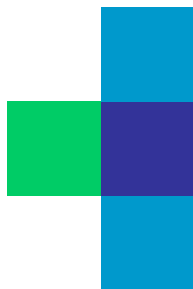


k-ras-Mutationsanalyse am Institut für
Pathologie des Universitätsklinikums
Erlangen

- Fallstricke in der
molekularpathologischen Diagnostik -

Dr. Robert Stöhr

**Universitätsklinikum
Erlangen**



Grundvoraussetzungen

- Material für die Analyse:
 - Gewebe-basierte Untersuchung



Archivmaterial: Paraffinblock



Frischmaterial

Grundvoraussetzungen

- Material für die Analyse:
 - Gewebe-basierte Untersuchung
 - Analyse auf DNA-Ebene



Archivmaterial: Paraffinblock



Frischmaterial

Grundvoraussetzungen

- Auswahl des geeigneten Gewebe-Blocks:
 - (ausreichend) Tumormaterial
 - (ausreichende) Gewebequalität (gepuffertes Formalin!)
 - **Nur durch einen Pathologen möglich!!!**



Grundvoraussetzungen

- Auswahl des geeigneten Gewebe-Areals:
 - Heterogenes Verhältnis Tumor- vs. Nicht-Tumor-Gewebe
 - => Mischung aus WT- und mutierter DNA-Sequenzen
 - Tumor kann heterozygot od. homozygot für *k-ras*-Mutation sein!
 - => „Anzeichnen“ des idealen Areals zur Analyse auf Gewebeschnitt (H&E-Färbung)!
 - **Nur durch einen Pathologen möglich!!!**
 - **Mikrodissektion!!! (70-90% Reinheit)**

Grundvoraussetzungen

- Auswahl der geeigneten Analysemethode
 - Bisher keine Empfehlungen!! => freie Wahl der Methodik!!
 - Großes Spektrum an Methoden verfügbar
 - Unterschiedlichste Sensitivität
 - 2 kommerzielle *Kits* erhältlich
 - Keine aussagekräftigen Studien zur Vergleichbarkeit der Methoden!!

Table 1 Overview of methods used for *KRAS* genotyping(Van Krieken *et al.*, 2008)

Method	Intended use
Gel electrophoresis assays	
Temporal temperature gradient electrophoresis	LBM
Denaturing gradient gel electrophoresis	LBM
Constant denaturant capillary electrophoresis	LBM
SSCP assay	LBM
Sequencing	
Dideoxy sequencing	LBM, RUO kit
Pyrosequencing	LBM
PyroMark™ <i>KRAS</i>	RUO kit
Allele-specific PCR assays^a	
Allele discrimination based on primer design	
ARMS-PCR	LBM
<i>KRAS</i> mutation test kit	RUO kit
TheraScreen® kit	CE-Mark kit for clinical use
<i>KRAS</i> LightMix® kit	CE-Mark kit for clinical use
REMS-PCR	LBM
FLAG assay	LBM
Enriched PCR-RFLP	LBM
Allele discrimination based allele-specific ligation detection reaction	
PCR-LDR	LBM
PCR-LDR spFRET assay	LBM
Allele discrimination based on discriminating amplification efficiencies at low melting temperatures	
COLD-PCR	LBM
Other methods	
Surface ligation reaction and biometallization	LBM
Multi-target DNA assay panel	LBM
Allele-specific oligonucleotide hybridization—Invigene®	
<i>KRAS</i> genotyping kit	LBM, RUO kit

LBM Laboratory-based method, not commercially available, RUO: research use only, not validated for clinical applications

^a Allele-specific assays are also used by vendors offering *KRAS* genotyping services

Qualitätssicherung der Methodik



Ringversuch der ***Deutschen Gesellschaft für Pathologie*** und des ***Berufsverbandes der Deutschen Pathologen*** in Zusammenarbeit mit AMGEN.

Qualitätssicherung der Methodik



- Analyse von 10 Kolonkarzinomen
- Material: 5 Paraffin-Schnitte / Fall
- Bearbeitungsdauer: 2 Wochen
- Max. 1 falsches Ergebnis toleriert
- Bei Bestehen: Zertifikat

k-ras-Analyse im Pathologischen Institut des Universitätsklinikums Erlangen



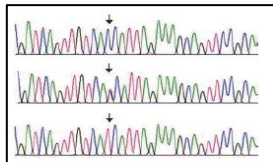
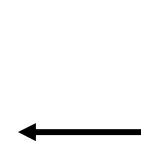
Ausgangsmaterial: Primärtumor/Metastase
Paraffinblock/Gefriermaterial



„Anzeichnen“ des
Tumors auf HE-Schnitt



Manuelle
Mikrodissektion
+
Genomische DNA-
Isolierung



PCR
+
Direkte Sequenzierung

k-ras-Mutationen

k-ras Exon 2
Codon 12 & 13
→ 90 % aller Mutationen

Codon	10	11	12	13	14	15	
	GGA Gly	GCT Ala	GGT Gly	GGC Gly	GTA Val	GGC Gly	<i>wt k-ras</i>
	GGA Gly	GCT Ala	GAT Asp	GGC Gly	GTA Val	GGC Gly	<i>mut k-ras</i>
	GGA Gly	GCT Ala	GCT Ala	GGC Gly	GTA Val	GGC Gly	
	GGA Gly	GCT Ala	GTT Val	GGC Gly	GTA Val	GGC Gly	
	GGA Gly	GCT Ala	AGT Ser	GGC Gly	GTA Val	GGC Gly	
	GGA Gly	GCT Ala	CGT Arg	GGC Gly	GTA Val	GGC Gly	
	GGA Gly	GCT Ala	GAT Cys	GGC Gly	GTA Val	GGC Gly	
	GGA Gly	GCT Ala	GGT Gly	GAC Asp	GTA Val	GGC Gly	

