



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Β. ΓΕΩΡΓΟΥΛΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ανίχνευση μεταλλάξεων του *EGFR* και *KRAS* σε ασθενείς με
μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και διερεύνηση της
αξίας τους ως προβλεπτικών παραγόντων ανταπόκρισης στη
θεραπεία

ΑΡΙΣΤΕΑ Ν. ΚΑΛΥΚΑΚΗ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2013

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Β. ΓΕΩΡΓΟΥΛΙΑΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*Ανίχνευση μεταλλάξεων του **EGFR** και **KRAS** σε ασθενείς με
μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και διερεύνηση της
αξίας τους ως προβλεπτικών παραγόντων ανταπόκρισης στη
θεραπεία*

ΑΡΙΣΤΕΑ Ν. ΚΑΛΥΚΑΚΗ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2013

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Βασίλειος Γεωργούλιας Καθηγητής Παθολογικής Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Βασίλειος Γεωργούλιας Καθηγητής Παθολογικής Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Δημήτριος Μαυρουδής Καθηγητής Παθολογικής Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Παναγιώτης Θεοδωρόπουλος Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Βασίλειος Γεωργούλιας Καθηγητής Παθολογικής Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Δημήτριος Μαυρουδής Καθηγητής Παθολογικής Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ευστάθιος Σταθόπουλος Καθηγητής Παθολογοανατομίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Παναγιώτης Θεοδωρόπουλος Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Σοφία Αγγελάκη Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Αναστάσιος Κουτσόπουλος Επίκουρος Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Αθανάσιος Κωτσάκης Λέκτορας Παθολογικής Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

*Με απέραντη ευγνωμοσύνη
στους γονείς μου Νίκο και Μαρία*

Με αγάπη στον σύζυγό μου Μανώλη

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογίας του Καρκίνου, του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης και με την ευκαιρία της ολοκλήρωσης της θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους όσους με βοήθησαν και μου συμπαράσθηκαν στην προσπάθειά μου αυτή.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα κ. Γεωργούλια Βασίλη, Καθηγητή Παθολογικής Ογκολογίας, Διευθυντή της Παθολογικής Ογκολογικής Κλινικής του ΠΑΓΝΗ και του Εργαστηρίου Βιολογίας του Καρκίνου, για την παρότρυνση στην πραγματοποίηση αυτής της διδακτορικής διατριβής, το συνεχές ενδιαφέρον του, τις πολύτιμες συμβουλές του και την υπομονή του.

Ευχαριστώ τον κ. Μαυρουδή Δημήτρη, Καθηγητή Παθολογικής Ογκολογίας για την συνεργασία, τη βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές του και τον κ. Θεοδωρόπουλο Παναγιώτη, Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας για τη συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή και την άριστη συνεργασία μας.

Ιδιαίτερα αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω την Δρ. Μοριακής Βιολογίας Βουτσινά Αλεξάνδρα, για την αποδοτική συνεργασία μας. Την ευχαριστώ επίσης, για τις πολύτιμες συμβουλές της και για την κατανόηση και συμπαράστασή της σε όλες τις στιγμές, εντός και εκτός εργαστηρίου. Κυρίως, όμως θέλω να την ευχαριστήσω για το ότι με εμπιστεύθηκε, πίστεψε σε μένα και με στήριξε σε κάθε προσπάθεια.

Επιπρόσθετα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Περράκη Μαρία, υπεύθυνη του εργαστηρίου Βιολογίας του Καρκίνου για την θετική της στάση, την ενθάρρυνση και τις συμβουλές της όλα αυτά τα χρόνια, καθώς και όλους τους συναδέλφους και μέλη του εργαστηρίου Βιολογίας του Καρκίνου για τη συνεργασία, την παρέα και τις ενδιαφέρουσες συζητήσεις.

Δεν θα παρέλειπα να ευχαριστήσω τον σύζυγό μου, τα αδέρφια μου και όλους τους κοντινούς μου ανθρώπους για την υποστήριξη και την ανοχή που έδειξαν στις προτεραιότητες που επέβαλε αυτή η προσπάθεια όλα αυτό το διάστημα.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου για την βοήθεια και την στήριξη που έδειξαν όλα αυτά τα χρόνια.

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί το κατά πόσο η παρουσία μεταλλάξεων των γονιδίων *EGFR* και *KRAS* αποτελούν προβλεπτικούς δείκτες για τους Έλληνες ασθενείς με ΜΜΚΠ. Αρχικά πραγματοποιήθηκε εύρεση του ποσοστού και του είδους των *EGFR* και *KRAS* μεταλλάξεων σε 639 ασθενείς με ΜΜΚΠ, ακολούθησε συσχέτιση τους με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά τους, με την απάντηση στην χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής και την συνολική επιβίωση τους. Επίσης, διερευνήθηκε η σχέση των *EGFR* μεταλλάξεων με τον αριθμό αντιγράφων του *EGFR* γονιδίου. Τέλος, εξετάστηκε αν το πρότυπο των μεταλλάξεων διαφέρει στον πρωτοπαθή όγκο και στην αντίστοιχη μετάσταση.

Για τη γενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε λήψη καρκινικών κυττάρων από ιστοικά δείγματα, πρωτοπαθούς όγκου ή μετάστασης. Από το υλικό αυτό απομονώθηκε γενωμικό DNA με γνωστές τεχνικές και ακολούθησε επιλεκτική ενίσχυση των εξωνίων 18, 19, 20 και 21 του *EGFR* και του εξωνίου 2 του *KRAS* γονιδίου με αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης. Η ανίχνευση των μεταλλάξεων έγινε με άμεση ταυτοποίηση της πρωτοταγούς νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των υπό μελέτη περιοχών, χρησιμοποιώντας αυτόματο αναλυτή βάσεων. Τέλος, η ανίχνευση της ενίσχυσης του *EGFR* γονιδίου έγινε σε επίπεδο DNA και πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου.

Η ανάλυση των *EGFR* μεταλλάξεων πραγματοποιήθηκε με επιτυχία σε 634 ασθενείς και μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν σε 100 (15.8%) από αυτούς. Ενεργοποιητικές μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν σε 53 (8.4%) ασθενείς. Οι πιο συχνές μεταλλάξεις, ήταν απαισιόφες 4-5 κωδικονίων στο εξώνιο 19 (del 19, 71.7%, 38/53) και η παρανοηματική μετάλλαξη στην θέση 858 (L858R) στο εξώνιο 21 (22.6%, 12/53). Επίσης σε 47 (7.4%) ασθενείς ανιχνεύθηκαν άλλες μεταλλάξεις και στα τέσσερα εξώνια του *EGFR*, οι οποίες έχουν αναφερθεί στο παρελθόν ή είναι νέες. Βρέθηκε ότι οι *EGFR* μεταλλάξεις εμφανίζονται συχνότερα στις γυναίκες, με ιστολογικό τύπο αδenoκαρκίνωμα, χωρίς ιστορικό καπνίσματος.

Η ανίχνευση των μεταλλάξεων στο *KRAS* γονίδιο πραγματοποιήθηκε επιτυχώς σε 399 δείγματα ασθενών και το 20.8% αυτών (83/399) έφεραν μεταλλάξεις. Συγκεκριμένα, το 92.8% των μεταλλάξεων ανιχνεύθηκαν στο κωδικόνιο 12 και το 7.2%

στο κωδικόνιο 13. Επίσης, οι *KRAS* μεταλλάξεις εντοπίστηκαν κυρίως στους καπνιστές και στα αδενοκαρκινώματα.

Η προβλεπτική σημασία των *EGFR* και *KRAS* μεταλλάξεων εξετάστηκε σε μια υποομάδα ασθενών (n=162) με ΜΜΚΠ που έλαβαν χημειοθεραπεία ως θεραπεία 1^{ης} γραμμής. Βρέθηκε ότι η αντικειμενική ανταπόκριση ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη (55.6%) στους ασθενείς που έφεραν «κλασσικές» μεταλλάξεις σε σχέση με αυτούς που ήταν αγρίου τύπου (21.8%). Η πολυπαραγοντική ανάλυση ανέδειξε τις «κλασσικές» ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του *EGFR* ως ανεξάρτητο προβλεπτικό παράγοντα ανταπόκρισης στην χημειοθεραπεία 1^{ης} γραμμής. Επίσης, δείχθηκε ότι οι «κλασσικές» *EGFR* μεταλλάξεις σχετίζονται με καλύτερη επιβίωση των ασθενών (p=0.028).

Μελετώντας 25 ασθενείς με ΜΜΚΠ το πρότυπο των *EGFR* και *KRAS* μεταλλάξεων του πρωτοπαθούς όγκου και της αντίστοιχης μετάστασης, διαπιστώθηκε να διαφέρει σε 7 (28%) και 6 (24%) ασθενείς, αντίστοιχα.

Όσον αφορά την ανίχνευση της γονιδιακής ενίσχυσης του *EGFR*, διαπιστώθηκε σε ποσοστό 7.2% (6/83) των πρωτοπαθών όγκων. Κανένας ασθενής με γονιδιακή ενίσχυση δεν έφερε μεταλλάξεις στο γονίδιο *KRAS*, ενώ σε δυο ανιχνεύτηκε απαλοιφή μερικών νουκλεοτιδίων στο εξώνιο 19 του *EGFR*.

Abstract

The purpose of this study was to investigate whether the *EGFR* and *KRAS* mutation status are predictive factors for Greek patients with NSCLC. Initially, we calculated the rate and the pattern of *EGFR* and *KRAS* mutations in 639 patients with NSCLC and then we correlated the mutations status with clinicopathological characteristics, the response to 1st line chemotherapy and patients' overall survival. We also investigated the association of *EGFR* mutations with the *EGFR* gene amplification. Finally, in a group of 25 patients the mutation status of these genes in the primary tumors and the corresponding metastasis was evaluated.

The genetic analysis performed in FFPE tissue samples of primary tumor or metastasis. DNA was extracted using universal techniques. For mutation analysis exons 18, 19, 20 and 21 of the *EGFR* and exon 2 of *KRAS* genes were sequentially amplified by polymerase chain reaction (PCR) and subjected to direct sequencing. Finally, *EGFR* amplification was determined by quantitative real time PCR.

Analysis of *EGFR* mutations was successfully performed in 634 patients and mutations were detected in 100 (15.8%) of them. Activating mutations were detected in 8.4%. The most common mutations were deletions of 4-5 codons in exon 19 (del 19, 71.7%, 38/53) and the missense mutation at position 858 (L858R) in exon 21 (22.6%, 12/53). Also in 47 (7.4%) patients other mutations were detected in four exons of *EGFR*, which have been reported previously or are new. We found that the incidence of *EGFR* mutations was statistically significant in women with no smoking history and with adenocarcinoma histology.

The mutation analysis of the *KRAS* gene was successfully performed on 399 patients and mutations detected in 20.8% of them (83/399). Especially, 92.8% of the mutations were found at codon 12 and 7.2% at codon 13. *KRAS* mutations were significantly associated with smoking history with higher incidence in smokers than nonsmokers. There was also a significant association between *KRAS* mutations and adenocarcinoma histology.

The predictive value of *EGFR* and *KRAS* mutations was examined in a subgroup of patients (n=162) with NSCLC who received chemotherapy as 1st line therapy. Patients with classical *EGFR* mutations had a higher probability of response (55.6%) to

front-line chemotherapy as compared to those with wild type *EGFR* (21.8%) ($p = 0.023$). Multivariate analysis revealed the 'classical' activating *EGFR* mutations as an independent predictive factor for response to 1st line chemotherapy. There was no significant correlation between the *EGFR* or *KRAS* mutation status and the time to tumor progression. The presence of activating *EGFR* but not of *KRAS* mutations was associated with a significantly higher overall survival compared to patients without mutations treated with platinum-based front-line chemotherapy.

Epidermal growth factor receptor and *KRAS* mutation status was different between primary tumors and corresponding metastases in 7 (28%) and 6 (24%) of the 25 patients, respectively. This discrepancy was not statistically significant with the McNemar's test.

EGFR amplification was found in 7.2% (6/83) of primary tumors. Among the patients with *EGFR* gene amplification none carried *KRAS* mutations while 2 had *EGFR* exon 19 deletion.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	iii
Περίληψη	iv
Abstract.....	vi
Περιεχόμενα.....	viii
Ευρετήριο Εικόνων	xi
Ευρετήριο Πινάκων	xiii
Συντομογραφίες.....	xv
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1 Καρκίνος του πνεύμονα.....	2
1.1 Επιδημιολογία και αίτια.....	2
1.2 Ιστολογική κατάταξη	5
1.2.1 Πλακώδες (ή Ακανθοκυτταρικό, Squamous Cell Carcinoma, SCC).....	6
1.2.2 Αδενοκαρκίνωμα (Adenocarcinoma, ADC).....	6
1.2.3 Μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα (Large Cell Carcinoma, LCC).....	6
1.3 Σταδιοποίηση.....	9
1.4 Κλινική εικόνα	12
1.5 Θεραπευτική προσέγγιση του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα.....	14
1.5.1 Στάδια I και II	15
1.5.2 Στάδιο IIIA.....	15
1.5.3 Στάδιο IIIB.....	15
1.5.4 Στάδιο IV.....	16
1.6 Επιβίωση.....	17
1.7 Καρκινογένεση και γενετική	18
1.7.1 Ογκογονίδια	20
1.7.2 Ογκοκατασταλτικά γονίδια.....	20
2 Υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα	22
2.1 Εισαγωγή.....	22
2.2 Το γονίδιο <i>EGFR</i> και η δομή της πρωτεΐνης.....	23
2.3 Προσδέτες και ενεργοποίηση του υποδοχέα <i>EGFR</i>	27
2.4 Απενεργοποίηση του <i>EGFR</i>	28
2.5 <i>EGFR</i> και κυτταρική σηματοδότηση.....	29
2.6 <i>EGFR</i> και καρκίνος του πνεύμονα.....	32
2.6.1 Υπερέκφραση των προσδετών.....	33

2.6.2	Υπερέκφραση του EGFR.....	34
2.6.3	<i>EGFR</i> μεταλλάξεις	35
2.6.4	Απορύθμιση της διαδικασίας αποικοδόμησης.....	40
2.6.5	Ετεροδιμερισμός του EGFR	40
2.7	Μόρια του σηματοδοτικού μονοπατιού του EGFR.....	41
2.7.1	Οικογένεια RAS πρωτεϊνών.....	41
2.8	Στοχεύοντας τον υποδοχέα EGFR.....	48
2.9	Ευαισθησία στους αναστολείς του EGFR	52
2.10	Αντίσταση στους ανταγωνιστές του EGFR.....	54
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....		56
A.	Σκοπός της μελέτης.....	57
B.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	58
B.1	Ασθενείς και συλλογή δειγμάτων.....	59
B.2	Απομόνωση γενωμικού DNA.....	60
B.3	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	61
B.4	Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης PCR σε πήκτωμα αγαρόζης.....	64
B.5	Καθαρισμός και Αλληλούχιση των προϊόντων της PCR για την ανίχνευση μεταλλάξεων	66
B.6	Ηλεκτροφόρηση προϊόντων σε Γενετικό Αναλυτή.....	69
B.7	Προσδιορισμός της γονιδιακής ενίσχυσης του <i>EGFR</i> με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου.....	71
B.8	Στατιστική ανάλυση.....	74
Γ.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	76
1	Ανίχνευση <i>EGFR</i> και <i>KRAS</i> μεταλλάξεων σε Έλληνες ασθενείς με ΜΜΚΠ	77
1.1	Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών.....	77
1.2	Ποσοστά ανίχνευσης μεταλλάξεων στο γονίδιο <i>EGFR</i>	79
1.3	Ποσοστά ανίχνευσης μεταλλάξεων στο <i>KRAS</i> γονίδιο	84
1.4	Μεταλλάξεις των γονιδίων <i>EGFR</i> / <i>KRAS</i> και κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά	86
2	Διερεύνηση της προβλεπτικής αξίας των <i>EGFR</i> και <i>KRAS</i> μεταλλάξεων σε ασθενείς με ΜΜΚΠ που έλαβαν 1 ^η γραμμή χημειοθεραπεία	91
2.1	Χαρακτηριστικά ασθενών.....	91
2.2	Πρότυπο <i>EGFR</i> και <i>KRAS</i> μεταλλάξεων.....	92
2.3	Ανταπόκριση στην πρώτη γραμμή χημειοθεραπείας σύμφωνα με το πρότυπο μεταλλάξεων <i>EGFR</i> και <i>KRAS</i>	92
2.4	Χρόνος μέχρι την πρόοδο νόσου και συνολική επιβίωση σύμφωνα με το πρότυπο μεταλλάξεων <i>EGFR</i> και <i>KRAS</i>	93

2.5	Επίδραση της θεραπείας με αναστολείς της τυροσινικής κινάσης του EGFR (gefitinib).....	94
3	Ανίχνευση μεταλλάξεων στον πρωτοπαθή όγκο και στην αντίστοιχη μετάσταση	103
3.1	Χαρακτηριστικά ασθενών	103
3.2	Πρότυπο μεταλλάξεων του γονιδίου <i>EGFR</i> στον πρωτοπαθή όγκο και στην μετάσταση.....	103
3.3	Πρότυπο μεταλλάξεων του γονιδίου <i>KRAS</i> στον πρωτοπαθή όγκο και στην μετάσταση.....	104
3.4	Απάντηση στη θεραπεία με αναστολείς της τυροσινικής κινάσης του EGFR σύμφωνα με το πρότυπο μεταλλάξεων των γονιδίων <i>EGFR</i> και <i>KRAS</i>	105
4	Προσδιορισμός της γονιδιακής ενίσχυσης του <i>EGFR</i> σε ασθενείς με ΜΜΚΠ.....	112
Δ.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	115
Ε.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	126

Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα 1. Εκτιμώμενες τιμές (σε χιλιάδες) νέων περιστατικών καρκίνου και θανάτων σε ανεπτυγμένες και αναπτυσσόμενες χώρες κατά το έτος 2008 στις γυναίκες (α) και στους άνδρες (β).	4
Εικόνα 2. Εκτιμώμενη συχνότητα εμφάνισης και ποσοστά θνησιμότητας (τυποποιημένα με την ηλικία) καρκίνου του πνεύμονα	5
Εικόνα 3. Θέση του EGFR γονιδίου στο χρωμόσωμα 7.....	24
Εικόνα 4. Δομή του υποδοχέα EGFR.	25
Εικόνα 5. Χωροταξική διαμόρφωση της κινάσης του υποδοχέα σε ανενεργή (A) και ενεργή (B) μορφή.	27
Εικόνα 6. Χωροδιάταξη στον υποδοχέα EGFR των καταλοίπων τυροσίνης που επάγουν την κυτταρική σηματοδότηση.	30
Εικόνα 7. EGFR και μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης..	31
Εικόνα 8. Μηχανισμοί απορύθμισης του EGFR μονοπατιού.....	35
Εικόνα 9. Σχηματική αναπαράσταση των μεταλλάξεων του <i>EGFR</i> γονιδίου.....	37
Εικόνα 10. Σχηματική αναπαράσταση των μεταλλάξεων στην περιοχή της κινάσης του EGFR.	39
Εικόνα 11. Ενεργοποίηση και απενεργοποίηση των πρωτεϊνών RAS.	43
Εικόνα 12. Η τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης KRAS.	46
Εικόνα 13. Ενεργοποίηση της πρωτεΐνης KRAS.....	48
Εικόνα 14. Πήκτωμα αγαρόζης μετά από ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR που ενισχύθηκαν χρησιμοποιώντας εκκινητές για τα εξόνια 18, 19 και 21 του γονιδίου <i>EGFR</i>	65
Εικόνα 15. Πήκτωμα αγαρόζης μετά από ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR που ενισχύθηκαν χρησιμοποιώντας εκκινητές για το εξόνιο 2 του γονιδίου <i>KRAS</i>	66
Εικόνα 16. Σχηματική απεικόνιση ηλεκτροφόρησης μέσω τριχοειδούς σε αυτόματο γενετικό αναλυτή.	69
Εικόνα 17. Ηλεκτροχρωματογράφημα μιας αντίδρασης άλληλούχισης..	70
Εικόνα 18. Ανάλυση μεταλλάξεων στα εξόνια 18 και 21 του γονιδίου <i>EGFR</i>	83
Εικόνα 19. Ανάλυση μεταλλάξεων στα κωδικόνια 12 και 13 του <i>KRAS</i> γονιδίου.....	85

Εικόνα 20. Καμπύλες επιβίωσης (Kaplan-Meier) των ασθενών ανάλογα με την παρουσία <i>EGFR</i> ή <i>KRAS</i> μεταλλάξεων (Α, Β) και τη θεραπεία με gefitinib (Γ, Δ).....	102
Εικόνα 21. Καμπύλη επιβίωσης (Kaplan-Meier) των ασθενών ως προς την γονιδιακή ενίσχυση του <i>EGFR</i>	114

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1. Ιστολογική ταξινόμηση του μη μικροκυτταρικού καρκίνου πνεύμονα.	8
Πίνακας 2. Σταδιοποίηση του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα σύμφωνα με το σύστημα TNM (6 ^η έκδοση) (Sobin and Wittekind 2002).....	11
Πίνακας 3. Αλλαγές στην σταδιοποίηση του MMΚΠ μεταξύ 6 ^{ης} και 7 ^{ης} αναθεώρησης TNM.	12
Πίνακας 4. Συμπτώματα καρκίνου του πνεύμονα κατά την διάγνωση.	13
Πίνακας 5. Θέσεις μεταστάσεων του MMΚΠ.....	14
Πίνακας 6. Πενταετής επιβίωση (%) ασθενών με MMΚΠ σύμφωνα με το κλινικό και παθολογοανατομικό στάδιο.	18
Πίνακας 7. Γονίδια που εμπλέκονται στην καρκινογένεση του πνεύμονα.....	19
Πίνακας 8. Συχνότητα εμφάνισης KRAS μεταλλάξεων σε ασθενείς με MMΚΠ σύμφωνα με τις διαφορετικές αντικαταστάσεις κωδικόνια 12 ή 13 του εξωνίου 2 ‡.....	47
Πίνακας 9. Αλληλουχίες εκκινητών (σε παρένθεση το επικρατές αλληλόμορφο) και μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος (PCR) (ζεύγη βάσεων - b.p.) για τα εξόνια 18-21 και 2 των γονιδίων <i>EGFR</i> και <i>KRAS</i> , αντίστοιχα.....	62
Πίνακας 10. Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων για την πρώτη (first) και δεύτερη (nested) PCR που χρησιμοποιήθηκαν για την επιλεκτική ενίσχυση των εξωνίων των υπό μελέτη γονιδίων.	63
Πίνακας 11. Βέλτιστες συνθήκες PCR για την ενίσχυση των εξωνίων 18-21 του <i>EGFR</i> γονιδίου.	63
Πίνακας 12. Βέλτιστες συνθήκες PCR για την ενίσχυση του εξωνίου 2 του <i>KRAS</i> γονιδίου.	64
Πίνακας 13. Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων των Cycle Sequencing αντιδράσεων.....	68
Πίνακας 14. Βέλτιστες συνθήκες του προγράμματος Cycle Sequencing.....	68
Πίνακας 15. Αλληλουχίες εκκινητών και ιχνηθετών των γονιδίων <i>EGFR</i> και <i>TOP3A</i>	74
Πίνακας 16. Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά όλων των ασθενών με MMΚΠ που συμμετείχαν στην μελέτη.	78
Πίνακας 17. Ποσοστά ανίχνευσης μεταλλάξεων στα γονίδια <i>EGFR</i> και <i>KRAS</i>	80

Πίνακας 18. Είδη <i>EGFR</i> μεταλλάξεων και κατανομή τους ανά εξώνιο.....	81
Πίνακας 19. Διπλές σημειακές <i>EGFR</i> μεταλλάξεις.....	83
Πίνακας 20. Είδη <i>KRAS</i> μεταλλάξεων ανά κωδικόνιο.....	85
Πίνακας 21. Δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών με MMΚΠ ως προς το πρότυπο μεταλλάξεων των γονιδίων <i>EGFR</i> και <i>KRAS</i>	87
Πίνακας 22. Κλινικόπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών σύμφωνα με το πρότυπο μεταλλάξεων των γονιδίων <i>EGFR</i> και <i>KRAS</i>	96
Πίνακας 23. Ανταπόκριση στην 1η γραμμή χημειοθεραπεία σύμφωνα με τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών.	98
Πίνακας 24. Ανταπόκριση στην 1 ^η γραμμή χημειοθεραπεία σύμφωνα με το πρότυπο των <i>EGFR</i> και <i>KRAS</i> μεταλλάξεων.	99
Πίνακας 25. Πολυπαραγοντική ανάλυση για την ανταπόκριση στην 1 ^η γραμμή χημειοθεραπείας.	100
Πίνακας 26. Μέσος χρόνος μέχρι την πρόοδο νόσου και συνολική επιβίωση (σε μήνες) σύμφωνα με το πρότυπο των <i>EGFR</i> και <i>KRAS</i> μεταλλάξεων.....	101
Πίνακας 27. Κλινικόπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών με MMΚΠ στους οποίους μελετήθηκε το πρότυπο των <i>EGFR</i> και <i>KRAS</i> μεταλλάξεων....	106
Πίνακας 28. Κατανομή των <i>EGFR</i> και <i>KRAS</i> μεταλλάξεων στον πρωτοπαθή όγκο και στην αντίστοιχη μετάσταση.	109
Πίνακας 29. Σύγκριση του πρωτοπαθούς όγκου και της αντίστοιχης μετάστασης ως προς το πρότυπο μεταλλάξεων στα γονίδια <i>EGFR</i> και <i>KRAS</i>	111
Πίνακας 30. Κλινικό-παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά ασθενών σύμφωνα με την γονιδιακή ενίσχυση του <i>EGFR</i>	113
Πίνακας 31. Συσχέτιση της γονιδιακής ενίσχυσης του <i>EGFR</i> με τον χρόνο ελεύθερο νόσου και την συνολική επιβίωση.....	114

