

# Onkogeny *RAS* – prediktivní molekulární marker u kolorektálního karcinomu

Tomášek J.<sup>1,2</sup>, Berkovcová J.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav, Brno

<sup>2</sup>LF MU, Brno

<sup>3</sup>1. úsek diagnostické biopické patologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Molekulární vyšetření nádorové tkáně pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem (mCRC) se stalo rutinní praxí. Do poloviny roku 2013 jsme stanovovali mutační stav onkogenu *KRAS* v exonu 2. Průkaz aktivační mutace *KRAS* predikuje rezistenci k inhibitorům receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR), tedy k cetuximabu a panitumumabu. V roce 2013 byla publikována data z rozšířené molekulární analýzy klinické studie III. fáze PRIME. V této studii byla testována účinnost panitumumabu s chemoterapií FOLFOX4 v první linii léčby mCRC proti chemoterapii FOLFOX4 samotné. Výsledky prokazují, že stejný prediktivní význam jako *KRAS* v exonu 2 má stav *KRAS* v exonu 3 a 4 a stav *NRAS* v exonu 2, 3 a 4, hovoříme o rodině onkogenů *RAS*. U skupiny pacientů s *WT RAS* bylo celkové přežití (overall survival – OS) delší v rameni s panitumumabem o 5,8 měsíce (26,0 vs 20,2 měsíce, HR 0,78; 95% CI, 0,62–0,99;  $p = 0,043$ ), podobně bylo prodlouženo také přežití bez progresu (progression-free survival – PFS) (10,1 vs 7,9 měsíce, HR 0,72; 95% CI, 0,58–0,90;  $p = 0,004$ ). V případě *MT RAS* vedla kombinace panitumumab s FOLFOX4 k významnému zkrácení jak OS, tak PFS. Tyto výsledky vedly ke změně indikačních kritérií v SPC Vectibixu.

Recentně byla v září 2013 na kongresu ESMO prezentována data rozšířené molekulární analýzy klinické studie III. fáze FIRE-3, do které byli zařazováni nepředléčení pacienti s mCRC *WT KRAS*, a randomizováni byli do ramene FOLFIRI + cetuximab nebo FOLFIRI + bevacizumab.

Prokázalo se, že pacienti *MT RAS* nemají z přidání cetuximabu k chemoterapii FOLFIRI žádný prospěch. U pacientů *WT RAS* bylo v obou ramenech dosaženo obdobné odpovědi na léčbu (ORR) i PFS, přežití bylo signifikantně delší v rameni s cetuximabem (33,1 vs 25,6 měsíce, HR 0,70; 95% CI, 0,53–0,92;  $p = 0,011$ ). Nakolik byl výsledek OS ovlivněn léčbou v druhé a vyšších liniích, je předmětem diskuzí.

## Rodina onkogenů *RAS*

Proteinové produkty *RAS* onkogenů patří do tzv. superrodiny guanosin-5'-trifosfát (GTPáz), neboli G proteinů, které fungují jako molekulární přepínače mezi receptorovými a nereceptorovými tyrozin kinázami, přenášejícími signál z cytoplazmy směrem k jádru. Díky existenci negativních a pozitivních zpětných vazeb jsou považovány spíše za integrátory signálu než za pouhé přenašeče. V lidských buňkách existují tři potenciálně onkogenní *RAS* geny, které kódují vysoce příbuzné proteiny H-ras, N-ras a K-ras, v případě mCRC má význam pouze K-ras a N-ras (tab. 1) [1]. Mutace v jednotlivých *RAS* genech se vyskytují vždy jedinečně a postihují oblast, která reguluje úroveň enzymatické aktivity proteinu. Za normálních okolností má každý nemutovaný *RAS* nízkou vnitřní GTPázovou aktivitu, která postupně inaktivuje vlastní signalizační funkci hydrolyzou vázaného GTP, kdežto přítomné mutace *RAS* hydrolyze zabrání, a tím dochází ke konstitutivní aktivaci ras proteinu nezávislé na dalších molekulách. Naprostá většina popisovaných mutací onkogenů *RAS* je identifikována pouze v několika málo ko-

Tato aktualita byla podpořena firmou Amgen.

This actuality was supported by Amgen.



MUDr. Jiří Tomášek, Ph.D.