Grundlage der Methodik

Human Cancer Biology

***BRAF* Mutation in Endometrial Carcinoma and Hyperplasia: Correlation with *KRAS* and *p53* Mutations and Mismatch Repair Protein Expression**

Yu-Zhen Feng,^{1,2} Tanri Shiozawa,¹ Tsutomu Miyamoto,¹ Hiroyasu Kashima,¹
Miyuki Kurai,¹ Akihisa Suzuki,¹ and Ikuo Konishi¹

Clinical Cancer Research 11 (178): 6133-6138, 2005

Grundlage der Methodik

k-ras-Sequenz Exon 2

INTRON

Primer sense

ttttcatataaagggtgagttgtattaaagggtact**ggaggagtatttgatagtgta**ttaaccttatgtgtgacatgttctaataatagtcacatttcattatttttattataag

Codon 12

EXON

GCCTGCTGAAA**ATG**ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCT**GGTGGC**GTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCT

Codon 13

GGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAG

INTRON

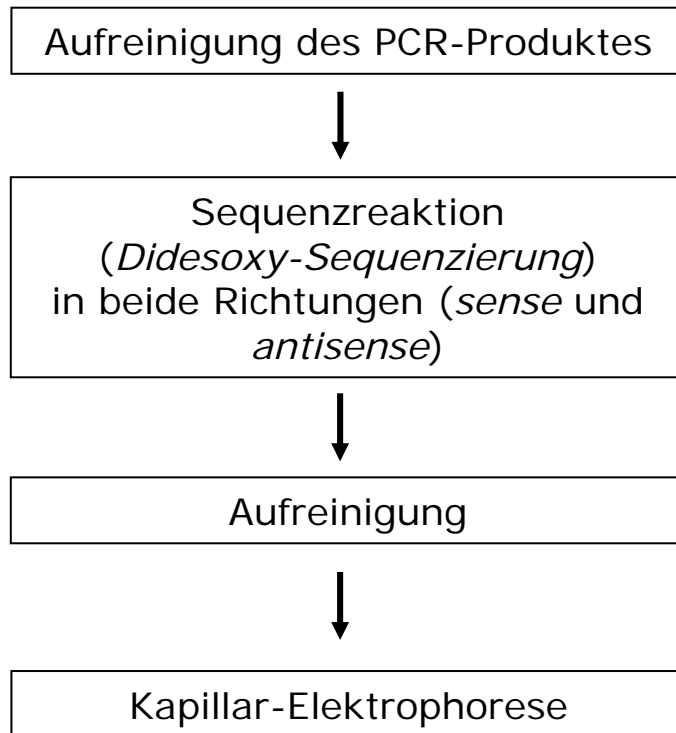
gtaaatctgttttaatat**gcatattactggtgcaggacc**attctttgatacagataaagggttctctgaccatttcacatgagtacttattacaagataattatgctgaaagttaagtat

Primer antisense

PCR-Produkt: 241bp

Universitätsklinikum
Erlangen

Grundlage der Methodik



Zusätzlich zum Patientenmaterial werden immer 2 Kontrollen analysiert:

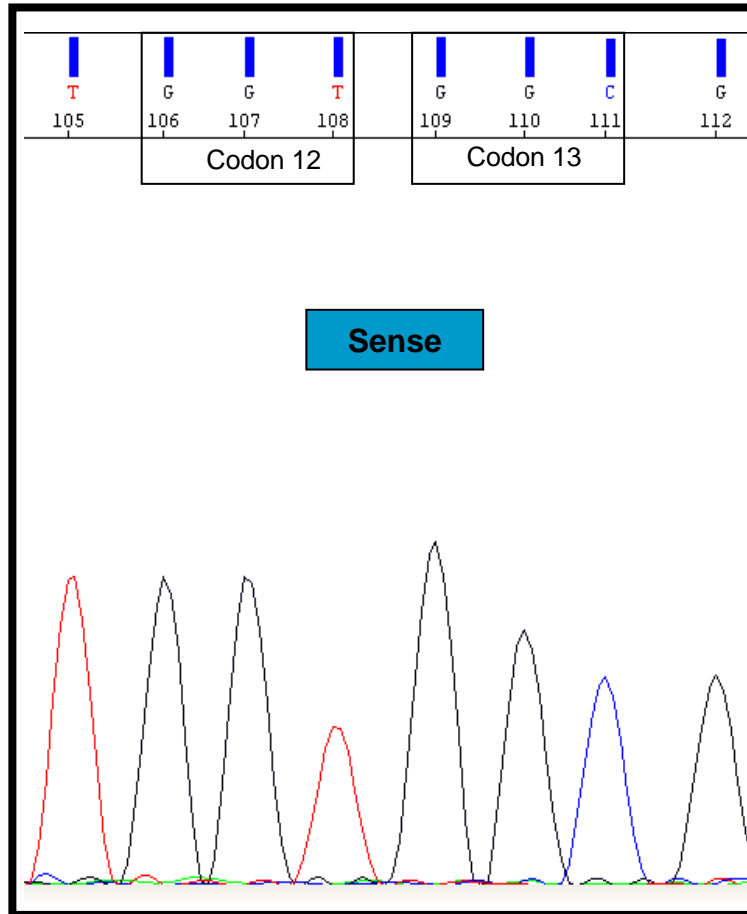
Zelllinie HCT116: bekannte *k-ras*-Mutation im Codon 13

