

Anne Ohren Nordraak
Marte Skog

KRAS-mutasjonsstatus i diagnostikk og behandling av kreft

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag

Veileder: Geir Bjørkøy

Mai 2020

Forord

Denne oppgaven er skrevet i forbindelse med bachelorprosjektet ved bioingeniørutdanning ved NTNU i Trondheim. I utgangspunktet skulle oppgaven skrives i samarbeid med avdeling for patologi på St. Olavs Hospital. Grunnet den spesielle situasjonen med pandemien Covid-19 ble oppgaven omgjort fra å være eksperimentell til å være teoretisk, da laboratoriearbeid i sykehusets lokaler ikke lot seg gjennomføre.

Oppgaveskrivingen ble mer utfordrende enn vi hadde sett for oss. Vi hadde sett fram til å gjøre laboratoriearbeid og få mer praktisk erfaring. Vi jobbet mye hver for oss av smittevernshensyn. Dette har ikke vært ideelt, men vi har tilpasset oss situasjonen ved å ta i bruk digitale verktøy. Vi synes likevel perioden har vært lærerik og spennende. Den har vært spennende fordi vi har fått muligheten til å fordype oss i en viktig problemstilling over en lengre tidsperiode. Gjennom bachelorprosjektet har vi fått økt faglig kunnskap, mer erfaring med litteratursøk og praktisk skrivetrening.

Vi ønsker å takke vår prosessveileder, Geir Bjørkøy, for god veiledning. Han har gitt gode innspill både skriveteknisk og teoretisk. I den spesielle situasjonen har han hjulpet oss med å vinkle oppgaven i en ny retning. Han har vist stort engasjement og fått oss til å se problemstillingen på nye måter.

Sammendrag

Kreft er en samlebetegnelse på en stor gruppe sykdommer, som har til felles at de starter med ukontrollert cellevekst. Kreftceller og tumorvev har helt spesielle egenskaper sammenlignet med normalt vev. Dette er seks ervervede kjennetegn som kreftceller har i større eller mindre grad. De kan opprettholde vekstsignaler, unngå veksthemmende signaler, dele seg uendelig antall ganger, unngå apoptose, danne nye blodkar og invadere og metastasere vev.

Kreftcellene har genetiske endringer som gir disse egenskapene. En av de vanligste genetiske endringene er mutasjon i KRAS. KRAS er en GTPase som er en del av flere signalveier i cellen. Ved mutasjon i KRAS vil proteinet alltid være i aktiv form, og kontinuerlig videreføre signaler som gir celleproliferasjon og -vekst. Mutasjoner i KRAS skjer i ekson 2, 3 og 4. De vanligste endringene er punktmutasjoner i kodon for aminosyre 12 og 13, og mer uvanlig; 61, 117 og 146. Kreftsykdommer der mutasjon i KRAS er vanlig er kolorektalkreft, ikke-småcellet lungekreft og duktalt adenokarsinom i pankreas. KRAS-mutasjonsstatus er et godt hjelpemiddel i diagnostikk og behandling av kreftsykdom. Dette gjøres for eksempel ved hjelp av mutasjonsspesifikk realtime-PCR. Per nå finnes det ingen behandling som er rettet mot aktivert KRAS. Grunnen til at mutasjonsstatus likevel benyttes i diagnostikk og behandling, er for å utelukke ineffektive behandlingsformer, slik som bruk av EGFR-inhibitorer. I tillegg kan KRAS-mutasjonsstatus bidra til å si noe om prognosen til pasienten. Tumorer med mutert KRAS gir ofte dårligere prognose enn tumorer med villtype KRAS.

Summary

Cancer is a generic term for a large group of diseases, of which uncontrolled cell growth is a common denominator. Cancer cells and tumor tissue have special hallmarks compared to normal tissue. These are hallmarks that cancer cells develop to different extents. These six traits are self-sufficiency in growth signals, insensitivity to anti-growth signals, limitless replicative potential, evading apoptosis, sustained angiogenesis and tissue invasion and metastasis. Lasting changes in the DNA creates these hallmarks. One of the most frequent DNA changes is mutation in the KRAS gene. KRAS is a GTPase that conducts signals through multiple cellular pathways. When mutated, the KRAS protein is in a constant active state. Mutations occur in exon 2, 3 and 4. The most common alterations are point mutations in the codons for amino acid 12 and 13, and less frequently; 61, 117 and 146. Colorectal cancer, non-small celled lung cancer and ductal adenocarcinoma in pancreas are forms of cancer where mutation in KRAS are frequent. KRAS mutation status is helpful when diagnosing and treating cancer. Mutation specific real time PCR is commonly used in determining mutation status. To this date scientists are yet to find drugs that can treat activated KRAS proteins. Mutation status is still a valuable tool for excluding the usage of unnecessary drugs, like EGFR inhibitors. The KRAS mutation status can also be used to determine prognosis. Tumors of cancer cells with mutated KRAS will often give worse prognosis than tumors with wild type KRAS cancer cells.

Innhold

Forord	I
Sammendrag	II
Summary	III
Innledning	3
Metode	4
Seks kjennetegn ved kreft	4
Opprettholdelse av vekstsignaler	5
Unngå apoptose	6
Unngå veksthemmende signaler	7
Evnen til å dele seg uendelig mange ganger	7
Angiogenese	7
Metastase og invadering av vev	8
Cellekommunikasjon	9
GTPaser	10
RAS	10
Dannelse av mutasjon i KRAS	14
Mutert KRAS sin påvirkning av prosesser i cellen	16
Ulike mutasjoner i KRAS	17
Tykktaarms- og endetarmskreft	18
Ikke-småcellet lungekreft	22
Duktalt adenokarsinom i pankreas	24
Diagnostikk av KRAS	24
KRAS og behandling	25
Konklusjon	27
Referanser	28

Ordforklaringer

RAS: Rat sarcoma viral oncogene homolog

RAF: Rapidly Accelerated Fibrosarcoma

MSI: Mikrosatellittinstabilitet

MAPK: Mitogenaktivert protein kinase

p53: Protein 53

pRb: Retinoblastomprotein

TGF- β : Transformerende vekstfaktor beta

EMT: Epitelial-til-mesenkymal transisjon

VEGF: Vaskulær endotelial vekstfaktor

TSP: Trombospondin

CAM: Celle-til-celle adhererende molekyl

N-CAM: Neural cell adhesion molecule

GTP: Guaninosintrifosfat

GDP: Guanosindifosfat

GEF: Guanine nucleotide exchange factor

GAP: GTPase aktiverende protein

PI3K: Fosfatidylinositol 3-kinase

RalGEF: Ral guanin exchange factor

SOS: Son of Sevenless

PDGFR: Platederivert vekstfaktor

Grb2: Growth factor receptor bound-protein 2

SH2/3: Sarcoma Homology 2/3

DH: Dbl Homology

PH: pleckstrin Homology

REM-Cdc25: Ras exchange motif-Cell division cycle 25

PIP₂: Fosfatidylinositol 4,5-bisfosfat

SHP 1/2: Sarcoma Homology 2 Domain Phosphatase-1/2 (Tyrosin fosfatase)

KRAS: Kristen RAS

NRAS: Neuroblastoma RAS

HRAS: Harvey RAS

ROS: Reaktive oksigenradikaler

PKC: Protein kinase C

Nrf2: Nuclear factor erythroid 2

IRES: Internal ribosome entry site

c-myc: c-myelocytom

MMR: mismatch reparasjonssystemet

NHEJ: Non-homologus end joining

mi-RNA: Mikro-RNA

HNPCC: Arvelig ikke-polypøs kolorektalkreft

FAP: Familiær adenomatøs polypose

APC: Adenomatøs polypose coli

EGFR: Epithelial vekstfaktorreseptor

CEA: Karsinoembryonalt antigen

pERK: Ekstracellulært signalregulert kinase

PKB: Protein kinase B

Innledning

Andelen som dør av kreft har økt jevnlig de siste tiårene. I 2017 var kreft den hyppigste dødsårsaken i Norge etterfulgt av hjerte- og karsykdommer (1).

Kreft oppstår på grunn av varige endringer i DNA som gir forandringer i cellenes egenskaper. Gener i RAS-familien, er det vanligste muterte onkogenet ved kreftsykdom. Rundt 25% av tumorer har mutasjon i RAS-genet. RAS-mutasjon sees ofte hos pasienter med ikke-småcellet lungekreft, kolorektalkreft og duktalt adenokarsinom i pankreas. Per dags dato finnes det ikke noen spesifikk behandling rettet mot aktivt RAS-protein. RAS-mutasjoner har lenge vært sett på som ikke medisinerbar. Forskningen innen feltet fortsetter for å finne medisiner som kan behandle mutasjonen (2).

I utgangspunktet skulle vår oppgave dreie seg om kartlegging av RAS/RAF-mutasjoner og mikrosatellittinstabilitetsstatus, MSI, hos pasienter med levermetastaser fra kolorektalkreft. Deler av oppgaven skulle vært utført på laboratoriene på St. Olavs Hospital. Dette lot seg som sagt ikke gjennomføre på grunn av Covid-19-situasjonen. Dermed ble oppgaven teoretisk og problemstillingen ble omgjort. I denne oppgaven har vi sett nærmere på RAS-mutasjoner i ulike krefttyper. Oppgaven er basert på følgende problemstilling:

Hvordan benyttes KRAS-mutasjonsstatus i diagnostikk og behandling av kreft?

Metode

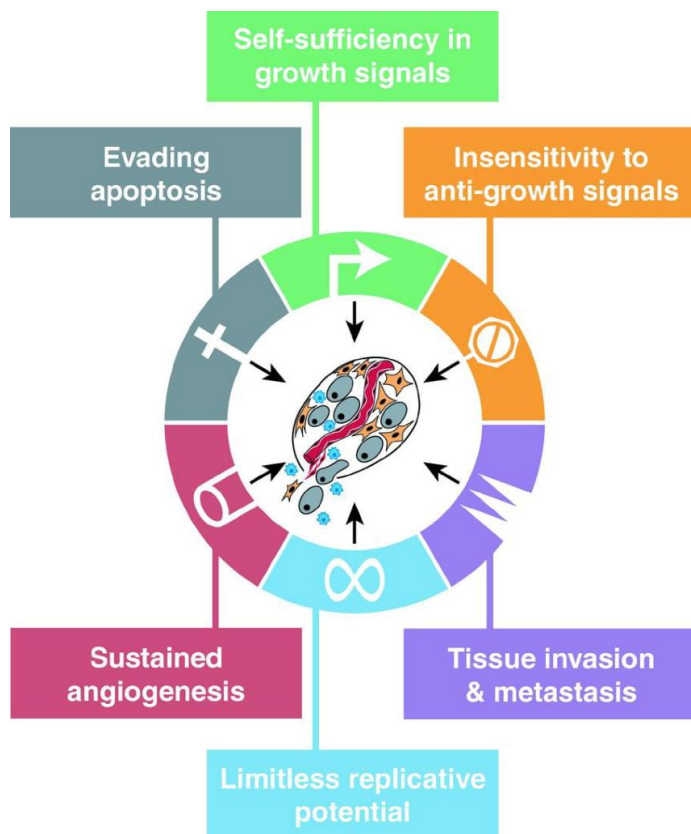
I starten av oppgaveskrivingen fikk vi tilsendt relevante artikler fra prosess- og fagveileder. Vi har benyttet oss av litteratursøk for å finne informasjon til oppgaven. Vi har tatt i bruk PubMed, Nature, Science og Google Scholar i skriveprosessen. Det finnes mye informasjon om temaet i disse databasene, derfor ble enkle søkeord benyttet. Vi hentet også informasjon og figurer fra databasen cBioPortal for kreftgenomikk.

