

University of Mosul  
College of Medicine



# Identification of *KRAS* Mutation in Colorectal Cancer :Molecular Study

A Thesis

Submitted to Council of the College of Medicine at the University  
of Mosul

In Partial Fulfillment of The Requirement for The Degree of The  
Master of science in Pathology

By

**Sarraa Ahmad Qahtan Abduljalil Beg**

Supervised by

**Lec .Dr. Zahraa Marwan Alomar**

M.B.Ch.B,MSc.Pathology,

Ph.D. Pathology/Medical Genetics

1444 A.H

2023 A.D

## Abstract

**Background:** Colorectal cancer is the third most common malignant growth in men and the second most malignant growth in women, with over 1.9 million new cases in 2020. The adenomatous polyposis coli gene is involved in the development of adenoma and the *KRAS* gene is involved in the transformation of adenoma into carcinoma. The *KRAS* gene produces a plasma membrane-bound Guanosin triphosphate binding protein with a molecular weight of 21 kd, which regulates a number of pathways that impact cell proliferation, differentiation, and death. Mutations in the *RAS* gene can alter the signal transduction pathway that stimulates cell clonal proliferation.

**Aim of Study:** To identify the expression of *KRAS* mutation in colorectal carcinoma cases by immunohistochemical study and polymerase chain reaction technique and to assess the validity of *KRAS* immunodetection of mutation compared with the genotyping method in colorectal adenocarcinoma. And to compare the expression of *KRAS* mutation with some clinicopathological parameters.

**Material and Method:** The Research Ethics Committee of the Faculty of Medicine at the University of Mosul gave its approval to this retrospective and prospective study. From November 2021 to February 2022, 50 Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue blocks from colorectal cancer patients who underwent colectomy were gathered from a private pathology laboratories in Mosul city \Iraq.

The study consist of two parts molecular and immunohistochemistry to evaluate *kras* mutation in colorectal cancer samples. All data provided demographic information (age at diagnosis, gender) and tumor topography (size, location nodal status, stage, and grade). All slides were inspected and the one with the best tumor (no necrosis, little mesenchymal tissue) was chosen for

this study. All paraffin blocks were stained with hematoxylin and eosin and reviewed for histopathological assessment. Immunohistochemical staining was conducted for all cases. regarding Molecular assay for identification of kras mutations based on polymerase chain reaction and reverse-hybridization by a human in vitro diagnostics Kras xl stripAssay kit manufactured by Vienna lab, Vienna, Austria is used in this study. then confirmed by real-time PCR by using a kit of @sensiscreen\USA. all were done at a private hospital \ in Erbil city \Iraq.

**Results:** During 8 months , The study examined a total of 50 cases of colorectal cancer, and the various clinicopathological factors are described below . The mean age was (54.80) with range between 20-85 years , about 44% were female and 56% were male, The overall male:female ratio was 1.2:2 According to microscopic types , 88% cases of adenocarcinoma and 10% of mucinous and 2% of neuroendocrine tumor. regarding to histological grading , 20% cases were well differentiated G1 and 58% for moderately differentiated G2 and 22% cases were poorly differentiated G3. Lymph node metastasis were positive in 46% and free nodal tissue in 54% of cases. kras immune expression by immune histochemical method was 56% positive while 44% had negative kras immune expression without significant relation between clinicopathological parameter (age, stage, grade ,site ,size ,gender). only significant relation with histological type mainly adenocarcinoma 54% , p value 0.001.

Exon 2 codons 12, 13, and 146 of the *KRAS* proto-oncogene were found to be mutated in 52% of the 50 cases studied. In contrast, 48% had a wild-type sequence. Codon 12 were predominant , about 40% from total positive cases 52% . While only 5 for codon thirteen and only one for codon 146 . all mutations detected were missense type , with strong association between K-ras immune expression and *KRAS* gene mutation by polymerase chain reaction

p value 0.001 without significant relation to age , stages ,grade , lymph node status size and site of tumor and *KRAS* mutation by polymerase chain reaction technique .

**Conclusion:**The frequency of K-ras protein expression in colorectal cancer by immunohistochemistry was 56% and the frequency of *KRAS* gene mutation in colorectal cancer by Polymerase chain reaction was 52% . There is a significant relation between kras expression by immunohistochemistry and *KRAS* gene mutation by polymerase chain reaction . The prevalence of K-ras protein expression by immunehistochemical method was mainly in adenocarcinoma at 54% without significant differences with other clinicopathological parameters . There was no significant relation between *KRAS* gene mutation and clinicopathological parameters, but mainly distributed in male, advanced stage, and poorly differentiated tumors.



