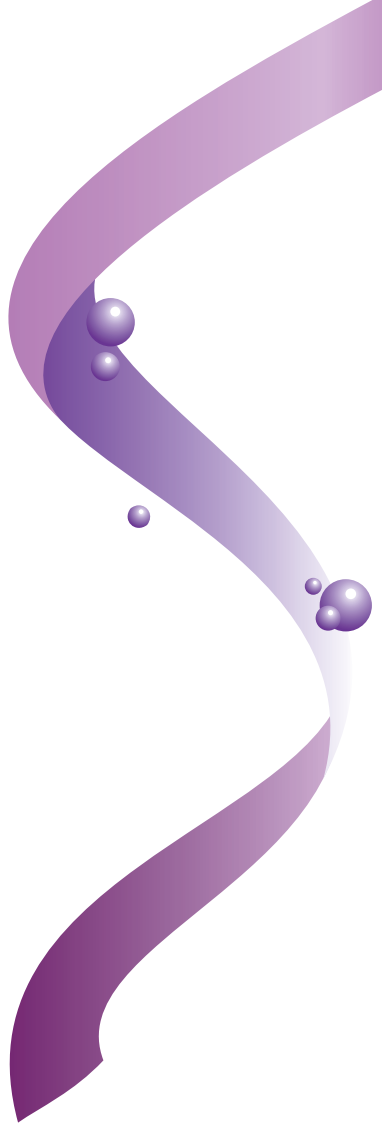


••• heterogenitet

*"Det vetenskapliga underlaget är idag tillräckligt stort för att säga att förekomst av genetisk makro- och mikrobeterogenitet förekommer i flertalet typer av maligna solida tumörer."*





Solida högmaligna tumörer utvecklar regelmässigt resistens mot målstyrd terapi. Att hitta orsaken till denna resistens bör prioriteras lika högt som att söka nya målstyrda behandlingar. Kan tumörcellsheterogenitet vara den målstyrda behandlingens akilleshäls? **David Gisselsson**, Universitetslektor i molekylär patologi, Lunds Universitet Specialistläkare, Klinisk Patologi, Region Skåne, resonerar nedan om saken.

byter plats med varandra), vilket leder till oreglerad aktivitet av tyrosinkinaset ABL. Imatinib hämmar selektivt detta kinas. Framgången med imatinib står sig ännu idag och långtidsöverlevnad för KML-patienter under imatinibbehandling ligger enligt vissa studier väl över 80%.<sup>1</sup>

Självklart väcktes hoppet om att liknande, målstyrd behandling skulle kunna göra en stor skillnad även vad gäller våra vanligaste och dödligaste cancerformer, de maligna solida tumörerna. Dessvärre har så inte blivit fallet. Trots att ett antal molekylärt målstyrda läkemedel, främst monoklonala antikroppar (antikroppar som ursprungligen kommer från en och samma cell, en klon) och småmolekylära tyrosinkinashämmare,

# Modern målstyrd terapi - från hopp till besvikelse

Individualiserad terapi och målstyrd behandling har blivit ledord i modern onkologi. Parallellt har dessa uttryck blivit nyckelbegrepp inom cancerforskning och det är idag svårt att hitta något större projekt inom cancerbiologi som inte syftar till att i slutändan hitta ett nytt behandlingsmål, i regel en molekyl som läkemedel kan riktas mot. Men, principiellt sett, hur lovande är egentligen den nya målstyrda behandling som

många av oss vurmar för? Är den inslagna vägen en säker riktning mot förbättrad överlevnad för cancerpatienter?

Den nuvarande trenden med målstyrd terapi fick sitt tydligaste genomslag för mer än 15 år sedan när tyrosinkinashämmaren imatinib visade sig vara en effektiv behandling mot kronisk myeloid leukemi (KML). Denna sjukdom karakteriseras av en specifik kromosomtranslokation (delar av kromosomer som

finns att tillgå mot främst lungcancer, koloncancer och melanom. Förvisso har upprepade studier visat signifikant effekt på överlevnadstid, i regel i storleksordningen några månader till ett par år.<sup>2</sup> Men till skillnad från vid KML uppnås ytterst sällan en varaktig effekt under längre tid. I stället utvecklar regelmässigt solida högmaligna tumörer resistens mot målstyrd terapi som gör behandlingen ineffektiv.

