

АНАЛИЗ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ *KRAS* И *BRAF* ПРИ РАКЕ ТОЛСТОЙ И ПРЯМОЙ КИШКИ В РОССИЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Е.Е. Писарева¹, Л.Н. Любченко², С.П. Коваленко¹, В.А. Шаманин¹

НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАМН, г. Новосибирск¹

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина, г. Москва²

630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2/12, e-mail: katerina.pisareva@mail.ru¹

Аннотация

Образцы опухоли толстой и прямой кишки (РТПК) от российских пациентов на наличие мутаций в генах *KRAS* и *BRAF* исследовали с помощью двух высокочувствительных методов анализа: аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени (ас-рв ПЦР) и секвенирования по Сэнгеру с блокированием аллеля дикого типа. **Материал и методы.** В качестве материала для исследования использовали срезы свежемороженой и фиксированной в формалине и заключенной в парафин ткани опухоли от 80 пациентов. На гистологическом исследовании было определено содержание опухолевых клеток в каждом образце. Образцы были протестированы методом ас-рв ПЦР на мутации в гене *KRAS* (G12C, G12S, G12R, G12V, G12D, G12A, G13D) и мутации *BRAFV600E*. Затем была проведена амплификация ДНК образцов в присутствии олигонуклеотида, блокирующего амплификацию аллеля *KRAS* дикого типа с дальнейшим секвенированием ДНК по Сэнгеру. **Результаты.** По данным гистологического заключения из 80 образцов низкое содержание опухолевых клеток (<20 %) было обнаружено в 5 (6 %) случаях. В модельных экспериментах оба метода анализа позволяли детектировать 5 % аллеля с мутацией. Мутации в генах *KRAS* и *BRAF* были обнаружены в 37 (46 %) и 3 (3,8 %) случаях соответственно. Совпадение результатов анализа с помощью обоих методов произошло в 79 (98,8 %) случаях. Расхождение результатов анализа для одного образца связано с тем, что секвенирование ДНК по Сэнгеру обнаружило мутацию *KRASG13R*, тогда как ас-рв ПЦР не включала методику детекции этой мутации. Кроме того, мутация в гене *KRAS* была обнаружена в 2 образцах с низким содержанием опухолевых клеток. Обнаружены 2 случая с несколькими мутациями: 1 образец с мутациями в гене *KRASG12V* и *G13D*, а также 1 образец с мутациями *KRASG13D* и *BRAFV600E*. **Заключение.** Частота мутаций при РТПК для мутаций в гене *KRAS* составила 46 %, для *BRAF* – 3,8 %. Показана сходимость результатов анализа с помощью ас-рв ПЦР и секвенирования по Сэнгеру в 98,8 %. Полученные данные о частотах мутаций согласуются с исследованиями в других странах. В исследовании впервые обнаружен образец РТПК, одновременно содержащий мутации *KRASG13D* и *BRAFV600E*.

Ключевые слова: ПЦР в режиме реального времени, секвенирование по Сэнгеру, рак толстой и прямой кишки, мутации, *KRAS*, *BRAF*.

В России рак толстой и прямой кишки (РТПК) занимает третье место в структуре онкологической патологии. Заболеваемость в РФ составляет 10,4 чел. на 100 тыс. населения в год, при средней пятилетней выживаемости – 50 % [1]. В патогенезе данного заболевания главным является пролиферация эпителиальных клеток слизистой оболочки кишечника. Ранее было показано, что в 80 % случаев РТПК есть гиперэкспрессия EGFR, которая приводит к усиленному росту и делению клеток опухоли вследствие гиперактивации RAS-МАРК сигнального каскада [16]. Для лечения таких больных успешно применяются препараты на основе моноклональных антител к EGFR, которые, связываясь с ним на поверхности клетки, блокируют запуск сигнального каскада и таким

образом препятствуют росту и развитию опухоли [11]. Эффективность лечения этими препаратами зависит от молекулярно-генетических изменений в опухоли: статуса EGFR, наличия мутаций в других участниках сигнального каскада – онкогенах *KRAS* и *BRAF* – и некоторых других факторов. При отсутствии мутаций в гене *KRAS* эффективность лечения РТПК очень высока, увеличивается средняя продолжительность жизни, уменьшается количество рецидивов. В то же время при наличии в клетках опухоли активирующих мутаций в гене *KRAS* использование анти-EGFR антител не приводит к положительным результатам [13]. В 30–40 % случаев РТПК выявляются следующие мутации в 12 и 13 кодонах *KRAS* (85–90 %), которые коррелируют с резистентностью опухолей к анти-EGFR терапии:

G12C, G12S, G12R, G12A, G12V, G12D, G13D. Значительно реже выявляются мутации в кодонах 61 (5 %) и 146 (5 %) [13, 19]. Таким образом, тест на наличие мутации гена *KRAS* необходим пациентам с РТПК для оценки возможности применения таргетной терапии анти-EGFR антителами [13, 19]. Активирующие мутации *BRAF* встречаются, по разным данным, в 5–15 % случаев РТПК, в 95 % случаев это мутация V600E [2–4, 21]. Существуют противоречивые данные о предсказательной роли мутации *BRAFV600E* в отношении ответа опухоли на анти-EGFR терапию и прогностической значимости в отношении прогрессирования заболевания [7, 8, 12, 17]. В настоящее время имеются немногочисленные исследования частоты мутаций в гене *KRAS* и одно исследование мутаций в гене *BRAF* при РТПК у российских пациентов [2–4, 21].

Соматические мутации возникают в клетках опухоли, которые всегда окружены нормальной тканью. Для гистологического исследования, как правило, берется часть опухолевой и нормальной ткани для приготовления фиксированной в формалине и заключенной в парафин (ФФЗП) ткани в виде блоков. Срезы блоков далее окрашиваются для определения типа опухоли и относительного содержания опухолевых клеток, и несколько срезов используются для выделения ДНК. Для анализа соматических мутаций в ДНК опухоли необходим высокочувствительный метод, позволяющий обнаруживать ДНК с мутацией при содержании минимального количества (5–10 %) опухолевых клеток в образце на фоне ДНК дикого типа из нормальной ткани. В большинстве исследований соматических мутаций используется метод секвенирования по Сэнгеру, который детектирует мутацию только при ее содержании в образце более 20 %, что может привести к ложноотрицательным результатам при меньшем содержании ДНК с мутацией в образце [10, 18]. В некоторых случаях эта проблема может быть решена с помощью макродиссекции опухолевой ткани для обогащения опухолевыми клетками, однако в случае диффузного расположения опухолевых клеток выполнить макродиссекцию не представляется возможным. Для точного анализа мутационного статуса всех опухолей необходим более чувствительный метод. Метод аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени (ас-рв ПЦР) обладает высокой чувствительностью и позволяет выявлять мутацию при наличии всего 1–5 % ДНК с мутацией в образце [14].

Целью исследования является анализ частот и спектра мутаций в 12 и 13 кодонах гена *KRAS* и мутации *BRAFV600E* при РТПК у российских пациентов с помощью высокочувствительных методов анализа.

Материалы и методы

Проводили анализ образцов опухолей от 80 российских больных РТПК из НИИ клинической онкологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН и онкологических диспансеров г. Новосибирска. Группа больных состояла из 49 женщин и 31 мужчины в возрасте 24–85 лет (средний возраст – 60,9 года).

Образцы ткани РТПК (n=80), фиксированной в формалине и заключенной в парафин (n=26) и замороженной (n=54), были предоставлены Российским онкологическим научным центром им. Н.Н. Блохина (n=72) и онкологическими диспансерами г. Новосибирска (n=8). Окрашенные срезы ФФЗП ткани были исследованы патоморфологом для определения количества опухолевых клеток. ДНК из замороженной ткани выделяли с помощью набора «QIAampDNA tissue MiniKit» (Qiagen, Германия), предварительно подвергнув образцы ручной макродиссекции для обогащения раковыми клетками. ДНК из срезов ФФЗП ткани выделяли с помощью набора «RealLineFFPETextraction100» («БиоЛинк», РФ) без предварительной макродиссекции.

Анализ мутаций *KRAS* проводили, тестируя образцы в ас-рв ПЦР, используя набор реагентов «KRAS-7M» («БиоЛинк», РФ), который позволяет обнаруживать наиболее частые мутации 12 и 13 кодонов гена *KRAS*. Анализ мутации *BRAFV600E* также проводили с помощью ас-рв ПЦР, используя набор реагентов «BRAFV600E» («БиоЛинк», РФ). Данные тестирования были валидированы с помощью секвенирования.

Набор «KRAS-7M» позволяет проводить анализ мутаций 12 и 13 кодонов гена *KRAS* методом ас-рв ПЦР для определения наиболее распространенных мутаций: G12C, G12S, G12R, G12V, G12D, G12A и G13D. Диагностика с помощью этого метода возможна, если содержание ДНК с мутацией составляет более 5 %. При этом образец ДНК тестируется в отдельной для каждой мутации реакции, содержащей специфичные праймеры. В каждом эксперименте тестируется положительный стандарт, содержащий 5 % ДНК с мутацией. Полученные кривые амплификации и значения *St* для образца ДНК сравниваются с таковыми для положительного стандарта для определения наличия или отсутствия мутации в исследуемом образце. Анализ мутации *BRAFV600E* проводили также методом ас-рв ПЦР с помощью набора реагентов «BRAF-V600E». Метод позволяет детектировать наличие мутации при ее содержании в образце более 1 % [15]. Анализ методом ас-рв ПЦР проводили, используя амплификатор «CFX96 Real-Time PCR detection System» (BioRad, США).

