



TINJAUAN PUSTAKA

Mutasi Gen KRAS pada Kanker Kolorektal

Ni Nyoman Ayu Dewi¹, Anak Agung Ngurah Satya Pranata², Ni Made Pramita Widya Suksmarini²

1. Departemen Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Udayana; 2. Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

Korespondensi: Ni Nyoman Ayu Dewi, email: ayu.dewi@unud.ac.id, HP: 081337141506

Abstrak

Tujuan: Onkogen RAS memiliki peran dalam pertumbuhan dan regulasi sel. Protein ini mempengaruhi banyak fungsi seluler termasuk proliferasi sel, diferensiasi, dan apoptosis. Jika KRAS mengalami mutasi, maka KRAS secara konstitutif akan tetap dalam keadaan terikat dengan GTP. Dengan demikian regulasi kaskade sinyal downstream hilang dan terjadi pertumbuhan sel yang tidak terkontrol.

Metode: Mutasi KRAS berperan dalam terjadinya 32-40% kanker kolorektal dan hampir seluruh kejadian tersebut disebabkan oleh mutasi KRAS pada ekson 2 kodon 12 dan 13. **Hasil:** Hal ini menyebabkan resistensi terhadap kemoterapi yang ditargetkan untuk reseptor faktor pertumbuhan epidermal (EGFR). **Kesimpulan:** Tulisan ini membahas peran KRAS dalam regulasi sel normal dan sel kanker, terutama kanker kolorektal. Pemahaman tentang protein ini serta interaksinya dengan protein lainnya dapat mengungkapkan potensi peran prognostik dan prediktifnya dalam agresivitas tumor.

Kata kunci: EGFR, kanker kolorektal, K-RAS, mutasi

Abstract

Objective: and regulation. This protein is involved in various cellular functions, including cell proliferation, cell differentiation and apoptosis. KRAS mutation results in constitutively active protein to induce downstream signals by binding to GTP. This activation leads to uncontrolled cell growth because of constitutive activation of downstream cascade. **Method:** KRAS mutation found in 32-40% colorectal cancers and predominantly occurred at exon 2 (codon 12 and 13). **Result:** The hot spot mutations cause lack of response to anti-epidermal growth factor receptor (EGFR)-targeted therapy.

Conclusion: This article critically reviews role of KRAS in normal and cancer cell regulation, especially in colorectal cancer. Understanding of KRAS protein and its interaction with other proteins will contribute to the discussion on prognostic and predictive value of the protein in tumor development.

Keywords: EGFR, colorectal cancer, K-RAS, mutation

PENDAHULUAN

Kanker kolorektal merupakan kanker di bagian kolon dan rektum dan merupakan penyebab kematian akibat kanker nomor tiga di dunia dengan resiko terjadi pada satu orang di antara dua puluh orang.¹ Kanker kolorektal merupakan satu-satunya kanker yang mengenai pria maupun wanita dengan perkiraan frekuensi yang hampir sama (10,9% pada pria dan 9,5% pada wanita) dan perkiraan kasus baru di dunia adalah sebanyak 1.800.000 kasus dan perkiraan kematian sebanyak 881.000 kematian.² Kanker kolorektal paling sering terjadi pada negara berkembang (25,1/100.000 penduduk). Laporan yang dikeluarkan GLOBOCAN tahun 2018 menyebutkan bahwa kanker kolorektal merupakan kanker nomor tiga yang paling sering menyerang pria setelah kanker paru-paru dan kanker prostat, dengan dengan kasus sebanyak 1.035.500 kasus (10,9% dari kasus kanker) dengan angka kematian mencapai 486.000 pasien serta merupakan kanker nomor dua yang paling sering menyerang wanita setelah kanker payudara, dengan kasus sebanyak 817.000 kasus (9,5% kasus kanker) dengan angka kematian mencapai 399.000 pasien. Secara keseluruhan angka kejadian kanker kolorektal yaitu 1.846.200 kasus dengan total kematian yaitu 883.200 kematian.² Tingkat kejadian CRC yang distandardisasi usia per 100.000 populasi di Indonesia adalah usia 19,1 tahun untuk pria dan 15,6 tahun untuk wanita. Studi epidemiologi sebelumnya menunjukkan bahwa pasien CRC di Indonesia lebih muda daripada pasien di negara maju. Lebih dari 30% kasus berusia 40 tahun atau lebih muda, sementara pasien yang lebih muda dari 50 tahun di negara maju hanya 2-8%, selain itu, CRC pada usia muda atau awal di negara maju sering dikaitkan dengan kasus

keluarga, sedangkan sebagian besar pasien CRC Indonesia dipastikan akan menjadi sporadik.^{2,3} Kanker ini lebih sering didiagnosis pada pasien yang lebih muda, karena faktor risiko seperti obesitas, sedentarisme, kebiasaan gizi buruk (tinggi lemak dan protein), merokok, dan penuaan populasi yang progresif.⁴

