



Protocollo per l'analisi mutazionale del gene **KRAS**

A cura del gruppo di lavoro AIOM - SIAPEC-IAP

Antonio Marchetti, Nicola Normanno



Protocollo per l'analisi mutazionale del gene KRAS

Diverse metodiche di laboratorio possono essere impiegate per l'analisi mutazionale di KRAS in pazienti con carcinoma del colonretto metastatico. L'amplificazione mediante PCR e la sequenza diretta dell'amplificato è l'approccio più utilizzato e rappresenta al momento, anche per la sua economicità, la metodica di riferimento per la determinazione dello stato mutazionale di KRAS. Kit commerciali con procedure standardizzate e appropriati controlli sostituiranno probabilmente nel tempo le procedure sviluppate autonomamente in laboratorio. Alcuni kit già disponibili si basano su metodiche di Real Time PCR, che presentano il vantaggio di una maggiore sensibilità e rapidità rispetto alla PCR/sequenza. Il pirosequenziamento rappresenta sicuramente un ulteriore approccio di notevole interesse anche per la sua elevata sensibilità. Tuttavia, non sono disponibili in letteratura studi di validazione di questa ultima metodica su ampie casistiche. Inoltre, il costo in generale delle nuove metodologie rappresenta una chiara limitazione alla loro applicazione su larga scala. Indipendentemente dalla procedura utilizzata, la determinazione dello stato mutazionale di KRAS non può prescindere da una attenta valutazione e selezione del campione da analizzare da parte dell'anatomo-patologo. Il protocollo che segue indica alcuni principi di base che devono essere rispettati per una corretta esecuzione della analisi mutazionale di KRAS.

Il materiale biologico

Il materiale biologico per l'estrazione del DNA e l'analisi mutazionale di KRAS può essere rappresentato da tessuto prelevato da carcinoma infiltrante primitivo del colonretto o metastatico. Lesioni adenomatose o carcinomatose non invasive non dovrebbero essere processate. Il materiale può essere disponibile sotto forma di biopsie esplorative o di tessuto neoplastico asportato con l'intervento chirurgico. Il campione da prelevare per la diagnosi molecolare deve essere effettuato in piena area neoplastica evitando, per quanto possibile, aree necrotiche e componenti tessutali normali. Il tessuto può essere processato immediatamente, oppure dopo congelamento a -80°C o ancora dopo fissazione in formalina ed inclusione in paraffina.

Poiché il congelamento tessutale, sebbene auspicabile, non può essere ancora considerato una pratica diffusa, è prevedibile che allo stato attuale, nella maggior parte dei casi, il DNA debba essere estratto da tessuti inclusi. L'utilizzo di tessuti paraffinati fornisce DNA di qualità decisamente inferiore a quella ottenibile da tessuti freschi o congelati ma in genere sufficiente per le analisi mutazionali. Ad un esame istopatologico, la lesione tumorale si presenta frequentemente come un tessuto eterogeneo: accanto ad aree di carcinoma infiltrante possono essere presenti aree di necrosi, aree flogistiche e componenti tessutali normali. La possibilità di individuare mutazioni geniche risente notevolmente della

percentuale di cellule mutate nel campione e quindi delle caratteristiche dell'area di tessuto destinata all'analisi molecolare. Tali caratteristiche, prima dell'estrazione del DNA, devono essere valutate accuratamente dall'anatomopatologo che deve eventualmente provvedere a selezionare le aree tumorali mediante dissezioni. La percentuale di cellule di carcinoma infiltrante nel tessuto da sottoporre all'esame molecolare non deve essere inferiore al 70%.

Dissezione tessutale e sezioni al microtomo

Le dissezioni tessutali possono essere sostanzialmente distinte in: a) microdissezioni laser; b) macrodissezioni eseguite manualmente su fette distese su vetrino o direttamente sul blocchetto di tessuto paraffinato. La microdissezione laser, sebbene importante in alcuni settori della ricerca in quanto consente di isolare anche singole cellule neoplastiche, non è proponibile per l'applicazione in esame per una serie di motivazioni. Innanzitutto, richiede una costosa strumentazione ed una particolare esperienza nel settore specifico, non disponibili in molte sedi. Inoltre, la scarsa quantità e la qualità non ottimale del DNA ottenuto possono favorire l'insorgenza di artefatti e quindi di falsi positivi. La macrodissezione manuale permette di arricchire notevolmente il campione di cellule tumorali e di raggiungere, nella maggior parte dei casi, la percentuale di cellule neoplastiche richiesta per l'esame. La macrodissezione su vetrino è da considerarsi la più semplice ai fini dell'organizzazione della rete laboratoristica nazionale. Cinque sezioni di 20 micron vengono raccolte su altrettanti vetrini portaoggetto. La raccolta su vetrino si effettua in acqua distillata priva di gelatina in recipienti monouso (capsula Petri, beaker) al fine di evitare inquinamenti. Le sezioni vengono fatte essiccare sul vetrino a temperatura ambiente. Nel caso in cui il patologo, dopo un esame istopatologico del preparato su sezione da 4 micron colorata con ematossilina-eosina, ritenga necessaria la dissezione di un'area tessutale, egli provvederà a delimitare l'area prescelta sul vetrino mediante un pennarello. Quindi le sezioni "in bianco" da 20 micron adese al vetrino vengono confrontate con l'area selezionata ed opportunamente dissezionate dall'anatomopatologo con la lama di un bisturi. Il tessuto dissezionato viene raccolto in un tubo Eppendorf, sottoposto a sparaffinatura in appropriato solvente, lavato in alcool e disidratato prima di iniziare l'estrazione. La macrodissezione può anche essere effettuata direttamente su blocco di paraffina. In tal caso, l'area neoplastica da sottoporre ad esame viene individuata dal patologo direttamente sul vetrino allestito per l'esame istopatologico e delimitata mediante l'uso di un pennarello. L'area viene quindi individuata sulla superficie del blocchetto di paraffina corrispondente e su quest'ultimo il perimetro della zona selezionata viene inciso con la lama di un bisturi. Si ottengono quindi