Секвенирование ДНК по Сэнгеру проводили для анализа мутаций в 12 и 13 кодонах гена *KRAS*. Продукт ПЦР для секвенирования получали с помощью набора «KRAS-HiSenSeq» («БиоЛинк»,

РФ), который содержит реагенты для амплификации участка гена *KRAS*, включающего 12 и 13 кодоны. Амплификация происходит в присутствии олигонуклеотида, имеющего последовательность 12 и 13 кодонов *KRAS* дикого типа и поэтому связывающегося преимущественно с ДНК без мутации, что приводит к ингибированию амплификации ДНК дикого типа и увеличению амплификации ДНК с мутацией [5]. Благодаря обогащению мутантным аллелем в ходе ПЦР становится возможным детектировать мутацию при ее содержании в образце ДНК более 5 % (данные будут опубликованы дополнительно). Продукты амплификации очищали, используя набор реагентов QIA quick Gel Extraction Kit (Qiagen, Германия), и далее проводили секвенирующую реакцию, используя набор реагентов Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Продукты секвенирующей реакции очищали с помощью набора реагентов Dye Ex2.0 Spin Kit (Qiagen, Германия) и далее анализировали на автоматическом секвенаторе 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Данное исследование соответствует гуманистическим и этическим нормам (Хельсинкская декларация, 2000, Директивы Европейского Сообщества 86/609 ЕС), о чем имеется заключение комитета по биомедицинской этике ФГБУ «НИИ МББ» СО РАМН от 23.10.2012.

Результаты и обсуждение

В данной работе мутации в генах *KRAS* и *BRAF* анализировали с помощью высокочувствительного метода ас-рв ПЦР с использованием наборов «*KRAS*-7М» и «*BRAF*-V600E». Наборы содержат несколько пар аллель-специфичных праймеров. Такие праймеры на своем 3'-конце содержат последовательность, специфичную к исследуемому аллелю дикого типа или мутантному аллелю, а также TaqMan-зонд для детекции сигнала амплификации в режиме реального времени. При тестировании образцов ДНК со специфичными к мутации праймерами кривая амплификации появляется только при наличии в образце ДНК с мутацией. Если об-

разец ДНК не содержит мутации, то эффективность амплификации снижается, что приводит к отсутствию кривой или ее отставанию от кривой ДНК с мутацией на 5 и более циклов. Такой метод анализа мутаций позволяет детектировать мутации в генах *KRAS* и *BRAF* с чувствительностью 1–5 %. Подтверждение результатов ПЦР проводили с помощью секвенирования по Сэнгеру. В данной работе для увеличения чувствительности метода был использован набор реагентов «*KRAS*-HiSenSeq», который позволяет проводить амплификацию участка гена *KRAS* с обогащением мутантным аллелем, что увеличивает чувствительность метода до 5 %.

Среди исследованных 80 образцов РТПК содержание опухолевых клеток после макродиссекции составляло 5–80 %. В 5 (6 %) случаях опухолевых клеток в образцах было менее 20 %. Возможно, эти образцы не могут быть корректно генотипированы даже после макродиссекции при использовании традиционных методов секвенирования, однако генотипирование таких образцов вполне возможно с использованием в работе методов повышенной чувствительности.

В данной работе все 80 образцов ДНК РТПК были протестированы на мутации в 12 и 13 кодонах гена *KRAS* с помощью ас-рв ПЦР. Для всех образцов получены данные секвенирования участка гена с 12 и 13 кодонами *KRAS* для подтверждения результатов ПЦР. В итоге активирующие мутации *KRAS* обнаружены в 37 (46 %) случаях РТПК (таблица). Из 5 образцов с низким содержанием опухолевых клеток мутация была обнаружена в 2 случаях. При анализе таких образцов традиционным секвенированием по Сэнгеру могли быть получены ложноотрицательные результаты.

