

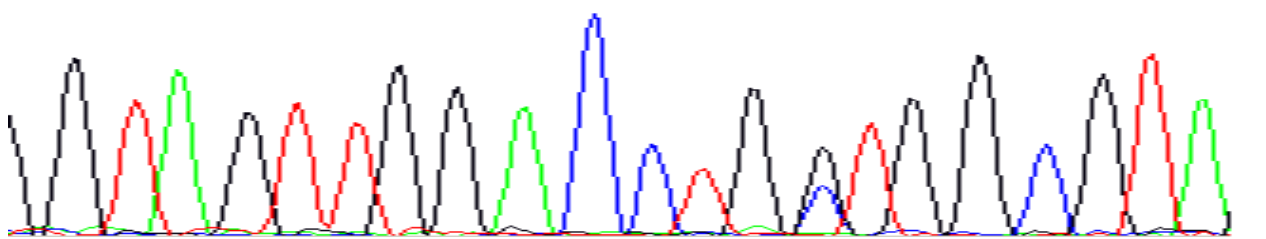
Mutazioni del gene K-RAS in pazienti affetti da carcinoma coloretale metastatico trattati con anticorpi monoclonali anti-EGFR: confronto fra metodiche

2009/2010

Mirjana Vucetik

Lavoro di Diploma eseguito presso il Laboratorio di Diagnostica Molecolare dell'Istituto Cantonale di Patologia di Locarno

Responsabile di stage: Dr. Milo Frattini



RIASSUNTO/ABSTRACT	pag. 4
1.INTRODUZIONE	pag. 5-8
2.PAZIENTI, MATERIALI E METODI	pag. 9
- 2.1 Casistica	pag. 9-10
- 2.2 Materiali e metodi	pag. 11
2.2.1 Procedure comuni alle tre metodiche utilizzate	pag. 11
▪ a) Estrazione di DNA da paraffina	pag. 11
▪ b) Quantificazione del DNA	pag. 11
▪ c) Amplificazione di DNA genomico	pag. 11
▪ d) Rivelazione su gel d'agarosio	pag. 11-12
▪ e) Purificazione post-PCR	pag. 12
▪ f) PCR di sequenziamento	pag. 12
▪ g) Purificazione di PCR di sequenza	pag. 12
▪ h) Sequenziamento automatico	pag. 13
2.2.2 Analisi del gene K-RAS tramite sequenziamento diretto	pag. 14
▪ a) Estrazione di DNA da paraffina	pag. 14
▪ b) Quantificazione del DNA	pag. 14
▪ c) Amplificazione K-RAS tramite PCR	pag. 14-15
▪ d) Rivelazione su gel d'agarosio all'1,8%	pag. 16
▪ e) Purificazione post-PCR	pag. 16
▪ f) PCR di sequenziamento	pag. 16
▪ g) Purificazione di PCR di sequenza	pag. 16
▪ h) Sequenziamento automatico	pag. 16
2.2.3 Analisi del gene K-RAS tramite Mutant-Enriched PCR	pag. 17
▪ a) Estrazione di DNA da paraffina	pag. 17
▪ b) Quantificazione del DNA	pag. 17
▪ c) Amplificazione K-RAS codoni 12 e 13 e digestione enzimatica con BstNI- BglI	pag. 17-21
▪ d) Rivelazione su gel d'agarosio al 3%	pag. 22

▪ e) Purificazione post-PCR	pag. 22
▪ f) PCR di sequenziamento	pag. 22
▪ g) Purificazione di PCR di sequenza	pag. 22
▪ h) Sequenziamento automatico	pag. 22
2.2.4 Analisi del gene K-RAS mediante il kit Ampli-set-K-RAS, BIRD (Napoli, Italia)	pag.23
▪ a) Estrazione di DNA da paraffina	pag. 23
▪ b) Quantificazione del DNA	pag. 23
▪ c) Amplificazione K-RAS tramite kit BIRD	pag. 23
c.1) codone 12 e digestione enzimatica con MvaI	pag. 23-25
c.2) codone 13 e digestione enzimatica con HaeIII	pag. 25-27
▪ d) Rivelazione su gel d'agarosio al 3%	pag. 27
- 3. RISULTATI	pag. 28
- 3.1 Analisi di K-RAS tramite sequenziamento diretto	pag. 28-30
- 3.2 Analisi di K-RAS tramite ME-PCR	pag. 31-32
- 3.3 Analisi di K-RAS tramite kit BIRD	pag. 33-35
- 3.4 Associazione con i dati clinici	pag. 36
- 4. DISCUSSIONE	pag. 37-39
- 5. CONCLUSIONI	pag. 40
- 6. RINGRAZIAMENTI	pag. 41
- 7. BIBLIOGRAFIA	pag. 42-43
- 8. ALLEGATI	pag. 44
- 8.1 Procedure comuni alle metodiche utilizzate	pag. 44
8.1 A) Estrazione di DNA da paraffina	pag. 44-46
8.1 B) Quantificazione del DNA	pag. 47
8.1 C) Rivelazione su gel d'agarosio all'1,8-3%	pag. 48-49
8.1 D) Purificazione post-PCR	pag. 50
8.1 E) PCR di sequenziamento	pag. 51-52
8.1 F) Purificazione di PCR di sequenza	pag. 53