Wasserkontrolle

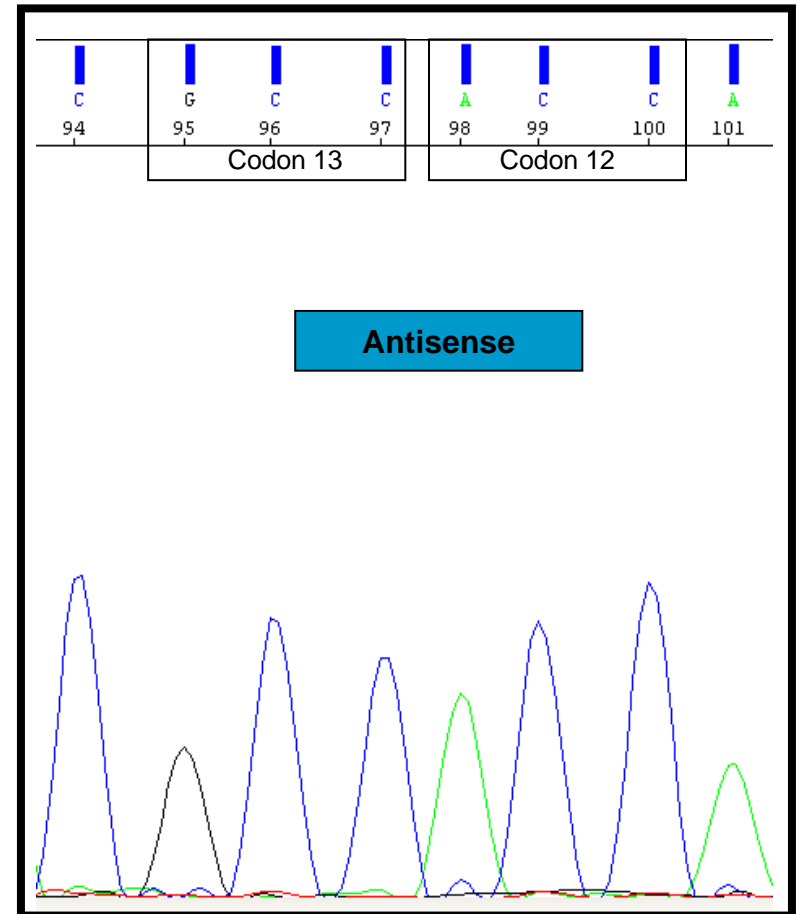


ABI 310 Genetic Analyzer

k-ras-Analyse

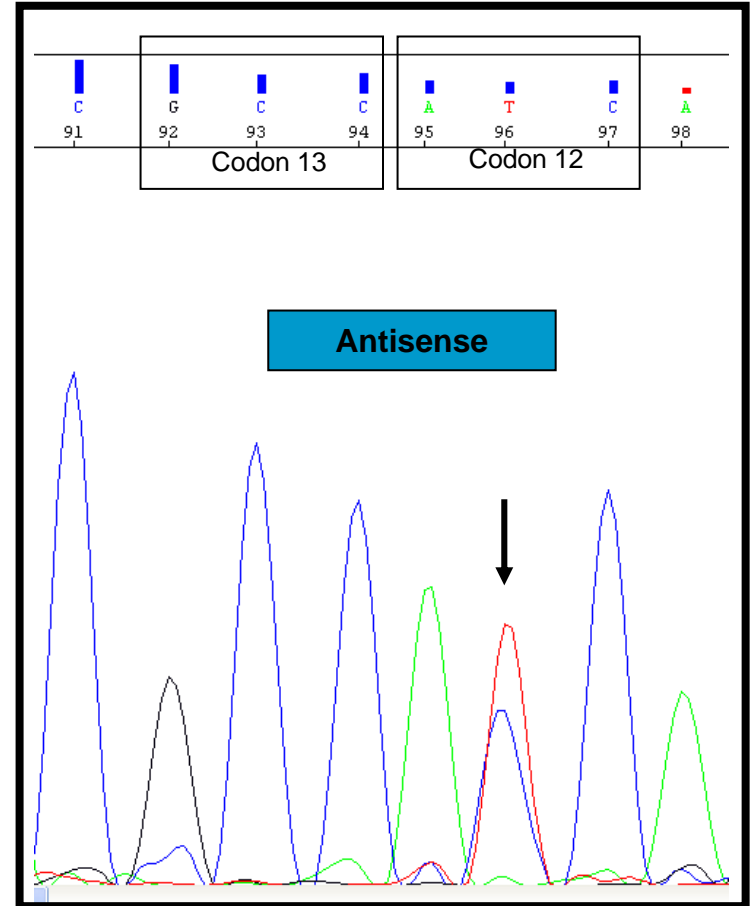
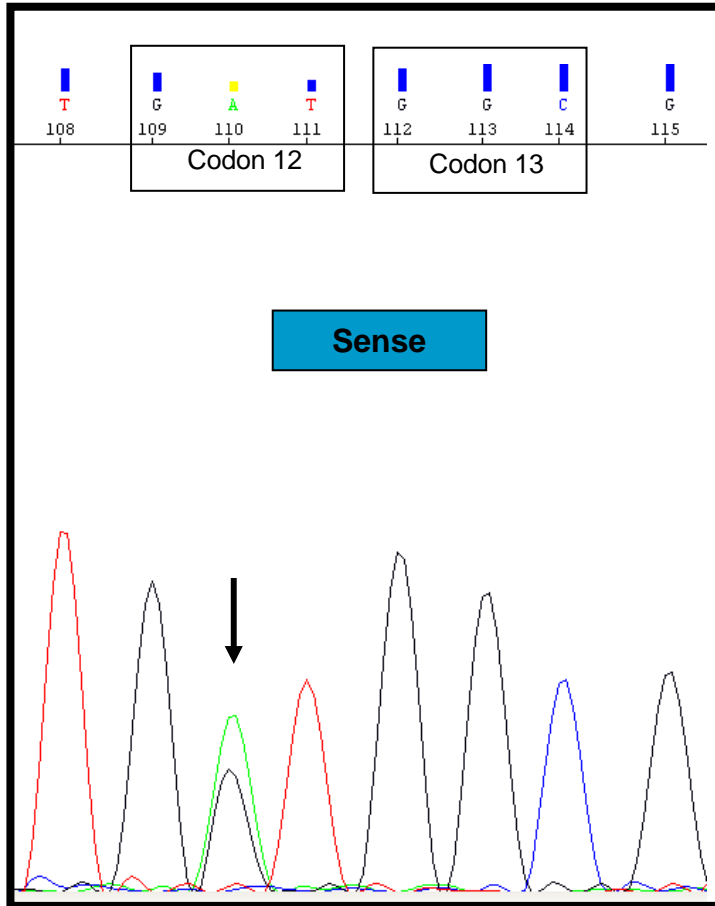