Genetiske endringer ved kreft

Det er to typer gener som er kritiske for utvikling av kreft; onkogener og tumorsupressorgener. Proto-onkogener er de normale forløperne til onkogener. Disse koder for proteiner som stimulerer cellevekst. Dersom vi får mutasjon i det ene allelet av dette genet får vi et onkogen. Dette vil kode for økt mengde eller høyere aktivitet hos vekststimulerende proteiner, det vi kaller “gain-of-function”. Her er det nok med mutasjon i ett av to alleler, dominant mutasjon. Vi vil da få økt celleoverlevelse og celledeling. Tumorsupressorgener koder for proteiner som bremser og hindrer cellevekst. For disse genene må det være mutasjon i begge allelene, recessiv mutasjon. Dersom cellen har én fungerende kopi av genet, blir det veksthemmende proteinet fortsatt produsert. Ved mutasjon i begge allelene får vi “loss-of-function”, det vil si at genproduktet blir inaktivert, produseres i mindre mengder eller har lavere aktivitet (3). DNA-reparasjonsgener korrigerer mutasjoner i DNA. Når disse er muterte øker mutasjonsraten og dermed også sjansen for at det oppstår mutasjoner i onkogener og tumorsupressorgener. Slik vil mutasjoner kunne oppstå og akkumuleres raskere enn vanlig (4).

Seks kjennetegn ved kreft

Kreft kjennetegnes ved seks ervervede biologiske egenskaper (5), se figur 1. I tillegg spiller tumorens mikromiljø en viktig rolle i tumorgenese. Dette innebærer at normale celler rekrutteres og spiller en aktiv rolle i karsinogenesen.

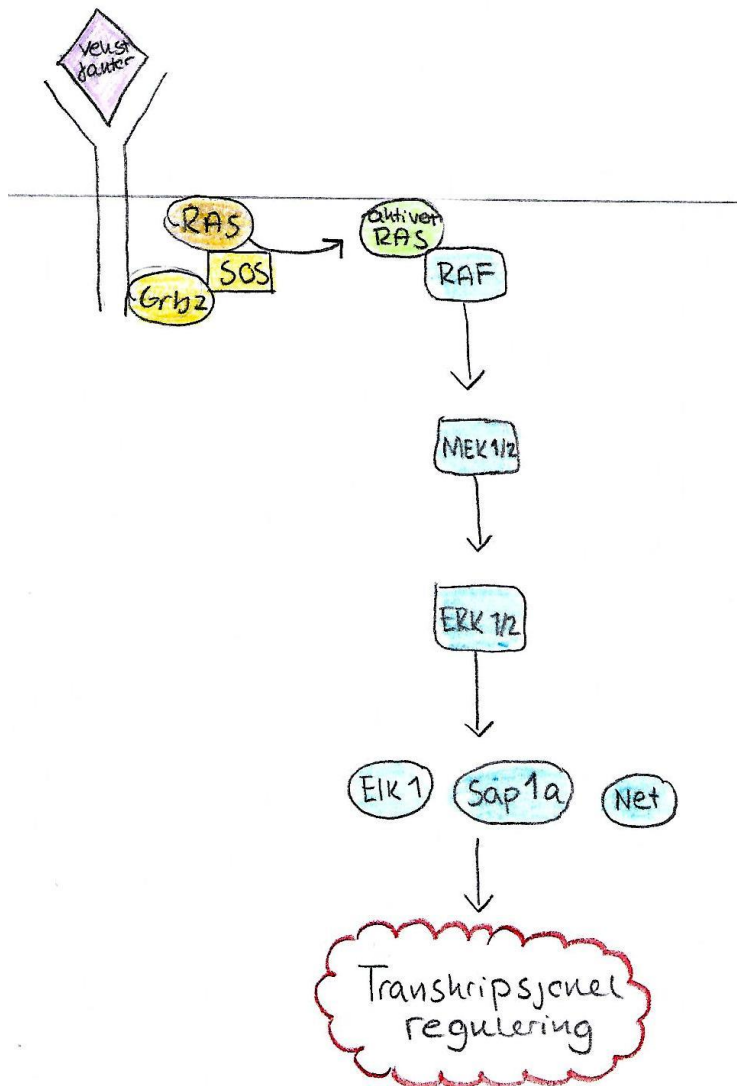


Figur 1: Illustrasjonen viser de seks kjennetegnene ved kreft. Tumorceller erverver seks forskjellige egenskaper i større eller mindre grad; opprettholdelse av vekstsignaler, insensitivitet for veksthemmere, uendelig antall celledelinger, unngå apoptose, nydannelse av blodkar og invadere vev. The Hallmarks of Cancer, Cell.

Opprettholdelse av vekstsignaler

Opprettholdelse av vekstsignaler og proliferasjon er den mest grunnleggende egenskapen ved kreftceller. Normale celler kontrollerer produksjonen og utskillelsen av vekstfremmende signaler nøye (6). Kreftceller opprettholder vekstsignaler på flere måter. De kan produsere vekstfaktorer selv, slik at vi får autokrin signalisering om at cellen skal proliferere. Alternativt kan kreftceller sende ut signaler til normale celler i tumorvevet. Disse sender vekstfaktorer tilbake til kreftcellene. I tillegg kan kreftceller ha økte mengder reseptorproteiner på overflaten, slik at de blir hyperresponsive på vekstfaktorer. Reseptormolekyler kan også få endrede strukturer og bli hyperresponsive på stimuli (5). Uavhengighet fra vekstfaktorer kan også skje ved at komponenter i signalveier er konstant aktivert. Aktivering via reseptormolekyler er da ikke nødvendig for aktivering videre i signalveien. Et eksempel på dette er mutasjon i RAF-genet, som fører til “gain-of-function”

hos proteinet. Vi får da konstant aktivering av BRAF-proteinet som sender signaler videre i MAPK-veien, som igjen fører til celledeling og cellevekst (6), se figur 2.



Figur 2: Skjematisk illustrasjon av MAPK signaleveien fra aktivert reseptor til endret genuttrykk. En vekstfaktor binder tyrosin-kinase reseptor på celleoverflaten. Dette fører til at Gbr2 og SOS aktiverer Ras. Aktivert Ras vil aktivere Raf, som aktiverer MEK 1 og 2, som igjen aktiverer ERK 1 og 2. Disse vil igjen aktivere blant annet Elk 1, Sap1a og Net som vil regulere transkripsjon. ERK1/2 har også mange substratproteiner som reguleres direkte gjennom fosforylering og gir regulering av celleprosesser uavhengig av transkripsjon (ikke vist i illustrasjon).

Unngå apoptose

Tumorens evne til å øke i antall celler er ikke bare avhengig av cellenes proliferasjonshastighet, men også hvor fort cellene dør. Cellene har sensorer som registrerer det ekstracellulære og intracellulære miljøet. Reseptorer på cellens overflate binder

overlevelses- eller apoptosefaktorer. Ved de fleste krefttilfeller har kreftcellene evne til å unngå apoptose. Kreftceller har ulike måter å unngå apoptose på, men den vanligste er mutasjon i p53-genet. Cellen mister da den proapoptotiske reguleringen som p53 bidrar med. En stor andel lunge- og kolonkarsinomer har en mekanisme som unngår signaler fra Fas-liganden. Dette skjer ved at en ikke-signaliserende reseptor for Fas-lignaden er oppregulert. Da vil ikke cellen motta signaler om apoptose og apoptosekaskadene i cellen vil ikke settes i gang (5).

Unngå veksthemmende signaler

Kreftceller unngår veksthemmende signaler som nedregulerer proliferering. Celler har tumorsupressorgener som koder for ulike proteiner. To eksempler på slike tumorsupressorproteiner er protein 53, p53, og retinoblastomprotein, pRb. p53 og pRb er begge gatekeeper proteiner, som regulerer sjekkpunkter i cellyklusen (6). Transformerende vekstfaktor beta, TGF- β , kan også bli påvirket ved tumorutvikling. Vanligvis er dette proteinet og dets signalvei med på å hindre uønsket cellevekst. Tumorer som har kommet langt i utviklingen kan ha TGF- β som ikke fungerer som supressorer, men heller aktiverer et cellulært program som kalles epitelial-til-mesenkymal transisjon, EMT. Epitelceller vil da miste polariteten og celle-til-celle-adhesjon. Denne endrede egenskapen er assosiert med høyere malignitet. Altså vil TGF- β fungere som en tumorsupressor tidlig i karsinogenesen, og utvikler seg til å bli tumorpromoterende senere (5).

Evnen til å dele seg uendelig mange ganger

Normale celler overlever et bestemt antall celledelinger. For hver celledeling en celle gjennomgår tapes noen baser på endene til DNA-trådene. Derfor finner vi telomere i endene av DNA-trådene, som er repeterte DNA-sekvenser. Disse fungerer som en beskyttelse for DNA-trådene. Når telomerene blir borte vil cellen stoppe å dele seg eller gjennomgå apoptose. Telomerase er en type DNA polymerase som legger til baseparene i telomerene. Dette enzymet er omtrent ikke til stede i normale celler, mens i kreftceller finner vi store mengder (5).

Angiogenese

Tumorvev trenger, i likhet med normalt vev, næring i form av næringsstoffer og oksygen, samt muligheten til å kvitte seg med avfallsstoffer og karbondioksid. Dette behovet dekkes gjennom angiogenese, som vil si at tumorvevet får nye blodkar til å vokse og forgreine seg mot og ut i tumoren. Normalt stimuleres angiogenese både som en naturlig del av sårtilheling

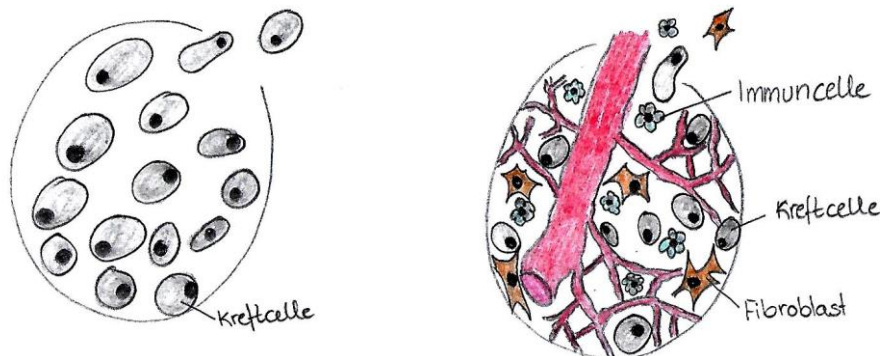
og i slimhinnen i livmor gjennom menstruasjonssyklus. Kreftceller som danner svulster over en viss størrelse er avhengig av å stimulere angiogenesen. Dette skjer gjennom sekresjon av signalproteiner som binder seg til stimulerende eller inhiberende reseptorer på de vaskulære endotelcellenes overflate. To eksempler på slike signalmolekyler er vaskulær endotelial vekstfaktor A, VEGF-A, og trombospondin-1, TSP-1, som er henholdsvis stimulerende og inhiberende. VEGF-A-genet kan være oppregulert som følge av hypoksi eller onkogen signalisering. Blodkarene som dannes inne i tumorvev avviker fra normale kar. De er gjerne store og har uregelmessig form med mange forgreininger. Blodstrømmen er ujevn og karene kan ha småblødninger. I tillegg har endotelet unormal proliferasjon og unormal apoptose (6).