Penemuan onkogen seperti MYC dan RAS, dan gen penekan tumor seperti P53 dan RB menyebabkan kemajuan pesat dalam pemahaman perkembangan kanker. Onkogen RAS memiliki peran dalam pertumbuhan dan regulasi sel; produk proteinnya mempengaruhi banyak fungsi seluler termasuk proliferasi sel, diferensiasi, dan apoptosis. Protein ini mampu menyampaikan sinyal eksternal ke inti sel dalam mengatur pembelahan sel. Ada tiga jenis gen RAS yang diketahui, yaitu NRAS, HRAS, dan KRAS. Lebih dari 90% adenokarsinoma pankreas, 30% -50% kanker kolorektal, 55% kanker tiroid, 35% kanker paru, dan 35% rhabdomyosarcomas ditemukan gen RAS yang mengalami mutasi. Mutasi pada KRAS terjadi dengan frekuensi terbesar pada semua kanker manusia, diikuti oleh NRAS dan HRAS.⁵⁻⁷ Mutasi KRAS menyebabkan sel tidak mampu memecah GTP menjadi GDP dalam proses pensinyalan sel. Hal inilah yang menyebabkan pembelahan sel menjadi tidak terkontrol, sehingga metastasis sel kanker menjadi semakin berbahaya apabila tidak segera ditanggulangi.³ Sebagai hasil dari aktivasi mutasi, protein KRAS mutan terganggu kemampuannya untuk beralih antara keadaan aktif dan tidak aktif. Hal ini menghasilkan transformasi sel dan resistensi terhadap kemoterapi dan terapi yang ditargetkan untuk reseptor faktor pertumbuhan epidermal (*Epidermal Growth Factor Receptor/EGFR*).⁸⁻¹⁰ Hampir seluruh kejadian tersebut disebabkan oleh

mutasi KRAS pada ekson 2 kodon 12 dan 13. Kedua kodon tersebut mengkode asam amino glisin dalam protein *wild type*.¹¹ Mutasi dapat juga terjadi pada kodon lainnya misalnya kodon 10, 11, 14, 61 atau 146 namun saat ini analisis mutasi pada kodon 12 dan 13 saja yang digunakan sebagai panduan sebelum pemberian terapi anti-EGFR.¹⁰

METODE

Tulisan ini disusun berdasarkan hasil penelusuran artikel-artikel ilmiah terkait kanker kolorektal dan protein KRAS.

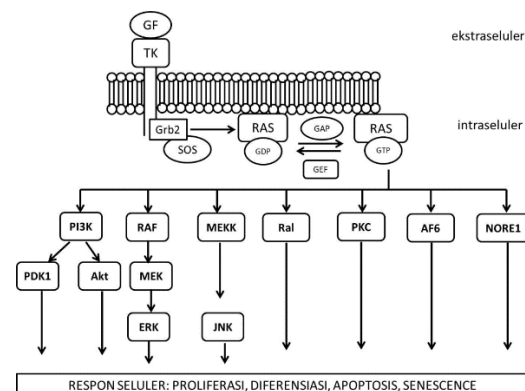
HASIL DAN PEMBAHASAN

Peran KRAS pada Perkembangan Sel Normal

Gen KRAS adalah onkogen yang menyandi protein transduktor GTPase kecil. Gen KRAS terletak di kromosom 12 lengan p pada posisi 12.1 dan terdiri dari enam ekson. Terdapat dua jenis KRAS yaitu, KRAS4A dan KRAS4B, yang masing-masing mengandung 188 dan 189 asam amino. KRAS4B diekspresikan secara luas dan dominan dalam sel manusia. Domain pertama KRAS mengandung N-terminus yang terdiri dari 85 asam amino dan domain yang kedua terdiri dari 80 asam amino. Kedua domain ini bersama-sama membentuk domain-G dan penting dalam pensinyalan. Domain-G berisi beberapa motif untuk fungsi protein termasuk guanosin trifosfat (GTP) *binding pocket*, *effector binding* dan loop Switch 1 dan Switch 2 yang bertanggung jawab untuk *GTPase activating protein* (GAP) dan interaksi *guanine nucleotide exchange factor* (GEF). C-terminus berisi wilayah *hypervariable*, yang menentukan *anchoring* membran plasma dan modifikasi pasca-translasi.⁸

