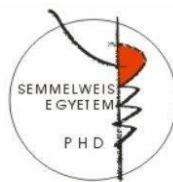


SZUBTÍPUS SPECIFIKUS KRAS ÉS EGFR MUTÁCIÓK VIZSGÁLATA TÜDŐ ADENOCARCINOMÁBAN

Doktori tézisek
Dr. Lohinai Zoltán

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezetők:

Dr. Döme Balázs PhD, tudományos főmunkatárs

Dr. Hegedűs Balázs PhD, tudományos munkatárs

Hivatalos bírálók:

Dr. Bittner Nóra PhD, osztályvezető főorvos

Dr. Komlósi Zsolt István PhD, egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Lengyel Gabriella, PhD, egyetemi docens

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Böszörményi Nagy György PhD,
egyetemi magántanár

Dr. Gálffy Gabriella PhD, egyetemi docens

Budapest
2016

BEVEZETÉS

A tüdőrák világszerte vezető szerepet foglal el a daganatos halálozási statisztikákban, megközelítőleg 1,4 millió beteg halálát okozva évente.

A tüdőrák egy heterogén betegség, az egyes típusok eltérő etiológiával és molekuláris háttérrel rendelkeznek. Előzőekben a terápia megválasztásához elegendő volt elkülöníteni a fő hisztológiai típusokat, mint a kissejtes és a nem kissejtes típust. Ez a klasszifikáció a molekuláris biológiai módszerek fejlődésével alapvető átalakuláson ment keresztül. Az új molekuláris besorolás befolyásolja a terápiaválasztást is. A driver onkogén mutációknak szerepe van a különböző tumor típusok kifejlődésében és targetként, ezen mutációk célzott terápiával kezelhetővé válhatnak. Számos klinikopatológiai faktor hatással bír az onkogén driver mutációk és mutációs szubtípusok epidemiológiájára és klinikai megjelenésére. A daganatok klinikopatológiai jellemzői fontos szerepet játszanak a terápiás döntéshozatalban és segíthetik az onkológiai bizottság munkáját. A mutációs szubtípusok szerepéről keveset tudunk, de feltételezhető, hogy eltérő jelátviteli útvonalakat aktiválnak. Preklinikai vizsgálatok alapján, az egyes molekuláris alcsoportokban a kemoterápiára adott terápiás válasz is különböző lehet. Az eddigi irodalmi adatokban mutatkozó jelentős különbségek (etnikai, szövettani típus, tumor stádium, kezelési mód) nem tették lehetővé homogén csoportok vizsgálatát.

Ezért munkánk során egy jól meghatározott kaukázusi betegcsoportot vizsgáltunk, amelyben előrehaladott stádiumú betegek adatait dolgoztuk fel, 4 éves időtartam alatt. Elemeztük a szubtípus specifikus mutációk epidemiológiai és klinikai jelentőségét tüdő adenocarcinomában.

Összefoglalva PhD disszertációmban ennek megfelelően az alábbi tudományos kérdésekre kerestük a választ.

CÉLKITŰZÉSEK

Számos klinikopatológiai tényező befolyásolja az onkogén driver mutációk epidemiológiáját. Ebben a dolgozatban az *KRAS* és *EGFR* mutációs szubtypusok epidemiológiáját és klinikai relevanciáját vizsgáltuk.

1. Előrehaladott stádiumú tüdő adenocarcinómában a szubtypus specifikus *KRAS* mutációs státusz jelentősége platinabázisú kemoterápiával kezelt betegek esetében előzőekben csak in vitro vizsgálatok történtek. Ezért, a *KRAS* mutációk szerepét elemeztük egy kaukázusi, nem rezekált, III-IV stádiumú betegcsoporton, akik platina bázisú kemoterápiában részesültek.

2. A ritka *EGFR* mutáció klinikai jelentősége nagy esetszámú, tisztán kaukázusi tüdő adenocarcinómában szenvedő betegpopuláción nem volt vizsgálva, ezért kaukázusi betegcsoporton hasonlítottuk össze a klasszikus és a ritka *EGFR* mutánsok epidemiológiáját és a klinikai jellemzőit.