Metastase og invadering av vev

Rundt 90% av dødsfall på grunn av kreft kommer av metastaser fra primærtumor (7). Kreftceller har gjerne endret fasong og binding til andre celler og ekstracellulærmatriks (6). Proteiner som binder celler til omgivelsene, er endret hos celler som har invasive og metastatiske evner. Eksempler på slike proteiner er celle-til-celle adhererende molekyler, CAMs, og integriner. Integriner binder celler til ekstracellulær matriks. Et mye studert protein er E-cadherin, som epitelceller har mye av. Via E-cadherin blir også signaler som blant annet hemmer vekst, overført til celler. Ved de fleste tilfeller av epitelial kreft er E-cadherins funksjoner fraværende. Også CAMs i form av immunoglobulin-familie proteiner kan være endrede, og spiller en sentral rolle i invasjon av vev og metastase. Et eksempel er neural cell adhesion molecule, N-CAM. N-CAM kan endre isoform fra å være veldig adhererende til å være svært lite adhererende, eller reduseres i antall. Den normale formen for N-CAMs bidrar til å hindre metastase. Mikromiljøet rundt tumorcellene vil endre seg ettersom cellene utvikler seg, og nye matrikskomponenter kan oppstå. Derfor kreves det også at cellene endrer overflateproteinene sine for å kunne kolonisere i vevet effektivt. Derfor ser en at de tumorcellene som har evne til å invadere vev har gått fra å ha integriner som binder normalt ekstracellulært matriks til å kunne binde degradert tumorvev. En siste mekanisme som gjør det mulig for tumorceller og invadere vev er at de har økt aktivitet av ekstracellulære proteaser. Proteasegenene er oppregulert mens proteaseinhibitorgenene er nedregulert, og inaktive proenzymmer av proteaser omgjøres til aktive enzymer. Dette gjør at vevet rundt cellene degraderes og tumorcellene kan invadere vevet ytterligere.

Kreftforskning har i stor grad fokusert på kreftcellene i seg selv og deres gener. Framover kan det tenkes at nye oppdagelser vil gjøres når tumorer betraktes som komplekse vev bestående

av kreftceller og rekrutterte og påvirkede normale celler. Til sammen danner disse neoplastiske tumorer (5), se figur 3.



Figur 3: Illustrasjon av forenklet og mer realistisk modell for oppbygging av en kreftsvulst. Tidligere har kreftforskningen fokusert på selve kreftcellene i tumoren (venstre). Ny teknologi og forståelse gjør det nå mulig å studere hele stroma (høyre), som inkluderer kreftcellene og miljøet rundt. Dette inkluderer blant annet blodkar, immunceller og andre celletyper som kan ha innvirkning på tumorens utvikling.

Cellekommunikasjon

Alle celler har evnen til å oppdage og motta informasjon. Deretter prosesseres informasjonen og cellen responderer på en dynamisk måte. Denne kommunikasjonen foregår gjennom celledesignaler. Disse signalene er fundamentale for biologiske prosesser. Ofte skjer denne signaliseringen gjennom proteinkaskader, som i MAPK-veien.

Cellesignalisering skjer på plasmamembranen, i cytosol og i kjernen. Inne i cellekjernen finner vi genekspressjon. Genekspressjon er ulikt fra de andre celleresponsene, fordi det dannes nytt mRNA. Dette er en prosess som tar lengre tid, gir stabile endringer og bruker mye energi.

Cellesignalisering utenfor kjernen har en mye raskere responstid. Signalene kan bytte tilstand meget raskt. I tillegg er det ikke en kontinuerlig prosess slik som inne i cellekjernene.

Signalene slås av og på når det behøves. Disse prosessene benytter lite energi i forhold til genekspressjon.

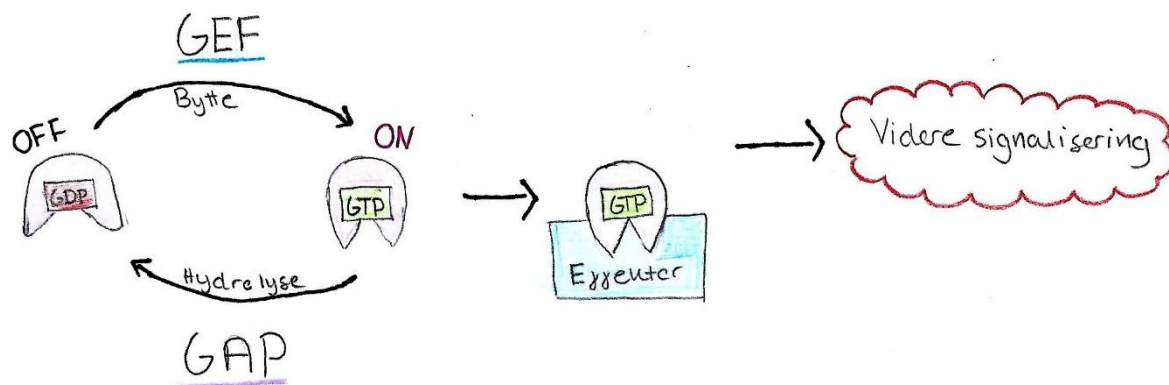
Lagring og overføring av informasjon skjer ved endring i tilstanden til proteiner. Proteiner har ikke en fastsatt konformasjon, men kan endres ved aktivering.

GTPaser

En type signalmolekyl er GTPaser, som er sentrale i mange signalveier. Disse proteinene bytter mellom aktiv og inaktiv konformasjon. Dette avhenger av om de er bundet til guanosintrifosfat, GTP, eller guanosindifosfat, GDP. Både GTP og GDP binder GTPase med høy affinitet og vil ha en lav dissosiasjonskonstant. Skal reaksjonen gå av seg selv vil det derfor gå meget sakte.

Bytte mellom GTPasenes to former kontrolleres av enzymer med motvirkende effekt, se figur 4. Guanin nucleotid exchange factors, GEFs, katalyserer frigjøringen av GDP og deretter tilknytningen til GTP. GEFs virker ved å modifisere strukturen i bindingssetet til nukleotidet slik at affiniteten senkes. GTPaser binder GDP og GTP med samme affinitet, men den høyere konsentrasjon av GTP i cellen sørger for at proteinet kommer i aktiv tilsand.

GTPase aktiverende proteiner, GAPs, inaktiverer GTPasen ved at de stimulerer GTPasen sin enzymatiske aktivitet som hydrolyserer GTP til GDP (8).



Figur 4: Skjematisk illustrasjon av aktivering, inaktivering og signalisering fra GTPaser. Når GTPasen er inaktiv er den knyttet til GDP. For å bytte over til aktiv form vil den bli påvirket av GEFs, som bytter GDT til GTP. Dette endrer konformasjonen av GTPasen slik at den kan feste seg til effektorer og gi videre signalisering. For å bytte over til inaktiv konformasjon igjen vil GTPasen bli påvirket av GAPs som hydrolyserer GTP til GDP.

RAS

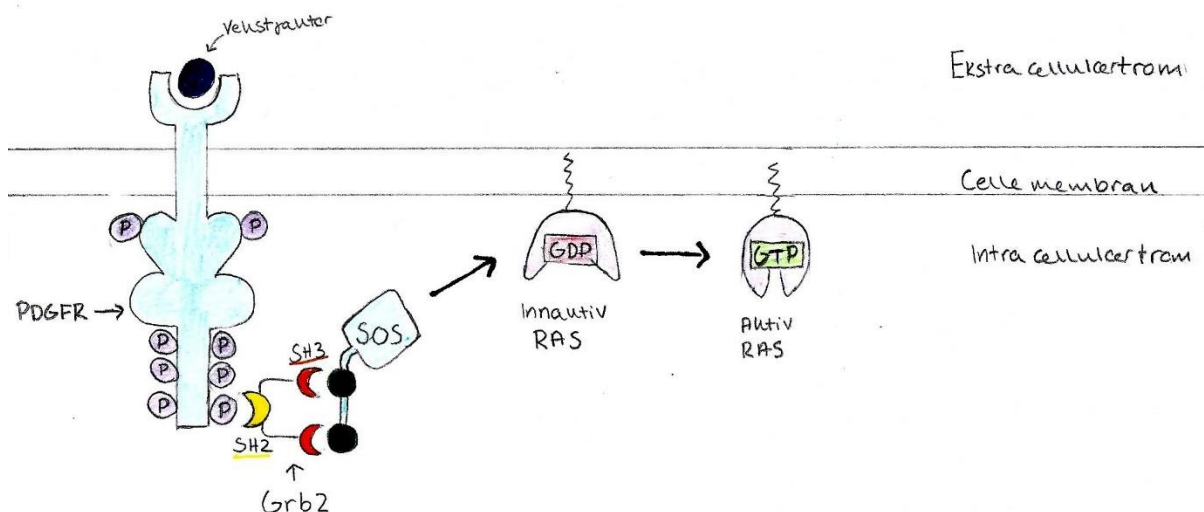
Rat sarcoma viral oncogene homolog, RAS, proteiner er små GTPaser, og er en del av flere signalveier i cellen (9). RAS-gener er proto-onkogener. Det finnes 3 ulike RAS-gener hos mennesker. KRAS, NRAS og HRAS. Der KRAS har to ulike undergrupper KRAS-4A og

KRAS-4B (10). Mekanismene for aktivering og signalisering er felles for alle de tre RAS-proteinene og i det videre vil de diskuteres under (RAS) med mindre det er spesifisert. Blant signalsporene som aktiveres av GTP-bundet, aktivert Ras er MAPK veien, Fosfatidylinositol 3-kinase, PI3K-veien og Ral guanin exchange factor, RalGEF, veien (11).

RAS aktiveres av reseptor tyrosin kinase, se figur 5. Aktiverte reseptorer blir fosforylert på flere tyrosin-residuer. Dermed rekrutteres GEF-enzymet som aktiverer RAS. Dette enzymet heter son of Sevenless, SOS. SOS finnes i cytosol i ustimulerte celler, mens RAS har en fast posisjon i cellemembranen. Ved reseptoraktivitet vil SOS rekrutteres til reseptoren, komme nært RAS og føre til aktivering.

Aktivering av platederivert vekstfaktorreseptor, PDGFR, skaper bindingssete for flere effektorer i den intracellulære delen av transmembranreseptoren. Adaptorproteinet som rekrutterer SOS heter Growth factor receptor bound-protein 2, Grb2. Den har et Sarcoma Homology 2, SH2, domene som binder seg til PDGFR som er fosforylering på bestemte tyrosing og et SH3 domene. SH3 har en C-terminal og en N-terminal ende. Disse binder den prolinrike sekvensen i den C-terminale enden til SOS.