Siklus protein RAS antara RAS terikat GDP dan RAS terikat GTP diatur oleh berbagai GAP dan GEF yang dipengaruhi oleh sejumlah reseptor permukaan sel, seperti reseptor tirosin kinase, integrin, reseptor serpentine, heterotrimerik G-protein dan reseptor sitokin. Ketika GTP berikatan dengan KRAS, KRAS diaktifkan karena perubahan konformasi ke Switch 1 dan Switch 2. Kedua wilayah ini mengendalikan spesifisitas pengikatan ke molekul efektor, sehingga mempengaruhi interaksi dengan *downstream transducers*.⁸

KRAS terikat GTP selanjutnya merangsang berbagai jalur sinyal dan mengatur proliferasi sel, diferensiasi, dan apoptosis (Gambar1).



Gambar 1. Interaksi seluler pada jalur RAS. Interaksi antara *growth factor* (GF) dengan reseptor tirosin kinase (TK) akan menyebabkan pengaktifan RAS dengan melibatkan GAP dan GEF. RAS aktif selanjutnya memberi sinyal ke berbagai efektor sehingga mengaktifkan berbagai jalur transduksi sinyal. Jalur-jalur ini terlibat dalam proliferasi, diferensiasi, apoptosis dan senescence.

Protein efektor yang diaktifkan termasuk RAF kinase, PI3K, RalGDS, p120GAP, MEKK1, Rin1, AF-6, fosfolipase C ϵ dan Nore / MST1. RAF aktif memulai kaskade sinyal dengan memfosforilasi MEK1 dan

MEK2 yang pada gilirannya memfosforilasi ERK1 dan ERK2. ERK1/2 selanjutnya mengaktifkan berbagai faktor transkripsi. Target penting dari PI3K adalah Akt/PKB yang mengatur apoptosis. MEKK1 meningkatkan kelangsungan hidup sel dan proliferasi melalui mediator seperti Jun N-terminal kinase (JNK) dan NF- κ B.^{8,12}

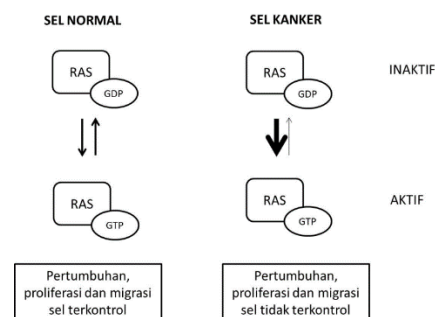
Mutasi Gen KRAS pada Perkembangan Sel Kanker

RAS merupakan famili gen yang mengkode kelas protein terikat membrane berukuran 21 kDa yang memiliki aktivitas GTPase intrinsik. Dua gen RAS pertama, H-RAS dan K-RAS, diidentifikasi pada tahun 1975 dari studi dua virus penyebab kanker, virus Harvey sarcoma dan virus Kirsten sarcoma oleh Scolnick *et al.* di *National Institutes of Health* (NIH). Analog manusia dari gen ini kemudian ditemukan pada tahun 1982 dan telah dipelajari secara intensif dan berimplikasi pada patogenesis banyak kanker.^{5,14}

Protein RAS adalah proto-onkogen yang sering mengalami mutasi pada kasus-kasus kanker.¹⁴ Dari tiga jenis gen RAS yang diketahui (KRAS, NRAS dan HRAS), KRAS paling sering bermutasi pada kanker. Modifikasi pasca-translasi protein ini memfasilitasi lokalisasi ke membran sel. Dalam keadaan normal, protein RAS ada dalam keadaan tidak aktif. Semua jenis gen RAS menjadi aktif ketika reseptor transmembran di sekitarnya (misalnya reseptor faktor pertumbuhan, reseptor G-protein berpasangan, toll-like reseptor dan lain-lain) terikat oleh ligan yang sesuai.