Wildtyp-Sequenz



Universitätsklinikum
Erlangen

k-ras-Analyse



Codon 12 : GGT => GAT / Gly12Asp

Qualitätssicherung unserer Methodik

■ „interner Test“:

- PD Dr. Zenker (Humangenetik):
 - Proben mit *k-ras*-Mutationen geblindet analysiert (Mutationen außerhalb der Codons 12 und 13) ✓
- Prof. Dr. Lehmann (Pathologie Hannover):
 - Colon-Ca.-DNA-Proben geblindet analysiert ✓

■ „offizieller Test“:

- Teilnahme am Ringversuch der QuIP

Teilnahmezertifikat
Ringversuch Molekularpathologischer
KRAS Mutationstest beim
Kolonkarzinom

2008

Dr. Robert Stöhr hat für das Institut für Pathologie des
Universitätsklinikums Erlangen
am Ringversuch
mit Erfolg teilgenommen.

Leiter des Ringversuchs: PD Dr. rer. nat. A. Jung und Prof. Dr. med. T. Kirchner

Hannover/Regensburg, 13.05.2008

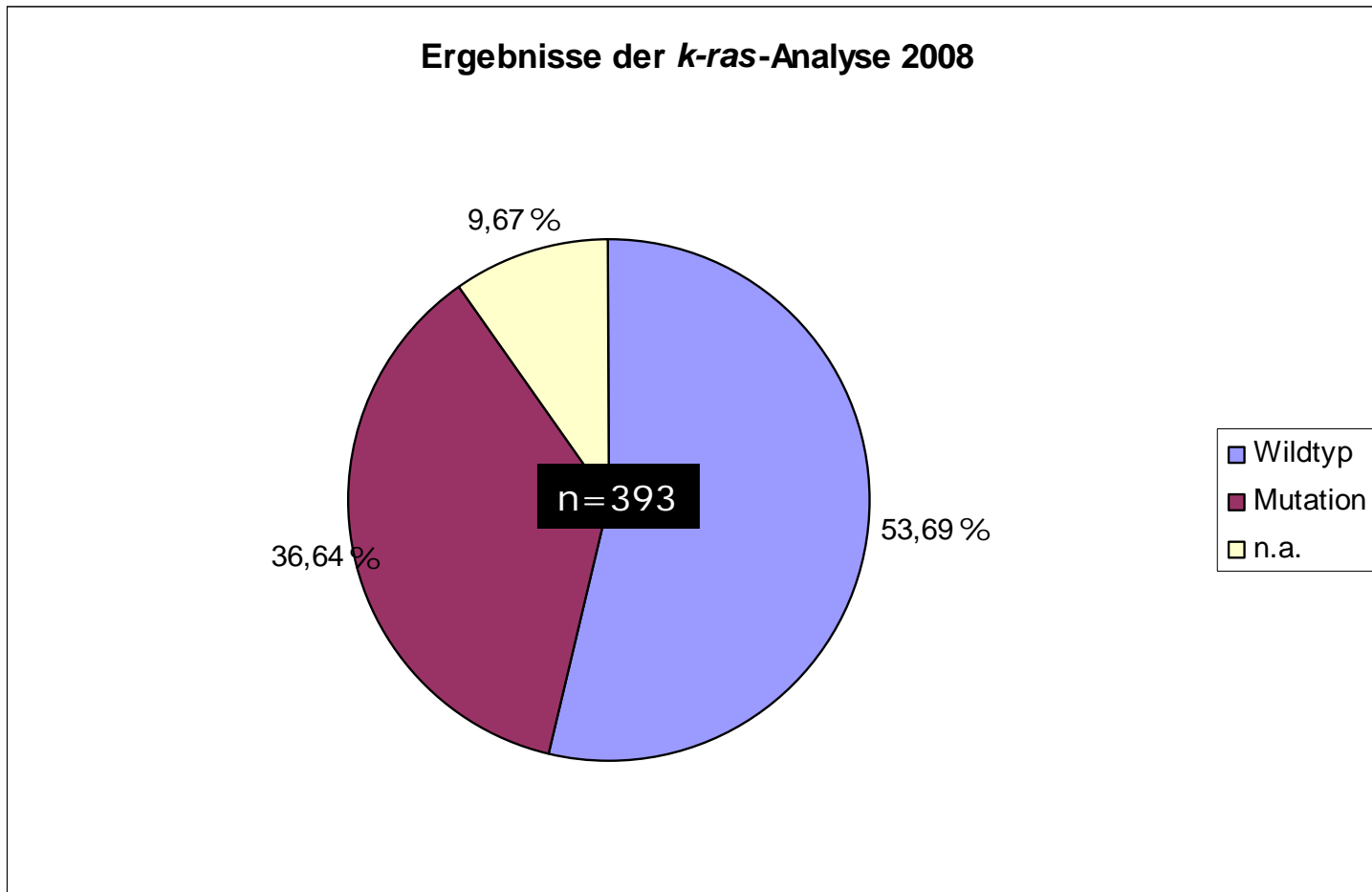
Prof. Dr. med. Hans H. Kreipe
Direktor des Institutes für
Pathologie der MH-Hannover
Vorstand
Deutsche Gesellschaft für Pathologie e.V.

