

THE USE OF MOLECULAR GENETIC METHODS FOR RESEARCH OF COLORECTAL CARCINOMA

Tereza Janáková

Bachelor Degree Programme (3), FEEC BUT

E-mail: xjanak04@stud.feec.vutbr.cz

Supervised by: Ivo Provazník

E-mail: provaznik@feec.vutbr.cz

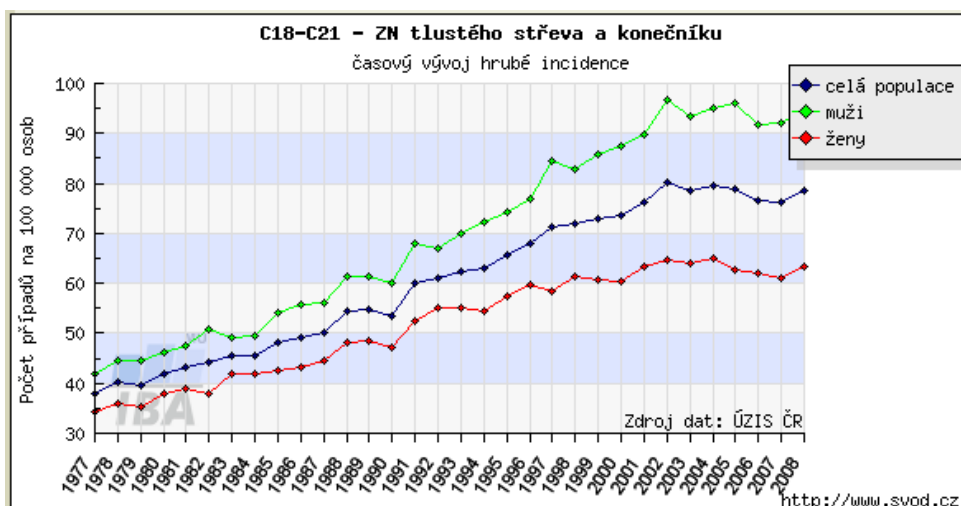
Abstract: Colorectal carcinoma (CRC) is one of the most spread type of cancer in the world. Nowadays, research studies are oriented to identification of genetic mutations in oncogenes that may contribute to prediction of biological treatment outcomes and selection of patients for therapy. The paper considers several suitable diagnostic methods for mutation detection in KRAS and BRAF genes. The methods were applied to a cohort of 302 patients with CRC of which DNA was analysed. Results corresponds to published distribution of mutations and suggests proper detection approach.

Keywords: Colorectal carcinoma, KRAS gene, BRAF gene, detection of mutations

1. ÚVOD

Kolorektální karcinom (CRC) patří celosvětově k nejrozšířenějším nádorovým onemocněním. Česká republika patří dlouhodobě k evropským zemím s vysokým výskytem CRC. Navíc incidence CRC v České republice neustále narůstá (viz Obrázek 1), proto by se tomuto tématu měla věnovat zvýšená pozornost. Úspěšnou léčbu komplikuje především pozdní rozpoznání tohoto onemocnění. CRC je výsledkem akumulace rozdílných genetických a epigenetických změn postihujících epitelální buňku, výsledkem je nekontrolovatelné dělení buněk s vysokou invazivitou a zakládáním metastáz. Důležitou roli v patogenezi CRC hraje dráha receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR) RAS/RAF/MEK a signální dráha PI3K/AKT/mTOR.