## VIKTIGT FÖRSTÅ BAKGRUNDEN TILL RESISTENS MOT MÅLSTYRD TERAPI

Att förstå bakgrunden till denna resistens måste prioriteras lika högt som att finna nya målstyrda terapier. Först när vi kan tackla detta problem i grunden kan den målstyrda behandlingen bli ett paradigmskifte för cancervård i stort.

Vad är det då som gör att tyrosinkinashämmare fungerar så mycket sämre vid flertalet maligna solida tumörer än vid KML? En avgörande skillnad dem emellan är att de neoplastiska cellerna vid KML (kronisk fas) är tämligen homogena, med rearrangemang av ABL1-genen som gemensam nämnare. I kontrast till detta förekommer i regel en slående stor heterogenitet mellan de cancer-celler som bygger upp en högmalign solid tumör.

Att morfologisk heterogenitet (pleomorfism) är ett signum för cancer har varit känt ända sedan begreppet neoplasmi myntades av Rudolf Virchow för mer än 150 år sedan. Men det är först med de senaste molekylärgenetiska metoderna, såsom next generation sequencing (NGS), som vi nu kan börja förstå vad tumörcellsheterogenitet egentligen innebär ur ett cellbiologiskt såväl som ur ett kliniskt onkologiskt perspektiv.

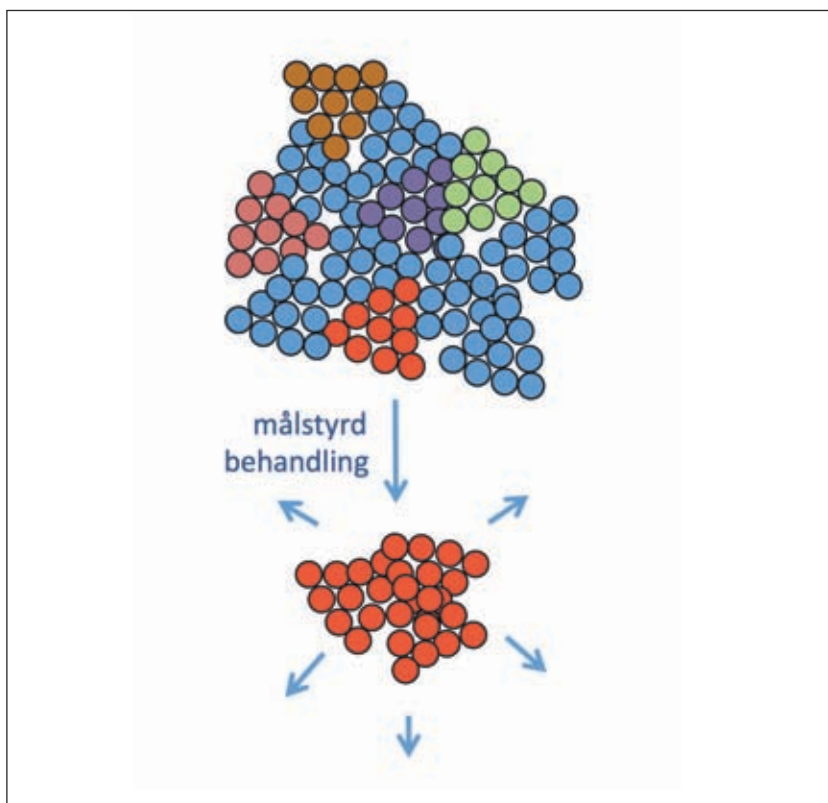
## RESISTENSUTVECKLING I LJUSET AV TUMÖRCELLSHETEROGENITET

Optimal effekt av målstyrd behandling på en enskild tumör bygger i teorin på att minst två förutsättningar är uppfyllda:

**- Det stora flertalet, helst alla, cancer-celler uttrycker mål-molekylen i aktiv form.** Exempel från klinisk rutin är påvisande av EGFR-mutationer i lungcancer, där ett positivt fynd (påvisad mutation) utgör indikation för behandling med EGFR-hämmare. Finns det inte en aktiverande mutation i det stora flertalet tumörceller gör behandlingen ingen nytta.

