

Promotionsstipendium – Abschlussbericht

Doktorandin: Anika Forstreuter (AG Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Sonja Loges, II. Med. Klinik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf)

Thema der Promotionsarbeit: Seltene *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR)-Mutationen bei Patienten und Patientinnen mit Nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (*Non small cell lung cancer* (NSCLC))

Jährlich erkranken in Deutschland ca. 500 000 Menschen an einer Krebserkrankung. Das Bronchialkarzinom stellt dabei die zweithäufigste Tumorentität bei Männern und die Dritthäufigste bei Frauen dar. Häufig wird die Diagnose eines Bronchialkarzinoms erst im fortgeschrittenen Stadium gestellt, sodass diese Art von Krebs eher mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei Frauen bei 21% und bei Männern bei 15% (Barnes et al., 2016). Die Therapie der Patienten ist unter anderem abhängig von der Histologie des Tumors, der Ausdehnung und ggf. Metastasierung sowie molekularen und immunhistochemischen Markern (Deutsche Krebsgesellschaft, 2018). Die Untersuchung hinsichtlich Mutationen im Genom der Tumorzellen, welche für das Wachstum der Krebszellen verantwortlich sind, hat zunehmend an Bedeutung gewonnen und ist Grundlage für eine personalisierte und zielgerichtete Therapie (Zheng, 2016).

Im Mittelpunkt des Projektes stand die nähere Untersuchung seltener *Epidermal growth factor receptor* (EGFR)-Mutationen bei Patienten/Patientinnen mit Nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (*non small cell lung cancer*, NSCLC). Eine Mutation im EGFR-Gen kann in Deutschland in ca. 10% der Fälle detektiert werden (Schuette et al., 2015, 2013). Sie führt in der Regel zu einer anhaltenden Aktivität des Tyrosin-Kinase-Rezeptors und somit zu einer gesteigerten Proliferation, Angiogenese und Überleben der Tumorzellen (Inamura et al., 2010). Häufig auftretende Mutation, wie zum Beispiel die *in-frame* Deletionen in Exon 19 (ca. 45% aller EGFR-Mutationen) oder die Einzel-Nukleotid-Substitution L858R in Exon 21 (ca. 40%) (Sharma et al., 2007) sind bereits gut untersucht und hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber den zugelassenen Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) analysiert. Zur Zeit stehen für Patienten mit fortgeschrittenem und/oder metastasierten NSCLC und nachgewiesener EGFR-Mutation TKI der ersten Generation (Erlotinib, Gefitinib), der zweiten Generation (Afatinib, Dacomitinib) und der dritten Generation (Osimertinib) zur Verfügung (Deutsche Krebsgesellschaft, 2018).

Neben den häufigen Mutationen treten jedoch auch zahlreiche seltene EGFR-Mutationen auf. Ihre Bedeutung für das Tumorstadium sowie Verhalten gegenüber den verfügbaren TKI ist häufig nicht oder nur unzureichend untersucht, da diese Patienten von den meisten Studien ausgeschlossen werden. Daher war es unser Ziel, seltene, in NSCLC-Patienten nachgewiesene EGFR-Mutationen in-vitro zu untersuchen und Sensitivitätsprofile gegenüber den verfügbaren TKI zu erstellen. Das experimentelle Projekt ist Bestandteil eines nationalen Forschungsprojektes des „nationalen Netzwerk genomische Medizin (nNGM) Lungenkrebs“. 13 der 17 nNGM-Zentren nahmen an dem Projekt teil und sammelten zunächst retrospektive Daten und Informationen zu dem Auftreten von seltenen EGFR-Mutationen. Insgesamt wurden 300 verschiedene seltene EGFR Mutationen bei Patienten detektiert. Mutationen, für die noch keine hinreichenden Informationen in der Literatur vorlagen, wurden im Rahmen dieser Arbeit in-vitro untersucht.