Συντομογραφίες

aa	amino acid, αμινοξύ
ADC	Adenocarcinoma, αδενοκαρκίνωμα
AKT	Also protein kinase B or PKB, πρωτεϊνική κινάση Β
ATP	Adenosine triphosphat, τριφωσφορική αδενοσίνη
BAC	Bronchioloalveolar carcinoma, βρογχοκυψελιδικό καρκίνωμα
bp	base pair, ζεύγος βάσεων
del	Deletion, απαλοιφή
DFS	Disease Free Survival, ελεύθερο νόσου διάστημα
DNA	Deoxyribonucleic acid, δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
dNTP	deoxynucleoside triphosphate, δεοξυτριφωσφορικό νουκλεοτίδιο
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid, αιθυλενοδιαμινοτετρα-οξικό οξύ
EGF	Epidermal Growth Factor, επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor, υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα
ex	Exon, εξώνιο
FFPE	Formalin-fixed Paraffin-embedded, Μονιμοποιημένο σε φορμόλη και εγκλεισμένο σε κύβο παραφίνης
GAPs	GTPase activating proteins, πρωτεΐνες ενεργοποίησης των G πρωτεϊνών
GDP	guanosine diphosphate, διφωσφορική γουανιδίνη
GEFs	Guanine nucleotide exchange factors, παράγοντας ανταλλαγής γουανίνης
GTP	guanosine triphosphate, τριφωσφορική γουανιδίνη
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LCC	Large cell carcinoma, μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα
MAPK	Mitogen-activated protein kinase, πρωτεϊνική κινάση με μιτογόνο δράση
mRNA	messenger ribonucleic acid, αγγελιοφόρο ριβονουκλεϊκό οξύ
NSCLC	Non-small cell Lung Cancer, μη-μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα
OD	Optical Density, οπτική πυκνότητα
ORR	Objective Response Rate, ποσοστό αντικειμενικής ανταπόκρισης
OS	Overall Survival, συνολική επιβίωση

p53	protein 53, ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη η οποία στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο <i>TP53</i>
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells, μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος
PCR	Polymerase Chain Reaction, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PET	Positron emission tomography, τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων
PKC	Protein kinase C, πρωτεϊνική κινάση C
PLC	Phosphoinositide phospholipase C, φωσφολιπάση
rpm	rounds per minute, στροφές ανά λεπτό
RR	Response Rate, ποσοστό ανταπόκρισης
RT-PCR	Real-Time Polymerase Chain Reaction, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου
SCC	Squamous cell carcinoma, πλακώδες καρκίνωμα
SCLC	Small cell lung cancer, μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα
SDS	Sodium dodecyl sulfate, θειικό δωδεκυλ νάτριο
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription, μετατροπείς σήματος και ενεργοποιητές της μεταγραφής
TK	Tyrosine kinase, κινάση τυροσίνης
TKIs	Tyrosine Kinase Inhibitors, αναστολείς της κινάσης τυροσίνης
TOP3A	topoisomerase III alpha, τοποισομεράση 3A

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1 Καρκίνος του πνεύμονα

1.1 Επιδημιολογία και αίτια

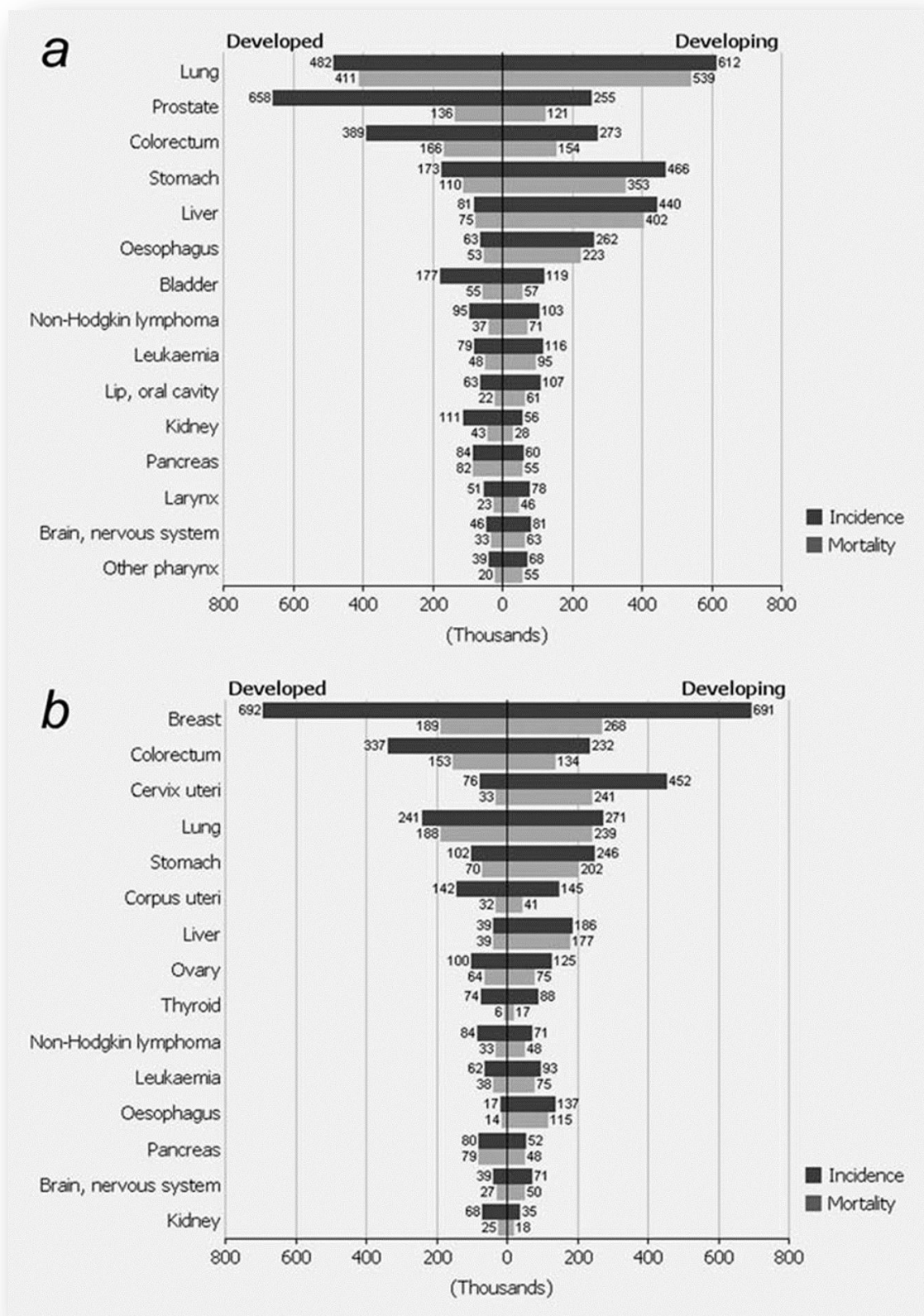
Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί το πιο συχνό νεόπλασμα παγκοσμίως. Το 2008, υπήρξαν περίπου 1,6 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις, εκπροσωπώντας έτσι το 12,7% όλων των νέων περιπτώσεων καρκίνου. Περίπου 1,4 εκατομμύρια άνθρωποι πέθαναν από καρκίνο του πνεύμονα το 2008 σε παγκόσμιο επίπεδο, εκπροσωπώντας έτσι το 18,2% όλων των θανάτων λόγω κακοήθειας (Ferlay et al. 2010).

Η πλειονότητα των περιπτώσεων με καρκίνο του πνεύμονα εμφανίζεται σήμερα στις αναπτυσσόμενες χώρες (55%). Βέβαια τόσο στις ανεπτυγμένες όσο και στις αναπτυσσόμενες περιοχές του κόσμου τα επιδημιολογικά στοιχεία μεταξύ γυναικών και ανδρών διαφέρουν (Εικόνα 1). Η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα παγκοσμίως είναι υπερδιπλάσια στους άνδρες παρά στις γυναίκες (αναλογία ποσοστού 2,5: 1,0). Επιπλέον, στους άνδρες ο καρκίνος του πνεύμονα εξακολουθεί να αποτελεί την πιο συχνή μορφή καρκίνου παγκοσμίως (1,1 εκατομμύρια περιπτώσεις, ποσοστό που αντιστοιχεί στο 16,5% όλων των καρκίνων) και την κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο (950.000 θάνατοι), έχοντας υψηλά ποσοστά εμφάνισης στην Κεντρική-Ανατολική και Νότια Ευρώπη, στη Βόρεια Αμερική και την Ανατολική Ασία. Πολύ χαμηλά ποσοστά καρκίνου του πνεύμονα εξακολουθούν να παρατηρούνται στη Μέση και Δυτική Αφρική. Στις γυναίκες, η επίπτωση της νόσου είναι γενικά χαμηλότερη, αλλά σε παγκόσμιο επίπεδο, ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί σήμερα τον τέταρτο πιο συχνό τύπο καρκίνου (516.000 περιπτώσεις, ποσοστό 8,5% όλων των καρκίνων) και τη δεύτερη συχνότερη αιτία θανάτου από καρκίνο στις γυναίκες (427.000 θάνατοι, ποσοστό 12,8% του συνόλου) (Jemal et al. 2011). Η μεγαλύτερη επίπτωση εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα παρατηρείται στη Βόρεια Αμερική (όπου σήμερα αποτελεί τον δεύτερο πιο συχνό τύπο καρκίνου στις γυναίκες) και η μικρότερη στη Μέση Αφρική (Εικόνα 2) (Ferlay et al. 2010).

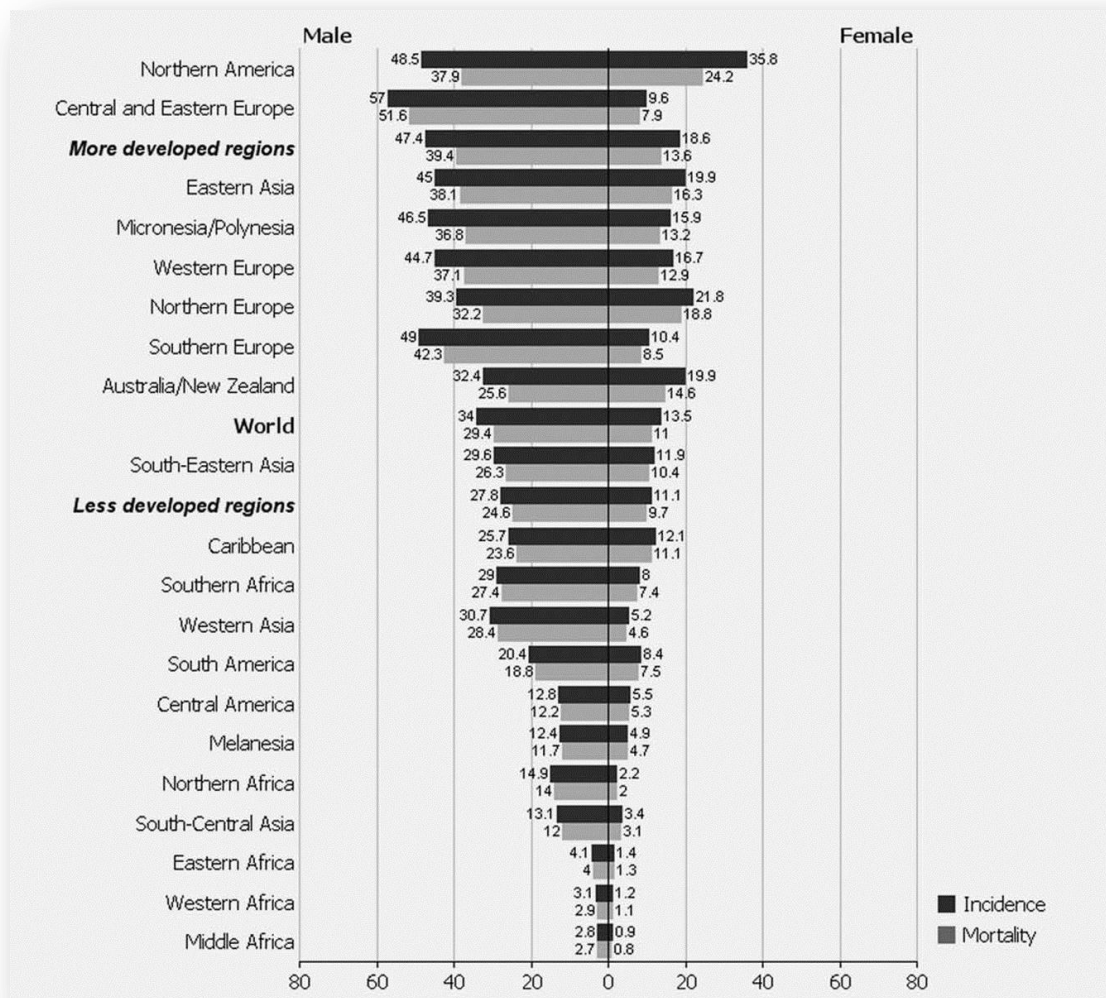
Τόσο η συχνότητα εμφάνισης όσο και η θνησιμότητα ανά φύλο σε διαφορετικές χώρες εξηγούνται σχεδόν αποκλειστικά από αλλαγές στις εθνικές συνήθειες καπνίσματος (Youlden, Cramb and Baade 2008, Bray and Weiderpass 2010). Υπολογίζεται ότι περίπου το 80% των θανάτων στους άνδρες από καρκίνο του πνεύμονα και το 50% στις γυναίκες κάθε χρόνο, οφείλεται στο κάπνισμα σε

παγκόσμιο επίπεδο (Ezzati et al. 2005, Ezzati and Lopez 2003). Σε πολλές δυτικές χώρες, όπου η συνήθεια καπνίσματος καθιερώθηκε και κορυφώθηκε στα μέσα του περασμένου αιώνα, όπως στις Ηνωμένες Πολιτείες, στο Ηνωμένο Βασίλειο, στον Καναδά και στην Αυστραλία, τα ποσοστά καρκίνου του πνεύμονα έχουν μειωθεί στους άνδρες και στις γυναίκες έχουν σταθεροποιηθεί (Jemal et al. 2008). Αντίθετα, σε χώρες όπου η καπνιστική συνήθεια ξεκίνησε σχετικά πρόσφατα και συνεχίζει να αυξάνεται, όπως στην Κίνα, στην Κορέα και σε πολλές χώρες της Αφρικής, τα ποσοστά καρκίνου του πνεύμονα αυξάνονται συνεχώς (Youlden et al. 2008, Lam, White and Chan-Yeung 2004). Επίσης το παθητικό κάπνισμα φαίνεται να αποτελεί ένα πιθανό αίτιο ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα (Taylor, Najafi and Dobson 2007). Μάλιστα η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα σε παθητικούς καπνιστές είναι έως και 30% μεγαλύτερη απ' ότι σε μη παθητικούς καπνιστές, αν και υπάρχουν ασάφειες κατά πόσο ο καρκίνος του πνεύμονα στους μη καπνιστές οφείλεται στο παθητικό κάπνισμα (Sun, Schiller and Gazdar 2007).

Εκτός από το κάπνισμα, το οποίο αποτελεί μια καλά τεκμηριωμένη αιτία εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα, πολλές επιδημιολογικές μελέτες συσχετίζουν τον καρκίνο του πνεύμονα και με άλλους παράγοντες, όπως είναι η ατμοσφαιρική ρύπανση, η έκθεση σε ραδιενέργεια, το ραδιενεργό αέριο ραδόνιο, η έκθεση σε αμίαντο, ορμονικοί παράγοντες, γενετικοί παράγοντες, άλλα νοσήματα του πνεύμονα, το ευάλωτο ανοσοποιητικό σύστημα και η ύπαρξη οικογενειακού ιστορικού εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα (Sun et al. 2007).



Εικόνα 1. Εκτιμώμενες τιμές (σε χιλιάδες) νέων περιστατικών καρκίνου και θανάτων σε ανεπτυγμένες και αναπτυσσόμενες χώρες κατά το έτος 2008 στις γυναίκες (α) και στους άνδρες (β) (Ferlay et al. 2010).



Εικόνα 2. Εκτιμώμενη συχνότητα εμφάνισης και ποσοστά θνησιμότητας (τυποποιημένα με την ηλικία) καρκίνου του πνεύμονα (Ferlay et al. 2010).

1.2 Ιστολογική κατάταξη

Η συντριπτική πλειοψηφία καρκίνων του πνεύμονα αφορά κακοήθειες που προκύπτουν από τα επιθηλιακά κύτταρα. Αν και το καρκίνωμα του πνεύμονα μπορεί να διαιρεθεί σε πολλές υποκατηγορίες, ιστορικά η σημαντικότερη διάκριση είναι μεταξύ του μικροκυτταρικού (Small Cell Lung Cancer – SCLC) και του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (ΜΜΚΠ-NSCLC) (Travis 2004). Ο διαχωρισμός αυτός οφείλεται στο γεγονός ότι οι δυο αυτές κατηγορίες παρουσιάζουν διαφορές ως προς την βιολογική τους συμπεριφορά, οι οποίες επηρεάζουν την θεραπευτική αντιμετώπιση και την πρόγνωση τους. Όσον αφορά τον ΜΜΚΠ, ευθύνεται περίπου για το 85% όλων των καρκίνων του πνεύμονα και διαιρείται

περαιτέρω σε τρεις κύριους ιστολογικούς υπότυπους, τον ακανθοκυτταρικό ή πλακώδες, το αδenoκαρκίνωμα και το μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα. Σε μερικές περιπτώσεις υπάρχει συνδυασμός των ιστολογικών υπότυπων (Travis 2004).

Η ιστολογική ταξινόμηση του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα γινόταν μέχρι πρόσφατα με βάση την αναθεώρηση που έγινε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας το 2004 (Πίνακας 1). Το σύστημα αυτό βασίζεται στην μορφολογική διάκριση των κυτταρικών τύπων και του τρόπου ανάπτυξης τους, με την χρήση κοινού μικροσκοπίου, μετά από χρώση των ιστολογικών τομών με ιωσίνη - αιματοξυλίνη.

1.2.1 Πλακώδες (ή Ακανθοκυτταρικό, Squamous Cell Carcinoma, SCC)

Τα πλακώδη καρκινώματα αντιπροσωπεύουν το 25% όλων των καρκίνων του πνεύμονα. Χαρακτηρίζονται από την παρουσία μεσοκυττάρων γεφυρών και την έντονη κερατινοποίηση, χαρακτηριστικά τα οποία ποικίλουν ανάλογα με το βαθμό διαφοροποίησης. Συνήθως εντοπίζονται στα κεντρικά τμήματα του πνεύμονα και γενικά δίνουν μεταστάσεις αργά στην πορεία της νόσου. Η νέκρωση του όγκου, η οποία μερικές φορές εμφανίζεται ως μεγάλη κοιλότητα, είναι χαρακτηριστικό σε προχωρημένα στάδια της νόσου.

1.2.2 Αδenoκαρκίνωμα (Adenocarcinoma, ADC)

Τα αδenoκαρκινώματα αναπτύσσονται στην περιφέρεια των πνευμόνων, ενώ συχνά σχετίζονται με τον υπεζωκότα, δίνουν νωρίς μεταστάσεις και χαρακτηρίζονται από τον σχηματισμό αδένων. Είναι ο συχνότερος (40%) σε εμφάνιση ιστολογικός τύπος καρκίνου του πνεύμονα και ιδιαίτερα μεταξύ των μη καπνιστών και των γυναικών.

Ξεχωριστή υποκατηγορία του αδenoκαρκινώματος αποτελεί το βρογχοκυψελιδικό καρκίνωμα (BAC), το οποίο αναπτύσσεται κατά μήκος των κυψελιδικών δομών χωρίς στοιχεία διήθησης.

1.2.3 Μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα (Large Cell Carcinoma, LCC)

Το μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα αποτελεί το 10% του συνόλου των καρκίνων του πνεύμονα και είναι συνήθως αδιαφοροποίητο, δηλαδή χαρακτηρίζεται από άτυπα κύτταρα με εστιακή νέκρωση, χωρίς καμιά ένδειξη κερατινοποίησης (χαρακτηριστικό του πλακώδους καρκινώματος) ή σχηματισμό αδένων (χαρακτηριστικό

του αδενοκαρκινώματος). Οι όγκοι αυτοί έχουν περιφερική εντόπιση και σχετίζονται με πρώιμη μετάσταση.

Ωστόσο, λόγω της αξιοσημείωτης προόδου των τελευταίων έξι ετών στην κατανόηση του αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα, ιδιαίτερα από την σκοπιά της ιατρικής ογκολογίας, της μοριακής βιολογίας και της ακτινολογίας, υπήρξε ανάγκη για αναθεώρηση της ταξινόμησης του ΜΜΚΠ (Travis et al. 2011), η οποία ισχύει σήμερα και βασίζεται όχι μόνο στην παθολογία, αλλά περισσότερο σε μια ολοκληρωμένη πολυδιάστατη πλατφόρμα. Ένας λόγος που σηματοδότησε αυτή την αναθεώρηση ήταν το γεγονός ότι η θεραπευτική επιλογή εξαρτάται πλέον από τον ιστολογικό τύπο του όγκου. Αξίζει να σημειωθεί ότι μέχρι πρόσφατα η πρόγνωση καθώς και η θεραπευτική αντιμετώπιση του ασθενούς σχετιζόνταν περισσότερο με το στάδιο παρά με τον τύπο του ΜΜΚΠ.

Πίνακας 1. Ιστολογική ταξινόμηση του μη μικροκυτταρικού καρκίνου πνεύμονα.

Πλακώδες (ή ακανθοκυτταρικό) καρκίνωμα	
	<i>Θηλώδες</i>
	<i>Διαυγοκυτταρικό</i>
	<i>Μικροκυτταρικό</i>
	<i>Βασικοειδές</i>
Αδενοκαρκίνωμα	
	<i>Αδενοκαρκίνωμα μεικτού τύπου</i>
	<i>Κυψελιδικό αδενοκαρκίνωμα</i>
	<i>Θηλώδες αδενοκαρκίνωμα</i>
	<i>Βρογχοκυψελιδικό καρκίνωμα</i>
	<i>Μη βλεννώδες</i>
	<i>Βλεννώδες</i>
	<i>Μεικτό βλεννώδες και μη βλεννώδες ή ακαθόριστο</i>
	<i>Συμπαγές βλεννοπαραγωγό αδενοκαρκίνωμα</i>
	<i>Εμβρυικό αδενοκαρκίνωμα</i>
	<i>Κολλοειδές αδενοκαρκίνωμα</i>
	<i>Βλεννώδες κυσταδενοκαρκίνωμα</i>
	<i>Αδενοκαρκίνωμα τύπου 'signet ring'</i>
	<i>Διαυγοκυτταρικό αδενοκαρκίνωμα</i>
Μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα	
	<i>Μεγαλοκυτταρικό νευροενδοκρινικό καρκίνωμα</i>
	<i>Μεικτό μεγαλοκυτταρικό νευροενδοκρινικό</i>
	<i>Βασικοειδές</i>
	<i>Καρκίνωμα τύπου λεμφοεπιθηλιώματος</i>
	<i>Διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα</i>
	<i>Μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα με ραβδοειδή φαινότυπο</i>
Αδενοπλακώδες καρκίνωμα	
Σαρκοματοειδές καρκίνωμα	
	<i>Πολύμορφο καρκίνωμα</i>
	<i>Ατρακτοκυτταρικό καρκίνωμα</i>
	<i>Γιγαντοκυτταρικό καρκίνωμα</i>
	<i>Καρκινοσάρκωμα</i>
	<i>Πνευμονικό βλάστωμα</i>
Καρκινοειδής όγκοι	
	<i>Τυπικό καρκινοειδές</i>
	<i>Άτυπο καρκινοειδές</i>
Όγκοι τύπου σιελογόνων αδένων	
	<i>Βλεννοεπιδερμοειδές καρκίνωμα</i>
	<i>Αδενοκυστικό σάρκωμα</i>
	<i>Επιθηλιακό - μυοεπιθηλιακό καρκίνωμα</i>

1.3 Σταδιοποίηση

Η σταδιοποίηση του ΜΜΚΠ γίνεται με βάση το Διεθνές Σύστημα σταδιοποίησης TNM. Με το σύστημα αυτό γίνεται εκτίμηση της ανατομικής έκτασης της νόσου, σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά του πρωτοπαθούς όγκου (T: tumor), την παρουσία ή μη πυλαίων, μεσοθωρακίου ή άλλων λεμφαδένων (N: nodes) και την παρουσία ή μη απομακρυσμένων μεταστάσεων (M: metastases). Έτσι στο σύστημα αυτό υπάρχουν και αριθμητικοί δείκτες, από 0 έως 4, για τον προσδιορισμό του βαθμού και της έκτασης της προσβολής (Πίνακας 2). Η σταδιοποίηση είναι πολύ σημαντική στον καθορισμό της θεραπείας και της πρόγνωσης των ασθενών με ΜΜΚΠ. Επίσης προσφέρει μια κοινή γλώσσα ανάμεσα σε ιατρούς ποικίλων ειδικοτήτων που σχετίζονται με τον καρκίνο του πνεύμονα.

Η παθολόγοανατομική σταδιοποίηση (pTNM, pStage) βασίζεται στα αποτελέσματα της παθολόγοανατομικής εξέτασης των ιστών που αφαιρέθηκαν από τον ασθενή κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης. Είναι ακριβέστερη όσον αφορά τον προσδιορισμό της έκτασης του όγκου και της προσβολής επιχώριων λεμφαδένων.

Η κλινική σταδιοποίηση (cTNM, cStage) βασίζεται στις πληροφορίες που συλλέγονται για την κλινική κατάσταση του ασθενούς πριν τη λήψη απόφασης για την επιλογή της θεραπείας.

Εκτός από την ακτινογραφία θώρακος, η αξονική και η μαγνητική τομογραφία αποτελούν κύρια μέσα στη διαδικασία της σταδιοποίησης. Άλλες εξετάσεις όπως η βιοψία της πρωτοπαθούς βλάβης (ή κυτταρολογική εξέταση), το σπινθηρογράφημα εκπομπής ποζιτρονίων (PET), το σπινθηρογράφημα οστών και η μεσοθωρακοσκόπηση χρησιμοποιούνται για να εντοπισθούν πιθανές μεταστάσεις σε λεμφαδένες ή απομακρυσμένα όργανα και να μπορέσει να σταδιοποιηθεί η νόσος (Gould et al. 2003, Silvestri et al. 2007).