Наиболее часто встречающимися мутациями являются G13D (15 %) и G12D (13 %), что согласуется с исследованиями частот мутаций *KRAS* в других странах [5, 9, 20]. В исследованной выборке не было обнаружено случаев с мутацией *KRAS*G12R. По данным исследований в других странах, частота этой мутации составляет 1–2 % [9, 20]. Образец ДНК из РТПК № 62, полученный из замороженного опухолевого материала, содер-

Таблица

Результаты анализа образцов РТПК на мутации в гене *KRAS*

Аллель <i>KRAS</i>	Количество образцов
Дикий тип	43 (54 %)
Мутация 12 и 13 кодона	37 (46 %)
Мутация G12D	10 (13 %)
Мутация G12V	5 (6 %)
Мутация G12C	4 (5 %)
Мутация G12A	3 (4 %)
Мутация G12S	2 (3 %)
Мутация G13D	12 (15 %)
Мутация G13R	1 (1 %)
Всего	80 (100 %)

жал одновременно две мутации: G12V и G13D. Возможно, наличие одновременно двух мутаций связано с гетерогенностью опухоли вследствие поликлональности, где присутствует несколько клеточных популяций с разным генетическим профилем [6]. Образец ДНК № 39 содержал мутацию KRASG13R, которая была выявлена с помощью секвенирования по Сэнгеру, но не была определена методом ас-рв ПЦР, так как в наборе реактивов «KRAS-7М» не предусмотрена соответствующая аллель-специфическая реакция для детекции этой мутации. Поэтому для обнаружения всех редких вариантов мутаций в 12 и 13 кодонах гена KRAS может быть рекомендовано секвенирование ДНК по Сэнгеру с обогащением мутантным аллелем.

В более ранних исследованиях показано, что около 10 % образцов могут иметь расхождения в результатах анализа при тестировании обычным секвенированием по Сэнгеру и более чувствительными методами [10]. В нашем исследовании не было расхождений результатов анализа мутаций в гене KRAS для выборки из 80 образцов благодаря использованию высокочувствительных методов анализа.

Все 80 образцов ДНК из РТПК были протестированы на наличие мутации BRAFV600E методом ас-рв ПЦР. Частота мутации составила 3,8 % (3/80), что согласуется с недавним исследованием в российской популяции, где частота составила 2,7 % (5/195) [21], однако несколько ниже

частоты мутации BRAFV600E, обнаруженной в других странах [7, 8, 12, 17]. Образец РТПК № 10 при тестировании оказался положительным на мутацию KRASG13D и BRAFV600E. В других исследованиях таких случаев обнаружено не было, и поэтому предполагалось, что мутации KRAS и BRAF являются взаимоисключающими [3]. Возможно, это связано с низкой частотой мутаций BRAF при РТПК и поэтому невысокой вероятностью появления опухоли одновременно с двумя мутациями KRAS и BRAF. Кроме того, нельзя исключать и ложноотрицательные результаты, полученные из-за недостаточной чувствительности используемых методов анализа.

Заключение

Проведен анализ 80 образцов РТПК на мутации 12 и 13 кодонов гена KRAS и мутацию BRAFV600E с помощью высокочувствительных методов ас-рв ПЦР и секвенирования по Сэнгеру с обогащением мутантным аллелем. Данные тестирования образцов двумя высокочувствительными методами совпали в 100 % случаев для 7 наиболее частых мутаций в 12 и 13 кодонах гена KRAS. Частота мутаций для мутаций в гене KRAS составила 46 %, для BRAF – 3,8 %. Полученные данные согласуются с исследованиями в других странах. В исследовании впервые обнаружен образец, одновременно содержащий мутации KRASG13D и BRAFV600E.

ЛИТЕРАТУРА

1. Злокачественные новообразования в России в 2011 году (заболеваемость и смертность) // Под ред. В.И. Чиссова, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М., 2013. С. 1–15.
2. Кит О.И., Водолажский Д.И., Двадненко К.В., Гудуева Е.Н., Кутшлин Д.С., Геворкян Ю.А., Владимирова Л.Ю. Частота мутаций в гене KRAS в различных клинических группах пациентов юга России с колоректальным раком // Медицинская генетика. 2014. Т. 13, № 12 (150). С. 35–41.
3. Мазуренко Н.Н., Гагарин И.М., Цыганова И.В., Мочальникова В.В., Бредер В.В., Горбунова В.А. Частота и спектр мутаций KRAS в метастатическом колоректальном раке // Вопросы онкологии. 2013. Т. 59, № 6. С. 751–755.
4. Шубин В.П., Поспехова Н.И., Цуканов А.С., Рыбаков Е.Г., Панина М.В., Сушков О.И., Ачкасов С.И., Жданкина С.Н., Кашиников В.Н., Фролов С.А., Шельгин Ю.А. Частота и спектр мутаций в гене KRAS при раке толстой кишки различной локализации и раке анального канала // Медицинская генетика. 2014. Т.13, № 5 (143). С. 31–35.
5. Arcila M., Lau C., Nafa K., Ladanyi M. Detection of KRAS and BRAF mutations in colorectal carcinoma roles for high-sensitivity locked nucleic acid-PCR sequencing and broad-spectrum mass spectrometry genotyping // J. Mol. Diagn. 2011. Vol. 13 (1). P. 64–73. doi: 10.1016/j.jmoldx.2010.11.005.
6. Blanco-Calvo M., Concha A., Figueroa A., Garrido F., Valladares-Ayerbes M. Colorectal Cancer Classification and Cell Heterogeneity: A Systems Oncology Approach // Int. J. Mol. Sci. 2015. Vol. 16 (6). P. 13610–13632. doi: 10.3390/ijms160613610.
7. De Rooock W., Claes B., Bernasconi D., De Schutter J., Biesmans B., Fountzilias G., Kalogeris K.T., Kotoula V., Papamichael D., Laurent-Puig P., Penault-Llorca F., Rougier P., Vincenzi B., Santini D., Tonini G., Cappuzzo F., Frattini M., Molinari F., Saletti P., De Dosso S., Martini M., Bardelli A., Siena S., Sartore-Bianchi A., Tabernero J., Macarulla T., Di Fiore F., Gangloff A.O., Ciardiello F., Pfeiffer P., Qvortrup C., Hansen T.P., Van Cutsem E., Piessens H., Lambrechts D., Delorenzi M., Tejpar S. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis // Lancet Oncol. 2010. Vol. 11 (8). P. 753–762. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70130-3.

