

XÁC ĐỊNH ĐỘT BIẾN GEN *KRAS* Ở BỆNH NHÂN UNG THƯ ĐẠI TRỰC TRÀNG TẠI VIỆT NAM

Nguyễn Thị Kim Liên¹, Hồ Quang Huy², Nguyễn Huy Hoàng¹

¹Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Trường Đại học Y Hà Nội

Ngày nhận bài: 23.10.2014

Ngày nhận đăng: 04.12.2014

TÓM TẮT

Ung thư đại tràng (Colorectal cancer – CRC) là loại ung thư phổ biến và có tỷ lệ tử vong cao thứ ba trên thế giới và Việt Nam, tỷ lệ mắc bệnh đang có xu hướng tăng lên. Liệu pháp điều trị bằng phân tử đích với chất ức chế thụ thể yếu tố tăng trưởng thượng bì (epidermal growth factor receptor - EGFR) đang trở thành một phần không thể thiếu được trong quá trình kiểm soát sự tiến triển của bệnh. Đột biến gen *KRAS* là nguyên nhân chính của tính kháng với chất ức chế thụ thể EGFR trong điều trị ung thư đại trực tràng. Trong nghiên cứu này, các đột biến trên exon 2, 3, 4 của gen *KRAS* ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng được xác định bằng phương pháp giải trình tự trực tiếp từ sản phẩm PCR. Kết quả nghiên cứu chưa xác định được các đột biến được cho là có ảnh hưởng đến hiệu quả điều trị đã được công bố. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này đã xác định được các đột biến M67V trên bệnh nhân KR10, 11, 12, 14, 15, 17, đột biến V103D ở bệnh nhân KR7 và đột biến M111K ở bệnh nhân KR7, 9. Nghiên cứu cấu trúc không gian của protein *KRAS* ở các vị trí đột biến cho thấy đột biến M67V và V103D đã làm thay đổi hình dạng không gian của protein *KRAS* tại các vị trí này. Vì vậy, cần có những nghiên cứu thêm về ảnh hưởng của các đột biến này lên đáp ứng điều trị ở bệnh nhân ung thư.

Từ khóa: đột biến gen *KRAS*, ung thư đại trực tràng, đáp ứng điều trị, chất ức chế thụ thể

MỞ ĐẦU

Gen *KRAS* (Kirsten ras sarcoma viral oncogene) là một gen nằm trên nhiễm sắc thể 12 ở người, mã hóa cho protein *KRAS* của con đường truyền tín hiệu MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Vogelstein *et al.*, 1988). *KRAS* là một GTPase (GTP-binding P-loopase) nhỏ gồm 188 hoặc 189 amino acid, đóng vai trò chìa khóa trong việc truyền tín hiệu ngoại bào (Bos, 1989) và có ảnh hưởng lớn đến đáp ứng với liệu pháp điều trị của bệnh nhân ung thư. Đột biến trên *KRAS* liên quan đến nhiều loại bệnh ung thư và được xác định là xảy ra với tần suất 17 – 25% ở tất cả các loại ung thư (Arrington *et al.*, 2012). Tuy nhiên, tần suất này thay đổi ở mỗi loại bệnh ung thư bao gồm: 36% bệnh nhân ung thư đại trực tràng, 20% bệnh nhân ung thư phổi và 65 – 100% bệnh nhân ung thư tuyến tụy (Rapont *et al.*, 2008). Theo Wicki và đồng tác giả (2010), tỷ lệ này được xác định là 30 – 60% bệnh nhân ung thư đại trực tràng, 60% bệnh nhân ung thư tuyến tụy, 33% bệnh nhân ung thư mật, 17% bệnh nhân ung thư buồng trứng, 15% bệnh nhân ung thư màng trong dạ con và 30 – 40% bệnh nhân ung thư phổi các loại.