SOS er et multidomeneprotein med et N-terminalt histonlignende domene. SOS består også andre domener: Dbl Homology, DH, Pleckstrin Homology, PH, Ras exchange motif-Cell division cycle 25, REM-Cdc25, og en Grb2-bindene C-terminal ende. Som nevnt over vil SOS rekrutteres og aktiveres ved kontakt med Grb2. Dette vil også skje ved binding av Fosfatidylinositol 4,5-bisfosfat, PIP₂, til PH domenet. RAS binder seg til et allosterisk reguleringssete i REM-Cdc25 domenet. Denne bindingen blir forsterket av PIP₂, og øker SOS sin katalytiske aktivitet. Dette fører til positiv feedback.



Figur 5: Skjematisk illustrasjon av RAS-aktiveringen i respons til vekstfaktor. Vekstfaktoren setter seg i bindingssetet hos PDGFR. Dette gjør at SH2 domenet av adaptorproteinet Grb2 fester seg til fosfotyrosin bindingssteder på PDGFR. Grb2 rekrutterer GEF for RAS, som er Sos. SH3 domenet hos Grb2 vil binde til prolinrike sekvenser i C-terminal ende på SOS. SOS vil deretter virke på inaktiv RAS som har GDP bundet til seg. Dette gjør at GDP vil løsne fra RAS og GTP vil feste seg. Da aktiveres RAS og kan virke videre på ulike prosesser.

PDGFR rekrutterer også enzymer som nedregulerer prosessen. Som GAP for RAS, samt tyrosin fosfatasene Sarcoma Homology 2 Domain Phosphatase-1 og -2, SHP 1, og SHP 2. SHP 1 og SHP2 fjerner fosfotyrosin-bindingssteder på PDGFR.

RAS har to regioner som er viktige for konformasjonen av proteinet, switch 1 og switch 2. γ -fosfatmolekylet i GTP spiller også en viktig rolle for konformasjonen. γ -fosfatet skaper hydrogenbindinger med regionene switch I og switch II for å endre konformasjonen. Disse regionene er kritiske for binding til effektorer, og endret konformasjon i disse regionene vil derfor endre evnen til binding (8).

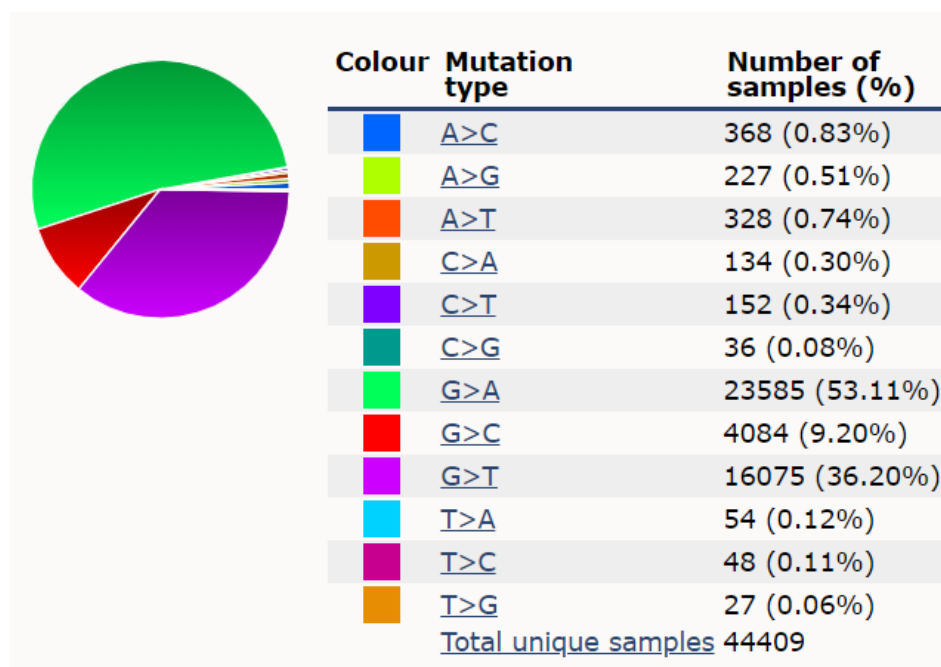
RAS genet har fem introner og fire eksoner. De tre ulike RAS typene har introner av ulik lengde og sammensetning. KRAS har over 35 000 basepar, NRAS har 7000 basepar og HRAS 3000 basepar. Eksonene for HRAS, NRAS og KRAS-4A har 189 basepar, mens eksonene for KRAS-4B har 188 basepar. I de tre typene er eksonene homologe de første 164 aminosyrene. De siste 25 baseparene er en heterogen region. Det er denne regionen som bestemmer proteinets subcellulære lokalisasjon. RAS proteinet har et lipid-anker som bindes kovalent i C-terminal ende. Denne vil forankre seg i membranen. Ulik lipidering for de ulike

C-terminale variantene av RAS-proteinene gir lokalisering til ulike membraner. HRAS og NRAS sitt lipidanker dirigerer proteinene til cellemembranen (12). Det fjerde eksonet i KRAS benyttes til å danne de to ulike genproduktene KRAS-4A og KRAS-4B. Disse genproduktene har ulike C-termini som blir ulikt lipidert og dirigert til ulike membraner. KRAS-4A rekrutteres til i cellemembranen og KRAS-4B til mitokondriemembraner (13).

Mutasjon i KRAS er den vanligste mutasjonen i RAS familien. Når KRAS muteres vil det gi opphav til aktiverte versjoner av både 4A og 4B spleisevariantene. NRAS og HRAS er også funnet mutert i tumorer, men dette er mindre vanlig. Det er veldig interessant at andelen med KRAS-mutasjon er mye større i forhold til HRAS og NRAS, når oppbygningen av de ulike genene er lik. Mutasjon i KRAS gir endring i både KRAS-4A og 4B, som vil gi endring i både metabolisme og signalisering (2). I fortsettelsen vil oppgaven fokusere på KRAS.

Mutasjoner i KRAS skjer i ekson 2, 3 og 4 (14). De vanligste mutasjonene er punktmutasjoner i kodon 12 og 13. Mer uvanlig er mutasjoner i kodon 61, 117 og 146 (15). De mest høyfrekvente mutasjonene i KRAS, uavhengig av kodon, kan sees i figur 6.

Mutasjoner i RAS-genet vil svekke hydrolyseringen av GTP. Dette fører til stabilisering av den aktiverte formen for RAS-proteinet og gi konstant signalisering (10).

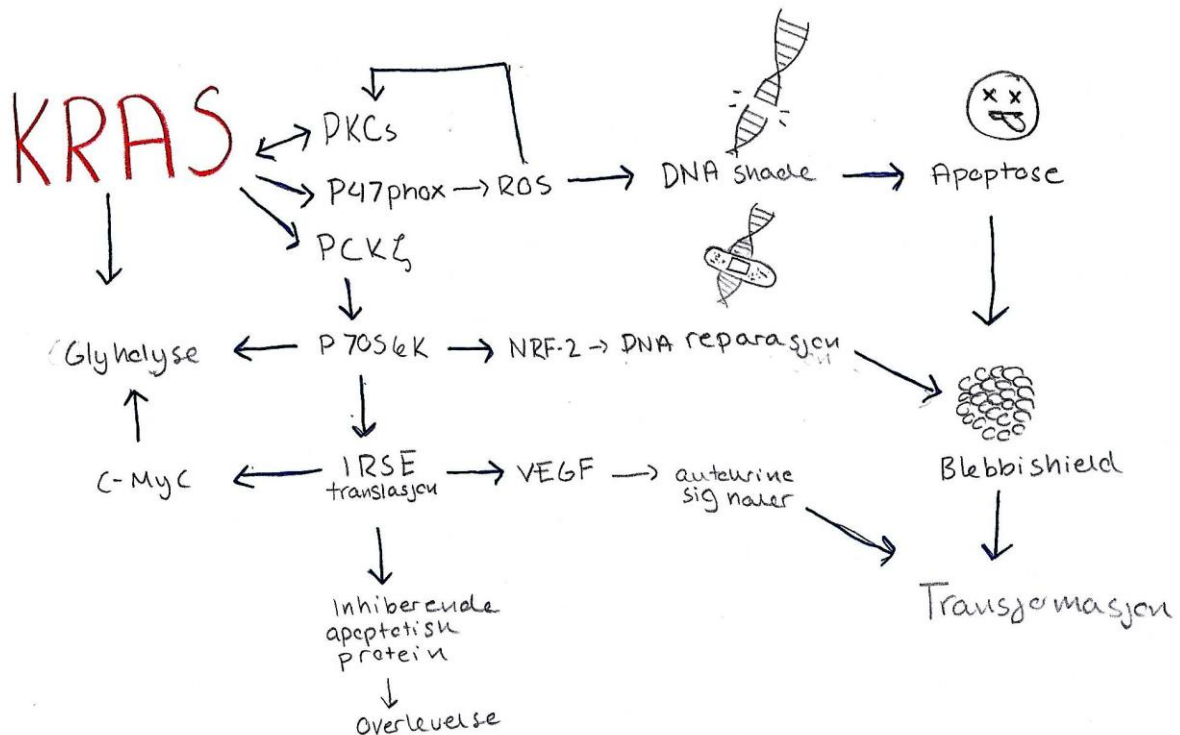


Figur 6: Fordeling av substitusjonsmutasjoner i KRAS uavhengig av kodon. Ser på denne fordelingen at mutasjonen G>A er den mest vanlige blant de 44409 krefttilfellene som er studert. Hentet fra Catalogue Of Somaic Mutations In Cancer.

Mutert KRAS som driver av celletransformasjon

I aktivert tilstand vil KRAS indusere dannelsen av reaktive oksygen-radikaler, ROS. Dette skjer gjennom positiv feedback. Aktivert KRAS vil legge til rette for p47phox, som deretter vil danne ROS (15). Denne dannelsen vil øke mengden protein kinase C, PKC. PKC er et enzym som vil fosforylere og aktivere KRAS (15). Mye ROS kan være skadelig for cellen. ROS kan skade DNA gjennom oksidativt stress og føre til apoptose ved aktivering av p53. KRAS vil holde nivået av ROS nede gjennom regulering av nivået og nøytralisering. Ved fjerningen av ROS vil KRAS prøve å redde cellen gjennom reparering av DNA, da skade på DNA vil føre til apoptose. Økt mengde aktiv KRAS vil føre til økt mengde av PKC- ζ , som igjen fører til økt mengde p70S6K. Proteinet vil føre til økt mengde nuclear factor erythroid 2, NRF-2. Dette systemet vil føre til aktivering av DNA-reparering (15).

Blebbishield nødprogrammet startes av påbegynt apoptose. Programmet vil forsøke å redde apoptotiske celler og omdirigere de mot KRAS-mediert celletransformasjon. DNA-reparasjon er også viktig når cellene skal reddes fra apoptose, da skade på DNA fører til apoptose. Cellen vil i programmet lage et blebbishield fra apoptotiske celler, som vil smelte sammen for å skape en transformert celle. Transformasjonen styres av autokrine signaler. Disse aktiveres gjennom VEGF, som igjen aktiveres av internal ribosome entry site, IRES, translasjon. IRES blir aktivert av p70S6K. IRSE-translasjon vil hjelpe cellen med å hemme apoptosen, ved inhiberende apoptotisk protein. KRAS vil øke glykolysen direkte. Glykolysen økes også gjennom p70S6K, samt gjennom c-myelocytom, c-myc, som aktiveres gjennom IRSE-translasjon. Dette er viktig for at cellene ikke skal utsettes for en sekundær nekrose under blebbeishield nødprogrammet (15). For grafisk fremvisning se figur 7.



