

Súbežný výskyt BRAF a KRAS mutácie u pacienta s mikrosatelitovo nestabilným kolorektálnym karcinómom

Co-occurrence of BRAF and KRAS mutation in a patient with microsatellite unstable colorectal cancer

Tomáš RENDEK¹, Rami SAADE², Georgína KOLNÍKOVÁ³, Monika URBANOVÁ³, Miroslav TOMÁŠ⁴, Ľuboslav MIHÓK⁵, Vanda REPISKÁ¹

¹Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UN Bratislava, prednosta doc. RNDr. L. Danišovič, PhD.

²II. gynekologicko-pôrodná klinika LF UK a UNB Nemocnica Ružinov, prednosta prof. MUDr. J. Záhumenský, PhD.

³Oddelenie patologickej anatómie, Národný Onkologický Ústav, Bratislava, primárka MUDr. G. Kolníková, PhD.

⁴Klinika chirurgickej onkológie SZU a NOÚ, Bratislava, prednosta prof. MUDr. D. Pindák, PhD.

⁵Národný onkologický ústav, Oddelenie onkologickej genetiky, Bratislava, vedúci oddelenia Ing. M. Čermák

Abstrakt

Identifikácia mutačného stavu génov riadiacich nádorový proces u pacientov s kolorektálnym karcinómom (CRC) je v súčasnosti štandardnou klinickou praxou v onkológii, nevyhnutná pre stratifikáciu a zacielenie vhodnej terapie. Napriek tomu sú údaje o molekulárnych biomarkeroch u pacientov s CRC na Slovensku obmedzené a prípady súbežného výskytu viacerých tzv. „driverových“ mutácií u jedného pacienta, a z nich vyplývajúca prognóza pre pacientov v domácej aj zahraničnej literatúre málo opísaná. V našej štúdií sme pri analyzovaní nádorového tkaniva 196 pacientov diagnostikovaných s CRC v databáze Národného onkologického ústavu (NOÚ), pričom sme sa zameriavali na mutácie génov *BRAF* a *KRAS/NRAS* identifikovali pacientku, ktorá bola na základe histologického vyšetrenia nádoru nositeľkou oboch mutácií súbežne. Odborná literatúra poukazuje na vzájomnú exkluzivitu výskytu týchto mutácií v jednom nádore a spolu s mikrosatelitovou instabilitou, ktorú nádor vykazoval, sa jedná o kombináciu markerov o ktorej je dostupné minimum poznatkov. Ako doplnkové parametre sme skúmali TNM klasifikáciu, histopatologický stupeň nádoru, percento zastúpenia nádorových buniek v biopptickej vzorke, ako aj expresiu ki-67 ako markera nádorovej proliferácie. Táto prípadová štúdia pojednáva o zriedkavom výskyte a vzťahu týchto biomarkerov, ako aj o prognostickom a terapeutickom dopade pre danú pacientku v kontexte mikrosatelitovej instability daného nádoru a porovnáva tento nález s globálne publikovanými kazuistikami a možnosťami terapie (lit. 43). Text v PDF www.lekarsky.herba.sk.

KLÚČOVÉ SLOVÁ: KRAS, BRAF, kolorektálny karcinóm, mikrosatelitová instabilita, prediktívne a prognostické biomarkery. Lek Obz 2024, 73 (5): 161-165

Abstract

Identification of the mutational status of genes driving the tumor process in patients with colorectal cancer (CRC) is now standard clinical practice in oncology, essential for stratification and targeting of appropriate therapy. Nevertheless, data on molecular biomarkers in patients with CRC in Slovakia are limited and cases of co-occurrence of multiple so-called „driver“ mutations in a single patient, and the resulting prognosis for patients, are poorly described in the domestic and international literature. In our study, we analyzed tumor tissue from 196 patients diagnosed with CRC in the National Cancer Institute (NCI) database, focusing on mutations in the *BRAF* and *KRAS/NRAS* genes, and identified a patient who carried both mutations simultaneously based on histological examination of the tumor. The literature points to the mutual exclusivity of the occurrence of these mutations in a single tumor and, together with the microsatellite instability exhibited by the tumor, this is a combination of markers about which minimal knowledge is available. As additional parameters, we investigated TNM staging, grading, the percentage of tumor cells in the biopsy sample, as well as the expression of ki-67 as a marker of tumor proliferation. This case study discusses the rare occurrence and relationship of these biomarkers, as well as the prognostic and therapeutic implications for the patient in the context of the microsatellite instability of the tumor in question, and compares this finding with globally published case reports and therapeutic options (Ref. 43). Text in PDF www.lekarsky.herba.sk.

