

# Uloga gena KRAS u dijagnostici i terapiji kolorektalnog karcinoma

---

**Madunić, Zrinka**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:492025>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-26**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

**Zrinka Madunić**

**Uloga gena *KRAS* u dijagnostici i terapiji kolorektalnog  
karcinoma**

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za Medicinsku biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Nina Sinčića i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2023./2024.

## Abecedni popis kratica

AKT – protein kinaza B

ARMS – genotipizacija polimorfizama PCR metodom alelne diskriminacije, engl.

*Amplification Refractory Mutation System*

CAAX – C = cistein, A = bilo koja alifatska aminokiselina, X = bilo koja aminokiselina

CD4 – engl. *cluster of differentiation 4*

CD8+ – engl. *cluster of differentiation 8*

cfDNA – nestanična DNA, engl. *cell-free DNA*

C-kraj – karboksilni kraj

CRC – kolorektalni karcinom, engl. *colorectal carcinoma*

CTLA4 – citotoksičnim T-limfocitima pridruženi protein 4, engl. *cytotoxic T lymphocyte associated protein*

CXCL10 – hemokinski ligand 10, engl. *C-X-C motif ligand 10*

ddPCR – digitalna kapljična lančana reakcija polimerazom, engl. *digital droplet polymerase chain reaction*

dMMR – engl. *deficient Mismatch Repair*

DNA – deoksibonukleinska kiselina, engl. *deoxyribonucleic acid*

EGF – epidermalni faktor rasta, engl. *epidermal growth factor*

EGFR – receptor za EGF, engl. *epidermal growth factor receptor*

ERK – kinaza regulirana vanjskim signalom, engl. *extracellular signal-regulated kinase*

ETS – engl. *erythroblast transformation specific*

FAP – familijarna adenomatozna polipoza, engl. *familial adenomatous polyposis*

FFPE – fiksirano u formalinu i uklopljeno u parafin, engl. *formalin-fixed paraffin-embedded*

FNA – aspiracija tankom iglom, engl. *fine needle aspiration*

FTaza – farneziltransferaza

GAP – proteini koji aktiviraju GTP-azu

GDP – gvanozin difosfat

GEFs – čimbenici aktivacije izmjene gvanina

GGTaza – geranilgeraniltransferaza

GTP – gvanozin trifosfat

GTP-aza – GTP hidrolaza

HRAS – Harvey-ev virus sarkoma u štakora, engl. *Harvey rat sarcoma virus*

HVR – hipervarijabilna regija

ICMT – izoprenil-cistein-karboksil metiltransferaza

KRAS – Kristen-ov virus sarkoma u štakora, engl. *Kristen rat sarcoma virus*

LAG3 – gen aktivacije limfocita, engl. *lymphocyte activation gene 3*

MAPK – mitogenom aktivirana protein kinaza, engl. *mitogen-activated protein kinase*

MEK – mitogenom-aktivirana proteinska kinaza, engl. *mitogen activated and extracellular-signal regulated kinase*

mRNA – glasnička ribonukleinska kiselina, engl. *messenger ribonucleic acid*

mTOR – meta rapamicina u sisavaca, engl. *mammalian target of rapamycin*

*MUTYH* gen – mutY DNA glikozilaza, engl. *mutY DNA glycosylase*

NF1 – neurofibromin 1

NGS – sekvencioniranje sljedeće generacije, engl. *next generation sequencing*

N-kraj – amino kraj

NRAS – homolog virusnog onkogenog RAS neuroblastoma, engl. *neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*

OS – sveukupno preživljenje, engl. *overall survival*

PCR – lančana reakcija polimerazom, engl. *polymerase chain reaction*

PD1 – protein programirane stanične smrti 1, engl. *programmed cell death protein 1*

PDEδ – fosfodiesteraza δ

PDL1 – ligand programirane stanične smrti 1, engl. *programmed cell death ligand 1*

PFS – preživljenje bez progresije bolesti, engl. *progression-free survival*

PI3K – fosfatidilinozitol 3-kinaza, engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*

RAS – virus sarkoma u štakora, engl. *Rat sarcoma virus*

RCE1 – RAS-konvertirajući enzim

STAT1 – engl. *signal transducer and activator of transcription 1*

TCR – receptor T stanica, engl. *T-cell receptor*

# Sadržaj

*Sažetak*

*Summary*

<i>Uvod</i> .....	<i>1</i>
<i>KRAS gen</i> .....	<i>2</i>
<i>Kolorektalni karcinom</i> .....	<i>7</i>
<i>Dijagnostika analizom KRAS-a</i> .....	<i>10</i>
<i>Terapija temeljena na KRAS-u</i> .....	<i>14</i>
<i>Zaključak</i> .....	<i>19</i>
<i>Zahvale</i> .....	<i>20</i>
<i>Literatura</i> .....	<i>21</i>
<i>Životopis</i> .....	<i>27</i>

## Sažetak

### Uloga gena *KRAS* u dijagnostici i terapiji kolorektalnog karcinoma

Zrinka Madunić

Kolorektalni karcinom (CRC) je heterogena bolest kako na staničnoj tako i na molekularnoj razini. Mutacije gena *KRAS* (engl. *Kirsten rat sarcoma virus*) prisutne su u otprilike 40% svih slučajeva CRC-a te često rezultiraju konstitutivnom aktivacijom istoimenog proteina. Takav, promijenjeni protein djeluje kao molekularni prekidač za neprekidno poticanje signalnih putova nizvodno, što potiče proliferaciju i preživljavanje stanica, a posljedično dovodi do tumorigeneze. Pacijenti čiji CRC sadrži stanice s mutiranim genom *KRAS* sveukupno imaju lošiju prognozu. Postoje različite laboratorijske metode za detekciju mutacija, s naglaskom na PCR analizu u stvarnom vremenu, Therascreen *KRAS* kit, StripAssay i SNaPshot. Zbog prisutnosti *KRAS* mutacija, skupina pacijenata s CRC-om zahtijeva preciznije terapije. *KRAS* protein je povijesno smatran nepristupačnim za ciljanu terapiju sve do razvoja inhibitora specifičnih za *KRAS*G12C. Imunosupresivno okruženje *KRAS* mutiranog CRC-a objašnjava ograničenja imunoterapije, ali ističe i potencijalne terapijske pristupe poput adoptivnog prijenosa T limfocita usmjerenih na *KRAS* mutant ili cjepiva za neutralizaciju proteina *KRAS*. Ovi obećavajući inhibitori mogu pružiti nove strategije za liječenje *KRAS*-mutiranog CRC-a.

Ključne riječi: kolorektalni karcinom, *KRAS*, mutacije *KRAS*, *KRAS* dijagnostika, *KRAS* terapija



## Summary

### Role of gene *KRAS* in the diagnosis and treatment of colorectal cancer

Zrinka Madunić

Colorectal cancer (CRC) is a heterogeneous disease at the cellular and molecular level. *Kirsten rat sarcoma virus* (*KRAS*) gene is a frequently mutated oncogene in CRC, with mutations present in approximately 40% of all CRC cases. Mutations result in constitutive activation of the *KRAS* protein, which acts as a molecular switch to continuously stimulate downstream signalling pathways, promoting cell proliferation and survival, leading to tumorigenesis. Patients whose CRC contains cells with mutated *KRAS* have a worse prognosis overall. There are various laboratory methods for mutation detection, emphasizing real-time PCR analysis, Therascreen *KRAS* kit, and other methods such as StripAssay and SNaPshot. Due to the presence of *KRAS* mutations, this group of CRC patients requires more precise therapies. The *KRAS* protein was historically considered inaccessible to targeted therapy until the development of *KRAS*G12C-specific inhibitors. The immunosuppressive environment of *KRAS* mutated CRC explains the limitations of immunotherapy, but also highlights potential therapeutic approaches such as adoptive transfer of T lymphocytes targeting the *KRAS* mutant or vaccines to neutralize the *KRAS* protein. These promising inhibitors may provide new strategies for the treatment of *KRAS*-mutated CRC.

