

Onkologische PCR Parameter basierend auf PNA-Clamps

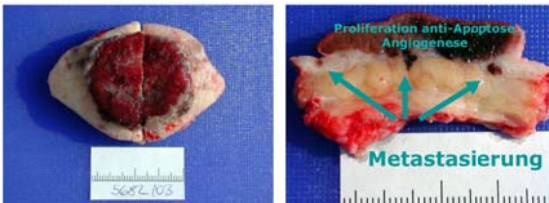
oder:

eine kurze Einführung in den RAS-RAF-MEK-ERK-MAP Kinase Pathway

Prim. Dr. Alexander Nader

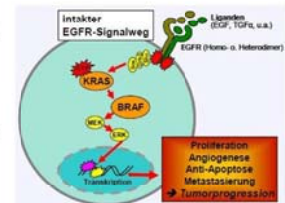
KRAS und BRAF

- zentrale Glieder im EGFR-Signaltransduktionsweg (EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor)
- Der aktivierte EGFR-Signaltransduktionsweg forciert Wachstum (Proliferation), Zellüberleben (anti-Apoptose), Gefäßbildung (Angiogenese) und Metastasierung (Ausbildung von Motilitätsstrukturen)

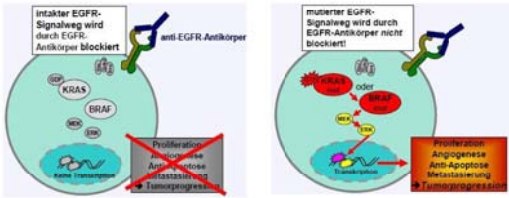


Funktion

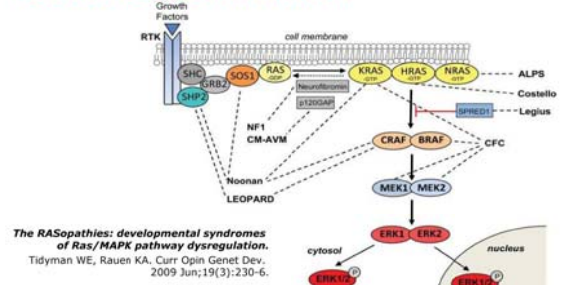
- KRAS hat die Funktion eines regulierten molekularen Schalters, der im „An“-Zustand die Signale des aktivierten EGFR an BRAF weitergibt.
- Normalerweise wechselt das aktivierte KRAS schnell zum inaktiven „Aus“-Zustand zurück, in dem es keine Signale mehr an BRAF weitergibt.
- Das durch KRAS aktivierte BRAF gibt seinerseits die Wachstumssignale zum nächsten Glied (MEK) der EGFR-Signalkaskade weiter.



pharmakologische Wirkung



hereditäre KRAS-Mutationen



The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation.
Tidyman WE, Rauen KA. *Curr Opin Genet Dev.* 2009 Jun;19(3):230-6.

somatische KRAS-Mutationen

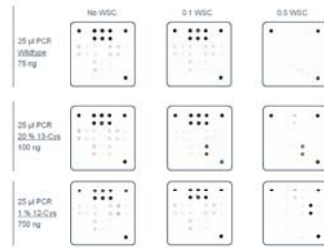
- somatische KRAS-Mutationen
 - in 30% aller Tumore
 - Leukämien!

Tumour type	Frequency of Mutations
Pancreatic	58%
Large intestine	33%
Biliary tract	31%
Small intestine	20%
Lung	17%
Ovary	14%
Cervix	%

Source: <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>
Data accessed: July 2010

LCD-Array K-RAS 1.4 Hybridisierung

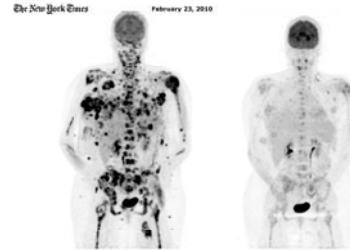
...amplification is carried out in the presence of the *k-ras* Wildtype Suppressor Compound (*K-RAS WSC*). This molecule preferentially suppresses wild type-sequence amplification and therefore allows sequence-specific detection of smallest amounts of *k-ras* mutations in codon 12 & 13.