KEY WORDS: KRAS, BRAF, colorectal carcinoma, microsatellite instability, predictive and prognostic biomarkers. Lek Obz 2024, 73 (5): 161-165

Úvod

Kolorektálny karcinóm (CRC) je celosvetovo druhou najčastejšou príčinou priamych úmrtí na onkologické ochorenie (1). Štúdium molekulárneho stavu onkogénov má prediktívny a prognostický význam v počiatkových aj neskorých štádiách CRC (2). Princíp vzniku CRC po-

stupom adenóm-karcinóm bol vytvorený v roku 1975 Day a Morson (3), ktorí opísali karcinogézu CRC od benígnych prekursorov po invazívne karcinómy v dedičných a sporadických prípadoch. Vogelstein a kol. (4) navrhli princíp vzniku CRC prostredníctvom akumulácie genetických zmien, najmä mutácií *APC*, *TP53* a *KRAS*.

Okrem dedičných syndrémov, ako je FAP (defekt génu APC) a Lynchovým syndrómom, ktorý je spôsobený chybnou opravou DNA, vedúcou k mikrosatelitovej nestabilite (MSI-H), je väčšina CRC sporadická (5). Popri klasickej dráhe adenóm-karcinóm, je dobre opísaný aj vývoj CRC prostredníctvom serrated polypov s včasnými mutáciami BRAF (6).

Enzým s GTPázovou aktivitou KRAS (Kirsten Rat Sarcoma) je jedným z najčastejšie mutovaných onkogénov v CRC, pričom približne 40 % pacientov s CRC má aktivačné missense mutácie v KRAS a väčšina z nich sa vyskytuje v kodónoch 12, 13 a 61 (7). Pacienti s KRAS-mutovaným CRC majú horšiu prognózu ako pacienti s nemutovaným KRAS, a to najmä v metastatickom štádiu (8). Jeho mutácia taktiež spôsobuje aberantnú aktiváciu dráhy signálnej dráhy KRAS, čo má u takýchto pacientov za následok rezistenciu na inhibítory receptorovej tyrozínkinázy (RTK), ako sú monoklonálne protilátky proti receptoru epidermálneho rastového faktora EGFR (cetuximab a panitumumab) (9, 10).

BRAF patrí do rodiny proteínov RAF, u ktorých sa ukázalo, že sú aktivované proteínmi RAS viazanými na GTP a fungujú ako efektor na aktiváciu prenosu signálu dráhy RAS-RAF-MEK-MAPK, čo vedie k bunkovej proliferácii, diferenciácii, migrácii a prežívaniu (11) (12). Mutácie v géne BRAF sa vyskytujú v 8 - 12 % prípadov mCRC, pričom vo viac ako 95 % prípadov ide o mutáciu BRAF V600E (13). Mutácie BRAF sa rozdeľujú do troch tried: podtypy s vysokou (I), strednou (II) a oslabenou (III) kinázovou aktivitou (14). BRAF V600E je zaradená do podtypu (I) a spôsobuje agresívny nádorový fenotyp spojený so zlou prognózou a rezistenciou na štandardné režimy chemoterapie (15). Mutácia V600E vedie k zámene aminokyseliny valínu za kyselinu glutámovú, čo vedie k 130- až 700-násobnému zvýšeniu kinázovej aktivity BRAF v porovnaní s divokým typom BRAF (16). Európske usmernenia odporúčajú u pacientov s mutáciou BRAF V600E v prvej línii kombinovanú (dvoj- alebo trojkombinovanú) chemoterapiu plus bevacizumab. Možnosti účinnejšej liečby týchto pacientov však zostávajú nedostupné (17).

Mikrosatelitová nestabilita (MSI) je hypermutabilný nádorový fenotyp spôsobený stratou aktivity opravy chýb DNA, ktorú zabezpečuje MMR reparačný systém. MSI sa vyskytuje približne u 15 % všetkých kolorektálnych karcinómov; pričom 3 % z nich sú spojené s Lynchovým syndrómom a zvyšných 12 % je spôsobených sporadickou, získanou hypermetyláciou promotora jedného z MMR génov (18,19). Je charakterizovaná krátkymi sekvenčnými opakovaniami (SSR) alebo krátkymi tandemovými opakovaniami (STR) repetitívnych sekvenčív DNA s rôznou dĺžkou (18). MSI ako biomarker na vysokej úrovni (MSI-high) je u pacientov s CRC spojená s lepším prežívaním (20).