Gần 90% đột biến làm mất hoạt tính của protein *KRAS* là đột biến tại codon 12 – 13 và 5% là đột biến tại codon 61 trên gen *KRAS* (Andreyev *et al.*, 1998; Bos *et al.*, 1987). Ở bệnh nhân người Hà Lan 37% đột biến xảy ra ở codon 12 và 13, ngoài ra còn có 6,6% đột biến xảy ra ở các codon 8, 9, 10, 15, 16, 19, 20 hoặc 25 (Brink *et al.*, 2003). Đột biến tại codon 15, 16, 18 và 31 trên gen *KRAS* đã được phát hiện ở một số bệnh nhân bị u vú thượng thận (Lin *et al.*, 1998). Edkins và đồng tác giả (2006), nghiên cứu trên 126 mô và 40 dòng tế bào ung thư đại trực tràng nuôi cấy đã xác định được đột biến A146T trên 4% mô và dòng tế bào nghiên cứu. Đột biến *KRAS* được tìm thấy trên 30 – 40% bệnh nhân ung thư đại tràng không có đáp ứng với liệu pháp điều trị, vì vậy việc xác định yếu tố di truyền quyết định tính kháng với liệu pháp sử dụng chất ức chế thụ thể EGFR (epidermal growth factor receptor) là rất quan trọng (Palmirotta *et al.*, 2009). Amino acid 12 và 13 là vị trí vòng gắn GTP và amino acid 61 nằm trên vùng switch-II (Wicki *et al.*, 2010). Đột biến điểm ở codon 12 và 13 được xác định là gây ra đáp ứng thấp với việc điều trị bằng cetuximab (chất ức chế thụ thể EGFR) và panitumumab (kháng thể đơn dòng đặc trưng EGFR) ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng

(Santini *et al.*, 2008; Chretien *et al.*, 2012). Vì vậy, đột biến điểm trên *KRAS* được sử dụng như một marker cho việc dự báo điều trị hiệu quả với chất ức chế thụ thể EGFR.

Việt Nam là một trong những nước có tỷ lệ ung thư nhiều nhất thế giới. Mỗi năm cả nước có thêm khoảng 150.000 ca mắc mới các bệnh ung thư và 75.000 ca tử vong do ung thư, đứng thứ hai chỉ sau bệnh tim mạch (Hiệp hội ung thư Việt Nam). Năm loại ung thư hàng đầu ở nam giới là ung thư phổi, gan, đại trực tràng, dạ dày và vòm hầu (chiếm 58%); còn ở nữ giới là ung thư vú, cổ tử cung, đại trực tràng, phổi và tuyến giáp (chiếm 63%). Đặc biệt, ở nữ giới có sự gia tăng tỉ lệ ung thư vú, đại trực tràng và tuyến giáp (www.bachmai.gov.vn). Như vậy, ở Việt Nam ung thư đại trực tràng cũng được xếp đứng thứ ba ở cả nam và nữ. Tuy nhiên, ở Việt Nam các nghiên cứu về di truyền các gen liên quan đến việc kiểm soát ung thư ở người bệnh còn hạn chế. Trong nghiên cứu này, chúng tôi xác định các đột biến có ảnh hưởng đến sự đáp ứng của bệnh nhân đối với liệu pháp sử dụng giúp cho quá trình điều trị có hiệu quả hơn.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Mẫu máu của các bệnh nhân ung thư đại trực tràng được thu thập từ các Bệnh viện Đại học Y Hà Nội và Bệnh viện Hóc Nhài, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội là KR1, 2, 3, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17.

Các mẫu máu được bảo quản ở -20°C, sau đó DNA được tách chiết bằng kit tách DNA từ máu (Gene JET whole blood genomic DNA purification mini kit) của hãng Thermo (EU - Lithuania) các bước tiến hành được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng của bộ kit.

