphism*), nakon čega se rezultati najčešće potvrđuju sekvenciranjem. Usporedbom rezultata dobivenih metodom *PCR* u stvarnom vremenu i direktnog sekvenciranja jedna skupina autora objavila je 100% podudarnost rezultata (156). Nedavno je razvijena poboljšana verzija direktnog sekvenciranja tzv. piro-sekvenciranje (engl. *pyroseqencing*), metoda koja ima veću osjetljivost, daje brže rezultate, uspješno analizira degradiranu DNA (male fragmente) lošije kvalitete, ali je i dosta skuplja od direktnog sekvenciranja (155). U ovom se radu za određivanje mutacije gena *BRAF* koristio isti početni uzorak kao i za određivanje mutacija gena *KRAS*. Rezultati dobiveni *PCR* u stvarnom vremenu potvrđeni su metodom direktnog sekvenciranja. Svih deset pozitivnih rezultata na mutaciju gena *BRAF* i dvadeset negativnih, koji su utvrđeni metodom *PCR* u stvarnom vremenu, potvrđeni su metodom direktnog sekvenciranja.

4.2.3. Postanalitička faza: važnost pravilnog izvještavanja o rezultatima

Smjernice ESP upućuju na to da se optimalno izvještavanje o rezultatima testiranja gena *KRAS* na mutacije treba raditi prema smjernicama za osiguranje kvalitete u molekularnom genetičkom testiranju (engl. *Guidelines for Quality Assurance in Molecular Genetic testing*) koje proizlaze iz organizacije OECD (engl. *Organization for Economic Cooperation and Development*) (157). Kada je rezultat testiranja gena *KRAS* na mutacije negativan, važno je u nalazu istaknuti na koje se mutacije testiranje odnosi (jer se različitim metodama testiraju različite mutacije). Kada je rezultat pozitivan, tada je važno specificirati nađenu mutaciju jer su, prema važećim smjernicama, za odabir liječenja bitne samo mutacije u kodonima 12 i 13 gena *KRAS*.

4.3. Učestalost i vrsta mutacija gena *KRAS* i *BRAF* u karcinomu debelog crijeva

Istraživanja koja su se radila na različitom broju uzoraka i pritom koristila različite metode za detekciju mutacija objavila su neujednačene podatake o mutacijama gena *KRAS* u CRC. Nekoliko skupina autora radilo je na usporedbi metoda koje se koriste za određivanje

mutacija u genu *KRAS*, iz čega je vidljivo da se rezultati dobiveni različitim metodama međusobno razlikuju (147,153).

Brojna istraživanja najčešćih mutacija onkogena *KRAS* u karcinomima debelog i završnog crijeva pokazuju različitu učestalost pojedinih mutacija u različitim populacijama svijeta. Na 737 uzoraka karcinoma oboljelih u Nizozemskoj mutacije na kodonima 12 i 13 pronađene su u 37% slučajeva; najčešća je bila mutacija p.Gly12Asp pronađena u 33% uzoraka pozitivnih na mutacije gena *KRAS* (152). Analizom 58 uzoraka tumora oboljelih u Grčkoj mutacija u kodonu 12 nađena je u 29,3% slučajeva (158). U populaciji Marokanaca, mutacije su nađene u 29% od 62 analizirana uzorka (159). U populaciji od 53 oboljele osobe iz Kashmira, metodom SSCP i direktnim sekvenciranjem, mutacije su dokazane u 22,6% uzoraka; najčešća je bila mutacija p.Gly12Asp pronađena u 54% pozitivnih uzoraka (160). Na uzorku od 392 tumora oboljelih Švicaraca učestalost mutacije iznosila je 30,1%; najčešća je bila mutacija p.Gly12Asp (41% pozitivnih uzoraka) zatim p.Gly12Val u 20% i p.Gly13Asp u 23% pozitivnih uzoraka (161). U Španjolskoj su, metodom *PCR* u stvarnom vremenu, mutacije dokazane u 48% uzoraka (162). U Francuskoj su, metodom direktnog sekvenciranja, na uzorku od 586 tumora dokazane mutacije u 34,4% uzoraka; 82,3% mutacija nađeno je u kodonu 12 i 17,7% u kodonu 13 (137).

U Hrvatskoj do sada nije ispitana učestalost mutacija gena *KRAS* u populaciji bolesnika s karcinomom debelog i završnog crijva. U ovoj disertaciji prikazano istraživanje predstavlja prvi takav pokušaj. Učestalost mutacije gena *KRAS* na kodonima 12 i 13, utvrđena metodom kvantitativnog *PCR* u stvarnom vremenu, iznosila je 39,8% (45/113), što je unutar granica učestalosti istih mutacija u drugim populacijskim studijama.

Multicentrična istraživanja na velikom broju uzoraka (engl. *The Kirsten ras in-colorectal-cancer collaborative group*, RASCAL), koja objedinjuju rezultate suradnih skupina iz različitih zemalja svijeta (Australija, Kanada, Francuska, Njemačka, Italija, Irska, Japan..), najbolje ukazuju na učestalost mutacija. Tako je, primjerice, na 2.721 uzorku tumora karcinoma debelog i završnog crijeva, pokazana učestalost mutacije u kodonima 12 i 13 od 37,7% (163). Nakon toga je, u drugoj studiji RASCAL II, analiziranjem 3.439 uzoraka tkiva tumora nađena učestalost mutacija od 35% (104). Ista istraživanja su pokalaza da su najčešće točkaste mutacije gena *KRAS* koje dovode do promjene aminokiseline glicin na kodonu 12 u aspartat c.35G>A (p.Gly12Asp) (32,5%), u valin c.35G>T (p.Gly12Val) (22,5%), u cistein c.34G>T (p.Gly12Cys) (8,8%), u serin c.34G>A (p.Gly12Ser) (7,6%), u alanin c.35G>C (p.Gly12Ala) (6,4%) i u arginin c.34G>C (p.Gly12Arg) (0,9%) odnosno na kodonu 13 u

aspartat c.38G>A (p.Gly13Asp) (16,7%; 19,5%) (104,163). Veći broj mutacija dokazan je u kodonu 12 (70-80%), nego u kodonu 13 (20-30%) (163,164).

I u našem su istraživanju mutacije kodona 12 bile češće (84,5%; 38/45), nego u kodonu 13 (15,5%; 7/45). Najčešća je bila mutacija p.Gly12Val u (42,2%; 19/45) po čemu se razlikujemo od ostalih populacija gdje se najčešće dokazuje mutacija p.Gly12Asp i p.Gly12Ser. U našim je uzorcima mutacija p.Gly12Asp nađena u 24,5% (11/45) uzoraka, mutacija p.Gly13Asp u 15,6% (7/45) uzorka, mutacija p.Gly12Ser u 11,1% (5/45) uzoraka, mutacija p.Gly12Cys u 4,4% (2/45) uzoraka, i mutacija p.Gly12Ala u 2,2% (1/45) uzoraka. U niti jednom uzorku nije dokazana mutacija p.Gly12Arg.

U metastatskim karcinomima debelog i završnog crijeva dokazan je veći postotak mutacija gena *KRAS* na kodonu 12 i 13 nego u ranijim stadijima bolesti (164). U Meksiku su, metodom *PCR* u stvarnom vremenu, na 807 uzoraka metastatskog karcinoma, mutacije gena *KRAS* na kodonu 12 i 13 nađene u 39% uzoraka; najčešća je bila mutacija p.Gly12Ser pronađena u 47% pozitivnih uzoraka, dok je na drugom mjestu bila mutacija p.Gly12Asp pronađena u svega 16% pozitivnih uzoraka (165). U Njemačkoj su, metodom sekvenciranja 1.018 uzoraka primarnog karcinoma i pridruženih metastaza, mutacije gena *KRAS* na kodonima 12 i 13 nađena u 39,3% uzoraka (166). U istraživanjima koja su rađena na uzorcima metastatskih karcinoma, u bolesnika koji su odabrani za liječenje monoklonskim protutijelima anti-EGFR jer su im dokazane udaljene metastaze, također je veća učestalost mutacija gena *KRAS*. Mutacije su dokazane u 40,7% bolesnika alel-specifičnim *PCR* u stvarnom vremenu, u 43% metodom ARMS, 42,3% sekvenciranjem, te u 38% uzoraka meta-analizom 22 studije(127,129,167,168). Učestalost pojedinih specifičnih mutacija gena *KRAS* u metastatskom CRC podjednaka je kao i kod svih stadija bolesti (166).

Najčešća mutacija gena *BRAF* je točkasta mutacija u eksonu 15 (kodon 600) koja dovodi do promjene aminokiseline valin u glutaminsku kiselinu p.Val600Glu, i čini više od 95% svih mutacija ovog gena u karcinomu debelog i završnog crijeva (74). U većini je istraživanja za dokazivanje ove mutacije korištena metoda direktnog sekcvencioniranja, a učestalost mutacije iznosila je od 0% - 6,5% (159,169,170). U Hrvatskoj populaciji, učestalost mutacije p.V600E gena *BRAF* u CRC dokazana metodom *PCR* u stvarnom vremenu uz potvrdu sekvenciranjem, iznosi 8,8% (10/113), što se podudara s do sada objavljenim podacima o učestalosti te mutacije u ostalim populacijama. Učestalost mutacija gena *BRAF* u karcinomu debelog i završnog crijeva bitno je manja od mutacija gena *KRAS* i kreće se od 5-15% (74).