Key words: colorectal cancer, *KRAS*, *KRAS* mutations, *KRAS* diagnostics, *KRAS* therapy

## Uvod

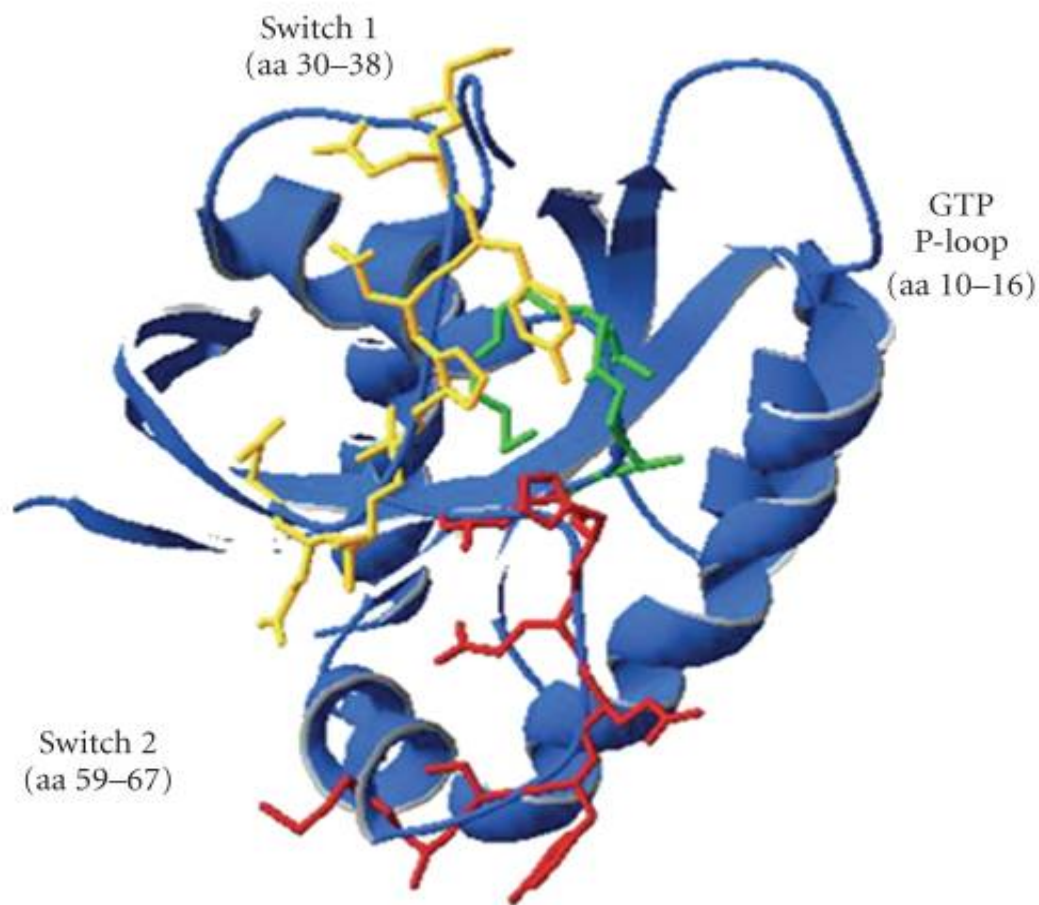
Kolorektalni karcinom (CRC) predstavlja značajan globalni zdravstveni izazov. Kao jedan od najčešćih karcinoma, CRC zauzima visoko treće mjesto po učestalosti, no drugo mjesto po smrtnosti. Veća učestalost CRC-a u razvijenim zemljama ukazuje na povezanost s čimbenicima rizika kao što su velika konzumacija crvenog mesa i alkohola te sjedilački način života (1,2). Patogeneza CRC-a uključuje niz patofizioloških mehanizama, uključujući abnormalnu staničnu proliferaciju, poremećenu staničnu diferencijaciju, otpornost na apoptozu itd. Među različitim genetskim promjenama povezanim s CRC-om, mutacije u genu *Kristen rat sarcoma virus* (*KRAS*) javljaju se u približno čak 40% slučajeva. Ove mutacije dovode do kontinuirane aktivacije proteina KRAS, koji služi kao molekularni prekidač koji pokreće ključne signalne putove odgovorne za staničnu proliferaciju, što pridonosi razvoju i napredovanju raka (3–6).

## ***KRAS* gen**

RAS obitelj čine 3 gena: *KRAS*, *HRAS* i *NRAS*, koji kodiraju za 4 enzima, međusobno visoko homologna (7). Svi *RAS* geni kodiraju GTP-aze čija je zadaća transdukcija izvanstaničnih signala na unutarstanične sekundarne glasnike niz signalne kaskade. Vezanje nukleozida određuje aktivno (uključeno) odnosno neaktivno (isključeno) stanje RAS proteina. Oblik u kojemu je RAS vezan za GTP nazivamo aktivnom konformacijom (8).

*KRAS* (engl. *Kristen rat sarcoma virus*) je mali za membranu vezani protein koji posjeduje aktivnost GTP-aze (GTP-aza hidrolaze) i sudjeluje u brojnim putevima stanične signalizacije. Razina aktivnog *KRAS* proteina u stanicama određena je ravnotežom između izmjene nukleozida i hidrolize (3–5). Mutacije u *RAS* genima dovode do promjene ravnoteže u vezanju GTP-a i GDP-a u korist aktivne konformacije, bilo smanjenjem hidrolize GTP-a ili većom brzinom nakupljanja GTP-a (8). Gen *KRAS* alternativnom doradom egzona 4 tvori dvije izoforme, *KRAS4A* i *KRAS4B*. Iako se *KRAS4B* dugo smatrao glavnom izoformom u karcinoma u ljudi zbog svoje visoke ekspresije, posljednjih godina dokazano je da je *KRAS4A* također široko zastupljena izoforma u karcinoma u ljudi. Protein *KRAS*, molekularne težine 21kDa, sadrži četiri domene (Slika 1.). Prva domena uključuje 85 aminokiselina na N-kraju i identična je u sva tri oblika (*KRAS*, *NRAS* i *HRAS*). Druga domena sadrži 80 aminokiselina, te nije potpuno identična u sva tri oblika RAS proteina (70-80 % identična). Ove regije su važne za signalnu funkciju proteina *KRAS* i zajedno tvore G-domena (aminokiseline 1-165). G-domena *KRAS* proteina uključuje džep za vezanje GTP-a, gdje P-petlja fosfatne vezne petlje (aminokiseline 10-16 i 56-59) stupa u interakciju s b-fosfatom i c-fosfatom GTP-a. Ostaci 116-119 i 152-165 stupaju u interakciju s bazom gvanina. Regija između aminokiselina 32 i 40 (efektorna regija jezgre) bitna je za interakcije između nizvodnih efektoru i GAP-ova. RAS protein također sadrži hipervarijabilnu regiju (HVR) na C-kraju (aminokiseline 165-188/189;

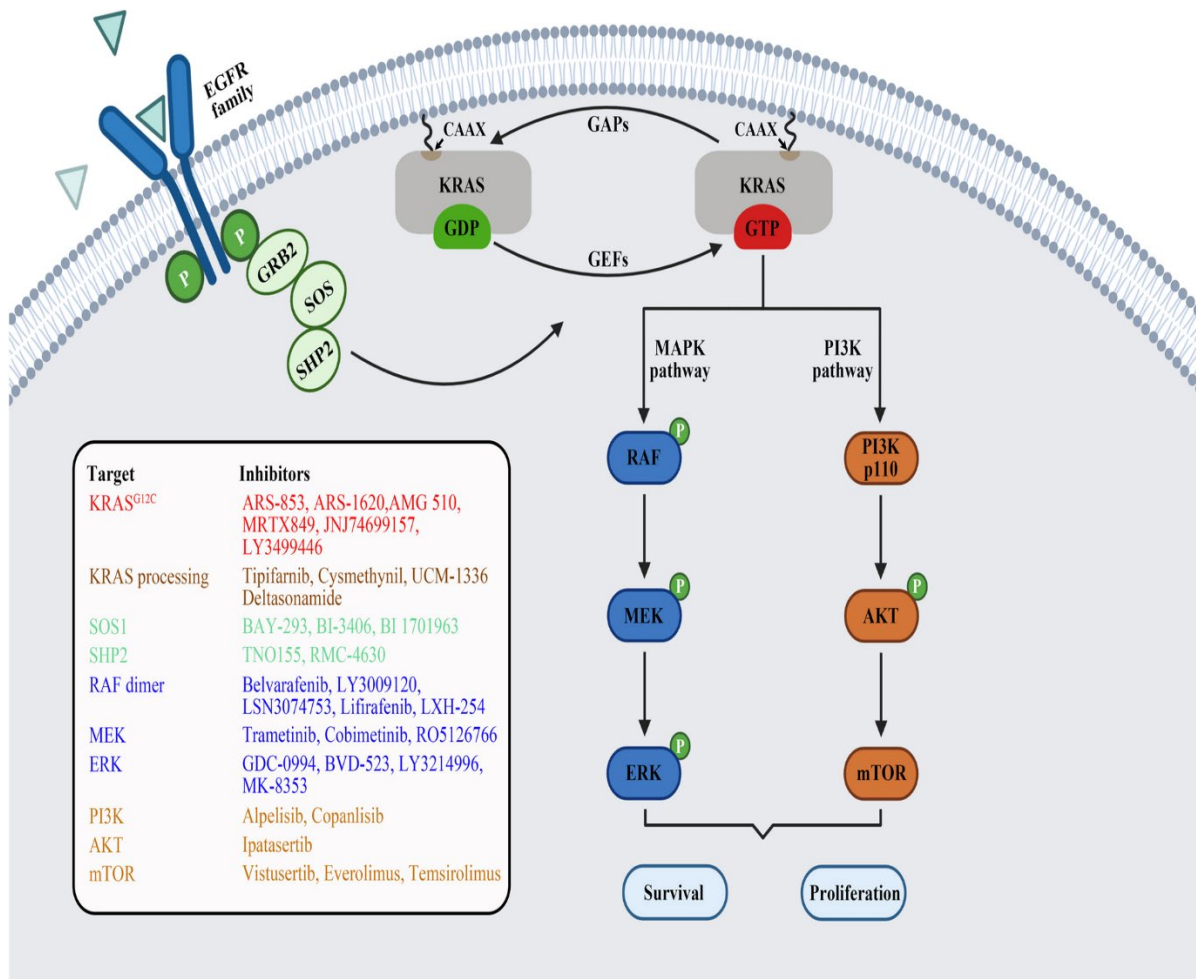
treća domena), koja vodi posttranslacijsku modifikaciju i određuje usidrenje za plazma membranu. Ovo područje ima važnu ulogu u regulaciji biološke aktivnosti RAS proteina (5,9).