Phản ứng PCR nhân đoạn exon được thực hiện theo công bố của Chang *et al.*, (2010), Loupakis *et al.*, (2009) với các cặp mồi

KRAS2F 5'-ACACGCTGTGCAACTGG-3',
KRAS2R 5'-TAACTTCAAACCAAGGTAC-3'
(nhân đoạn 445bp); KRAS3F 5'-
GCACGTGAATAATCCAGACT-3', KRAS3R 5'-
CATGGCATTAGCAAAGACTC-3' (nhân đoạn
297bp) và cặp mồi KRAS4F 5'-
TGGACAGGTTTGAAGATATTG-3',
KRAS4R 5'-
ATTAAGAAGCAATGCCCTCTCAAG-3' (nhân
đoạn 375bp).

Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự trực tiếp trên máy giải trình tự ABI 3100 Bio System (Mỹ) theo phương pháp của Sanger *et al.*, (1977).

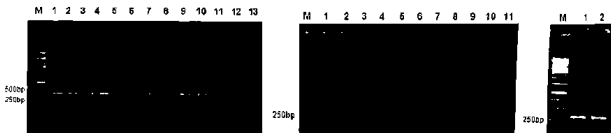
Kết quả giải trình tự được so sánh với trình tự exon của gen *KRAS* chuẩn ở người trên Ensembl mã số ENSG00000133703 bằng phần mềm BioEdit (www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html) để xác định các đột biến.

Ảnh hưởng của các đột biến lên cấu trúc protein *KRAS* được phân tích bằng phần mềm MSViewerLite (<http://viewerlite.software.informer.com/>) và SPDBV (www.spdbv.vital-it.ch/download.html).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả PCR nhân đoạn exon trên gen *KRAS*

Trong nghiên cứu này, mẫu máu của 14 bệnh nhân ung thư đại trực tràng đã được thu thập từ các Bệnh viện Hóc Nhài, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội. Các mẫu máu được tách chiết theo hướng dẫn của bộ kit tách chiết DNA từ máu (Gene JET whole blood genomic DNA purification mini kit) của hãng Thermo và được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8%. Kết quả điện di DNA tổng số cho thấy các mẫu DNA đều đạt chất lượng và số lượng cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR nhân đoạn exon 2, 3, 4 ở các bệnh nhân ung thư đại trực tràng. A. Sản phẩm PCR nhân đoạn exon 2. B. Sản phẩm PCR nhân đoạn exon 3. C. Sản phẩm PCR nhân đoạn exon 4

DNA tổng số từ mẫu máu của các bệnh nhân ung thư đại trực tràng được sử dụng làm khuôn để nhân đoạn exon trên gen *KRAS*. Các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu được tham khảo từ công bố của Chang *et al.*, (2010), Loupakis *et al.*, (2009) để nhân các đoạn exon 2, 3, 4 có kích thước tương ứng là 445bp, 297bp và 375bp. Kết quả điện di sản phẩm PCR cho phân ứng nhân đoạn các exon được thể hiện trên hình 1.

Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy các đoạn exon 2, 3, 4 có kích thước đúng như dự kiến. Sản phẩm PCR có sự đặc hiệu cao, các băng điện di gọn và sắc nét cho thấy sản phẩm PCR có chất lượng, số lượng để tiến hành tinh sạch và giải trình tự.