U zajedničkoj studiji koja je provedena u dva medicinska centra (u Grčkoj i Americi) na tkivima metastatskog karcinoma liječenih osoba, mutacije gena *BRAF* nađene su u 8%, a mutacije gena *KRAS* u 37% uzoraka (171). I u drugim populacijama, prijavljena je veća učestalost mutacije gena *BRAF* u bolesnika s metastatskim karcinomom u odnosu na ranije stadije bolesti (137,164).

U Hrvatskoj je tek prošle godine započelo testiranje i liječenje bolesnika s metastatskim karcinomom debelog i završnog crijeva (s udaljenim metastazama) koji su kandidati za novi lijek (cetuksimab). Iz tog razloga još nema dovoljno uzoraka niti podataka na temelju kojih bi se utvrdila učestalost mutacija gena *KRAS* i *BRAF* u metastatskom CRC u našoj populaciji.

Mutacije gena *KRAS* i *BRAF* se u gotovo svim tumorima debelog i završnog crijeva pojavljuju odvojeno; u samo malom broju uzoraka (0-0,4%) pojavljuju se zajedno (164). U našem su istraživanju sve mutacije gena *BRAF* dokazane u uzorcima tumora koji nisu imali mutaciju gena *KRAS*.

4.4. Povezanost mutacija gena *KRAS* i *BRAF* s prognozom bolesti

Premda se čini da su spomenute mutacije povezane s lošijom prognozom bolesti jer se češće dokazuju u metastatskim tumorima i uzrokuju rezistenciju na liječenje novim lijekovima, do danas nema jednoznačnih rezultata koji to potvrđuju. Prognostička vrijednost spomenutih mutacija danas je još uvijek nejasna jer istraživanja u kojima se povezuje prisutnost mutacija s prognostičkim pokazateljima, uključujući ukupno preživljenje i period bez progresije bolesti, ne pokazuju iste rezultate (172). Prema smjernicama REMARK (engl. *Reporting recommendations fot tumor marker prognostic studies*), koje su osmišljene radi poboljšanja kvalitete istraživanja prognostičkih biljega u onkologiji, potrebno je usporediti novi biljeg kandidat (mutacije gena *KRAS*, *BRAF*) s već usvojenim biljezima i utvrditi njegovu samostalnu prognostičku značajnost (173). Za definiranje prognostičke značajnosti u istraživanju naglašava se važnost studije preživljenja Kaplan-Meyerovom analizom te provođenje univarijantne i multivarijantne Cox-regresije. Ovo istraživanje imalo je za cilj utvrditi povezanost prisutnih mutacija gena *KRAS* i *BRAF* s prognozom bolesti usporedbom učestalosti mutacije u tumoru s kliničko-patohistološkim karakteristikama oboljelih (dob, spol) i tumora (klasifikacija po Dukes'u, angioinvazija, histološki stupanj diferencijacije tumora (gradus), veličina tumora, smještaj tumora). Analizu ukupnog preživljenja i perioda

bez progresije bolesti u ovom trenutku nije bilo moguće napraviti jer su bolesnici obuhvaćeni istraživanjem operirani tijekom zadnje dvije godine.

Prva studija RASCAL na 2.721 uzorku CRC pokazala je da je prisutnost mutacije gena *KRAS* povezana s povećanim rizikom od recidiva i smrti te da je mutacija p.Gly12Val agresivnija od ostalih (163). To je potvrđeno i u studiji RASCAL II na još većem broju bolesnika gdje pojava mutacije p.Gly12Valin u tumorima klasificiranim kao Dukes'C ima negativan utjecaj na period bez progresije bolesti i ukupno preživljenje (104,174). U našoj populaciji ističe se visok udio mutacije p.Gly12Val (42,2%). Taj bi podatak, zajedno s podatkom o kasnom otkrivanju karcinoma debelog i završnog crijeva u Hrvatskoj, mogao biti razlogom za trajno visoku smrtnost od ove bolesti.

Prema brojnim istraživanjima važnost životne dobi za prognozu ishoda bolesti još je nejasna. Neke studije pokazuju da ljudi mlađi od 45, 50 ili 60 godina češće imaju lošiju prognozu zbog proširenosti bolesti, histoloških tipova tumora lošije prognoze i češćih recidiva, dok druge studije pokazuju da se karcinom pojavljuje u jednakim stadijima bolesti kod mlađih i starijih bolesnika (175). Prema studijama RASCAL na velikom broju uzoraka nije pronađena statistički značajna razlika u prisutnosti mutacija gena *KRAS* u odnosu na dob bolesnika, dok skupina autora na manjem broju uzoraka u populaciji Grčke i Maroka dokazuju mutacije gena *KRAS* kao češće u skupini bolesnika mlađih od 70, odnosno 60 godina (102,159,169,173). Mutacija gena *BRAF* nije dokazana statistički značajno češće kod mlađih ili starijih bolesnika (175,176). U našem istraživanju nije dokazana statistički značajna razlika u prisutnosti mutacija gena *KRAS* i *BRAF* između skupina mlađih i starijih bolesnika (≤ 60 i > 60 godina).

Neka istraživanja pokazuju da se u žena, češće nego u muškaraca s karcinomom debelog i završnog crijeva, javljaju loše diferencirani tumori i da se bolest češće dijagnosticira u uznapredovalom stadiju, što upućuje na lošiju prognozu ishoda bolesti (177). Međutim, u mnogim studijama mutacije gena *KRAS* i *BRAF* nisu dokazane statistički značajno češće kod žena nego kod muškaraca (102,143,160,163). U našem istraživanju nije dokazana statistički značajna razlika u prisutnosti mutacija gena *KRAS* i *BRAF* između muškaraca i žena.

Veličina tumora nije se pokazala prognostički značajnom (178). Ipak, jedna skupina autora nedavno je pokazala da je veličina tumora neovisan prognostički biljeg te da je prognostička značajnost veća za karcinome debelog crijeva nego za karcinome završnog crijeva (40). Karcinomi debelog crijeva su obično veći od karcinoma završnog crijeva jer se kasnije otkrivaju. U našem istraživanju nije dokazana statistički značajna razlika u prisutnosti

mutacija gena *KRAS* i *BRAF* između skupine manjih (<5 cm) i većih karcinoma (≥ 5cm), kao niti u drugim sličnim studijama (163).

Histološki stupanj diferencijacije tumora (gradus) temelji se na procjeni udjela žljezdanih stanica u tumoru te se prema tome karcinomi debelog i završnog crijeva klasificiraju u dvije kategorije: dobro do umjereno diferencirani (niski gradus) i loše diferencirani (visoki gradus). Histološki gradus dokazan je u mnogim multivarijantnim analizama kao neovisni prognostički biljeg, s tim da je visoki gradus povezan s izuzetno lošom prognozom. Međutim, velika većina kirurški odstranjenih tumora su niskog gradusa, zbog čega je u bilo kakvim daljnjim analizama uvijek veći broj takvih uzoraka. S obzirom da naši uzorci predstavljaju realnu učestalost kirurški odstranjenih karcinoma u našoj ustanovi, od ukupno 111 uzoraka kojima je određen histološki gradus čak 102 spadaju u niski, a svega 9 u visoki gradus. To je jedan od razloga zbog kojeg se u ovom istraživanju dokazuje statistički značajno češća pojava mutacija gena *KRAS* u karcinomima niskog gradusa u odnosu na visoki (p=0,01). Niti jedna mutacija gena *KRAS* nije dokazana u karcinomima visokog gradusa. U velikoj studiji RASCAL objavljeni su isti rezultati kao što su dobiveni u ovom istraživanju, razina statističke značajnosti za pojavu mutacija gena *KRAS* u skupini uzoraka niskoga histološkog gradusa je čak p=0,006 i objašnjava se na isti način. Mutacije gena *BRAF* dokazane su u 22% (2/9) uzoraka visokog gradusa i u 7,8% (8/102) uzoraka niskog gradusa što je slično rezultatima skupine autora iz Australije koji su objavili 24% mutacija u loše diferenciranim i 5% u dobro diferenciranim karcinomima (176).

Stadij po Dukes'u je prihvaćen kao jedan od najjačih prognostičkih biljega u CRC jer pokazuje anatomsku proširenost tumora i izravno je povezan s ukupnim preživljenjem oboljelih. Za stadij bolesti Dukes'A petogodišnje preživljenje iznosi 80-90%, za Dukes'B iznosi 50%, dok prisutnost udaljenih metastaza smanjuje petogodišnje preživljenje na manje od 10% (2). Različite studije upućuju na različite zaključke o povezanosti prisutnosti mutacija gena *KRAS* i/ili *BRAF* u CRC sa stadijem po Dukes'u. Jedna skupina autora u uzorku od 100 karcinoma podijeljenih prema stadiju po Dukes'u u podjednake skupine, nije dokazala nikakvu povezanost mutacija gena *KRAS* i *BRAF* sa stadijem bolesti (179). Međutim, druga skupina autora u velikoj populacijskoj studiji od 1.413 bolesnika dokazuje statistički značajno češću pojavu mutacija gena *KRAS* u uznapredovalim karcinomima debelog crijeva (Dukes'B i C) (180). U našem istraživanju prisutnost mutacija gena *KRAS* u uzorcima ne pokazuje povezanost s tumorima lošije prognoze prema stadiju po Dukes'u, za razliku od mutacija gena *BRAF* koje se statistički značajno češće dokazuju u tumorima stadija Dukes'C što pokazuje

povezanost mutacije gena *BRAF* s lošijom prognozom bolesti. Svi pozitivni rezultati na mutaciju p.V600E gena *BRAF* (10/10) dobiveni su u karcinomima klasificiranim kao Dukes'C, odnosno u uzorcima tumora s metastazama u limfnim čvorovima.