Figur 7: Skjematiske illustrasjon som viser hvordan aktivert KRAS vil skape transformasjon i cellen. Økt mengde aktivert KRAS vil legge til rette for p47phox som igjen vil danne ROS. ROS inducerer dannelse av PKC. Aktivert KRAS vil også gi økt mengde PKC, og PKC vil aktivere mer KRAS gjennom fosforylering. For mye ROS er skadelig for cellen og kan gi DNA skade. Cellen vil prøve å holde nivået av ROS nede, da DNA-skader vil føre til apoptose. Cellen blir forsøkt reddet gjennom blebbishield nødprogrammet og DNA-reparasjon. I blebbishield nødprogrammet vil det dannes et blebbishield av apoptotiske kropper. Disse smelter sammen og skaper en transformert celle. DNA-reparasjonen gjøres gjennom økte mengder NRF-2. Økte mengde NRF-2 kommer av økt mengde p70S6K. Som igjen kommer av økt mengde PKC- ζ . Økt mengde PKC- ζ kommer direkte fra økt mengde KRAS. p70S6K vil også gi økt mengde IRSE-translasjon. IRSE-translasjon skaper inhiberende apoptotisk protein som øker sjansen for overlevelse ved å inhibere apoptose. IRSE-translasjon øker også mengden VEGF. Dette skaper autokrine signaler som påvirker celletransformasjonen. Aktivert KRAS gir også økt glykolyse, både direkte og gjennom andre stoffer. P70S6K øker glykolysen. Det samme gjør IRSE-translasjon gjennom c-myc. Økt glykolyse er viktig for å unngå sekundær nekrose (15).

KRAS-indusert celletransformasjon er ikke nok til å sette i gang karsinogenese. Instabilitet i arvematerialet er essensielt. Denne instabiliteten kan skje på en spesifikk plass på genomet eller på kromosomalt nivå. Om DNA-reparasjonsmekanismene ikke fungerer som de skal vil denne instabiliteten vedvare. En type defekt i DNA-reparasjonssystemet er defekt i mismatch reparasjonssystemet, MMR. Dette kan føre til mutasjons hotspots, som kan være årsaken til KRAS-aktiverende mutasjon. Den alternative non homologous end joining, NHEJ, veien

benyttes også av KRAS for å skape varig instabilitet. Celler er avhengig av NHEJ veien ved genotoksisk stress, siden den reparerer DNA. Den alternative NHEJ-veien er mer utsatt for feil enn den klassiske veien. KRAS kan oppregulere komponentene i den alternative NHEJ-veien slik at denne benyttes til reparasjon. KRAS benytter også homolog rekombinasjon for å generere genominstabilitet.

Transformasjon av cellen kan føre til varig kromosominstabilitet om p53 er manglende. Blebbishield nødprogrammet kan begrense p53 ved celletransformasjon. Oppsamling av kromosom 8 er forbundet med genominstabilitet i flere krefttyper. Kromosom 8 inneholder myc-genet. KRAS og myc regulerer opp glykolysen i den transformerte cellen for å unngå sekundær nekrose. Kontrollen KRAS har over metabolsk reprogrammering kan derfor gi økt oppsamling av kromosom 8. Laktat vil øke sjansen for at en celle skal overleve transformasjonen med blebbishield nødprogrammet. pH reduseres og dette kan potensielt øke tilgjengeligheten av VEGF. Blebbishield nødprogrammet vil velge ut celler som kan øke glykolysen og laktatproduksjonen. Dette gir økt sjanse for å overleve apoptosen.

Hemmet bearbeiding av mikro-RNA, miRNA, er vanlig i karsinogenesen. MiRNA kan øke eller senke KRAS-drevet karsinogenese. For eksempel vil miR-143/145 hemme karsinogenesen. KRAS vil prøve å undertrykke miR-143/145 gjennom bindingsproteiner (15).

Mutert KRAS sin påvirkning av prosesser i cellen

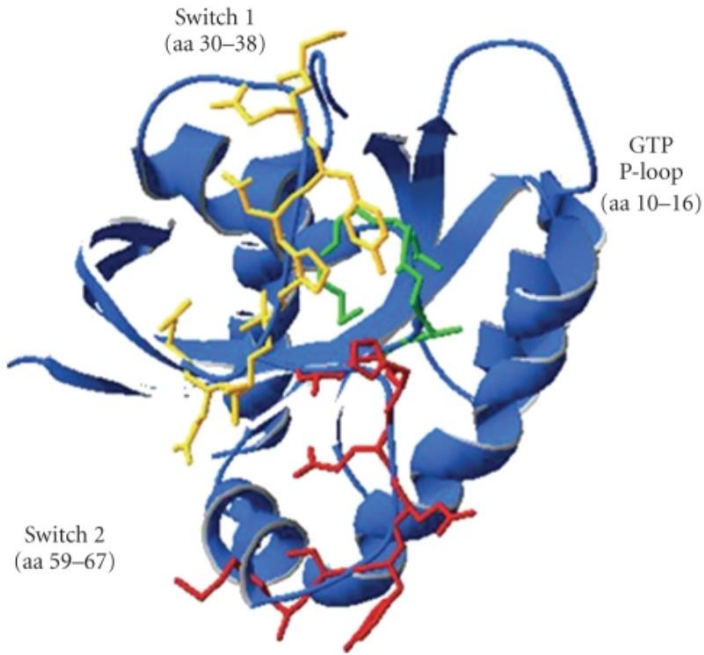
Mutert KRAS vil påvirke mange prosesser i cellen. Den vil aktivere MAPK-veien, PI3K-veien og RalGEF-veien. Stressresponser som p38 og c-Jun N-terminal kinase, samt Nuclear Factor-kappa B blir også aktivert. Dette skjer enten ved at KRAS påvirker en annen signalvei, eller ved at KRAS øker produksjon av stressignaler som ROS (11). Mutert KRAS vil også aktivere nukleære transkripsjonsfaktorer som ELK, JUN, MYC. Alt dette vil føre til økt celledifferensiering, proliferasjon, migrasjon, transformasjon, adhesjon og overlevelse.

Når KRAS er mutert endrer dette cellemetabolismen. Glukoseopptaket øker og skifter fra mitokondrial oksidativ fosforylering til aerob glykolyse. Dannelsen av laktat og ROS i cellen øker også. KRAS stimulerer til økt pinocytose. Pinocytose er type endocytose hvor cellene tar opp næringsstoffer. Dette vil øke mengden katabolitter, som øker karbonmetabolismen og opprettholde celleproliferasjon. Mutasjon i KRAS gir også økt autofagi. Celler med mutert

KRAS vil utskille kjemokiner som aktiverer T-celler, B-celler, myeloide celler og makrofager. Dette øker den inflammatoriske responsen og tumor vekst. Fibroblaster som infiltrerer svulsten vil regulere stroma i tumoren. Dette inkluderer ekstracellulær matrix, kollagenfibre og hyaluronsyre. Pro-angiogenetiske faktorer vil stimulere dannelsen av blodkar i tumoren. Alle disse prosessene vil bidra til økt tumorvekst og dannelse av metastase (16).

Ulike mutasjoner i KRAS

Kodon for de vanligste mutasjonstypene for KRAS befinner seg rundt bindingssetet for GTP og GDP. G12 og G13 befinner seg i P-loopen, se figur 8. P-loopen er viktig for å stabilisere det aktive setet. Mutasjoner i kodon 12 reduserer GTP-hydrolysen i KRAS uten å påvirke byttet fra GDP til GTP i det aktive setet. Både ustimulert og GAP-indusert GTP-hydrolyse er redusert i KRAS-protein som kodes av et gen med mutasjon i kodon 12. Mutasjoner i kodon 13 påvirker også hydrolysen og øker i tillegg hastigheten på det naturlige byttet fra GDP til GTP ti ganger. Mutasjon i K117 vil endre amingruppen slik at den danner en saltbro som binder seg til G13 i P-loopen. Dette vil gi en stabiliserende effekt som både reduserer hydrolysen og stimulerer bytte av GDP til GTP. Mutasjon i A146 øker hastigheten på byttet av GDP til GTP når GEFs ikke er til stede. Økningen er over 1000 ganger høyere enn villtype (17).



Figur 8: Modell av KRAS proteinet. Viktige domener er uthevet med farge. Switch 1 regionen er gul, switch 2 rød og P-loop grønn (18).

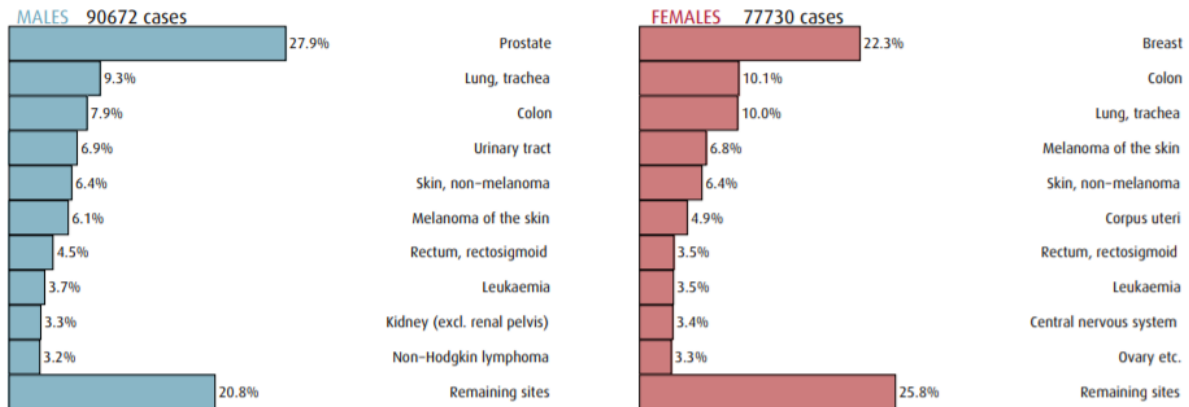
Mutasjoner i kodon 12 er den vanligste mutasjonstypen for tykktarmskreft, ikke-småcellet lungekreft og duktalt adenokarsinom i pankreas. Nesten 90% av tilfeller fra disse krefttypene har mutasjon i kodon 12.

For duktalt adenokarsinom i pankreas er mutasjon som gir aminosyrebyttet G12D assosiert med lav sjanse for overlevelse. Mutasjon G12R har bedre sjanse for overlevelse. I tykktarmskreft vil G12D- og G12V-mutasjon gi lavere overlevelsesrate. Hos denne krefttypen vil mutasjon i kodon 12 assosieres med dårligere prognose, da mutasjonen ofte gir raskere utvikling og større sjanse for metastase til lymfeknutene. Ved ikke-småcellet lungekreft vil mutasjonene G12D og G12V vil gi bedre sjanse for overlevelse enn de sjeldne mutasjonene i kodon 12 (17).