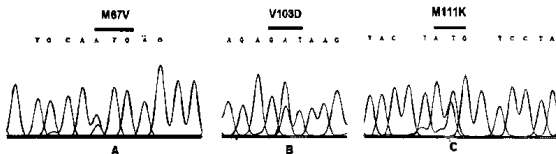
Kết quả phân tích trình tự

Theo các nghiên cứu trước đây, việc đáp ứng với từng liệu pháp điều trị phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố trong bản thân mỗi người bệnh. Lievre *et al.*, (2006) là nhóm tác giả đầu tiên công bố về mối liên hệ giữa đột biến trên *KRAS* và sự không đáp ứng với chất ức chế thụ thể EGFR ở người bệnh ung thư đại tràng. Đột biến trên *KRAS* được cho là nguyên nhân chính gây ra tính kháng với chất ức chế thụ thể EGFR ở bệnh nhân ung thư đại tràng (Molinari *et al.*, 2011). Những công bố khác cho thấy đột biến điểm ở codon 12 và 13 trên *KRAS* được xác định là gây ra đáp ứng thấp với việc điều trị bằng cetuximab và panitumumab ở bệnh nhân ung thư đại tràng (Santini *et al.*, 2008; Chretien *et al.*, 2012). Loupakis *et al.*, (2009) nhận thấy những bệnh nhân mang đột biến tại codon 61 và 146 trên *KRAS* cũng có tính kháng với chất ức chế thụ thể EGFR như bệnh nhân mang đột biến tại codon 12 và 13. Janakiraman *et al.*, (2010) lại nhận thấy đột biến tại codon 117 và 146 trên gen *KRAS* xảy ra khá phổ biến và cho dự báo việc điều trị khả quan hơn đối với bệnh nhân ung thư đại tràng. Vì vậy, phân tích đột biến là điều kiện bắt buộc trước khi điều trị để có được hướng điều trị hiệu quả cho bệnh nhân.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành xác định các đột biến ở exon 2, 3, 4 trên gen *KRAS* ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng nhằm đưa ra hướng điều trị hiệu quả cho bệnh nhân. Sản phẩm PCR nhân đoạn exon được tinh sạch và giải trình tự trực tiếp trên máy giải trình tự tự động ABI 3100 Bio System (Mỹ). Kết quả giải trình tự được so sánh với trình tự exon của gen *KRAS* chuẩn ở người trên Ensembl mã số ENSG00000133703 bằng phần mềm BioEdit để xác định các đột biến.

Theo (Smith *et al.*, 2002; Amado *et al.*, 2008) tỷ lệ xảy ra đột biến trên gen *KRAS* ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng là 30 – 40%. Trong nghiên cứu này, kết quả so sánh trình tự cho thấy trong số 14 bệnh nhân nghiên cứu có sáu bệnh nhân (KR10, 11, 12, 14, 15, 17) mang đột biến M67V; một bệnh nhân KR7 mang đột biến V103D; hai bệnh nhân KR7, 9 mang đột biến M111K (Hình 2) chiếm tỷ lệ 57%.

Ở các bệnh nhân tham gia trong nghiên cứu chưa xác định được các đột biến ảnh hưởng đến hiệu quả điều trị như đã công bố trong các nghiên cứu trước đây tại các vị trí codon 12, 13, 61, 146. Kết quả này có thể là do số lượng bệnh nhân tham gia vào nghiên cứu còn chưa nhiều. Tuy nhiên, kết quả này cũng phù hợp với (Ren *et al.*, 2012) khi nghiên cứu trên 4687 bệnh nhân ung thư đại trực tràng đã phát hiện được khoảng 29% bệnh nhân mang đột biến tại codon 12, 13 và chỉ phát hiện được một bệnh nhân mang đột biến tại codon 61. Đột biến tại codon 61, 146 hoặc 154 được xác định chiếm 1% ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng (Forbes *et al.*, 2006). Bên cạnh đó (Janakiraman *et al.*, 2010) cũng đã xác định được các đột biến tại các vị trí khác nhau Q22K, E31K và K117N trên *KRAS* ở các bệnh nhân ung thư đại trực tràng. Tuy nhiên, ảnh hưởng của các đột biến này lên khả năng đáp ứng điều trị của bệnh nhân chưa được nghiên cứu.



Hình 2. Đột biến ở các bệnh nhân ung thư đại trực tràng. A: Đột biến di hợp từ M67V ở bệnh nhân KR10, 11, 12, 14, 15, 17. B: Đột biến di hợp từ V103D ở bệnh nhân KR7. C: Đột biến di hợp từ M111K ở bệnh nhân KR7, 9.