8. Di Nicolantonio F., Martini M., Molinari F., Sartore-Bianchi A., Arena S., Saletti P., De Dosso S., Mazzucchelli L., Frattini M., Siena S., Bardelli A. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer // J. Clin. Oncol. 2008. Vol. 26 (35). P. 5705–5712. doi: 10.1200/JCO.2008.18.0786.
9. Jakovljevic K., Malisic E., Cavic M., Krivokuca A., Dobricic J., Jankovic R. KRAS and BRAF mutations in Serbian patients with colorectal cancer // J. BUON. 2012. Vol. 17 (3). P. 575–580.
10. Jancik S., Drabek J., Berkovcova J., Xu Y.Z., Stankova M., Klein J., Kolek V., Skarda J., Tichy T., Grygarkova I., Radzioch D., Hajdich M. A comparison of Direct sequencing, Pyrosequencing, High resolution melting analysis, TheraScreen DxS, and the K-ras StripAssay for detecting KRAS mutations in non small cell lung carcinomas // J. Exp. Clin. Cancer Res. 2012. Vol. 31. P. 79. doi: 10.1186/1756-9966-31-79.
11. Jean G.W., Shah S.R. Epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies for the treatment of metastatic colorectal cancer // Pharmacotherapy. 2008. Vol. 28 (6). P. 742–754. doi: 10.1592/phco.28.6.742.
12. Laurent-Puig P., Cayre A., Manceau G., Buc E., Bachel J.B., Lecomte T., Rougier P., Lievre A., Landi B., Boige V., Ducreux M., Ychou M., Bibeau F., Bouché O., Reid J., Stone S., Penault-Llorca F. Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer // J. Clin. Oncol. 2009. Vol. 27 (35). P. 5924–5930. doi: 10.1200/JCO.2008.21.6796.
13. Lièvre A., Bachel J.B., Le Corre D., Boige V., Landi B., Emile J.F., Côté J.F., Tomic G., Penna C., Ducreux M., Rougier P., Penault-Llorca F., Laurent-Puig P. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer // Cancer Res. 2006. Vol. 66 (8). P. 3992–3995.
14. Milbury C.A., Li J., Makrigiorgos G.M. PCR-based methods for the enrichment of minority alleles and mutations // Clin. Chem. 2009. Vol. 55 (4). P. 632–640. doi: 10.1373/clinchem.2008.113035.
15. Pisareva E., Gutkina N., Kovalenko S., Kuehnappfel S., Hartmann A., Heizerling L., Schneider-Stock R., Lyubchenko L., Shaminin V.A. Sensitive allele-specific real-time PCR test for mutations in BRAF codon V600 in skin melanoma // Melanoma Res. 2014. Vol. 24 (4). P. 322–331. doi: 10.1097/CMR.0000000000000090.
16. Porebska I., Harlozińska 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. Vol. 21 (2). P. 105–115.

17. Samowitz W.S., Sweeney C., Herrick J., Albertsen H., Levin T.R., Murtaugh M.A., Wolff R.K., Slattery M.L. Poor Survival Associated with the BRAF V600E Mutation in Microsatellite-Stable Colon Cancers // *Cancer Res.* 2005. Vol. 65 (14). P. 6063–6069.

18. Tsiatis A.C., Norris-Kirby A., Rich R.G., Hafez M.J., Gocke C.D., Eshleman J.R., Murphy K.M. Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: diagnostic and clinical implications // *J. Mol. Diagn.* 2010. Vol. 12 (4). P. 425–432. doi: 10.2353/jmoldx.2010.090188.