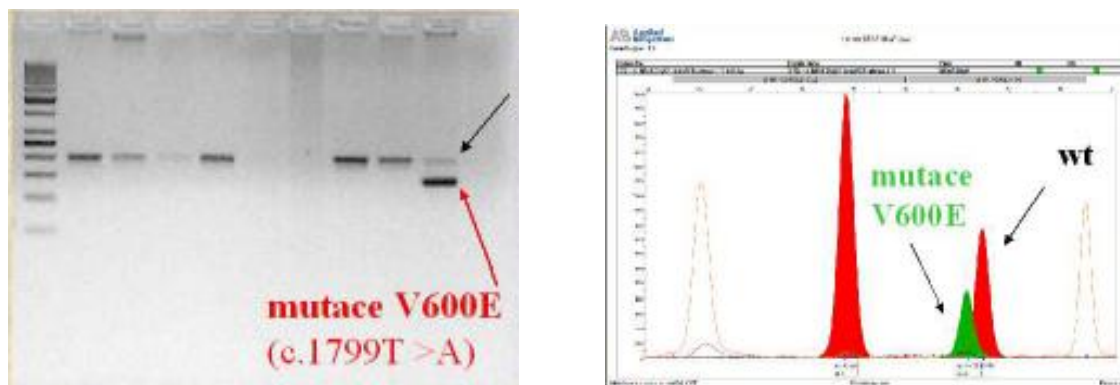
Léčba nádorových onemocnění je z mnoha ohledů náročná. Volba nejvhodnější a nejúčinnější léčebné strategie záleží na velikosti nádoru, jeho lokalizaci a pokročilosti onemocnění. Až u jedné čtvrtiny nemocných jsou v okamžiku stanovení diagnózy přítomny metastázy. Jako moderní léčebný postup se ve světě stále více uplatňuje cílená biologická léčba. Ta vyžaduje identifikaci genetických změn, které mohou predikovat účinnost této léčby a tak pomoci s výběrem pacientů, kteří mohou z léčby profitovat. V současnosti je pro léčbu mCRC monoklonálními protilátkami proti EGFR vyžadováno vyšetření mutačního statutu genu KRAS. To je založeno na výsledcích řady studií, které potvrzují význam prediktivního biomarkeru nemutovaného (wild-type) onkogenu KRAS. Přesto zhruba 50 až 60% pacientů KRAS wild-type je rezistentních na léčbu pomocí anti-EGFR. Současné poznatky naznačují, že k rezistenci na anti-EGFR terapii mohou vést poškození dalších proteinů v EGFR signální dráze, jako např. BRAF proteinu a deregulace PI3K/PTEN signální dráhy. Studium komplexu mutacemi potenciálně zasažených lokusů DNA má proto velký význam pro prohloubení poznání v této oblasti, konkrétně k vysvětlení vztahů mezi současně se vyskytujícími nebo naopak vylučujícími se mutacemi.



Obrázek 1: Časový vývoj incidence nádorů tlustého střeva a konečníku v České republice [1].

2. METODY DETEKCE MUTACÍ V KRAS, BRAF A PIK3CA GENU

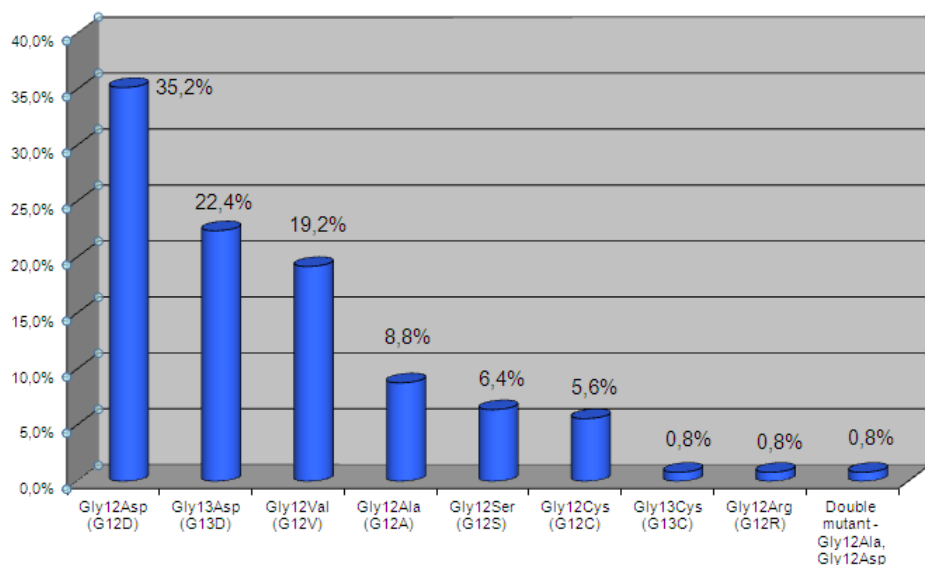
Nádorová DNA pacientů s CRC byla izolována převážně z parafinových bloků s největším zastoupením nádorové tkáně a s přesným označením lokalizace nádoru, případně z nativní nebo fixované nádorové tkáně. Stanovení přítomnosti mutací v kodonu 12 a 13 KRAS genu bylo provedeno zejména metodou PCR a reverzní hybridizace (KRAS Strip Assay, ViennaLab). Analýza mutace V600E v BRAF genu a mutace v exonu 9 (E542K, E545G, E545K) a exonu 20 (H1047R) v PIK3CA genu byla provedena pomocí sekvenčně specifické PCR (viz Obrázek 2 (a)), primer extension analýzy (SNaPshot assay) (viz Obrázek 2 (b)), přímého sekvenování a real-time PCR [2].