Zunächst erfolgte die Integration der gewünschten Mutation in einen retroviralen Vektor mittels zielgerichteter Mutagenese. Anschließend erfolgte eine Transfektion des erzeugten Plasmids in Phoenix E Zellen, welche zur Virusproduktion genutzt wurden. Durch retrovirale Transduktion erfolgte schließlich der Einbau des mutierten Gens in das Genom der gut charakterisierten murinen pro- B-Zell Linie Ba/F3. Handelt es sich bei der eingebrachten Mutation um eine Treibermutation, so transformieren diese normalerweise IL-3-abhängig wachsenden Ba/F3-Zellen und proliferieren IL-3 unabhängig. Neben der Mutation enthielt das Plasmid ein Markergen, welches die Detektion per FACS ermöglichte. Somit konnte das Transformationsverhalten mithilfe von FACS-Analysen beobachtet werden. Insgesamt wurden 41 seltene, nicht hinreichend charakterisierte EGFR-Mutationen untersucht. Hiervon stellten sich 14 als Treibermutationen heraus und diese wurden im Rahmen dieses Projektes hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber den vier oben beschriebenen TKI analysiert (s. Abbildungen).

Das Projekt konnte dazu beitragen, mehr über seltene EGFR-Mutationen zu erfahren. Es ist vielmehr sogar gelungen, nach erfolgreicher Etablierung aller Techniken im Labor, die Zeitspanne für eine komplette Analyse von der Klonierung bis zum Sensitivitätsprofil auf nur 4-5 Wochen zu verkürzen und so eine enge Verknüpfung zwischen Klinik/Patienten und Labor/experimentelle Arbeit zu erschaffen. Somit ist es inzwischen möglich, zeitnah nach der Identifikation einer neuen Mutation bei einem Patienten, ein individuelles Sensitivitätsprofil zu erstellen und damit die

Entscheidungsfindung für die Therapie des Patienten entsprechend maßgeblich zu unterstützen.

Literaturverzeichnis

- (2013) A Genomics-Based Classification of Human Lung Tumors. *Science Translational Medicine*, 5: (209): 209ra153-209ra153.
- Barnes B, Kraywinkel K, Nowossadeck E, Schönfeld I, Starker A, Wienecke A und Wolf U 2016. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Robert Koch-Institut.
- Deutsche Krebsgesellschaft DK, Awmf. (2018) *Leitlinienprogramm Onkologie: Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms, Lang-version 1.0* [Online im Internet]: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/index.php?id=98&type=0> [Stand: 27.08.2020 9:00].
- Inamura K, Ninomiya H, Ishikawa Y und Matsubara O (2010) Is the epidermal growth factor receptor status in lung cancers reflected in clinicopathologic features? *Arch Pathol Lab Med*, 134: (1): 66-72.
- Schuette W, Schirmacher P, Eberhardt WE, Fischer JR, Von Der Schulenburg JM, Mezger J, Schumann C, Serke M, Zaun S, Dietel M und Thomas M (2015) EGFR mutation status and first-line treatment in patients with stage III/IV non-small cell lung cancer in Germany: an observational study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 24: (8): 1254-1261.
- Sharma SV, Bell DW, Settleman J und Haber DA (2007) Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*, 7: (3): 169-181.
- Zheng M (2016) Classification and Pathology of Lung Cancer. *Surg Oncol Clin N Am*, 25: (3): 447-468.

Abbildungen

Nach erfolgreicher Integration der gewünschten Mutation in das Genom der BaF3 Zellen, erfolgte der Entzug des Wachstumsfaktors Interleukin 3 (IL-3) um das Transformationsverhalten der Zellen zu beobachten. Die generierten Zelllinien exprimierten infolge der retroviralen Infektion neben der gewünschten Mutation zusätzlich YFP (*yellow fluorescent protein*) als Markerprotein, sodass eine Analyse mithilfe des FACS möglich war. Der Anteil an YFP-positiven Zellen lag nach der *Spin Infection* bei über 90%. Um eine Transformation der Zellen gut beurteilen zu können, erfolgte zunächst durch Hinzugabe von parentalen Zellen eine Anpassung des Anteils an infizierten Zellen auf ca. 18-25% (s. Startwert Tag 0 in Abbildung 2). Anschließend wurden die Zellen in Medium ohne IL-3 kultiviert und ihr Wachstumsverhalten beobachtet.