Tumorske stanice često stvaraju udaljene metastaze u jetri i plućima šireći se hematogenim putem. Dokazano je da pojačana aktivnost gena iz porodice *RAS* stimulira angiogenezu i angioinvaziju preko pojačane regulacije vaskularno-endotelnog čimbenika rasta te je prisutnost angioinvazije u tumoru izuzetno snažan prognostički biljeg za karcinome debelog i završnog crijeva (181). U našem istraživanju nismo dokazali povezanost prisutnosti mutacija gena *KRAS* i *BRAF* s angioinvazijom u tumorima, a razlog bi mogao biti mali udio tumora s angioinvazijom u našem ukupnom uzorku, svega 15%.

U posljednja dva desetljeća, porast oboljelih od karcinoma debelog crijeva bitno je veći od porasta oboljelih od karcinoma završnog crijeva (78% i 6%) (182). Također, učestalost jednog od ova dva lokaliteta razlikuje se u različitim dijelovima svijeta (182). Neke studije pokazuju da lokalizacija karcinoma bitno utječe na morfologiju tumora te da se karcinomi debelog i završnog razvijaju po različitim genskim obrascima (177,182). Poznato je da karcinomi završnog crijeva brže metastaziraju zbog svog anatomskog položaja, a karcinomi debelog crijeva u pravilu su veći jer se kasnije otkrivaju. Zanimljive su činjenice da se mutacije gena *BRAF* gotovo uopće ne dokazuju u karcinomima završnog crijeva i da je u karcinomima završnog crijeva relativno veća učestalost mutacija gena *KRAS* u odnosu na karcinome debelog crijeva (143,152). I u našem su istraživanju mutacije gena *BRAF* dokazane isključivo u karcinomima debelog crijeva, a mutacije gena *KRAS* javljaju se jednakom učestalošću u tumorima debelog i zavrsnog crijeva.

Tranzicije i transverzije su točkaste promjene gena. Tranzicije podrazumijevaju zamjenu jedne purinske baze drugom purinskom (A umjesto G i obrnuto), odnosno pirimidinske baze drugom pirimidinskom (T umjesto C i obrnuto). Transverzije podrazumijevaju zamjenu purinske baze pirimidinskom i obrnuto. Za razliku od tranzicija, transverzije G u T i G u C povezane su s metastaziranjem tumora i lošijom prognozom bolesti (104,172). Najčešći tipovi ovakvih mutacija u CRC su tranzicija G u A i transverzija G u T; povezane su sa spolom i sublokalizacijom tumora (152). Isto je nađeno u velikom kohortnom istraživanju provedenom u Nizozemskoj; tranzicija G u A i transverzija G u T najčešće zahvaćaju kodone 12 i 13 gena *KRAS*, u tumorima završnog crijeva je učestalost transverzija G u T veća nego u tumorima debelog crijeva, što se naročito odnosi na oboljele žene (152). U drugoj studiji tranzicija G u A u kodonu 12 gena *KRAS* pronađena je isključivo u tumorima

klasificiranim kao Dukes'B, transverzija G u T nađena je većinom u tumorima klasificiranim kao Dukes'C, a transverzija G u C samo u tumorima stadija Dukes'C što upućuje na povezanost transverzija s napredovanjem i metastaziranjem tumora (172). Jedna skupina autora dokazala je statistički značajnu povezanost tranzicije G u A u kodonu 12 gena *KRAS* s veličinom tumora i smještajem tumora klasificiranih kao Dukes'B (183). U našem istraživanju, od 45 pozitivnih uzoraka na mutaciju gena *KRAS*, tranzicije i transverzije zastupljene su podjednako: u 23 uzorka dokazane su tranzicije, a u 22 transverzije. U karcinomu debelog i završnog crijeva najčešće su dokazane tranzicije G u A (35,6%), i transverzije G u T (46,7%). Usporedba učestalosti po skupinama nije rađena zbog malog broja uzoraka u skupinama.

Uzorci sakupljeni u našoj ustanovi odražavaju stvarnu učestalost patohistološki različitih tumora debelog i završnog crijeva koji se otkrivaju u Hrvatskoj. Manje od 10% tumora otkriva se u lokaliziranom stadiju bolesti (Dukes'A), a najviše u metastatskom stadiju bolesti (Dukes'C) što se i vidi po učestalosti tih stadija bolesti u našem uzorku. Također, u našem uzorku prevladavaju dobro do umjereno diferencirani tumori bez angioinvazije.

Visok udio mutacije p.Gly12Val u našoj populaciji, zajedno s kasnim otkrivanjem ove bolesti u poodmaklom stadiju, čini visoko rizičnu kombinaciju čimbenika koji zajedno utječu na poraznu statistiku kada je u pitanju pojavnost i smrtnost od karcinoma debelog i završnog crijeva u Hrvatskoj.

Do danas nema jednoznačnih rezultata koji proizlaze iz relevantnih studija (primjerice sistematski pregledni članak s meta analizom) i koji nedvojbeno povezuju mutacije gena *KRAS* i *BRAF* s lošom prognozom ove bolesti. U predstavljenom istraživanju, usporedbom mutacija gena *KRAS* s kliničkim i patohistološkim karakteristikama nije dokazana statistički značajna učestalost tih mutacija u tumorima lošije prognoze. Međutim, mutacije gena *BRAF* češće se pojavljuju u loše diferenciranim tumorima i tumorima klasificiranim u stadij bolesti Dukes'C koji uključuje postojanje limfogenih metastaza i kraće preživljenje. Naši rezultati upućuju na zaključak da za razliku od gena *KRAS*, čije mutacije ne možemo povezati s napredovanjem bolesti, gen *BRAF* točkastom mutacijom p.Val600Glu sudjeluje u napredovanju i metastaziranju tumora debelog i završnog crijeva. Kako bi se što bolje razjasnila uloga gena *KRAS* i *BRAF* u napredovanju ovih tumora potrebno je dodatno ispitati prognostičku značajnost ovih gena neovisno o patohistološkim karakteristikama tumora praćenjem ukupnog preživljenja oboljelih i perioda bez progresije bolesti. Također, točkaste mutacije gena *KRAS* i *BRAF* trebalo bi pratiti u kombinaciji s ostalim molekularnim biljezima poznate prognostičke vrijednosti.

5. ZAKLJUČCI

Mutacije gena *KRAS* u uzorcima karcinoma debelog i završnog crijeva

1. Učestalost 7 ispitivanih mutacija gena *KRAS* u karcinomima debelog i završnog crijeva u oboljelih iz Hrvatske iznosi 39,8% što je unutar prijavljene učestalosti istih mutacija u ostalim populacijama.
2. Najčešća mutacija je p.Gly12Val koja je dokazana u 42,2% uzoraka što je specifično za oboljele osobe iz Hrvatske, jer se u ostalim populacijama najčešće dokazuju mutacije p.Gly12Asp i p.Gly12Ser. Odmah iza nje po učestalosti slijede: p.Gly12Asp (24,5% uzoraka) p.Gly13Asp (15,6% uzoraka), p.Gly12Ser (11,1% uzoraka), p.Gly12Cys (4,4% uzoraka) i p.Gly12Ala (2,2% uzoraka). Mutacija p.Gly12Arg (c.34G>C) nije utvrđena.
3. Veći postotak mutacije p.Gly12Val povezujemo s većim udjelom agresivnijih tumora lošije prognoze u ispitivanim uzorcima.
4. Učestalost tranzicija i transverzija bila je podjednaka. Najčešće dokazane transverzije su G>T i tranzicije G>A kao i u drugim sličnim istraživanjima na uzorcima debelog i završnog crijeva.
5. Mutacije su znatno češće u dobro do umjereno diferenciranim tumorima što objašnjavamo izuzetno malim udjelom loše diferenciranih tumora u ispitivanim uzorcima tumora.

Mutacija p.Val600Glu (c.1799T>A) gena *BRAF* u uzorcima karcinoma debelog i završnog crijeva

6. Učestalost ove mutacije u karcinomima debelog crijeva u oboljelih iz Hrvatske iznosi 8,8% što je unutar prijavljene učestalosti iste mutacije u ostalim populacijama .
7. U uzorcima karcinoma završnog crijeva mutacija nije nađena što se podudara s rezultatima drugih studija.
8. Češća je u tumorima dobivenim od oboljelih starije životne dobi (starijih od 60 godina).
9. Češća je u loše diferenciranim tumorima.
10. Češća je u tumorima klasificiranim kao Dukes'C što objašnjavamo ulogom gena *BRAF* u napredovanju i metastaziranju tumora.

6. LITERATURA

1. Štimac D, Katičić M, Kujundžić M, Ljubičić N, Poropat G, Bokun T. Značaj ranog otkrivanja raka debelog crijeva. Medicina 2008; 44: 7-15.

2. Nacionalni program otkrivanja raka debelog crijeva 2007. Dostupno na: www.mzss.hr/programi_i_projekti/prevencija/nacionalni_program_ranog_otkrivanja_raka_debelog_crijeva/ Pristup dana 17/02/2012.