**- Mål-molekylens aktivitet är en förutsättning för cancer-cellernas fortsatta tillväxt.** Detta kan exemplifieras med mutationer av RAS-generna i kolorektalcancer där fynd av aktiverande mutation kontraindicerar behandling med EGFR-blockerare. Tumörer där flertalet neoplastiska celler bär sådana mutationer

## HETEROGEN TUMÖRCELLSPOPULATION MED DELVIS SKILDA CELL-POPULATIONER



Figur 1. En genetiskt heterogen tumörcellspopulation är uppbyggd av flera, klonalt besläktade men ändå genetiskt delvis skilda cellpopulationer. Genetiskt heterogena cellpopulationer kan sluta att svara på riktad behandling om en viss subklon (röda cirklar) antingen saknar mål-molekylen och/eller är oberoende av den för sin tillväxt. Behandlingen innebär i så fall klonal selektion för resistenta celler som över tid tar över tumör-parenkymet och kan spridas vidare i patienten.

svarar inte markant på riktad behandling eftersom tillväxten är oberoende av EGFR-stimulering.

Dagens molekylära patologi syftar till stor del till att utvärdera dessa två förutsättningar i olika tumörformer. De algoritmer som används och exemplifieras ovan är logiska utifrån det vetenskapliga underlag vi har idag. Samtidigt bygger hela förfarandet på två utforskade premisser, nämligen<sup>1</sup> att den påvisade mutationen finns i alla tumörceller samt att<sup>2</sup> inga ytterligare mutationer finns i några cancer-celler som gör den signalväg som angrips överflödig. Om inte dessa kriterier är uppfyllda är resistensutveckling över tid en överhängande risk (Figur 1). Det finns idag ingen klinisk analys som kan garantera att dessa premisser är uppfyllda hos varje patient.

Samtidigt anhopas just nu vetenskapliga studier som visar på en omfattande genetisk heterogenitet mellan tumörcel-

ler i flertalet cancerformer. Man måste då ställa sig frågan om premisserna verkligen gäller. Är det regel eller undantag att alla tumörceller bär det molekylära mål som en behandling riktas mot? Är aktivitet av mål-molekylen verkligen en förutsättning för alla tumörcellers tillväxt? Kanske kan tumörcellsheterogenitet vara en del av förklaringen till att målstyrd terapi idag har så kortvarig effekt på solida maligna tumörer.

## TUMÖRCELLSHETEROGENITET - HUR STORT ÄR PROBLEMET?

Färska studier visar tydligt att tumörcellsheterogenitet kan ha betydelse för kliniskt behandlingssvar. Detta gäller inte bara de vanliga cancerformerna hos vuxna utan även solida tumörer hos barn. Problemet har kartlagts i två större studier publicerade under våren 2015.

McGranahan och medarbetare undersökte data från DNA-sekvensering från

2694 tumörer fördelade över nio vanliga cancertyper hos vuxna.<sup>3</sup> Syftet var att ta reda på hur ofta de så kallade "driver"-mutationer, som den målstyrd behandlingen oftast riktas mot, är subklonala, det vill säga förekom endast i en delmängd av cancercellerna i varje tumör. Man fann härvid att flertalet sådana mutationer kunde vara subklonala i en andel av patienterna, vilket skulle försämrats utsikterna för målstyrd behandling. Mutationerna inkluderade kända behandlingsmål som muterad EGFR i lungcancer och BRAF i melanom. Emellertid kunde man endast påvisa sådan subklonalitet av målmutationer i några procent av alla de undersökta tumörerna. Samtidigt använde sig denna studie av extremt hårda gränsvärden för att inte överskatta subklonalitet och samtliga analyser gjordes på publik, retrospektiv data. Möjlighet att gå in i vidare detalj i enskilda fall saknades. Exempelvis gjorde man inga analyser av multipa prover från samma patients tumörceller. Inte heller studerades större kromosomförändringar utan endast sekvensmutationer.