جامعة الموصل  
كلية الطب

## تحديد طفرة *KRAS* في سرطان القولون والمستقيم: دراسة جزئية

رسالة تقدّمت بها

سراء احمد قحطان عبدالجليل بك

الى

مجلس كلية الطب في جامعة الموصل

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علم الامراض

باشراف

م.د.زهراء مروان شعبان العمر

بكالوريوس طب وجراحة عامة

ماجستير علم الامراض دكتوراه علم الامراض/وراثة طبية

1444هـ

م 2023

## الخلاصة

**الخلفية:** سرطان القولون والمستقيم هو ثالث أشهر نمو خبيث يحدث عند الرجال وثاني نمو خبيث يحدث بشكل عام عند السيدات. هناك أكثر من 1.9 مليون حالة جديدة في 2020. يشارك جين (APC) البوليوسيس القولوني الغدي) في تطور الورم الغدي، ويشارك *K-ras oncogene* في تحويل الورم الغدي إلى سرطان في حالات سرطان القولون والمستقيم الغير وراثي، وفقاً للنموذج الجيني متعدد الخطوات لسرطان القولون. وهذا النموذج هو حدث تمهيدي في تسرطن القولون والمستقيم، وبالتالي يتم إنتاج بروتين GTP المرتبط بغشاء البلازما بوزن جزيئي قدره 21 كد بواسطة جين *KRAS* المسؤول عن تنظيم عددًا من المسارات التي تؤثر على تكاثر الخلايا والتمايز والموت. حتى في حالة عدم وجود محفزات خارجية، تؤدي بعض طفرات جينات الراس إلى استبدال الأحماض الأمينية في البروتين الذي ينتج عنه، مما يغير مسار نقل الإشارة الذي يحفز تكاثر الخلايا المستنسخة.

**هدف الدراسة:** تحديد تواجد طفرة *KRAS* في حالات سرطان القولون والمستقيم من خلال الدراسة النسيجية المناعية الكيميائية وتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل وتقييم صحة الكشف المناعي لطفرة *KRAS* مقارنة بطريقة النمط الجيني في سرطان القولوني والمستقيم الغدي. ومقارنة التعبير المناعي لطفرة *kras* مع بعض المعلمات المرضية السريرية.

**المواد وطريقة العمل:** أعطت لجنة أخلاقيات البحوث بكلية الطب بجامعة الموصل موافقتها على هذه الدراسة الاستراتيجية والمستقبلية. في الفترة من نوفمبر 2021 إلى فبراير 2022، تم جمع 50 كتلة من الأنسجة المضمنة في الفورمالين (FFPE) من مرضى سرطان القولون والمستقيم الذين خضعوا لاستئصال القولون من مختبرات علم الأمراض الخاصة في مدينة الموصل/العراق

تتكون الدراسة من جزأين، الجزيئية والنسيجية المناعية الكيميائية لتقييم طفرة *KRAS* في عينات سرطان القولون والمستقيم. تم جمع معلومات ديموغرافية (العمر عند التشخيص والجنس) وتضاريس الورم (الحجم وحالة العقد اللمفاوية وموقع الورم ومرحلة الورم ودرجة التمايز). تم فحص جميع الكتل واختيار الكتلة التي تحتوي على أفضل ورم (بدون نخر، نسيج اللحمية المتوسطة الصغير) لهذه الدراسة. تم صبغ جميع كتل البارافين بالهيماتوكسيلين والإيوزين ومراجعتها لتقييم الأنسجة المرضية. تم إجراء الصبغة النسيجية المناعية الكيميائية لجميع الحالات. وفيما يتعلق بالفحص الجزيئي لتحديد طفرات *KRAS* على أساس تفاعل البلمرة المتسلسل والتجهين العكسي للتشخيص المختبري لتشخيص *KRAS* باستخدام xl stripAssay kit المصنعة من قبل مختبر فيينا، فيينا، النمسا في الدراسة الجزيئية. ثم

تم تايده بطريقة تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام @ Sensiscreen kit \USA . تم كل ذلك العمل في مستشفى خاص في مدينة أربيل / العراق.