3. GLOBOCAN 2008 (IARC). Section of cancer information 17/02/2012. Dostupno na: http://www.globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp

4. WHO /Top 10 cuses of death. Dostupno na: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index4.html. Pristup dana 17/02/2012.

5. Ebling Z. Rizici za zdravlje. Mala kirurgija. Nacionalni program ranog otkrivanja raka debelog crijeva u Hrvatskoj. Zbornik radova XVIII Kongresa obiteljske medicine 2011; 7-19.

6. Registar za rak, Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija raka u Hrvatskoj 2008. Bilten br. 33. Zagreb, 2010.

7. Boyle P, Langman JS. ABC of colorectal cancer. BMJ 2000; 321: 805-808.

8. Levin KE, Dozois RR. Epidemiology of large bowel cancer. World J Surg 1991; 15: 562-567.

9. Gilroy AM, MacPherson BR, Ross LM. Anatomski atlas. Latinsko nazivlje. Trbuh i zdjelica. Medicinska naklada 2011, Zagreb

10. Vucelić B i sur. Gastroenterologija i hepatologija. Tanko i debelo crijevo. 1.dio. Medicinska naklada Zagreb, 2002.

11. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 1990; 61: 759-767.

12. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. Cell 1996; 87: 159-170.

13. Abdel-Rahman WM, Peltomaki P. Molecular basis and diagnostics of hereditary colorectal cancers. Ann Med 2004; 36: 379-388.

14. Giovannucci E, Willett WC. Dietary factors and risk of colon cancer. 1994; 26: 443-452.

15. Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE. Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. N Engl J Med 1990; 323: 1664-1672.

16. Luchtenborg M, Weijenberg MP, de Goeij AF, Wark PA, Brink M, Roemen GM i sur. Meat and fish consumption, APC gene mutations and hMLH1 expression in colon and rectal cancer: a prospective cohort study (The Netherlands). Cancer Causes Control 2005; 16: 1041-1054.

17. Nomura AM, Hankin JH, Henderson BE, Wilkens LR, Murphy SP, Pike MC i sur. Dietary fiber and colorectal cancer risk: the multiethnic cohort study. Cancer Causes Control 2007; 18: 753-764.

18. Glen H, Cassidy J. Vitamin D (and its analogs) in the treatment and prevention of cancer. Expert Rev Anticancer Ther 2006; 6: 305-308.

19. Van Guelpen B, Hultdin J, Johansson I, Hallmans G, Stenling R, Riboli E i sur. Low folate levels may protect against colorectal cancer. Gut 2006; 55: 1461-1466.

20. Sanjoaquin MA, Allen N, Couto E, Roddam AW, Key TJ. Folate intake and colorectal cancer risk: a meta-analytical approach. Int J Cancer 2005; 113: 825-828.

21. de Vogel S, Dindore V, van Engeland M, Goldbohm RA, van den Brandt PA, Weijenberg MP. Dietary folate, methionine, riboflavin, and vitamin B-6 and risk of sporadic colorectal cancer. J Nutr 2008; 138: 2372-2378.

22. Giovannucci E, Stampfer MJ, Colditz GA, Hunter DJ, Fuchs C, Rosner BA i sur. Multivitamin use, folate, and colon cancer in women in the Nurses' Health Study. Ann Intern Med 1998; 129: 517-524.

23. Pufulete M, Al-Ghnaniem R, Khushal A, Appleby P, Harris N, Gout S i sur. Effect of folic acid supplementation on genomic DNA methylation in patients with colorectal adenoma. Gut 2005; 54: 648-653.

24. Jokić M, Kapitanović S. Nutrigenetics and colon cancer. Period biol 2009; 111: 51-54.

25. Ashktorab H, Begum R, Akhgar A, Smoot DT, Elbedawi M, Daremipouran M i sur. Folate status and risk of colorectal polyps in African Americans. Dig Dis Sci 2007; 52: 1462-1470.

26. Schottenfeld D, Winawer S. Cancers of the large intestine. In: Schottenfeld D, Fraumeni JF Jr, eds. Cancer epidemiology and prevention. 2nd ed. New York: Oxford University Press 1996: 813-840.

27. Potter JD. Colorectal cancer: molecules and populations. JNCI 1999; 91: 916-932.

28. Colditz GA, Cannuscio CC, Fraizer AL. Physical activity and reduced risk of colon cancer: implications for prevention. Cancer Causes Control 1997; 8:649-667.

29. Janne PA, Mayer RJ. Chemoprevention of colorectal cancer. N Engl J Med 2000; 342:1960-1969.

30. Coppola D, Richard CK. Pathology of early colonic neoplasia: clinical and pathologic features of precursor lesions and minimal carcinomas. Cancer Control J 1997;4: 160-166.

31. Ruschoff J, Bocker T, Vogel P, Schlegel J. Prognostic significance of molecular biological and immunohistological parameters in gastrointestinal carcinomas. Recent Results Cancer Res 1996; 142: 73-88.

32. Jass JR. Colorectal adenoma progression and genetic changes: is there a link? Ann Med 1995; 27: 301-306.

33. Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. J Pathol Bacteriol 1932; 35: 323-332.

34. Dukes CE. The surgical pathology of rectal cancer. J Clin Pathol 1949; 2: 95-98.

35. Dukes CE, Bussey HJ. The spread of rectal cancer and its effect on prognosis. Br J Cancer 1958; 12: 309-320.

36. Astler VB, Coller FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. Ann Surg 1954; 139: 846-852.

37. Compton CC. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. Mod Pathol 2003; 16: 376-388.

38. Compton C, Fielding P, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR i sur. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. Arch Pathol Lab Med 2000; 124: 979-993.

39. Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson J, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. Nature Rev 2009; 9: 489-497.

40. Kornprat P, Pollheimer MJ, Lindtner RA, Schlemmer A, Rehak P, Langner C. Value of tumor size as a prognostic variable in colorectal cancer. Am J Clin Oncol 2011; 34: 43-49.

41. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN i sur. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. Nature 1992; 359: 235-237.

42. Bodmer W. Familial adenomatosus polyposis (FAP) and its gene APC. Cytogenet Cell Genet 1999; 86: 99-104.

43. Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. Cancer Res 1998; 58: 1130-1134.

44. Markowitz SD, Dawson DM, Willis J, Wilson JKV. Focus on colon cancer. Cancer Cell 2002; 1: 233-236.

45. Goss KH, Groden J. Biology of adenomatous polyposis coli tumor supressor. J Clin Oncol 2000; 18: 1967-1979.

46. Bos JL, Fearon ER, Hamilton SE, Verlaan-de Vries M, Van Boom JH, Van der Eb AJ i sur. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. Nature 1987; 327: 293-297.

47. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M i sur. Genetic alterations during colorectal-tumor development. N Eng J Med 1988; 319: 525-532.

48. Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjoblom T, Leary RJ i sur. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. Science 2007; 318: 1108-1113.

49. Ellis CA, Clark G. The importance of being K-Ras. Cell Signall 2000; 12: 425-434.

50. Moskaluk CA, Kern SE. Cancer genes MAD-DPC4 and other TGF-beta pathway genes in human cancer. Biochem Bioph Act 1996; 1288: M13-M33.

51. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP I sur. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. Science 1993; 260: 812-816.

52. Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y i sur. Allelotype of colorectal tumors. Science 1989; 244: 207-211.

53. Knudson AG. Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. PNAS USA 1971; 68: 820-823.

54. Boland RC, Sato J, Appelman HD, Bresalier RS, Feinberg AP. Microallelotyping defines the sequence and tempo of allelic losses at tumour suppressor gene loci during colorectal cancer progression. Nat Med 1995; 1: 902-909.

55. Jones S, Chen W, Parmigiani G, Diehl F, Beerenwinkel N, Antal T i sur. Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. PNAS USA 2008; 105: 4283-4288.

56. Fodde R. The APC gene in colorectal cancer. Eur J Cancer 2002; 38: 867-871.

57. Hemminki A, Peltomaki P, Mecklin JP, Jarvinen H, Salovaara R, Nystrom-Lathi M i sur. Loss of the wild type MLH1 gene is a feature of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Nature Genet 1994; 8: 405-409.

58. Parsons R, Li GM, Jongley M, Modrich P, Liu B, Berk T i sur. Mismatch repair deficiency in phenotypically normal human cells. Science 1995; 268: 738-740.

59. Van Epps HL. Peyton Rous: father of the tumor virus. J Exp Med 2005; 201(3): 320.

60. Temin HM. Homology between rna from rous sarcoma virous and dna from rous sarcoma virus-infected cells. Natl Cancer Inst Monogr 1964; 17: 557-570.

61. Baltimore D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. Nature 1970; 226: 1209-1211.

62. Temin HM, Mizutani S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. Nature 1970; 226: 1211-1213.

63. Ruddon WR. Cancer biology 3. izdanje. Oxford: Oxford University Press 1995.

64. Cantley LC, Anger KR, Carpenter C, Duckworth B, Graziani A, Kapeller R i sur. Oncogenes and signal transduction. Cell 1991; 64:2 81-302.

65. Cooper GM, Hausman RE. Stanica. Molekularni pristup. Rak. Peto izdanje. Medicinska naklada Zagreb 2010.

66. Lewin B. Genes VI. Oxford: Oxford University Press and Cell Press 1998.

67. Witte ON. Role of the bcr-abl oncogene in human leukemia. Cancer Res 1993; 53: 485-489.

68. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210 bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. Science 1990; 247: 824-830.

69. Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: A review. Cancer Res 1989; 49: 4682-4689.

70. Hunter T. The proteins of oncogenes. Sci Am 1984; 251: 70-79.

71. Sorić J. Molekularna biologija tumora. U: Turić M, Kolarić K, Eljuga D, ur. Klinička onkologija. Zagreb: Nakladni zavod Globus 1996: 57-86.

72. Kranenburg O. The KRAS oncogene: past, present, and future. Biochim Biophys Acta 2005; 1756: 81-82.

73. Schubbert S, Shannon, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. Nature Rev 2007; 7: 295-308.

74. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S i sur. Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature 2002; 417: 949-954.

75. Jančik S, Drabek J, Radzioch D, Hajduch M. Clinical relevance of KRAS in human cancers. J Biomed Biotech 2010; Aticle ID 150960

76. Popescu NC, Amsbaugh SC, DiPaolo JA. Chromosomal localization of three human ras genes by in situ molecular hybridization. Somat Cell Mol Genet 1985; 11: 149–155

77. McGrath JP, Capon DJ, Smith DH. Structure and organization of the human Ki-ras proto-oncogene and a related processed pseudogene. Nature 1983; 304: 501–506.

78. McBride OW, Swan DC, Tronick SR, Gol R, Klimanis D, Moore DE i sur. Regional chromosomal localization of N-ras, K-ras-1, K-ras-2 and myb oncogenes in human cells. Nucl Acids Res 1983; 11: 8221–8236.

79. Carta C, Pantaleoni F, Bocchinfuso G, Stella L, Vasta I, Sarkozy A i sur. Germline missense mutations affecting KRAS isoform B are associated with a severe Noonan syndrome phenotype. Am J Hum Genetics 2006; 79: 129–135.

80. Cogoi S, Xodo LE. G-quadruplex formation within the promoter of the KRAS proto-oncogene and its effect on transcription. Nucl Acids Res 2006; 34: 2536–2549.

81. Yanagihara M, Ishikawa S, Naito M, Nakajima J, Aburatani H, Hatakeyama M. Paired-like homeoprotein ESXR1 acts as a sequence-specific transcriptional repressor of the human K-ras gene. Oncogene 2005; 24: 5878–5887.

82. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. Science 2001; 294: 853–858.

83. Lewis BP, Burge CB,Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. Cell 2005; 120: 15–20.

84. Lai EC. Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. Nature Genet 2002; 30: 363–364.

85. Johnson SM, Grosshans S, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A i sur. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. Cell 2005; 120: 635–647.

86. Carethers JM. The cellular and molecular pathogenesis of colorectal cancer. Gastro Clin North Am 1996; 25: 737-775

87. Gideon P, John J, Frech M, Lautwein A, Clark R, Scheffler JE i sur. Mutational and kinetic analyses of the GTPase- activating protein (GAP) p21 interaction: the C-terminal domain of GAP is not sufficient for full activity. Mol Cell Biol 1992; 12: 2050–2056.

88. Giglione C, Parrini MC, Baouz S, Bernardi A, Parmeggiani A. A new function of p120-GTPase-activating protein: prevention of the guanine nucleotide exchange factor-stimulated nucleotide exchange on the active form of Ha-Ras p21. J Biol Chem 1997; 272: 25128–25134.

89. Ikawa S, Fukui M, Ueyama Y, Tamaoki N, Yamamoto T, Toyoshima K. B-raf, a new member of the raf family, is activated by DNA rearrangement. Mol Cell Biol 1988; 8: 2651-2654.

90. Storm SM, Cleveland UR, Rapp UR. Expression of raf family proto-oncogenes in normal mouse tissues. Oncogene 1990; 5: 345-351.

91. Barnier JV, Papin C, Eychene A, Lecoq O, Calothy G. The mouse B-raf gene encodes multiple protein isoforms with tissue-specific expression. J Biol Chem 1995; 270: 23381-23389.

92. Papin C, Denouel-Galy A, Laugier D, Calothy G, Eychene A. Modulation of kinase activity and oncogenic properties by alternative splicing reveals a novel regulatory mechanism for B-Raf. J Biol Chem 1998; 273: 24939-24947.

93. Huser M, Luckett J, Chiloeches A, Mercer K, Iwobi M, Giblett S i sur. MEK kinase activity is not necessary for Raf-1 function. EMBO J 2001; 20: 1940-1951.

94. Busca R, Abbe P, Mantoux F, Aberdam E, Peyssonnaux C, Eychene A i sur. Ras mediates the cAMP-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) in melanocytes. EMBO J 2000; 19: 2900-2910.

95. Ciardiello F, Tortora G. Drug therapy: EGFR antagonists in cancer treatment. N Engl J Med 2008; 358: 1160–1174.

96. Metro G, Finocchiaro G, Cappuzzo F. Anti-cancer therapy with EGFR inhibitors: factors of prognostic and predictive significance. Ann Oncol 2006; 17 Suppl 2: 1142–1145.

97. Porebska I, Harlozinska A, Bojarowski T. Expression of the tyrosine kinase activity growth factor receptors (EGFR, ERB B2, ERB B3) in colorectal adenocarcinomas and adenomas. Tumour Biol 2000; 21: 105–115.

98. Haigis KM, Kendall KR, Wang Y, Cheung A, Haigis MC, Glickman JN i sur. Differential effects of oncogenic K-ras and N-ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. Nat Genet 2008; 40: 600–608.

99. Edkins S, O'Meara S, Parker A, Stevens C, Reis M, Jones S i sur. Recurrent KRAS codon 146 mutations in human colorectal cancer. Cancer Biol Ther. 2006; 5: 928-932.

100. Oliveira C, Westra JL, Arango D, Ollikainen M, Domingo E, Ferreira A i sur. Distinct patterns of KRAS mutations in colorectal carcinomas according to germline mismatch repair defects and hMLH1 methylation status. Hum Mol Gen 2004; 13: 2303-2311.

101. Siena S, Bianchi AS, Nicolantonio FD, Balfour J, Bardelli A. Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer. JNCI 2009; 101: 1308-1324.

102. Russo A, Bazan V, Agnese V, Rodolico V, Gebbia N. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer: Kirsten Ras in CRC (RASCAL) and TP53CRC collaborative studies Ann Oncol 2005; 16: iv44–iv49.

103. Samowitz WS, Curtin K, Schaffer D, Robertson M, Leppert M, Slattery ML. Relationship of Ki-ras mutations in colon cancers to tumor location, stage, and survival: a population-based study. Cancer Epidemiol Biom Prev 2000; 9: 1193-1197.

104. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ i sur. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. Br J Cancer. 2001; 85: 692-696.

105. Al-Mulla F, Going JJ, Sowden ET, Winter A, Pickford IR, Birnie GD. Heterogeneity of mutant versus wild-type in primary and metastatic colorectal carcinomas and association of codon 12 valine with early mortality. J Pathol 1998; 185: 130-138.

106. Normanno N, Tejpar S, Morgillo F, De Luca A, Van Cutsem E, Ciardiello F. Implications for *KRAS* status and EgFR-targeted therapies in metastatic CRC. Nat Rev Clin Oncol 2009; 6: 519-527.

107. Bellon E, Ligtenberg MJ, Tejpar S, Cox K, de Hertogh G, de Stricker K i sur. External quality assessment for *KRAS* testing is needed: setup of a European program and report of the First Joined Regional Quality Assessment Rounds. Oncologist 2011; 16: 467-78.

108. Gattenlöhner S, Etschmann B, Kunzmann V, Thalheimer A, Hack M, Kleber G i sur. Concordance of KRAS/BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer before and after anti-EGFR therapy. J Oncol 2009; Article ID 831626; 5.

109. Bamford S, Dawson E, Forbes S, Clements J, Pettett R, Dogan A i sur. The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. Br J Cancer 2004; 91, 355–358.

110. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM i sur. Cancer genome project: mechanism of activation of the RAF-ERK signaling patway by oncogenic mutations of B-RAF. Cell 2004; 116: 855-867.

111. Mercer KE, Pritchard CA. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. Biochem Biophys Acta 2003; 1653: 25-40.

112. Wang HL, Lopategui J, Amin MB, Patterson SD. KRAS mutation testing in human cancers: the pathologist's role in the era of personalized medicine. Adv Anat Pathol 2010; 17: 23–32.

113. Monzon FA, Ogino S, Hammond ME, Halling KC, Bloom KJ, Nikiforova MN. The role of *KRAS* mutation testing in the management of patients with metastatic colorectal cancer. Arch Pathol Lab Med 2009; 133: 1600-1606.

114. LyghtCycler®480 Instrument Operator's Manual 2008. Dostupno na www.roche-applied-science.com. Published by Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, 68298 Mannheim, Germany. 2008 Roche Diagnostics GmbH. All rights reserved.05152062001 0208

115. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F i sur. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. J Clin Endo Metab 2003; 88: 5399-5404.

116. Jass JR. Colorectal cancer: a multipatway disease. Crit Rev Oncogen 2006; 12: 273-287.

117. Baisse B, Bouzourene H, Saraga EP, Bosman FT, Benhattar J. Intratumor genetic heterogeneity in advanced human colorectal adenocarcinoma. Int J Cancer 2001; 93: 346–352.