Prof. Dr. med. Hans H. Kreipe

Prof. Dr. med. Ferdinand Hofstädter
Institut für Pathologie
Medizinische Fakultät der Universität Regensburg
Vorstand
Berufsverband Deutscher Pathologen e.V.

Prof. Dr. med. Ferdinand Hofstädter

k-ras-Analyse: eigene Daten



Literatur-Daten zur Verteilung der k-ras-Mutation beim metastasierten Kolon-Karzinom

Reference	Treatment	n	K-RAS Wt : Mut (%)	ORR K-RAS Wt N (%)	ORR K-RAS Mut N (%)
Amado et al. (JCO 2008)	Panitumumab	208	60 : 40	21 (17%)	0 (0%)
Benvenuti et al. (Cancer Res 2007)	Panitumumab (n = 25)	48	67 : 33	3 (12%)	1 (6%)
	ERBITUX (n = 12)			3 (25%)	0 (0%)
	ERBITUX + Irinotecan (n = 11)			4 (36%)	0 (0%)
Lièvre et al. (JCO 2008)	ERBITUX (n = 2)	89	73 : 27	26 (40%)	0 (0%)
	ERBITUX + Irinotecan (n = 87)				
De Roock et al. (Ann Oncol 2007)	ERBITUX (n = 30)	113	59 : 41	5 (28%)	0 (0%)
	ERBITUX + Irinotecan (n = 83)			22 (46%)	0 (0%)
Finocchiaro et al. (ASCO 2007)	ERBITUX (n = 5)	85	60 : 40	13 (27%)	2 (6%)
	ERBITUX + Irinotecan (n = 77)				
	ERBITUX + Oxaliplatin (n = 3)				
Di Fiore et al. (Br J Cancer 2007)	ERBITUX + Irinotecan	59	73 : 27	12 (28%)	0 (0%)
	ERBITUX + Oxaliplatin				
Khambata-Ford et al. (JCO 2007)	ERBITUX	80	63 : 37	5 (10%)	0 (0%)

Ø: Gesamt: n=682: WT : Mut: 63,5% : 36,5%

k-ras-Analyse: eigene Daten

■ aktuelle Diskussionen:

- Wahl der Methodik?
- Wahl des Gewebes: Primärtumor – Metastase?
 - Diskrepante Ergebnisse!!!
 - „nur“ 95% Übereinstimmung (Santini *et al.*, 2008)
 - Empfehlung: Primärtumor (Van Krieken *et al.*, 2008)
- Klinische Relevanz von seltenen Mutationen?
 - z.B. Codons 8,9,10,15,16,19,20,25,59,61,117 (Rouleau *et al.*, 2008)
 - z.B. Gly13Arg (GGC => CGC), Gly13Cys (GGC => IGC)
- Europaweites Qualitätssicherungsprogramm

Neue molekulare prädiktive Marker?

VOLUME 26 · NUMBER 35 · DECEMBER 10 2008

JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY

ORIGINAL REPORT

Wild-Type *BRAF* Is Required for Response to Panitumumab or Cetuximab in Metastatic Colorectal Cancer

Federica Di Nicolantonio, Miriam Martini, Francesca Molinari, Andrea Sartore-Bianchi, Sabrina Arena, Piercarlo Saletti, Sara De Dossò, Luca Mazzucchelli, Milo Frattini, Salvatore Siena, and Alberto Bardelli

From the Laboratory of Molecular Genetics, The Oncogenomics Center, Institute for Cancer Research and Treatment, University of Torino Medical School, Candiolo; The Falck Division of Medical Oncology, Ospedale Niguarda Ca' Granda; Italian Foundation for Cancer Research-Institute of Molecular Oncology, Milan, Italy; Laboratory of Molecular Diagnostic, Istituto Cantonale di Patologia, Locarno; and Oncology Institute of Southern Switzerland, Ospedale San Giovanni, Bellinzona, Switzerland.

Submitted June 3, 2008; accepted August 28, 2008; published online ahead of print at www.jco.org on November 10, 2008.

Supported by the Italian Association for Cancer Research, Italian Ministry of Health, Regione Piemonte, Italian Ministry of University and Research, Association for International Cancer Research, EU FP6 MCSCs Contract No. 037297, CRT Progetto Alfieri, Oncosuisse Grant No. OCS-01921-08-2006, Fondazione Ticinese per la Ricerca sul Cancro, and Oncologia Ca' Granda Onlus Fondazione.

F.D.N., M.M., and F.M. contributed equally to this work.

M.F., S.S., and A.B. are co-senior authors.

A B S T R A C T

Purpose

Cetuximab or panitumumab are effective in 10% to 20% unselected metastatic colorectal cancer (CRC) patients. *KRAS* mutations account for approximately 30% to 40% of patients who are not responsive. The serine-threonine kinase *BRAF* is the principal effector of *KRAS*. We hypothesized that, in *KRAS* wild-type patients, *BRAF* mutations could have a predictive/prognostic value.

Patients and Methods

We retrospectively analyzed objective tumor responses, time to progression, overall survival (OS), and the mutational status of *KRAS* and *BRAF* in 113 tumors from cetuximab- or panitumumab-treated metastatic CRC patients. The effect of the *BRAF* V600E mutation on cetuximab or panitumumab response was also assessed using cellular models of CRC.