Materiál a metodiky

Do sledovania sme zahrnuli nádorové vzorky odobraté v rámci vyšetrenia biopsie tkaniva, alebo resekcie tkaniva počas kuratívneho chirurgického

zákroku. Nádorové tkanivo kohorty 196 pacientov, ktorej súčasťou bola aj sledovaná pacientka bolo fixované vo formalíne a zaliate do parafínu (FFPE) na oddelení patologickej anatómie Národného Onkologického Ústavu v Bratislave (NOÚ). Uvedené vzorky CRC boli odoslané na vyšetrenie stavu MSI, ako aj na genetické vyšetrenie mutácií BRAF a KRAS/NRAS na Oddelenie lekárskej genetiky NOÚ. Izolácia DNA zo vzoriek FFPE sa vykonala podľa štandardizovaných postupov v laboratóriách klinickej genetiky. Na identifikáciu mikrosatelitne nestabilných nádorových tkanív sa použilo 5 mononukleotidových mikrosatelitných markerov: NR-21, BAT-26, BAT-25, NR-24, MONO-27, po ktorých nasledovala fragmentačná analýza na genetickom analyzátoe ABI PRISM 3130. Alternatívne sa stav MSI skúmal pomocou testu Idylla™ MSI Assay na platforme Biocartis Idylla™ System. Oba testy sú štandardnými metódami na detekciu MSI na Oddelení lekárskej genetiky NOÚ. Identifikácia mutácií BRAF (V600E a V600K) prebiehala alelovo špecifickou PCR pomocou systému Cobas Z 480 PCR (Roche Molecular Diagnostics). Stav génov RAS sa vyšetroval na platforme Roche LightCycler 480 (Roche Molecular Diagnostics) pomocou súpravy RAS Mutation Screening Panel CE-IVD (Entrogen), zameranej na gény KRAS a NRAS (kodóny 12/13, 59/61, 117/146).

Všetci účastníci skúmanej kohorty vrátane sledovanej pacientky podpísali informovaný súhlas a náš výskum bol schválený etickou komisiou NOÚ v Bratislave, kód protokolu: PATOL-01.

Kazuistika

V prípadovej štúdií opisujeme nález u 79-ročnej ženy trpiacej zhubným nádorom vzostupnej časti hrubého čreva, klasifikovaná podľa systému IDC-10 ako C18.2 (*neoplasma malignum coli ascendentis*).

Výsledok a diskusia

Imunohistochemické vyšetrenie expresie génov MMR systému odhalilo deficienciu expresie MLH1, MSH2 a PMS2 génov, ktoré môžu byť zapríčinené somatickou, ako aj epigenetickou alebo zárodočnou mutáciou v prípade Lynchovho syndrómu, na ktorý v tom čase nebola vyšetrená (21).

Mutácia génu KRAS bola u pacientky identifikovaná v dvanástom kodóne (KRAS: c.35G>A, p.G12D) a taktiež bola nositeľkou mutácie BRAF V600E. Pacientka mala taktiež expersiu biomarkeru Ki-67 na relatívne vysokej úrovni, vyjadrenú percentuálne (80%). Antigén Ki67 je exprimovaný len v mitotickej fáze bunkového cyklu a nie je exprimovaný v pokojovej fáze (G0) a je spoľahlivým markerom bunkovej proliferácie (22). Používanie biomarkera Ki-67 v klinickej praxi nie je jednotné a jeho regulérne používanie sa často líši v závislosti od metodiky pracoviska. Metaanalýza používania tohto markera v klinickej praxi však preukázala, že vysoká expresia Ki-67 významne koreluje so zlým celkovým prežívaním a prežívaním bez ochorenia, čo naznačuje, že vysoká expresia Ki-67 môže slúžiť ako

prognostický marker pre zlú prognózu pacientov s CRC (23). Podiel zastúpenia nádorových buniek vo vzorke bol na úrovni 60%. Nádor po resekcií bol vyhodnotený histopatologickým stupňom G3 (zle diferencovaný). Pacientka bola po operácii klasifikovaná nasledovne: pT4N0MX.