118. Zlobec I, Lugli A. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. J Clin Pathol 2008; 61: 561–569.

119. Weiser MR, Landmann RG, Kattan MW, Gonen M, Shia J, Chou J i sur. Individualized prediction of colon cancer recurrence using a nomogram. J Clin Oncol 2008; 26: 380–385.

120. Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. N Engl J Med 2008; 358: 1160–1174.

121. Metro G, Finocchiaro G, Cappuzzo F. Anti-cancer therapy with EGFR inhibitors: factors of prognostic and predictive significance. Ann Oncol 2006;17 Suppl 2: ii42–ii45.

122. Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. Biochem J 2000; 351: 289-305.

123. Porebska I, Harlozinska A, Bojarowski T. Expression of the tyrosine kinase activity growth factor receptors (EGFR, ERB B2, ERB B3) in colorectal adenocarcinomas and adenomas. Tumour Biol 2000; 21: 105–115.

124. Hamilton SR. Targeted therapy of cancer: new roles for pathologists in colorectal cancer. Mod Pathol 2008; 21(suppl 2): S23–S30.

125. Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. Eur J Cancer 2001; 37 Suppl 4: S9-S15.

126. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ i sur. Wild-type *KRAS* is required for Panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 2008; 26: 1626-1634.

127. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan C, Tu D, Tebbutt NC i sur. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. N Engl J Med 2008; 359: 1757-1765.

128. Jimeno A, Messersmith WA, Hirsch FR, Franklin WA, Eckhardt G. KRAS mutations and sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in colorectal cancer: Practical application of patient selection. J Clin Oncol 2009; 27: 1130-1136.

129. Lie`vre A, Bachet JP, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E i sur. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with Cetuximab. J Clin Oncol 2008; 26: 374-379.

130. Distribution of somatic mutations in KRAS. COSMIC Database, Sanger Institute. Dostupno na: http://www.sanger.ac.uk/perl/genetics/CGP/cosmic. Pristup dana 26/06/2009.

131. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF i sur. American Society of Clinical Oncology Provisional Clinical Opinion: Testing for *KRAS* gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. J Clin Oncol 2009; 27: 2091-2096.

132. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Rectal Cancer v.2.2009. Fort Washington, PA: National Comprehensive Cancer Network; 2009.

133. Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Zanon C, Moroni M, Veronese S i sur. Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. Cancer Res 2007; 67: 2643-2648.

134. Finocchiaro G, Capuzzo F, Janne K, Bencardino K, Carnaghi C, Franklin WA i sur. EGFR, HER2 and Kras as predictive factors for cetuximab sensitivity in colorectal cancer. J Clin Oncol 2007; 25: 168 (suppl; abstr 4021)

135. Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F, Le Pessot F, Lamy A, Galais MP i sur. Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by cetuximab plus chemotherapy. Br J Cancer 2007; 96: 1166-1169

136. Lievre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E i sur. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. J Clin Oncol 2008; 26: 374-379.

137. Barault L, Veyrie N, Jooste V, Lecorre D, Chapusot C, Ferraz JM i sur. Mutations in the RAS-MAPK, PI(3)K (phosphatidylinositol-3-OHkinase) signaling network correlate with poor survival in a population-based series of colon cancers. Int J Cancer 2008; 122: 2255-2259.

138. Ofner D, Reihemann K, Maier H, Riedmann B, Nehoda H, Totsch M i sur. Immunohistochemically detectable Bcl-2 expression in colorectal carcinoma: correlation with tumor stage and patient survival. Br J Cancer 1995; 72: 981–985.

139. Lee S, Cho NY, Choi M, Yoo EJ, Kim JH, Kang GH. Clinicopathological features of CpG island methylator phenotype-positive colorectal cancer and its adverse prognosis in relation to KRAS/BRAF mutation. Pathol Int 2008; 58: 104–113.

140. National Comprenhesive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines). Accessed: 11/02/2010. Dostupno na: http://www.nccn.org.

141. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. Nature 2002; 418: 934.

142. Saletti P, De Dosso S, Mazzucchelli L, Frattini M, Siena S, Bardell A. Wild-type *BRAF* is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 2008; 26: 5705-5712.

143. Phillips B, Kalady M, Kim R. *BRAF* testing in advanced colorectal cancer: Is it ready for prime time? Clin Adv Hematol Oncol 2010; 8: 437-444.

144. Seth R, Crook S, Ibrahem S, Fadhil W, Jackson D, Ilyas M. Concomitant mutations and splice variants in KRAS and BRAF demonstrate complex perturbation of the Ras/Raf signalling pathway in advanced colorectal cancer. Gut 2009; 58: 1234–1241.

145. Oliveira C, Velho S, Moutinho C, Ferreira A, Preto A, Domingo E i sur. KRAS and BRAF oncogenic mutations in MSS colorectal carcinoma progression. Oncogene 2007; 26: 158–163.

146. van Krieken JH, Jung A, Kirchner T, Carneiro F, Seruca R, Bosman FT i sur. KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program. Virchows Arch 2008; 453: 417–431.

147. Weichert W, Schewe C, Lehmann A, Sers C, Denkert C, Budczies J i sur. KRAS genotyping of paraffin-embedded colorectal cancer tissue in routine diagnostics. Comparison of methods and impact of histology. J Mol Diagn 2010; 12: 35-41.

148. Losi L, Baisse B, Bouzourene H, Benhattar J. Evolution of intratumoral genetic heterogeneity during colorectal cancer progression. Carcinogenesis 2005; 26: 916–922.

149. Losi L, Benhattar J, Costa J. Stability of K-ras mutations throughout the natural history of human colorectal cancer. Eur J Cancer 1992; 28A: 1115–1120.

150. Baldus SE, Schaefer KL, Engers R, Hartleb D, Stoecklein NH, Gabbert HE. Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases. Clin Cancer Res. 2010; 16: 790-799.

151. Loupakis F, Pollina L, Stasi I, Masi G, Funel N, Scartozzi M i sur. Evaluation of PTEN expression in colorectal cancer metastases and in primary tumors as predictors of activity of cetuximab plus irinitecan treatment. J Clin Oncol 2008; 26(Suppl). abstract 4003.

152. Brink M, de Goeij A, Weijenberg MP, Roemen G, Lentjes M, Pachen M i sur. K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. Carcinogenesis 2003; 24: 703-710.

153. Franklin WA, Haney J, Sugita M, Bemis L, Jimeno A, Messersmith WA. KRAS mutation. Comparison of testing methods and tissue sampling techniques in colon cancer. J Mol Diagn 2010; 12: 43-48.

154. Tol J, Dijkstra JK, Vink-Borger ME, Nagtegaal ID, Punt CJ, Van Krieken JH i sur. High sensitivity of both sequencing and PCR u stvarnom vremenu analysis of KRAS mutations in colorectal cancer tissue. J Cell Mol Med 2010; 14: 2122-2131.

155. Ross JS. Clinical implementation of KRAS testing in metastatic colorectal carcinoma. The pathologist's perspective. Arch Pathol Lab Med 2011 doi:10.5858/arpa.2011-0478-RA

156. Benlloch S, Paya A, Alenda C, Bessa X, Andreu M, Jover R i sur. Detection of BRAF V600E mutation in colorectal cancer: comparison of automatic sequencing and real-time chemistry methodology. J Mol Diagn 2006; 8: 540-543.

157. Van Krieken JHJM, Jung A, Kirchner T, Carneiro F, Seruca R, Bosman FT i sur. KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program. Virchows Arch 2008; 453: 417–431.

158. Symvoulakis EK, Zaravinos A, Panutsopulos D, Zoras O, Papalambros E, Sigala F i sur. Highly conserved sequence of exon 15 BRAF gene and KRAS codon 12 mutation among Greek patients with colorectal cancer. Int J Biol Markers. 2007; 22: 12-18.

159. Bennani B, Gilles S, Fina F, Nanni I, Ibrahimi SA, Riffi AA i sur. Mutation analysis of BRAF exon 15 and KRAS codons 12 and 13 in Moroccan patients with colorectal cancer. Int J Biol Markers 2010; 25: 179-184.

160. Sameer AS, Chowdhri NA, Abdullah S. Shah ZA, Siddiqi MA. Mutation pattern of K-ras gene in colorectal cancer patients of Kashmir: A report. Indian J Cancer 2009; 46: 219-225.

161. Zlobec I, Kovac M, Erzberger P, Molinari F, Bihl MP, Rufle A, Foerster A i sur. Combined analysis of specific KRAS mutation, BRAF and microsatellite instability identifies prognostic subgroups of sporadic and hereditary colorectal cancer. Int J Cancer 2010; 127: 2569-2575.

162. Herreros-Villanueva M, Rodrigo M, Claver M, Muniz P, Lastra E, Garcia-Giron C i sur. KRAS, BRAF, EGFR and HER2 gene status in a Spanish population of colorectal cancer. Mol Biol Rep 2010; 38: 1315-1320.

163. Andreyev HJN, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" Study. JNCI 1998; 90: 675-684.

164. Souglakos J, Philips J, Wang R, Marwah S, Silver M, Tzardi M i sur. Prognostic and predictive value of common mutations for treatment response and survival in patients with metastatic colorectal cancer. Br J Cancer 2009; 101: 465-472.