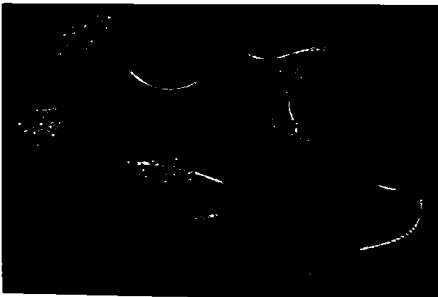
Kết quả phân tích cấu trúc 3D

Người ta đã xác định được bốn vùng trên RAS protein: Vùng thứ nhất bao gồm 85 amino acid ở đầu N hình thành nên ba dạng của họ RAS protein (KRAS, NRAS và HRAS). Vùng thứ hai bao gồm 80 amino acid có sự tương đồng về trình tự thấp hơn (70 – 80%). Những vùng này rất quan trọng trong chức năng truyền tín hiệu của protein KRAS và hình thành nên vùng G-domain (amino acid 1 – 165). Vùng G-domain của protein KRAS gồm vùng liên kết GTP, ở đó các vòng liên kết P-loop-phosphate (amino acid 10 – 16 và 56 – 59) phản ứng với b-phosphate và c-phosphate của GTP. Vùng 116 – 119 và 152 – 165 phản ứng với base guanine. Vị trí M67 và V103 nằm trên vùng xoắn α helicase B và C của cấu trúc phân tử protein KRAS (Hình 3).

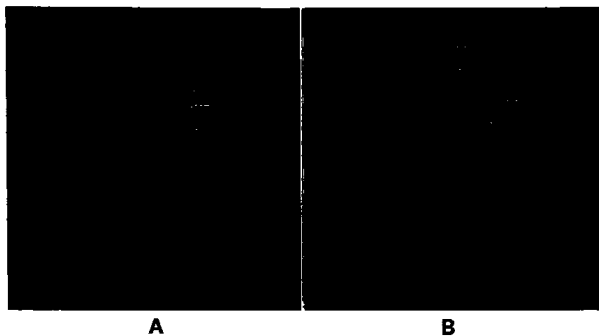
Phân tích ảnh hưởng của các đột biến lên cấu trúc 3D của phân tử protein KRAS cho thấy các đột biến M67V, V103D đã làm thay đổi đáng kể cấu trúc không gian của protein KRAS tại các vị trí này (Hình 4, 5, 6). Đặc biệt, đột biến tại vị trí M67V đã làm xuất hiện thêm một cầu nối hydro với amino acid tại vị trí 65 (Hình 4B).

Nghiên cứu của Jancik *et al.*, (2010) cho thấy, đột biến kích hoạt trên gen KRAS làm mất chức năng bật tắt từ chế độ hoạt động sang chế độ bất hoạt của protein KRAS, dẫn đến làm thay đổi tế bào và làm tăng khả năng kháng với liệu pháp hóa học và liệu pháp điều trị đích với chất ức chế thụ thể EGFR. Protein KRAS duy trì sự bất hoạt cho