Die erste Abbildung zeigt zunächst den Anteil der lebendigen Zellen in der Probe. Da die parentalen Zellen infolge des IL-3 Entzugs untergehen, nimmt der Anteil der vitalen Zellen zunächst in allen Proben ab. Ab Tag drei ist ein Unterschied zwischen Treiber- und Nicht-Treiber Mutationen zu beobachten. Die Zellen mit einer Treibermutation transformieren und überleben, dadurch bleibt der Prozentsatz stabil bzw. steigt.

Besonders aussagekräftig hinsichtlich des Transformationsverhaltens ist jedoch Abbildung 2. In dieser Grafik ist der Anteil an YFP-positiven Zellen, bezogen auf die vitalen Zellen, dargestellt. Liegt eine Treibermutation vor, ist früh ein Anstieg des Anteils an YFP-positiven Zellen zu beobachten. Im Gegensatz dazu, zeigt sich bei der Zelllinie EGFR P733Q eine kontinuierliche Abnahme. Die Mutation EGFR P733Q ist keine Treibermutation, sodass die Zellen nicht transformieren und in Folge des IL-3 Entzugs untergehen.

Abb.1: Ergebnis des IL3 Entzugs – Lebensfähige Zellen

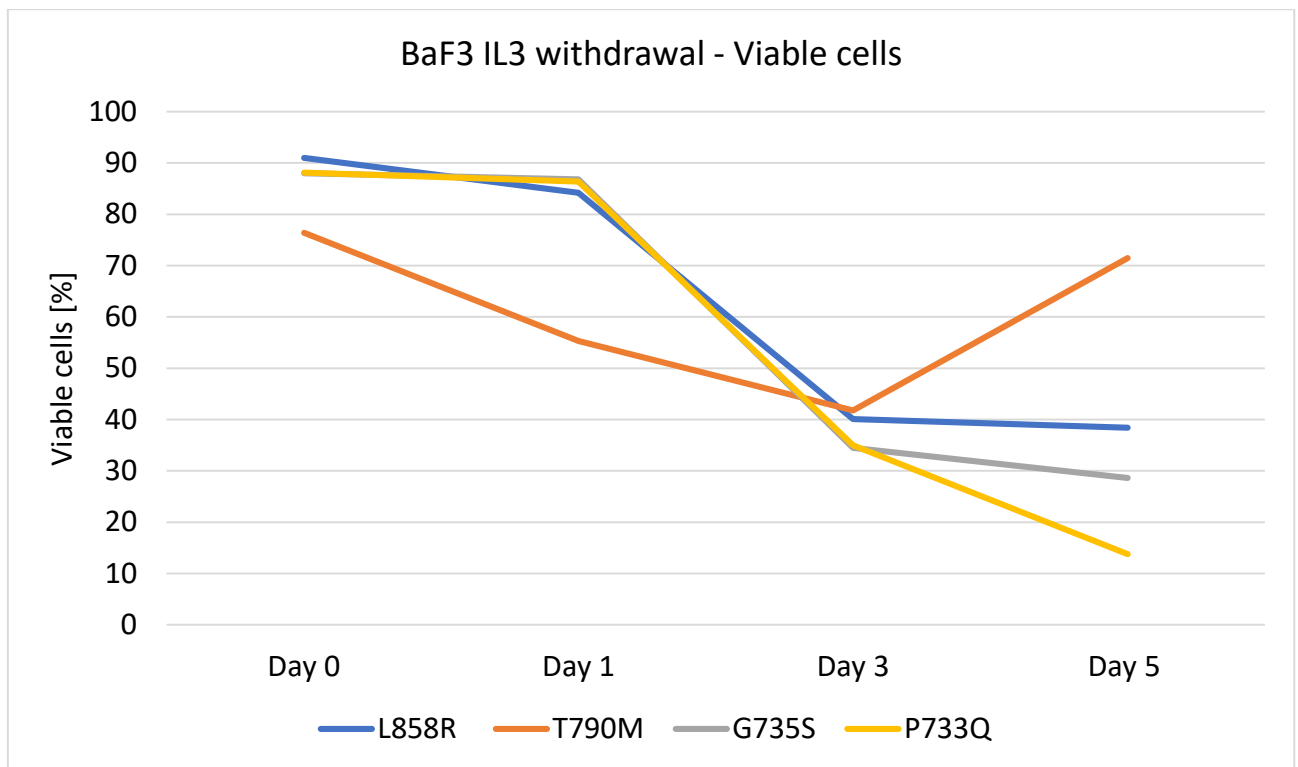
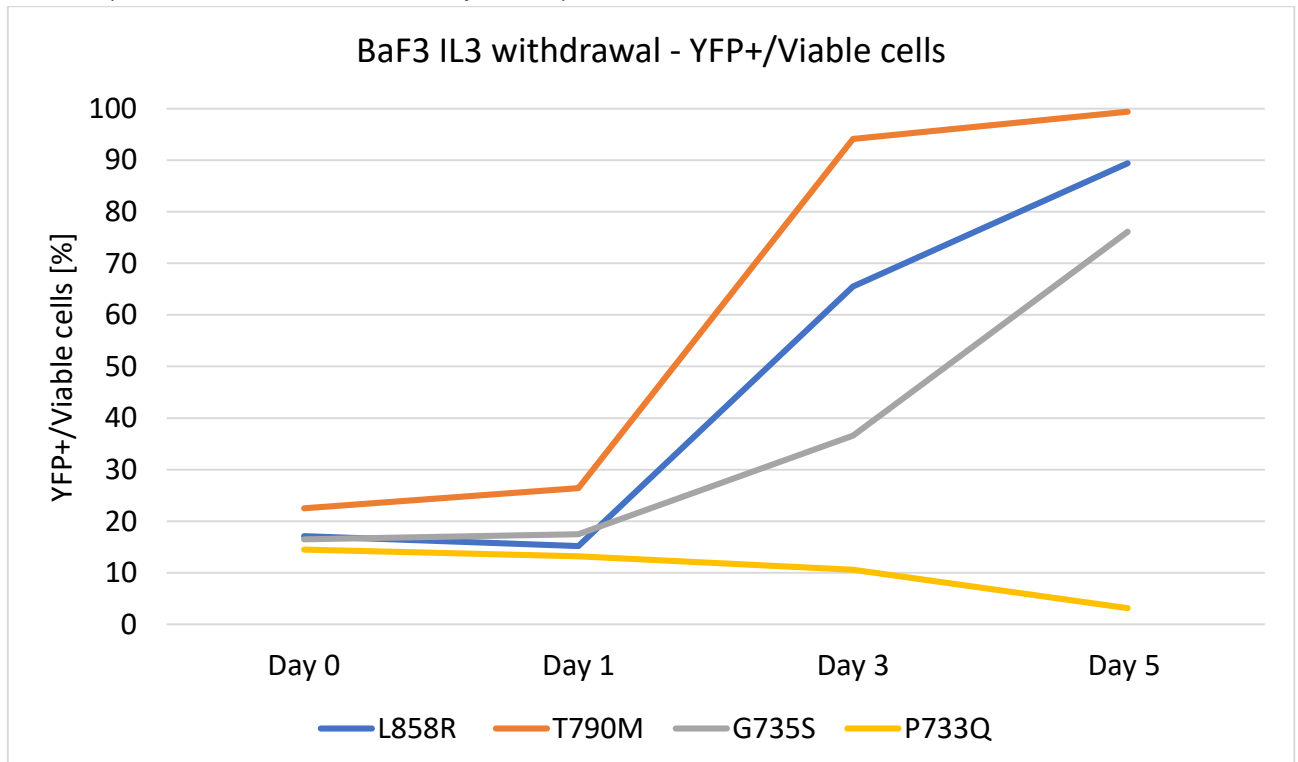