3. Eddig kevés adat állt rendelkezésre szervspecifikus metasztázisok esetében a *KRAS* mutációk incidenciájáról. Ezért a *KRAS* mutáció és a szervi metasztázis megjelenése közötti összefüggést értékeltük és a *KRAS* mutáció prognosztikus szerepét vizsgáltuk.

MÓDSZEREK

Beteganyag

Konszekutív (n=1247), az Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézetben és a Semmelweis Egyetem Pulmonológiai Klinikán, 2009-2013 között citológiailag vagy szövettanilag igazolt, előrehaladott stádiumú tüdő adenocarcinomával kezelt betegek klinikopatológiai adatait elemeztük. Három beteg csoportot (kohort #1, #2, és egyesített kohort) hoztunk létre. A kohortokban molekuláris analízist történt a potenciális *EGFR* tirozin kináz inhibitor (TKI) terápiára alkalmas betegek kiválasztása céljából. A kohort #1 (n=505) csoport betegeinél *KRAS* mutációs szubtípus analízis történt. A kohort #2-ben (n=814) a betegeknél a klasszikus és a ritka *EGFR* mutációk kimutatása is megtörtént. Ezek epidemiológiai és klinikai jelentőségét elemeztük. Az egyesített kohortban (n=903) vizsgáltuk a szervi metasztázisok és a *KRAS* státusznak az összefüggését.

Molekuláris analízis

Formalin-fixált paraffinba ágyazott tumor mintákból DNS-t izoláltunk. A *KRAS* és *EGFR* mutációk meghatározása "polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism" segítségével és Sanger (direkt) szekvenálással történt.

Alkalmazott terápiák

A Kohort #1-ben minden beteg első vonalban platina-bázisú kemoterápiás kezelésben részesült. A kohort #2-ben a betegek másod és/vagy harmad vonalban gefitinibet, míg első vonalban erlotinibet kaptak a *KRAS* és *EGFR* státusztól függően.

Statisztikai módszerek

A statisztikai analízisek elvégzéséhez a SPSS programot használtuk.

***In vitro* tesztek**

A kísérletekben nyolc humán nem-kissejtes tüdőrák sejtvonalat használtunk. Klonogenitás vizsgálat segítségével vizsgáltuk a zoledronsav (ZA) kezelés preniláció gátláson keresztül kifejtett tumor ellenes hatását. Ezer sejtet helyeztünk hat lyukú tenyésztőedénybe és hozzáadtunk 1, 2, 8 és 32 μM ZA-t majd 10 nap elteltével fotométerrel mértük a sejtszámot.

EREDMÉNYEK

Driver onkogén mutációk szerepe előrehaladott tüdő adenokarcinómában

Kohort #1-ben *KRAS* vad típust 68%-ban, 30%-ban *KRAS* exon 2, kodon 12 és 2%-ban kodon 13 mutációt azonosítottuk.

A gyakoribb *KRAS* codon 12 mutációk megoszlása altípusok szerint G12C (39%), G12V (18%), G12D (17%) és G12A (5%).

A vizsgált betegcsoportban (kohort #2) 5% volt a klasszikus, 6% a ritka (aminosav cserével járó, nem klasszikus *EGFR* mutáció) és 3% az aminosav cserével nem járó, szinonim mutációk aránya. Az *EGFR/KRAS* kettős vad típus 59%-ban volt jelen.

Megjegyzendő, hogy öt beteg esetében, a G719x vagy L861Q ritka érzékenyítő *EGFR* mutációt azonosítottunk. Vizsgálatunkban a COSMIC adatbázisban tüdődaganatok esetében már leírt (n=33), szinonim és ritka *EGFR* mutációt azonosítottunk. Húsz esetben más szervi malignus daganatban már közölt mutációt találtunk és emellett 45 eddig nem publikált új mutációt mutattunk ki. A T790M rezisztencia mutációt nem volt egyetlen esetben sem kimutatható. 16 beteg esetében, 39 mutációt azonosítottunk ami azt jelenti, hogy ezen betegek komplex mutációs mintát (legalább két különböző *EGFR* mutáció volt jelen egy mintán belül) mutatnak.