Slika 1. Model proteina KRAS s istaknutim važnim domenama. Preuzeto iz Jančik i sur. (5).

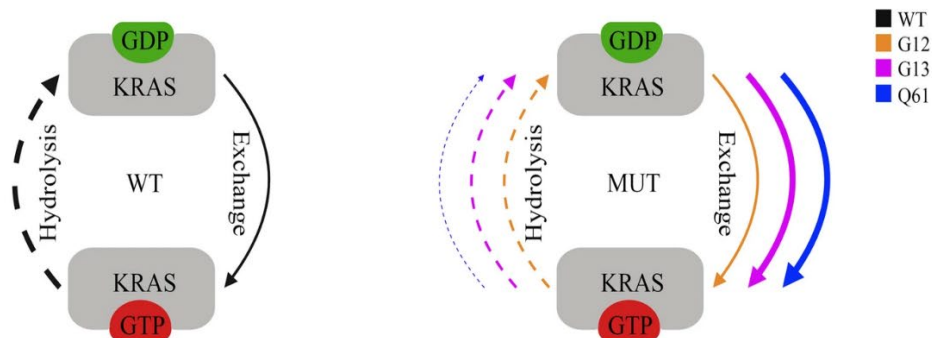
Domena C je hipervarijabilna regija na čijem se kraju nalazi CAAX (C = cistein, A = bilo koja alifatska aminokiselina, X = bilo koja aminokiselina). C-kraj čini tako svojevrsnu metu za razne posttranslacijske modifikacije te igra važnu ulogu u transportu novosintetiziranih i modificiranih KRAS proteina (6,9). Čimbenici aktivacije izmjene gvanina (engl. *guanine exchange factors*, GEFs), kao što su *sons of sevenless* (SOS) i Ras-gvanil-nukelotid-oslobađajući protein (engl. *Ras guanyl nucleotide-releasing protein*) koji katalizira vezivanje i deaktivaciju GTP-a proteinima koji aktiviraju GTP-azu (engl. *GTP-ase activating proteins*, GAPs), kao što su P120GAP i neurofibromin (NF1), koji stimulira hidrolizu GTP-a, važni su

čimbenici regulacije i aktivacije, odnosno deaktivacije samog KRAS onkoproteina (10). Vežanje GTP-a za KRAS olakšava vežanje efektorskih molekula odgovornih za pokretanje nekoliko nizvodnih signalnih puteva kao što su RAF (engl. *rapidly accelerated fibroarcoma*) - MEK (engl. *mitogen-activated protein kinase*) - ERK (engl. *extracellular signal-regulated kinase*) te PI3K (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*) – AKT (engl. *protein kinase B*) – mTOR (engl. *mechanistic target of rapamycin*) puteva, koji potiču rast i preživljavanje stanica. Nasuprot tome, KRAS vežan za GDP gubi aktivnost te kao takav sprječava trajnu transdukciju signala (6) (Slika 2.). Prema podacima o globalnom opterećenju bolesti povezanih s *RAS* mutacijama u različitim oblicima raka, procjenjuje se da 19% oboljelih od raka ima *RAS* mutacije, što odgovara 3,4 milijuna novih slučajeva godišnje u cijelome svijetu, od čega je *KRAS* odgovoran za čak 75% tih slučajeva. To čini *KRAS* jednim od glavnih čimbenika onkogeneze u ljudi (11). Mutacija *KRAS*-a dovodi do poremećene hidrolize GTP-a i/ili pojačane izmjene nukleozida. Posljedično, dolazi do nagomilavanja *KRAS*-a u aktivnom stanju i do kontinuirane aktivacije signalizacijskih puteva nizvodno od *KRAS*-a, što konačno potiče proliferaciju tumorskih stanica (12,13). Duktalni adenokarcinom gušterače, CRC i karcinom pluća nemalih stanica predstavljaju vodeće primjere raka kod kojih su *KRAS* mutacije najčešće (8). U CRC-u, *KRAS* mutacije najčešće su povezane s desnim debelim crijevom (desni kolon). Oko 85% mutacija *KRAS*-a u kolorektalnom karcinomu javlja se na jednoj od tri glavnih točaka odnosno na kodonima 12,13 i 61 (6). U gotovo 90% tih mutacija radi se o mutaciji kodona 12 (8).



Slika 2. Prikaz KRAS signalnog puta i relevantnih inhibitora svakog čvora. Preuzeto iz Zhu i sur. (6).

G12D (glicin u asparginsku kiselinu) i G12V (glicin 12 u valin) dva su najčešća podtipa *KRAS* mutacija u CRC-u. G12 i G13 nalaze se na P petlji koja je važna za stabilizaciju nukleozida u aktivnom stanju KRAS-a. Mutacije na kodonu 12 smanjuju hidrolizu bez utjecaja na izmjenu nukleozida. S druge strane, mutacije na kodonu 13, osim što smanjuju hidrolizu, također i povećavaju intrinzičnu aktivnost izmjene nukleozida. Q61 se nalazi na N-kraju Switch II i sudjeluje u konformacijskim promjenama ove regije prilikom konverzije između strukturnih stanja. Mutacije kodona 61 potiču GTP-GDP izmjenu te istovremeno ometaju hidrolizu GTP-a. Q61 mutanti imaju najnižu stopu hidrolize među svim *KRAS* alelima (14,15) (Slika 3.).

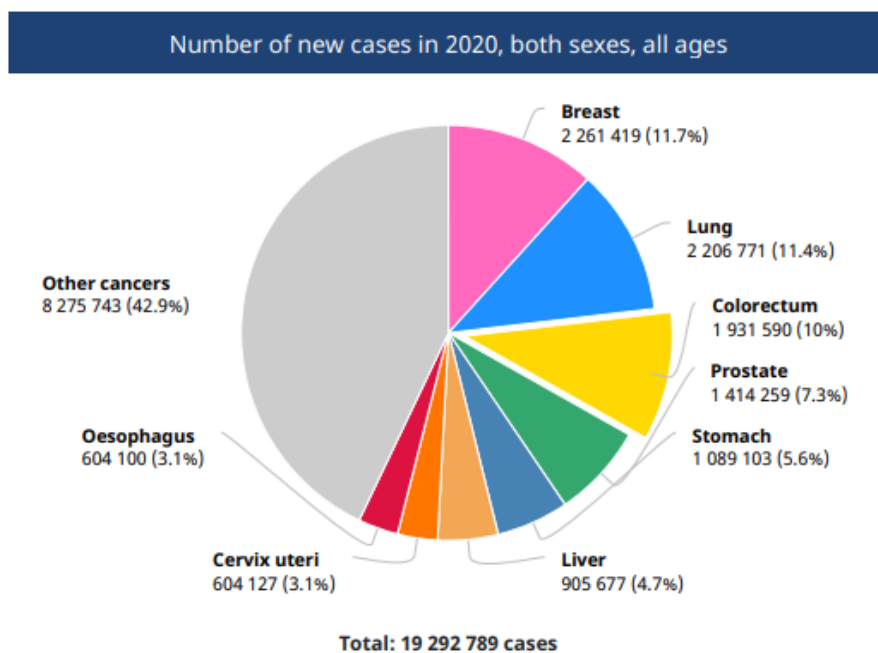


Slika 3. Šablone biokemijskih promjena hidrolize i izmjene gvanina nakon mutacija u kodonima 12 (narančasto), 13 (ljubičasto) ili 61 (plavo). Isprekidana linija označava hidrolizu, a puna linija označava izmjenu gvanina, pri čemu deblja linija označava veću brzinu izmjene. Preuzeto iz Zhu i sur. (6).

Različite mutacije *KRAS*-a povezane su sa širokim spektrom razvoja bolesti u pacijenata oboljelih od CRC-a. *KRAS* mutacije na egzonu 2 bile su povezane s heterogenim ishodom gledajući sveukupno preživljenje (engl. *overall survival*, OS) i preživljenje bez progresije bolesti (engl. *progression-free survival*, PFS). G12V mutacija, koja predstavlja jedan od najčešćih podtipova mutacija na egzonu 2, povezana je sa značajno lošijim PFS parametrom, u usporedbi s onim pacijentima koji nemaju mutaciju. U usporedbi pacijenata s nemutiranim tumorima, parametar OS bio je nešto nižih vrijednosti u podtipovima G12V i G13D te značajno nižih vrijednosti u podtipu G12C (16). Kao razlog navedenim razlikama u prognozi bolesti predložena su različita biološka ponašanja tumora s različitim varijantama mutacija, kao što je aktivacija *KRAS* nizvodnih signalizacijskih puteva (17).