Μέχρι πρόσφατα ήταν σε ισχύ η 6^η αναθεώρηση σταδιοποίησης του ΜΜΚΠ (TNM-UICC 2002, Πίνακας 2) βασιζόμενη σε βάση δεδομένων του νοσοκομείου M. D. Anderson Cancer Center και μελετώντας ασθενείς που κυρίως είχαν υποβληθεί σε χειρουργική εξαίρεση του όγκου (Sobin and Wittekind 2002, Mountain 2002). Οι

αδυναμίες της 6ης αναθεώρησης οδήγησαν την διεθνή ένωση για την μελέτη του καρκίνου του πνεύμονα (IASLC) στην απόφαση να προταθεί νέα αναθεώρηση με διαφορετική όμως μέθοδο. Έτσι το έτος 2007 προτάθηκε νέα αναθεώρηση βασισμένη σε 68.463 περιπτώσεις ασθενών με ΜΜΚΠ, που συλλέχθηκαν από διεθνή κέντρα και οι ασθενείς είχαν την δυνατότητα να υποβληθούν σε συνδυασμό θεραπευτικών παρεμβάσεων. Η 7^η αναθεώρηση έγινε αποδεκτή το 2009 και εφαρμόζεται παγκοσμίως από τις αρχές του 2010.

Η 7^η αναθεωρημένη σταδιοποίηση του ΜΜΚΠ αποδίδει πιο αξιόπιστα την σχέση μεταξύ σταδίου της νόσου και επιβίωσης των ασθενών, καθορίζοντας έτσι συγκεκριμένες ομάδες ασθενών και διαφορετική θεραπευτική προσέγγιση. Οι αλλαγές αντιστοιχούν στα χαρακτηριστικά του όγκου (T) και της μετάστασης (M), ενώ δεν προτείνονται επί του παρόντος τροποποιήσεις όσον αφορά τους λεμφαδένες (N) (Πίνακας 3) [17].

Πίνακας 2. Σταδιοποίηση του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα σύμφωνα με το σύστημα TNM (6^η έκδοση) (Sobin and Wittekind 2002).

Πρωτοπαθής όγκος (T)			
T0	Μη εντοπίσιμος πρωτοπαθής όγκος		
TX	Μη εντοπίσιμος πρωτοπαθής όγκος με θετική κυτταρολογική εξέταση		
Tis	Καρκίνωμα in situ		
T1	Όγκος διαμέτρου μικρότερης των 3 cm χωρίς τοπική διήθηση		
T2	Όγκος διαμέτρου μεγαλύτερης των 3 cm ή υπεζωκοτική διήθηση ή με ατελεκτασία σε λιγότερο από ολόκληρο τον πνεύμονα, περισσότερο από 2 cm από την τρόπιδα.		
T3	Όγκος οποιουδήποτε μεγέθους με διήθηση στο θωρακικό τοίχωμα ή λιγότερο από 2 cm από την τρόπιδα ή με πρόκληση ατελεκτασίας σε ολόκληρο τον πνεύμονα ή διήθηση διαφράγματος, μεσοθωρακίου, υπεζωκότα, τοιχωματικού περικαρδίου		
T4	Όγκος που διηθεί ένα από τα ακόλουθα: μεσοθωράκιο, περικάρδιο, μεγάλα αγγεία, τραχεία, οισοφάγος, τρόπιδα, σπόνδυλος, πλευριτικό υγρό με κακοήγη κύτταρα, δορυφόρα οζία στον ίδιο λοβό με την πρωτοπαθή εστία		
Προσβολή λεμφαδένων (N)			
NX	Επιχώριοι λεμφαδένες δεν αναγνωρίζονται		
N0	Απουσία νόσου στους λεμφαδένες		
N1	Προσβεβλημένοι σύστοιχοι περιβρογχικοί, ενδοπνευμονικοί, πυλαίοι λεμφαδένες		
N2	Προσβεβλημένοι σύστοιχοι μεσοθωρακικοί ή και υποτροπιδικοί λεμφαδένες		
N3	Προσβεβλημένοι ετερόπλευροι πυλαίοι ή μεσοθωρακικοί λεμφαδένες, ομόπλευροι ή ετερόπλευροι υπερκλείδιοι λεμφαδένες		
Απομακρυσμένες μεταστάσεις (M)			
MX	Απομακρυσμένες μεταστάσεις δεν αναγνωρίζονται		
M0	Απουσία μακρινών μεταστάσεων		
M1	Μακρινές μεταστάσεις ή δορυφόρα οζία σε λοβό διαφορετικό από αυτόν της πρωτοπαθούς εστίας		
Σταδιοποίηση			
Στάδιο 0	Tis	N0	M0
Στάδιο IA	T1	N0	M0
Στάδιο IB	T2	N0	M0
Στάδιο IIA	T1	N1	M0

Στάδιο IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Στάδιο IIIA	T1-3	N2	M0
	T3	N1	M0
Στάδιο IIIB	Κάθε T	N3	M0
	T4	Κάθε N	M0
Στάδιο IV	Κάθε T	Κάθε N	M1

Πίνακας 3. Αλλαγές στην σταδιοποίηση του ΜΜΚΠ μεταξύ 6^{ης} και 7^{ης} αναθεώρησης TNM.

	<i>6^η έκδοση TNM</i>	<i>7^η έκδοση TNM 2009</i>	
T	T1	≤2cm	T1a
		>2cm αλλά ≤ 3cm	T1b
	T2	>3cm αλλά ≤5cm	T2a
		>5cm αλλά ≤7cm	T2b
		>7cm	T3
	T4	Οζίδια στον ίδιο λοβό	T3
Πλευριτικό ή περικαρδικό υγρό με κακοήθη κύτταρα		M1a	
N		Καμία αλλαγή	
M		Οζίδια σε ομόπλευρο λοβό	T4
		Οζίδια στον υπεζωκότα	M1a
		Απομακρυσμένη μετάσταση	M1b

1.4 Κλινική εικόνα

Περισσότεροι από το 90% των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα είναι συμπτωματικοί κατά την αρχική αξιολόγηση. Μάλιστα το 75% των ασθενών παρουσιάζουν τοπικά εκτεταμένη, μη χειρουργήσιμη ή μεταστατική νόσο κατά την διάγνωση εμφανίζοντας τα ανάλογα συμπτώματα. Οι ασθενείς μπορεί να εμφανίζουν μη ειδικά συμπτώματα όπως είναι η ανορεξία, η εύκολη κόπωση, η απώλεια βάρους και ο χαμηλός πυρετός ή και άμεσα συμπτώματα που προκαλούνται από τον πρωτοπαθή όγκο ή την ενδοθωρακική ή την εξωθωρακική εξάπλωση (Πίνακας 4) (Beckles et al. 2003). Ένα μικρό ποσοστό ασθενών παρουσιάζει παρανεοπλασματικά σύνδρομα (Spiro, Gould and Colice 2007). Τα πιο κοινά συμπτώματα του

πρωτοπαθούς όγκου είναι η δυσφορία, ο βήχας, η δύσπνοια και η αιμόπτυση. Από την ενδοθωρακική επέκταση του όγκου συνηθέστερα προκαλείται βράγχος φωνής, παράλυση του ημιδιαφράγματος αριστερά, σύνδρομο Horner, θωρακικός πόνος, δυσφαγία και σύνδρομο άνω κοίλης φλέβας. Τα συμπτώματα που οφείλονται σε μεταστατική επέκταση του όγκου αναφέρονται από το ένα τρίτο των ασθενών κατά την αρχική αξιολόγηση. Συχνότερα είναι αυτά που σχετίζονται με μεταστάσεις στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στο ήπαρ, στα οστά, στους τραχηλικούς και υπερκλείδιους λεμφαδένες. Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται οι πιο συχνές θέσεις εμφάνισης μεταστάσεων στον ΜΜΚΠ. Στα παρανεοπλασματικά σύνδρομα που εμφανίζονται σε ποσοστό 3-10% όλων των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα περιλαμβάνονται η υπερασβεστιαμία, το σύνδρομο Cushing, το σύνδρομο απρόσφορης έκκρισης ADH, κάποια νευρομυϊκά σύνδρομα, η πληκτροδακτυλία, η υπερτροφική οστεοαρθροπάθεια και οι αιματολογικές εκδηλώσεις, όπως η θρομβοφλεβίτιδα.

Πίνακας 4. Συμπτώματα καρκίνου του πνεύμονα κατά την διάγνωση.

Συμπτώματα	Εύρος συχνότητας (%)
Βήχας	8-75
Απώλεια βάρους	0-68
Δύσπνοια	3-60
Θωρακικός πόνος	20-49
Αιμόπτυση	6-35
Οστικός πόνος	6-25
Πληκτροδακτυλία	0-20
Πυρετός	0-20
Καταβολή	0-10
Απόφραξη άνω κοίλης φλέβας	0-4
Βράγχος φωνής	0-2
Δυσφαγία	0-2

Ο διαγνωστικός έλεγχος του ΜΜΚΠ πρέπει να περιλαμβάνει ιστολογική επιβεβαίωση-διάγνωση, αξιολόγηση της έκτασης της νόσου (σταδιοποίηση) καθώς επίσης και μια ανάλυση της γενικής κατάστασης του ασθενούς με στόχο την επιλογή της θεραπευτικής αντιμετώπισης. Όσον αφορά την αξιολόγηση της γενικής

κατάστασης του ασθενούς, αρχικά εκτιμάται η πνευμονική λειτουργία. Επιπλέον, λαμβάνονται υπόψη οι καρδιαγγειακές συνοσηρότητες και κάθε σοβαρή βλάβη της ηπατικής ή νεφρικής λειτουργίας (Thomas et al. 2000).

Η ιστολογική επιβεβαίωση του καρκίνου του πνεύμονα μπορεί να γίνει με διάφορες τεχνικές, παραδείγματος χάριν με κυτταρολογική ανάλυση πτυέλων, με βρογχοσκόπηση με ή χωρίς διαβρογχική αναρρόφηση με βελόνα, καθώς και με την μέθοδο της θωρακοκέντησης, με παρακέντηση λεπτής βελόνης (FNA) ή μετά από χειρουργική επέμβαση (Rivera, Detterbeck and Mehta 2003).

Πίνακας 5. Θέσεις μεταστάσεων του ΜΜΚΠ.

Εστία μετάστασης	Συχνότητα εμφάνισης
Οστά	25%
Κεντρικό νευρικό σύστημα	20-50%
Εγκέφαλος	20%
Περικάρδιο	20%
Τραχηλικοί λεμφαδένες	15-60%
Υπεζωκότας	8-15%
Επινεφρίδια	20%
Ήπαρ	1-35%
Δέρμα	1-3%

1.5 Θεραπευτική προσέγγιση του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα

Τα είδη της θεραπείας που συστήνονται για την αντιμετώπιση του ΜΜΚΠ, όταν η επέκταση της νόσου είναι μόνο τοπική, είναι η χειρουργική επέμβαση και η ακτινοθεραπεία. Στην συστηματική θεραπεία χρησιμοποιούνται η συμβατική χημειοθεραπεία και οι στοχευμένες θεραπείες, που αναπτύσσονται ολοένα και περισσότερο τα τελευταία χρόνια.

Η θεραπεία του ΜΜΚΠ μπορεί να είναι ενός είδους ή συνδυασμός πολλών μαζί. Η χημειοθεραπεία, η ακτινοθεραπεία και η χημειο-ακτινοθεραπεία μπορεί να προηγούνται της χειρουργικής επέμβασης (εισαγωγική θεραπεία, neoadjuvant) ή μπορεί να την ακολουθούν (επικουρική θεραπεία, adjuvant).

Παρακάτω αναφέρονται τα βασικά σημεία των κατευθυντήριων συστάσεων του Αμερικανικού Κολλεγίου Ιατρών Θώρακος (ACCP, 2007) όσον αφορά τις θεραπευτικές επιλογές για την αντιμετώπιση του ΜΜΚΠ ανάλογα με το στάδιο.

1.5.1 Στάδια I και II

Το 25% έως 30% των περιπτώσεων με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα είναι πρώιμου σταδίου (Scott et al. 2007). Για τους ασθενείς χωρίς αντενδείξεις (καρδιακή, νεφρική ανεπάρκεια, ΧΑΠ) για χειρουργική επέμβαση, η εκτομή (ογκεκτομή, λοβεκτομή, πνευμονεκτομή) είναι η θεραπεία επιλογής. Την χειρουργική αντιμετώπιση ακολουθεί η επικουρική χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα, η οποία συνιστάται για όγκους σταδίου II και όχι για όγκους σταδίου I, εκτός εάν πρόκειται για κάποια κλινική δοκιμή. Σε ασθενείς με όγκους σταδίου I ή II, οι οποίοι δεν μπορούν να υποβληθούν σε χειρουργική εξαίρεση ενδείκνυται η ακτινοθεραπεία (Scott et al. 2007).

1.5.2 Στάδιο IIIA

Το 15% έως 20% των περιπτώσεων με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα διαγιγνώσκονται σε αυτό το στάδιο (T3N1M0). Οι όγκοι αυτοί είναι συχνά χειρουργήσιμοι, όπως στο στάδιο I και II. Μετά την χειρουργική επέμβαση συστήνεται επικουρική χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα (Robinson et al. 2007). Το στάδιο IIIA περιλαμβάνει επίσης όγκους με διαφορετική λεμφαδενική N2 έκταση (ποσοστό 10% όλων των περιπτώσεων ΜΜΚΠ). Με βάση αυτό διακρίνονται σε τέσσερις υποομάδες, όπου σε καθεμία ακολουθείται διαφορετική θεραπευτική αντιμετώπιση. Ο συνδυασμός χημειο-ακτινοθεραπείας εξακολουθεί να είναι η προτιμώμενη θεραπεία για τους ασθενείς σταδίου IIIA ανεξάρτητα του βαθμού της λεμφαδενικής έκτασης (Robinson et al. 2007).

1.5.3 Στάδιο IIIB

Περίπου το 10% έως 15% των ασθενών με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα διαγιγνώσκεται με στάδιο IIIB (Jett et al. 2007). Στο στάδιο αυτό συστήνεται

η χημειο-ακτινοθεραπεία. Η θεραπεία ασθενών σταδίου IIIB με περικαρδική ή πλευριτική συλλογή μπορεί να είναι μόνο παρηγορητική, όπως στους ασθενείς σταδίου IV. Σε ασθενείς σταδίου IIIB χωρίς διήθηση λεμφαδένων η χειρουργική αντιμετώπιση θα πρέπει να εξετάζεται.

Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις, σταδίου IIIB με διήθηση λεμφαδένων N3 και χωρίς περικαρδική ή πλευριτική συλλογή, ενδείκνυται η χημειο-ακτινοθεραπεία με βάση την πλατίνα, ταυτόχρονα ή διαδοχικά, ανάλογα την γενική κατάσταση του ασθενούς. Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις, με έντονα συμπτώματα της νόσου, μπορεί να πραγματοποιηθεί παρηγορητική ακτινοθεραπεία.

1.5.4 Στάδιο IV

Το 40% έως 50% των ασθενών με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα έχουν απομακρυσμένες μεταστάσεις και μάλιστα πολλαπλές κατά τη διάγνωση της νόσου. Για τους ασθενείς αυτούς μπορεί να προσφερθεί μόνο η παρηγορητική θεραπεία (συνδυασμοί χημειοθεραπευτικών σχημάτων και ακτινοθεραπείας) με σκοπό την ανακούφιση των συμπτωμάτων και τη βελτίωση της ποιότητας ζωής και την παράταση της συνολικής επιβίωσης (Socinski et al. 2007). Η γενική κατάσταση του ασθενούς, όπως εκτιμάται με βάση τον δείκτη Karnofsky (ECOG performance status), η ηλικία και οι συννοσηρότητες αποτελούν καθοριστικούς παράγοντες.

Από την δεκαετία του '80, η χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα παραμένει ο ακρογωνιαίος λίθος στην αντιμετώπιση του μεταστατικού ΜΜΚΠ. Μελέτες έδειξαν ότι η χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα αυξάνει μερικούς μήνες την επιβίωση των ασθενών με ΜΜΚΠ σε σύγκριση με μόνη την υποστηρικτική θεραπεία (διάμεση επιβίωση 6,5 έναντι 3,6 μηνών) (Socinski et al. 2003). Επιπλέον, ο συνδυασμός της πλατίνας με κάποιο κυτταροτοξικό παράγοντα τρίτης γενιάς (ταξάνη, γεμισιταμπίνη, βινoreλβίνη) φάνηκε να αυξάνει την επιβίωση των ασθενών περίπου για 10 μήνες. Έτσι, μετά το 1990, οι διπλέτες με βάση την πλατίνα αποτέλεσαν την καθιερωμένη αγωγή, σε ασθενείς με καλή γενική κατάσταση. Μη-πλατινούχοι συνδυασμοί μπορούν να αποτελούν επιλογή σε ασθενείς με απόλυτη αντένδειξη για θεραπεία με πλατινούχο σκεύασμα.

Τα τελευταία χρόνια η εμφάνιση στην θεραπευτική προσέγγιση του προχωρημένου μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα της εξατομικευμένης θεραπείας με βιολογικούς παράγοντες κερδίζει συνεχώς έδαφος. Πρόκειται για δραστικά μόρια, αντισώματα ή μικρομοριακούς αναστολείς της τυροσυνικής κινάσης που αναστέλλουν συγκεκριμένα ενδοκυττάρια μονοπάτια τα οποία σχετίζονται με την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και το μεταστατικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων. Για πρώτη φορά, δόθηκε έγκριση σε στοχευμένη θεραπεία, στο bevacizumab - μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα, VEGF – ως θεραπεία 1^{ης} γραμμής σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία σε ασθενείς με ΜΜΚΠ και μη πλακώδη ιστολογικό τύπο. Επίσης το χημειοθεραπευτικό πεμετρεξίδιο (pemetrexed) έχει εγκριθεί ως θεραπεία 1^{ης} γραμμής σε ασθενείς με ΜΜΚΠ και μη πλακώδη ιστολογικό τύπο. Με την χορήγηση αυτών των δυο φαρμάκων, η συνολική επιβίωση των ασθενών σταδίου IIIB/IV, αυξήθηκε στους 12 μήνες (Scagliotti et al. 2008, Sandler et al. 2006). Όσον αφορά το χημειοθεραπευτικό docetaxel και τον αναστολέα της τυροσυνικής κινάσης του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (erlotinib) έχουν πάρει έγκριση ως δεύτερη και μεγαλύτερη γραμμή θεραπείας σε ασθενείς με ΜΜΚΠ.

1.6 Επιβίωση

Η πενταετής επιβίωση στον ΜΜΚΠ παραμένει χαμηλή (10% - 15%) και αυτό κυρίως λόγω της διάγνωσης της νόσου σε προχωρημένο στάδιο (Molina et al. 2008). Προγνωστικοί παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση είναι το στάδιο της νόσου, ο ιστολογικός τύπος καθώς επίσης και η γενική κατάσταση του ασθενούς. Στον Πίνακα 6 παρατηρείται μείωση της επιβίωσης ανάλογα με το στάδιο και την ύπαρξη μεταστάσεων. Πιο συγκεκριμένα, στο στάδιο IA ή IB χωρίς διηθημένους λεμφαδένες όταν η νόσος αντιμετωπίζεται χειρουργικά, η 5ετής επιβίωση κυμαίνεται από 57% έως 67%. Στο στάδιο IIA ή IIB με διήθηση των επιχώριων λεμφαδένων και η χειρουργική αντιμετώπιση είναι εφικτή, η 5ετής επιβίωση κυμαίνεται από 39% έως 55%. Σε ασθενείς με προχωρημένο στάδιο νόσου και μη χειρουργήσιμους όγκους, η επιβίωση μειώνεται ακόμα περισσότερο. Έτσι σε ασθενείς με παθολογοανατομικό στάδιο IIIA η 5ετής επιβίωση είναι από 23% έως 25%, ενώ με κλινικό στάδιο IIIA η 5ετής επιβίωση

κυμαίνεται από 9% έως 13%. Στο Στάδιο IIIB όπου υπάρχει διήθηση των θωρακικών και τραχηλικών λεμφαδένων, η 5ετής επιβίωση μειώνεται ακόμα περισσότερο, φτάνοντας στο 3%-7%. Τέλος, στο στάδιο IV με κύρια στοιχεία την εκτεταμένη διήθηση λεμφαδένων ή τις απομακρυσμένες μεταστάσεις, η επιβίωση στον πρώτο χρόνο είναι 15% έως 35%, ενώ η 5ετής είναι μικρότερη από 1%.

Πίνακας 6. Πενταετής επιβίωση (%) ασθενών με ΜΜΚΠ σύμφωνα με το κλινικό και παθολογοανατομικό στάδιο.

Στάδιο	Πενταετής επιβίωση (%)	
	Κλινικό στάδιο	Παθ/κό στάδιο
IA	61	67
IB	38	57
IIA	34	55
IIB	22	38
IIIA	9	25
IIIB	7	--
IV	1	--

1.7 Καρκινογένεση και γενετική

Ο καρκίνος του πνεύμονα προκαλείται από τη συσσώρευση γενετικών ανωμαλιών (κατά τη διάρκεια μιας περιόδου αρκετών ετών), που απορυθμίζουν τους μηχανισμούς των κυττάρων του βρογχικού επιθηλίου που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση με συνέπεια τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό ή διαφοροποίηση τους και, τελικά, την δυνατότητα τους να διεισδύουν στους γειτονικούς ιστούς. Σε μοριακό επίπεδο, ενεργοποιούνται γονίδια πολλαπλασιασμού και απενεργοποιούνται τα γονίδια που καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων με αποτέλεσμα τα κύτταρα να ξεφεύγουν από το μηχανισμό της απόπτωσης.

Οι οικογένειες των γονιδίων που συμμετέχουν στην καρκινογένεση του πνεύμονα, ταξινομούνται σε δυο κύριες ομάδες: (α) τα ογκογονίδια και (β) τα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Τα ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια

προκαλούν αντίθετα αποτελέσματα στην καρκινογένεση. Τα ογκογονίδια διευκολύνουν τη δημιουργία κακοήθειας, ενώ τα ογκοκατασταλτικά παρεμποδίζουν την καρκινογένεση ρυθμίζοντας τα γονίδια που σχετίζονται με την κυτταρική ανάπτυξη (Niklinski et al. 2001, Rom et al. 2000). Τα γονίδια που θεωρείται ότι εμπλέκονται στην καρκινογένεση στον πνεύμονα παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7. Γονίδια που εμπλέκονται στην καρκινογένεση του πνεύμονα.

	Καρκίνος του πνεύμονα	
	Μη μικροκυτταρικός (ΜΜΚΠ)	Μικροκυτταρικός (ΜΚΠ)
Ογκογονίδια	<i>K-ras</i>	<i>c-myc</i>
	<i>N-ras</i>	<i>L-myc</i>
	<i>H-ras</i>	<i>N-myc</i>
	<i>c-myc</i>	<i>c-raf</i>
	<i>c-raf</i>	<i>c-myb</i>
	<i>c-fur</i>	<i>c-erbB1 (EGFR)</i>
	<i>c-fes</i>	<i>C-fims</i>
	<i>c-erbB1 (EGFR)</i>	<i>c-rfl</i>
	<i>c-erbB2 (HER2)</i>	
	<i>c-sis</i>	
	<i>bcl-1</i>	
Ογκοκατασταλτικά γονίδια	<i>p53</i>	<i>p53</i>
	<i>RB</i>	<i>RB</i>
	<i>3p</i>	<i>3p</i>

1.7.1 Ογκογονίδια

Τα περισσότερα ογκογονίδια είναι μεταλλαγμένες μορφές φυσιολογικών γονιδίων, τα οποία ονομάζονται πρωτο-ογκογονίδια και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση. Τα τελευταία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την απόπτωση ή και τα δύο σε φυσιολογικά κύτταρα. Υπάρχουν δυο μηχανισμοί μέσω των οποίων γίνεται η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων: (α) με μετάλλαξη του πρωτο-ογκογονιδίου που οδηγεί σε ένα παθολογικό γονιδιακό προϊόν και (β) με αύξηση της έκφρασης του πρωτο-ογκογονιδίου που οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα του φυσιολογικού γονιδιακού προϊόντος (Koparcka et al. 1985). Έτσι εάν ένα ογκογονίδιο μεταλλαχθεί ή υπερεκφραστεί τότε το κύτταρο στο οποίο βρίσκεται θα οδηγηθεί σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό καταλήγοντας σε καρκινικό. Η δράση των ογκογονιδίων είναι επικρατής και μια μόνο μετάλλαξη αρκεί για να οδηγήσει το κύτταρο σε ανεξέλεγκτη ανάπτυξη. Τα κυριότερα ογκογονίδια που σχετίζονται με τον ΜΜΚΠ είναι το *c-myc*, *ras* και *c-erbB-1*, *c-erbB-2* (τα δυο τελευταία κωδικοποιούν για τους υποδοχείς τυροσινικής κινάσης). Τα ογκογονίδια *c-erbB-1* και *K-ras* αλλά και τα προϊόντα τους αναλύονται εκτενέστερα σε επόμενες ενότητες.

1.7.2 Ογκοκατασταλτικά γονίδια

Τα προϊόντα των ογκοκατασταλτικών γονιδίων παρεμποδίζουν την ανώμαλη διαίρεση και τον κακοήγη μετασχηματισμό και προκαλούν καρκινογένεση μόνο όταν διακοπεί η λειτουργία τους. Η δράση τους είναι υπολειπόμενη, δηλαδή μόνο όταν και τα δυο αλληλόμορφα μεταλλάσσονται ή απαλείφονται, απορυθμίζεται η κυτταρική ανάπτυξη οδηγώντας σε καρκινογένεση. Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια απενεργοποιούνται λόγω απώλειας ενός αλληλομόρφου σε συνδυασμό με τη παρουσία μεταλλάξεων, απαλοιφών ή και των δύο. Οι πιο συχνές απαλοιφές εντοπίζονται στο βραχύ βραχίονα του σκέλους του χρωμοσώματος 3. Μελέτες έχουν δείξει ότι η απώλεια της ετεροζυγωτίας μέσω απαλοιφής ή σωματική μετάλλαξης του υπολειπόμενου φυσιολογικού αλληλομόρφου, αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα όλων των ογκογονιδίων. Έτσι στον ΜΜΚΠ, η απώλεια ετροζυγωτίας παρατηρείται στο 30% των περιπτώσεων. Αντιθέτως, στον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα το αντίστοιχο ποσοστό ανέρχεται στο 80% με 100% των περιπτώσεων.