Therapiemöglichkeiten

- sehr schlechtes Ansprechen von PatientInnen mit KRAS-mutiertem Dickdarmkarzinom auf:
 - Panitumumab (*Vectibix*[®]) 4.000 €/Monat
 - Cetuximab (*Erbix*[®]) 4.000 €/Monat
- schlechtes Ansprechen von PatientInnen mit EGFR-mutiertem Lungenkarzinom auf:
 - Erlotinib (*Tarceva*[®]) 2.000 €/Monat
- exzellentes Ansprechen von PatientInnen mit BRAF-mutierten Melanomen auf:
 - Vemurafenib (*Zelboraf*[®]) 9.350 €/Monat

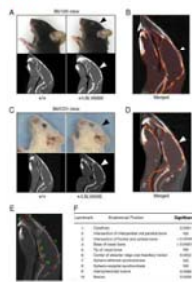
Einkaufspreise, Stand 11/2012



Peter MacCallum Cancer Centre
BEFORE AND AFTER Within weeks of starting a clinical trial of a cancer drug, nearly all of the patients began to recover. Doctors, impressed by the results, began trading scans like this one, which shows how a patient's tumors shrank in 15 days.

hereditäre BRAF-Mutationen

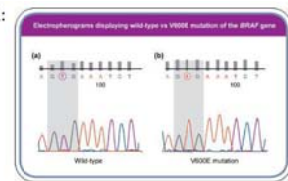
- kardio-facio-kutanes Syndrom
 - High Incidence of Chromaffin-Derived Tumors in B-Raf^{v600E}/LSLV600E Mice.
 - Expression of B-RafV600E in adult mice results in rapid development of lung adenomas and melanomas – with high frequency (20/25) and relatively short latency (about 5 mo)



Cranial defects in B-Raf^{v600E}/LSLV600E mice.
Urosevic J et al. PNAS 2011;108:5015-5020

somatische BRAF-Mutationen

- mehr als 30 verschiedene Mutationen beschrieben, ABER: in 90% Codon 600 (V600E) betroffen
 - Haarzelleukämie (100%)
 - Melanom (80%)
 - papilläres Schilddrüsenkarzinom
 - Non Hodgkin-Lymphom
 - Dickdarmkarzinom (5%)
 - AdenoCa der Lunge (1-3%)

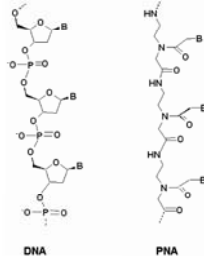


Examples of electropherograms from Sangar's dyeless cycle sequencing method, displaying (a) wild type and (b) V600E mutation of the BRAF gene in melanoma cell lines. Adapted from Spino et al. J Mol Diagn 2007;9:464-471.

Stand 11-2012

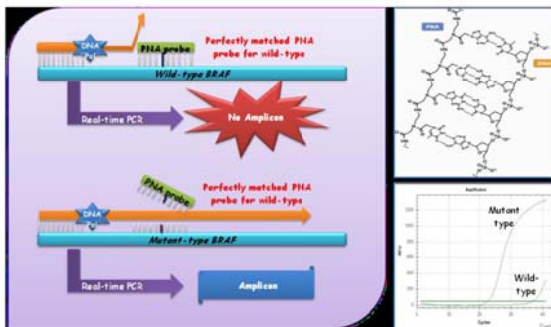
PNA Clamp Methode

- PNA, künstliches Polymer (DNÄ/RNA-Analog), 1991 von P. Nielsen in Kopenhagen erfunden
 - N-(2-Aminoethyl)glycin als Rückgrat
 - höhere Affinität für komplementäre DNA/RNA-Stränge
 - hohe Stabilität
 - von DNA-Polymerase nicht erkannt