Tykktarms- og endetarmskreft

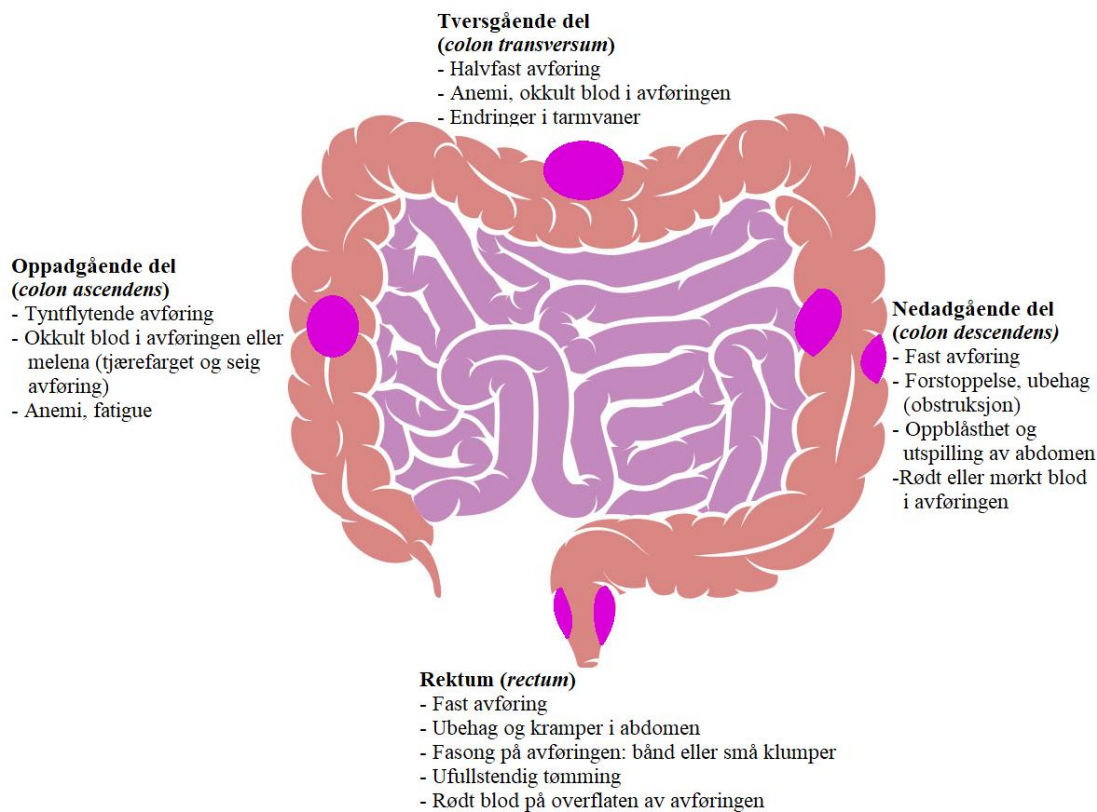
Tykktarms- og endetarmskreft, også kalt kolorektalkreft, er den andre og tredje vanligste kreftformen hos henholdsvis kvinner og menn, se figur 9. Kolorektalkreft utvikler seg sporadisk, eller som følge av arvelige kreftsyndromer eller inflammatoriske tarmsykdommer.

De aller fleste tilfeller av kolorektalkreft er adenokarsinomer, som er ondartede svulster som vokser ut fra kjertelepitel. Flesteparten av adenokarsinomene utvikler seg via benigne forstadier; adenomatøse polypper eller adenomer. Dette kan ta 5–15 år (19).



Figur 9: Statistisk framvisning av krefttilfeller i Norge i 2018. Her kan en se at prostata-, lunge- og kolonkreft er de hyppigste kreftformene hos menn, og at bryst-, kolon- og lungekreft er de hyppigste kreftformene hos kvinner. Hentet fra kreftregisteret: Cancer in Norway 2018 (20).

Prevalensen av adenomatøse polypper og karsinomer øker med økende alder. Polyppene er stort sett lokalisert på venstre side av kolon hos yngre mennesker, mens andelen med polypper i høyre kolon øker med alderen. Lokaliseringen av polyppene avgjør hvilke symptomer pasientene får, og det har innvirkning på prognosen, se figur 10. Polypper gir sjeldent symptomer, og oppdages gjerne sent, ofte ved en tilfeldighet. Når polyppene øker i størrelse, øker risikoen for at de blir maligne. Behandling av kolorektalkreft består av fjerning av den delen av tarmen som er involvert. Kjemoterapi og stråling blir i noen tilfeller benyttet etter operasjon. Hvilken type medisiner som benyttes er avhengig av hvilket stadium kreften er i og av pasientens generelle helse og sykdomshistorie (21).



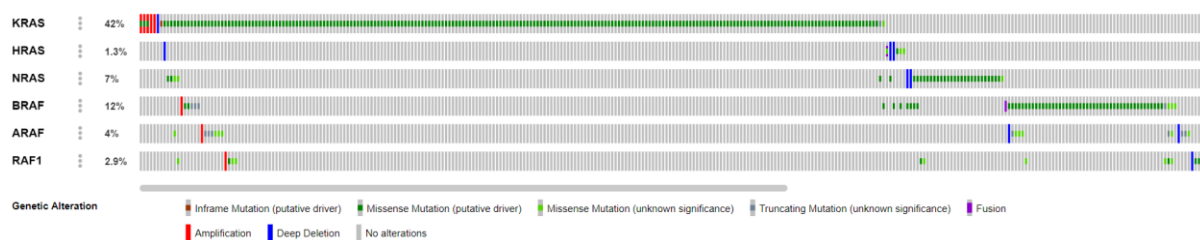
Figur 10: Illustrasjon av tarmen og hvordan lokalisering av tumorer gir ulike symptomer. Dersom tumor sitter i oppadgående del av tarmen vil pasienten ha få symptomer i starten, men etter hvert vil avføringen bli tyntflytende og inneholde okkult blod og/eller være seig. I tillegg vil pasienten etter hvert utvikle anemi og fatigue. Er tumoren lokalisert i tversgående del av tarmen vil avføringen være halvfast og kan inneholde okkult blod. Pasienten vil etter hvert utvikle anemi og oppdage at tarmvanene endrer seg. Dersom tumor sitter i nedadgående del av tarmen vil pasienten oppdage symptomer på et tidligere stadium enn om den var i oppadgående del. Da vil pasienten ha fast avføring og forstoppelse på grunn av obstruksjon i tarmen. Abdomen vil føles oppblåst og utspilt. Avføringen vil inneholde rødt eller mørkt blod. Tumor i rektum vil føre til at pasienten har fast avføring som er formet som små klumper eller bånd og er rødlig på overflaten. Pasienten kan føle på ubehag og kramper i abdomen. I tillegg har pasienten vansker for å tømme seg skikkelig.

Selv om det er vanskelig å finne årsaker til kreft, er det flere risikofaktorer som bidrar til utvikling av kreftsykdom. Dette er miljøfaktorer som blant annet dårlig fysisk form og overvekt, røyking, høyt alkoholinntak, *diabetes mellitus*, giftige kjemikalier, inntak av mye rødt og bearbeidet kjøtt, fet, stekt og røkt mat. I tillegg gir betennelsestilstander som ulcerøs kolitt og Chrons sykdom økt risiko for kolorektalkreft. Også små godartede svulster, polypper og adenomer, gir økt risiko for kreft, ettersom disse kan utvikle seg til å bli maligne (22). Tidligere kreftdiagnoser øker også risikoen for kolorektalkreft.

Genetiske faktorer er også sentrale for kreftutvikling. Rundt 5–10% av pasienter med kolorektalkreft har definerte arvelige kreftsykdommer. Dette er i hovedsak arvelig ikke-polypøs kolorektalkreft, HNPCC, og familiær adenomatøs polypose, FAP. HNPCC er en autosomal dominant sykdom med mutasjoner i MMR-gener. Syndromet kalles også Lynch syndrom og er det vanligste arvelige kolorektalkreftsyndromet. Av pasienter med kolorektalkreft, har 1–3% HNPCC (23). HNPCC karakteriseres av tidlige utbrudd av neoplastiske lesjoner i ulike typer vev, og MSI. Pasienter med HNPCC har også økt risiko for andre krefttyper, deriblant kreft i endometrium, magen, eggstokkene, urinveiene, lever- og gallegangen, pankreas og tynntarmen (24). Risikoen for å utvikle kreft dersom en har HNPCC avhenger av hvilke MMR-gener som er mutert.

FAP er en autosomal dominant sykdom, der 80% av pasientene har en mutasjon i adenomatøs polypose coli-genet, APC (25). Pasienter kan utvikle 100-1000 polypper i tarm og rektum i ung alder. Disse er i utgangspunktet godartede, men en eller flere vil gå over til å bli maligne uten behandling (26). Ubehandlet vil de aller fleste pasientene utvikle kreft før de fyller 40 år (25). Behandlingen for denne sykdommen er å fjerne tykktarmen.

KRAS-mutasjoner er vanlige ved kolorektalkreft. Andre mutasjoner forekommer også. Figuren under viser fordelingen av ulike typer mutasjoner hos kolorektalkreftpasienter. Her ser vi at den vanligste formen for mutasjon hos pasienter med kolorektalkreft er missensmutasjon i KRAS-genet.



Figur 11: Fordelingen av ulike type mutasjoner hos 526 pasienter med kolorekalt adenokarsinom. Her kan en se at den vanligste mutasjonen er KRAS-mutasjon, med 42%. Figuren er hentet fra cBioPortal: Colorectal Adenocarcinoma – TCGA, PanCancer Atlas.

Leveren er det organet som oftest får metastaser ved kolorektalkreft. Rundt 50% av kolorektalkreftpasienter vil utvikle fjernmetastaser i lever (27).

Levermetastasene utvikler seg enten samtidig med primærtumoren (synkron spredning) eller seinere i forløpet (metakron spredning). Metastaser som blir oppdaget innen seks måneder etter oppdagelsen av primærtumoren, kategoriseres som synkrone (28).

Per nå er det leverreseksjon som er den beste potensielt kurative behandlingen av levermetastaser. 5 års overlevelse ligger mellom 40 og 60% og 10 års overlevelse ligger mellom 15 og 25% (27). Mer enn 50% av pasientene får tilbakefall innen 2 år etter reseksjon av kolorektale levermetastaser (29).

En rekke studier har sett på betydningen av KRAS-mutasjon hos kolorektalkreftpasienter. Disse pasientene har kortere overlevelse, dårligere respons på kjemoterapi og en høyere andel får tilbakefall med spredning til lunge. (30).

Bestemmelse av KRAS-mutasjonsstatus kan si noe om utfallet av reseksjon av kolorektale metastaser.

Flere studier har sammenlignet KRAS mutasjonsstatus på biopsier fra primærtumorer og metastaser. Disse studiene viser at over 90% av primærtumorene med KRAS-mutasjon også har KRAS-mutasjon i sekundærtumorene. Det vil si at mutasjonen oppstår tidlig i tumorgenese, før metastasering.