Klinikopatológiai jellemzők

Mind a három kohort esetében a *KRAS* státusz szignifikáns összefüggést mutatott a dohányzással. Fontos kiemelni, hogy a G12V szubtípus *KRAS* mutáció gyakrabban fordult elő a nem dohányzók között.

A ritka *EGFR* mutáció a dohányzó státusszal mutatott összefüggést szemben a klasszikus *EGFR* mutációval, amely a vártan megfelelően a nemdohányzó betegekben volt gyakoribb.

903 előrehaladott stádiumú tüdő adenokarcinómában szenvedő betegből a diagnózis idején 500 betegnél volt áttét kimutatható. Egy szervben előforduló metasztázis 362 (72%) esetben és 138 (28%) betegnél több szervi metasztázis volt jelen a diagnózis időpontjában.

A metasztázisok szervi lokalizáció szerinti előfordulásának gyakorisága: tüdő (45,6%), a csont (26,2%), mellékvese (17,4%), agy (16,8%), mellhártya (15,6%), és máj (11%).

Nem volt különbség a *KRAS* mutáció előfordulási arányában a metasztatikus (28,6%) és a nem metasztatikus (28%) esetekben.

KRAS mutációs gyakoriság agyi (29%), csont (28%), vagy mellékvese (33%) metasztázisok esetében hasonló volt. Azonban a tüdő áttétes esetben szignifikánsan magasabb volt a *KRAS* mutációs gyakoriság, szemben az extrapulmonalis áttétekkel bírókkal (35% vs. 26,5%).

Szemben a tüdőáttétes esetekkel, a mellhártya és a máj metasztázisoknál a *KRAS* mutáció ritkábban volt jelen (17% ($p < 0,001$) és 16% ($p = 0,0023$)).

Prognosztikus faktorok előrehaladott stádiumú tüdő adenokarcinómában

A kohort #1-ben nem találtunk összefüggést a teljes túlélés (OS) és a dohányzási státusz között. Ezzel szemben a dohányzó státuszt szignifikáns prognosztikus faktornak találtuk a kohort #2-ben. A betegség stádiuma a diagnózis idején mind a két kohort esetében prognosztikus tényezőnek bizonyult.

Megjegyzendő, hogy nem volt kimutatható összefüggés a *KRAS* státusz és a teljes túlélés között.

Hasonlóképpen nem volt különbség a *KRAS* kodon 12, kodon 13 mutáns vagy *KRAS* vad típusú betegek túlélésében. Szintén nem találtunk összefüggést a *KRAS* mutációs státusz előfordulása és a teljes túlélés között sem az egy, sem a több szervben előforduló metasztázisok esetén.

Azonban a klasszikus *EGFR* mutáció jelenléte szignifikánsan javította a teljes túlélést az *EGFR* és *KRAS* vad típusú daganatokhoz képest. Ezzel ellentétben, nem volt szignifikáns különbség a ritka *EGFR* mutáció és az *EGFR* / *KRAS* vad típusú betegek vizsgálatakor.

A *KRAS* mutáció és a különböző szerv-specifikus áttétek valamint az OS közötti kapcsolat vizsgálata során a *KRAS*

vad típusú csontmetasztázissal rendelkező betegeknél klinikailag releváns és jelentős OS növekedés van (vs. *KRAS* mutánsok, medián OS 9,7 vs. 3,7 hónap; $p=0,003$). Fontos megjegyezni, hogy nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a teljes túlélésben más szerv-specifikus metasztázist hordozó daganatok esetében.

Szubtípus-specifikus EGFR/KRAS mutációk és a kezelés közötti összefüggés vizsgálata előrehaladott tüdő adenocarcinomában.

Terápiás választ és a progresszió mentes túlélést (PFS) értékeltük platina bázisú terápiák alkalmazásakor. Nem volt különbség a terápiás válasz (RR) és a PFS tekintetében a *KRAS* kodon 12, 13 kodon mutációt hordozó és a *KRAS* vad típusú betegek között. Kimutattuk, hogy a *KRAS* G12V mutációs szubtípus szignifikánsan nagyobb arányban fordult elő a nem dohányzók között, szemben a többi kodon 12 *KRAS* mutánsal (G12x).