Spoločný výskyt mutácie *BRAF* a *KRAS* u sledovanej pacientky je pomerne ojedinelým javom a v dostupnej literatúre sa o ňom hovorí len zriedkavo, väčšinou práve prostredníctvom kazuistík jednotlivých pacientov. Jedným z možných vysvetlení tohto javu podporuje hypotéza o dvoch klonálnych pôvodoch CRC u jedného pacienta, ako bolo dokázané v štúdií (24). Identifikácia individuálneho výskytu mutácie *BRAF* a *KRAS* má dnes už zrejmu prognostickú aj prediktívnu hodnotu. Zatiaľ čo pacienti s pokročilým CRC s divokým typom RAS sú vhodní na liečbu cetuximabom alebo panitumumabom, pacienti s CRC s mutáciou *BRAF* p.V600E sú vhodní na kombinovanú liečbu enkorafenibom a cetuximabom (25). V súčasných diskusiách sa objavuje taktiež názor, že terapeutické riešenie prítomnosti viacerých mutácií rodiny RAS v CRC si môže vyžadovať ich liečbu ako samostatných primárnych stavov, pretože sa môžu vyvíjať oddelene v paralelných evolučných dráhach a byť prítomné v nižšom počte kópií ešte pred podaním liečby, ako sa ukázalo napríklad v štúdií primárneho melanómu (26).

Náhľad do konkrétnych kazuistík kolorektálneho karcinómu opisuje niekoľko prípadov konkomitantnej mutácie, publikovaných napríklad autormi Midthun a kolektív (27):

Prvou pacientkou bola 67-ročná Afroameričanka, ktorej vyšetrenie počítačovou tomografiou (CT) ukázalo ascites a bilaterálne adnexálne masy so solídnyimi a cystickými komponentmi, pričom následná kolonoskopia a biopsia rektálnej masy ukázala dobre diferencovaný adenokarcinóm vychádzajúci z tubulovilózneho adenómu. Vyhodnotenie na gynekologickej onkológii naznačilo, že obojstranné adnexálne masy sú pravdepodobne metastázy vaječníkov z karcinómu konečníka. Sekvenovaním cielených génov sa zistili koexistujúce mutácie v génoch *BRAF* a *KRAS*. V géne *KRAS* sa vyskytla mutácia c.35G>T (p.G12V (Gly12Val)), ktorá viedla k missense mutácii z glycínu (G) na valín (V) v kodóne 12 exónu 2. V géne *BRAF* sa vyskytla mutácia c.1396G>C (p.G466R), pričom mikrosatelitová stabilita nádorového tkaniva bola zachovaná (27).

Druhý prípad výskytu konkomitantnej mutácie bol u 60-ročného muža ázijského pôvodu a pri kolonoskopii bol potvrdený adenokarcinóm rektosigmy. V októbri 2014 podstúpil nízku prednú resekciu, pričom sedem zo sedemnástich lymfatických uzlín bolo pozitívnych na metastatický adenokarcinóm. NGS sekvenovanie tkaniva preukázalo mutáciu *KRAS* c.34G>A (p.G12S (Gly12Ser)) a mutáciu *BRAF* c.1390G>A (p.G464R (Gly464Arg)), pričom expresia MMR proteínov bola zachovaná a potvrdená mikrostabilitou nádorového tkaniva. Prvá pacientka podstúpila chemoterapeutický režim známy ako FOLFOX (pozostávajúci z oxaliplatiny, fluo-

ouracilu (5-FU) a leucovorinu (28)), a perioperatívne mitomycín C v rámci hypertermickej intraperitoneálnej chemoterapie. Druhý pacient podstúpil liečbu FOLFIRI (kombinácia s irinotekanom) a neskôr FOLFOXIRI (kombinácia s bevacizumabom), pričom ani jeden pacient na liečbu nereagoval.

Obaja pacienti chorobe podľahli do 12 mesiacov od počiatočnej diagnózy (27). V uvedených prípadoch nebola preukázaná mutácia podtypu I. *BRAF* V600E, pričom autori poukazujú, že pri konkomitantných mutáciách *BRAF* a *RAS* mutáciách sú bežnejšie *BRAF* non-V600E mutácie, čo robí náš nález pomerne unikátnym. Zaujímavý bol post resekčný výsledok biopsie odobratých lymfatických uzlín u pacientky 1, ktorá nemala z odobratých sentinelových uzlín (celkovo 44) ani jednu pozitívnu na prítomnosť nádoru, rovnako ako bol negatívny výsledok všetkých excidovaných uzlín (19) u pacientky v našej prípadovej štúdií.