19. van Krieken J.H., Jung A., Kirchner T., Carneiro F., Seruca R., Bosman F.T., Quirke P., Fléjou J.F., Plato Hansen T., de Hertogh G., Jares P., Langner C., Hoefler G., Ligtenberg M., Tiniakos D., Tejpar S., Bevilacqua G., Ensari A. KRAS mutation testing for predicting response

to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program // *Virchows Arch.* 2008. Vol. 453 (5). P. 417–431. doi: 10.1007/s00428-008-0665-y.

20. Wang D., Liang W., Duan X., Liu L., Shen H., Peng Y., Li B. Detection of KRAS gene mutations in colorectal carcinoma: a study of 6 364 patients // *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 2014. Vol. 43 (9). P. 583–587.

21. Yanus G.A., Belyaeva A.V., Ivantsov A.O., Kuligina E.Sh., Susptsin E.N., Mitiushkina N.V., Aleksakhina S.N., Iyevleva A.G., Zaitseva O.A., Yatsuk O.S., Gorodnova T.V., Strelkova T.N., Efremova S.A., Lepenchuk A.Y., Ochir-Garyayev A.N., Paneyah M.B., Matsko D.E., Togo A.V., Imyaninov E.N. Pattern of clinically relevant mutations in consecutive series of Russian colorectal cancer patients // *Med. Oncol.* 2013. Vol. 30 (3). P. 686. doi: 10.1007/s12032-013-0686-5.

Поступила 23.07.15.
Принята в печать 10.12.15.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Писарева Екатерина Евгеньевна, младший научный сотрудник лаборатории генно-инженерных методов исследования, НИИ молекулярной биологии и биофизики (г. Новосибирск, Российская Федерация). E-mail: katerina.pisareva@mail.ru. SPIN-код: 7151-5842.

Любченко Людмила Николаевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией клинической онкогенетики НИИ клинической онкологии Российского онкологического центра им. Н.Н. Блохина (г. Москва, Российская Федерация). E-mail: clingen@mail.ru. AuthorID: 140311.

Коваленко Сергей Петрович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией генно-инженерных методов исследования НИИ молекулярной биологии и биофизики (г. Новосибирск, Российская Федерация). E-mail: skoval@sibmail.ru. SPIN-код: 2272-6747.

Шаманин Владимир Александрович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории инженерных методов исследования НИИ молекулярной биологии и биофизики (г. Новосибирск, Российская Федерация). E-mail: shamanin@niimbb.ru. SPIN-код: 5669-0201.

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие финансовой поддержки / конфликта интересов, о котором необходимо сообщить

ANALYSIS OF MUTATIONS IN KRAS AND BRAF GENES IN COLORECTAL CANCER IN RUSSIAN PATIENTS

E.E. Pisareva¹, L.N. Ljubchenko², S.P. Kovalenko¹, V.A. Shamanin¹

Institute of Molecular Biology and Biophysics, SB RAMS, Novosibirsk¹
Russian Cancer Research Center memory of N.N. Blokhin, Moscow²
2/12, Timakova Street, 630117-Novosibirsk, Russia, e-mail: katerina.pisareva@mail.ru¹

Mutations in *KRAS* and *BRAF* genes in 80 colorectal cancer (CRC) samples from Russian patients were tested using two methods: 1) allele-specific real-time PCR (as-rt PCR) and 2) wild-type blocking PCR with Sanger sequencing (WTBS). **Material and methods.** Sections of fresh frozen or formalin-fixed paraffin embedded tumor tissue from 80 patients were used in the study. Tumor tissue content was determined on H&E stained sections. Samples were first tested by as-rtPCR for common mutations of the *KRAS* gene (G12C, G12S, G12R, G12V, G12D, G12A, G13D) and mutations *BRAFV600E*. After that samples were evaluated in PCR with oligonucleotide blocking amplification of wild-type DNA for enrichment with mutant allele followed by Sanger sequencing of the PCR DNA (WTBS method). **Results.** In 5 (6.3 %) cases samples had low tumor tissue content (<20 %). In reconstruction experiments both methods detected 1–5 % mutant allele. Mutations of *KRAS* and *BRAF* genes were found in 37 (46 %) and 3 (3.8 %) of the clinical cases, respectively. Classification in to wild-type and mutant samples by both methods was in agreement in 79 (98.8 %) cases. A single case with rare mutation *KRASG13R* was detected by WTBS, but was missed by as-rtPCR since this mutation is not included in the test. Of note, *KRAS* mutations were detected by both tests in two cases with low tumor content. Two cases were found with multiple mutations: one with *KRASG12V* and *G13D*, and one with *KRASG13D* and *BRAFV600E*. Conclusion. The frequency of mutations in CRC was 46 % for mutations in the *KRAS* gene, and 3.8 % for the *BRAF*. We showed 98.8% agreement in *KRAS* mutation detection by sensitive Sanger sequencing and as-rt PCR. The data on the frequencies of mutations are in agreement with studies in other countries. This in the first study to discover CRC case with multiple mutations *KRASG13D* and *BRAFV600E*.