Den andra nyligen publicerade studien som brett syftade till att katalogisera tumörcellsheterogenitet inriktades på maligna tumörer hos barn. Dessa har i regel betydligt färre mutationer än tumörer hos vuxna och har därför betraktats som mer genetiskt stabila. Studien av Holmquist Mengelbier och Karlsson kartlade två olika typer av genetisk heterogenitet i barntumörer (Figur 2).<sup>4</sup> Dels makrovariation, genetiska skillnader mellan tumörbiopsier tagna på olika lokaler och/eller vid olika tidpunkter, hos en och samma patient. Dels mikrovariation, vilket motsvarar genetisk variation inom en och samma biopsi. Mikrovariation är därmed ekvivalent med den typ av subklonalitet som undersöktes av McGranahan. Något förvånande påvisade studien att makrovariation var allmänt förekommande efter att barntumörer utsatts för cellgiftsbehandling. Den påvisade variationen utgjordes främst av skillnader i kopialet för hela kromosomer eller större kromosomsegment och påträffades såväl när olika delar av samma tumör jämfördes som när primärtumör jämfördes med fjärrmetastas eller lokalrecidiv. Slutligen eftersöktes mikrovariation i en konsekutiv serie av Wilms

*"Att kartlägga fenomenet bättre är nödvändigt för att vi skall finna hållbara strategier mot resistensutveckling vid målstyrd behandling av maligna tumörer."*

tumör, den vanligaste njurtumören hos barn. Mikrovariation vad gäller större kromosomsegment påträffades i knappt hälften av fallen (20/44) och visade sig vara en oberoende prediktiv faktor för återfall och död efter cellgiftsbehandling. Barn vars tumörer inte hade någon mätbar genetisk variation hade en utmärkt prognos efter cellgiftsbehandling.

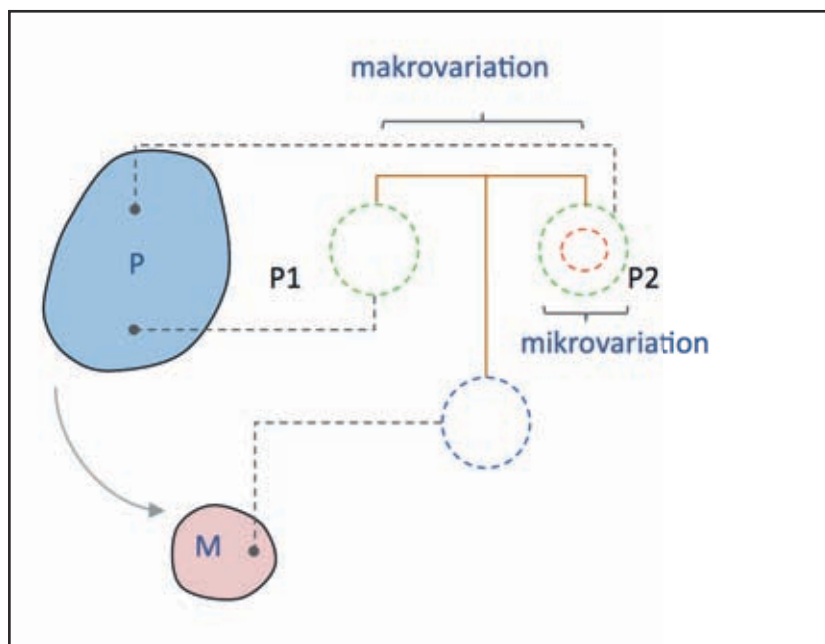
Sålunda förefaller tumörcellsheterogenitet vara ett tämligen vanligt fenomen som kan ha implikationer både för målstyrd behandling och för prognos i vissa cancerformer.

## PREDIKTIV TESTNING I LJUSET AV TUMÖRCELLSHETEROGENITET

För att förstå hur vi skall hantera fenomenet tumörcellsheterogenitet i praktisk molekylär patologi och onkologi krävs riktade studier av just de gener som idag testas kliniskt för prediktion av behandlingseffekt. Sådana studier är tämligen få och motsäger delvis varandra.