Ďalšiu prípadovú štúdiu opisujúcu konkomitantnú *KRAS* a *BRAF* mutáciu opísal Vittal a kolektív, pričom identifikovali 29-ročnú pacientku s karcinómom rekta, synchronnými metastázami v pečeni a mutáciami *KRAS* (C 35 G>A/p. G12D) a *BRAF* v exóne 15 kodónu V600E. Jej TNM klasifikácia bola pT4N1M1. Pacientke bola na základe prítomných mutácií zamietnutá anti-EGFR liečba a anti-VEGF liečbu (bevacizumab) nemohla podstúpiť kvôli akútnej infekcii. MS status reportovaný nebol. Podobne, ako v predošlých kazuistikách, taktiež nereagovala na prvolíniovú FOLFOX a chorobe podľahla tri mesiace po stanovení diagnózy (29).

Celosvetová frekvencia *BRAF* a *KRAS* konkomitantných mutácií v CRC však ostáva nejasná. Pri výskume mutačných profilov CRC na kohorte 820 pacientov bola frekvencia tohto fenoménu na úrovni 0,5 % (30). Štúdiá Guglielchimi a kol, ktorá zahŕňala kohortu 316 pacientov s CRC, identifikovala tento jav u 3 pacientov (1 %) v štádiu metastáz, pričom u dvoch zlyhala odporúčaná liečba a u tretieho pacienta s menej distálnymi metastázami nastala po resekcií a adjuvantnej FOLFOX4 terapii pri 6-mesačnej kontrole remisia (31).

Nedávna štúdiá väčšieho rozsahu, zahŕňajúca 2347 pacientov s kolorektálnym karcinómom však odhalila viac ako dvojnásobnú frekvenciu výskytu dvojitej mutácie a to na úrovni až 1,2%, pričom rovnako ako v predošlých prípadoch bola väčšina *BRAF* mutácií (77,8 %) non-V600E a neboli klasifikované ako mutácie s vysokou kinázovou aktivitou (trieda I.) (30,32).

Terapeutické vyhliadky našej pacientky ako aj pacientov spomenutých v rámci globálnych kazuistík nie sú zrejme. Napriek obrovskému pokroku v cielenej liečbe sa nepodarilo pre *KRAS* mutácie objaviť efektívny inhibítor, s výnimkou molekuly Sotorasib. Tá je marketovaná ako Lumakras® (Amgen) a je určená práve pre *KRAS* mutáciu v kodóne 12, avšak špecificky pre G12C a je schválená len v určitých krajinách pre nemalobunkový karcinóm pľúc (NSCLC) (33). Pri priamych aj nepriamych prístupoch inhibície *KRAS* je taktiež vždy potrebné počítať s pomerne rýchlo nastupujúcou rezistenciou na liečbu. Z tohto dôvodu sa vždy odpo-

rúča užívanie inhibítorov v rámci kombinovanej terapie (34). Pri volení chemoterapeutického prístupu je taktiež dôležité rozpoznať jednotlivé mutácie KRAS a neuvažovať o nich uniformne, keďže štúdie naznačujú ich rozdielnú senzitivitu voči chemoterapii (napríklad nádory s KRAS (G12C) dobre reagovali na taxány a pemetrexed, ale zle reagovali na cisplatinu (34, 35)).

Predpokladá sa, že pacienti s mCRC s mutáciou BRAF V600E sú rezistentní na inhibíciu EGFR v dôsledku aktivácie dráhy MAPK sekundárne spôsobenej mutáciou BRAF (36). Terapeutické perspektívy CRC s mutovaným BRAF zhŕňa publikácia Guerrero a kolektív (2), pričom poukazuje na používanie agresívnej dvoj- a troj-kombinačnej terapie pozostávajúcej z chemoterapie a cielenej liečby, nakoľko sa pacienti dožívajú v priemere iba 10,4 mesiaca u metastázujúcej choroby (37).