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια *RB* (γονίδιο του ρετινοβλαστώματος) και *p53* είναι συχνά απορυθμισμένα στον ΜΜΚΠ. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *p53* εμφανίζονται σε ποσοστό πάνω από 50% των περιπτώσεων με ΜΜΚΠ (κυρίως στα πλακώδη καρκινώματα) και πάνω από το 80% των περιστατικών μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (Chiba et al. 1990, D'Amico et al. 1992) .

Σε φυσιολογικά κύτταρα, όταν συμβεί κάποια βλάβη στο DNA, η πρωτεΐνη *p53* μπορεί να σταματήσει τον κυτταρικό κύκλο στο σημείο ελέγχου G1, αποτρέποντας έτσι τα κύτταρα να προχωρήσουν στην φάση S του κύκλου, έως ότου το DNA επισκευαστεί. Επίσης, μπορεί να επάγει την απόπτωση του κυττάρου. Αντιθέτως, σε καρκινικά κύτταρα, όταν το γονίδιο *p53* μεταλλάσσεται, ο έλεγχος χάνεται. Ουσιαστικά, η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη *p53* δεν έχει τη δυνατότητα να διαμεσολαβήσει στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου.

2 Υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα

2.1 Εισαγωγή

Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι ένζυμα τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλούς τομείς της κυτταρικής βιολογίας (Schlessinger 2000). Εμπλέκονται στην απόπτωση, τον κυτταρικό κύκλο, την αναδιάταξη του κυτταροσκελετού, τη διαφοροποίηση, την ανάπτυξη, την ανοσολογική απάντηση έως και τη λειτουργία του νευρικού συστήματος (Cohen 2001). Απορρύθμιση των πρωτεϊνικών κινασών παρατηρείται σε διάφορες ασθένειες συμπεριλαμβανομένων αυτοάνοσων, νευρολογικών, καρδιαγγειακών και φλεγμονωδών νόσων, του σακχαρώδους διαβήτη καθώς και στον καρκίνο.

Τα ένζυμα αυτά ταξινομούνται σε δυο μεγάλες ομάδες, τις πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης και τις πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης. Κάποιες από αυτές τις πρωτεΐνες είναι καθαρά ενδοκυττάρια μόρια ενώ κάποια άλλα λειτουργούν ως διαμεμβρανικοί υποδοχείς. Η πρώτη κινάση τυροσίνης/υποδοχέας που ανακαλύφθηκε είναι ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) (Carpenter 1987, Cohen et al. 1982).

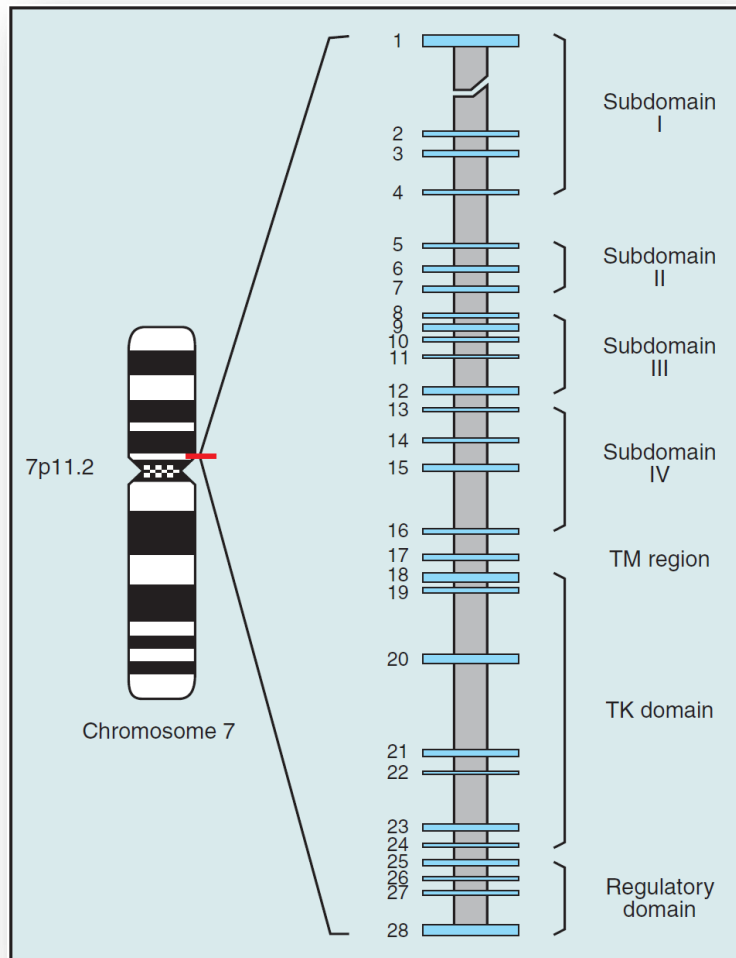
Η οικογένεια υποδοχέων του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα περιλαμβάνει τέσσερις υποδοχείς: HER1 (EGFR, erb-B1), HER2 (neu, erb-B2), HER3 (erb-B3) και HER4 (erb-B4). Δύο από τα μέλη της οικογένειας, ο EGFR και HER2, εμπλέκονται στην ανάπτυξη πολλών τύπων καρκίνου στον άνθρωπο. Οι υποδοχείς αυτοί έχουν πολλές ομοιότητες, όπως συμμετοχή σε διαδικασίες κυτταρικού πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης, απόπτωσης, αγγειογένεσης και μετανάστευσης. Ωστόσο, παρουσιάζουν διαφορές ως προς τη φύση των προσδετών και την ενεργοποίηση ενδοκυττάρων μηχανισμών. Για παράδειγμα ο υποδοχέας HER2 δεν έχει γνωστό προσδέτη, ενώ ο HER3 δεν έχει ενεργότητα κινάσης (Citri, Skaria and Yarden 2003).

Ο ρόλος του EGFR και όλων των ErbB υποδοχέων, είναι η μεταβίβαση εξωτερικών σημάτων στο εσωτερικό μια ευρείας ποικιλίας επιθηλιακών κυττάρων (Olayioye et al. 2000, Yarden and Sliwkowski 2001). Ο υποδοχέας EGFR παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των πιο βασικών κυτταρικών διαδικασιών, συμπεριλαμβανομένου τον κυτταρικό κύκλο, τη κυτταρική μετανάστευση, τον κυτταρικό μεταβολισμό και

επιβίωση, καθώς επίσης και το κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση (Hunter 1998).

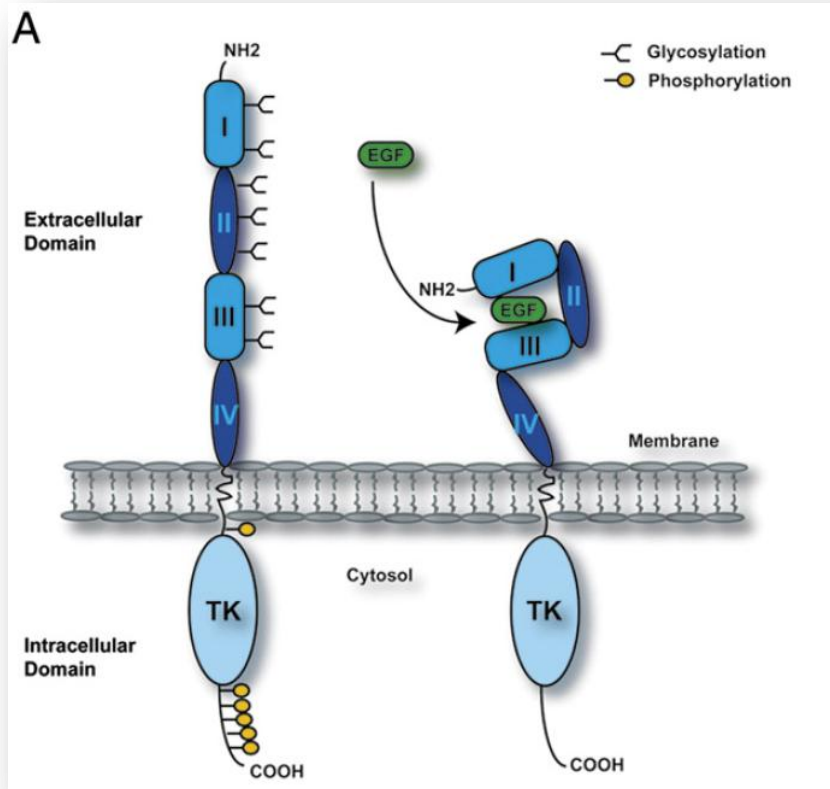
2.2 Το γονίδιο *EGFR* και η δομή της πρωτεΐνης

Η αλληλουχία του γονιδίου είναι πολύ συντηρημένη και διαφέρει ελάχιστα ανάμεσα στα είδη. Το ανθρώπινο γονίδιο του *EGFR* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7, στη θέση 7p11.2 και αποτελείται από 28 εξώνια καλύπτοντας περίπου 200kb του γενωμικού DNA (Εικόνα 3) (Reiter et al. 2001). Κωδικοποιεί για μια γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 170 kDa, η οποία αποτελείται από μια μονή πολυπεπτιδική αλυσίδα 1186 αμινοξέων. Όπως όλοι οι υποδοχείς κινάσης τυροσίνης, η *EGFR* πρωτεΐνη χαρακτηρίζεται από τρεις κύριες περιοχές: την εξωκυτταρική (εξώνια 1-16), την διαμεμβρανική (εξώνιο 17) και την ενδοκυτταρική περιοχή (εξώνια 18-28) (Εικόνα 3, Εικόνα 4) (Jorissen et al. 2003).



Εικόνα 3. Θέση του EGFR γονιδίου στο χρωμόσωμα 7. Παρουσιάζονται τα εξώνια καθώς και οι περιοχές της EGFR πρωτεΐνης που κωδικοποιούν (Martin, Kelly and Carney 2006).

Η εξωκυτταρική περιοχή είναι γλυκοζυλιωμένη και δομείται από 620 αμινοξέα. Μπορεί να διαιρεθεί περαιτέρω σε 4 επιμέρους περιοχές I, II III και IV (Εικόνα 4). Οι περιοχές I και III, είναι μεγάλες σε μήκος και έρχονται σε άμεση επαφή με τον προσδέτη, ενώ οι πλούσιες σε κυστείνες περιοχές II και IV παίρνουν μέρος στο διμερισμό του υποδοχέα (Burgess et al. 2003, Citri et al. 2003). Κρυσταλλογραφικές μελέτες της εξωκυτταρικής περιοχής του EGFR που βρίσκεται σε σύνδεση με ένα προσδέτη έδειξαν ότι οι περιοχές I, II και III σχηματίζουν μια δομή σαν θήκη, όπου δεσμεύεται ο προσδέτης (Εικόνα 4) (Ogiso et al. 2002, Garrett et al. 2002, Zandi et al. 2007).

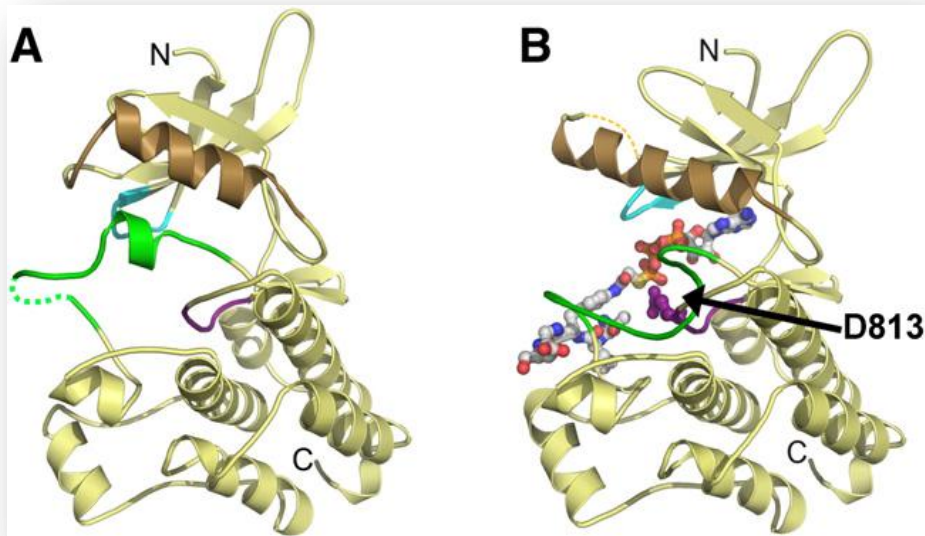


Εικόνα 4. Δομή του υποδοχέα EGFR. Πρόκειται για μια γλυκοζυλιωμένη διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία αποτελείται από τρεις κύριες περιοχές: μια εξωκυτταρική, μια διαμεμβρανική και μια ενδοκυτταρική περιοχή που περιέχει την κινάση τυροσίνης (TK). Η εξωκυτταρική περιοχή αποτελείται από τέσσερις επιμέρους περιοχές, I, II, III και IV. Μεταξύ των περιοχών I και III ο προσδέτης (EGF) αγκυροβολεί (Zandi et al. 2007).

Η διαμεμβρανική περιοχή του EGFR υποδοχέα αποτελείται από 23 αμινοξέα που σχηματίζουν μια μόνο α -έλικα, η οποία συνεχίζει στην παραμεμβρανική (juxtamembrane) περιοχή. Το παραμεμβρανικό τμήμα του υποδοχέα αποτελούμενο από 50 αμινοξέα έχει διάφορες ρυθμιστικές ιδιότητες που αφορούν την ενδοκύτωση του συμπλόκου προσδέτη/υποδοχέα, τη διαλογή του υποδοχέα στα πολωμένα κύτταρα ενώ, παράλληλα, αποτελεί και θέση σύνδεσης άλλων μορίων (π.χ. eps38, calmodulin and PKC) (Hubbard 2004, Hubbard 2009).

Όσον αφορά το ενδοκυτταρικό τμήμα της πρωτεΐνης, αυτό περιλαμβάνει την περιοχή της κινάσης τυροσίνης, η οποία κωδικοποιείται από τα εξώνια 18 έως 24 (αμινοξέα 685 - 953) και τη ρυθμιστική περιοχή στο καρβοξυτελικό άκρο της που κωδικοποιείται από τα εξώνια 25 έως 28 (αμινοξέα 954 - 1186). Η περιοχή της τυροσινικής κινάσης αποτελεί την καταλυτική μονάδα όλων των υποδοχέων με

ενεργότητα κινάσης τυροσίνης. Η ενεργότητα κινάσης τυροσίνης σχετίζεται με την ικανότητα της κινάσης να μεταφέρει μια φωσφορική ομάδα, χρησιμοποιώντας ως δότη φωσφόρου τη γ' φωσφορική ομάδα της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), στο υδροξύλιο συγκεκριμένων τυροσινών των ιδίων υποδοχέων (αυτοφωσφορυλίωση) ή άλλων πρωτεϊνών- στόχων (Hunter 1998). Στον EGFR υποδοχέα αποτελείται από δύο λοβούς - το λοβό N (αμινοξέα 685 - 769) και το λοβό C (αμινοξέα 773 - 953) (Εικόνα 5). Ο λοβός N αποτελείται από πέντε β-πτυχές και μια α-έλικα που είναι πλούσια σε γλυκίνη, ενώ ο λοβός C αποτελείται κυρίως από α-έλικες. Η τριφωσφορική αδενοσίνη που αποτελεί τον δότη φωσφόρου, καθώς και το υπόστρωμα που πρόκειται να φωσφορυλιωθεί, δεσμεύεται σε μια σχισμή ανάμεσα στους δύο λοβούς. Το ATP συγκρατείται μέσω της θηλιάς πρόσδεσης των φωσφορικών (phosphate binding loop /P-loop), η οποία βρίσκεται στο λοβό N. Το υπόστρωμα τοποθετείται κοντά στη γ-φωσφορική ομάδα του ATP μέσω θηλιάς ενεργοποίησης (activation loop) που βρίσκεται στο C λοβό. Η θηλιά των φωσφορικών και η θηλιά ενεργοποίησης είναι δύο περιοχές που είναι πολύ συντηρημένες σε όλες τις κινάσες τυροσίνης. Και οι δύο περιοχές διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στην καταλυτική διαδικασία. Όταν ο υποδοχέας βρίσκεται σε ανενεργή μορφή, η θηλιά ενεργοποίησης σχηματίζει μια κλειστή διαμόρφωση, αποτρέποντας έτσι την σύνδεση του υποστρώματος. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα περιλαμβάνει διαμορφωτικές αλλαγές και φωσφορυλίωση της θηλιάς ενεργοποίησης. Ουσιαστικά η καταλυτική διαδικασία εκτελείται από την υψηλά συντηρημένη καταλυτική θηλιά στη βάση της ενεργούς θέσης που βρίσκεται στο λοβό C. Βέβαια η κατάλυση προϋποθέτει ότι όλα τα ανωτέρω ρυθμιστικά στοιχεία έχουν την κατάλληλη χωροδιάταξη.



Εικόνα 5. Χωροταξική διαμόρφωση της κινάσης του υποδοχέα σε ανενεργή (A) και ενεργή (B) μορφή. Οι ρυθμιστικές περιοχές της κινάσης απεικονίζονται με διαφορετικά χρώματα: η θηλιά ενεργοποίησης (πράσινο), η αC – έλικα (καφέ), η θηλιά των φωσφορικών (κυανό) και η καταλυτική θηλιά (μωβ). Στην εικόνα B, απεικονίζεται η σύζευξη του καταλυτικού αμινοξέος ασπαρτικού στην θέση 813 (Asp813 - μωβ) με ένα πεπτίδιο ανάλογο του ATP (Zhang et al. 2006).

2.3 Προσδέτες και ενεργοποίηση του υποδοχέα EGFR

Οι προσδέτες του EGFR είναι αρκετοί, όπως π.χ. ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού α (TGF- α), η αμφιρεγουλίνη (AREG), η βετασελουλίνη (BTC), η επιρεγουλίνη (EREG) και ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας δεσμευμένος με ηπαρίνη (HB-EGF) (Hynes et al. 2001, Yarden 2001). Αρκετοί από αυτούς, όπως ο TGF- α , AREG και HB-EGF, συντίθενται ως ανενεργά πρόδρομα μόρια αγκυροβολημένα στην κυτταρική μεμβράνη και η μετατροπή τους σε ώριμους πλέον προσδέτες απαιτεί την αποκοπή τους από τη μεμβράνη με την δράση μεταλλοπρωτεασών της οικογένειας ADAM (Sahin et al. 2004). Με εξαίρεση τον EGF οι προσδέτες του EGFR γενικά δρουν ως αυτοκρινικοί ή παρακρινικοί αυξητικοί παράγοντες.

Εν απουσία προσδέτη, οι EGFR υποδοχείς υπάρχουν ως μονομερή στην κυτταρική επιφάνεια. Αντιθέτως μετά την απελευθέρωση του προσδέτη από την μεμβράνη, ο προσδέτης δεσμεύεται στον EGFR επάγοντας μία διαμορφωτική αλλαγή στον υποδοχέα προάγοντας με αυτόν τον τρόπο το σχηματισμό των ομο- και ετεροδιμερών, ανάλογα με το αν ο EGFR διμερίζεται με άλλο EGFR ή με άλλα μέλη της οικογένειας ErbB, αντιστοίχως (Hynes et al. 2001, Schlessinger 2000). Οι πιθανοί

συνδυασμοί διμερών που μπορούν να σχηματισθούν είναι δέκα και το αποτέλεσμα του διμερισμού είναι η γεινίαση των κυτταροπλασματικών ουρών των μονομερών υποδοχέων, η οποία προκαλεί την αυτοφωσφορλίωση σε κατάλοιπα τυροσίνης και την ενεργοποίηση της κινάσης του υποδοχέα (Garrett et al. 2002, Ogiso et al. 2002). Αυτές οι φωσφορυλιωμένες τυροσίνες αποτελούν θέσεις αγκυροβόλησης (docking sites) για διάφορες πρωτεΐνες, όπως είναι η PI3K, STAT3, PLCγ, SRC, SHC και GRB2, οι οποίες με την σειρά τους είναι δυνατόν να ενεργοποιηθούν ή να μεσολαβήσουν στην ενεργοποίηση άλλων μορίων μέσω της δραστικότητας της κινάσης του EGFR.

Έτσι τα μόρια τελεστές που μπορούν να ενεργοποιηθούν από τον EGFR είναι ποικίλα και συχνά είναι ειδικά του τύπου του κυττάρου. Τα διάφορα μονοπάτια μεταγωγής σήματος σε μεγάλο βαθμό καταλήγουν στον πυρήνα, ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο (Carpenter and Cohen 1990). Σε επόμενη ενότητα γίνεται εκτενέστερη αναφορά των μονοπατιών αυτών.

2.4 Απενεργοποίηση του EGFR

Ο υποδοχέας EGFR παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και εμπλέκεται στην ανανέωση και αναδιαμόρφωση των φυσιολογικών επιθηλιακών κυττάρων (Shtiegman and Yarden 2003). Δεδομένου ότι ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου είναι μία λειτουργία που συχνά αποδιοργανώνεται στον καρκίνο, δεν είναι τυχαίο ότι η σηματοδότηση του EGFR (EGFR signaling) είναι μια αυστηρά ρυθμιζόμενη διαδικασία. Έτσι η σηματοδότηση του EGFR μπορεί να ρυθμίζεται αρνητικά από την δράση φωσφατασών, τον μεταγραφικό / μεταφραστικό έλεγχο καθώς επίσης και από την μετα-μεταφραστική επεξεργασία. Επιπλέον αυτών των ρυθμιστικών σημείων, η αποικοδόμηση του ενεργοποιημένου υποδοχέα είναι ένας σημαντικός μηχανισμός με τον οποίο το κύτταρο μπορεί να ελέγξει / ρυθμίσει την σηματοδότηση.

Μόλις ο EGFR ενεργοποιηθεί με την δέσμευση του προσδέτη, το συμπλοκο προσδέτης/υποδοχέας ενδοκυτταρώνεται στο ενδόσωμα και είτε ανακυκλώνεται στην μεμβράνη του κυττάρου ή ουβικουϊτινώνεται και αποικοδομείται στα λυσοσώματα (Εικόνα 7) (Shtiegman and Yarden 2003). Η φωσφορλίωση της τυροσίνης στη θέση 1045 (Y1045) ενεργοποιεί τη θέση πρόσδεσης για την πρωτεΐνη CBL, η οποία μαζί με

το λιγάση E2, δεσμεύει και διευκολύνει την μονο-και / ή πολυ-ουβικουϊτινίωση του EGFR. Ο ουβικουϊτινωμένος πλέον EGFR μετακινείται προς τα λυσοσώματα όπου και αποδομείται (Grandal and Madshus 2008). Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι ορισμένα σύμπλοκα προσδέτη/υποδοχέα, όπως είναι ο EGF-EGFR, είναι πιο σύνηθες να οδηγούν στην αποδόμηση των υποδοχέα σε σύγκριση με άλλα σύμπλοκα (Ebner and Derynck 1991).

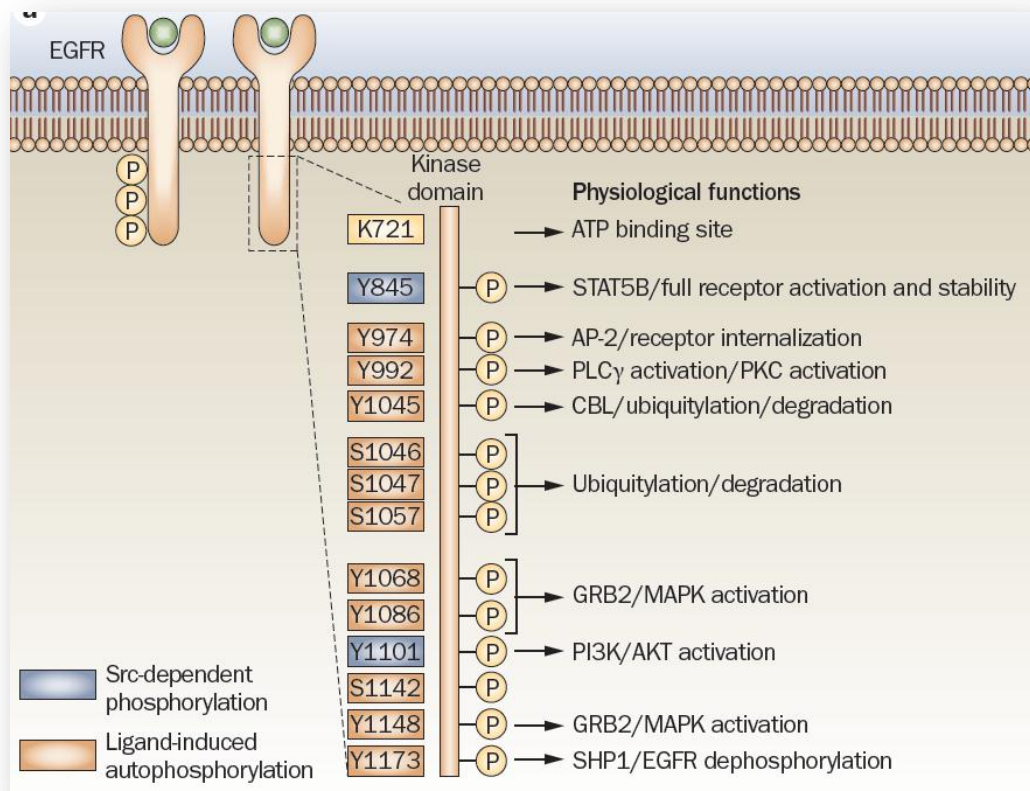
2.5 EGFR και κυτταρική σηματοδότηση

Υπάρχουν τέσσερα βασικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τον EGFR: το μονοπάτι της ενεργοποιημένης μιτογόνου πρωτεϊνικής κινάσης (MAPK, mitogen – activated protein kinase), το μονοπάτι της κινάσης 3-φωσφατιδυλινοσιτόλης (PI3K), της φωσφολιπάσης C γ (PLC γ) και η ενεργοποίηση κινασών της οικογένειας του σαρκώματος (Src) (Εικόνα 7). Κάθε ένα από αυτά τα μονοπάτια μπορεί να ενεργοποιηθεί από περισσότερες από μια φωσφορυλιωμένες τυροσίνες. Στην Εικόνα 6 απεικονίζονται όλα τα κατάλοιπα τυροσίνης τα οποία όταν φωσφορυλιωθούν ενεργοποιούν συγκεκριμένα μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης.