Results

KRAS mutations were present in 30% of the patients and were associated with resistance to cetuximab or panitumumab ($P = .011$). The ***BRAF* V600E** mutation was detected in 11 of 79 patients who had wild-type *KRAS*. None of the *BRAF*-mutated patients responded to treatment, whereas none of the responders carried *BRAF* mutations ($P = .029$). *BRAF*-mutated patients had significantly shorter progression-free survival ($P = .011$) and OS ($P < .0001$) than wild-type patients. In CRC cells, the introduction of *BRAF* V600E allele impaired the therapeutic effect of cetuximab or panitumumab. Treatment with the *BRAF* inhibitor sorafenib restored sensitivity to panitumumab or cetuximab of CRC cells carrying the V600E allele.

Conclusion

BRAF wild-type is required for response to panitumumab or cetuximab and could be used to select patients who are eligible for the treatment. Double-hit therapies aimed at simultaneous inhibition of epidermal growth factor receptor and *BRAF* warrant exploration in CRC patients carrying the V600E oncogenic mutation.

BRAF-Mutationsscreening

Gewebe-basierte Untersuchung

Analyse auf DNA-Ebene

Mutation in Codon 600: V600E

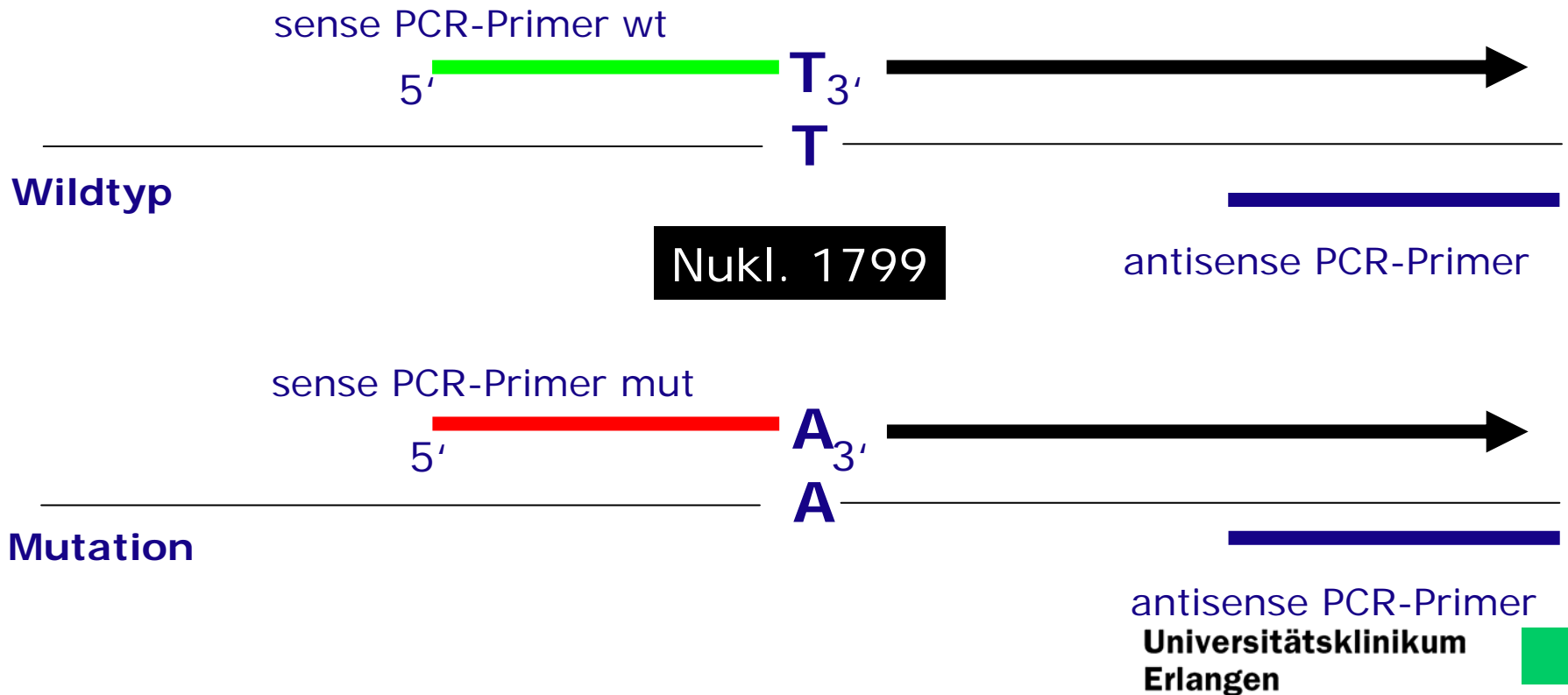
GTG => GAG (Nukl. 1799)



Allelspezifische PCR (PASA: PCR Amplification of Specific Alleles)

BRAF-Mutationsscreening

Prinzip: PASA



BRAF-Mutationsscreening

sense PCR-Primer mut

5'

A
T

3'