Obrázek 2: (a) Sekvenčně specifická PCR.
(b) SNaPshot assay, kodon 600, 601 BRAF genu, mutace V600E.

3. VÝSLEDKY

Retrospektivně byl na přítomnost mutací v KRAS, BRAF a PIK3CA genu analyzován soubor 302 vzorků nádorových DNA pacientů s kolorektálním karcinomem. Mutace v KRAS genu (viz Obrázek 3) byly detekovány u 125 pacientů (41,4 %). Mutace V600E v BRAF genu byly nalezeny u 12 pacientů (4 %). Mutace v PIK3CA genu byly nalezeny u 26 pacientů (8,6 %), z toho v exonu 9 u 13 pacientů (4,3 %) a v exonu 20 u 13 pacientů (4,3 %). Mutace v KRAS a BRAF genu se nevykytovaly současně. U 18 pacientů (5,9 %) se současně vyskytla mutace v KRAS a PIK3CA genu. V jednom případě (0,3 %) byla rovněž detekována přítomnost mutace BRAF genu současně s mutací v exonu 20 PIK3CA genu.



Obrázek 3: Výskyt jednotlivých typů mutací v genu KRAS.

4. ZÁVĚR

Frekvence mutací v KRAS a BRAF genu korelují s publikovanými údaji [3]. Stejně tak koreluje koexistence PIK3CA mutací s mutacemi v KRAS nebo BRAF genu a dosud publikovaná výlučnost současného výskytu mutací KRAS a BRAF genu. Frekvence výskytu mutací v PIK3CA genu je v našem analyzovaném souboru nižší (cca 8,6 %), než je publikovaná frekvence uváděná v literatuře [4]. V personalizované protinádorové terapii mCRC, s objevem řady nových potenciálně účinných inhibitorů proteinů signální dráhy EGFR receptoru (MAPK2K, BRAF, PI3K a mTOR inhibitory), nabývá na významu nejen stanovení mutačního statutu KRAS genu, ale i genetické profilování nádoru o další potenciální markery. Po ověření by mohly tyto markery v budoucnu poskytnout účinný nástroj nejen pro výběr pacientů vhodných pro cílenou biologickou léčbu, ale i pro stanovení efektivní strategie a volby léčebného postupu u pacientů s CRC.

PODĚKOVÁNÍ

Příspěvek vznikl za podpory CGB Laboratoře a.s. pod vedením J. Šimové a I. Urbanovské.

REFERENCE

- [1] Dušek, L., Mužík, J., Kubásek, M., Koptíková, J., Žaloudík, J., Vyzula, R.: Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita, [2005], [cit. 2012-3-04]. Dostupný z WWW: <http://www.svod.cz>. Verze 7.0 [2007], ISSN 1802 – 8861
- [2] Šimová, J., Kubová, B., Janáková, T., Uvírová, M., Urbanovská, I., Jalůvková, M., Konvalinka, D., Žebráková, I., Dvořáčková, J.: Mutace v KRAS, BRAF a PIK3CA genu u pacientů s kolorektálním karcinomem. Sborník XV. konference DNA diagnostiky, Ostrava, 2011
- [3] Vaughn, C. P., ZoBell, S. D., Furtado, L. V., Baker, C. L. and Samowitz, W. S.: Frequency of *KRAS*, *BRAF*, and *NRAS* mutations in colorectal cancer. *Genes Chromosom. Cancer*, 50: 307–312. doi: 10.1002/gcc.20854, 2011
- [4] Velho, S., Oliveira, C., Ferreira, A., Ferreira, A. C., Suriano, G., Schwartz, S., Duval, A., Carneiro, F., Machado, J. C., Hamelin, R., Seruca, R.: The prevalence of PIK3CA mutations in gastric and colon cancer. *European Journal of Cancer*, 41(11): 1649-1654, 2005