## Kolorektalni karcinom

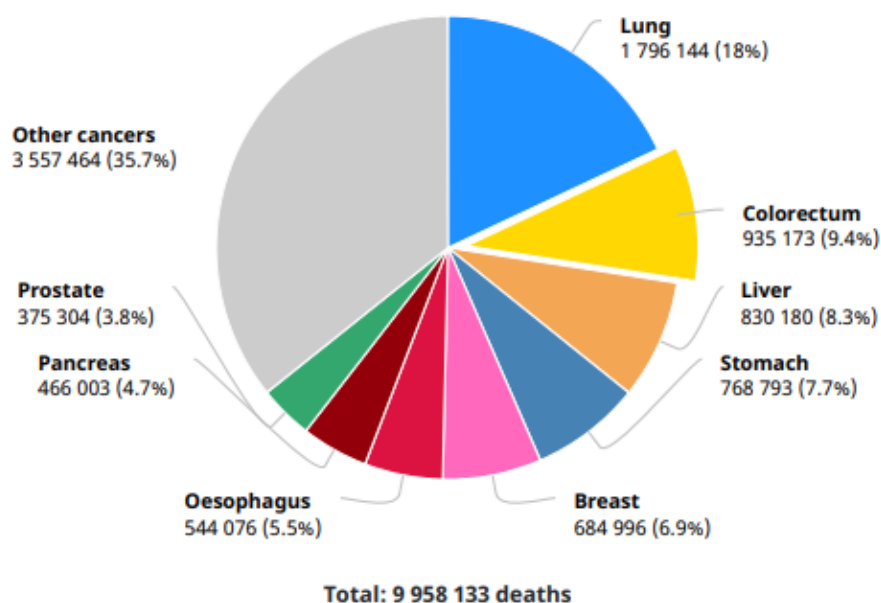
Ukupni rizik za razvoj nekog oblika raka od rođenja do 74 godine života iznosi 20,2%, u muškaraca 22,4% dok je u žena 18,2% (2). Rak je bio odgovoran za gotovo 10 milijuna smrtnih slučajeva u 2020. godini, odnosno za svaki šesti smrtni slučaj. Stoga predstavlja drugi najčešći uzrok smrti u svijetu (17). Najčešći karcinomi su rak dojke, rak pluća i CRC. CRC zauzima treće mjesto (Slika 3.). Uzevši u obzir rak kao uzrok smrti, CRC se penje na visoko 2. mjesto (Slika 4.).



Slika 3. Prikaz udjela pojedinog oblika raka prema broju novih slučajeva u 2020. godini u oba spola i u svim dobnim skupinama. Preuzeto s WHO web stranice (17).



### Number of deaths in 2020, both sexes, all ages



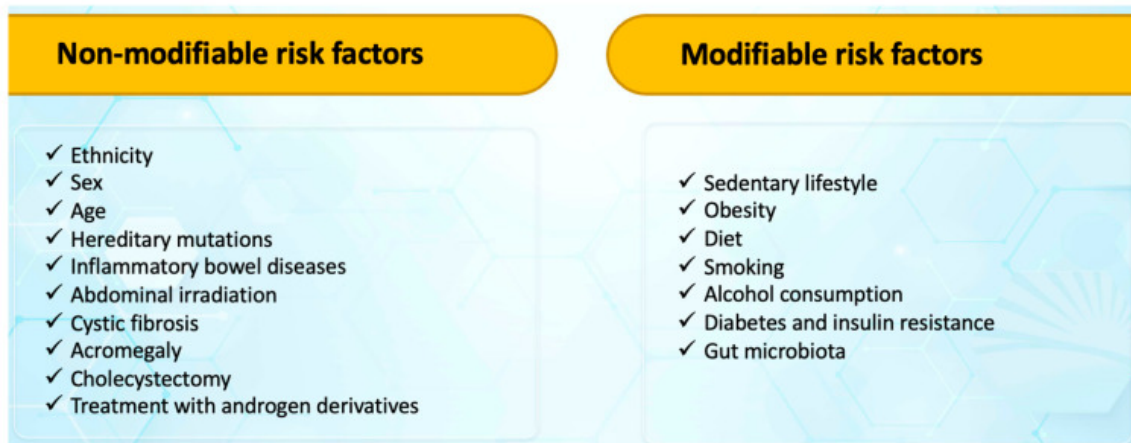
Slika 4. Prikaz udjela pojedinog oblika raka kao uzroka smrti od ukupnog broja umrlih od raka u oba spola i svih dobnih skupina u 2020.godini. Preuzeto s WHO web stranice (17).

Viša incidencija CRC-a u razvijenijim zemljama ukazuje na povezanost s prehrambenim navikama specifičnim za ta područja, kao što su velika konzumacija crvenog mesa i alkohola te sjedilački način života (1). CRC nešto je češći u populacijama afričkog podrijetla nego u populacijama europskog podrijetla. Također, muškarci imaju 1,5 puta veću vjerojatnost za razvoj CRC-a u usporedbi sa ženama, bez obzira na dob i etničku pripadnost. S druge strane, žene imaju veću vjerojatnost za razvoj malignih oblika bolesti desnog kolona s agresivnijom progresijom (19). Karcinogeneza CRC-a uključuje niz patofizioloških mehanizama, kao što su abnormalna stanična proliferacija, poremećena stanična diferencijacija, otpornost na apoptozu, invazija stanica karcinoma susjednih struktura te stvaranje udaljenih metastaza. Niz različitih gena kao i višestruki signalni putevi uključeni su u CRC onkogenezu. No, o ovom složenom mehanizmu i dalje ne znamo sve (20). Iako nasljeđe ima određenu ulogu u nastanku

CRC-a, značajan je dio slučajeva sporadičan te se razvija tijekom nekoliko godina slijedeći sekvencu adenom-karcinom (21). Tako je CRC često asimptomatski te ostaje neprepoznat u svojim ranim stadijima, sve do uznapredovalih stadija kada prognoza postaje nepovoljna. Ukoliko se rano otkrije, može se spriječiti čak 90% smrti (22). Otprilike 10% adenomatoznih polipa evoluiru u adenokarcinom, a rizik je izravno proporcionalan veličini samoga polipa (19). S povećanom incidencijom CRC-a povezani su i neki genetski sindromi, većinom autosomno dominantni. Najčešće je riječ o obiteljskoj adenomatoznoj polipozi (engl. *Familial adenomatous polyposis*, FAP) i o nasljednome nepolipoznom CRC-u, poznatijem kao Lynchov sindrom. Među ostale spada polipoza povezana s mutacijama gena *MUTYH*, Gardnerov sindrom, Turcotov sindrom, sindrom juvenilne polipoze, Peutz-Jeghersov sindrom i Cowdenov sindrom (19,23). Pacijenti oboljeli od upalnih bolesti crijeva imaju dvostruko veću vjerojatnost za razvoj CRC-a u usporedbi s općom populacijom (19).

Poznate čimbenike rizika za razvoj CRC-a možemo podijeliti na nepromjenjive čimbenike, poput etničke pripadnosti, dobi, spola, nasljednih mutacija, zračenja abdomena, upalnih bolesti crijeva, akromegalije, cistične fibroze te na promjenjive čimbenike rizika, kao što su pretilost, sjedilački način života, prehrana i prehrambene navike, pušenje, konzumacija alkohola itd. (Tablica 1.). S obzirom na prehrambeni upalni indeks, hranu možemo podijeliti u dvije kategorije, proupalni i protupalni tip prehrane. Proupalna prehrana povezana je povećanim rizikom za razvoj CRC-a. Tu spadaju ugljikohidrati, proteini, trans masti, kolesterol, zasićene masne kiseline, željezo itd. Protupalnu prehranu, odnosno hranu s potencijalnim protupalnim djelovanjem, čine namirnice bogate vlaknima, monozasićenim masnim kiselinama, polizasićenim masnim kiselinama, omega 3, omega 6, niacinom, tiaminom, vitaminom B6, vitaminom B12, selenom, cinkom, magnezijem, vitaminima topljivima u mastima (A, D, E, K), beta karotenom, folnom kiselinom, kofeinom, teinom itd. Prehrana koja obiluje namirnicama izrazito bogatima navedenim tvarima povezana je s nižim rizikom za razvoj CRC-a (20).

Tablica 1. Prikaz čimbenika rizika za razvoj CRC-a. Preuzeto iz Ionescu i sur. (20).



## Dijagnostika analizom *KRAS*-a

S obzirom da su mutacije gena *KRAS* česta pojava u CRC-u te igraju ključnu ulogu ne samo u prognostičkoj procjeni, nego i pri donošenju terapijskih odluka, *KRAS* mutacije treba rutinski testirati u postupku postavljanja definitivne dijagnoze CRC-a. Učinkovitost terapije uvelike ovisi o statusu gena *KRAS* u danome tumoru, zbog čega je pouzdano testiranje *KRAS* mutacija tijekom postavljanja dijagnoze ključno.