Μονοπάτι Ras/Raf/MAPK: Πρόκειται για ένα πολύ σημαντικό μονοπάτι που ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση. Μετά την φωσφορυλίωση του EGFR, το σύμπλοκο που αποτελείται από τις πρωτεΐνες προσαρμογείς Grb2 και Sos συνδέεται απευθείας, ή μέσω σύνδεσης με την πρωτεΐνη Shc σε ειδικές θέσεις πρόσδεσης του υποδοχέα (Batzer et al. 1994, Lowenstein et al. 1992). Η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί σε αλλαγή της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης Sos που επάγει στην Ras την ανταλλαγή της δεσμευμένης διφωσφορικής γουανωσίνης (GDP) με την τριφωσφορική (GTP), ενεργοποιώντας την Ras πρωτεΐνη. Στη συνέχεια η Ras-GTP ενεργοποιεί την Raf-1 η οποία μέσω ενδιάμεσων σταδίων φωσφορυλιώνει τις κινάσες Erk1 και Erk2 (Hallberg, Rayter and Downward 1994, Liebmann 2001), οι οποίες εισέρχονται στον πυρήνα όπου φωσφορυλιώνουν ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό του κυττάρου (Hill and Treisman 1995).

Μονοπάτι PI3K /Akt: Αυτή η οδός συμμετέχει στην κυτταρική ανάπτυξη, στην αντοχή της απόπτωσης, στη διήθηση και στη μετανάστευση (Shaw and Cantley 2006,

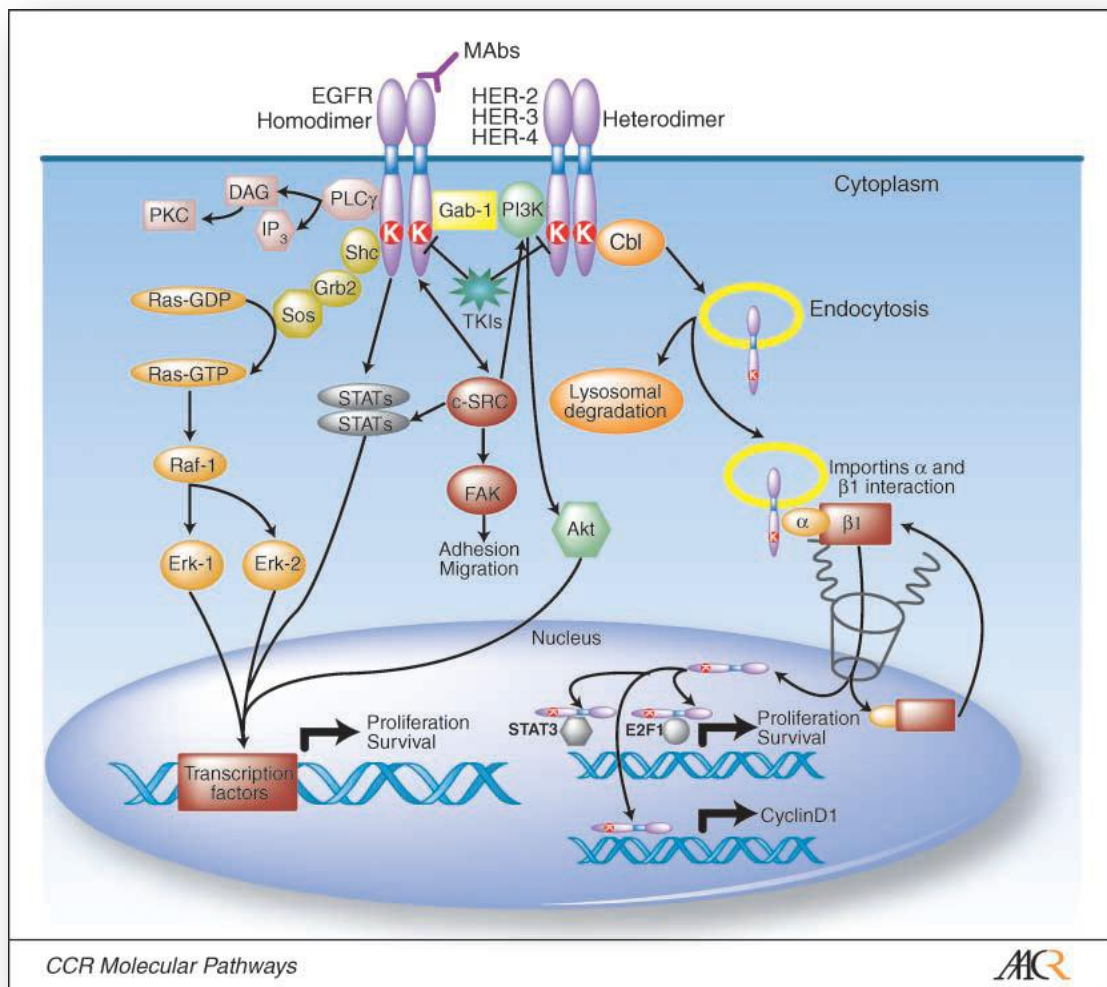
Vivanco and Sawyers 2002). Η κινάση της 3-φωσφατιδυλο-ινανοσιτόλης (PI3K: Phosphatidylinositol 3-Kinase) είναι ένα ετεροδιμερές ένζυμο αποτελούμενο από την ρυθμιστική υπομονάδα p85, που είναι υπεύθυνη για την αγκύρωση σε ειδικές θέσεις πρόσδεσης των erbB υποδοχέων και μια καταλυτική υπομονάδα p110, που παράγει την τριφωσφορική 3,4,5-φωσφατιδυλινανοσιτόλη, η οποία είναι υπεύθυνη για την φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της κινάσης σερίνης / θρεονίνης Akt (Vivanco and Sawyers 2002). Ο κύριος μηχανισμός για την ενεργοποίηση της PI3K είναι ο διμερισμός του EGFR υποδοχέα με τον HER3. Στην πραγματικότητα, ο υποδοχέας HER3 έχει άφθονες περιοχές πρόσδεσης με την ρυθμιστική υπομονάδα p85, σε αντίθεση με τον EGFR υποδοχέα (Carpenter et al. 1993, Yarden and Sliwkowski 2001).



Εικόνα 6. Χωροδιάταξη στον υποδοχέα EGFR των καταλοίπων τυροσίνης που επάγουν την κυτταρική σηματοδότηση. Η μεγέθυνση αφορά ένα τμήμα της περιοχής της κινάσης και της καρβοξυτελικής C – ουράς του υποδοχέα, όπου αναδεικνύονται όλα τα κατάλοιπα τυροσίνης που ενεργοποιούνται. Οι Src-εξαρτώμενες φωσφορυλιωμένες τυροσίνες επισημαίνονται με μπλε χρώμα, ενώ οι εξαρτώμενες από τον προσδέτη φωσφορυλιωμένες τυροσίνες με πορτοκαλί. Η λυσίνη στην θέση 721 (K721) αποτελεί την κρίσιμη θέση δέσμευσης του ATP. Τα βέλη δείχνουν το ενεργοποιημένο κατάλοιπο της κινάσης ακολουθούμενο από την

επακόλουθη λειτουργία ή το ενεργοποιημένο σηματοδοτικό μονοπάτι (Wheeler, Dunn and Harari 2010).

Μονοπάτι PLCγ-PKC: Η Φωσφολιπάση Cγ (PLCγ) αλληλεπιδρά άμεσα με τον ενεργοποιημένο EGFR και υδρολύει την διφωσφορική 4,5-φωσφατιδυλινοσιτόλη προς 1,3,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη, η οποία είναι σημαντική για την ενδοκυτταρική απελευθέρωση του ασβεστίου και της 1,2-διακυλογλυκερόλης, μόρια τα οποία αποτελούν συμπαράγοντες για την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) (Chattopadhyay et al. 1999, Patterson et al. 2005). Η ενεργοποιημένη κινάση C οδηγεί, με τη σειρά της, στην ενεργοποίηση των κινάσων MAPK και c-Jun (Schonwasser et al. 1998).



Εικόνα 7. EGFR και μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης. Η ενεργοποίηση του EGFR οδηγεί σε ομοδιμερισμό/ετεροδιμερισμό του EGFR και, κατόπιν, ακολουθεί η φωσφορυλίωση συγκεκριμένων καταλοίπων τυροσίνης και η στρατολόγηση αρκετών πρωτεϊνών στο ενδοκυτταρικό τμήμα των υποδοχέων. Η φωσφολιπάση Cγ (ροζ) και οι μεταγραφικοί

παραγόντες STAT (μπλε) συνδέονται άμεσα με τον υποδοχέα, ενώ τα μονοπάτια Ras/Raf/MAPK (πορτοκαλί) και PI3K (πράσινο) χρειάζονται πολλά μόρια προσαρμογείς (adaptor) (κίτρινο). Η PI3K μπορεί επίσης να συνδεθεί άμεσα με οποιοδήποτε από τα ετεροδιμερή του EGFR. Συνακόλουθα, οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς υφίστανται ενδοκυττάρωση και ακολουθούν δύο πιθανές διαδρομές: αποικοδόμηση τους στα λυσοσώματα ή μετατόπιση τους στον πυρήνα. Μετά την είσοδο του EGFR στον πυρήνα, μπορεί να λειτουργήσει ως παράγοντας μεταγραφής (για την κυκλίνη D1) ή ως συνρρυθμιστής μεταγραφής άλλων γονιδίων. Γενικά ο EGFR συμμετέχει στην ενεργοποίηση γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, την διήθηση και την μετάσταση. Υπάρχουν δυο τρόποι για την αναστολή της κινάσης του EGFR: μονοκλωνικά αντισώματα, που δρουν εξωκυτταρικά και μικρά μόρια, αναστολείς τις κινάσης τυροσίνης. DAG: 1,2-διακυλογλυκερόλη, IP3: 1,3,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη, PLCγ: φωσφολυπάση Cγ, Erk-1: εξωκυτταρική ρυθμιζόμενη κινάση-1, Erk-2, εξωκυτταρική ρυθμιζόμενη κινάση -2, FAK: κινάση εστιακής προσκόλλησης, PKC: πρωτεϊνική κινάση C (Scaltriti and Baselga 2006).

Μονοπάτι ενεργοποίησης μεταγραφικών παραγόντων: Οι πρωτεΐνες STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) αλληλεπιδρώντας με συγκεκριμένα κατάλοιπα φωσφοτυροσίνης μέσω Src ομολογίας 2 (SH2), διμερίζονται και μετατοπίζονται στον πυρήνα όπου ρυθμίζουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων στόχων (Haura, Turkson and Jove 2005). Η συνεχής ενεργοποίηση των STAT πρωτεϊνών και ιδιαίτερα της STAT3 έχει βρεθεί σε πολυάριθμους πρωτοπαθείς καρκίνους (Bromberg 2002).

Μονοπάτι Src κινασών: Η πρωτεΐνη Src είναι το αρχέτυπο μέλος μιας οικογένειας non-receptor κινασών τυροσίνης που διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης, της προσκόλλησης, της αγγειογένεσης και της ανοσοποιητικής λειτουργίας (Yeatman 2004). Η πρωτεΐνη Src, η οποία βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, ενεργοποιεί μια σειρά από υποστρώματα, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών PI3K και STAT (Yeatman 2004).

2.6 EGFR και καρκίνος του πνεύμονα

Καθώς ο EGFR κατέχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού, της κινητικότητας και της επιβίωσης του κυττάρου, η απορύθμιση του συμπλόκου EGFR-προσδέτη είναι δυνατόν να προκαλέσει αυξημένη σηματοδότηση του EGFR, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε νεοπλασματικό μετασχηματισμό. Πράγματι, ο EGFR

είναι συχνά απορυθμισμένος στον καρκίνο του πνεύμονα καθώς και σε άλλους τύπους καρκίνου (Arteaga 2002, Prenzel et al. 2001).

Αρκετοί είναι οι μηχανισμοί που απορυθμίζουν το σύμπλοκο EGFR – προσδέτη. Αυτοί περιλαμβάνουν: 1) αυξημένη παραγωγή προσδετών, 2) αυξημένα επίπεδα της EGFR πρωτεΐνης, 3) ενεργοποιητικές EGFR μεταλλάξεις οι οποίες προκαλούν συνεχή ενεργοποίηση των EGFR πρωτεϊνών, 4) ελαττωματική αποδόμηση του EGFR και 5) συνομιλία με άλλα συστήματα υποδοχέων (Εικόνα 8).

2.6.1 Υπερέκφραση των προσδετών

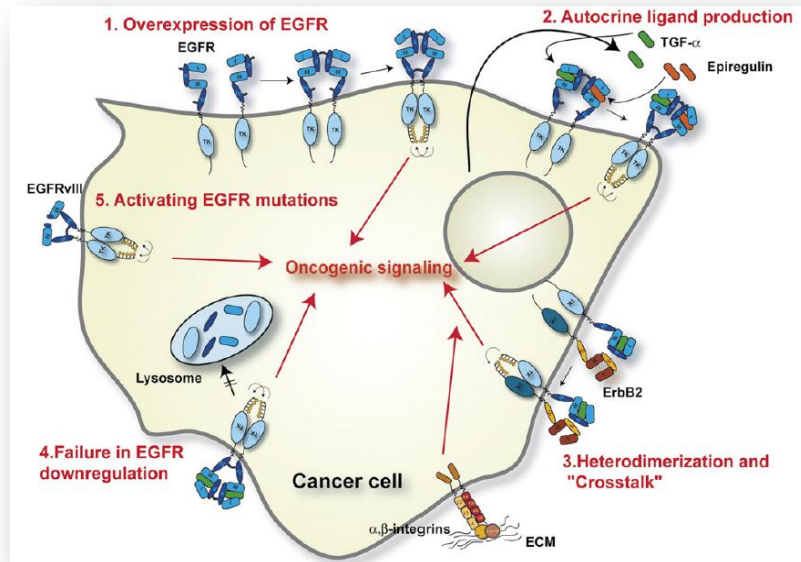
Οι προσδέτες TGF-α και EGF συνεκφράζονται συχνά με τον EGFR σε διάφορους τύπους καρκίνου και θεωρείται ότι δρουν με αυτοκρινή / παρακρινή τρόπο, οδηγώντας σε απορύθμιση της ενεργοποίησης του EGFR και, επομένως, σε ανεξέλεγκτη ανάπτυξη του όγκου (Εικόνα 8) (Cai et al. 1999, Umekita et al. 2000). Αυτό έχει δειχθεί σε πολλές μελέτες. Για παράδειγμα, η υπερέκφραση του TGFα σε διαγονιδιακά ποντίκια επάγει τον σχηματισμό όγκου και η προσθήκη του TGFα ή EGF σε ινοβλάστες ποντικού που υπερεκφράζουν EGFR έχει ως αποτέλεσμα τον κυτταρικό μετασχηματισμό (Sandgren et al. 1990). Ωστόσο, ο κυτταρικός μετασχηματισμός φαίνεται να εξαρτάται τόσο από τα επίπεδα του EGFR όσο και του προσδέτη, καθώς η υπερέκφραση αυξητικών παραγόντων σε κύτταρα που εκφράζουν μέτρια επίπεδα EGFR προκαλεί ασθενές σήμα για μετασχηματισμό. Επιπλέον, η συνέκφραση TGFα και EGFR σε διάφορους όγκους οδηγεί σε υψηλότερο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και σε χειρότερη πρόγνωση των ασθενών σε σύγκριση με όγκους που εκφράζουν EGFR χωρίς την συνέκφραση προσδετών (Yonemura et al. 1992). Άλλοι προσδέτες του EGFR, όπως η αμφιρεγουλίνη, προαγάγουν επιπλέον ογκογόνες διεργασίες, όπως είναι η διήθηση και η μετανάστευση σε φυσιολογικά και κακοήγη επιθηλιακά κύτταρα μαστού (Willmarth and Ethier 2006). Ως εκ τούτου, οι επιδράσεις της ταυτόχρονης υπερέκφρασης πολλών προσδετών θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις στον καρκίνο, προωθώντας και διατηρώντας ογκογόνες διαδικασίες. Έτσι η υπερέκφραση των προσδετών του EGFR διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε ορισμένες μορφές καρκίνου.

2.6.2 Υπερέκφραση του EGFR

Η απορύθμιση της ενεργοποίησης του EGFR συμβαίνει συχνά λόγω υπερέκφρασης του EGFR (Εικόνα 8). Έχει βρεθεί ότι αυξημένα επίπεδα του EGFR συσχετίζονται με μειωμένη επιβίωση σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως της κεφαλής και τραχήλου, της ουροδόχου κύστης, των ωοθηκών, του τραχήλου της μήτρας και τον καρκίνο του οισοφάγου (Nicholson, Gee and Harper 2001). Ο ρόλος της υπερέκφρασης EGFR στην ογκογένεση υποστηρίζεται από διάφορες μελέτες, οι οποίες έχουν δείξει ότι η υπερέκφραση του EGFR σε ινοβλάστες ποντικού οδηγεί σε κυτταρικό μετασχηματισμό και αυξημένη κυτταρική κινητικότητα ανεξαρτήτου της σύνδεσης του προσδέτη (Pedersen et al. 2005). Αυτό είναι πιθανό να οφείλεται στην συνεχή ενεργοποίηση του υποδοχέα λόγω αυθόρμητου διμερισμού του ως αποτέλεσμα των υψηλών επιπέδων του EGFR στην επιφάνεια των κυττάρων (Pedersen et al. 2005). Έτσι το αποτέλεσμα ενός συνεχώς ενεργού υποδοχέα είναι η συνεχής ενεργοποίηση των κατάντη σηματοδοτικών μονοπατιών που οδηγούν σε ένα πιο κακοήθη φαινότυπο.

Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί με τους οποίους τα επίπεδα του EGFR στα καρκινικά κύτταρα αυξάνονται. Ένας τέτοιος μηχανισμός είναι ο αυξημένος αριθμός αντιγράφων του *EGFR* γονιδίου (ή αλλιώς γονιδιακή ενίσχυση) και έχει βρεθεί σε ποσοστό έως και 50% στο ΜΜΚΠ (Suzuki et al. 2005) στον καρκίνο του μαστού (Bhargava et al. 2005) και στο γλοιοβλάστωμα (GBM) (Wong et al. 1987). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι σε απουσία γονιδιακής ενίσχυσης, η υπερέκφραση του EGFR μπορεί να οφείλεται σε μία ποικιλία μηχανισμών, που περιλαμβάνουν την αυξημένη ενεργότητα του EGFR προαγωγέα (promoter) ή την απορρύθμιση σε μεταφραστικό και μετα-μεταφραστικό επίπεδο. Μάλιστα, πρόσφατα έχει αναφερθεί ότι μία συγκεκριμένη περιοχή του *EGFR* γονιδίου έχει ικανότητα ενισχυτή σε μερικές κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού που υπερεκφράζουν τον EGFR. Επιπροσθέτως, έχει δειχθεί ότι αυτές οι κυτταρικές σειρές περιέχουν περισσότερες θέσεις της DNAασης H1 στο ιντρόνιο 1 σε σχέση με τις κυτταρικές σειρές που υποεκφράζουν τον EGFR, υποδηλώνοντας ότι η δομή της χρωματίνης στις ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου μπορεί να παίζει ρόλο στην έκφραση του υποδοχέα (McInerney et al. 2001). Επιπλέον, ο αριθμός των επαναλήψεων των δινουκλεοτιδίων CA στο ιντρόνιο 1 του *EGFR* γονιδίου κοντά στην περιοχή του ενισχυτή φαίνεται να επηρεάζει τα επίπεδα

έκφρασης του EGFR, όπως π.χ. η μεταγραφή του γονιδίου η οποία μειώνεται με την αύξηση του αριθμού των επαναλήψεων CA (Amador et al. 2004, Gebhardt, Zanker and Brandt 1999).



Εικόνα 8. Μηχανισμοί απορύθμισης του EGFR μονοπατιού (Zandi et al. 2007).

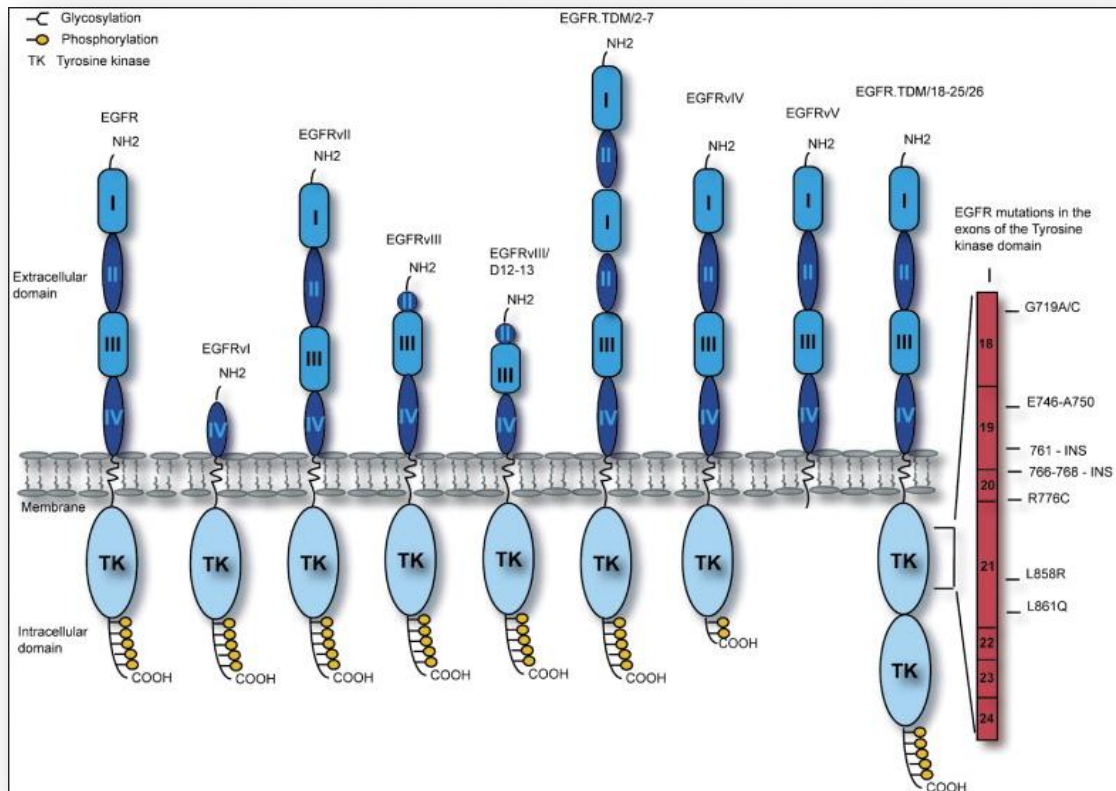
2.6.3 EGFR μεταλλάξεις

Οι επίκτητες μεταλλάξεις στο γονίδιο του EGFR δεν κατανέμονται τυχαία, αλλά συγκεντρώνονται σε συγκεκριμένες περιοχές. Σε δείγματα όγκων έχουν ανιχνευτεί συνολικά 1380 μεταλλάξεις στο γονίδιο του EGFR. Το 30% (413 από τις 1.380) των μεταλλάξεων ανιχνεύονται στο αδενοκαρκίνωμα και το 2% (16 από τις 1380) στο ΜΜΚΠ. Ο αριθμός των μεταλλάξεων είναι αρκετά υψηλός και έτσι κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τη θέση τους στις διάφορες περιοχές του EGFR (Gazdar 2009). Όλες οι μεταλλάξεις παρουσιάζονται στην Εικόνα 9 και Εικόνα 10.

2.6.3.1 Μεταλλάξεις στην εξωκυτταρική περιοχή

Μεταλλάξεις στην εξωκυτταρική περιοχή του EGFR ανιχνεύονται συχνά στο γλοιοβλάστωμα. Οι τύπου I, II, III παραλλαγές του υποδοχέα EGFR (EGFRvI, EGFRvII, EGFRvIII) είναι οι πιο γνωστές και πρόκειται για ελλείψεις εξωνίων που κωδικοποιούν τμήμα ή ολόκληρη την εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα (Zandi et al. 2007). Αυτοί οι 'κουτσουρεμένοι' υποδοχείς είναι συνεχώς ενεργοποιημένοι και άκρως ογκογόνοι.