al microtomo 5 sezioni di 20 micron dell'area prescelta che, raccolte in un tubo Eppendorf, vengono processate, come sopra, prima dell'estrazione. Nel caso in cui il campione all'origine contenga cellule di carcinoma infiltrante in misura uguale o superiore al 70% la dissezione non è necessaria e 5 sezioni da 20 micron vengono direttamente raccolte in tubo Eppendorf per essere processate.

L'estrazione e la conservazione del DNA

Per l'estrazione e la purificazione del DNA da tessuto paraffinato sono oggi disponibili vari kit commerciali, in genere basati sul principio della cromatografia, che hanno il vantaggio di accorciare notevolmente i tempi tecnici rispetto alla metodica classica che prevede l'estrazione in fenolo-cloroformio e la purificazione mediante precipitazione in alcool. Sono anche disponibili kit per estrazione di DNA da micro campioni quali piccole biopsie. Il vantaggio principale nell'utilizzo di tali kit è che essi consentono una standardizzazione delle procedure. Le proposte commerciali sono differenziate in funzione del tipo di campione da utilizzare, tessuto congelato o fissato e incluso in paraffina e sono corredate di protocolli di semplice esecuzione. Una volta estratto, il DNA viene risospeso in tampone adeguato, quindi valutato sotto il profilo qualità/quantità mediante lettura spettrofotometrica, o tramite visualizzazione su gel d'agarosio. La metodica di estrazione da tessuti paraffinati deve garantire adeguate quantità di DNA per l'analisi mutazionale in almeno il 95% dei campioni processati. Se conservato opportunamente il DNA può essere usato anche a distanza di tempo (vari anni) per ulteriori indagini molecolari. La conservazione ottimale degli acidi nucleici è di estrema importanza e comporta una rigida organizzazione di "biobanking" che implica di base una strumentazione adeguata (congelatori a -80°C e contenitori di azoto liquido), dispositivi di controllo grafico della temperatura, sistemi di allarme acustico e via radio, controlli di qualità dei materiali biologici conservati. L'estrazione rappresenta il primo passo nel percorso diagnostico molecolare alla quale, nella maggior parte dei casi, segue una metodica di amplificazione del DNA, di seguito brevemente descritta.

Amplificazione mediante PCR dell'oncogene KRAS

I farmaci anti-EGFR sono stati approvati per pazienti con KRAS *wild type* e, quindi, i pazienti con qualsiasi mutazione dovrebbero essere esclusi dal trattamento. Tuttavia, tutti i dati disponibili in letteratura riguardano esclusivamente le mutazioni attivanti note dei codoni 12 e 13 dell'esone 2.

Pertanto, l'attività diagnostica al momento deve essere ristretta a queste mutazioni. La determinazione delle mutazioni del codone 61 o di altre varianti dovrebbe rientrare in protocolli di studio tesi a valutarne il ruolo nella resistenza ai farmaci anti-EGFR. L'am-

plificazione mediante PCR dell'esone 2 del gene KRAS consente di avere sufficiente materiale per la analisi mutazionale anche partendo da esigue quantità di DNA. Il prodotto della PCR può essere utilizzato per il sequenziamento diretto del tratto amplificato o sottoposto a tecniche di vario tipo per l'identificazione di mutazioni geniche.