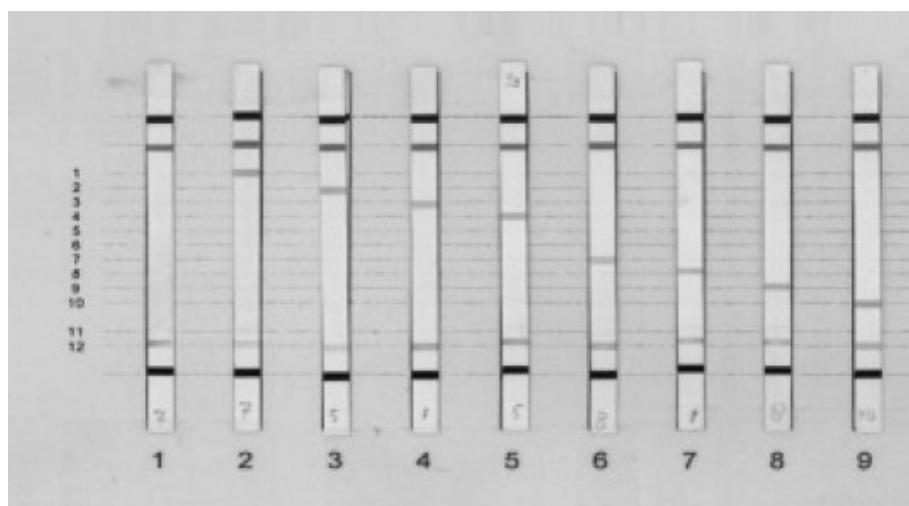
Dostupne su različite laboratorijske metode za detekciju *KRAS* mutacija u biološkim uzorcima (Tablica 2.). Neke analize koriste tkiva fiksirana u formalinu i uklopljena u parafinu, svježa tumorska tkiva, materijal dobiven pomoću aspiracija tankom iglom (engl. *fine needle aspiration*, FNA), citološki uzorak ili uzorak tjelesnih tekućina (6,24). Zlatni standard u otkrivanju mutacija još uvijek predstavljaju metode izravnog sekvencioniranja, lančana reakcijom polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) te dideoksi-sekvencioniranje (6). Ovim se metodama mogu otkriti sve mutacije u regiji od interesa, uz uvjet visoke učestalosti mutacije alela (10-30 %), što sugerira da trenutno korišteni pristupi možda i nisu najprikladniji za kliničku primjenu zbog svoje niske osjetljivosti (25,26).

Therascreen KRAS kit je PCR analiza u stvarnom vremenu koja otkriva sedam mutacija u kodonima 12 i 13 gena *KRAS*. Sastoji se od odvojenih PCR reakcija, sedam reakcija specifičnih za mutacije u kodonima 12 i 13 egzona 2 onkogena *KRAS* i kontrole divljeg tipa na egzonu 4. Therascreen metoda omogućuje kvalitativno otkrivanje mutacija u kodonima 12 i 13 ljudskog *KRAS* gena (G12A,G12D,G12R,G12C,G12S,G12V,G12D) za *in vitro* dijagnostičku uporabu, čime se razlikuju tumori s negativnom mutacijom *KRAS-a*, odnosno divlji tip, i tumora s mutacijom *KRAS-a*. Koristi se genotipizacija polimorfizama PCR metodama alelne diskriminacije (engl. *Amplification Refractory Mutation System*, ARMS) početnica (engl. *primer*) za selektivno umnožavanje mutirane DNA, a zatim Scorpions početnica za otkrivanje produkata amplifikacije te se kvalitativno utvrđuje status mutacije uzorka DNA kao i sadrži li uzorak jednu ili više mutacija (27,28).

StripAssay detekcijska metoda je također PCR metoda koja se temelji na *clamping-u* sekvence divljeg tipa sa specifičnim PNA oligonukleotidom, dopuštajući tako amplifikaciju mutirane sekvence (29,30). Nakon toga se PCR produkti hibridiziraju na nitroceluloznoj traci koja sadrži specifične sonde za različite mutacije (31) (Slika 4.). StripAssay (Vienna Labs) koji se temelji na PCR-u obogaćenom mutantima praćenom reverznom hibridizacijom također ima puno niži prag detekcije od izravnog sekvenciranja i može otkriti 10 najčešćih mutacija (osam u kodonu 12 i dvije u kodonu 13). Njegova je fleksibilnost slaba, a cijena mnogo viša od cijene izravnog sekvenciranja. Druga tehnika, SNaPshot, nije tako osjetljiva kao StripAssay, ali može detektirati 12 mutacija u kodonima 12 i 13, te je fleksibilnija i jeftinija od StripAssaya (30).

Tablica 2. Sažetak glavnih *KRAS* detekcijskih metoda. Preuzeto iz Zhu i sur. (6).

Summary of the main <i>KRAS</i> detection methods		
Techniques	Range of detection	Sensitivity <sup>a</sup>
Direct sequencing	All mutations in the interested region	10–30%
TheraScreen <i>KRAS</i> kit	7 <i>KRAS</i> mutations in codons 12 and 13	Approximately 1%
StripAssay	10 <i>KRAS</i> mutations in codons 12 and 13	1%
SNaPshot	12 <i>KRAS</i> mutations in codons 12 and 13	10%
Cobas	19 <i>KRAS</i> mutations in codons 12, 13 and 61	Approximately 1%
Next generation sequencing	All clinical relevant <i>KRAS</i> mutations	1–6%
Droplet digital PCR	7 <i>KRAS</i> mutations in codons 12 and 13	0.01–0.05%
BEAMing	16 <i>KRAS</i> mutations in codons 12, 13, 59, 61, 117 and 146	0.01%



Slika 4. *KRAS* mutacije prisutne na StripAssay-u. 1: Divlji tip; 2: str. Gly12Ala; 3: p. Gly12Arg; 4: p. Gly12Asp; 5: p. Gly12Cys; 6: str. Gly12Ser; 7: str. Gly12Val; 8: str. Gly13Asp; i 9: str. Gly13Cys. p.Gly12Ile i p.Gly12Leu nisu prisutni u našoj seriji, ali su

prisutni na StripAssay na poziciji 5 i 6. p.Gly13Val i p.Gly13Arg nisu prisutni na StripAssay-u. Preuzeto iz Farina Sarasqueta i sur. (30).

Komplet za testiranje *KRAS* mutacije Cobas je TaqMelt PCR test dizajniran za otkrivanje prisutnosti 19 *KRAS* mutacija u kodonima 12, 13 i 61 u uzorcima CRC-a fiksiranih u formalinu i uklopljenih u parafin (engl. *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*, FFPE). Cobas je osjetljiviji od Therascreen testa. Štoviše, ovaj je test vrlo reproducibilan (>98 %) i ima kratko vrijeme izvedbe (1 dan) (28). Međutim, ograničenje dosad navedenih detekcijskih metoda *KRAS* mutacija je nemogućnost otkrivanja rjeđe prisutnih biološki važnih mutacija. Stoga, pacijenti s tim mutacijama nemaju značajne koristi ovih terapijskih pristupa, a naposljetku ni od anti-EGFR terapije.

Sekvenciranje sljedeće generacije (engl. *Next generation sequencing*, NGS), zbog svoje velike osjetljivosti i mogućnosti sekvenciranja cijelog egzona, može identificirati sve, pa i klinički relevantne, *KRAS* mutacije (6). NGS se oslanja na početne koncepte pirosekvenciranja, ali koristi markere fluorescencije ili pH mjerenje za određivanje slijeda nukleotida DNA. Genomska područja od interesa odabiru se i umnažaju. Naknadno se pojedinačne molekule iz DNA biblioteke klonalno umnažaju i imobiliziraju za kuglice na stakalcima ili u jažicama poluvodičkog uređaja. Naposljetku, univerzalne početnice vežu se na adapterske sekvence vezane za kuglice, a sinteza komplementarnog lanca izvodi se ili s fluorescentnim nukleotidima praćenim optičkom detekcijom ili s nemodificiranim nukleotidima nakon čega slijedi detekcija inkorporacije pH mjerenjem. Obje tehnologije mogu proizvesti milijune očitavanja (kratkih sekvenci DNA) tijekom nekoliko sati pružajući sustav koji može sekvencirati velike dijelove DNA s vrlo visokom osjetljivošću (obično 3–5 % učestalosti alela) (32).

Tehnologije PCR-a koje se temelje na analizi mutacija u tekućinskim biopsijama uključuju svakako digitalni kapljični PCR (engl. *Digital Droplet PCt*, ddPCR). DdPCR se temelji na

disperziji uzorka DNA u tisuće kapljica, uljnih micela, veličine nanolitara za naknadno PCR umnožavanje te se zatim analiziraju pristupom sličnim protočnoj citometriji. DdPCR kombinira visoku preciznost i robusnost s relativno niskim troškovima analize, što ga čini prikladnim za ponovljeno uzorkovanje. S druge strane, većina dostupnih ddPCR sustava tehnički je ograničena na istodobnu detekciju maksimalno dvaju fluorofora, što ograničava njihovu sposobnost multipleksiranja za analizu slobodne nestanične DNA (engl. *cell-free DNA*, cfDNA). Ova metodologija koristi minimalnu količinu DNA, a putem visokog razrjeđenja uzorka DNA uklanjaju se PCR inhibitori. To rezultira pouzdanim i ultrasjetljivim rezultatima koji su prikladni za analize tekućinskih biopsija (32,33). Ipak, trenutno se detekcija *KRAS* mutacija najčešće provodi u tumorskom tkivu, posebno FFPE tumorskom tkivu. Iako detekcijske metode temeljene na FFPE tumorskim tkivima daju zadovoljavajuće rezultate u smislu osjetljivosti i specifičnosti, one se uvelike oslanjaju na kvalitetu i kvantitetu uzoraka tumora i zahtijevaju više vremena zbog sporije obrade, što možda neće zadovoljiti hitne potrebe pacijenata. Zaključno, tekućinska biopsija, analitička tehnika u razvoju, trebala bi imati prednost pred FFPE tkivima zbog minimalne invazivnosti, sposobnosti ranije detekcije CRC-a i sposobnosti analize sveobuhvatnih molekularnih karakteristika bolesti omogućavajući ranu dijagnozu, procjenu odgovora na molekularno ciljane terapije i ranu detekciju rezistencije stanica raka na terapiju (6).