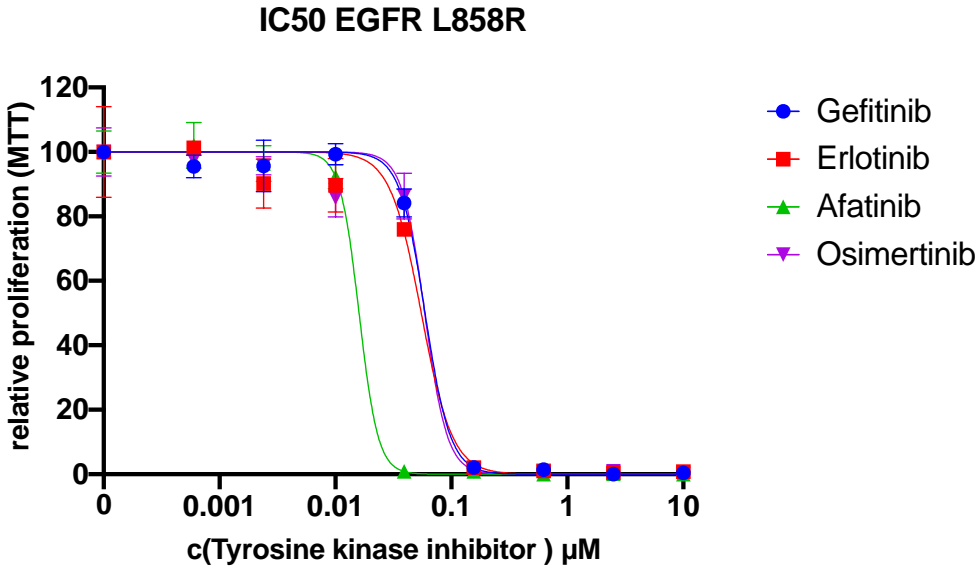
Abb. 2: Ergebnis des IL3 Entzugs – Anteil der YFP+ Zellen an den lebensfähigen Zellen (YFP: Yellow fluorescent protein)



EGFR L858R: bekannte Driver Mutation (Treibermutation) (Kontrolle); **EGFR T790M:** bekannte Driver Mutation mit Resistenz gegen Inhibitoren der 1.Generation (Kontrolle); **EGFR G735S:** identifiziert als Driver Mutation; **EGFR P733Q:** identifiziert als Non-Driver Mutation

Konnte eine Mutation als Treibermutation identifiziert werden, folgte eine Untersuchung der Sensitivität gegenüber Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI). Für die Inhibitoren Gefitinib, Erlotinib, Afatinib und Osimertinib wurden jeweils eine Verdünnungsreihe angesetzt, sodass letztendlich vier Inhibitoren in jeweils acht unterschiedlichen Konzentrationen für die Testung zur Verfügung standen. Die Inkubationsdauer der Zellen mit dem jeweiligen Inhibitor betrug 48h. Anschließend erfolgte die Messung der Proliferationsaktivität und Zellviabilität mithilfe des *Cell Proliferation Reagent WST*. Die niedrigste Inhibitorenkonzentration, welche zur Reduktion der Zellviabilität um 50% führte, ist als IC50-Wert (*engl. Inhibitory concentration of half-maximed effect*) angegeben.

Abb. 3: Ergebnis der Inhibitorentestung (WST-Assay) – **EGFR L858R** (bekannte Driver Mutation, Kontrolle)