Mimoriadne zaujímavá je okrem koexistencie KRAS a BRAF mutácie aj prítomnosť mikrosatelitovej instability v nádore sledovanej pacientky. Vzťah medzi MSI-H a prítomnosťou KRAS mutácie nie je dodnes objasnený, pravdepodobne je však jeho výskyt spojený so zhoršenou prognózou u pacienta (38). Naopak koexistencia mutácie BRAF je vo vysoko mikrosatelitovo nestabilných nádoroch až 15% oproti štandardnej prevalencii na úrovni 5% (39, 40). Samotná MSI je v súčasnosti markerom na indikáciu imunoterapie, na ktorú takýto pacienti veľmi dobre reagujú (41). Ukazuje sa, že MSI-H pacienti s prítomnosťou aj BRAF mutácie benefitujú s dostupnej imunoterapie (39). Indikácia imunoterapie za prítomnosti mutácie KRAS nie je objasnená, avšak v súčasnosti prebieha intenzívny výskum, predovšetkým s využitím PD-L1 inhibítorov v kombinácii s KRAS inhibítormi, ako je zhrnuté v publikácii o terapeutických perspektívach KRAS autormi Negri a kolektív (42). Pre vylúčenie alebo potvrdenie hereditárne podmienenej mikrosatelitovej instability nádoru (Lynchov syndróm) je potrebné pacientku dodatočne vyšetriť na prítomnosť zárodočných mutácií MMR systému, čo má veľký význam aj pre jej rodinných príslušníkov.

Záver

Mnohé onkologické centrá testujú mutáciu KRAS u pacientov s CRC, pokiaľ sa zistí mutácia KRAS, testovanie BRAF sa nevykonáva. Ak je však KRAS divokého typu, testovanie BRAF sa vykonáva postupne. Vzhľadom na čoraz častejšie zavádzanie panelového testovania NGS bude výskyt koexistujúcich mutácií KRAS a BRAF v CRC pravdepodobne vyšší, ako sa doteraz predpokladalo. Kým z prognostického hľadiska sa javí konkomitantný výskyt týchto mutácií ako negatívny prognostický faktor, o ich prediktívnej úlohe v rámci liečby CRC je mimoriadne málo dostupnej literatúry, čo limituje onkológov v nastavení vhodného terapeutického režimu pre takto zasiahnutých pacientov. Na hlbšie pochopenie vplyvu súbežných mutácií KRAS a BRAF na prognózu CRC a reakciu týchto nádorov na súčasnú cytotoxickú a biologickú liečbu je potrebný ďalší výskum.*

*Publikácia vznikla vďaka podpore VEGA grantu 1/0198/24.

*Autori vyhlasujú, že všetky použité postupy boli v súlade s etickými normami príslušnej etickej komisie pre klinickú prácu s ľuďmi a práca bola realizovaná v súlade s Helsinskou deklaráciou.

Autori publikácie vyhlasujú, že od všetkých účastníkov klinickej štúdie bol získaný informovaný súhlas.

Autori práce vyhlasujú, že nemajú žiaden konflikt záujmov.