165. Astudillo H, Ruiz-Garcia EB, Vazquez VM, Bastarrachea J, Romero-Garcia P, Silva AJ i sur. Molecular analysis of KRAS polymorphism mutation using a high-resolution melting system in a large mCRC patients sample in Mexico. J Clin Oncol 2011; 29 (Suppl; abstr e14132).

166. Neumann J, Zeindl-Eberhart E, Kirchner T, Jung A. Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. Pathol Res Practice 2009; 205: 858-862.

167. De Rock W, Piessevaux H, De Schutter J, Janssens M, De Hertogh G, Personeni N i sur. KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. Ann Oncol 2008; 19: 508-515.

168. Qiu LX, Mao C, Zhang J, Zhu XD, Liao RY, Xue K i sur. Predictive and prognostic value of KRAS mutations in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab: A meta-analysis of 22 studies. Eur J Cancer 2010; 46: 2781-2787.

169. Symvoulakis EK, Zaravinos A, Panutsopulos D, Zoras O, Papalambros E, Sigala F i sur. Highly conserved sequence of exon 15 BRAF gene and KRAS codon 12 mutation among Greek patients with colorectal cancer. Int J Biol Markers 2007; 22: 12-18.

170. Yokota T, Ura T, Shibata N, Takahari D, Shitara K, Nomura M i sur. BRAF mutation is a a powerful prognostic factor in advanced and recurrent colorectal cancer. Br J Cancer 2011; 104: 856-862.

171. Heinemann V, Stintzing S, Kirchner T, Boeck S, Jung A. Clinical relevance of EGFR- and KRAS-status in colorectal cancer patients treated with monoclonal antibodies directed against the EGFR. Cancer Treat Rev 2009; 35: 262–271.

172. Anwar S, Frayling IM, Scott NA, Carlson GL. Systematic review of genetic influences on the prognosis of colorectal cancer. Br J Surg 2004; 91: 1275-1291.

173. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK). JNCI 2005; 97:1180-1184.

174. Rizzo S, Bronte G, Fanale D, Corsini L, Silvestris N, Santini D i sur. Prognostic vs predictive molecular biomarkers in colorectal cancer: is KRAS and BRAF wild type status required for anti-EGFR therapy? Cancer Treat Rev 2010; 36 Suppl 3: S56-61.

175. Maestro ML, Vidaurreta M, Sanz-Casla MT, Rafael S, Veganzones S, Martinez A i sur. Role of the BRAF mutations in the microsatellite instability genetic pathway in sporadic colorectal cancer. Ann Surg Oncol 2006; 14: 1229-1236.

176. Li WQ, Kawakami K, Ruszkiewicz A, Bennett G, Moore J, Iacopetta B. *BRAF* mutations are associated with distinctive clinical, pathological and molecular features of colorectal cancer independently of microsatellite instability status. Molecular Cancer 2006, 5: 1-6.

177. Ghazi S, Lindforss U, Lindberg G, Berg E, Lindblom A, Papadogiannakis N i sur. Analysis of colorectal cancer morphology in relation to sex, age, location, and family history. J Gastroenterol 2012; doi 10.1007/s00535-011-0520-9.

178. Compton CC. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. Mod Pathol 2003; 16: 376-388.

179. Calistri D, Rengucci C, Seymour I, Lattuneddu A, Polifemo AM, Monti F i sur. Mutation analysis of p53, K-ras and BRAF genes in colorectal cancer progression. J Cell Physiol 2005; 204: 484-488.

180. Samowitz WS, Curtin K, Schaffer D, Robertson M, Leppert M, Slattery ML. Relationship of Ki-ras mutations in colon cancers to tumor location, stage and survival: A population-based study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2000; 9: 1193-1197.

181. Campbell PM, Der CJ. Oncogenic Ras and its role in tumor cell invasion and metastasis. Sem Cancer Biol 2004; 14: 105-114.

182. Li JN, Zhao L, Wu J, Wu B, Yang H, Zhang HH i sur. Differences in gene expression profiles and carcinogenesis pathways between colon and rectal cancer. J Dig Dis 2012; 13: 24-32.

183. Zulhabri O, Rahman J, Ismail S, Isa MR, Wan Zurinhan WN. Predominance of G to A codon 12 mutation K-ras gene in Dukes'B c olorectal cancer. Singapore Med J 2012; 53: 26-31.

7. ŽIVOTOPIS

Ivana Rako rođena je 11. ožujka 1972. godine u Splitu. Osnovnu i srednju školu (Kemijski školski centar Split) pohađala je u Splitu. Farmaceutsko-biokemijski fakultet u Zagrebu upisala je 1990. godine i diplomirala 1995. godine. Diplomski rad ‘’Različite metode izolacije DNA iz eukariotskih stanica genitalnih karcinoma’’ izradila je u Institutu Rudjer Bošković, Zavodu za molekularnu medicinu, pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Krešimira Pavelića.

Nakon obavljenog stručnog staža, 1997. godine, položila je državni ispit pri Ministarstvu zdravstva RH i do danas kontinuirano radi u struci kao medicinski biokemičar. Dvije godine radila je u primarnoj zdravstvenoj zaštiti (Dom zdravlja Senj), deset godina u sekundarnoj (Poliklinika Medico u Rijeci i Poliklinika dr. Obad u Splitu), a od 16. 03. 2009. godine zaposlena je u KBC Zagreb gdje radi kao specijalizant medicinske biokemije i laboratorijske medicine.

Znanstveni poslijediplomski studij ‘’Imunobiologija i fiziologija’’ pristupnica je upisala 1998. godine pri Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Godine 2003. magistrirala je obranom magistarskog rada ‘’Određivanje gubitka heterozigotnosti i mikrosatelitne nestabilnosti gena *hMSH2* u sporadičnim karcinomima debelog crijeva’’ kojeg je izradila u Institutu Ruđer Bošković, Zavodu za molekularnu medicinu, Laboratoriju za molekularnu onkologiju, pod stručnim vodstvom dr. sc. Sanje Kapitanović.

Pristupnica je članica Hrvatske komore medicinskih biokemičara i Hrvatskog društva medicinskih biokemičara.

Recenzent je u časopisu Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM).

POPIS RADOVA

Rad u stranom časopisu (CC)

Rako I, Jakic-Razumovic J, Katalinic D, Sertic J, Plestina S. Mutation pattern of *KRAS* and *BRAF* oncogenes in colorectal cancer patients**.** Neoplasma 2012; doi: 10.4149/neo_2012_049.

Rad u hrvatskom časopisu (Index Medicus/Medline i Scopus)

Rako I, Jakić-Razumović J, Caban D, Sertć J, Katalinić D, Golem H, Pleština S. Uloga mutacije gena *KRAS* u kolorektalnom karcinomu – prediktivni čimbenik odgovora na liječenje inhibitorima EGFR. Liječ Vjesn 2011;133(11/12):403-407.

Stručni radovi

1. Sertić J, Ljubić H, Rako I, Caban D, Zekušić M, Juričić Lj. Primjena automatiziranih elektroforetskih metoda visoke djelotvornosti u kliničkom laboratoriju. Elektroforetske tehnike u molekularnoj dijagnostici. Priručnik za trajno usavršavanje, Medicinska naklada, Zagreb, 2011; 89-105.

2. Rako I, Čvorišćec D. Analitičke pogreške. Zbornik radova Simpozija "Novi trendovi u razvoju modernih laboratorijskih kapaciteta u istraživanju i dijagnostici'', Medicinska naklada, Zagreb, 2009;83-95.

3. Fuček M, Šrenger V, Rako I, Majdenić K, Kuleš K, Stojmilović S, Sertić J. Smanjenje pogrešaka u predanalitičkoj fazi laboratorijskog rada integracijom laboratorijskog i bolničkog informacijskog sustava. Zbornik radova 10. simpozija Hrvatskog društva za medicinsku informatiku Varaždin, Med. Inform. 2011.

4. Šrenger V, Fuček M, Rako I, Majdenić K, Kuleš K, Stojmilović S, Košćina S, Sertić J. Utjecaj bolničkog informacijskog sustava na racionalizaciju poslovanja laboratorijske dijagnostike. Zbornik radova 10. simpozija Hrvatskog društva za medicinsku informatiku Varaždin, Med. inform. 2011, 10:41-50.

Aktivna sudjelovanja na kongresima i međunarodnim tečajevima

1. Sertic J, Rako I, Jakic-Razumovic J, Caban D, Plestina S. *KRAS*: A potential marker of prognosis and treatment efficacy in oncology. 6. Hrvatski kongres farmakologije s međunarodnim sudjelovanjem 2010. Period Biol 2010; 11(Suppl 1):65.

2. Rako I, Katalinic D, Caban D, Sertic J, Plestina S. Apsolutna kvantifikacija gena *KRAS* u kolorektalnom karcinomu. 1. simpozij Hrvatskog onkološkog društva HLZ-a s međunarodnim sudjelovanjem 2011. Knjiga sažetaka 'Tumori probavnog trakta'', str.45.