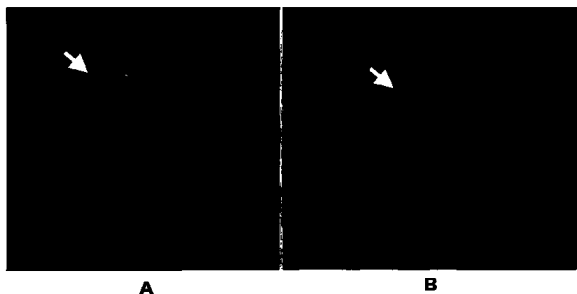
đến khi nó liên kết với GTP. Sự bật tắt từ trạng thái bất hoạt sang trạng thái hoạt động được điều hòa bởi các tín hiệu nội bào. Khi GTP được gắn vào protein KRAS, làm biến đổi hình dạng ở hai vùng đặc biệt của protein KRAS khiến nó chuyển sang trạng thái hoạt động. Đây là hai vùng rất quan trọng được biết đến như là vùng "Switch I" (amino acid 30 – 38) và vùng "Switch II" (amino acid 59 – 67), hình thành nên vòng phản ứng lại kích thích, điều khiển bởi đặc trưng liên kết của GTPase với phần tử kích thích phản ứng của nó. Vùng "Switch I và II" đóng vai trò quan trọng trong liên kết của yếu tố điều hòa và yếu tố ảnh hưởng (Lopez-Alcala *et al.*, 2008). Sự thay đổi hình dạng của protein KRAS ảnh hưởng đến phản ứng của nó với các protein có hoạt tính GTPase (GTPase-activating proteins - GAPs) làm tăng hoạt tính GTPase của phân tử RAS protein lên 100 000 lần (Gideon *et al.*, 1992). Sự thay đổi hình dạng cũng ảnh hưởng đến phản ứng với các yếu tố guanine - exchanging/releasing (GEFs/GRFs) đẩy mạnh sự giải phóng GTP. Protein KRAS cũng có bản chất GTPase được kích thích bởi GAPs và hoạt động như một đồng hồ bấm giờ liên quan tới phản ứng trực tiếp với các yếu tố ảnh hưởng (Giglione *et al.*, 1997). Các đột biến bất thường của protein KRAS làm mất tác dụng điều hòa của nhiều yếu tố, vì vậy ảnh hưởng đến các con đường quan trọng trong tế bào. Các protein KRAS đột biến được sinh ra còn kích thích sự tăng sinh tế bào dẫn đến sự phát triển không kiểm soát của các khối u.



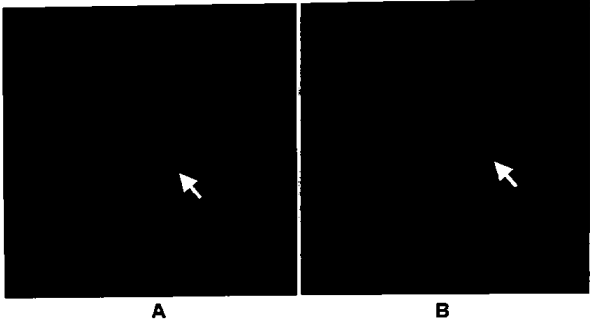
Hình 3. Cấu trúc 3D của phân tử protein KRAS. AC1, 2: vùng activity sites; A, B, C, D, E: vùng xoắn α helicase, $\beta 1$, $\beta 2$ 1, $\beta 2$ 2, $\beta 3$ 1, $\beta 3$ 2: vùng xoắn β helicase, M67, V103, M111: vị trí đột biến.



Hình 4. Ảnh hưởng của các đột biến lên cấu trúc 3D của phân tử protein KRAS. A: cấu trúc bình thường của protein KRAS tại vị trí 67, B: cấu trúc của protein KRAS khi bị đột biến tại vị trí M67V



Hình 5. Ảnh hưởng của các đột biến lên cấu trúc 3D của phân tử protein KRAS. A: cấu trúc bình thường của protein KRAS tại vị trí 103; B: cấu trúc của protein KRAS khi bị đột biến tại vị trí V103D.



Hình 6. Ảnh hưởng của các đột biến lên cấu trúc 3D của phân tử protein KRAS. A: cấu trúc bình thường của protein KRAS tại vị trí 111; B: cấu trúc của protein KRAS khi bị đột biến tại vị trí M111K.

Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xác định được các đột biến M67V, V103D và M111K trên bệnh nhân ung thư đại trực tràng của Việt Nam. Kết quả nghiên cứu cấu trúc 3D của phân tử protein KRAS cho thấy đột biến M67V và V103D đã làm thay đổi hình dạng không gian của protein KRAS. Như vậy, bên cạnh các đột biến đã được xác định rõ sự ảnh hưởng đối với hiệu quả điều trị như đột biến tại codon 12, 13, 146 và 161, thì những đột biến tại các điểm trên vùng Switch I, II hay vùng domain G đều có thể ảnh hưởng ít nhiều đến hoạt tính của protein KRAS. Vì vậy, cần có nghiên cứu thêm về ảnh hưởng của các đột biến này lên hiệu quả điều trị ở bệnh nhân ung thư đại trực tràng.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài cấp cơ sở Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD (2008) Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26: 1626-1634.

Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA (1998) Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter 'RASCAL' study. *J Natl Cancer Inst* 90: 675-684

Arrington AK, Heinrich EL, Lee W, Dululao M, Patel S, Sanchez J, Garcia-Aguilar J, Kim J (2012) Prognostic and Predictive Roles of KRAS Mutation in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 13: 12153-12168.

Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, Vogelstein B (1987) Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 327: 293-297.

Bos JL (1989) Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49: 4682-4689.

Brink M, de Goeij AFPM, Weijnenberg MP, Roemen GMJM, Lentjes MHFM, Pachen MMM, Smits KM, de Bruïne AP, Goldbohm RA, van den Brandt PA (2003) KRAS oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in the Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis* 24: 703-710.

Chang YS, Yeh KT, Hsu NC, Lin SH, Chang TJ, Chang JG (2010) Detection of N-, H-, and KRAS codons 12, 13, and 61 mutations with universal RAS primer multiplex PCR and N-, H-, and KRAS-specific primer extension. *Chn Biochem* 43: 296-301.

Chretien AS, Harle A, Meyer-Lefebvre M, Rouyer M, Husson M, Ramacci C, Harter V, Genin P, Leroux A, Merlin JL (2013) Optimization of routine KRAS mutation PCR-based testing procedure for rational individualized

first-line-targeted therapy selection in metastatic colorectal cancer. *Cancer Med* 2: 11-20.

Edkins S, O'Meara S, Parker A, Stevens C, Reis M, Jones S, Greenman C, Davies H, Dalgleish G, Forbes S, Hunter C, Smith R, Stephens P, Goldstraw P, Nicholson A, Chan TL, Velculescu VE, Yuen ST, Leung SY, Stratton MR, Futreal PA (2006) Recurrent *K-RAS* codon 146 mutations in human colorectal cancer. *Cancer Biol Ther* 5: 928-932

Forbes S, Clements J, Dawson E, Bamford S, Webb T, Dogan A, Flanagan A, Teague J, Wooster R, Futreal PA, Stratton MR (2006) Cosmic 2005. *Br J Cancer* 94: 318-322.

Gideon P, John J, Frech M, Lautwein A, Clark R, Scheffer JE, Wittinghofer A (1992) Mutational and kinetic analyses of the GTPase-activating protein (GAP)-p21 interaction: the C-terminal domain of GAP is not sufficient for full activity. *Mol Cell Biol* 12: 2050-2056.

Giglione C, Parrini MC, Baouz S, Bernardi A, Parmeggiani A (1997) A new function of p120-GTPase-activating protein: prevention of the guanine nucleotide exchange factor-stimulated nucleotide exchange on the active form of Ha-Ras p21. *J Biol Chem* 272: 25128-25134.

Jancik S, Drabek J, Radzich D, Hajdich M (2010) Clinical Relevance of *KRAS* in Human Cancers. *J Biomed Biotechnol* 2010: 150960

Janakiraman M, Vakiani E, Zeng Z, Pratilas CA, Taylor BS, Chitale D, Halilovic E, Wilson M, Huberman K, Filho JCR, Persaud Y, Levine DA, Fagin JA, Jhanwar SC, Manadason JM, Lash A, Ladanyi M, Saltz LB, Heguy A, Paty PB, Soltis DB (2010) Genomic and Biological Characterization of Exon 4 *KRAS* Mutations in Human Cancer. *Cancer Res* 70: 5901-5911.

Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, Cote JF, Tomasic G, Penna C, Ducreux M, Rougier P, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P (2006) *KRAS* mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 66: 3992-3995.

Lin SR, Tsai JH, Yang YC, Lee SC (1998) Mutations of *K-ras* oncogene in human adrenal tumors in Taiwan. *Br J Cancer* 77: 1060-1065.

Lopez-Alcala C, Alvarez-Moya B, Villalonga P, Calvo M, Bachs O, Agell N (2008) Identification of Essential Interacting Elements in K-Ras/Calmodulin Binding and Its Role in K-Ras Localization. *J Biol Chem* 283: 10621-10631.