Hovedutfordringen ved kolorektale levermetastaser er å selektere ut de pasientene hvor det kan være fordelaktig å gjøre en reseksjon med tanke på overlevelse (31). Tidligere har morfologiske egenskaper ved metastasene vært brukt til å anslå overlevelse (27).

Ikke-småcellet lungekreft

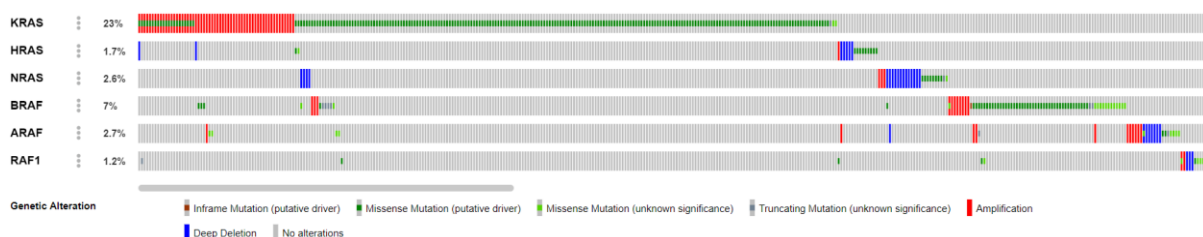
Lungene er en vanlig lokalisasjon for både primær- og sekundærtumorer. I Norge er lungekreft den nest vanligste kreftformen hos menn, og den tredje mest vanlige kreftformen hos kvinner. Lungekreft deles inn i småcellet og ikke-småcellet lungekreft. Småcellet lungekreft består av små celler som ligger nær en hovedbronkie og som sprer seg raskt. Dette er den mest aggressive formen og metastaserer tidlig i utviklingen. Ikke-småcellet lungekreft deles igjen inn i plateepitelkarsinom, adenokarsinom og storcellet karsinom.

Plateepitelkarsinom utvikler seg vanligvis fra epitelets overflate i bronkiene, men kan sees i hele bronkialtreet. Adenokarsinomer utvikler seg fra kjertler, perifert i lungen. Pasienter med adenokarsinomer vil derfor være mindre symptomatiske, og sykdommen oppdages ofte sent i

forløpet. Storcellede karsinomer sees ofte perifert i lungen og består av store, udifferensierte celler som vokser fort og metastaserer tidlig i forløpet (21). Småcellet lungekreft kan sjeldent behandles med kirurgi, da kreften sprer seg fort. Cellegift kombinert med strålebehandling er behandlingsformen som benyttes. Ikke-småcellet lungekreft behandles med kirurgi hvis dette er mulig. Da fjernes lungelappen tumoren sitter i, eventuelt hele lungen. Dersom kirurgi ikke lar seg gjøre på grunn av for stor spredning, får pasienten strålebehandling, medikamentell behandling eller en kombinasjon av disse (32).

Røyking er årsaken til de aller fleste tilfeller av lungekreft. I tillegg er andre stoffer som inhaleres risikofaktorer. Dette er blant annet radon, asbest og farlige stoffer på arbeidsplasser som maling, diesel- og trafikkforurensing, nikkel, krom og silisium. Også passiv røyking kan bidra til utvikling av lungekreft. I tillegg er den generelle helsetilstanden av betydning. Dette innebærer å unngå overvekt, fedme, høyt alkoholforbruk og inntak av rødt og bearbeidet kjøtt.

De to vanligste genene som er muterte ved ikke-småcellet lungekreft er epitelial vekstfaktorreseptor, EGFR, og RAS. EGFR-mutasjoner er mer vanlig å finne hos pasienter som ikke har røyket, mens KRAS-mutasjoner sees ofte hos røykere. Noen punktmutasjoner er vanligere hos røykere enn hos ikke-røykere. En ser at $G \rightarrow A$ mutasjon er vanlig hos ikke-røykere, mens $G \rightarrow T$ og $G \rightarrow C$ er vanligere hos røykere. Slik som ved kolorektalkreft med KRAS-mutasjon, har flere studier vist at KRAS-mutasjon ved ikke-småcellet lungekarsinom gir dårligere overlevelsesrate enn villtype KRAS (25 sammenlignet med 42 måneders overlevelse) (33). Figuren under viser fordelingen mellom mutasjoner i ulike gener hos pasienter med pan-lungekreft, en type ikke-småcellet lungekreft.



Figur 12: Fordelingen av ulike genmutasjoner hos 1144 pasienter med pan-lungekreft. Her kan en se at mutasjon i KRAS-genet er den hyppigste formen for mutasjon med 23%. Figuren er hentet fra cBioPortal: Pan-Lung Cancer – TCGA, Nat Genet 2016.

Duktalt adenokarsinom i pankreas

Duktalt adenokarsinom i pankreas er den vanligste formen for bukspyttkjertelkreft og utgår fra eksokrine kjertler (34). I Norge får ca. 700 pasienter påvist denne formen for pankreaskreft årlig (35). Tumorer som utvikler seg i hodet av pankreas (*caput pancreatis*) fører vanligvis til obstruksjon av galle og bukspytt. Dette fører til vekttap og gulsott som tidlige symptomer. Tumorer i kroppen (*corpus pancreatis*) eller halen (*cauda pancreatis*) av pankreas vil være asymptomatisk fram til det involverer omkringliggende strukturer som lever, mage, lymfeknuter, bukvegg og nerver. Kreft i pankreas har dårlige prognoser og kan kun kureres dersom den diagnostiseres tidlig og kan fjernes kirurgisk. Risikofaktorer for utvikling av pankreaskreft er røyking, pankreatitt og kosthold (21). KRAS er det vanligste genet som er mutert hos pasienter med duktalt adenokarsinom i pankreas. I figuren under ser vi at av 383 pasienter har 90% KRAS-mutasjon.



Figur 13: Fordelingen av ulike genmutasjoner hos 383 pasienter med duktalt adenokarsinom i pankreas. Her kan en se at KRAS-mutasjon er den absolutt vanligste formen for mutasjon med hele 90%. Figuren er hentet fra cBioPortal: Pancreatic Adenocarcinoma – QCMG, Nature 2016.

Diagnostikk av KRAS

Tidligere ble antall metastaser og størrelsene på disse benyttet for å avgjøre sjansen for tilbakefall av metastaserende kolorektalkreft. Dette er ikke nok for å forutse prognose. Nå benyttes også biomarkører for å anslå prognose, bestemme behandling og avgjøre hvilke pasienter som skal opereres (29). Pålitelige biomarkører er nødvendige for å bestemme behandling av kolorektalkreft. I tillegg er de nyttige for å kunne overvåke terapeutisk respons og for å oppdage tilbakefall. Karsinoembryonalt antigen, CEA, er den viktigste kreftmarkøren som benyttes i dag. I tillegg blir noen pasienter sjekket for ulike mutasjoner, som kan ha betydning for å anslå prognose og for å kunne gi riktig behandling.

Tumorer med mutert KRAS er resistente mot anti-EGFR-behandling, slik som cetuximab og panitumumab. Pasienter blir derfor screenet for KRAS-mutasjon, og kun pasienter med villtype KRAS får anti-EGFR-behandling (36).

Når mutasjon i KRAS skal kartlegges brukes biopsier tatt fra pasientens tumor. Testing av KRAS-mutasjon gjøres på pasienter med kolorektal-, tyroid-, endometrie-, pankreas- og ikke-småcellet lungekreft. Det gjøres i hovedsak på pasienter som har høystadium tumorer.

Dersom pasienten har metastaser er det viktig at testen gjøres på en metastatisk lesjon fremfor primærtumoren (37). Biopsien har blitt formalinfiksert og vurdert av patolog på forhånd, slik at en vet at materialet er egnet. Deretter isoleres DNA fra biopsien. Dette gjøres ved lage et snitt av parafinblokken og benytte sentrifugering med xylene og alkohol, for deretter å tilsette proteinase K som vil lysere andre proteiner i prøven (38). Det isolerte DNAet blir så amplifisert ved hjelp av mutasjonsspesifikk realtime-PCR for ekson 2, 3 og 4 (39). Det er i disse eksonene mutasjonene ligger.

Det er flere utfordringer knyttet til testing av KRAS-mutasjon. Det kan være kryssbindinger mellom ulike biomolekyler som kan gjøre amplifisering vanskelig, spesielt ved lengre DNA-sekvenser. De aller fleste kreftceller med mutert KRAS har bare mutasjon i det ene allelet og inneholder derfor både mutert og villtype KRAS. I tillegg kan tumorvevet inneholde en høy andel benigne stromaceller, slik at villtype KRAS-sekvenser vil tynne ut mulig mutert DNA ytterligere. Dette gjelder spesielt etter kjemoterapi, da antallet tumorceller kan være svært lavt. Det samme gjelder dersom tumoren er liten og normalvev utgjør mye av biopsien. Alle disse forholdene vil bidra til å tynne ut mutert KRAS DNA. På grunn av disse utfordringene er det viktig at metoden som benyttes har best mulig spesifisitet og sensitivitet. Falskt positive eller negative svar vil også kunne ha betydelig innvirkning på pasienten (37).

KRAS og behandling

KRAS-mutasjoner er en vanlig mutasjon i flere krefttyper. Derfor vil medisiner som direkte inhiberer mutert KRAS bety mye for behandlingen av pasienter. Det finnes enda ingen godkjente medisiner mot KRAS-mutasjoner (10). KRAS har vist seg å være svært vanskelig å inhibere. Dette skyldes at det på overflaten av KRAS er mangel på lommer, utenom GTP lommen. Her vil GTP bindes med svært høy affinitet til KRAS. Å finne stoffer som kan erstatte GTP blir derfor svært vanskelig. Medisiner som kan inhibere KRAS i denne lommen

ses derfor ikke på som en mulighet. Flere forskningsgrupper har jobbet og jobber med problemet. Det er for tiden flere medisiner til utprøving. Flere av disse virker kun på mutasjonen G12C (40).

Mye forskning dreier seg i dag om å finne og binde opp lommer på KRAS gjennom kovalente bindinger. Imidlertid frykter man sterke bivirkninger, grunnet de irreversible bindingene som skapes og som kanskje også kan forstyrre aktiviteten til villtype KRAS. Men man har sett på andre medikamenter at den toksiske effekten kan kontrolleres. Som for eksempel hos EGFR-inhibitoren afatinib (40).

Det finnes en lomme mellom switch I og II regionene hos KRAS, som lenge har blitt sett på som ikke medisinerbar (10). Klarer man å danne et stoff som fester seg i denne lommen vil både aktiv og inaktiv form av KRAS bli inhibert i noen grad. Det er funnet et stoff som kalles BI-2852, som kan feste seg i lommen og påvirke ekstracellulært signalregulert kinase, pERK, og protein kinase B, PKB. Dette vil gi en antiproliferativ effekt på mutert KRAS. Virkningen er ikke sterk nok til å benyttes som behandling. Men håpet er at denne skal utvikles videre for å skape sterkere medisiner (10).

KRAS kan inhiberes direkte på andre måter enn å binde opp lommer på molekylet. RNA-interferens kan benyttes for å fortrenge KRAS-proteinekspresjon. Mutasjonsspesifikke molekyler kan benyttes. Disse binder seg irreversibelt til ulike missens mutasjoner av KRAS. Det er også gjort forsøk på å nøytralisere KRAS-proteinet med en anti-RAS vaksine. Vaksinen består av RAS-peptider av ulik lengde og med ulike mutasjoner på aminosyrenivå.