## **Terapija temeljena na *KRAS*-u**

CRC je bio jedan od prvih karcinoma kod kojeg je uvedena ciljana terapija na receptor epidermalnog faktora rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*, EGF). U toj terapiji koriste se protutijela na EGFR (anti-EGFR antitijela) (34). Izravno ciljanje *KRAS* proteina i dalje predstavlja veliki izazov. Dugo se smatralo kako je ciljana terapija mutiranog *KRAS*-a

praktički nemoguća (engl. *undruggable*), uzimajući u obzir kako je za takvu terapiju potrebno zadovoljiti dva uvjeta. Jedan je mogućnost ciljanog kemijskog djelovanja, a drugi postojanje dokaza kliničke učinkovitosti male molekule koja bi se koristila protiv targetiranog područja (35).

KRAS je mali protein s relativno glatkom površinom. Osim GTP/GDP-vezajućeg džepa, KRAS nema drugih džepova prikladnih za potencijalno vezanje male molekule inhibitora. Također treba uzeti u obzir da se u fiziološkim uvjetima, *in vivo*, GTP za džep gotovo isključivo veže iznimno visokim afinitetom pikomolarnih razmjera. Navedeni razlozi objašnjavaju iznimne poteškoće u razvoju male molekule konkurentnog inhibitora, s obzirom da bi izgledi takvog inhibitora u postizanju odgovarajuće koncentracije u krvi dovoljne za istiskivanje GTP-a bili iznimno niski. Također, zbog interakcije KRAS-a s drugim proteinima samo plitka površina KRAS proteina preostaje slobodna, što otežava vezanje molekule inhibitora. Poznato je da neizravno ciljanje proteina unutar KRAS signalnog puta nije klinički učinkovito, jer je KRAS signalni put prije svega jedna kompleksna i isprepletana signalna mreža (36).

Selektivni inhibitori KRASG12C vežu se za džep u regiji Switch II, izloženoj u GDP-vezanom RAS-u. Ovi lijekovi iskorištavaju prednost cisteinskog ostatka u mutiranom proteinu i intrinzičnu GTP-azu KRASG12C, koja je relativno više koncentracije nego u drugim KRAS mutanata. Sotorasib (AMG510) i adagrasib (MRTX849) inhibitori su KRASG12C koji su najznačajnije uznapredovali u kliničkom razvoju (37) (Slika 5). Inhibitori KRASG12C posjeduju sinergističku aktivnost inhibicije rasta kada se kombiniraju s inhibitorima proteina koji stimuliraju ili su potaknuti RAS-om, tj. AKT, MEK, PI3K, proteini EGFR puta ili imunoterapijom (38). U džepu Switch II molekule KRASG12D nedostaje reaktivni ostatak koji bi mogao stvoriti snažnu kovalentnu vezu s molekulom inhibitora. Još jedan izazov čini i niža intrinzična stopa hidrolize GTP-a s mutacijom KRASG12D u usporedbi s KRASG12C.



Nedavno je razvijen MRTX1133, nekovalentni inhibitor KRASG12D koji zauzima džep Switch II (15,37).

Fang, Wang, Fesik i ostali identificirali su niz spojeva koji bi mogli djelovati na hidrofobni džep RAS-GDP kompleksa, a zatim i blokirati interakciju RAS-SOS, čime se inhibira razmjena nukleotida posredovana SOS-om (39,40). Ovi spojevi djeluju kao pan-RAS inhibitori. Njihova niska specifičnost može biti uzrok njihove potencijalne toksičnosti (6).

BI3406 i BI1701963 su male molekule inhibitora koje se vežu za katalitičko mjesto SOS1 i sprječavaju interakciju SOS1 s RAS-GDP, što smanjuje aktivaciju RAS-GTP-a. BI1701963 je trenutno u fazi I kliničkog razvoja kao monoterapija i u kombinaciji s inhibitorom MEK (trametinib) u KRAS mutiranim uznapredovalim solidnim tumorima (NCT04111458) (37).

BAY239 selektivni je inhibitor SOS1 koji može inhibirati put RAS-RAF-MEK-ERK. Dodatno, u kombinaciji s kovalentnim inhibitorom KRASG12C, BAY293 pokazuje sinergističnu antiproliferativnu aktivnost u KRASG12C mutantu, zbog svoje sposobnosti povećavanja koncentracije KRASG12C vezanog za GDP (6).

SPH2 je nereceptorski protein tirozin fosfataza koji igra važnu ulogu u aktivaciji MAPK puta. Slično inhibitoru SOS1, blokiranje SPH2 sprječava nakupljanje GTP-a na RAS-u. Terapija RMC4550, snažnim selektivnim alosteričkim inhibitorom SPH2, smanjila je proliferaciju stanica u prekliničkim modelima. Utjecaj ovog lijeka bio je posebno uočljiv u stanicama s mutacijama na kodonu 12, ali ne i na kodonima 13 ili 61 (38).

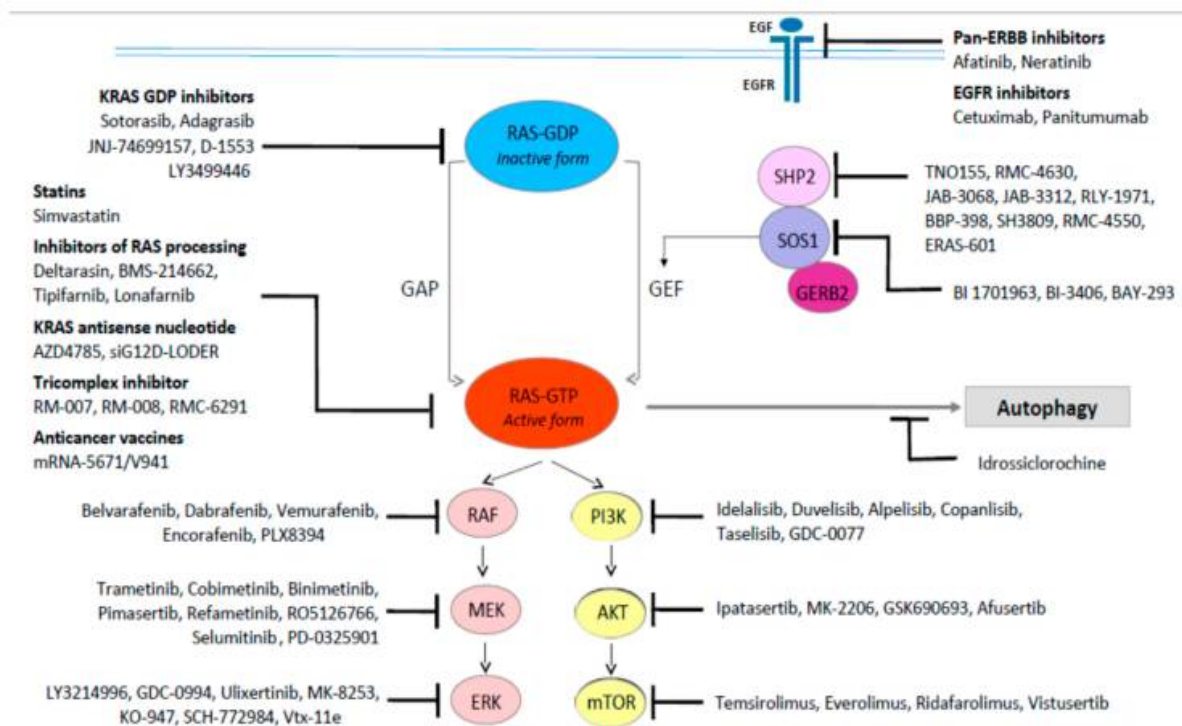
Posttranslacijska modifikacija KRAS-a odvija se pomoću tri ključna enzima: farneziltransferaza (FT-aza) odnosno geranilgeraniltransferaza (GGT-aza), RAS-konvertirajući enzim (RCE1) i izoprenilcisteinkarboksilmetiltransferaza (ICMT). Inhibitori navedenih enzima razvijeni su kako bi smanjili aktivnost KRAS-a (6). Postranslacijski modificirani KRAS zahtijeva regulaciju prenil-vezujućeg proteina fosfodiesteraze- $\delta$  (PDE $\delta$ ) za transport i lokalizaciju na membrani. Aktivnost PDE $\delta$ , povećavajući koncentraciju RAS-a na

membrani, povećava KRAS signalizaciju te obrnuto, PDEδ *down*-regulacija nasumično raspoređuje RAS na sve membrane u stanici i suprimira reguliranu signalizaciju putem divljeg tipa RAS-a. Deltarasin, inhibitor PDEδ-RAS visokog afiniteta, blokira vezanje KRAS-a tako što zauzima džep PDEδ-a, koji veže farnezil, te time pogrešno lokalizira KRAS (6,41).