En av de äldsta prediktiva gentesterna är mätning av antalet kopior av HER2-genen i bröstcancer. Starkt ökat antal kopior (amplifiering) av genen indikerar där behandling med trastuzumab. Trots att såväl gentest som läkemedel funnits i många år, är ganska litet känt om i vilken utsträckning HER2-amplifiering kan variera inom en bröstcancer. Enligt vissa studier uppvisar upp till 40% av bröstcancerfall olika subkloner som har ett sinsemellan annorlunda mönster i kopialet av HER2-genen.<sup>5</sup> Heterogenitet med avseende på HER2-amplifiering inom en tumör har också associerats med sämre svar på trastuzumab.<sup>6</sup> HER2-status kan också skilja sig mellan primärtumör och lymfkörtelmetastaser, varför HER2-värdering av metastaser bör över-

## OLIKA TYPER AV GENETISK HETEROGENITET I SOLIDA TUMÖRER.



Figur 2. Makrovariation innebär skillnader detekterade mellan tumörbiopsier som skiljs åt anatomiskt och/eller tidsmässigt, exempelvis mellan olika delar (P1 och P2) av en primärtumör (P) eller mellan primärtumör och metastas (M). Mikrovariation innebär att flera genetiskt skilda subkloner kan påvisas i en enda tumörbiopsi. Om detta i sig innebär att subklonerna ligger i histologiskt skilda områden eller om dess celler blandas med varandra är för det mesta oklart av metodologiska skäl.

vägas för patienter med spridd sjukdom och HER2-negativ primärtumör.<sup>7</sup>

I ventrikelcancer förefaller heterogenitet i HER2-status inom primärtumörer vara än mer utbredd och enligt, i alla fall en studie, föreligga i en majoritet av fallen.<sup>8</sup> Data från större studier behöver alstras för att kliniska riktlinjer för hantering av heterogenitet i HER2-status skall kunna skapas på vetenskaplig grund.

I lungcancer (främst adenocarcinom) testas idag företrädesvis för strukturella rearrangemang av ALK-genen samt för mutationer i EGFR-genen. Testning sker idag på både histologiskt material (biopsier/excisioner) och cytologiska preparat. Vad gäller ALK-rearrangemang utgör fluorescens in situ hybridisering "golden standard"-metod, ibland med immunohistokemisk detektion av ALK-proteinuttryck som screeningmetod och/eller komplement. Nyligen publicerade data vad gäller ALK-rearrangemang påvisat med FISH visar på att det i excisionsmaterial föreligger en ganska liten variation i ALK-status för cellerna inom en och samma tumör.<sup>9</sup> Emellertid påvisades en slående diskrepans mellan ALK-status på biopsimaterial och excisioner. Hälften av de ALK-positiva fallen missades vid undersökning av biopsier. Cytologiskt material utvärderades inte. Det skall betonas att endast ett litet antal prover analyserades (totalt 20 patienter), men om resultaten kan reproduceras i ett större material skulle det innebära att rutiner för testning av ALK-status kommer att behöva ändras radikalt eftersom biopsimaterial då ej avspeglar situationen i majoriteten av tumörcellerna. Om resultaten beror på metodologiska problem eller på äkta tumörcellsheterogenitet kan inte i nuläget avgöras.

Att äkta heterogenitet kan föreligga i ALK-status stärks dock av en fallrapport av en patient som debuterade med EGFR-muterad ALK-negativ lungcancer, som i ett senare skede av sjukdom blev ALK-rearrangerad.<sup>10</sup> En förändring av ALK-status över tid har även visat sig vara tämligen vanligt förekommande vad gäller de mutationer av ALK som ses i barntumören neuroblastom. Här har man med mycket djup sekvensering retrospektivt påvisat små ALK-muterade kloner som ej detekterades med vanliga metoder vid debuten av sjukdomen. Sådana kloner kan sedan helt komma att

dominera tumörmassan vid återfall.<sup>11</sup> Att testa för ALK-status mer än en gång, för att följa olika skeden av en tumörsjukdom och överblicka olika anatomiska lokaler, kan alltså anses ha ett visst vetenskapligt underlag. Men hur diskrepant ALK-status över olika lokaler och tidpunkter skall hanteras kliniskt är än så länge oklart.