8.1 G) Sequenziamento automatico	pag. 54
- 8.2 Cetuximab (Erbix®)	pag. 55
- 8.3 Panitumumab (Vectibix®)	pag. 56
- 8.4 Risultati ottenuti con le tre metodiche	pag. 57-59
- 8.5 Associazione con i dati clinici	pag. 60

Riassunto

Introduzione

Il gene K-RAS codifica per una proteina appartenente alla cascata intracellulare attivata da EGFR coinvolta nella trasduzione di segnali mitogeni dalla superficie cellulare al nucleo. Mutazioni puntiformi in questo gene determinano un'attivazione costitutiva della proteina K-Ras, che causa una proliferazione cellulare incontrollata. Il 40% dei pazienti affetti da carcinoma coloretale metastatico (mCRC) presentano mutazioni nel gene in questione, conferendo resistenza a cetuximab e panitumumab, due anticorpi monoclonali contro EGFR usati per la cura del mCRC.

Il sequenziamento diretto, che ha una sensibilità del 20%, è la tecnica più comune per individuare le mutazioni nel gene K-RAS.

Lo scopo di questo lavoro è quello di indagare se tecniche più sensibili possano aumentare l'individuazione di tali mutazioni per migliorare la selezione di pazienti che possono beneficiare dei trattamenti con cetuximab e panitumumab.

Pazienti, Materiali e Metodi

Sono stati analizzati 53 pazienti affetti da mCRC che sono stati trattati con cetuximab o panitumumab. L'80% di questi non ha risposto alla terapia (NR) mentre il 20% solo in maniera parziale (PR).

Il DNA genomico è stato estratto da campioni di tessuto fissati in formalina ed inclusi in paraffina usando il kit QIAamp Mini Kit (Qiagen). L'amplificazione del gene K-RAS è avvenuta tramite tre tecniche differenti, quali il sequenziamento diretto, la Mutant-Enriched PCR (ME-PCR) ed un kit della ditta BIRD (Napoli, Italia). L'analisi delle sequenze è avvenuta usando il sequenziatore automatico ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems).

Risultati

La frequenza osservata di mutazioni nel gene K-RAS in pazienti NR, usando il sequenziamento diretto, è stata del 40%. Con le tecniche più sensibili la frequenza sale al 57%. Sette casi aggiuntivi di mutazione nel gene K-RAS, rispetto a quelli individuati con il sequenziamento diretto, sono stati individuati con la ME-PCR e BIRD, tutti NR ai farmaci anti-EGFR.

Conclusioni

Con tecniche più sensibili è possibile migliorare la selezione di pazienti da trattare con cetuximab o panitumumab.

Abstract

Introduction

K-RAS gene encodes for a protein component of EGFR downstream pathways involved in mitogen transduction signals from the cell surface to the nucleus. A point mutation in this gene determines a constitutive activation of protein K-Ras, which causes an uncontrolled cell proliferation. It is known that 40% of patients with a metastatic colorectal cancer (mCRC) carry mutations on this gene, which confers resistance to cetuximab and panitumumab, two monoclonal antibodies against EGFR used to treat mCRC patients.

Direct sequencing, which has a sensitivity of 20%, is the most common methodology used to find the mutations. The purpose of this diploma study is to investigate if more sensitive methodologies can increase the detection of K-RAS gene mutations in order to improve the selection of patients who can benefit from cetuximab and panitumumab administration.

Patients, Materials and Methods

We analyzed 53 patients with mCRC and who had been treated with cetuximab or panitumumab. 80% of these were Non-Responders (NR) while 20% were Partial-Responders (PR) to cetuximab or panitumumab.

Genomic DNA was extracted from formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples using the QIAamp Mini Kit (Qiagen). All the samples were then subjected to K-RAS gene amplification by direct sequencing, Mutant-Enriched PCR (ME-PCR) and a kit from the BIRD company (Napoli, Italia) and then to automated sequencing using ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems).

Results

The frequency of K-RAS gene mutation in NR patients observed by direct sequencing was 40%. With higher sensitive methodologies the frequency increased to 57% for both ME-PCR and BIRD kit. Therefore, seven additional cases were found with these methodologies in addition to those found by direct sequencing. All the patients carrying mutations were NR to treatments.

Conclusions

With higher sensitive methodologies, we can improve the selection of patients before the treatment with cetuximab and panitumumab.