**النتائج:** خلال 8 أشهر ، فحصت الدراسة ما مجموعه 50 حالة من سرطان القولون والمستقيم ، والعوامل السريرية المرضية المختلفة موصوفة أدناه . كان متوسط العمر (الانحراف المعياري) (54.80) مع نطاق يتراوح بين 20-85 سنة ، حوالي (22) 44 ٪ من الإناث و 28 ( 56٪) من الذكور ، وكانت النسبة الإجمالية للذكور:الإناث 1.2:2. وفقا لأنواع المجهرية ، 44 (88٪) من الحالات الغدية و 5 (10٪) من النوع المخاطي و 1 (2٪) من ورم الغدد الصم العصبية. فيما يتعلق بالتصنيف النسيجي ، كانت 10 حالات (20٪) متباينة بشكل جيد و 29 (58٪) حالات متباينة بصورة معتدلة و 11 (22٪) كانت حالات متباينة ضعيفة. كان ورم العقدة الليمفاوية الخبيث إيجابيا في 23 (46٪) والأنسجة العقدية الحرة في 27 (54٪) من الحالات. كان تعبير *kras* المناعي بالطريقة النسيجية المناعية 28 (56 ٪) إيجابي بينما 22 (44٪) كان لديهم تعبير مناعي سلبي دون علاقة كبيرة بين المعلمات السريرية المرضية (العمر ، المرحلة ، الدرجة ، الموقع ، الحجم ، الجنس).علاقة ترابطية احصائية قوية فقط مع نوع النسيجي الغدي السرطاني 27 (54٪) ،ص قيمة 0.001.

تم العثور على كودونات إكسون 2 (12 و 13 و 146) من *kras* الجين الورمي قد تحور في 26 (52٪) من 50 حالة تمت دراستها. في المقابل ، كان لدى 24 (48٪) تسلسل من النوع البري. كودون 12 كانت سائدة ، حوالي 20 من إجمالي الحالات الإيجابية (26).في حين أن 5 فقط للكودون الثالث عشر و واحد فقط للكودون 146 ، اذ كان هنالك ترابط احصائي قوي بين التعبير المناعي لكراس والطفرة الجينية لكراس بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل حيث كانت القيمة الاحصائية تساوي 0.001 دون علاقة كبيرة بالعمر والمرحل والصف وحجم حالة العقدة الليمفاوية وموقع الورم وطفرة *KRAS* بواسطة تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل.

**الاستنتاج:** أظهرت هذه الدراسة أن تواتر بروتين *K-ras* الإيجابي في سرطان القولون والمستقيم بواسطة التقنية النسيجية المناعية الكيميائية كان 56٪ ، وكان تواتر الطفرة الجينية *kras* في سرطان القولون والمستقيم بطريقة تفاعل البلمرة المتسلسل 52 ٪. اظهرت النتائج علاقة مهمة بين تعبير *K-ras* بطريقة الصبغة المناعية الهستوكيميائية وطفرة جين *KRAS* ، وبالتالي قد يكون التعبير البروتيني *K-ras* مفيداً كبديل للدراسة الجزيئية في المستقبل باستخدام طرق متقدمة لتمييز بروتين *K-ras* المتحول من النوع البري وكان انتشار التعبير عن بروتين *K-ras* بواسطة تقنية الصبغة النسيجية المناعية الكيميائية بشكل أساسي في سرطان القولون والمستقيم الغدي بنسبة 54٪ دون اختلافات كبيرة

نحن اعضاء التقويم والمناقشة قد اطلعنا عل هذه الرسالة (تحديد طفرة KRAS في سرطان القولون والمستقيم: دراسة جزيئية.) وناقشنا الطالبة سراء احمد قحطان في محتوياتها وفي ما له علاقة بها واتها جديرة لنيل شهادة الماجستير في علم الامراض.

د.سامان صلاح الدين عبدالله

د.وحدة محمد طيب النعيمي

استاذ مساعد في علم الامراض انسيج مرضي

استاذ في علم الامراض انسيج المرضي

عضوا

(رئيسا)

التاريخ:

التاريخ:

د. زهراء مروان شعبان

د.ندوى صبحي العزو

مدرس في علم الامراض اوراثة طبية

استاذ مساعد في علم الامراض النسيج

( عضوا ومشرفا )

المرضي

(عضوا)

التاريخ:

التاريخ: