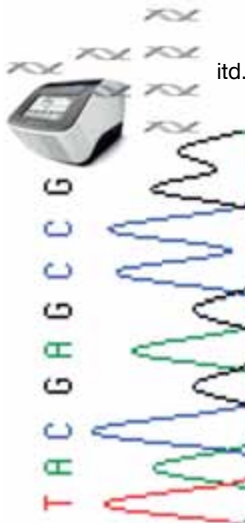


kwalifikowani chorzy, których nowotwory nie wykazują mutacji w genach *KRAS*, *NRAS* (mutacje w eksonach 2-4) i *BRAF* (mutacja *BRAF V600E*)<sup>6</sup>. Obecność tych mutacji wskazuje na brak wrażliwości na przeciwciała anty-EGFR, gdyż produkty białkowe zmutowanych genów *KRAS*, *NRAS* i *BRAF* powodują ciągłą aktywację szlaku MAPK, co z kolei sprawia, że blokowanie EGFR, będącego pierwszym ogniwem wymienionego szlaku, jest nieskuteczne. Diagnostykę omawianych mutacji wykonuje się na materiale pooperacyjnym (guz pierwotny i materiał z przerzutów do narządów odległych) z wykorzystaniem sekwencjonowania nowej generacji (NGS) (ryc. 12.5) lub sekwencjonowania sangerowskiego (ryc. 12.3) bądź qPCR (ryc. 12.2).

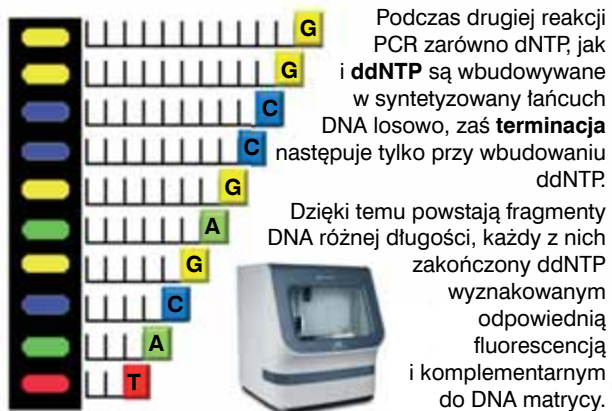
W celu poznania dokładnej sekwencji nukleotydów w określonym amplikonie można zastosować

### SEKWENCJONOWANIE METODĄ SANGERA

**PCR 1:** (1) Polimeraza, (2) dNTP, (3) startery.



**PCR 2:** (1) Polimeraza, (2) dNTP, (3) startery. Do drugiej reakcji PCR oprócz dNTP domiaremckowywane są **ddNTP wyznakowane różnego koloru fluorochromami**. **ddNTP** są wbudowywane w syntetyzowaną nić DNA przez polimerazę, jednak ich wbudowanie doprowadza do **TERMINACJI**, czyli uniemożliwia dalszą syntezę DNA.



Ostatecznie podczas elektroforezy kapilarnej następuje rozdział fragmentów i odczytanie sekwencji nukleotydów w badanym DNA.

#### RYCINA 12.3.

Sekwencjonowanie metodą Sanger – ogólna zasada działania.

<sup>6</sup> Wykazano, że u pacjentów, u których nie stwierdzono mutacji w eksonie 2 *KRAS* i u których jednocześnie w analizie retrospektywnej wykryto mutacje w innych eksonach *KRAS* lub *NRAS*, leczenie przeciwciałami anty-EGFR przyspieszało rozwój choroby.