Literatúra

1. SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021, 71: 209–249.
2. GUERRERO RM, LABAJOS VA, BALLENA SL, et al. Targeting BRAF V600E in Metastatic Colorectal Cancer: Where Are We Today? *Ecancermedalscience* 2022, 16: 1489.
3. DAY DW, MORSON BC. The Adenoma-Carcinoma Sequence. *Major Probl Pathol* 1978, 10: 58–71.
4. VOGELSTEIN B, FEARON ER, HAMILTON SR, et al. Genetic Alterations during Colorectal-Tumor Development. *N Engl J Med* 1988, 319: 525–532.
5. ILYAS M, STRAUB J, TOMLINSON IP, BODMER WF. Genetic Pathways in Colorectal and Other Cancers. *Eur J Cancer* 1999, 35: 1986–2002.
6. NOFFSINGER AE. Serrated Polyps and Colorectal Cancer: New Pathway to Malignancy. *Annu Rev Pathol* 2009, 4: 343–364.
7. DIENSTMANN R, CONNOR K, BYRNE AT. COLOSSUS Consortium Precision Therapy in RAS Mutant Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 2020, 158: 806–811.
8. DIENSTMANN R, MASON MJ, SINICROPE FA, et al. Prediction of Overall Survival in Stage II and III Colon Cancer beyond TNM System: A Retrospective, Pooled Biomarker Study. *Ann Oncol* 2017, 28: 1023–1031.
9. AMADO RG, WOLF M, PEETERS M, et al. Wild-Type KRAS Is Required for Panitumumab Efficacy in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 2008, 26: 1626–1634.
10. ZHU G, PEI L, XIA H, et al. Role of Oncogenic KRAS in the Prognosis, Diagnosis and Treatment of Colorectal Cancer. *Mol Cancer* 2021, 20: 143.
11. HOLDERFIELD M, DEUKER MM, McCORMICK F, McMAHON M. Targeting RAF Kinases for Cancer Therapy: BRAF-Mutated Melanoma and beyond. *Nat Rev Cancer* 2014, 14: 455–467.
12. YAEGER R, CORCORAN RB. Targeting Alterations in the RAF-MEK Pathway. *Cancer Discov* 2019, 9: 329–341.
13. Van CUTSEM E, CERVANTES A, ADAM R, et al. ESMO Consensus Guidelines for the Management of Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Ann Oncol* 2016, 27: 1386–1422.
14. DANKNER M, ROSE AAN, RAJKUMAR S, et al. Classifying BRAF Alterations in Cancer: New Rational Therapeutic Strategies for Actionable Mutations. *Oncogene* 2018, 37: 3183–3199.
15. TAIEB J, LAPEYRE-PROST A, LAURENT PUIG P, ZAAANAN A. Exploring the Best Treatment Options for BRAF-Mutant Metastatic Colon Cancer. *Br J Cancer* 2019, 121: 434–442.
16. DAVIES H, BIGNELL GR, COX C, et al. Mutations of the BRAF Gene in Human Cancer. *Nature* 2002, 417: 949–954.

