

Anja Lisa Riediger

Dr. med.

Mutationsanalyse von zirkulierender DNA bei Lungenkrebspatienten mit Adenokarzinom unter Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren

Einrichtung: Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg (DKFZ)

Doktorvater: Herr Prof. Dr. rer. nat. Holger Sültmann

Lungenkrebs gehört zu den am meisten diagnostizierten Krebsarten und ist mit einer schlechten Überlebensprognose verbunden. Der Großteil aller Patienten besitzt ein nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom (NSCLC), welches durch eine große molekulare Heterogenität gekennzeichnet ist. Häufig treten Mutationen im Gen des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) auf. Mit Hilfe von Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) wurde eine zielgerichtete Therapie etabliert. Deren Erfolg ist jedoch von einer adäquaten Evaluierung des Therapieansprechens sowie dem frühzeitigen Erkennen einer Resistenzentwicklung verbunden. Bei der Tumorprogression unter TKI-Therapie tritt in über 50 % der Fälle die *EGFR* T790M-Mutation auf. Eine zusätzliche Informationsquelle zur gängigen Gewebebiopsie stellt die Analyse von Körperflüssigkeiten (*Liquid Biopsy*) dar. Im Blut von NSCLC-Patienten wurden verschiedene Mutationen in der Tumor-DNA, u.a. *EGFR*-Mutationen, identifiziert und damit die molekularen Eigenschaften und Heterogenität der Tumore abgebildet.

In dieser Arbeit wurde das Potential der seriellen Analyse von *EGFR*-Mutationen im Blut von NSCLC-Patienten zur Einschätzung des Therapieansprechens und der Resistenzentwicklung unter TKI-Therapie evaluiert. Insgesamt lagen 49 Serum- und 119 Plasmaproben von 20 NSCLC-Patienten im fortgeschrittenen Tumorstadium vor, aus denen zirkulierende DNA (cfDNA) extrahiert wurde. Zur Optimierung der Ergebnisse wurde die cfDNA einer präanalytischen Qualitätskontrolle unterzogen. Mit Hilfe von Bioanalyser-Profilen konnte deren Integrität beurteilt werden, wobei deutliche Unterschiede zwischen den Proben gesehen wurden. Kurze DNA-Fragmente wurden mit tumorassoziiertes DNA in Verbindung gebracht, während lange Fragmente auf genomische DNA hinwiesen und mit einem größeren Anteil der wildtypischen Allele in der Mutationsanalyse einhergingen. Zwischen Serum und Plasma konnten zudem deutliche Unterschiede in der Qualität und Quantität der cfDNA beobachtet werden. Der Median der cfDNA-Konzentration war im Plasma (30,28 ng/ml) um einen dreifachen Faktor niedriger als im Serum, in dem zudem vermehrt genomische DNA auftrat. Das Plasma wurde daraufhin als geeigneteres Ausgangsmaterial für die Mutationsanalyse

gewählt. Die Präanalytik hatte einen entscheidenden Einfluss auf die Durchführung und die Resultate der Mutationsanalyse. Mit Hilfe der sensitiven digitalen PCR gelang im Plasma eine qualitative und quantitative Detektion von vier aktivierenden *EGFR*-Mutationen (L858R, L861Q, *EGFR* c.2235_49del, *EGFR* c.2236_50del) bei 15 von 16 getesteten Patienten sowie der *KRAS*-Mutation (G12C) bei einem Patienten. Der Mutationsstatus des Tumors war aus einer vorherigen Gewebeanalyse bekannt. Die *EGFR* T790M-Mutation war bei zwölf von 19 getesteten Patienten nachweisbar.

Bei 16 Patienten wurden zwischen zwei und elf serielle Plasmaproben über einen längeren Zeitraum (bis zu 33 Monate) evaluiert. Trotz individueller Unterschiede konnten drei gemeinsame Aspekte herausgearbeitet werden, welche die raschen Entwicklungen nach einem Therapiebeginn, das längerfristige Therapieansprechen sowie die Tumorprogression und Resistenzentwicklung beinhalteten. Bei drei Patienten konnte ein direkter zeitlicher Zusammenhang zwischen einem Therapiebeginn und den Reaktionen im Plasma beobachtet werden: Ein initiales Ansprechen eines Tumors wurde bereits 96 Stunden nach Beginn einer TKI-Therapie gesehen. Nach einem starken Anstieg der mutierten Allele im Plasma, wurde deren erneuter Abfall auf ein sehr niedriges Niveau registriert. Beim zweiten Patienten lag der gemessene Wert am fünften Therapietag stattdessen über dem Niveau vor Beginn der TKI-Therapie, und der Patient zeigte klinisch eine Tumorprogression. Beim dritten Patienten zeigte sich zunächst ein rasanter Anstieg der mutierten Allele zu Beginn der cerebralen Bestrahlung, gefolgt von einem Absinken zum Therapieende. Eine Verringerung des Wertes von der letzten Probe vor- zur ersten Probe unter Therapiebeginn konnte bei sechs von sieben Patienten mit erfolgreicher Therapieeinleitung gesehen werden. Bei einer Stabilisierung der Tumorerkrankung waren die mutierten Allele nicht mehr nachweisbar oder lagen auf einem niedrigen Niveau. Bei drei Patienten konnte die kontrollierte Tumorerkrankung über 11, 13 bzw. 33 Monate im Plasma nachverfolgt werden. Im Gegensatz dazu, wurde bei erneuter Tumorprogression ein Anstieg der mutierten Allele im Plasma beobachtet. Bei fünf Patienten mit Tumorprogression wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten die T790M-Mutation im Plasma detektiert. Die Ergebnisse waren übereinstimmend mit den Resultaten der Gewebeanalyse. Es lagen jedoch auch positive Plasmabefunde bei negativem Gewebestatus vor. Die Identifikation der T790M-Mutation vor Beginn der TKI-Therapie war bei einem Patienten mit einem fehlenden Ansprechen und einer kurzen Überlebenszeit verbunden. Ebenso zeigte ein Patient mit rasant ansteigender und schlussendlich sehr hoher Anzahl an *KRAS*-mutierten Allelen kein Therapieansprechen und der Patient verstarb wenige Monate später.

Die Ergebnisse dieser Arbeit waren übereinstimmend mit weiteren Veröffentlichungen im Bereich der *Liquid Biopsy*. Darüber hinaus wurde die cfDNA nicht nur in größeren Zeitabschnitten evaluiert. Bei einem Patienten konnten zudem die ersten Stunden nach Einleitung der TKI-Therapie nachverfolgt werden. Die beobachteten Entwicklungen der mutierten cfDNA ließen interessante Rückschlüsse auf die Applikation der TKI-Therapie zu. Es handelte sich hierbei jedoch um einen Einzelfall, der in weiteren Versuchen und größeren Kohorten näher evaluiert werden müsste. In gleicher Weise könnte eine engmaschige Analyse der T790M-Mutation angestrebt werden, um eine Resistenzentwicklung noch früher erfassen und gegebenenfalls mit einer Therapieumstellung reagieren zu können. Mit den Ergebnissen diese Arbeit konnte das Potential der seriellen Plasmaanalyse zur Therapieüberwachung aufgezeigt werden. Allerdings wurde auch die Notwendigkeit weiterer Forschung deutlich. Hierbei sind insbesondere eine Standardisierung der präanalytischen Versuche und der Durchführung der Mutationsanalyse sowie ein erweitertes Wissen über Tumorbiologie, zur besseren Interpretation der Ergebnisse, erstrebenswert.