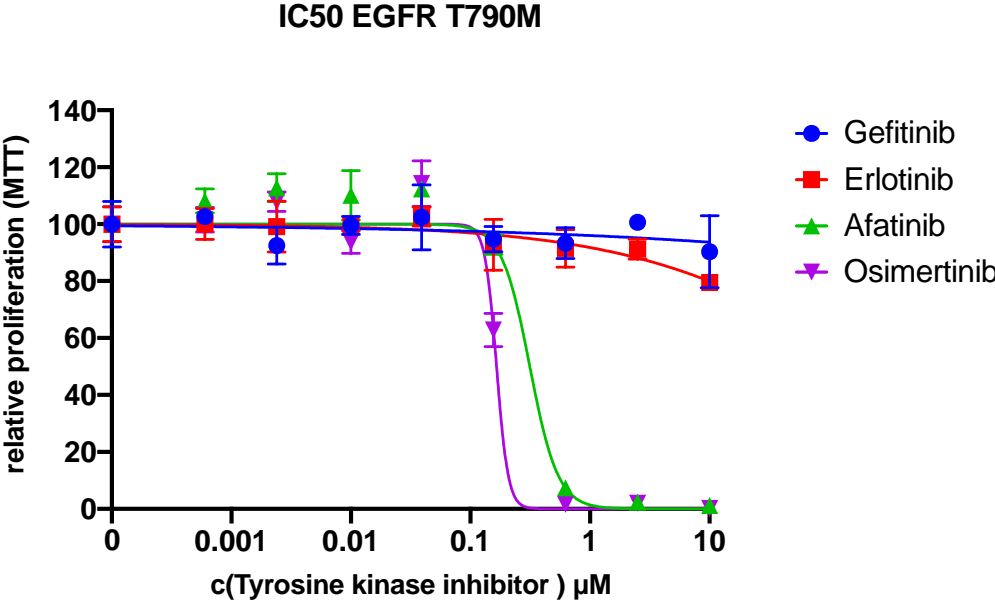
IC50 Gefitinib: 59,85 nM

IC50 Afatinib: 15,89 nM

IC50 Erlotinib: 53,47 nM

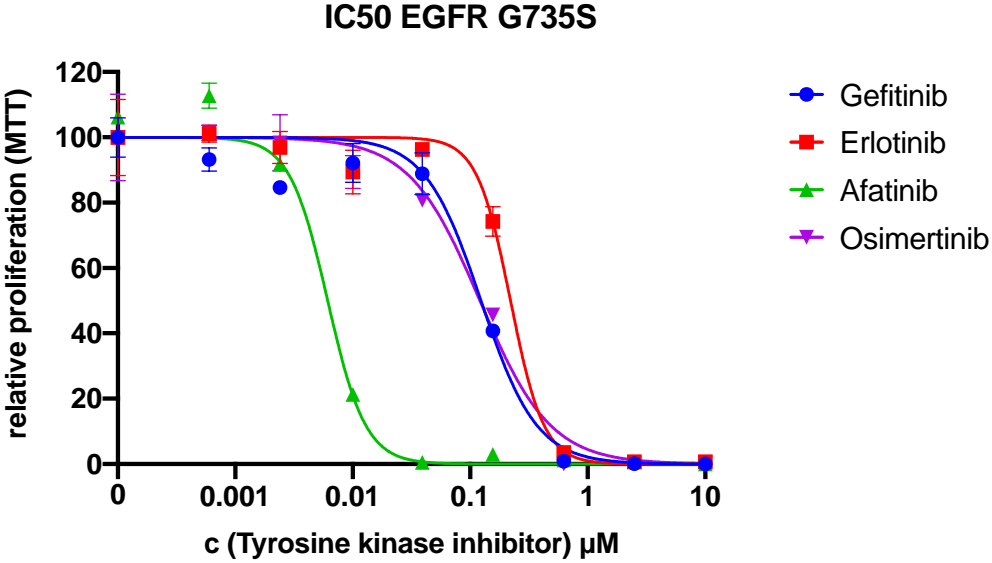
IC50 Osimertinib: 61,15 nM

Abb. 4: Ergebnis der Inhibitorentestung (WST-Assay) – **EGFR T790M** (bekannte Driver Mutation mit bekannter Resistenz gegen Inhibitoren der 1.Generation, Kontrolle)



IC50 Gefitinib: IC50 Afatinib: 286,6 nM
 IC50 Erlotinib: IC50 Osimertinib: 167,3 nM

Abb. 5: Ergebnis der Inhibitorentestung (WST-Assay) – identifizierte Driver Mutation **EGFR G735S**



IC50 Gefitinib: 130,3 nM IC50 Afatinib: 9,26 nM
 IC50 Erlotinib: 196,8 nM IC50 Osimertinib: 123,15 nM