17. MARTINELLI E, CREMOLINI C, MAZARD T, et al. Real-World First-Line Treatment of Patients with BRAF-Mutant Metastatic Colorectal Cancer: The CAPSTAN CRC Study. *ESMO Open* 2022, 7: 100603.
18. GEMAYEL R, CHO J, BOEYNAEMS S, et al. Variable Tandem Repeats as Facilitators of Rapid Evolution of Regulatory and Coding Sequences. *Genes* 2012, 3, 461–480.
19. BOLAND CR, GOEL A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 2010, 138: 2073–2087.e3.
20. LOCHHEAD P, KUCHIBA A, IMAMURA Y, et al. Microsatellite Instability and BRAF Mutation Testing in Colorectal Cancer Prognostication. *J Natl Cancer Inst* 2013, 105: 1151–1156.
21. ROSTY C, CLENDENNING M, WALSH MD, et al. Germline Mutations in PMS2 and MLH1 in Individuals with Solitary Loss of PMS2 Expression in Colorectal Carcinomas from the Colon Cancer Family Registry Cohort. *BMJ Open* 2016, 6: e010293.
22. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, et al. Cell Cycle Analysis of a Cell Proliferation-Associated Human Nuclear Antigen Defined by the Monoclonal Antibody Ki-67. *J Immunol* 1984, 133: 1710–1715.
23. LUO ZW, ZHU MG, ZHANG ZQ, et al. Increased Expression of Ki-67 Is a Poor Prognostic Marker for Colorectal Cancer Patients: A Meta Analysis. *BMC Cancer* 2019, 19: 123.
24. LARKI P, GHARIB E, YAGHOOB TALEGHANI M, et al. Coexistence of and Mutations in Colorectal Cancer: A Case Report Supporting The Concept of Tumoral Heterogeneity. *Cell J* 2017, 19: 113–117.
25. KOPETZ S, GROTHEY A, YAEGER R, et al. Encorafenib, Binimetinib, and Cetuximab in V600E-Mutated Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 2019, 381: 1632–1643.
26. SHOUSHTARI AN, CHATILA WK, ARORA A, et al. Therapeutic Implications of Detecting MAPK-Activating Alterations in Cutaneous and Unknown Primary Melanomas. *Clin Cancer Res* 2021, 27: 2226–2235.
27. MIDTHUN L, SHAHEEN S, DEISCH J, et al. Concomitant and Mutations in Colorectal Cancer. *J Gastrointest Oncol* 2019, 10: 577–581.
28. HAN B, XU R, SHI Y, LUO H, et al. Oxaliplatin, Fluorouracil and Leucovorin (FOLFOX) as First-Line Chemotherapy for Metastatic or Recurrent Colorectal Cancer Patients. *Chin Ger J Clin Oncol* 2007, 4: 397–400.
29. VITTAL A, MIDDINTI A, KASI LOKNATH KUMAR A. Are All Mutations the Same? A Rare Case Report of Coexisting Mutually Exclusive KRAS and BRAF Mutations in a Patient with Metastatic Colon Adenocarcinoma. *Case Rep Oncol Med* 2017, 2321052.
30. DESHWAR A, MARGONIS GA, ANDREATOS N, et al. Double and Mutations in Surgically Treated Colorectal Cancer Liver Metastases: An International, Multi-Institutional Case Series. *Anticancer Res* 2018, 38: 2891–2895.
31. GUGLIELMINI PF, ROSSI M, GROSSO F, et al. Double KRAS and BRAF Mutations in Colorectal Cancer in a Single Oncologic Department Series. *J Clin Oncol* 2013, DOI: 10.1200/jco.2013.31.15_suppl.e14657.
32. UCHIDAS, KOJIMAT, SUGINOT. Frequency and Clinicopathological Characteristics of Patients with Double-Mutant Colorectal Cancer: An Study. *Pathol Oncol Res* 2022, 28: 1610206.
33. LUMAKRAS® (Sotorasib) receives approval in japan for patients with KRAS G12C-Mutated advanced non-small cell lung cancer Available online: <https://www.amgen.com/newsroom/press-releases/2022/01/lumakras-sotorasib-receives-approval-in-japan-for-patients-with-kras-g12cmutated-advanced-nonsmall-cell-lung-cancer> (accessed on 14 March 2024).
34. HUANG L, GUO Z, WANG F, FU L. KRAS Mutation: From Undruggable to Druggable in Cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2021, 6: 1–20.
35. SUN JM, HWANG DW, AHN JS, et al. Prognostic and Predictive Value of KRAS Mutations in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS One* 2013, 8: e64816.
36. ORLANDI A, CALEGARI A, INNO A, et al. BRAF in Metastatic Colorectal Cancer: The Future Starts Now. *Pharmacogenomics* 2015, 16: 2069–2081.
37. CAPUTO F, SANTINI C, BARDASI C, et al. BRAF-Mutated Colorectal Cancer: Clinical and Molecular Insights. *Int J Mol Sci* 2019, 20. DOI: 10.3390/ijms20215369.
38. HU J, YAN WY, XIE L, et al. Coexistence of MSI with KRAS Mutation Is Associated with Worse Prognosis in Colorectal Cancer. *Medicine* 2016, 95: e5649.
39. PARK R, LOPES L, LEE S, RIANO I, SAEED A. The Prognostic and Predictive Impact of Mutations in Deficient Mismatch Repair/microsatellite Instability-High Colorectal Cancer: Systematic Review/meta-Analysis. *Future Oncol* 2021, 17: 4221–4231.
40. SELIGMANN JF, FISHER D, SMITH CG, et al. Investigating the Poor Outcomes of BRAF-Mutant Advanced Colorectal Cancer: Analysis from 2530 Patients in Randomised Clinical Trials. *Ann Oncol* 2017, 28: 562–568.
41. LE DT, URAM JN, WANG H, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med* 2015, 372: 2509–2520.
42. NEGRI F, BOTTARELLI L, De ANGELIS GL, GNETTI L. KRAS: A Druggable Target in Colon Cancer Patients. *Int J Mol Sci* 2022, 23. DOI: 10.3390/ijms23084120.
43. BÁTOVSKÝ M, BERNADIČ M, Jr, HRČKA R, PEKÁREK B, ŠÁLEK T. Aktuality v problematike kolorektálneho karcinómu. *Herba: Bratislava* 2020, 175 s.
44. BERNADIC M, Jr, DUCHON R, AZIRI R, MLADOSIEVICOVA B. New principles of cancer therapy give new hope for oncological patients. *Nobel Prize in Physiology and Medicine* 2018. *Bratisl Med J* 2019; 120 (1), pp. 15 – 18. DOI: 10.4149/BLL_2019_002

Do redakcie došlo 20. 2. 2024

Adresa pre korešpondenciu:

Mgr. Tomáš Rendek

Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UN Sasinkova 4

811 08 Bratislava

E-mail: Rendek8@uniba.sk, +421 915 382 588