Η τύπου I παραλλαγή του EGFR (EGFRVI) στερείται το μεγαλύτερο μέρος της εξωκυττάριας περιοχής, άρα είναι αδύνατη η σύνδεση του προσδέτη. Παρόλα αυτά παραμένει συνεχώς ενεργοποιημένη. Ο τύπος EGFRVII έχει έλλειψη 83 αμινοξέων (εξώνια 14-15) και, επομένως, εξακολουθεί να υπάρχει θέση δεσμευσης του προσδέτη. Η ογκογόνος δράση αυτού του υποδοχέα παραμένει ασαφής (Grandal et al. 2007). Η πλέον συχνή και πιο χαρακτηρισμένη μετάλλαξη είναι ο τύπος EGFRVIII, που περιγράφεται επίσης ως de2-7 EGFR ή Δ2-7 EGFR και είναι το αποτέλεσμα μιας έλλειψης εντός πλαισίου ανάγνωσης των εξωνίων 2-7. Αυτά τα εξώνια κωδικοποιούν την περιοχή I και τα δύο τρίτα της περιοχής II της εξωκυτταρικής περιοχής και η έλλειψη των αμινοξέων 2-273 οδηγεί σε απώλεια του μεγαλύτερου μέρους της περιοχής δέσμευσης του προσδέτη. Παρόλα αυτά, ο τύπος αυτός (EGFRVIII) είναι συνεχώς φωσφορυλιωμένος και ενεργοποιεί το μονοπάτι Ras/Raf/MEK/ERK και PI3K/AKT (Grandal et al. 2007). Μία άλλη παραλλαγή του υποδοχέα είναι ο τύπος EGFRVIII/D12-13, ο οποίος εκτός από την έλλειψη των εξωνίων 2-7 έχει και απώλεια της περιοχής III (εξώνιο 12-13). Εκτός από αυτές τις παραλλαγές του υποδοχέα υπάρχουν δεδομένα ενός ακόμα μεταλλαγμένου τύπου που περιέχει επανάληψη των εξωνίων 2-7: EGFR TDM/2-7. Αυτός ο τύπος περιέχει μια επιπλέον περιοχή I, πλούσια σε κυστεΐνη, και ένα τμήμα της περιοχής II, που όμως δεν επηρεάζει την σύνδεση με τον προσδέτη. Ανάλυση του *EGFR* γονιδίου αποκάλυψε ότι τόσο το εξώνιο 1 όσο και το εξώνιο 7 περιέχουν ένα στοιχείο Alu όπου συγκεντρώνονται σπασίματα (breaks) του DNA (Fenstermaker and Ciesielski 2000). Ο ανασυνδυασμός αυτών των στοιχείων Alu έχει ενοχοποιηθεί στον μηχανισμό έλλειψης/επανάληψης της περιοχής αυτής πράγμα που εξηγεί γιατί η εξωκυτταρική περιοχή υπόκειται σε αυτού του είδους τις μεταλλάξεις (Wong et al. 1992). Στην Εικόνα 9 παρουσιάζονται οι παραλλαγές του EGFR που περιγράφηκαν παραπάνω.



Εικόνα 9. Σχηματική αναπαράσταση των μεταλλάξεων του *EGFR* γονιδίου. Από αριστερά προς τα δεξιά: αγρίου τύπου *EGFR*, ελλείψεις και/ή διπλασιασμοί εξωκυττάρων περιοχών του *EGFR* (EGFRvI-EGFRvV, EGFRvIIID12-13, EGFR.TDM/2-7, και EGFR.TDM18-25/26) και μεταλλάξεις στην περιοχή της κινάσης (με κόκκινο) (Zandi et al. 2007).

2.6.3.2 Μεταλλάξεις στην ενδοκυτταρική περιοχή

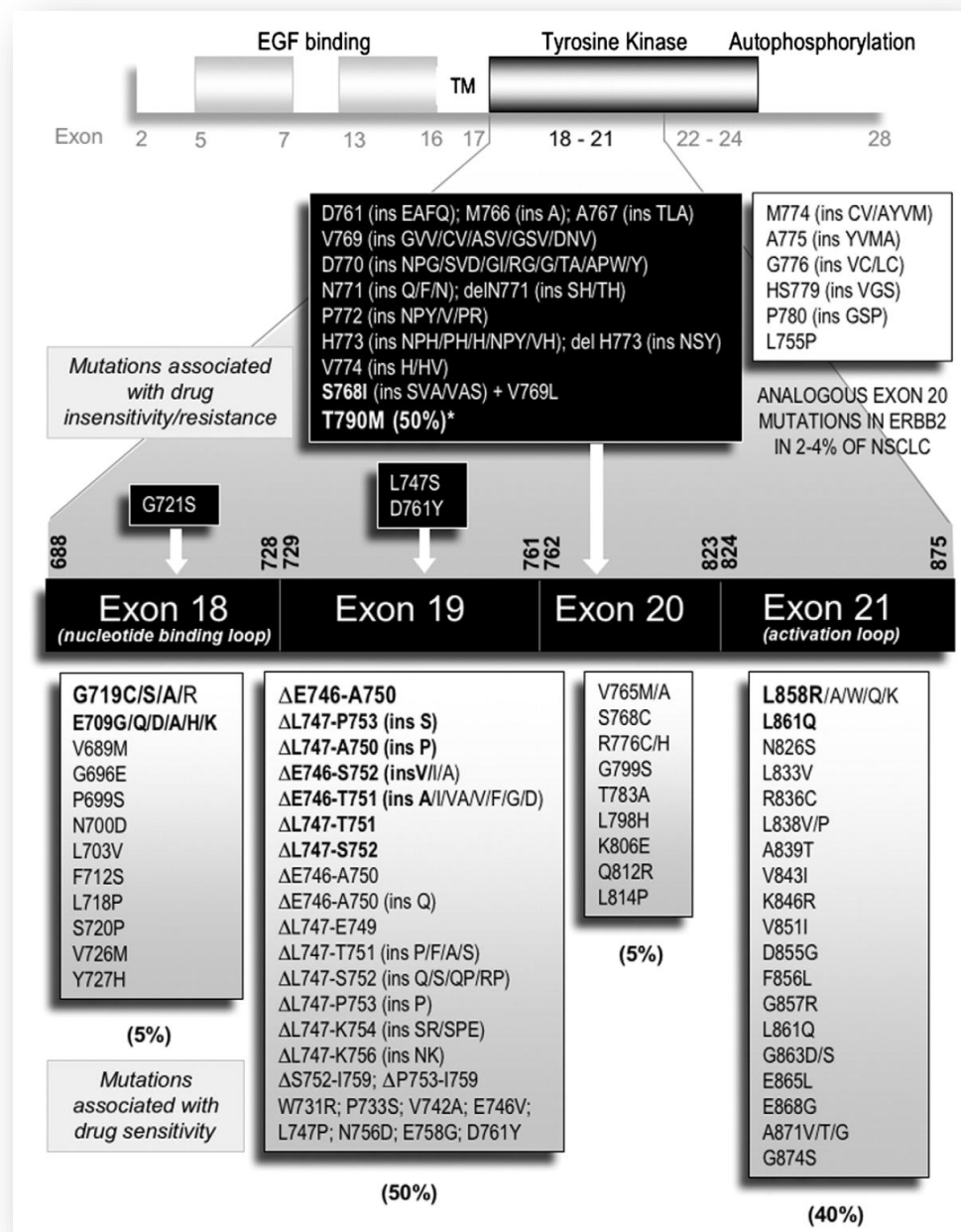
2.6.3.2.1 Μεταλλάξεις στην περιοχή της κινάσης

Οι μεταλλάξεις αυτής της κατηγορίας επηρεάζουν κατάλοιπα αμινοξέων που βρίσκονται γύρω από την θέση δέσμευσης της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) και έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της κινάσης ανεξάρτητα από την σύνδεση προσδέτη στον υποδοχέα (Gazdar 2009). Αυτές οι μεταλλάξεις διαιρούνται σε τρεις κατηγορίες. Οι μεταλλάξεις της πρώτης κατηγορίας αφορούν απαλοιφές 10-15 νουκλεοτιδίων εντός πλαισίου ανάγνωσης στο εξώνιο 19 (αντιστοιχούν σε διάφορες απαλοιφές αμινοξέων μεταξύ των θέσεων 746 - 753) και αντιπροσωπεύουν περίπου το 44% όλων των μεταλλάξεων του *EGFR*. Η πιο συχνή απαλοιφή ξεκινά από την λευκίνη στη θέση 747 (L747) έως το γλουταμινικό οξύ στη θέση 749 (E749) (συνήθως η έλλειψη αυτή αναγράφεται ως del747-749). Οι μεταλλάξεις της δεύτερης

κατηγορίας περιλαμβάνουν σημειακές παρανοηματικές (missense) μεταλλάξεις. Η πλέον χαρακτηρισμένη είναι η σημειακή μετάλλαξη στο εξόνιο 21, όπου η λευκίνη (L) στη θέση 858 αντικαθίσταται από την αργινίνη (R) (L858R). Το ποσοστό ανίχνευσης της μετάλλαξης αυτής είναι 41% του συνόλου των ενεργοποιητικών μεταλλάξεων στην περιοχή της κινάσης και βρίσκεται στην αγκύλη ενεργοποίησης της κινάσης (A loop). Στη δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνονται επίσης μεταλλάξεις στην θέση 719, όπου το αμινοξύ γλυκίνη (G) αντικαθίσταται από την σερίνη (S), αλανίνη (A) ή κυστεΐνη (C) και αφορούν το 4% όλων των ενεργοποιητικών μεταλλάξεων (Sharma and Settleman 2009). Τέλος, ανιχνεύονται και άλλες παρανοηματικές μεταλλάξεις σε ποσοστό 6% των μεταλλάξεων του EGFR (Gazdar 2009). Η τρίτη κατηγορία μεταλλάξεων αφορά εντός πλαισίου ανάγνωσης διπλασιασμούς ή ενθέσεις στο εξόνιο 20 και ανιχνεύονται σε ποσοστό 5% όλων των μεταλλάξεων. Επίσης έχουν ανιχνευτεί μεταλλάξεις σε χαμηλή συχνότητα (<1%) στο εξόνιο 20, όπως είναι η αντικατάσταση της θρεονίνης (T) στη θέση 783 από την αλανίνη (A) (T783A) και της βαλίνης (V) στη θέση 765 από την αλανίνη (A) (V765A) (Gandhi et al. 2009). Στην Εικόνα 10 παρουσιάζεται ένα διάγραμμα με όλες τις μεταλλάξεις στην περιοχή της κινάσης του EGFR.

Οι μεταλλάξεις στο εξόνιο 19 και η μετάλλαξη L858R στο εξόνιο 21 του EGFR αντιπροσωπεύουν περίπου το 90% του συνόλου των ενεργοποιητικών μεταλλάξεων και για τον λόγο αυτό ονομάζονται επίσης κλασικές ενεργοποιητικές μεταλλάξεις (Gazdar and Minna 2008). Η μετάλλαξη L858R εντοπίζεται δίπλα στην συντηρημένη αλληλουχία τριών αμινοξέων (ασπαρτικό οξύ – φαινυλαλανίνη - γλυκίνη, DFG) που σταθεροποιούν τη θηλιά ενεργοποίησης της κινάσης. Επίσης η γλυκίνη στη θέση 719 βρίσκεται σε γειτονική θέση ως προς την θηλιά ενεργοποίησης. Έτσι η μετάλλαξη L858R καθώς και η G719S προκαλούν παρόμοιες αλλαγές στη διαμόρφωση, στενεύοντας τη θέση σύνδεσης του ATP και με αυτό τον τρόπο συντελούν στην ενεργοποίηση της κινάσης και στην υψηλότερη σταθερότητα της πρωτεΐνης (Gazdar et al. 2004, Sharma and Settleman 2009, Murray et al. 2008, Yun et al. 2007). Συγκρίσεις με τη δομή του ανενεργού EGFR υποδηλώνουν ότι οι μεταλλάξεις L858R και G719S ενεργοποιούν την κινάση αποσταθεροποιώντας την ανενεργό μορφή (Yun et al. 2007). Επίσης παρατηρήθηκε ότι οι κινάσες του EGFR που φέρουν την

μετάλλαξη L858R ή G719S αποκτούν συνολικές δομές που μοιάζουν κατά πολύ με την αγρίου τύπου κινάση στην ενεργή της μορφή (Yun et al. 2007).



Εικόνα 10. Σχηματική αναπαράσταση των μεταλλάξεων στην περιοχή της κινάσης του EGFR. Πάνω απεικονίζεται η θέση δέσμευσης του προσδέτη EGF, η TM (διαμεμβρανική περιοχή), η περιοχή της κινάσης τυροσίνης και η περιοχή αυτοφωσφορυλίωσης. Επίσης υποδεικνύεται η σχετική θέση των εξωνίων, ενώ διευρύνεται μόνο η περιοχή των εξωνίων 18-21. Η λίστα των μεταλλάξεων διαιρείται σε δύο μέρη. Στο κάτω μέρος απεικονίζονται οι επίκτητες σωματικές μεταλλάξεις που συσχετίζονται με ευαισθησία στους αναστολείς κινάσης τυροσίνης, gefitinib ή erlotinib, ενώ στο πάνω μέρος παρουσιάζονται οι μεταλλάξεις που σχετίζονται με αντίσταση στους αναστολείς TKIs. Οι πιο συχνές μεταλλάξεις εμφανίζονται με έντονη γραφή.

Τέλος, φαίνεται η συνολική συχνότητα εμφάνισης των μεταλλάξεων (Sharma and Settleman 2009).

2.6.3.2.2 Μεταλλάξεις στην καρβοξυτελική περιοχή

Αυτές οι μεταλλάξεις εντοπίζονται στην καρβοξυτελική-C περιοχή του υποδοχέα και έχουν περιγραφεί καλύτερα σε μοντέλα γλοιοβλαστώματος. Στην παραλλαγή EGFRvIV λείπουν τα εξώνια 25-27, ενώ η μορφή EGFRvV είναι κομμένη από το αμινοξύ 958 και στερείται το υπόλοιπο της C-ουράς (εξώνια 25-28) (Εικόνα 9). Οι παραλλαγές EGFR^{TDM} 18-25 και EGFR^{TDM} 18-26, που περιέχουν επανάληψη των εξωνίων 18-25 και 18-26 αντίστοιχα, ανήκουν επίσης σε αυτή την κατηγορία μεταλλάξεων. Από αυτές τις τέσσερις παραλλαγές, μόνο η EGFRvIV έχει ογκογόνο ιδιότητα (Zandi et al. 2007).

2.6.4 Απορύθμιση της διαδικασίας αποικοδόμησης

Η απορύθμιση της διαδικασίας αποικοδόμησης του υποδοχέα EGFR είναι δυνατόν να συμβεί στον καρκίνο (Shtiegman and Yarden 2003). Μάλιστα αυτή η απορύθμιση έχει παρατηρηθεί σε καρκινικά κύτταρα που φέρουν ενεργοποιητικές μεταλλάξεις στην περιοχή της κινάσης του EGFR (Shtiegman et al. 2007). Τα κύτταρα που φέρουν την έλλειψη del746-750 ή την σημειακή μετάλλαξη L858R δείχνουν μειωμένη ουβικουϊτινίωση, παρατείνοντας την ενεργοποίηση του EGFR, άρα και την μεταγωγή του σήματος (Shtiegman et al. 2007). Αν και είναι ακόμα ασαφές ποιος είναι ο ακριβής μηχανισμός για την απορύθμιση, έχει υποτεθεί ότι ο EGFR υποδοχέας που φέρει μετάλλαξη προτιμά να ετεροδιμερίζεται με τον υποδοχέα ErbB2, μπλοκάροντας έτσι την τυροσίνη Y1045 που απαιτείται για την αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη Cbl, που είναι ένα ένζυμο που μεσολαβεί στην ουβικουϊτινίωση του EGFR (Shtiegman et al. 2007).

2.6.5 Ετεροδιμερισμός του EGFR

Τέλος, ο ετεροδιμερισμός του EGFR με άλλα μέλη της οικογένειας ErbB έχει υποτεθεί ότι συμβάλουν στις ογκογόνες ιδιότητες του καρκινικού κυττάρου (Zandi et al. 2007). Ο ετεροδιμερισμός του υποδοχέα κατέχει σημαντικό ρόλο στην σηματοδότηση της οικογένειας ErbB στα φυσιολογικά κύτταρα. Ως γνωστό τα μέλη

της οικογένειας ErbB υπερεκφράζονται σε διάφορους τύπους καρκίνου και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ογκογόνο σηματοδότηση (π.χ. HER2/ErbB2 στον καρκίνο του μαστού). Επειδή ο υποδοχέας ErbB2 στερείται προσδέτη και ο ErbB3 στερείται την περιοχή της κινάσης, η σημασία του ετεροδιμερισμού των μελών της οικογένειας ErbB στην μεταγωγή ογκογόνων σημάτων φαίνεται να είναι υψίστης σημασίας (Marmor, Skaria and Yarden 2004). Το ετεροδιμερές EGFR-ErbB3 έχει προταθεί να έχει πρωταρχικό ρόλο στην ανάπτυξη του ΜΜΚΠ και να σχετίζεται με την αντοχή σε στοχευμένη θεραπεία του EGFR (Engelman et al. 2007, Zhou et al. 2006).

2.7 Μόρια του σηματοδοτικού μονοπατιού του EGFR

Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός στον ΜΜΚΠ οφείλεται στην συνεχόμενη ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών (RAS/MAPK και PI3K/Akt) του EGFR, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των μονοπατιών είναι δυνατόν να αποτελέσουν μηχανισμούς διαφυγής πράγμα που επιτρέπει στους όγκους να παρακάμψουν ένα μονοπάτι που έχει ανασταλεί φαρμακευτικά.

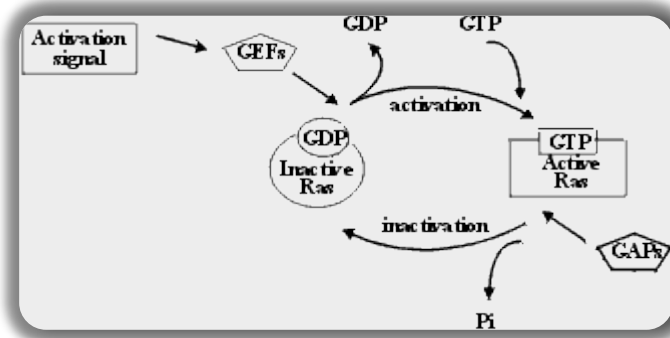
2.7.1 Οικογένεια RAS πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες RAS ανήκουν στην υπεροικογένεια των G πρωτεϊνών (GTPάσες) και όπως οι υπόλοιπες G πρωτεΐνες, έτσι και οι RAS εναλλάσσονται μεταξύ ενός ενεργού συμπλέγματος GTP και ενός ανενεργού συμπλέγματος GDP. Οι πρωτεΐνες RAS είναι μονομερείς, έχουν μέγεθος 21kDa (188-189 αμινοξέα), εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη και λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες για ποικίλα μεταγωγικά μονοπάτια, όπως είναι τα Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt και RalGEF/Ral. Το τελικό αποτέλεσμα της ενεργοποίησης RAS εξαρτώμενων μονοπατιών σηματοδότησης σχετίζεται με τον κυτταρικό τύπο και το βιολογικό περιεχόμενο του κυττάρου. Σε κάθε περίπτωση το τελικό αποτέλεσμα καθορίζεται από το μέγεθος, τη διάρκεια και τον εντοπισμό της ενεργοποίησης της πρωτεΐνης RAS, καθώς και από την ισορροπία των θετικών και αρνητικών μεταγωγικών σημάτων (Campbell et al. 1998, Frame and Balmain 2000).

Η σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα EGFR μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα παράδειγμα της ενεργοποίησης των RAS πρωτεϊνών. Όταν ο EGFR ενεργοποιηθεί

από εξωτερικά σήματα, στρατολογεί και ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες GEFs, οι οποίες έρχονται σε επαφή με την πρωτεΐνη RAS και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποσύνδεση της RAS πρωτεΐνης από το GDP (ανενεργή μορφή) και την πρόσδεση της στο GTP (ενεργή μορφή). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η μεταγωγή σήματος είναι παροδική, καθώς η πρωτεΐνη RAS επανέρχεται στην ανενεργή μορφή της μέσω της υδρόλυσης του προσδεμένου μορίου GTP από τις GAP πρωτεΐνες (Εικόνα 11).

Το πρώτο γονίδιο μικρής G-πρωτεΐνης που ανακαλύφθηκε ήταν το γονίδιο *ras* (*rat sarcoma*), το οποίο ανακαλύφθηκε το 1978 σαν ογκογονίδιο, υπεύθυνο για την καρκινογόνο δράση των ρετροϊών Harvey και Kirsten, οι οποίοι προκαλούν σάρκωμα στα τρωκτικά. Στις αρχές της δεκαετίας του '80 ανακαλύφθηκαν τα ανθρώπινα *ras* ογκογονίδια τα οποία είναι ανάλογα των ιικών. Έτσι κάθε ανθρώπινο κύτταρο περιέχει τρία συντηρημένα πρωτο-ογκογονίδια RAS, το *H(arvey)RAS*, *K(irsten)RAS* και *N(euroblastoma)RAS*. Μια από τις πιο σημαντικές πτυχές των RAS πρωτεϊνών είναι ότι εμπλέκονται σε περισσότερο από 30% των καρκίνων του ανθρώπου. Μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια αποκάλυψαν ότι η πρωτεΐνη KRAS έχει βιολογικές ιδιότητες που δεν μπορούν να αντισταθμιστούν από τις πρωτεΐνες HRAS και NRAS παρόλη την ύπαρξη ~85% ομολογίας μεταξύ των τριών αυτών πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι τα ποντίκια KRAS^{-/-} δεν είναι βιώσιμα καθότι πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της πρώιμης εμβρυϊκής ανάπτυξης (Johnson et al. 1997), σε αντίθεση με τα ποντίκια HRAS^{-/-} και NRAS^{-/-} που επιβιώνουν μέχρι την ενηλικίωση (Esteban et al. 2001). Επιπλέον, οι μεταλλάξεις των διαφορετικών RAS γονιδίων έχουν διαφορετικές ικανότητες ως προς τον μετασχηματισμό των κυττάρων. Έτσι, διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία εκφράζουν μια μεταλλαγμένη (KRAS G12V) KRAS πρωτεΐνη δεν είναι βιώσιμα, ενώ η έκφραση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης HRASV12 έχει ως αποτέλεσμα την επιβίωση των ποντικών τα οποία όμως παρουσιάζουν προβλήματα στην ανάπτυξη και αυξημένη συχνότητα διαφόρων τύπων νεοπλασιών. Οι NRAS μεταλλάξεις εντοπίζονται κυρίως σε μυελογενής παθήσεις, οι HRAS σε καρκινώματα της κύστης και οι KRAS σε διάφορα αδενοκαρκινώματα.



Εικόνα 11. Ενεργοποίηση και απενεργοποίηση των πρωτεϊνών RAS. GAPs: GTPase activating proteins, GEFs: guanine nucleotide exchange factors, GDP: guanosine diphosphate, GTP: guanosine triphosphate, Pi: a phosphate group.

2.7.1.1 KRAS γονίδιο

Στο ανθρώπινο γονιδίωμα υπάρχουν δύο αντίγραφα του *KRAS* γονιδίου, το *KRAS1* και το *KRAS2*. Το mRNA που κωδικοποιείται από το *KRAS2* έχει μήκος 5.5 kb (McGrath et al. 1983). Το γονίδιο *KRAS1* είναι ένα ψευδογονίδιο που προέρχεται από το *KRAS2* με εναλλακτικό μάτισμα του mRNA. Ως εκ τούτου, το γονίδιο *KRAS1* ονομάζεται *KRAS1P* (McGrath et al. 1983).

Το 1983, ο McBride και οι συνεργάτες του, βρήκαν ότι τα πρωτο-ογκογονίδια *KRAS1* και *KRAS2* εντοπίζονται στα ανθρώπινα χρωμοσώματα 6 και 12, αντίστοιχα. Αργότερα με *in situ* υβριδισμό τα γονίδια αυτά χαρτογραφήθηκαν στις χρωμοσωμικές θέσεις 6p11-12 και 12p11.1-12.1, αντίστοιχα (Popescu et al. 1985).

Η αλληλούχιση του γονιδίου *KRAS2* έδειξε ότι αποτελείται από έξι εξώνια, από τα οποία τα 2, 3 και 4 είναι αμετάβλητα εξώνια κωδικοποίησης. Με εναλλακτικό μάτισμα μετά το εξώνιο 4 παράγονται δύο μορφές mRNA, γνωστές ως 4A και 4B. Έτσι, το εξώνιο 5 παραλείπεται κατά τη διάρκεια εναλλακτικού ματίσματος και το έκτο εξώνιο κωδικοποιεί την καρβοξυτελική περιοχή στην πρωτεΐνη KRAS4B ενώ δεν μεταφράζεται (3' UTR) στην KRAS4A. Η ισομορφή KRAS4A σπάνια εκφράζεται στον άνθρωπο σε αντίθεση με την KRAS4B, η οποία είναι η κυρίαρχη παραλλαγή ματίσματος του γονιδίου *KRAS2*. Οπότε από τώρα και στο εξής αναφερόμενοι στο *KRAS* θα εννοείται η ισομορφή KRAS4B.

2.7.1.2 KRAS πρωτεΐνη

Το προϊόν του *KRAS* γονιδίου είναι μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 21,6 kD, που περιλαμβάνει 188 αμινοξέα (McGrath et al. 1983). Η πρωτεΐνη *KRAS* αποτελείται από τις εξής τρεις περιοχές: την καταλυτική περιοχή (G-περιοχή, αμινοξέα 1-165), την ετερογενή περιοχή (αμινοξέα 165-186) και την περιοχή πρόσδεσης στην μεμβράνη (αμινοξέα 187-188). Ανάμεσα στις τρεις ισομορφές (*KRAS*, *NRAS* και *HRAS*) των *RAS* πρωτεϊνών, παρατηρείται υψηλή ομολογία στην καταλυτική περιοχή (τα 85 αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο είναι ακριβώς όμοια, ενώ η ομολογία στα υπόλοιπα 80 αμινοξέα είναι μικρότερη, περίπου 70-80%), ενώ τα τελευταία 25 αμινοξέα στο καρβοξυτελικό άκρο διαφέρουν σημαντικά (εκτός από την κυστεΐνη στη θέση 186). Η καταλυτική περιοχή (G- περιοχή) περιλαμβάνει την φωσφορική θηλιά (P-loop) στα αμινοξέα 10-16, όπου προσδέεται η β-φωσφορική ομάδα του GTP και του GDP (Εικόνα 12). Τα αμινοξέα 116-119 και 152-165 αλληλεπιδρούν με τη βάση της γουανίνης. Η περιοχή μεταξύ των αμινοξέων 32 και 40 είναι απαραίτητη για τις αλληλεπιδράσεις με τα μόρια τελεστές. Οι άλλες δυο περιοχές της *KRAS* πρωτεΐνης (αμινοξέα 165-188) καθοδηγούν την μετα-μεταφραστική τροποποίηση και επίσης καθορίζουν την αγκυροβόληση της πρωτεΐνης στην πλασματική μεμβράνη (Hancock and Prior 2005).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η πρωτεΐνη *KRAS*, παραμένει ανενεργή έως ότου δεσμεύσει GTP, όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 13. Η μετάβαση από την ανενεργή στην ενεργή μορφή ρυθμίζεται από ενδοκυτταρικά σήματα. Η δέσμευση του GTP στην πρωτεΐνη *KRAS* προκαλεί διαμορφωτικές αλλαγές κυρίως σε δύο τμήματα της καταλυτικής περιοχής της πρωτεΐνης, ενεργοποιώντας την. Αυτά τα δύο σημαντικά τμήματα της πρωτεΐνης είναι γνωστά ως διακόπτης 1 (Switch 1, αμινοξέα 30 - 38) και διακόπτης 2 (Switch 2, αμινοξέα 59 - 67) (Εικόνα 12). Η διαμορφωτική αυτή αλλαγή επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης με άλλες πρωτεΐνες, όπως είναι οι GAPs και GEFs (Gideon et al. 1992).