Key words: real-time PCR, Sanger sequencing, colorectal cancer, mutations, *KRAS*, *BRAF*.

REFERENCES

1. *Malignancies in Russia in 2011 (morbidity and mortality)* / Ed. V.I. Chissov, V.V. Starinskiy, G.V. Petrov. M., 2013. P. 1–15. [in Russian]
2. Kit O.I., Vodolazhskij D.I., Dvadenko K.V., Gudueva E.N., Kutilin D.S., Gevorkjan Ju.A., Vladimirova L.Ju. The frequency of mutations in KRAS in different clinical groups of patients with colorectal cancer of the south of Russia // *Medicinskaja genetika*. 2014. Vol. 13, № 12 (150). P. 35–41. [in Russian]
3. Mazurenko N.N., Gagarin I.M., Cyganova I.V., Mochal'nikova V.V., Breder V.V., Gorbunova V.A. The frequency and spectrum of mutations in KRAS in metastatic colorectal cancer // *Voprosy onkologii*. 2013. Vol. 59 (6). P. 751–755. [in Russian]
4. Shubin V.P., Pospeshova N.I., Cukanov A.S., Rybakov E.G., Panina M.V., Sushkov O.I., Achkasov S.I., Zhdankina S.N., Kashnikov V.N., Frolov S.A., Shelygin Ju.A. The frequency and spectrum of mutations in the KRAS gene in colon cancer and cancer of different localization of the anal canal // *Medicinskaja genetika*. 2014. Vol. 13, № 5 (143). P. 31–35. [in Russian]
5. Arcila M., Lau C., Nafa K., Ladanyi M. Detection of KRAS and BRAF mutations in colorectal carcinoma roles for high-sensitivity locked nucleic acid-PCR sequencing and broad-spectrum mass spectrometry genotyping // *J. Mol. Diagn.* 2011. Vol. 13 (1). P. 64–73. doi: 10.1016/j.jmoldx.2010.11.005.
6. Blanco-Calvo M., Concha Á., Figueroa A., Garrido F., Valladares-Ayerbes M. Colorectal Cancer Classification and Cell Heterogeneity: A Systems Oncology Approach // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. Vol. 16 (6). P. 13610–13632. doi: 10.3390/ijms160613610.
7. De Roock W., Claes B., Bernasconi D., De Schutter J., Biesmans B., Fountzilias G., Kalogeris K.T., Kotoula V., Papamichael D., Laurent-Puig P., Penault-Llorca F., Rougier P., Vincenzi B., Santini D., Tonini G., Cappuzzo F., Frattini M., Molinari F., Saletti P., De Dosso S., Martini M., Bardelli A., Siena S., Sartore-Bianchi A., Tabernero J., Macarulla T., Di Fiore F., Gangloff A.O., Ciardiello F., Pfeiffer P., Qvortrup C., Hansen T.P., Van Cutsem E., Piessevaux H., Lambrechts D., Delorenzi M., Tejpar S. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis // *Lancet Oncol.* 2010. Vol. 11 (8). P. 753–762. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70130-3.
8. Di Nicolantonio F., Martini M., Molinari F., Sartore-Bianchi A., Arena S., Saletti P., De Dosso S., Mazzucchelli L., Frattini M., Siena S., Bardelli A. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer // *J. Clin. Oncol.* 2008. Vol. 26 (35). P. 5705–5712. doi: 10.1200/JCO.2008.18.0786.
9. Jakovljevic K., Malisic E., Cavic M., Krivokuca A., Dobricic J., Jankovic R. KRAS and BRAF mutations in Serbian patients with colorectal cancer // *J. BUON.* 2012. Vol. 17 (3). P. 575–580.
10. Jancik S., Drabek J., Berkovcova J., Xu Y.Z., Stankova M., Klein J., Kolek V., Skarda J., Tichy T., Grygarkova I., Radzioch D., Hajduch M. A comparison of Direct sequencing, Pyrosequencing, High resolution melting analysis, TheraScreen DxS, and the K-ras StripAssay for detecting KRAS mutations in non small cell lung carcinomas // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2012. Vol. 31. P. 79. doi: 10.1186/1756-9966-31-79.
11. Jean G.W., Shah S.R. Epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies for the treatment of metastatic colorectal cancer // *Pharmacotherapy*. 2008. Vol. 28 (6). P. 742–754. doi: 10.1592/phco.28.6.742.