Kaskade sinyal intraseluler selanjutnya melibatkan GEF yang memfasilitasi aktivasi RAS dengan mengaktifkan *guanine diphosphate* (GDP) menjadi *guanine triphosphate* (GTP). Setelah diaktifkan, RAS

akan mengaktifkan berbagai macam efektor termasuk serin/threonin kinase, protein pengaktif GTPase (GAP), phosphoinositide 3-kinase (PI3K), dan GEFs. RAS menjadi tidak aktif ketika molekul GTP diubah kembali menjadi molekul GDP. Jika KRAS mengalami mutasi, KRAS secara konstitutif tetap dalam keadaan terikat dengan GTP dan dengan demikian regulasi fungsi *downstream* hilang dan terjadi pertumbuhan sel yang tidak terkontrol (Gambar 2).^{5,15}



Gambar 2. Perbedaan protein RAS pada sel normal dan sel kanker. Pada sel kanker dengan RAS yang mengalami mutasi, maka RAS secara konstitutif tetap dalam keadaan terikat dengan GTP dan menyebabkan pertumbuhan sel yang tidak terkontrol.

Tabel 1. Mutasi KRAS pada Beberapa Jenis Kanker⁸

Tipe Kanker	% mutasi KRAS
Saluran pencernaan	61
Pankreas	57-90
Traktus biliaris	28
Paru-paru	16
Endometrium	15
Ovarium	14
Prostat	8
Servix	7
Liver	6
Tiroid	2

Mutasi KRAS terjadi di berbagai jenis kanker pada manusia. Kanker-kanker dengan tingkat mutasi KRAS yang signifikan dapat dilihat pada Tabel 1.⁸

Mutasi Gen KRAS pada Perkembangan Sel Kanker Kolorektal

CRC merupakan penyakit yang bersifat multistep dan merupakan akumulasi dari perubahan genetic dan epigenetik.^{15,16} Patogenesis CRC melibatkan 3 jalur molekuler utama, yang biasanya saling tumpang tindih, sebagai akibat dari perubahan genetik. Ketiga jalur ini disebut sebagai *chromosomal instability* (CIN), *microsatellite instability* (MSI) dan *CpG island methylator phenotype* (CIMP).¹⁷ Ketiga jalur ini berperan dalam transformasi sel dari adenoma menjadi karsinoma, suatu proses multistep karsinogenesis yang dikenal dengan nama *adenoma-carcinoma sequence*.^{17,18} Perkembangan kanker *adenoma-carcinoma sequence* ini diawali dengan adanya perubahan pada gen APC (*adenopoliposis coli*)¹⁴ dimana gen ini bertugas menyandi protein yang berperan sebagai penekan tumor (*supressor tumor*) dalam mengatur pembelahan sel-sel epitelial usus. Mutasi tersebut menyebabkan gen penekan tumor terhambat dan adanya aktivasi onkogen KRAS.³

Mutasi RAS terdeteksi pada sekitar 50% pasien kanker kolorektal; mutasi KRAS ditemukan di sekitar 40% kasus, mutasi NRAS ditemukan pada sekitar 3-5% kasus, dan mutasi HRAS adalah kejadian yang dapat diabaikan. Mutasi pada gen RAS sering menyebabkan aktivasi konstitutif dari protein RAS dan jalur efektor *downstream* RAS.¹¹ Pensinyalan *downstream* melalui sumbu RAS dapat mengaktifkan banyak proses yang terlibat dalam perkembangan tumor dan metastasis tanpa pengaruh dari EGFR dan kinase reseptor permukaan sel lainnya. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa mutasi pada gen RAS memainkan peran

utama dalam resistensi primer terhadap terapi anti-EGFR.¹⁴

Mutasi KRAS biasanya melibatkan kodon 12, 13, 59 atau 61.⁵ Pada kanker kolorektal, sekitar 85-90% mutasi KRAS terjadi dalam ekson 2 (kodon 12 dan 13).¹¹ Dua kodon dalam gen KRAS ini mengkode asam amino glisin dalam protein *wild type*.⁹ Mutasi pada kodon 12 adalah mutasi KRAS yang paling umum pada kanker kolorektal. Perubahan yang paling sering pada kodon 12 ini adalah transisi GGT ke GAT (G12D; glisin menjadi aspartat). Residu glisin pada kodon 12 memiliki peran penting terhadap fungsi normal dari protein RAS. Oleh karena itu, substitusi basa tunggal yang menghasilkan penggantian asam amino glisin dengan asam amino lain di lokasi ini menyebabkan pembentukan GTPase secara terus menerus.⁵