2.7.1.3 KRAS μεταλλάξεις

Στο *KRAS* γονίδιο έχουν ανιχνευθεί ενεργοποιητικές σημειακές μεταλλάξεις σε πολλούς τύπους ανθρώπινων όγκων (Anderson et al. 1992). Οι ογκογόνες μορφές

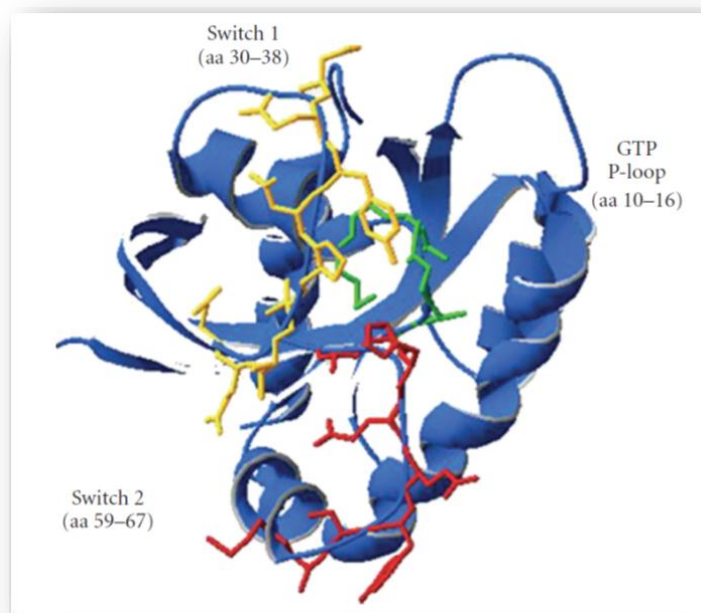
του γονιδίου *KRAS*, εμφανίζονται συχνότερα στον καρκίνο του παγκρέατος (> 80%), του παχέος εντέρου (40-50%), του πνεύμονα (30-50%), ωστόσο εμφανίζονται σε μικρότερο ποσοστό στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, της ουροδόχου κύστης, του ήπατος, του μαστού (Schubbert, Shannon and Bollag 2007).

Η παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο *KRAS* έχει σημαντικές συνέπειες στη διαδικασία της καρκινογένεσης, πράγμα που εξαρτάται από τα κύτταρα και τους ιστούς που εμπλέκονται (Guerra et al. 2003). Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *KRAS* που εμφανίζονται συχνότερα στα καρκινικά κύτταρα εντοπίζονται στα κωδικόνια 12 και 13 του εξωνίου 2 και λιγότερο συχνά στα κωδικόνια 61, 63, 117, 119 και 146 (Barbacid 1990, Rodenhuis and Slebos 1990). Πιο συγκεκριμένα, οι σωματικές παρανοηματικές μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12, 13, 61 και 63 επηρεάζουν την ενεργότητα GTPασης της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα η *KRAS* πρωτεΐνη να μην ανταποκρίνεται σε σήματα των GAP πρωτεϊνών (Εικόνα 13). Έτσι, οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες ανταλλάσσουν ταχέως τη διφωσφορική με την τριφωσφορική γουανοσίνη, την οποία προτιμούν ως υπόστρωμα, επάγοντας έτσι την ενεργή μορφή τους. Για παράδειγμα, μια μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου *KRAS*, προκαλεί την *KRAS* πρωτεΐνη, να «παγώσει» στην ενεργή μορφή για μια πολύ μεγαλύτερη διάρκεια από ότι η αγρίου τύπου πρωτεΐνη (Scheffzek et al. 1997). Ενώ οι μεταλλάξεις που έχουν ως αποτέλεσμα αντικαταστάσεις αμινοξέων στις θέσεις 116, 117, 119 και 146 μειώνουν την νουκλεοτιδική συγγένεια της *KRAS* πρωτεΐνης, επηρεάζοντας έτσι το ρυθμό ανταλλαγής GDP/GTP.

Οι μεταλλαγμένες *KRAS* πρωτεΐνες απορυθμίζουν πολλά μόρια τελεστές, επηρεάζοντας τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Σε αντίθεση με τις αγρίου τύπου πρωτεΐνες *KRAS* που απενεργοποιούνται μετά από ένα σύντομο χρονικό διάστημα, οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες μπορούν να ενεργοποιούν συνεχώς τα μονοπάτια σηματοδότησης σε απουσία οποιουδήποτε προσδέτη των EGFR/HER υποδοχέων.

Οι ασθενείς με ΜΜΚΠ έχουν την τάση να συσσωρεύουν ενεργοποιητικές μεταλλάξεις είτε στο γονίδιο *EGFR* είτε στο *KRAS*. Ωστόσο, μελέτες δείχνουν ότι οι μεταλλάξεις αυτών των δύο γονιδίων, σε γενικές γραμμές, αλληλοαναιρούνται. Στον άνθρωπο, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *KRAS* εμφανίζονται σε ποσοστό 10 - 30% των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα και φαίνεται να σχετίζονται με κακή πρόγνωση (Broermann et al. 2002, Huncharek, Muscat and Geschwind 1999). Περισσότερο από

το 95% των *KRAS* μεταλλάξεων στον ΜΜΚΠ εμφανίζονται στα κωδικόνια 12 και 13 έχουν ως αποτέλεσμα απλές αντικαταστάσεις αμινοξέων σε επίπεδο πρωτεΐνης. Έτσι, οι μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 αφορούν την αντικατάσταση της γλυκίνης (Gly ή G) από το ασπαρτικό οξύ (Gln ή D), την αλανίνη (Ala ή A), αργινίνη (Arg ή R), σερίνη (Ser ή S), βαλίνη (Val ή V) ή κυστεΐνη (Cys ή C), ενώ στο κωδικόνιο 13 έχουμε την αντικατάσταση της γλυκίνης (Gly ή G) από το ασπαρτικό οξύ (Gln ή D). Στον ΜΜΚΠ οι πιο συχνές *KRAS* μεταλλάξεις εντοπίζονται στις θέσεις G12C (42%), G12V (21%), G12D (17%) και G12A (7%) (Πίνακας 8).



Εικόνα 12. Η τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης *KRAS*. Οι περιοχές Switch 1, Switch 2 και η περιοχή σύνδεσης του GTP φαίνονται με κίτρινο, κόκκινο και πράσινο χρώμα, αντίστοιχα (Jancik et al. 2010).

Όπως οι *EGFR* μεταλλάξεις, έτσι και οι *KRAS* μεταλλάξεις, φαίνεται να συνδέονται με ιδιαίτερα κλινικά/παθολογικά χαρακτηριστικά και να διαφέρουν ανάλογα με τον ιστολογικό τύπο του όγκου, το ιστορικό καπνίσματος και την εθνικότητα (Okudela, Woo and Kitamura 2010). Έτσι μεταλλάξεις στο γονίδιο *KRAS* εμφανίζονται σε ποσοστό περίπου 25% σε αδενοκαρκινώματα του πνεύμονα, όμως τόσο μεταξύ των ενεργών όσο και των πρώην καπνιστών. Επιπλέον, αν και κάποιες μελέτες αναφέρουν την ανίχνευση σποραδικών *KRAS* μεταλλάξεων σε μη καπνιστές με πρώιμη έναρξη του καρκίνου, το ιστορικό καπνίσματος αποτελεί σημαντικό

παράγοντα, ο οποίος σχετίζεται με την αυξημένη εμφάνιση *KRAS* μεταλλάξεων σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα (Westra et al. 1993, Ahrendt et al. 2001, Mao et al. 2010). Επιπλέον, όπως έχει περιγραφεί και σε άλλα γονίδια, για παράδειγμα στο p53, φαίνεται ότι ο καπνός του τσιγάρου προκαλεί ορισμένους τύπους *KRAS* μεταλλάξεων, καθιστώντας έτσι εφικτό να προσδιοριστεί μια μοριακή υπογραφή των καρκινογόνων αποτελεσμάτων του καπνού του τσιγάρου (Riely et al. 2008, Ahrendt et al. 2001). Έτσι, μελέτη έδειξε ότι οι μεταστροφές (transversions, αντικατάσταση μιας πυριμιδίνης C/T με μια πουρίνη A/G ή το αντίστροφο) είναι πιο συχνές από τις μεταπτώσεις (transitions, αντικατάσταση μιας πυριμιδίνης C/T με μια άλλη πυριμιδίνη ή μιας πουρίνης A/G με μια άλλη πουρίνη) σε ασθενείς με ιστορικό καπνίσματος σε σύγκριση με τους ασθενείς χωρίς ιστορικό καπνίσματος (Πίνακας 8) (Riely et al. 2008). Η αιτία μεταστροφής της γουανίνης σε θυμιδίνη (G→T) σε όγκους ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα θεωρείται ότι σχετίζεται με την έκθεση σε πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες που βρέθηκαν στον καπνό του τσιγάρου (Hecht 1999). Επίσης υπάρχουν εθνικές διαφορές ως προς την συχνότητα εμφάνισης *KRAS* μεταλλάξεων. Έτσι οι *KRAS* μεταλλάξεις ανιχνεύονται συχνότερα στους Καυκάσιους (25-50%) σε σχέση με τους Ασιάτες (5-15%) (Okudela et al. 2010, Mao et al. 2010).

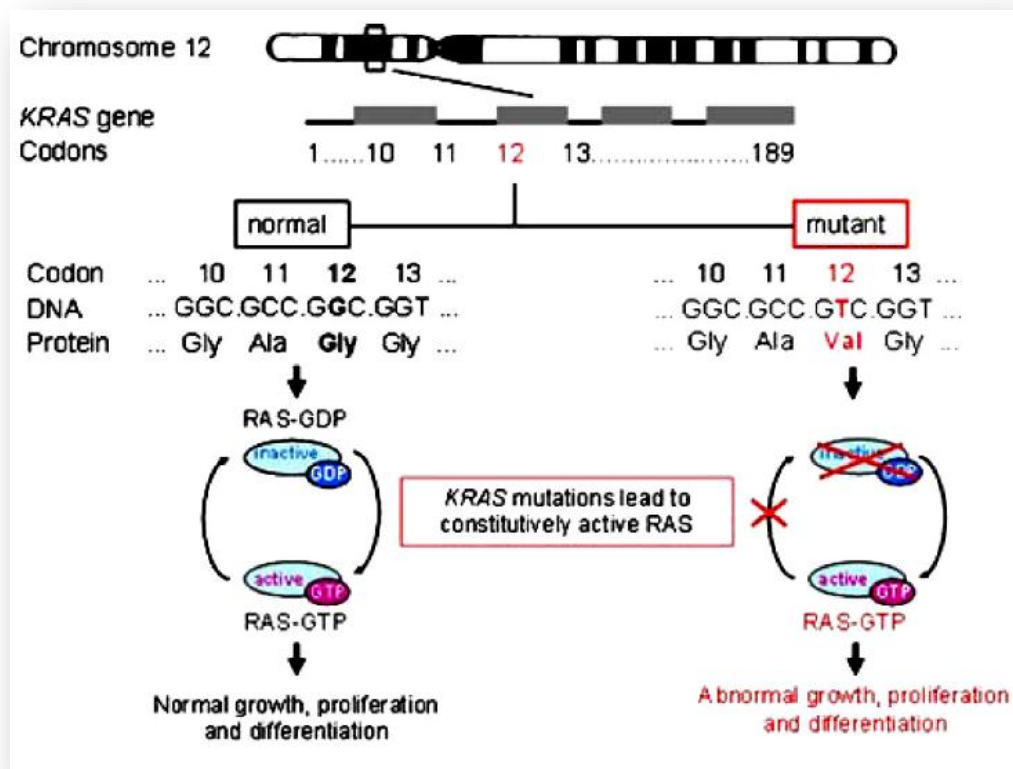
Πίνακας 8. Συχνότητα εμφάνισης *KRAS* μεταλλάξεων σε ασθενείς με ΜΜΚΠ σύμφωνα με τις διαφορετικές αντικαταστάσεις κωδικόνια 12 ή 13 του εξωνίου 2 †.

Κωδικόνιο*	Τύπος σημειακής μετάλλαξης ‡	Αντικατάσταση αμινοξέος	Συχνότητα
GGT → GCT	μεταστροφή	p.G12A	7%
GGT → TGT	μεταστροφή	p.G12C	42%
GGT → GTT	μεταστροφή	p.G12V	21%
GGC → TGC	μεταστροφή	p.G13C	3%
GGT → CGT	μεταστροφή	p.G12R	2%
GGC → GAC	μετάπτωση	p.G13D	2%
GGT → GAT	μετάπτωση	p.G12D	17%
GGT → AGT	μετάπτωση	p.G12S	5%

† Η συλλογή των στοιχείων έγινε από τον κατάλογο σωματικών μεταλλάξεων που βρίσκεται στην βάση δεδομένων του καρκίνου (COSMIC), τον Ιούνιο του 2012.

* Με έντονο χρώμα εμφανίζεται η αλλαγή του νουκλεοτιδίου

‡ Ανάλογα με το ποιά βάση αντικαθίσταται από άλλη (πυριμιδίνη T,C / πουρίνη G,A)



Εικόνα 13. Ενεργοποίηση της πρωτεΐνης KRAS. Αριστερά, η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης σε φυσιολογική κατάσταση, ενώ δεξιά φαίνεται η συνεχής ενεργοποίηση της λόγω παρουσίας σημειακών ογκογόνων μεταλλάξεων στα κωδικόνια 12 και 13.

2.8 Στοχεύοντας τον υποδοχέα EGFR

Σε όγκους του πνεύμονα που εμφανίζουν μετάλλαξη ή γονιδιακή ενίσχυση στον EGFR, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η επιβίωση φαίνεται να εξαρτάται από το μονοπάτι του EGFR. Η παρατήρηση αυτή ώθησε την ανάπτυξη θεραπειών που στοχεύουν τον υποδοχέα EGFR. Μάλιστα μελέτες έχουν δείξει ότι κυτταρικές σειρές που φέρουν EGFR μεταλλάξεις αποπίπτουν όταν τους χορηγούνται στοχευμένοι για τον EGFR παράγοντες ή siRNA που στοχεύουν τους μεταλλαγμένους υποδοχείς (Sordella et al. 2004). Επίσης μεγάλες κλινικές μελέτες έχουν παρατηρήσει ότι σε μια μειονότητα ασθενών με ΜΜΚΠ, που προηγουμένως δεν ανταποκρίθηκαν σε κάποιο χημειοθεραπευτικό σχήμα, και που εμφανίζουν κάποια συγκεκριμένα χαρακτηριστικά (π.χ. το φύλο - γυναίκες, η Ασιατική καταγωγή, το ιστορικό καπνίσματος και / ή ο ιστολογικός τύπος - αδενοκαρκίνωμα) που έλαβαν ως θεραπεία αναστολείς της κινάσης του EGFR δείχνουν σημαντική μείωση του όγκου (Lynch et al. 2004). Συχνά

αυτή η υποομάδα ασθενών παρουσιάζει κάποια ή όλα τα κλινικά ή μοριακά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την ενεργοποίηση του EGFR.

Η αναστολή της δράσης του EGFR βασίζεται κυρίως σε δυο προσεγγίσεις που στοχεύουν: 1) την περιοχή σύνδεσης του προσδέτη με την χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων που αναστέλλουν τον σχηματισμό διμερούς και κατ' επέκταση την ενεργοποίηση της κινάσης οδηγώντας τον υποδοχέα σε αποδόμηση και 2) την περιοχή της τυροσινικής κινάσης, χρησιμοποιώντας μόρια που ανταγωνιζόμενα με την τριφωσφορική αδενοσίνη προσδένονται αναστρέψιμα ή μη στη θέση πρόσδεσης της στην περιοχή της κινάσης, αναστέλλοντας έτσι την φωσφορυλίωση, άρα και την ενεργοποίηση της κινάσης (Hynes and Lane 2005). Αν και έχουν παρασκευασθεί διάφορα μόρια που αναστέλλουν τον EGFR, έγκριση για την εφαρμογή στην κλινική έχουν τα μονοκλωνικά αντισώματα cetuximab (IMC-225 ή ERBITUX[®]) και panitumumab (VECTIBIX[®]) και οι αναστρέψιμοι αναστολείς που περιλαμβάνουν ενώσεις κιναζολίνης με τα συστατικά OSI-774 (erlotinib ή TARCEVA[®]) (Pollack et al. 1999) και ZD 1839 (gefitinib ή IRESSA[®]) (Wakeling et al. 2002). Οι αναστολείς του υποδοχέα EGFR (EGFR inhibitors- EGFRIs) αποτελούν νέες, στοχευμένες θεραπείες για την αντιμετώπιση του ΜΜΚΠ, του καρκίνου της κεφαλής και του τραχήλου καθώς και άλλων κακοηθειών. Το πλεονέκτημα των θεραπειών αυτών είναι ότι είναι καλά ανεκτές από τους ασθενείς, ενώ δεν εμφανίζουν τις σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες των κλασικών χημειοθεραπευτικών σχημάτων.

2.8.1.1 Μονοκλωνικό αντίσωμα Cetuximab

Το cetuximab είναι ένα χημειοθεραπευτικό μονοκλωνικό αντίσωμα μεγέθους 152 kDa που δρα με την σύνδεση του στην εξωκυτταρική περιοχή του EGFR κοντά στην θέση σύνδεσης του προσδέτη με συγγένεια πέντε φορές μεγαλύτερη από τους φυσικούς προσδέτες, μπλοκάροντας την αλληλεπίδραση του προσδέτη/υποδοχέα και την επακόλουθη ενεργοποίηση των ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών PI3K/Akt και Ras/Raf/MAPKs (Bleeker et al. 2004, Fan et al. 1994, Fan et al. 1993). Τα μονοκλωνικά αντισώματα σήμερα διερευνώνται ως μονοθεραπεία αλλά και σε συνδυασμό με ακτινοβολία, χημειοθεραπεία ή άλλους βιολογικούς παράγοντες για την θεραπεία του ΜΜΚΠ. Τα σημερινά στοιχεία δείχνουν έναν περιορισμένο ρόλο

των αντισωμάτων στην θεραπεία του ΜΜΚΠ εκτός από μια μελέτη η οποία θα μπορούσε να συνηγορήσει στην χορήγηση του cetuximab σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία ως θεραπεία πρώτης γραμμής σε ασθενείς με ΜΜΚΠ που εκφράζουν EGFR (Pirker et al. 2009).

2.8.1.2 Αναστρέψιμοι αναστολείς της τυροσινικής κινάσης του EGFR

Οι αναστρέψιμοι αναστολείς TKIs υπήρξαν έως σήμερα οι πιο επιτυχημένοι παράγοντες που στοχεύουν τον υποδοχέα του EGFR για την θεραπεία του ΜΜΚΠ.

2.8.1.2.1 Gefitinib (ZD1839, IRESSA®)

Το gefitinib αναστέλλει εκλεκτικά την ενεργότητα της τυροσινικής κινάσης του EGFR, λειτουργώντας ως ανταγωνιστής της τριφωσφορικής αδενοσίνης, εμποδίζοντας έτσι την ενεργοποίηση του EGFR και την επακόλουθη σηματοδότηση ενδοκυτταρικών οδών, όπως είναι τα μονοπάτια ERK1/2 και PI3K/Akt που επηρεάζουν την κυτταρική ανάπτυξη και επιβίωση (Janmaat et al. 2003). Επίσης το gefitinib επάγει αποπτωτικά σήματα προάγοντας την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C μέσω διαφόρων μορίων (Gilmore et al. 2002, Cragg et al. 2007, Gong et al. 2007, Costa et al. 2007). Το gefitinib μειώνει τα επίπεδα mRNA της κυκλίνης D1 και επάγει την συσσώρευση διαφόρων παραγόντων που αναστέλλουν την κυτταρική ανάπτυξη (Koyama et al. 2007). Επιπλέον το gefitinib μπορεί να αναστείλει την κυτταρική διήθηση.

Σε μελέτες φάσης I, το gefitinib έδειξε να έχει αντικαρκινική δράση σε ασθενείς με διάφορους συμπαγείς όγκους, οι οποίοι προηγουμένως δεν ανταποκρίθηκαν στις συμβατικές θεραπείες. Σε μελέτες φάσης II, το gefitinib φάνηκε να έχει κλινικά σημαντική αντικαρκινική δράση, περιλαμβάνοντας 10% ανταπόκριση και βελτίωση στον έλεγχο των συμπτωμάτων στο 40% των ασθενών με τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό ΜΜΚΠ ανθεκτικό σε χημειοθεραπεία με πλατινούχα φάρμακα (Fukuoka et al. 2003, Kris et al. 2003). Επίσης, σε Ασιάτες ασθενείς που έφεραν μεταλλάξεις στην περιοχή της κινάσης του EGFR το ποσοστό ανταπόκρισης ήταν 75% και η επιβίωση ενός έτους 79% (Tamura et al. 2008). Αρκετές μελέτες φάση II έχουν αξιολογήσει τη θεραπεία με gefitinib σαν πρώτη γραμμή σε ασθενείς με προχωρημένο ΜΜΚΠ που δεν είχαν λάβει προηγουμένως άλλη θεραπεία (Cadranel et

al. 2009, Ebi et al. 2008, Ellis et al. 2009, Yang et al. 2008). Σε μη επιλεγμένους πληθυσμούς, η συνολική ανταπόκριση που παρατηρήθηκε ήταν 4% έως 9.8% με μέση επιβίωση 2.7 με 7.2 μήνες. Ιδιαίτερα σε ασθενείς με ιστολογικό τύπο αδενοκαρκινώματος με βρογχοκυψελιδικά χαρακτηριστικά, η θεραπεία με gefitinib έδειξε ανταπόκριση 9% με 17% και μέση επιβίωση 13 περίπου μήνες. Αυτό το αποτέλεσμα βελτιώθηκε στους Ασιάτες ασθενείς οι οποίοι ανταποκρίθηκαν σε ποσοστό 25% με 54.5% με μέση επιβίωση από 9.4 έως 22.4 μήνες. Σε ασθενείς της Βόρειας Αμερικής που έφεραν μεταλλάξεις στην περιοχή της κινάσης του EGFR το ποσοστό ανταπόκρισης ήταν 55% (Sequist et al. 2008). Επιπλέον, όταν σε Ασιάτες ασθενείς που έφεραν μεταλλάξεις του *EGFR* χορηγήθηκε gefitinib το ποσοστό ανταπόκρισης κυμάνθηκε μεταξύ 63.2% - 66% με μέση επιβίωση 17.8 έως 20 μήνες (Inoue et al. 2009, Sugio et al. 2009). Τέλος, σε ασθενείς Ασιάτες, μη καπνιστές, με ιστολογικό τύπο αδενοκαρκινώματος το ποσοστό ανταπόκρισης έφτασε στο 69% και η επιβίωση ενός έτους στο 73% (Lee et al. 2005).

2.8.1.2.2 Erlotinib (OSI-774, TARCEVA®)

Το erlotinib είναι ένα μικρό μόριο κινάζολιναμίνης, χορηγείται από το στόμα και δρα ως εκλεκτικός αναστρέψιμος αναστολέας της τυροσινικής κινάσης του EGFR. Μάλιστα είναι ειδικός αναστολέας για τον EGFR υποδοχέα και αντιδρά λιγότερο με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας ErbB (de Bono and Rowinsky 2002). Το erlotinib προσδένεται στην ίδια ακριβώς θέση με το gefitinib και οδηγεί στην ανατολή του EGFR και των σχετικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος (Sausville and Verweij 2003). Ο αναστολέας αυτός αναστέλλει τον εξαρτώμενο από τον EGF κυτταρικό πολλαπλασιασμό και σταματάει τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G1, με αποτέλεσμα τη διακοπή μιτογόνων και αντι-αποπτωτικών σημάτων που είναι υπεύθυνα για τις διαδικασίες όπως ο πολλαπλασιασμός, ανάπτυξη, μετάσταση, αγγειογένεση και ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία. Μάλιστα ένα ευρύ φάσμα όγκων έχουν δείξει ευαισθησία στον αναστολέα erlotinib τόσο in vitro όσο και in vivo (de Bono and Rowinsky 2002).