A G12V betegcsoport nem szignifikánsan, de növelte a RR-t platina-alapú kemoterápiánál ($p=0,077$). Továbbá ugyanezen mutáns alcsoport nem szignifikáns mértékben, de hosszabb medián progressziómentes túléléssel is társult (233 vs. 175 nap).

Következő lépésként értékeltük az EGFR-TKI-val kezelt betegek klasszikus és ritka *EGFR* mutáció esetében betöltött szerepét. A kezeléstől függetlenül jelentősen megnövekedett RR-t találtunk a klasszikus *EGFR*

mutánsok között, szemben a ritka *EGFR* mutációt hordozókkal (71% vs. 37%, $p=0,039$).

In vitro tüdő adenocarcinoma sejtek zoledronsav érzékenysége a driver onkogén mutáció függvényében.

A *KRAS* mutáns csontmetasztázissal bíró betegek esetében tapasztalt rossz prognózis okát in vitro vizsgáltuk tovább. Mivel a ZA gyakran alkalmazott kezelés csont áttétes betegeknél, ezért klonogenitás vizsgálattal értékeltük a *KRAS* mutáns és a *KRAS* vad típusú tüdő adenocarcinoma sejtek ZA érzékenységét. Minden sejtvonalak érzékenynek bizonyult zoledronsav kezelésre. Rezisztencia a - várttal ellentétben - nem volt megfigyelhető a *KRAS* mutáns sejtvonalak esetében sem.

KÖVETKEZTETÉSEK

1. Tüdő adenocarcinómában a *KRAS* G12V mutációs szubtípus eltérő klinikopatológiai jellemzőkkel rendelkezik és ugyanezen mutáció jelenlétekor jobb klinikai válasz várható platina bázisú kemoterápiás kezelés alkalmazása során.

2. A legtöbb ritka *EGFR* mutáció dohányzással mutatott összefüggést kaukázusi tüdő adenocarcinómában szenvedő betegekben. Ugyanezen mutációknál rövidebbnek találtuk a teljes túlélést és alacsonyabb arányú *EGFR*-TKI terápiás választ figyeltünk meg, összehasonlítva a klasszikus *EGFR* mutációval járó tumorokkal.

3. Vizsgálatunkban elsőként elemeztük a *KRAS* mutáció összefüggését az egyes szerv-specifikus metasztázis mintázattal tüdő adenocarcinómában. Tüdőmetasztázisok esetében magasabb, míg pleura és májáttét esetében szignifikánsabb alacsonyabb volt a *KRAS* mutációk aránya.

4. *KRAS* mutáns csont áttétellel rendelkező tüdő adenocarcinómában szenvedő betegek prognózisa rosszabb a vad típusú tumorokhoz képest.

5. Azt a klinikai megfigyelést miszerint a *KRAS* mutáció jelenléte rosszabb prognózissal jár csontmetasztázis esetében az *in vitro* vizsgálat nem támasztotta alá. Klonogenitás vizsgálat alapján a zoledronsav kezelés hatása nem-kissejtes tüdőrák sejtjeire nem függött a *KRAS* mutációs státusztól.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

1. Hegedűs B, Moldvay J, Berta J, **Lohinai Z**, Rózsás A, Cserepes MT, Fábíán K, Ostoros G, Tóvári J, Rényi-Vámos F, Tímár J, Döme B. [Excerpts from the collaborative lung cancer research program of Semmelweis University, the National Institute of Oncology and Korányi Institute of TB and Pulmonology (2010-2015)]. *Magy Onkol.* 2015 Dec;59(4):282-5. Hungarian.