Berdasarkan studi RASCAL pada Tabel 2, dapat dilihat bahwa mutasi pada kodon 12 dengan prevalensi tertinggi adalah mutasi G12D yaitu asam amino glisin (GGT) menjadi aspartat (GAT) sebanyak 31,5 % pada studi RASCAL I dan 39,3 % pada studi RASCAL II. Kemudian secara berturut-turut sampai prevalensi terendah yaitu G12V adalah mutasi asam amino glisin (GGT) menjadi valin (GGT), G12C adalah mutasi asam amino glisin (GGT) menjadi sistein (TGT), G12S adalah mutasi asam amino glisin (GGT) menjadi serin (AGT), G12A adalah mutasi asam amino glisin (GGT) menjadi alanin (GCT), G12R adalah mutasi asam amino glisin (GGT) menjadi arginin (CGT). Mutasi pada kodon 13 (G13D) yang terjadi akibat substitusi asam amino glisin menjadi aspartat, merupakan jenis mutasi KRAS kodon 13 yang paling sering ditemukan, dengan prevalensi 83,9% menurut studi RASCAL I dan 100% menurut studi RASCAL II.⁵ Mutasi kodon 13 selanjutnya yang memiliki frekuensi

terbesar kedua G13C, substitusi asam amino dari glisin menjadi sistein. Prevalensi mutasi kodon 13 yang paling rendah adalah G13R, yaitu substitusi asam amino dari glisin menjadi arginin.¹⁹

Tabel 2. Tipe Mutasi KRAS pada Kodon 12 dan 13 pada Studi RASCAL (*The Kirsten Ras In-Colorectal-Cancer Collaborative Group*) I dan RASCAL II⁵

Mutasi	% dari mutasi kodon spesifik		% dari semua mutasi kodon 12/13	
	RASCA LI	RASCA LII	RASCA LI	RASCA LII
Kodon 12				
G→A				
G12S	7,5 %	8,3 %	6,8 %	6,2 %
G12D	31,5 %	39,3 %	28,5 %	39,6 %
G→T				
G12C	8,9 %	10,2 %	8,0 %	7,7 %
G12V	24,2 %	33,3 %	21,9 %	25,8 %
G→C				
G12R	3,8 %		3,5 %	
G12A	6,2 %	8,8 %	5,6 %	6,6 %
Kodon 12, mutasi titik yang tidak diketahui	17,8 %		16,0 %	
Kodon 13				
G→A				
G13D	83,9 %	100 %	14,5 %	24,8 %
G→T				
G13C	6,8 %		1,2 %	
G13V	2,1 %		0,4 %	
G→C				
G13R	0,7 %		0,1 %	
G13A	2,1 %		0,4 %	
Kodon 13, mutasi titik yang tidak diketahui	5,5 %		1,0 %	
% dari pasien kanker kolorektal dengan mutasi KRAS			37,7 %	34,8 %

Terapi yang sudah ada ditargetkan pada EGFR seperti cetuximab dan panitumumab untuk pengobatan karsinoma kolorektal metastatik, gefitinib untuk NSCLC, atau erlotinib untuk NSCLC dan untuk karsinoma pankreas. Cetuximab dan panitumumab mengikat domain ekstraseluler EGFR, sehingga mencegah aktivasi reseptor tirosin kinase dan beberapa kaskade transduksi sinyal hilir yang terkait dengan kelangsungan hidup

sel, proliferasi, metastasis, dan angiogenesis. Hasil studi klinis telah membuktikan bahwa kanker kolorektal metastatik dengan mutasi KRAS tidak merespon secara efektif terhadap terapi penghambat EGFR.^{20, 21}