**Mismatch des 3'-Endes
des Primers => keine
Amplifikation!**

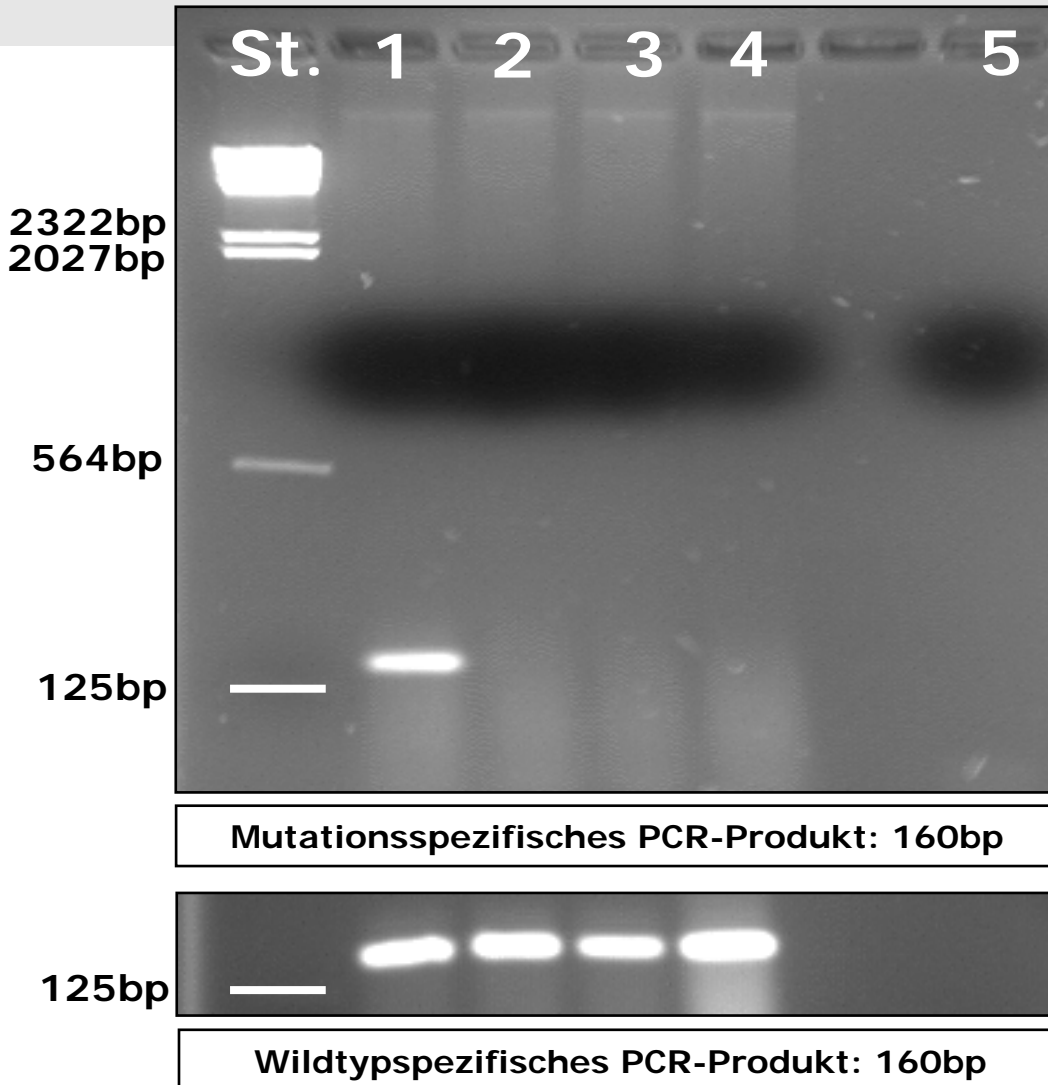
Wildtyp

antisense PCR-Primer

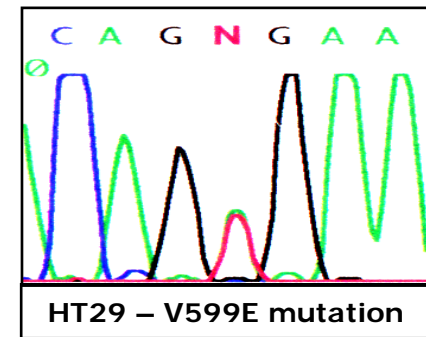
Screening:

- Mutations-spezifischer Primer: nur DNA MIT der Mutation kann amplifiziert werden!
- Wildtyp-spezifischer Primer: DNA kann immer amplifiziert werden (= > DNA-Qualitätskontrolle!)