Aktivirani RAS vezan za GTP stimulira dimerizaciju i fosforilaciju RAF-a, što potiče aktivnost RAF-kinaze te fosforilira MEK1 i MEK2. Signalna kaskada nastavlja se fosforilacijom ERK1 i ERK2, koji aktiviraju nekoliko transkripcijskih faktora, uključujući članove obitelji ETS, koji reguliraju petlje negativne povratne sprege. Za uspješno liječenje RAS-mutantnih tumora, MAPK put mora biti gotovo potpuno inhibiran (38). Inhibitori PI3K puta prikladniji su kao opcija u kombiniranoj terapiji, jer postoje preklapajući mehanizmi povratne sprege između putova MAPK i PI3K, što znači da inhibiranje jednog puta može rezultirati kompenzatornom aktivacijom drugog. Kombinacija inhibitora oba puta (MAPK i PI3K) bi mogao biti dobar pristup liječenja KRAS-mutiranih karcinoma. U KRAS-mutiranim stanicama CRC-a, inhibitori PI3K puta nadvladavaju otpornost na inhibitore MEK te značajno inhibiraju proliferaciju stanica (6,38).

Imunološko okruženje KRAS mutiranog CRC-a je imunosupresivno. Smanjena je ekspresija citotoksičnih T limfocita, neutrofila, interferona gama, STAT1 i CXCL10 u uzorcima KRAS mutanata u usporedbi s uzorcima KRAS divljeg tipa. Osim toga, *KRAS* mutirani CRC ima i nižu ekspresiju imunoloških inhibitornih molekula kao što su CTLA4, PDL1, LAG3 i TIM3, te CD4 limfocita (37). Blokada imunoloških kontrolnih točaka, kao što je ciljanje PDL1 proteina ili njegovog receptora PD1 izazvala je snažnu regresiju kod raznih oblika zloćudnih bolesti. Međutim, većina bolesnika oboljelih od CRC-a, osim onih s visokom razinom mikrosatelitne nestabilnosti ili dMMR, neće imati koristi od imunoterapije zbog niske imunogenosti (6). Još jedan imunoterapijski pristup liječenju KRAS mutiranog CRC-a uključuje korištenje adoptivnog prijenosa ekspanziranih T limfocita *ex vivo*. Infuzija CD8+

limfocita usmjerenih na KRAS mutant posredovala je učinkovitoj regresiji metastatskog CRC-a koji je ekspimirao KRASG12D mutaciju. Trenutna istraživanja se služe tehnologijom za transdukciju ljudskih limfocita periferne krvi s mišjim TCR protiv RASG12D ili RASG12V (38). Još jedno potencijalno terapijsko sredstvo je cjepivo za neutralizaciju proteina KRAS, koje je tek u istraživanju. Serija GI400, vrsta rekombinantnog cjepiva izvedenog iz *Saccharomyces cerevisiae*, koje ekspimirira mutantni RAS protein, pokazala je pojavu remisije tumora u prekliničkim modelima (6). Jedan od ovih pristupa koristi glasničku RNA (mRNA) koja kodira neoepitope za odabrane *KRAS* mutacije (38).



Slika 5. Strategije KRAS ciljane terapije. Preuzeto iz Negri i sur. (38).

## Zaključak

Gen *KRAS* često je mutiran u CRC-u zbog čega igra ključnu ulogu u dijagnostici, prognosti i liječenju CRC-a. Rutinsko testiranje mutacija gena *KRAS* kod pacijenata s dijagnosticiranim CRC-om od velikog je značaja s obzirom na njihovu učestalost. Učinkovitost terapije i prognoza pacijenata ovise o statusu gena *KRAS* u tumorskim stanicama CRC-a. Iako postoji nekoliko laboratorijskih metoda za detekciju *KRAS* mutacija, od kojih svaka ima svoje prednosti i nedostatke, Therascreen *KRAS* kit se ističe kao praktičan alat za kvalitativno otkrivanje najčešćih mutacija u kodonima 12 i 13. Međutim, važno je napomenuti da nijedna metoda nije savršena, te se prilikom odabira metode za testiranje trebaju uzeti u obzir i drugi čimbenici poput osjetljivosti, cijene i fleksibilnosti. Pravovremeno i pouzdano testiranje *KRAS* mutacija pomaže personalizirati terapiju i poboljšati ishode liječenja kod pacijenata s CRC-om. Iako je ciljana terapija za CRC postigla značajan napredak, izravno ciljanje mutiranog proteina *KRAS* i dalje predstavlja izazov. Tradicionalni pristupi su ograničeni zbog nedostatka odgovarajućih ciljanih točaka na *KRAS* proteinu i složenosti *KRAS* signalnog puta. Međutim, nova istraživanja donose nadu u razvoj selektivnih inhibitora kao što su *KRAS*G12C inhibitori, koji su pokazali obećavajuće rezultate u kliničkim ispitivanjima. Osim toga, kombinirana terapija s inhibitorima drugih proteina u *RAS* signalnom putu ili imunoterapijom također pokazuje sinergijske učinke u liječenju pacijenata sa *KRAS*-mutiranim CRC-om. Dodatno, strategije koje ciljaju posttranslacijske modifikacije *KRAS*-a i imunološki odgovor, otvaraju nove terapijske strategije. Iako još uvijek postoje izazovi i nepoznanice, napredak u razumijevanju biologije *KRAS*-mutiranog CRC-a pruža nadu za razvoj učinkovitih terapijskih protokola koje bi mogli značajno poboljšati ishode liječenja za pacijente s CRC-om.

## **Zahvale**

Zahvaljujem prije svega mentoru izv. prof. dr. sc. Ninu Sinčiću na ukazanom povjerenju, pomoći, strpljenju, pristupačnosti i usmjeravanju tijekom pisanja ovog diplomskog rada. Zahvaljujem svojoj cijeloj obitelji na svemu omogućenom, sestrama Anamariji i Katarini, majci Ivani i ocu Anti, a posebno rodici Mariji kao najvećem prijatelju i neiscrpnj podršci kako tijekom studentskih dana, tako i tijekom cijeloga života.

## Literatura

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209–49. doi: 10.3322/caac.21660
2. Mattiuzzi C, Lippi G. Current Cancer Epidemiology. *J Epidemiol Glob Health*. 2019 Dec;9(4):217–22. doi: 10.2991/jegh.k.191008.001
3. Habashy P, Lea V, Wilkinson K, Wang B, Wu XJ, Roberts TL, et al. KRAS and BRAF Mutation Rates and Survival Outcomes in Colorectal Cancer in an Ethnically Diverse Patient Cohort. *Int J Mol Sci*. 2023 Dec 15;24(24):17509. doi: 10.3390/ijms242417509
4. Hofmann MH, Gerlach D, Misale S, Petronczki M, Kraut N. Expanding the Reach of Precision Oncology by Drugging All KRAS Mutants. *Cancer Discov*. 2022 Apr 1;12(4):924–37. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1331
5. Jancík S, Drábek J, Radzioch D, Hajdúch M. Clinical relevance of KRAS in human cancers. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:150960. doi: 10.1155/2010/150960
6. Zhu G, Pei L, Xia H, Tang Q, Bi F. Role of oncogenic KRAS in the prognosis, diagnosis and treatment of colorectal cancer. *Mol Cancer*. 2021 Nov 6;20(1):143. doi: 10.1186/s12943-021-01441-4
7. Cercek A, Braghiroli MI, Chou JF, Hechtman JF, Kemeny N, Saltz L, et al. Clinical Features and Outcomes of Patients with Colorectal Cancers Harboring NRAS Mutations. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2017 Aug 15;23(16):4753–60. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0400

8. Haigis KM. KRAS Alleles: The Devil Is in the Detail. *Trends Cancer*. 2017 Oct;3(10):686–97. doi: 10.1016/j.trecan.2017.08.006
9. Vögler O, Barceló JM, Ribas C, Escribá PV. Membrane interactions of G proteins and other related proteins. *Protein Modul Membr Struct*. 2008 Jul 1;1778(7):1640–52. doi: 10.1016/j.bbamem.2008.03.008
10. Cherfils J, Zeghouf M. Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol Rev*. 2013 Jan;93(1):269–309. doi: 10.1152/physrev.00003.2012
11. Prior IA, Hood FE, Hartley JL. The Frequency of Ras Mutations in Cancer. *Cancer Res*. 2020 Jul 15;80(14):2969–74. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-3682
12. Dienstmann R, Mason MJ, Sinicrope FA, Phipps AI, Tejpar S, Nesbakken A, et al. Prediction of overall survival in stage II and III colon cancer beyond TNM system: a retrospective, pooled biomarker study. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2017 May 1;28(5):1023–31. doi: 10.1093/annonc/mdx052
13. Li Z, Chen Y, Wang D, Wang G, He L, Suo J. Detection of KRAS mutations and their associations with clinicopathological features and survival in Chinese colorectal cancer patients. *J Int Med Res*. 2012;40(4):1589–98. doi: 10.1177/147323001204000439
14. Smith MJ, Neel BG, Ikura M. NMR-based functional profiling of RASopathies and oncogenic RAS mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Mar 19;110(12):4574–9. doi: 10.1073/pnas.1218173110
15. Hunter JC, Manandhar A, Carrasco MA, Gurbani D, Gondi S, Westover KD. Biochemical and Structural Analysis of Common Cancer-Associated KRAS Mutations. *Mol Cancer Res MCR*. 2015 Sep;13(9):1325–35. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-15-0203

16. Modest DP, Ricard I, Heinemann V, Hegewisch-Becker S, Schmiegel W, Porschen R, et al. Outcome according to KRAS-, NRAS- and BRAF-mutation as well as KRAS mutation variants: pooled analysis of five randomized trials in metastatic colorectal cancer by the AIO colorectal cancer study group. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2016 Sep;27(9):1746–53. doi: 10.1093/annonc/mdw261
17. Camaj P, Primo S, Wang Y, Heinemann V, Zhao Y, Laubender RP, et al. KRAS exon 2 mutations influence activity of regorafenib in an SW48-based disease model of colorectal cancer. *Future Oncol Lond Engl*. 2015;11(13):1919–29. doi: 10.2217/fon.15.97
18. The International Agency for Research on Cancer. *Cancer Today* [internet]. Lyon: The International Agency for Research on Cancer; c2024 [pristupljeno 1.2.2024.]. Dostupno na: <https://gco.iarc.fr/today/about#references>
19. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Przeglad Gastroenterol*. 2019;14(2):89–103. doi: 10.5114/pg.2018.81072
20. Ionescu VA, Gheorghe G, Bacalbasa N, Chiotoroiu AL, Diaconu C. Colorectal Cancer: From Risk Factors to Oncogenesis. *Med Kaunas Lith*. 2023 Sep 12;59(9):1646. doi: 10.3390/medicina59091646
21. La Vecchia S, Sebastián C. Metabolic pathways regulating colorectal cancer initiation and progression. *Semin Cell Dev Biol*. 2020 Feb;98:63–70. doi: 10.1016/j.semcdb.2019.05.018
22. Tepus M, Yau TO. Non-Invasive Colorectal Cancer Screening: An Overview. *Gastrointest Tumors*. 2020 Jul;7(3):62–73. doi: 10.1159/000507701



23. Valle L, de Voer RM, Goldberg Y, Sjursen W, Försti A, Ruiz-Ponte C, et al. Update on genetic predisposition to colorectal cancer and polyposis. *Mol Aspects Med.* 2019 Oct;69:10–26. doi: 10.1016/j.mam.2019.03.001
24. Bihl MP, Hoeller S, Andreozzi MC, Foerster A, Ruffle A, Tornillo L, et al. KRAS mutation testing in colorectal cancer: comparison of the results obtained using 3 different methods for the analysis of codons G12 and G13. *Diagn Mol Pathol Am J Surg Pathol Part B.* 2012 Mar;21(1):14–23. doi: 10.1097/PDM.0b013e31822b831a
25. Isler JA, Vesterqvist OE, Burczynski ME. Analytical validation of genotyping assays in the biomarker laboratory. *Pharmacogenomics.* 2007 Apr;8(4):353–68. doi: 10.2217/14622416.8.4.353
26. Linardou H, Briasoulis E, Dahabreh IJ, Mountzios G, Papadimitriou C, Papadopoulos S, et al. All about KRAS for clinical oncology practice: gene profile, clinical implications and laboratory recommendations for somatic mutational testing in colorectal cancer. *Cancer Treat Rev.* 2011 May;37(3):221–33. doi: 10.1016/j.ctrv.2010.07.008
27. QIAGEN. theascreen KRAS RGQ PCR kit [internet]. Njemačka: QIAGEN; c2024 [pristupljeno 1.2.2024.]. Dostupno na: <https://www.qiagen.com/ca/products/diagnostics-and-clinical-research/oncology/therascreen-solid-tumor/therascreen-kras-rgq-pcr-kit-ca>
28. Gonzalez de Castro D, Angulo B, Gomez B, Mair D, Martinez R, Suarez-Gauthier A, et al. A comparison of three methods for detecting KRAS mutations in formalin-fixed colorectal cancer specimens. *Br J Cancer.* 2012 Jul 10;107(2):345–51. doi: 10.1038/bjc.2012.259
29. Mohamed Suhaimi NA, Foong YM, Lee DYS, Phyo WM, Cima I, Lee EXW, et al. Non-invasive sensitive detection of KRAS and BRAF mutation in circulating tumor cells of

colorectal cancer patients. *Mol Oncol.* 2015 Apr;9(4):850–60. doi: 10.1016/j.molonc.2014.12.011

30. Fariña Sarasqueta A, Moerland E, de Bruyne H, de Graaf H, Vrancken T, van Lijnschoten G, et al. SNaPshot and StripAssay as valuable alternatives to direct sequencing for KRAS mutation detection in colon cancer routine diagnostics. *J Mol Diagn JMD.* 2011 Mar;13(2):199–205. doi: 10.1016/j.jmoldx.2010.10.006

31. Ausch C, Buxhofer-Ausch V, Oberkanins C, Holzer B, Minai-Pour M, Jahn S, et al. Sensitive detection of KRAS mutations in archived formalin-fixed paraffin-embedded tissue using mutant-enriched PCR and reverse-hybridization. *J Mol Diagn JMD.* 2009 Nov;11(6):508–13. doi: 10.2353/jmoldx.2009.090022

32. Timar J, Kashofer K. Molecular epidemiology and diagnostics of KRAS mutations in human cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2020 Dec;39(4):1029–38. doi: 10.1007/s10555-020-09915-5

33. Hussung S, Follo M, Klar RFU, Michalczyk S, Fritsch K, Nollmann F, et al. Development and Clinical Validation of Discriminatory Multitarget Digital Droplet PCR Assays for the Detection of Hot Spot KRAS and NRAS Mutations in Cell-Free DNA. *J Mol Diagn.* 2020 Jul;22(7):943–56. doi: 10.1016/j.jmoldx.2020.04.206

34. Martinelli E, Ciardiello D, Martini G, Troiani T, Cardone C, Vitiello PP, et al. Implementing anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) therapy in metastatic colorectal cancer: challenges and future perspectives. *Ann Oncol.* 2020 Jan;31(1):30–40. doi: 10.1016/j.annonc.2019.10.007

35. Dang CV, Reddy EP, Shokat KM, Soucek L. Drugging the “undruggable” cancer targets. *Nat Rev Cancer*. 2017 Aug;17(8):502–8. doi: 10.1038/nrc.2017.36
36. Nagasaka M, Li Y, Sukari A, Ou SHI, Al-Hallak MN, Azmi AS. KRAS G12C Game of Thrones, which direct KRAS inhibitor will claim the iron throne? *Cancer Treat Rev*. 2020 Mar;84:101974. doi: 10.1016/j.ctrv.2020.101974
37. Nusrat M, Yaeger R. KRAS inhibition in metastatic colorectal cancer: An update. *Curr Opin Pharmacol*. 2023 Feb;68:102343. doi: 10.1016/j.coph.2022.102343
38. Negri F, Bottarelli L, de’Angelis GL, Gnetti L. KRAS: A Druggable Target in Colon Cancer Patients. *Int J Mol Sci*. 2022 Apr 8;23(8):4120. doi: 10.3390/ijms23084120
39. Maurer T, Garrenton LS, Oh A, Pitts K, Anderson DJ, Skelton NJ, et al. Small-molecule ligands bind to a distinct pocket in Ras and inhibit SOS-mediated nucleotide exchange activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Apr 3;109(14):5299–304. doi: 10.1073/pnas.1116510109
40. Sun Q, Burke JP, Phan J, Burns MC, Olejniczak ET, Waterson AG, et al. Discovery of small molecules that bind to K-Ras and inhibit Sos-mediated activation. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2012 Jun 18;51(25):6140–3. doi: 10.1002/anie.201201358
41. Chandra A, Grecco HE, Pisupati V, Perera D, Cassidy L, Skoulidis F, et al. The GDI-like solubilizing factor PDE $\delta$  sustains the spatial organization and signalling of Ras family proteins. *Nat Cell Biol*. 2011 Dec 18;14(2):148–58. doi: 10.1038/ncb2394

## **Životopis**

Rođena sam 19. 04. 1999. godine u Zagrebu. Tijekom osnovne škole pohađala sam i Osnovnu glazbenu školu Blagoje Bersa u Zagrebu. Nakon završenog srednjoškolskog obrazovanja u XV. gimnaziji u Zagrebu, matematičko-informatički smjer, upisala sam Medicinski fakultet u Zagrebu. Odlično govorim engleski jezik s položenim C1 stupnjem te njemački jezik, razine B2 stupnja.