Resistensi terhadap anti-EGFR pada pasien CRC melibatkan mekanisme yang beragam, misalnya *low copy number* dari gen EGFR, ekspresi yang rendah dari AREG dan EREG (ligan spesifik dari EGFR), mutasi pada EGFR (S492R), mutasi RAS, mutasi BRAF (V600E), mutasi PIK3CA ekson 20, PTEN loss, fosforilasi STAT3, amplifikasi MET, amplifikasi HER2, perubahan VEGF/VEGFR maupun EMT (*epithelial-to-mesenchymal transition*). Mekanisme ini dapat berjalan masing-masing atau terjadi bersamaan sehingga menghambat aktivitas obat anti-EGFR.²¹

Keberhasilan pengobatan menggunakan cetuximab dan panitumumab untuk pengobatan kanker kolorektal metastatik tergantung pada gen KRAS yang tidak bermutasi; pengobatan akan menjadi tidak efektif jika gen KRAS memiliki mutasi, yang mengarah ke G-protein yang diaktifkan bahkan tanpa ligan, seperti faktor pertumbuhan epidermal. Hal ini menyebabkan proliferasi sel ganas lebih lanjut meskipun pengobatan telah dilakukan.^{22,23} Pasien kanker kolorektal dengan mutasi KRAS memiliki *progression-free survival* yang lebih rendah dan risiko kematian yang lebih tinggi.^{5,24} Pada pasien kanker kolorektal dengan metastasis, perlu dilakukan evaluasi KRAS sebelum pengobatan dengan antibodi anti-EGFR untuk efektivitas terapi anti-EGFR.^{17,24} Pasien dengan KRAS normal secara umum memiliki *progression-free survival times* dua kali lebih baik daripada pasien-pasien dengan KRAS mutan.²⁵ Sampai saat ini, mutasi KRAS merupakan biomarker

prediktor utama untuk resistensi terapi dengan anti-EGFR; namun perlu dicatat bahwa kontribusinya sekitar 30–40% dari pasien-pasien yang non responsif.²⁶ Mekanisme resistensi anti-EGFR lainnya belum digunakan secara rutin di klinik karena masih perlu dieksplorasi lebih lanjut, tidak praktis secara klinis, masih belum jelas cara penilaiannya atau adanya kendala secara teknis.²¹

SIMPULAN

Kanker kolorektal masih merupakan masalah kesehatan utama di seluruh dunia. Oleh karena itu, pemahaman mengenai patobiologi kanker kolorektal sangat diperlukan dalam upaya untuk mencegah terjadinya penyakit ini maupun sebagai usaha untuk meningkatkan *survival* pasien. Pemahaman tentang KRAS serta interaksinya dengan protein lainnya sangat penting untuk dapat mengungkapkan potensi peran prognostik dan prediktifnya dalam agresivitas tumor.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kopetz S, Chang GJ, Overman MJ, Eng C, Sargent DJ, Larson DW, Grothey A, Vauthey JN, Nagorney DM, McWilliams RR. Improved survival in metastatic colorectal cancer is associated with adoption of hepatic resection and improved chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 2009;27(22):3677-83. doi: 10.1200/JCO.2008.20.5278.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global Cancer in Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424. doi: 10.3322/caac.21492.
3. Abdullah M, Sudoyo AW, Utomo AR, Fauzi A, Rani AA. Molecular profile of colorectal cancer in Indonesia: is there another pathway? *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2012;5(2):71-78.
4. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, Velde CJH, Watanabe T. Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;5(1):15065. doi: 10.1038/nrdp.2015.65.
5. Arrington AK, Heinrich EL, Lee W, Duldulao M, Patel S, Sanchez J, Garcia-Aguilar J, Kim J. Prognostic and predictive roles of KRAS mutation in colorectal cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2012;13(10):12153-12168. doi: 10.3390/ijms131012153.
6. Inamura K. Colorectal Cancers: An Update on Their Molecular Pathology. *Cancers.* 2018; 10(1):26. doi:10.3390/cancers10010026
7. Shen Y, Wang J, Han X, Yang H, Wang S, Lin D, et al. Effectors of Epidermal Growth Factor Receptor Pathway: The Genetic Profiling of KRAS, BRAF, PIK3CA, NRAS Mutations in Colorectal Cancer Characteristics and Personalized Medicine. *PLoS ONE.* 2013; 8(12): e81628. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081628>
8. Chetty R, Govender D. Gene of the month: KRAS. *J Clin Pathol.* 2013;66(7):548-550. doi: 10.1136/jclinpath-2013-201663
9. Zinsky R, Bölükbas S, Bartsch H, Schirren J, Fisseler-Eckhoff A. Analysis of KRAS Mutations of Exon 2 Codons 12 and 13 by SNaPshot Analysis in Comparison to Common DNA Sequencing. *Gastroenterol Res Pract.* 2010. doi: 10.1155/2010/789363
10. Vaughn CP, ZoBell SD, Furtado LV, Baker CL, and Samowitz WS. Frequency