12. Laurent-Puig P., Cayre A., Manceau G., Buc E., Bachet J.B., Lecomte T., Rougier P., Lievre A., Landi B., Boige V., Ducreux M., Ychou M., Bibeau F., Bouché O., Reid J., Stone S., Penault-Llorca F. Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer // *J. Clin. Oncol.* 2009. Vol. 27 (35). P. 5924–5930. doi: 10.1200/JCO.2008.21.6796.
13. Lièvre A., Bachet J.B., Le Corre D., Boige V., Landi B., Emile J.F., Côté J.F., Tomic G., Penna C., Ducreux M., Rougier P., Penault-Llorca F., Laurent-Puig P. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer // *Cancer Res.* 2006. Vol. 66 (8). P. 3992–3995.
14. Milbury C.A., Li J., Makrigiorgos G.M. PCR-based methods for the enrichment of minority alleles and mutations // *Clin. Chem.* 2009. Vol. 55 (4). P. 632–640. doi: 10.1373/clinchem.2008.113035.
15. Pisareva E., Gutkina N., Kovalenko S., Kuehnappfel S., Hartmann A., Heinzerling L., Schneider-Stock R., Lyubchenko L., Shamanin V.A. Sensitive allele-specific real-time PCR test for mutations in BRAF codon V600 in skin melanoma // *Melanoma Res.* 2014. Vol. 24 (4). P. 322–331. doi: 10.1097/CMR.0000000000000090.
16. Porebska I., Harlozińska 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. Vol. 21 (2). P. 105–115.
17. Samowitz W.S., Sweeney C., Herrick J., Albertsen H., Levin T.R., Murtaugh M.A., Wolff R.K., Slattery M.L. Poor Survival Associated with the BRAF V600E Mutation in Microsatellite-Stable Colon Cancers // *Cancer Res.* 2005. Vol. 65 (14). P. 6063–6069.
18. Tsiatis A.C., Norris-Kirby A., Rich R.G., Hafez M.J., Gocke C.D., Eshleman J.R., Murphy K.M. Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: diagnostic and clinical implications // *J. Mol. Diagn.* 2010. Vol. 12 (4). P. 425–432. doi: 10.2353/jmoldx.2010.090188.
19. van Krieken J.H., Jung A., Kirchner T., Carneiro F., Seruca R., Bosman F.T., Quirke P., Fléjou J.F., Plato Hansen T., de Hertogh G., Jares P., Langner C., Hoefler G., Ligtenberg M., Tiniakos D., Tejpar S., Bevilacqua G., Ensari A. KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program // *Virchows Arch.* 2008. Vol. 453 (5). P. 417–431. doi: 10.1007/s00428-008-0665-y.
20. Wang D., Liang W., Duan X., Liu L., Shen H., Peng Y., Li B. Detection of KRAS gene mutations in colorectal carcinoma: a study of 6 364 patients // *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 2014. Vol. 43 (9). P. 583–587.
21. Yanus G.A., Belyaeva A.V., Ivantsov A.O., Kuligina E.Sh., Suspitin E.N., Mitiushkina N.V., Aleksakhina S.N., Iyevleva A.G., Zaitseva O.A., Yatsuk O.S., Gorodnova T.V., Strelkova T.N., Efremova S.A., Lepenchuk A.Y., Ochir-Garyayev A.N., Paneyah M.B., Matsko D.E., Togo A.V., Imyanitov E.N. Pattern of clinically relevant mutations in consecutive series of Russian colorectal cancer patients // *Med. Oncol.* 2013. Vol. 30 (3). P. 686. doi: 10.1007/s12032-013-0686-5.

Received 23.07.15.

Accepted 10.12.15.

ABOUT THE AUTHORS

Pisareva Ekaterina E., Junior Researcher, Genetic engineering laboratory, Institute of Molecular Biology and Biophysics (Novosibirsk, Russia). E-mail: katerina.pisareva@mail.ru. SPIN-code: 7151-5842.

Ljubchenko Ljudmila N., MD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of clinical oncogenetics, Russian Cancer Research Center memory of N.N. Blokhin (Moscow, Russia). E-mail: clingen@mail.ru. AuthorID: 140311.

Kovalenko Sergej P., PhD, Head of the Genetic engineering laboratory, Institute of Molecular Biology and Biophysics (Novosibirsk, Russia). E-mail: skoval@sibmail.ru. SPIN-code: 2272-6747.

Shamanin Vladimir A., PhD, Senior Researcher, Genetic engineering laboratory, Institute of Molecular Biology and Biophysics (Novosibirsk, Russia). E-mail: shamanin@niimbb.ru. SPIN-code: 5669-0201.

Authors declare lack of the possible conflicts of interests