Även vad gäller EGFR-mutationer har heterogenitet inom maligna lungtumörer påvisats, detta i en frekvens mellan 14% och 27% av patienterna.<sup>12</sup> Med djup sekvenseringsteknik har det nyligen också framkommit ett samband mellan hög andel tumörceller med EGFR-mutation och behandlingssvar på tyrosinkinashämmare.<sup>13</sup> I linje med detta har man funnit ett bättre behandlingssvar hos lungcancerpatienter med EGFR-mutation påvisad i både primärtumör och lymfkörtelmetastas, jämfört med när primärtumören varit positiv men metastas negativ för mutationen.<sup>14</sup> Även dessa studier antyder alltså att det föreligger äkta tumörcellsheterogenitet inklusive såväl makro- som mikrovariation snarare än metodologiska svagheter i mutationsanalyserna. Detta stöds av breda sekvenseringsanalyser av lungcancer som påvisat en generellt hög grad av genetisk tumörcellsheterogenitet i denna cancerform.<sup>15</sup>

För de behandlingsprediktiva mutationer i RAS-generna som regelmässigt undersöks vid spridd kolorektalcancer är bilden liknande den för EGFR i lungcancer. De flesta tumörer som är positiva för KRAS- eller NRAS-mutation uppvisar förändringen i majoriteten av tumörcellerna. Men det föreligger ändå en andel patienter med uttalad mikrovariation, där en låg andel RAS-muterade celler medför bättre svar på anti-EGFR-behandling.<sup>16</sup> Vidare har det påvisats makrovariation i form av diskrepans i KRAS-status mellan olika regioner av primärtumörer hos upp till 50% av fallen,<sup>17</sup> samt mellan primärtumör och metastas hos upp till ca 30% av patienterna.<sup>18,19</sup> Dock varierar siffrorna för andelen heterogena tumörer starkt mellan studier, sannolikt beroende både på skiftande metodik och vävnadskvalitet. Det är lätt att genom undermåligt materialurval skapa en falsk diskrepans mellan olika tumörlokaler.

Felkällor av denna typ har diskuterats i mycket hög grad vad gäller en annan mutationsanalys, nämligen den behandlingsprediktiva testningen av BRAF-mutationer vid malignt melanom. Där indikerar fynd av aktiverande V600-mutation behandling med den specifika tyrosinkinashämmaren vemurafenib. Till skillnad från situationen i lung- och koloncancer har det här ivrigt debatterats i vilken mån makro- eller mikrovariation för BRAF-mutationer överhuvudtaget förekommer.<sup>20</sup> Flera studier talar för att makrovariation mellan olika lymfkörtelmetastaser och mellan primärtumör och metastas är mycket sällsynt (<7% av patienterna). Variationen är eventuellt större (upp till 25%) om man jämför primärtumör med metastaser till hud eller hjärna.<sup>21,22</sup> Eventuellt kan även mikrovariation i primärtumörer föreligga.<sup>22</sup> Det finns minimal/obefintlig data om de kliniska konsekvenserna av tumörcellsheterogenitet för patienter med malignt melanom.

*"Att förstå bakgrunden till denna resistens måste prioriteras lika högt som att finna nya målstyrda terapier. Först när vi kan tackla detta problem i grunden kan den målstyrda behandlingen bli att paradigmskifte för cervix i stort."*

#### SAMMANFATTNING

Det vetenskapliga underlaget är idag tillräckligt stort för att säga att förekomst av genetisk makro- och mikroheterogenitet förekommer i flertalet typer av maligna solida tumörer, såväl hos barn som hos vuxna. I en andel av fallen inkluderar denna heterogenitet mutationer som förutsäger behandlingssvar och/eller prognos. Emellertid är fenomenet alltför litet utforskat för att vi idag skall

ta ställning till hur och i vilken utsträckning det skall tas hänsyn till i behandlingsprotokoll. Kunskap om genetisk heterogenitet kan dock redan idag hjälpa oss att förstå diskrepanser i mutationsstatus i tumörprover från en och samma patient. Att kartlägga fenomenet bättre är nödvändigt för att vi skall finna hållbara strategier mot resistensutveckling vid målstyrd behandling av maligna tumörer.