Andre taktikker enn direkte inhibering er avbrudd i RAS sin plassering på membranen. Dette gjøres for at mutert KRAS ikke skal nå membranen. Da vil de videre proteinkjedene ikke bli påvirket av mutasjonen. KRAS farnesyleres før det fraktes til membranen gjennom endoplasmatisk retikulum og golgiapparatet. Farnesyltransferase-inhibitorer kan påvirke denne prosessen. En annen taktikk er å stanse den videre prosessen i proteinkjedene. KRAS vil aktivere proteiner videre i flere kjeder. Blant annet MAPK-veien og PI3K-veien. Klarer man å hemme videre aktivitet i disse veiene, vil dette være positivt for kreftforløpet. Mange av disse metodene forskes på for øyeblikket, men ingen benyttes i klinikken (16).

KRAS-mutasjon vil føre til at mange behandlinger som benyttes ikke har effekt. Hos pasienter med tykktarmskreft kan EGFR-inhibitorer benyttes for noen pasienter. Da får pasientene humant antistoff mot EGFR reseptorene. Om krefttilfellet er uten KRAS-mutasjon vil EGFR-inhibitorer stanse signaliseringen i MAPK-veien, ved at de binder opp EGFR. Det

er bevist at pasienter med KRAS-mutasjon i lunge eller tykktarmskreft ikke responderer på denne behandlingen. Da vil pasientene med tykktarmskreft ikke ha nytte av å få EGFR-inhibitorene panitumumab eller cetuximab (36). Hos pasienter med ikke-småcellet lungekreft er de to vanligste onkogene mutasjonene i KRAS og mutasjon i EGFR. Dersom kreften har EGFR-mutasjon finnes det inhibitorer mot disse. EGFR-inhibitorene som benyttes mot dette er gefitinib og erlotinib. Har pasienten derimot KRAS-mutasjon med eller uten EGFR-mutasjon vil ikke behandlingen ha effekt (33).

Konklusjon

Per dags dato finnes det ingen behandling direkte rettet mot KRAS-mutasjon. Dette er et problem ettersom mutasjon i KRAS er en av de vanligste mutasjonene hos kreftpasienter. Allikevel testes mange kreftpasienter for ulike typer KRAS-mutasjoner. En annen type mutasjon som er vanlig er mutasjon i EGFR. Pasienter med denne type mutasjon kan ha god effekt av EGFR-inhibitorer. Dette er ikke tilfellet for pasienter med KRAS-mutasjon. Det er derfor viktig å kartlegge mutasjonsstatus hos kreftpasienter slik at man unngår å gi ineffektiv behandling. Unødvendige behandlinger gir uønskede bivirkninger og er kostbare uten at de gir bedring. Mutasjonsstatus til KRAS er også viktig å fastslå siden KRAS-mutasjon i mange tilfeller gir dårligere prognose enn mutasjoner i andre gen. I tillegg vet vi at noen typer KRAS-mutasjoner vil gi dårligere prognose enn andre. Ny teknologi og basal kunnskap om cellesignalisering gjør det nå mulig å utvikle persontilpasset kreftdiagnostikk og -behandling basert på KRAS-status.

Referanser

1. Kreft er nå hyppigste dødsårsak i Norge [Internett]. Folkehelseinstituttet. [sitert 20. april 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.fhi.no/nyheter/2018/dodsarsakene-2017/>
2. Papke B, Der CJ. Drugging RAS: Know the enemy. *Science*. 17. mars 2017;355(6330):1158–63.
3. Bruce. Alberts. *Essential cell biology*. 4th ed. New York: Garland Science; 2014. 112 s.
4. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJC. The colorectal adenoma–carcinoma sequence. *BJS Br J Surg*. 2002;89(7):845–60.
5. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 7. januar 2000;100(1):57–70.
6. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 4. mars 2011;144(5):646–74.
7. Sporn MB. The War on Cancer. [sitert 13. april 2020]; Tilgjengelig på: [https://www.thelancet.com/pdfs/journals/lancet/PIIS0140-6736\(96\)91015-6.pdf](https://www.thelancet.com/pdfs/journals/lancet/PIIS0140-6736(96)91015-6.pdf)
8. Lim W, Mayer B, Pawson T. *Cell Signaling: principles and mechanisms*. Garland Science; 2015.
9. Mai TT, Lito P. A treatment strategy for KRAS-driven tumors. *Nat Med*. juli 2018;24(7):902–4.
10. Kessler D, Gmachl M, Mantoulidis A, Martin LJ, Zoephel A, Mayer M, mfl. Drugging an undruggable pocket on KRAS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 6. august 2019;116(32):15823–9.
11. Jonckheere N, Vasseur R, Van Seuning I. The cornerstone K-RAS mutation in pancreatic adenocarcinoma: From cell signaling network, target genes, biological processes to therapeutic targeting. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1. mars 2017;111:7–19.
12. Lowy DR, Willumsen BM. Function and Regulation of Ras. *Annu Rev Biochem*. 1993;62(1):851–91.
13. Chakrabarti M, Jang H, Nussinov R. Comparison of the Conformations of KRAS Isoforms, K-Ras4A and K-Ras4B, Points to Similarities and Significant Differences. *J Phys Chem B*. 4. februar 2016;120(4):667–79.
14. Amendola CR, Mahaffey JP, Parker SJ, Ahearn IM, Chen W-C, Zhou M, mfl. KRAS4A directly regulates hexokinase 1. *Nature*. desember 2019;576(7787):482–6.
15. Jinesh GG, Sambandam V, Vijayaraghavan S, Balaji K, Mukherjee S. Molecular genetics and cellular events of K-Ras-driven tumorigenesis. *Oncogene*. februar 2018;37(7):839–46.
16. Buscail L, Bournet B, Cordelier P. Role of oncogenic KRAS in the diagnosis, prognosis and treatment of pancreatic cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. mars 2020;17(3):153–68.

17. Haigis KM. KRAS Alleles: The Devil Is In The Detail. *Trends Cancer*. oktober 2017;3(10):686–97.
18. Jančík S, Drábek J, Radzioch D, Hajdúch M. Clinical Relevance of KRAS in Human Cancers. *J Biomed Biotechnol* [Internett]. 2010 [sitert 31. mars 2020];2010. Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2896632/>
19. Bretthauer M, Hoff G. Forebygging og tidlig diagnostikk av kolorektal kreft. *Tidsskr Den Nor Legeforening* [Internett]. 18. oktober 2007 [sitert 5. april 2020]; Tilgjengelig på: <https://tidsskriftet.no/2007/10/tema-kolorektal-kreft/forebygging-og-tidlig-diagnostikk-av-kolorektal-kreft>
20. Kreftregisteret. *Cancer in Norway 2018* [Internett]. 2018 [sitert 23. april 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.kreftregisteret.no/globalassets/cancer-in-norway/2018/cin2018.pdf>
21. Karin C. VanMeter, Robert J. Hubert. *Gould's pathophysiology for the health professions*. 5th ed. St Louis, Mo: Elsevier Saunders; 2014. xix+694.
22. Kreftforeningen. *Tarmkreft* [Internett]. Kreftforeningen. [sitert 5. april 2020]. Tilgjengelig på: <https://kreftforeningen.no/om-kreft/kreftformer/tarmkreft/>
23. Vasen HFA, Blanco I, Aktan-Collan K, Gopie JP, Alonso A, Aretz S, mfl. Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts. *Gut*. 1. juni 2013;62(6):812–23.
24. Lagerstedt Robinson K, Liu T, Vandrovcova J, Halvarsson B, Clendenning M, Frebourg T, mfl. Lynch Syndrome (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer) Diagnostics. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 21. februar 2007;99(4):291–9.
25. Weitz J, Koch M, Debus J, Höhler T, Galle PR, Büchler MW. Colorectal cancer. *The Lancet*. 8. januar 2005;365(9454):153–65.
26. FAMILIÆR ADENOMATØS POLYPOSE [Internett]. [sitert 6. april 2020]. Tilgjengelig på: https://www.kreftregisteret.no/contentassets/89859b0db12c4998b92bd0f1c5723b94/informasjonsbrosjyre_polypose_2013-bokmaal.pdf
27. Margonis GA, Sasaki K, Kim Y, Samaha M, Buettner S, Amini N, mfl. Tumor Biology Rather Than Surgical Technique Dictates Prognosis in Colorectal Cancer Liver Metastases. *J Gastrointest Surg*. november 2016;20(11):1821–9.
28. Bjørnbeth., *Behandling av levermetastaser fra koloncancer (LM)* [Internett]. Tilgjengelig på: <https://kirurgen.no/fagstoff/gastrokirurgi/behandling-av-levermetastaser-fra-koloncancer-lm/>
29. Yamashita S, Chun YS, Kopetz SE, Vauthey J-N. Biomarkers in colorectal liver metastases. *BJS Br J Surg*. 2018;105(6):618–27.
30. Denbo JW, Yamashita S, Passot G, Egger M, Chun YS, Kopetz SE, mfl. RAS Mutation Is Associated with Decreased Survival in Patients Undergoing Repeat Hepatectomy for Colorectal Liver Metastases. *J Gastrointest Surg*. januar 2017;21(1):68–77.

31. Brudvik KW, Kopetz SE, Li L, Conrad C, Aloia TA, Vauthey J-N. Meta-analysis of KRAS mutations and survival after resection of colorectal liver metastases. *BJS Br J Surg*. 2015;102(10):1175–83.
32. Kreftforeningen. Lungekreft [Internett]. [sitert 23. april 2020]. Tilgjengelig på: <https://kreftforeningen.no/om-kreft/kreftformer/lungekreft/>
33. Riely GJ, Marks J, Pao W. KRAS Mutations in Non–Small Cell Lung Cancer. *Proc Am Thorac Soc*. 15. april 2009;6(2):201–5.
34. Oslo universitetssykehus HF. Kreft i bukspyttkjertel [Internett]. 2020 [sitert 23. april 2020]. Tilgjengelig på: <http://oncolex.no/Bukspyttkjertel>
35. Buanes T. Utsiktene ved pancreaskreft – bedre enn fryktet. *Tidsskr Den Nor Legeforening* [Internett]. 10. januar 2012 [sitert 20. april 2020]; Tilgjengelig på: <https://tidsskriftet.no/2012/01/leder/utsiktene-ved-pancreaskreft-bedre-enn-fryktet>
36. Beganoyic S. CLINICAL SIGNIFICANCE OF THE KRAS MUTATION. *Bosn J Basic Med Sci*. oktober 2009;9(Suppl 1):S17–20.
37. Shackelford RE, Whitling NA, McNab P, Japa S, Coppola D. KRAS Testing. *Genes Cancer*. juli 2012;3(7–8):459–66.
38. Furre T. Metode; DNA-isolering FFPE vev, MolPat Lab. :7.
39. Furre T. PCR - KRAS/ BRAF/ NRAS mutasjonsanalyse, MolPat Lab. :8.
40. Mullard A. Cracking KRAS. *Nat Rev Drug Discov*. 12. november 2019;18(12):887–.