Loupakis F, Ruzzo A, Cremolini C, Vincenzi B, Salvatore L, Santini D, Masi G, Stasi I, Canestrari E, Rulli E, Floriani I, Bencardino K, Galluccio N, Catalano V, Tonini G, Magnani M, Fontanini G, Basolo F, Falcone A, Graziano F (2009) *KRAS* codon 61, 146 and *BRAF* mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in *KRAS* codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 101: 715-721.

Molinari F, Felicioni L, Buscarino M, De Dosso S, Buttitta F, Malatesta S, Molitni A, Luoni M, Boldorini R, Alabiso O, Girlando S, Soini B, Spitale A, Di Nicolantonio F, Saletti P, Crippa S, Mazzucchelli L, Marchetti A, Bardelli A, Frattini M (2011) Increased Detection Sensitivity for *KRAS* Mutations Enhances the Prediction of Anti-EGFR Monoclonal Antibody Resistance in Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* 17: 4901-4914.

Palmirotta R, Savonarola A, Formica V, Ludovici G, Del Monte G, Roselli M, Guadagni F (2009) A Novel *K-ras* Mutation in Colorectal Cancer. *Anticancer Res* 29: 3369-3374.

Raponi M, Winkler H, Dracopoli NC (2008) *KRAS* mutations predict response to EGFR inhibitors. *Curr Opin Pharmacol* 8: 413-418.

Ren JJ, Li GX, Ge J, Li X, Zhao YS (2012) Is *K-ras* Gene Mutation a Prognostic Factor for Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Dis Colon Rectum* 55: 913-923.

Sannini D, Loupakis F, Vincenzi B, Floriani I, Stasi I, Canestrari E, Rulli E, Maresca PE, Andreoni F, Masi G, Graziano F, Baldi GG, Salvatore L, Russo A, Perrone G, Tommasino MR, Magnani M, Falcone A, Tonini G, Ruzzo A (2008) High Concordance of *KRAS* Status Between Primary Colorectal Tumors and Related Metastatic Sites. Implications for Clinical Practice. *Oncologist* 13: 1270-1275.

Smith G, Carey FA, Beattie J, Wilkie Murray JV, Lightfoot TJ, Coxhead J R, Garner C, Steele RJC, Wolf CR (2002) Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53-alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 9433-9438.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319: 525-532

Wicki A, Herrmann R, Christofori G (2010) *Kras* in metastatic colorectal cancer. *Swiss Med Wkly* 140: W13112.

DETERMINING *KRAS* MUTATIONS OF COLORECTAL CANCER PATIENTS IN VIETNAM

Nguyen Thi Kim Lien¹, Ho Quang Huy², Nguyen Huy Hoang^{1*}

Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology

²*Hanoi Medical University*

SUMMARY

Colorectal cancer (CRC) is the most common cancer type and has high mortality rate at the third in the World and Vietnam. Currently, the number of patients with colorectal cancer tends to increase. The targeted therapy that uses EGFR (epidermal growth factor receptor) inhibitors is becoming an indispensable part of the process of controlling the progression of the disease. However, the *KRAS* mutations are major cause of resistance to EGFR inhibitor in treatment to colorectal cancer. In this study, the mutations in exon 2, 3, 4 in *KRAS* gene of patients with colorectal cancer were determined by direct sequencing from PCR products. The results showed that we did not find the mutations which were said to be affect to effect treatment as has been published. However, we determined six patients (KR10, 11, 12, 14, 15, 17) who have mutation point M67V, one patient (KR7) have mutation V103D and two patients (KR7, 9) have mutation M111K. The mutations at codon M67V and V103D did change the spatial structure of *KRAS* protein in these positions. So, further analysis is needed to understand the associations between *KRAS* mutations and the influence of these mutations on effective treatment in patients with CRC.

Keywords: *KRAS* mutation, colorectal cancer, treatment response, receptor inhibitor