## REFERENSER

1. Bixby D, Talpaz M: Seeking the causes and solutions to imatinib-resistance in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 25:7-22, 2011
2. Vincent MD: Cancer: beyond speciation. *Adv Cancer Res* 112:283-350, 2011
3. McGranahan N, Favero F, de Bruin EC, Birkbak NJ, Szallasi Z, Swanton CI: Clonal status of actionable driver events and the timing of mutational processes in cancer evolution. *Sci Transl Med* 7:283ra54, 2015
4. Holmquist Mengelbier L, Karlsson J, Lindgren D, Valind A, Lilljebjorn H, Jansson C, Bexell D, Braekveldt N, Ameer A, Jonson T, Kulima HG, Isaksson A, Asmundsson J, Versteeg R, Rissler M, Fioretos T, Sandstedt B, Borjesson A, Backman T, Pal N, Ora I, Mayrhofer M, Gisselsson DI: Intratumoral genome diversity parallels progression and predicts outcome in pediatric cancer. *Nat Commun* 6:6125, 2015
5. Hanna WM, Ruschoff J, Bilous M, Coudry RA, Dowsett M, Osamura RY, Penault-Llorca F, van de Vijver M, Viale G: HER2 in situ hybridization in breast cancer: clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity. *Mod Pathol* 27:4-18, 2014
6. Lee HJ, Seo AN, Kim EJ, Jang MH, Suh KJ, Ryu HS, Kim YJ, Kim JH, Im SA, Gong G, Jung KH, Park IA, Park SY: HER2 heterogeneity affects trastuzumab responses and survival in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Am J Clin Pathol* 142:755-66, 2014
7. Shafi H, Astvatsaturyan K, Chung F, Mirocha J, Schmidt M, Bose SI: Clinicopathological significance of HER2/neu genetic heterogeneity in HER2/neu non-amplified invasive breast carcinomas and its concurrent axillary metastasis. *J Clin Pathol* 66:649-54, 2013
8. Treacy AD, Karamchandani JR, Streutker CJ, Grin AI: HER2 Genetic Heterogeneity in Gastric Cancer: Evaluation According to the College of American Pathologists Breast Cancer Criteria. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2015
9. Abe H, Kawahara A, Azuma K, Taira T, Takase Y, Fukumitsu C, Murata K, Yamaguchi T, Akiba J, Ishii H, Okamoto I, Hoshino T, Takamori S, Kage M: Heterogeneity of anaplastic lymphoma kinase gene rearrangement in non-small-cell lung carcinomas: a comparative study between small biopsy and excision samples. *J Thorac Oncol* 10:800-5, 2015
10. Sun Q, Wu JY, Jiao SC: Heterogeneity of epidermal growth factor receptor mutations in lung adenocarcinoma harboring anaplastic lymphoma kinase gene rearrangements: A case report. *Oncol Lett* 8:2093-5, 2014
11. Schleiermacher G, Javanmardi N, Bernard V, Leroy Q, Cappel J, Rio Frio T, Pierron G, Lapouble E, Combaret V, Speleman F, de Wilde B, Djos A, Ora I, Hedborg F, Trager C, Holmqvist BM, Abrahamsson J, Peuchmaur M, Michon J, Janoueix-Lerosey I, Kogner P, Delattre O, Martinsson TI: Emergence of new ALK mutations at relapse of neuroblastoma. *J Clin Oncol* 32:2727-34, 2014
12. Remon J, Majem MI: EGFR mutation heterogeneity and mixed response to EGFR tyrosine kinase inhibitors of non small cell lung cancer: a clue to overcoming resistance. *Transl Lung Cancer Res* 2:445-8, 2013