- of KRAS, BRAF and NRAS Mutations in Colorectal Cancer. *Genes, Chromosomes & Cancer* 2011;50:307-312.
11. Zhao B, Wang L, Qiu H, Zhang M, Sun L, Peng P., Yu, Q., Yuan, X. Mechanisms of resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017;8:3982-3984.
 12. Morkel M, Riemer P, Blaker H and Sers C. Similar but different: distinct roles for KRAS and BRAF oncogenes in colorectal cancer development and therapy resistance. *Oncotarget*. 2015;6(25): 20785-20800.
 13. Baines AT, Xu D, Der CJ. Inhibition of Ras for cancer treatment: The search continues'. *Future Med. Chem*, 3,1011;1787–1808.
 14. Kanik P, Gajjar K and Ghosh N. Immunohistochemical Localization of KRAS and BRAF and its Clinical Utility in Patients with Colorectal Cancer. *Colorec Cancer*. 2018; 4 (1):4. doi: 10.21767/2471-9943.100051.
 15. Sriwidayani NP. Mutasi KRAS pada Karsinogenesis Kanker Kolorektal. *Medicina*. 2013;44(2):97-100.
 16. Vaiopoulus AG, Athanasoula KC, Papavassiliou. Epigenetic modifications in colorectal cancer: molecular insights and therapeutic challenges. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2014:971-980.
 17. Tariq K, Ghias K. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer biology & medicine*. 2016;13(1):120-135.
 18. Nikolouzakis TK, Vassilopoulou L, Fragkiadaki P, Sapsakos TM, Papadakis GZ, Spandidos DA, Tsatsakis AM, Tsiaoussis J. Improving diagnosis, prognosis and prediction by using biomarkers in CRC patients. *Oncol Rep*. 2018; 39(6): 2455–2472. Published online 2018 Mar 21. doi: 10.3892/or.2018.6330
 19. Kothari N, Schell MJ, Teer JK, Yeatman T, Shibata D, Kim R. Comparison of K-RAS mutation analysis of colorectal cancer samples by standard testing and next-generation sequencing. *J Clin Pathol*. 2014;67(9):764-7.
 20. Lou E, D'Souza D, Nelson AC. Therapeutic Response of Metastatic Colorectal Cancer Harboring a KRAS Missense Mutation After Combination Chemotherapy with the EGFR Inhibitor Panitumumab. *J Natl Compr Canc Netw*. 2017;15(4):427-432.
 21. Zhao B, Wang L, Qiu H, Zhang M, Sun L, Peng P, Yu Q, Yuan X. Mechanisms of resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. 2017;8(3):3980-4000.
 22. Peeters M, Balfour J, Arnold D. Review article: panitumumab—a fully human anti-EGFR monoclonal antibody for treatment of metastatic colorectal cancer. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2008;28(3):269–281.
 23. Li'evre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, Ychou M, Bouché O, Landi B, Louvet C, André T, Bibeau F, Diebold MD, Rougier P, Ducreux M, Tomasic G, Emile JF, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P. K-RAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol*. 2008;26(3):374–379.
 24. Granados-Romero JJ, Valderrama-Treviño AI, Contreras-Flores EH, Barrera-Mera B, Enríquez MH, Uriarte-Ruiz K, Ceballos-Villalva JC, Estrada-Mata AG, Rodríguez CA, Arauz-Peña G. Colorectal cancer: a review. *Int J Res Med Sci*. 2017;5(11):4667-4676.
 25. Bardelli A, Siena S. Molecular Mechanisms of Resistance to

- Cetuximab and Panitumumab in Colorectal Cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(7):1254-1261.
26. Zu-Yao Yang, Xin-Yin Wu, Ya-Fang Huang, Meng-Yang Di, Da-Yong Zheng, Jin-Zhang Chen, Hong Ding, Chen Mao and Jin-Ling Tang. Promising biomarkers for predicting the outcomes of patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies: A systematic review with meta-analysis. *Int. J. Cancer.* 2013;133(8):1914–1925.