BRAF-Mutationsscreening

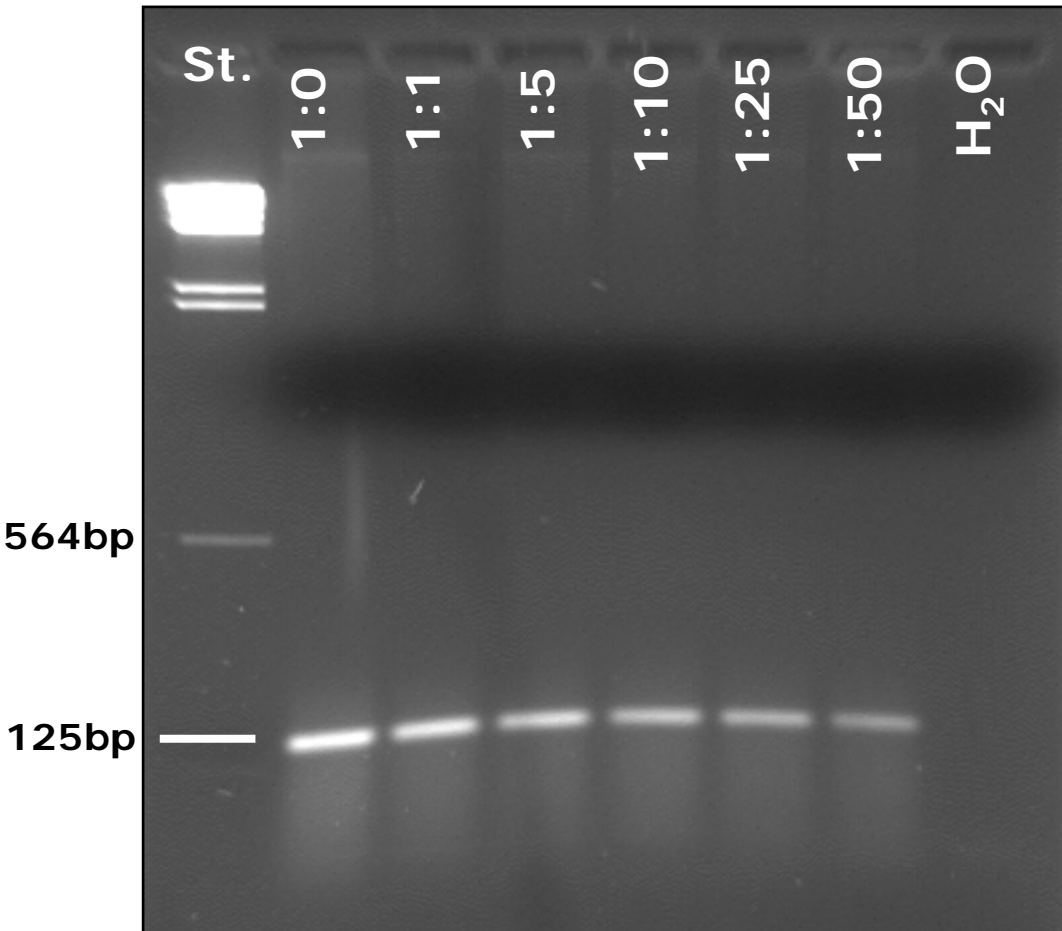


- 1: HT 29: Mutation 5'-GAG-3'
(Davies *et al.*, Nature 417, 2002)



- 2: RT 4: Wildtyp 5'-GTG-3'
(Davies *et al.*, Nature 417, 2002)
- 3: UROtsa: Wildtyp 5'-GTG-3'
(Normalurothel)
- 4: SK BR-3: Wildtyp 5'-GTG-3'
(Davies *et al.*, Nature 417, 2002)
- 5: H₂O

BRAF-Mutationsscreening



Verdünnungsreihe: HT29 mit SK BR-3

Sensitivität der
PASA:
Mutation kann
noch bei einem
Hintergrund von
98% an *wt*-
Sequenz
nachgewiesen
werden!

BRAF-Mutationsscreening

- eigene Studien unter Anwendung der Methodik:

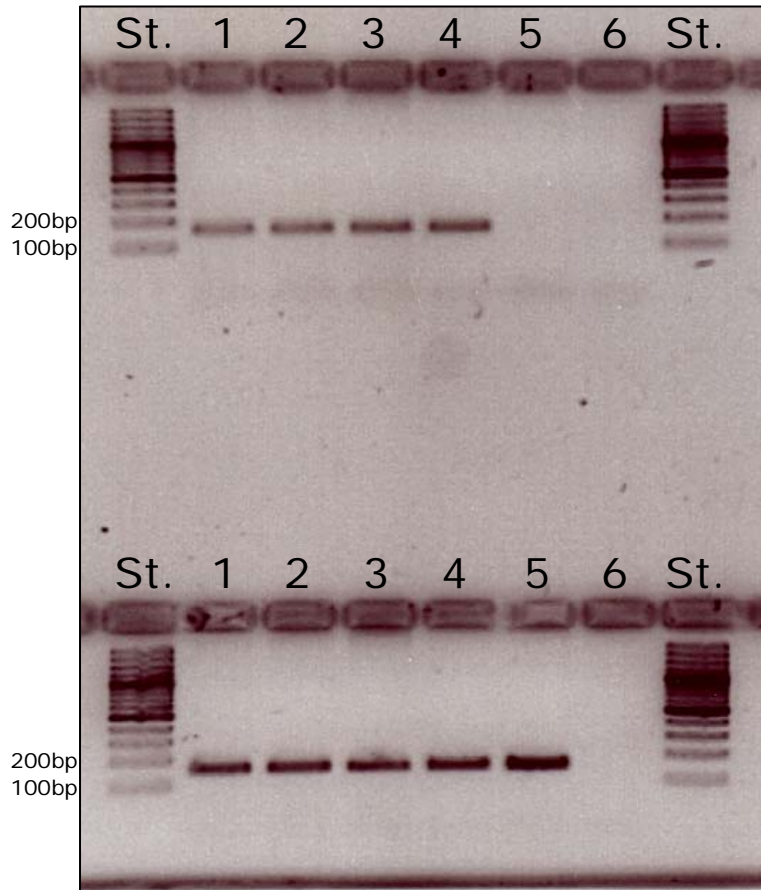
Stoehr *et al.*, Oncol Rep, 2004 (Urothelkarzinom)

Burger, ..., Stoehr, Eur Urol, 2006 (Prostatakarzinom)

Hafner, Stoehr, *et al.*, Br J Dermatol, *in press* (Haut)



BRAF-Mutationsscreening



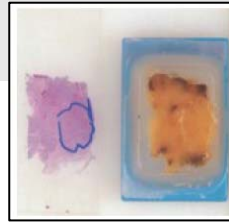
**Bereits in unserem
Institut etabliert!**

- 1: Polyp
- 2: SSA
- 3: *high grade* Dysplasie
- 4: HT29
- 5: HCT116
- 6: H₂O

Fall bereit gestellt von PD Dr.med. Vieth, Bayreuth

Universitätsklinikum
Erlangen

Zukünftiges Mutationsscreening



„Anzeichnen“ des Tumors auf
HE-Schnitt

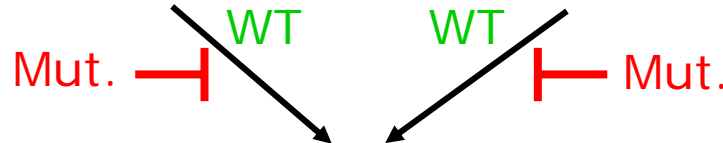
Manuelle Mikrodissektion
+
Genomische DNA-Isolierung

***BRAF* Nukl. 1799**

Allelspezifische PCR

***k-ras* Exon 2**

PCR + Direkte Sequenzierung



Anti-EGFR-Therapie

Universitätsklinikum
Erlangen