Raccomandazioni per il protocollo di amplificazione PCR del gene KRAS

- Le reazioni devono essere allestite in una cappa a flusso laminare, in un ambiente diverso da quello utilizzato per l'analisi dei prodotti di amplificazione, impiegando materiali dedicati e con le opportune precauzioni onde evitare contaminazioni (guanti, puntali con filtro, ecc.).
- Per ogni determinazione devono essere previsti almeno un controllo positivo di amplificazione (campione di DNA genomico precedentemente validato) ed un controllo negativo (miscela di reazione priva di template).
- La reazione PCR deve essere allestita utilizzando 80-100 ng di DNA genomico, per garantire una buona resa ed evitare artefatti.
- Per ogni campione da analizzare è opportuno produrre due diversi amplificati, in modo da effettuare la sequenza di due diversi prodotti di PCR.
- La regione da amplificare deve comprendere le sequenze dei codoni 12 e 13 del gene KRAS.
- Il controllo qualitativo/quantitativo del prodotto della reazione viene effettuato mediante elettroforesi in gel di agarosio e colorazione con etidio bromuro o con altro intercalante, che consente di valutare l'efficienza della PCR e la specificità del risultato.
- Ogni laboratorio dovrebbe validare la metodica di PCR/sequenziamento in via preventiva utilizzando diluizioni di DNA mutato in DNA non-mutato da linee cellulari il cui stato mutazionale di KRAS sia conosciuto. La sensibilità della metodica dovrebbe essere tale da individuare mutazioni quando le copie di DNA mutato rappresentano il 25% circa del totale.

Sequenziamento dei prodotti di PCR

Il sequenziamento diretto è la tecnica in assoluto più diffusa per evidenziare le mutazioni sia nei laboratori di ricerca che in laboratori dedicati a procedure diagnostiche.

Tuttavia, tale metodica non ha un elevato grado di sensibilità. Difficilmente una mutazione può essere evidenziata se è presente in meno del 20% delle molecole di DNA analizzate.

L'utilizzo del sequenziamento diretto per l'analisi delle mutazioni del gene KRAS nei tumori coloretali consente di evidenziare mutazioni in circa il 35-40% dei pazienti.

Raccomandazioni per il protocollo di sequenziamento del gene KRAS

- La quantità del template analizzato mediante sequenziamento deve essere dell'ordine dei 40-50 ng.
- Prodotti di due diverse PCR dovrebbero essere sequenziati in forward e reverse, in modo da ottenere un numero di 3-4 sequenze per campione.
- Il controllo qualitativo viene effettuato mediante assemblaggio delle sequenze con un software dedicato all'analisi delle sequenze, lettura dell'elettroferogramma e confronto con la sequenza *wild type*.
- Un campione può essere definito positivo per mutazione se questa è presente in almeno due diverse sequenze (una forward ed una reverse) ottenute da PCR indipendenti.
- Ad intervalli di 25-30 sequenze, deve essere sequenziato un DNA di controllo per verificare l'assenza di contaminazioni e la qualità della procedura.
- L'efficienza della metodica di PCR/sequenziamento deve garantire un corretto risultato almeno nel 97% dei campioni.

Analisi mediante Real-Time PCR

Diverse metodiche basate sull'impiego della Real Time PCR possono essere utilizzate per la individuazione delle mutazioni di KRAS. Non è pertanto possibile stabilire delle raccomandazioni che siano valide per tutte le metodiche.

In linea di massima:

- Le reazioni devono essere allestite in una cappa a flusso laminare, con materiali dedicati e con le opportune precauzioni onde evitare contaminazioni (guanti, puntali con filtro, ecc.).
- Le reazioni dovrebbero essere eseguite almeno in duplicato
- I kit disponibili in commercio contengono gli appropriati controlli positivi e negativi nonché una descrizione dettagliata delle procedure. In questo caso, l'unica raccomandazione è quella di

verificare l'efficienza della metodica nelle proprie condizioni di analisi utilizzando diluizioni di DNA mutato in DNA non-mutato. Ad esempio, per un kit disponibile in commercio e basato sulla tecnologia ARMS, la sensibilità della metodica dovrebbe essere tale da individuare mutazioni quando le copie di DNA mutato rappresentano circa l'1% del totale.

- Per le metodiche sviluppate da laboratori indipendenti, dovrebbero essere previsti appropriati controlli positivi e negativi. Queste metodiche devono essere in grado di individuare e discriminare le sette mutazioni più frequenti dei codoni 12 e 13.
- La sensibilità delle metodiche basate sulla tecnologia ARMS dovrebbe raggiungere l'1%; per i saggi basati sulla discriminazione allelica è stata descritta una sensibilità di circa il 10%.
- L'impiego di metodiche di High Resolution Melting deve prevedere la conferma mediante sequenziamento diretto, che consente anche l'individuazione della specifica mutazione.
- Indipendentemente dalla metodica utilizzata, una mutazione dovrebbe essere ritenuta certa solo quando individuata almeno in due reazioni indipendenti.

Refertazione

La refertazione è parte integrante della procedure diagnostica. Il referto dovrebbe contenere le seguenti informazioni:

- L'identificazione del paziente e del medico/struttura che ha richiesto l'analisi.
- Il materiale utilizzato per l'analisi e la percentuale di cellule tumorali.
- La metodica impiegata per l'esecuzione dell'analisi.
- I risultati del test, con specificazione del tipo di mutazione eventualmente rilevata.

cod. 213EG