13. Bria E, Pilotto S, Amato E, Fassan M, Novello S, Peretti U, Vavala T, Kinspergher S, Righi L, Santo A, Brunelli M, Corbo V, Giglioli E, Sperduti I, Milella M, Chilosi M, Scarpa A, Tortora G: Molecular heterogeneity assessment by next-generation sequencing and response to gefitinib of EGFR mutant advanced lung adenocarcinoma. *Oncotarget*, 2015
14. Shimizu K, Yukawa T, Hirami Y, Okita R, Saisho S, Maeda A, Yasuda K, Nakata M: Heterogeneity of the EGFR mutation status between the primary tumor and metastatic lymph node and the sensitivity to EGFR tyrosine kinase inhibitor in non-small cell lung cancer. *Target Oncol* 8:237-42, 2013
15. de Bruin EC, McGranahan N, Mitter R, Salm M, Wedge DC, Yates L, Jamal-Hanjani M, Shafi S, Murugaesu N, Rowan AJ, Gronroos E, Muhammad MA, Horswell S, Gerlinger M, Varela I, Jones D, Marshall J, Voet T, Van Loo P, Rasmussen DM, Rintoul RC, Janes SM, Lee SM, Forster M, Ahmad T, Lawrence D, Falzon M, Capitanio A, Harkins TT, Lee CC, Tom W, Teeffe E, Chen SC, Begum S, Rabinowitz A, Phillimore B, Spencer-Dene B, Stamp G, Szallasi Z, Matthews N, Stewart A, Campbell P, Swanton CI: Spatial and temporal diversity in genomic instability processes defines lung cancer evolution. *Science* 346:251-6, 2014
16. Normanno N, Rachiglio AM, Lambiasi M, Martinelli E, Fenizia F, Esposito C, Roma C, Troiani T, Rizzi D, Tatangelo F, Botti G, Maiello E, Colucci G, Ciardiello F, on the behalf of the C-Gil: Heterogeneity of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in metastatic colorectal cancer and potential effects on therapy in the CAPRI GOIM trial. *Ann Oncol*, 2015
17. Kosmidou V, Oikonomou E, Vlassi M, Avlonitis S, Katseli A, Tsiaras I, Mourtoukou D, Kontogeorgos G, Zografos G, Pintzas AI: Tumor heterogeneity revealed by KRAS, BRAF, and PIK3CA pyrosequencing: KRAS and PIK3CA intratumor mutation profile differences and their therapeutic implications. *Hum Mutat* 35:329-40, 2014
18. Siyar Ekinci A, Demirci U, Cakmak Oksuzoglu B, Ozturk A, Esbah O, Ozatli T, Celik B, Budakoglu B, Turker I, Bal O, Turan NI: KRAS discordance between primary and metastatic tumor in patients with metastatic colorectal carcinoma. *J BUON* 20:128-35, 2015
19. Baldus SE, Schaefer KL, Engers R, Hartleb D, Stoecklein NH, Gabbert HE: Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases. *Clin Cancer Res* 16:790-9, 2010
20. Menzies AM, Wilmott JS, Long GV, Scolyer RA: Intra-patient heterogeneity of BRAF mutation status: fact or fiction? *Br J Cancer* 111:1678-9, 2014
21. Colombino M, Capone M, Lissia A, Cossu A, Rubino C, De Giorgi V, Massi D, Fonsatti E, Staibano S, Nappi O, Pagani E, Casula M, Manca A, Sini M, Franco R, Botti G, Caraco C, Mozzillo N, Ascierto PA, Palmieri G: BRAF/ NRAS mutation frequencies among primary tumors and metastases in patients with melanoma. *J Clin Oncol* 30:2522-9, 2012
22. Yancovitz M, Litterman A, Yoon J, Ng E, Shapiro RL, Berman RS, Pavlick AC, Darvishian F, Christos P, Mazumdar M, Osman I, Polsky DL: Intra- and inter-tumor heterogeneity of BRAF(V600E) mutations in primary and metastatic melanoma. *PLoS One* 7:e29336, 2012

DAVID GISSELSSON, UNIVERSITETSLEKTOR I MOLEKYLÄR PATOLOGI, LUNDS UNIVERSITET  
SPECIALISTLÄKARE, KLINISK PATOLOGI, REGION SKÅNE, DAVID.GISSELSSON\_NORD@MED.LU.SE