PNA Clamp Methode

- PNA gegen Wildtyp gerichtet
- Wildtyp wird nicht amplifiziert
- nur mutierte DNA, an die sich PNA nicht binden kann, wird amplifiziert
- **Vorteil:** NW-Grenze: 0,1%
- **Nach(?)teil:** Jede Veränderung zum Wildtyp (innerhalb der PNA-Sequenz) wird detektiert



PNA vs. Scorpion ARMS/S

Accordingly, K-ras mutation testing has become mandatory in hospitals offering such treatment. We compared the performance and reagent costs of 2 sensitive methods for detection of K-ras mutations: a peptide nucleic acid (PNA) clamp polymerase chain reaction (PCR) assay and a commercially available amplification refractory mutation system/Scorpion (ARMS/S) PCR assay. Both methods were applied in parallel to 101 formalin-fixed, paraffin-embedded tumor and metastasis samples from patients with colon cancer. The PNA clamp PCR assay detected K-ras mutations in 35% (35 of 101) of the samples, whereas the ARMS/S PCR assay detected mutations in 27% (27 of 101) of them. There was 92% (93 of 101) concordance between the 2 methods and the κ coefficient for the comparison was 0.82. **The 8 discordant cases were exclusively positive by PNA clamp PCR.** Finally, the reagent costs of the PNA clamp PCR assay were estimated to be at least 20 times lower than the ARMS/S assay. We concluded that the high performance and low costs associated with the PNA clamp PCR assay encourage its use in the administration of personalized epidermal growth factor receptor-directed therapy.

Comparison of a PNA clamp PCR and an ARMS/Scorpion PCR assay for the detection of K-ras mutations. Nordgård O, Oltedal S, et al. Diagn Mol Pathol. 2012 Mar;21(1):9-13.

hanuschkrankenhaus **Onkologische PCR Parameter basierend auf PNA-Clamps**
 Prim. Dr. Alexander Nader 11/2012





Zertifikat

über die erfolgreiche Teilnahme am
BRAF Ringversuch 2012

Teilnehmer-ID: 2012A0710

Molekularpathologisches Zentrum des Institutes
 für Pathologie & Mikrobiologie
 Hanusch Krankenhaus
 Prim. Dr. Alexander Nader, Ing. Helmut Wöllberger

Graz, Mai 2012

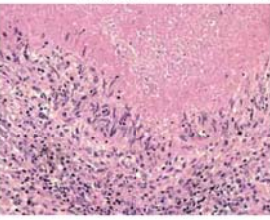
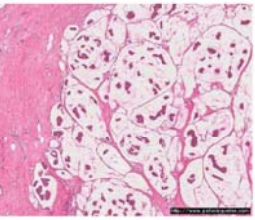




Dr. Dr. Johann Jäger
 Organisator des Ringversuches
 Dr. Helmut Wöllberger
 Organisator des Ringversuches
 Leitender Mediziner Ögynärie

hanuschkrankenhaus **Onkologische PCR Parameter basierend auf PNA-Clamps**
 Prim. Dr. Alexander Nader 11/2012

typische Probleme

- Tumorzellmenge niedrig aufgrund von
Nekrose **Schleim**

Krankenhaus der WGKK und Kompetenzzentrum der  **wgkk**


hanuschkrankenhaus **Onkologische PCR Parameter basierend auf PNA-Clamps**
 Prim. Dr. Alexander Nader 11/2012

daher obligatorische Angaben

- Anzahl Schnitte
- Schnittdicke
- Durchmesser Gewebe
- Durchmesser Tumor
- Nekrose
- Zellzahl in %

↓

- Schätzung der DNA-Menge

Krankenhaus der WGKK und Kompetenzzentrum der  **wgkk**

hanuschkrankenhaus **Onkologische PCR Parameter basierend auf PNA-Clamps**
 Prim. Dr. Alexander Nader 11/2012



Krankenhaus der WGKK und Kompetenzzentrum der  **wgkk**