2. **Lohinai Z**, Hoda MA, Fabian K, Ostoros G, Raso E, Barbai T, Timar J, Kovalszky Cserepes M, Rozsas A, Laszlo V, Grusch M, Berger W, Klepetko W, Moldvay J, Dome B, Hegedus B. Distinct Epidemiology and Clinical Consequence of Classic Versus Rare *EGFR* Mutations in Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2015 May;10(5):738-46. (impakt faktor: 5.28),

Commentar:

1. **Lohinai Z**, Ostoros G, Moldvay J, Dome B, Hegedus B. Reply to Rare Versus Artifactual *EGFR* Mutations. *J Thorac Oncol.* 2015 Aug;10(8): e80-1.

2. Lohinai Z, Ostoros G, Moldvay J, Dome B, Hegedus B. Differences in the Epidemiology of Rare *EGFR* Mutations in Different Populations. *J Thorac Oncol*. 2016 Jan;11(1):e19-20.

3. Cserepes M, Ostoros G, **Lohinai Z**, Raso E, Barbai T, Timar J, Rozsas A, Moldvay J, Kovalszky I, Fabian K, Gyulai M, Ghanim B, Laszlo V, Klikovits T, Hoda MA, Grusch M, Berger W, Klepetko W, Hegedus B, Dome B. Subtype-specific *KRAS* mutations in advanced lung adenocarcinoma: a retrospective study of patients treated with platinum-based chemotherapy. *Eur J Cancer*. 2014 Jul;50(10):1819-28 (impakt faktor: 5.41),

4. Lohinai Z, Ostoros Gy, Cserepes TM, Rásó E, Tímár J, Döme B, Hegedűs B Az *KRAS* mutáció epidemiológiája tüdő adenocarcinomában: hazai tapasztalatok. *Medicina Thoracalis* (Budapest) 66:(4) pp. 211-217. (2013)

Disszertációtól független közlemények:

1. Lohinai Z, Peter Dome, Zsuzsa Szilagyi, Gyula Ostoros, Judit Moldvay, Balazs Hegedus, Balazs Dome, Glen J. Weiss From Bench to Bedside: Attempt to Validate Repositioning of Drugs in the Treatment of Metastatic Small Cell Lung Cancer (SCLC). PLOS ONE 2016 Jan 6;11(1):e0144797. (IF: 3.23)

2. Maneschg OA, Volek É, **Lohinai Z**, Resch MD, Papp A, Korom Cs, Karlinger K, Németh J. Genauigkeit und Relevanz der CT Volumetrie bei offenen Bulbusverletzungen mit Intraokularen Fremdkörpern. Ophthalmologie 2015 Apr; 112(4):367. (IF: 0.504)

3. Ostoros Gyula, **Lohinai Zoltán** Új lehetőségek a nem kissejtes tüdőrák másodvonalbeli kezelésében Onkológia (ISSN: 2062-7041) 2014. 4. évf.: (2. sz.,) pp. 93-95.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki, hogy PhD tanulmányaim során lehetőségem nyílt sok segítőkész embert megismerni a különböző Intézetekben, kórházakban és laboratóriumokban, ahol tanulhattam, dolgozhattam, felkészülhettem.

Elsőként köszönetet mondok az Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézetnek, továbbá a Bécsi Orvostudományi Egyetem Mellkassebészeti Klinikájának, és Transzlációs Onkológiai Kutatólaboratóriumának, valamint a Cancer Treatments Centers of America és a Coloradói Egyetem, Onkológiai részlegének.

Tiszteletemet és köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőimnek, Dr. Döme Balázsnak és Dr. Hegedüs Balázsnak, hogy munkámat mindvégig figyelemmel kísérték és segítették.

Köszönetet mondok az Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet igazgatójának, Dr. Kovács Gábornak mindenkori támogatásáért.

Hálás vagyok és köszönettel tartozom: Dr. Tímár József, Dr. Moldvay Judit, Dr. Walter Klepetko, Dr. Robert Pirker, Dr. Glen J. Weiss, Dr. Ostoros Gyula, Dr. Paul Bunn, Dr. Markóczy Zsolt és Dr. Garay Tamás támogató segítségéért.

Szeretném megköszönni az Ernst Mach Grant és az ESMO ösztöndíját, valamint a Magyar Pulmonológiai Alapítvány támogatását.

Végül köszönöm családomnak hogy segítettek a PhD munkám során.