Klinika komplexní onkologické péče  
Masarykův onkologický ústav  
Žlutý kopec 7  
656 53 Brno  
e-mail: tomasek@mou.cz

donech (12, 13, 59, 61, 117 a 146). Tyto kodony kódují aminokyseliny, které zodpovídají za indukci hydrolyzy GTP. Popisované kodony leží ve třech odlišných exonech. Kodony 12 a 13 leží v exonu 2; kodony 59 a 61 v exonu 3 a kodony 117 a 146 pak v exonu 4. Při mutační analýze je tedy nutné vyšetřit sekvence těchto tří exonů jednotlivých genů (*KRAS* a *NRAS* v případě mCRC).

## Metody mutační analýzy *RAS* onkogenů

Při vyšetření mutačního stavu jednotlivých *RAS* onkogenů lze postupovat několika cestami. V první řadě je možné zavést vlastní tzv. in-house metodu. Běžnou takovou metodou je Sangerovo sekvenování jednotlivých úseků genů. Nevýhodou metody je její časová náročnost i nízká senzitivita, která dosahuje pouze 25 % pozitivní (mutované) DNA ve vzorku. Další možností jsou komerčně dodávané kity se značkami CE IVD (určeno pro *in vitro* diagnostiku). Firmy dodávající tyto soupravy zaručují jejich bezpečné používání v diagnostické praxi. Zároveň je zajištěna reprodukovatelnost

výsledků mezi jednotlivými pracovišti. V současné době je k dispozici několik různých typů kitů s RQ PCR aplikacemi pro detekci mutací v exonu 2 onkogenu *KRAS*. Tyto metody dosahují značné senzitivity – detekce až 1 % pozitivní DNA ve vzorku. Kompletní vyšetření požadovaných exonů obou onkogenů v případě mCRC, tedy exonů 2, 3 a 4 u *KRAS* a *NRAS*, v současné době umožňuje pouze CRC RAScan kit firmy Transgenomic se značkou CE IVD. Tato metoda dosahuje senzitivity 2–5 % pozitivní DNA ve vzorku. Nejnovější možností mutačních analýz požadovaných genů jsou metody založené na tzv. sekvenování nové generace (NextGen Sequencing, NGS). Tyto metody jsou nesporně diagnostickou budoucností veškerých molekulárně biologických laboratoří. Poskytují jak vysokou senzitivitu, tak i specifitu testů. Jejich cena zatím není dostupná pro běžná rutinní vyšetření, která jsou požadována plátcí zdravotní péče při léčbě pacientů s mCRC. Při nárůstu sledovaných biomarkerů (počtu oblastí genů) se však tato metoda velmi rychle ekonomicky zvýhodní oproti klasickým metodám. Výhodou metody je rovněž úspora biologického materiálu, kdy vyšetření všech biomarkerů je možné provést ze stejného množství DNA, které odpovídá vyšetření jednoho biomarkeru Sangerovým sekvenováním.

**Tab. 1. Frekvence mutací RAS onkogenů u lidských nádorových onemocnění [1].**

| Typ nádorového onemocnění     | Frekvence mutací | Izoforma Ras proteinu |
|-------------------------------|------------------|-----------------------|
| kolorektální karcinom         | 44 %, 7 %        | K-ras, N-ras          |
| nemalobuněčný plicní karcinom | 33 %, 1%         | K-ras, N-ras          |
| karcinom slinivky břišní      | 90 %             | K-ras                 |
| karcinom štítné žlázy         |                  |                       |
| • folikulární                 | 53 %             | H-ras, K-ras, N-ras   |
| • nediferencovaný papilární   | 60 %             | H-ras, K-ras, N-ras   |
| • papilární                   | 0 %              |                       |
| seminom varlete               | 43 %             | K-ras, N-ras          |
| kožní melanom                 | 13 %             | N-ras                 |
| karcinom močového měchýře     | 10 %             | H-ras                 |
| karcinom jater                | 30 %             | N-ras                 |
| karcinom ledvin               | 10 %             | H-ras                 |
| myelodysplastický syndrom     | 40 %             | N-ras, K-ras          |
| akutní myeloidní leukemie     | 30 %             | N-ras                 |

### Závěr

Znalost stavu *RAS* nám v běžné praxi pomůže přesněji vybrat optimální léčbu pro konkrétního pacienta. Informaci o mutačním stavu *RAS* bychom měli mít již v době diagnózy metastatického kolorektálního karcinomu. Pomůže nám to nejen při výběru optimální protinádorové léčby v první linii,

ale můžeme přesněji dopředu zvažovat možnosti v dalších liniích. Je reálný předpoklad, že se to projeví v prodloužení života pacientů s touto závažnou diagnózou.

### Literatura

1. Adjei AA. Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(14): 1062–1074.