3. Rako I, Razumovic JJ, Caban D, Sertic J, Plestina S. Mutation pattern of *KRAS* and *BRAF* oncogenes in colorectal cancer patients of croatia. 21th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 19th IFCC-EFCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 8th Annual Meeting of the German Society of

Laboratory Medicine and Clinical Chemistry ''IFCC- WorldLab-EuroMedLab" 2011. Clin Chem Lab Med 2011; 49, Special Suppl, pp S1 – S874, May 2011

4. Rako I, Caban D, Jakic-Razumovic J, Plestina S, Sertic J. The role of determining status of *KRAS* gene in colorectal cancer. 7th ISABS Conference in Forensic, Anthropologic and Medical Genetics and Mayo Clinic Lectures in Translational Medicine, 5th Croatian Congres on Human Genetics 2011. HDHG-ABS-230-ISABS-2011

5. Rako I, Bašić-Marković N. The baseline levels change of biochemical markers of bone turnover osteocalcin and beta-crosslaps. IFCC World Lab Fortaleza 28.9.-2.10.2008. Clin Chem Lab Med 2008; 46, Poster abstracts Special Suppl.

6. Rako I. Loss of heterozygosity and microsatellite instability of hMSH2 gene in sporadic colon cancer. IFCC World Lab Fortaleza 28.9.-2.10.2008. Clin Chem Lab Med 2008; 46, Poster abstracts Special Suppl.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet **Doktorski rad**

ZNAČAJNOST ODREĐIVANJA MUTACIJA GENA *KRAS* I *BRAF* U BOLESNIKA S KARCINOMOM DEBELOG CRIJEVA

IVANA RAKO

KLINIČKI ZAVOD ZA LABORATORIJSKU DIJAGNOSTIKU

KLINIČKI BOLNIČKI CENTAR ZAGREB

SAŽETAK

Uvod. Učestalost i smrtnost od karcinoma debelog crijeva u stalnom je porastu i zato je ova bolest vodeći zdravstveni problem u svijetu i u Hrvatskoj. Nastaje složenim procesom tijekom kojeg dolazi do uzastopnih promjena u tumor supresorskim genima, onkogenima i genima za popravak krivo sparenih baza. Karcinom debelog crijeva može se pojaviti sporadično ili kao nasljedni oblik; u oba slučaja radi se o vrlo heterogenoj skupini zloćudnih tumora. Geni *KRAS* i *BRAF* spadaju u skupinu onkogena. Njihovi produkti posreduju u prijenosu signala od receptora za epidermalni čimbenik rasta (EGFR) na unutarstanične mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK), te na taj način sudjeluju u kontroli staničnog ciklusa. Najčešće promjene ovih gena su točkaste mutacije. Događaju se u dobroćudnoj fazi nastanka karcinoma debelog i završnog crijeva i odgovorne su za klinički značajan rast tumora. Cilj ovog rada je odrediti učestalost i vrstu mutacija gena *KRAS* i *BRAF* u uzorcima karcinoma debelog i završnog crijeva te ispitati da li postoji povezanost mutacija s patohistološkim pokazateljima lošije prognoze bolesti. **Materijali i metode.** U istraživanje je uključeno 113 arhivskih uzoraka (tkiva fiksirana u formalinu i uklopljena u parafin) karcinoma debelog i završnog crijeva osoba koje boluju od te bolesti, operiranih u razdoblju od 2009. do 2011. godine u KBC-u Zagreb. Za izdvajanje DNA korišteno je 6-10 rezova debljine 10 mikrometara svakog pojedinog tkiva. Sedam najčešćih točkastih mutacija gena *KRAS* (p.G12A, p.G12D, p.G12V, p.G12R, p.G12C, p.G12S, p.G13D) određeno je metodom kvantitativnog PCR u stvarnom vremenu, a jedna mutacija gena *BRAF* (p.V600E) metodom PCR u stvarnom vremenu uz analizu krivulje taljenja. Za svakog bolesnika prikupljeni su podaci o dobi, spolu, veličini tumora, histološkom gradusu tumora, stadiju po Dukes'u, angioinvaziji i smještaju tumora. Usporedba učestalosti mutacija u uzorcima podijeljenim po skupinama učinjena je Fisherovim testom, statističkom obradom podataka u programu MedCalc v9.3.2.0. **Rezultati.** Mutacije gena *KRAS* dokazane su u 39,8% uzoraka, a najčešće je dokazana mutacija p.G12V (42,2% uzoraka). Tranzicije i transverzije bile su podjednako zastupljene. Mutacija p.V600E gena *BRAF* dokazana je u 8,8% uzoraka i to isključivo u uzorcima s nemutiranim genom *KRAS*. Učestalost mutacija gena *BRAF* bila je viša u loše diferenciranim tumorima i tumorima klasificiranim u stadij bolesti Dukes'C ($p = 0,04$). Sve mutacije gena *BRAF* dokazane su u karcinomima debelog crijeva ($p = 0,01$). **Zaključak.** Učestalost mutacija gena *KRAS* i *BRAF* u populaciji bolesnika s karcinomom debelog i završnog crijeva iz Hrvatske nalazi se unutar granica prijavljene učestalosti istih mutacija u drugim populacijama svijeta. Ističe se visok udio mutacije p.G12V koja se povezuje s najlošijom prognozom bolesti, što bi se moglo povezati s kontinuirano visokom smrtnošću od ove bolesti u Hrvatskoj. Viša učestalost mutacija gena *BRAF* u tumorima lošije prognoze upućuje na njihovu ulogu u napredovanju bolesti.

Ključne riječi: *KRAS*, *BRAF*, točkaste mutacije, karcinom debelog i završnog crijeva, kliničko-patohistološke osobitosti, prognoza bolesti

Rad je pohranjen u knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta te Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici.
(98 stranica, 43 slike, 9 tablica, 183 literaturna navoda, izvornik je na hrvatskom jeziku)

Voditelj: Dr. sc. Jadranka Sertić, red.prof., Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet

Ocjenjivači: Dr. sc. Jerka Dumić Belamarić, red. prof., Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Dr. sc. Jasminka Pavelić, znanstv. savj., Institut "Ruđer Bošković" u Zagrebu
red. prof., Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet
Dr. sc. Jadranka Sertić, red. prof., Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet

Datum prihvaćanja rada: 20. lipnja 2012.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry **Doctoral Thesis**

SIGNIFICANCE OF *KRAS* AND *BRAF* MUTATION TESTING IN COLORECTAL CANCER PATIENTS

IVANA RAKO

DEPARTMENT OF LABORATORY DIAGNOSTICS

UNIVERSITY HOSPITAL CENTER ZAGREB

SUMMARY

Introduction. Incidence and mortality of colorectal cancer are on constant increase and represent one of the major health problems in the world as well as in Croatia. The development of colon cancer is a multistep process which involves successive genetic alterations of tumor supressor genes, oncogenes and mismatch repair genes. Colon cancer can arise as sporadic or familial hereditary colon cancer, representing in both cases a very heterogeneous group of malignant tumors. *KRAS* and *BRAF* genes are oncogenes. Their products mediate and control cellular responses through mitogen activating protein kinase signal pathway (MAPK), downstream of epidermal growth factor receptor (EGFR). The most common activating mutations of these oncogenes are point mutations. They arise early during the development of colorectal cancer and are associated with the clinically significant tumor growth. The aim of this study was to determine the incidence of *KRAS* and *BRAF* gene mutations in colorectal cancer patients in Croatia and to assess whether they are linked with clinicopathological features of poor prognosis. **Materials and methods.** A total of 113 consecutive colorectal cancer patients were included in this research. They were operated on 2009-2011 period at University Hospital Center Zagreb. Resected tumor samples were formalin fixed and paraffin embedded and prepared for DNA extraction as four to six 10-µm sections. Seven common point mutations of *KRAS* gene (p.G12A, p.G12D, p.G12V, p.G12R, p.G12C, p.G12S, p.G13D) were identified using quantitative real-time PCR, and the most common mutation of *BRAF* gene (p.V600E) was detected using *real-time* PCR by fluorescence melting curve analysis. Clinical and pathological data such as age, sex, tumor size, histologic grade, Dukes'stage, angioinvasion and tumor position were collected for each patient. Differences in clinical and pathological variables between the groups of patients with and without *BRAF* and *KRAS* mutations were analyzed using Fisher exact tests performed using MedCalc v9.3.2.0. **Results.** *KRAS* gene mutations were detected in 39.8% samples, and the most frequent mutation was p.G12V detected in 42.2% positive samples. Transitions and transversions were equally present. *BRAF* gene mutation p.V600E was detected in 8.8% samples, exclusively in tumors without *KRAS* mutations. Incidence of *BRAF* gene mutation was higher in poor differentiated and Dukes'C tumors ($p = 0.04$). All *BRAF* gene mutations were detected in colon cancers ($p = 0.01$). **Conclusion.** The incidence of *KRAS* and *BRAF* gene mutations in colorectal cancer patients from Croatia is within commonly accepted limits. High percentage of p.G12V aggressive mutation can be related to high mortality from colorectal cancer in Croatia. High incidence of *BRAF* gene mutations in tumors with poor prognostic markers shows that *BRAF* mutations play a role in the progression of this disease.

Key words: *KRAS, BRAF*, point mutations, colorectal cancer, clinicopathological features, tumor prognosis

The thesis is deposited in the library of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry and National and University Library in Zagreb. (98 pages, 43 figures, 9 tables, 183 references, original in Croatian language)

Supervisor: Jadranka Sertić, PhD, Professor, University of Zagreb

Reviewers: Jerka Dumić Belamarić, PhD, Professor, University of Zagreb
Jasminka Pavelić, PhD, Senior Scientist, Rudjer Boskovic Institute of Zagreb
Professor, University of Rijeka
Jadranka Sertić, PhD, Professor, University of Zagreb

Thesis accepted: 20. lipnja 2012.