Σε μελέτες φάσης I, το erlotinib έδειξε σημαντικές αντικαρκινικές δράσεις ή μεγάλα διαστήματα σταθερής νόσου σε ασθενείς με διάφορους συμπαγείς όγκους, συμπεριλαμβανομένου του ΜΜΚΠ, οι οποίοι προηγουμένως δεν ανταποκρίθηκαν

στις συμβατικές θεραπείες (Hidalgo et al. 2001). Επίσης έχουν γίνει μελέτες φάσης II, όπου το erlotinib χορηγήθηκε ως μονοθεραπεία σε Ασιάτες ασθενείς με προχωρημένο ΜΜΚΠ, οι οποίοι είχαν λάβει θεραπεία. Σε αυτόν τον πληθυσμό το ποσοστό ανταπόκρισης ήταν 24.2% - 35.7% με μέση επιβίωση 12.9 έως 14.7 μήνες, δείχνοντας καλύτερη απάντηση οι ασθενείς που ήταν γυναίκες, μη καπνίστριες και είχαν ιστολογικό τύπο αδenoκαρκίνωμα (Takahashi et al. 2010, Uhm et al. 2009, Zhou et al. 2009, Kubota et al. 2008). Σε ασθενείς που δεν έφεραν μεταλλάξεις, η απάντηση στο erlotinib ήταν μικρή, μόλις 3.3% και η μέση επιβίωση των ασθενών ήταν 9.2 μήνες (Yoshioka et al. 2010). Αρκετές μελέτες φάση II έχουν αξιολογήσει τη θεραπεία με erlotinib σαν πρώτη γραμμή σε ασθενείς με προχωρημένο ΜΜΚΠ (Akerley et al. 2009, Ellis et al. 2009). Ενώ όταν χορηγήθηκε ως μονοθεραπεία σε μη επιλεγμένο πληθυσμό ασθενών η ανταπόκριση ήταν 7% - 31% με μέση επιβίωση 6 με 13.9 μήνες. Ωστόσο όταν επελέγησαν ασθενείς με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, όπως το φύλο-γυναίκες, ο ιστολογικός τύπος- αδenoκαρκίνωμα με βρογχοκυψελιδικά χαρακτηριστικά ή η παρουσία *EGFR* μεταλλάξεων, τα ποσοστά ανταπόκρισης στον αναστολέα ήταν 21%, 30% και 90%, αντίστοιχα.

2.9 Ευαισθησία στους αναστολείς του EGFR

Οι σημειακές μεταλλάξεις L858R και G719S, καθώς επίσης και οι απώλειες του εξωνίου 19 και η προσθήκη του εξωνίου 20 είναι ικανές να επηρεάσουν τη μιτωτική συμπεριφορά των κυττάρων, σε κυτταρικές καλλιέργειες βρογχικών επιθηλιακών κυττάρων (Amann et al. 2005, Engelman et al. 2005, Greulich et al. 2005, Lynch et al. 2004, Stamos, Sliwkowski and Eigenbrot 2002, Arao et al. 2004).

Η κλινική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας σημειακών μεταλλάξεων και της ανταπόκρισης στη θεραπεία με TKIs ίσως αντανάκλαται πιστά στις κυτταρικές καλλιέργειες και σε κύτταρα με μεταλλαγμένους EGFR υποδοχείς. Τα κύτταρα που φέρουν τους μεταλλαγμένους EGFR υποδοχείς είναι γενικά πιο ευαίσθητα στους αναστολείς τυροσινικής κινάσης του EGFR σε σύγκριση με τα κύτταρα που έχουν φυσιολογικούς EGFR υποδοχείς. Μάλιστα τα κύτταρα που φέρουν τη μετάλλαξη L858R έχουν 10πλάσια έως 100πλάσια ευαισθησία στο erlotinib και στο gefitinib σε σύγκριση με τα κύτταρα που δεν φέρουν *EGFR* μεταλλάξεις (Greulich et al. 2005,

Mukohara et al. 2005, Pao et al. 2004) και προπάντων έχουν πολύ μεγαλύτερη ευαισθησία σε σύγκριση με τα κύτταρα που φέρουν την μετάλλαξη G719S (Jiang et al. 2005). Ταυτόχρονα, οι εξαιρέσεις από τον κανόνα αυτό υπογραμμίζουν περαιτέρω την σχέση της απάντησης στους αναστολείς με συγκεκριμένες μεταλλάξεις.

Η δομή της περιοχής της κινάσης του αγρίου τύπου EGFR υποδοχέα έχει ήδη μελετηθεί τόσο στην ανενεργή όσο και στην ενεργή μορφή της. Η κρυσταλλική δομή έχει μελετηθεί μόνη ή σε σύμπλεγμα με το erlotinib (Stamos et al. 2002), όπου εμφανίζεται μια ενεργή διαμόρφωση της κινάσης, αν και η τυροσίνη στη θέση 869 (Tyr869) στην αγκύλη ενεργοποίησής της δεν είναι φωσφορυλιωμένη. Αυτή η παρατήρηση συμφωνεί με το εύρημα ότι η φωσφορυλίωση της αγκύλης ενεργοποίησης του υποδοχέα EGFR δεν είναι απαραίτητη για την ενεργοποίησή του (Tice et al. 1999).

Η ανακάλυψη ενεργοποιητικών μεταλλάξεων της περιοχής της κινάσης του EGFR και η διαφορετική ευαισθησία τους στους αναστολείς θέτει μια σειρά από δομικά ενδιαφέρουσες και κλινικά σημαντικές ερωτήσεις. Ενδέχεται η ευαισθησία των όγκων που φέρουν μεταλλάξεις του *EGFR* να εξαρτάται από τις δομικές διαφορές που προκαλούν οι μεταλλάξεις στην περιοχή της κινάσης και με αυτόν τον τρόπο επηρεάζουν την απόκριση σε διάφορους αναστολείς του EGFR (Greulich et al. 2005, Lynch et al. 2004).

Σε μια μελέτη του 2006 προσδιορίστηκε η δομή της αγρίου τύπου (wild-type) κινάσης του EGFR αλλά και των κινασών που έφεραν τις μεταλλάξεις L858R και G719S, σε συμπλέγματα με αναστολείς τους, όπως το gefitinib, το AEE788 και το ανάλογο του ATP, το AMP-PNP. Επιπλέον, μελετήθηκε *in vitro* η κινητική των κινασών που έφεραν ή όχι τις μεταλλάξεις. Έτσι διαπιστώθηκε ότι η κινάση με την μετάλλαξη L858R ήταν 50 φορές πιο ενεργή από την κινάση αγρίου τύπου και ότι η κινάση με την μετάλλαξη G719S ήταν 10 φορές πιο ενεργή από την κινάση αγρίου τύπου. Η εξέταση των μεταλλαγμένων δομών αποκάλυψε μια συνολική διαμόρφωση παρόμοια με αυτή της ενεργοποιημένης κινάσης αγρίου τύπου. Οι συγκρίσεις με τη δομή του ανενεργού EGFR υποδηλώνουν ότι οι μεταλλάξεις L858R και G719S ενεργοποιούν την κινάση παρεμβαίνοντας σε αλληλεπιδράσεις οι οποίες σταθεροποιούν την ανενεργό μορφή. Η ανάλυση των συμπλεγμάτων με τους αναστολείς έδειξε ότι ο τρόπος σύνδεσης του AMP-PNP, της AEE788 και του gefitinib είναι παρόμοιος στις κινάσεις αγρίου τύπου,

L858R και G719S. Αντίθετα, παρατηρήθηκε μια σημαντική περιστροφή του ανάλογου της σταυροσπορίνης AFN941 στο σημείο σύνδεσης της μετάλλαξης G719S σε σύγκριση με τον προσανατολισμό του στη σύνδεσή του με την πρωτεΐνη αγρίου τύπου. Άμεσες μετρήσεις της σύνδεσης της gefitinib και του AEE788 με την κινάση αγρίου τύπου και τις μεταλλαγμένες κινάσες αποκάλυψαν ότι και οι δύο αναστολείς συνδέονται με μεγαλύτερη συγγένεια με τη κινάση που φέρει την μετάλλαξη L858R σε σύγκριση με την κινάση αγρίου τύπου ή με τη μετάλλαξη G719S. Είναι αξιοσημείωτο ότι το gefitinib συνδέεται 20 φορές ισχυρότερα με τη μετάλλαξη L858R.

Οι μεταλλάξεις του *EGFR* ενεργοποιούν την κινάση αναστέλλοντας αυτοανασταλτικές επιδράσεις κοντά στο σημείο σύνδεσης με το ATP. Καθώς φαίνεται από αυτή τη μελέτη, αυτές οι μεταλλάξεις μεταβάλλουν την περιοχή της κινάσης με τρόπο ώστε να επηρεάζεται δραματικά η σύνδεση με τους αναστολείς. Συνεπώς, κάθε μετάλλαξη αποτελεί ιδιαίτερο στόχο για την ανάπτυξη ειδικών αναστολέων.

2.10 Αντίσταση στους ανταγωνιστές του EGFR

Η αντίσταση στους φαρμακευτικούς ανταγωνιστές του EGFR μπορεί να είναι είτε ενδογενής είτε επίκτητη. Όπως έχει αναφερθεί, η σηματοδότηση του EGFR γίνεται και μέσω του μονοπατιού RAS-RAF-MEK/MAPK. Όταν το KRAS είναι μεταλλαγμένο, υπάρχει μια συνεχής ενεργοποίηση του μονοπατιού, η οποία είναι ανεξάρτητη από τη σήμανση μέσω του EGFR. Οι συχνότερα αναφερόμενες μεταλλάξεις του KRAS εμφανίζονται στα κωδικόνια 12 και 13 του εξωνίου 2 (Bos 1989). Οι μεταλλάξεις αυτές εμφανίζονται συχνότερα στους καπνιστές (Ahrendt et al. 2001), κατά κανόνα αποκλείουν αμοιβαία την ύπαρξη EGFR και BRAF μεταλλάξεων και η ανίχνευση τους συσχετίζεται με μη απάντηση στις θεραπείες με ανταγωνιστές του EGFR (Pao et al. 2005b).

Η αποτυχία των ανταγωνιστών του EGFR στην κλινική πράξη συχνά συμβαίνει μετά μία περίοδο κλινικού οφέλους. Στην περίπτωση αυτή γίνεται λόγος για δευτεροπαθή αστοχία ή επίκτητη αντίσταση. Ο συχνότερος λόγος επίκτητης αντίστασης στα μόρια αναστολείς της τυροσινικής κινάσης είναι η εμφάνιση νέων επιπλέον EGFR μεταλλάξεων. Η ανάδυση της μετάλλαξης T790M με αντικατάσταση της μεθειονίνης από τη θρεονίνη στο εξώνιο 20 (Pao et al. 2005a) προκαλεί μία

αλλαγή στην τρισδιάστατη δομή της τυροσινικής κινάσης και εμποδίζει την σύνδεση του erlotinib και του gefitinib στον EGFR. Ένας διαφορετικός μηχανισμός αντίστασης είναι η χρήση από τον όγκο εναλλακτικών μονοπατιών καρκινογένεσης. Έτσι, η υπερδραστηριοποίηση του πρώτο-ογκογονιδίου MET μπορεί να ενεργοποιήσει το μονοπάτι PI3K/Akt και να οδηγήσει σε πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και δευτερογενή αντίσταση στο gefitinib (Engelman et al. 2007)

Εν κατακλείδι, γίνεται προσπάθεια προσδιορισμού προγνωστικών και προβλεπτικών δεικτών, που στο εγγύς μέλλον θα χρησιμοποιούνται στην εξατομίκευση της θεραπείας για κάθε ασθενή. Σήμερα, διερευνάται ο ρόλος των μοριακών υπογραφών και η συσχέτισή τους με την κλινική έκβαση, καθώς και η χρήση της φαρμακογενωμικής, με σκοπό τη βελτίωση των αποτελεσμάτων της χημειοθεραπείας.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανίχνευση της συχνότητας και του είδους των μεταλλάξεων των γονιδίων *EGFR* και *KRAS* και η συσχέτιση αυτών με τα κλινικόπαθολογικά χαρακτηριστικά Ελλήνων ασθενών με ΜΜΚΠ που έλαβαν 1^η γραμμή χημειοθεραπεία. Η ανίχνευση των μεταλλάξεων πραγματοποιήθηκε στον πρωτοπαθή όγκο των ασθενών. Η ανίχνευση των μεταλλάξεων έγινε με τον προσδιορισμό της πρωτοταγούς νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των τμημάτων των υπό μελέτη γονιδίων.

Ο σκοπός του δεύτερου τμήματος αυτής της μελέτης ήταν η διερεύνηση του προτύπου των *EGFR* και *KRAS* μεταλλάξεων στον πρωτοπαθή όγκο και στην αντίστοιχη μετάσταση. Προκειμένου λοιπόν να μελετηθεί αν οι μεταλλάξεις ήταν προβλεπτικές για την υποτροπή, αναλύθηκαν δείγματα ασθενών του πρωτοπαθούς όγκου και του αντίστοιχου μεταστατικού ή δείγματα βρογχικής βιοψίας στη φάση της υποτροπής και τα ευρήματα συσχετίστηκαν με τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους.

Όσον αφορά το τρίτο μέρος της μελέτης, σκοπός ήταν η συσχέτιση των μεταλλάξεων του *EGFR* με την ενίσχυση του γονιδίου (gene amplification) σε ασθενείς με ΜΜΚΠ που έλαβαν ως θεραπεία αναστολείς του EGFR. Η ανίχνευση της γονιδιακής ενίσχυσης του *EGFR* επιτεύχθηκε με την χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης σε παραγματικό χρόνο (real-time PCR) και τα αποτελέσματα συσχετίστηκαν με τα παθολογο-ανατομικά χαρακτηριστικά του όγκου, την απάντηση στην θεραπεία, την διάρκεια ανταπόκρισης, την γενική κατάσταση του ασθενούς και την συνολική επιβίωση.

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B.1 Ασθενείς και συλλογή δειγμάτων

Στην μελέτη συμπεριλήφθησαν ασθενείς με διαγνωσμένο, χειρουργήσιμο ή μη ΜΜΚΠ σε προχωρημένα στάδια της νόσου και οι οποίοι χωρίστηκαν σε δυο ομάδες. Η πρώτη ομάδα περιλάμβανε ασθενείς, στους οποίους το προς ανάλυση υλικό προερχόταν από τον πρωτοπαθή όγκο (χειρουργικό παρασκεύασμα, βρογχική βιοψία ή κυτταρολογική). Επίσης στην ομάδα συμπεριλάβαμε και ασθενείς όπου το μόνο διαθέσιμο υλικό προς ανάλυση ήταν βιοψιακό υλικό από επιχώριους ή απομακρυσμένους λεμφαδένες. Η δεύτερη ομάδα θα περιλαμβάνει ασθενείς, στους οποίους το προς ανάλυση υλικό που προερχόταν από τον πρωτοπαθή όγκο και τον αντίστοιχο μεταστατικό ή δείγμα βρογχικής βιοψίας στην φάση της υποτροπής.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ιστικά δείγματα, μονιμοποιημένα σε 10% φορμαλδεΐδη και εγκλεισμένα σε κύβους παραφίνης από ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Από το κύριο χειρουργικό παρασκεύασμα κάθε ασθενούς πάρθηκαν αντιπροσωπευτικές ιστολογικές τομές του όγκου με τη χρήση μικροτόμου, μονιμοποιήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες και βάφτηκαν με την χρώση αιματοξυλίνης - ιωσίνης. Έπειτα ακολούθησε η επιλογή των προς μελέτη δειγμάτων με τη βοήθεια έμπειρων παθολογοανατόμων (Α.Κ., Ε.Λ.), έτσι ώστε να υπάρχει όσο το δυνατό μεγαλύτερη ποσότητα καρκινικού ιστού (λιγότερος συνδετικός ή παρακείμενος φυσιολογικός ιστός, αιμοφόρα αγγεία). Αυτό αποσκοπούσε στο να υπάρχει η μεγαλύτερη δυνατή κυτταρική ομοιογένεια στο τμήμα του καρκινικού ιστού που θα ελεγχόταν, ώστε να είναι εφικτή αφενός μεν η ανίχνευση των μεταλλάξεων και αφετέρου δε η αποφυγή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων. Επομένως, στα περισσότερα δείγματα, τα οποία προέρχονταν είτε από χειρουργικά είτε από βιοψιακά παρασκευάσματα, πραγματοποιήθηκε επιλογή των καρκινικών κυττάρων με πιεζο-ηλεκτρική μικροτόμηση (microdissection - piezo power Erpendorf Microdissector, Germany) προκειμένου να εξασφαλιστεί ότι τα προς ανάλυση δείγματα αποτελούνταν από τουλάχιστον 80% καρκινικά κύτταρα. Για τους σκοπούς της μελέτης και με την προϋπόθεση ότι υπήρχε επάρκεια υλικού, από κάθε περιστατικό χρησιμοποιήθηκαν τουλάχιστον 4 διαδοχικές ιστολογικές τομές πάχους 10μm.

Επίσης στην μελέτη αναλύθηκαν κυτταρολογικά επιχρίσματα. Σε αυτά τα δείγματα πριν την μικροτόμηση προηγήθηκε σήμανση των εστιών των παθολογικών

κυττάρων με μια βελόνα στην πίσω πλευρά των πλακιδίων βαμμένων με χρώση Giemsa. Ακολούθως, για την απομάκρυνση των καλυπτρίδων, τα πλακίδια επώαστηκαν σε διάλυμα ξυλόλης σε θερμοκρασία δωματίου σε χωριστά σωληνάρια για την αποφυγή μόλυνσης. Η επώαση πραγματοποιήθηκε μία νύκτα ή μέχρις ότου η καλυπτρίδα να μπορούσε να αφαιρεθεί (μερικές φορές έως και μία εβδομάδα). Στη συνέχεια, τα πλακίδια ξεπλύθηκαν σε διάλυμα αλκοόλης, τρεις φορές σε απόλυτη αιθανόλη (100%), δυο φορές σε 70% για την ενυδάτωση των κυττάρων. Στην συνέχεια η επιλογή των καρκινικών κυττάρων έγινε με πιεζο-ηλεκτρική μικροτόμηση, όπως και στα ιστικά δείγματα. Όλα τα δείγματα επεξεργάστηκαν κατά τα αρχικά στάδια στο Παθολογοανατομικό εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου και η μελέτη πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους κανόνες ηθικής και δεοντολογίας.

B.2 Απομόνωση γενωμικού DNA

Η απομόνωση DNA έγινε από τομές πάχους 10 μ m ή από 500 έως 50.000 κύτταρα που συλλέχθηκαν από τον φυσιολογικό ιστό (όταν ήταν διαθέσιμος) και από το τμήμα όγκου. Τα δείγματα ιστών επεξεργάστηκαν με ξυλόλη και διαβαθμίσεις αιθανόλης, για την απομάκρυνση της παραφίνης και στην συνέχεια επώαστηκαν για 20 ώρες στους 56°C με διάλυμα 1% SDS/πρωτεΐνάση K (10mg/ml). Για την απομόνωση του γενωμικού DNA χρησιμοποιήθηκε το kit MasterPure Complete DNA/RNA Purification (EPICENTRE; Biotechnologies, Madison, USA), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η μέθοδος στηρίζεται στην διάσπαση των μεσοκυττάρων δεσμών, των κυτταρικών και πυρηνικών μεμβρανών και βασικών πρωτεϊνών, όπως είναι οι ιστόνες, και αυτό επιτυγχάνεται με την χρήση απορρυπαντικών και πρωτεολυτικών ενζύμων (πρωτεΐνάση K). Οι πρωτεΐνες απομακρύνονται και στο τελικό στάδιο το DNA κατακρημνίζεται σε διάλυμα αλκοόλης (ισοπροπανόλη).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός και ο έλεγχος καθαρότητας του DNA, πριν από την φύλαξη των δειγμάτων στους -20°C, πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρικά σε δύο μήκη κύματος 260 nm (απορρόφηση νουκλεϊκών οξέων) και 280 nm (απορρόφηση πρωτεϊνών) με τη χρήση του nanodrop (Nanodrop Spectrophotometer ND-1000). Από την οπτική πυκνότητα (Optical Density, OD) στα 260 nm

προσδιορίζεται η συγκέντρωση του DNA, ενώ από το λόγο OD260/OD280 εκτιμάται η καθαρότητα του DNA από την παρουσία πρωτεϊνών, φαινόλης ή άλλων προσμίξεων που απορροφούν στα 280 nm. Όταν ο λόγος 260/280 είναι μεγαλύτερος από 1.8 υποδηλώνει ότι το δείγμα έχει ικανοποιητική καθαρότητα.

Στο σημείο αυτό να σημειωθεί ότι η ποιότητα του DNA, που απομονώνεται από ιστούς που έχουν μονιμοποιηθεί σε φορμόλη και εμπεδωθεί σε παραφίνη, συνήθως δεν είναι καλή διότι επηρεάζεται από το χρόνο μονιμοποίησης και τις συνθήκες επεξεργασίας του ιστού. Κατά κύριο λόγο το DNA είναι κατακερματισμένο από την επίδραση της φορμόλης, γεγονός που δεν επιτρέπει την αξιόπιστη ανίχνευση αλληλουχιών μεγάλου μήκους (>400bp).

B.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο του *EGFR* πραγματοποιήθηκε στα εξώνια 18-21, ενώ για το γονίδιο *KRAS* μελετήθηκε το εξώνιο 2. Για την εκλεκτική ενίσχυση, με την αντίδραση της PCR, των εξωνίων των υπό μελέτη γονιδίων (*EGFR* και *KRAS*) χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα 0.1-0.4 μg DNA που απομονώθηκε από τα ιστικά δείγματα της μελέτης.

Όσον αφορά το *EGFR* γονίδιο, η πολλαπλή αντιγραφή των εξωνίων 18-21 του βασίστηκε σε δυο διαδοχικές αντιδράσεις PCR, μια πρώτη αντίδραση (first PCR) και μια δεύτερη, τη φωλιακή PCR (nested PCR).

Θα πρέπει να επισημανθεί εδώ ότι επειδή τα δείγματα της μελέτης προέρχονταν από μονιμοποιημένους σε φορμόλη ιστούς και επομένως η ποιότητα του DNA δεν ήταν καλή, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της nested PCR, η οποία θεωρείται ότι αυξάνει την ευαισθησία και ειδικότητα της αντίδρασης. Η αύξηση της ειδικότητας της nested PCR στηρίζεται στη διαδοχική χρήση δυο ζευγών εκκινητών, ενώ η μεγαλύτερη ευαισθησία προκύπτει από τον αυξημένο αριθμό κύκλων σε σχέση με τη συμβατική PCR. Πιο συγκεκριμένα, η πρώτη PCR χρησιμοποιεί ένα ζευγάρι εξωτερικών εκκινητών (outer primers), ενώ η δεύτερη δυο φωλιακούς εκκινητές (inner primers), οι οποίοι είναι εσωτερικοί στο πρώτο ζευγάρι. Το προϊόν της πρώτης αντίδρασης PCR χρησιμοποιείται ως μήτρα για τη δεύτερη PCR που παράγει προϊόν μικρότερου μήκους από την πρώτη αντίδραση.

Αντίστοιχα, για την αντιγραφή του εξωνίου 2 του *KRAS* γονιδίου πραγματοποιήθηκαν δυο διαδοχικές αντιδράσεις PCR για μεγαλύτερη ευαισθησία, όπου μέρος του προϊόντος της πρώτης PCR αποτέλεσε εκμαγείο για την δεύτερη αντίδραση, χρησιμοποιώντας όμως το ίδιο ζευγάρι εκκινητών και στις δυο αντιδράσεις.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών καθώς και το μέγεθος των αναμενόμενων προϊόντων PCR για καθένα εξώνιο παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9. Αλληλουχίες εκκινητών (σε παρένθεση το επικρατές αλληλόμορφο) και μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος (PCR) (ζεύγη βάσεων - b.p.) για τα εξώνια 18-21 και 2 των γονιδίων *EGFR* και *KRAS*, αντίστοιχα.

		Εξώνιο	Εκκινητές	Αλληλουχία εκκινητών	b.p.
EGFR γονίδιο	Εξωτερικοί εκκινητές (Outer primers)	18	(F)	5'-TCAGAGCCTGTGTTTCTACCAA-3'	532
			(R)	5'-TGGTCTCACAGGACCACTGATT-3'	
		19	(F)	5'-AAATAATCAGTGTGATTTCGTGGAG-3'	495
			(R)	5'-GAGGCCAGTGCTGTCTCTAAGG-3'	
		20	(F)	5'-ACTTCACAGCCCTGCGTAAAC-3'	444
			(R)	5'-ATGGGACAGGCACTGATTTGT-3'	
	21	(F)	5'-GCAGCGGGTTACATCTTCTTT-3'	526	
		(R)	5'-CAGCTCTGGCTCACACTACCA-3'		
	Εσωτερικοί εκκινητές (Inner primers)	18	(F)	5'-TCCAAATGAGCTGGCAAGTG-3'	397
			(R)	5'-CATCCTCCCCTGCATGTGT-3'	
		19	(F)	5'-GTGCATCGCTGGTAACATCC-3'	297
			(R)	5'-TGTGGAGATGAGCAGGGTCT-3'	
		20	(F)	5'-ATCGCATTTCATGCGTCTTCA-3'	378
			(R)	5'-ATCCCCATGGCAAACCTCTTG-3'	
21	(F)	5'-GCT CAGAGCCTGGCATGAA-3'	348		
	(R)	5'-CATCCTCCCCTGCATGTGT-3'			
KRAS γονίδιο	Εξωτερικοί εκκινητές (Outer primers)	2	(F)	5' AGGCCTGCTGAAAATGACTGAATA 3'	320
			(R)	5' CTGTATCAAAGAATGGTCCTGCAC 3'	
	Εσωτερικοί εκκινητές (Inner primers)	2	(F)	5' AAAATGACTGAATATAAACTTGTGG 3'	247
			(R)	5' CTCTATTGTTGGATC ATATTCGTC 3'	

Η πρώτη αντίδραση PCR για την αντιγραφή των εξωνίων και των δυο γονιδίων πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 10 μl με τις συγκεντρώσεις των διαλυμάτων που παρουσιάζονται στον Πίνακας 10. Μετέπειτα η δεύτερη (nested) PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 20 μl με τις συγκεντρώσεις των διαλυμάτων που παρουσιάζονται στον Πίνακας 10, ενώ οι συνθήκες PCR ήταν όμοιες με αυτές της πρώτης PCR (Πίνακας 11 και Πίνακας 12) και όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στην συσκευή θερμοκυκλοποιητή *DNA Engine PTE-200* (Peltier thermal cycler).

Πίνακας 10. Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων για την πρώτη (first) και δεύτερη (nested) PCR που χρησιμοποιήθηκαν για την επιλεκτική ενίσχυση των εξωνίων των υπό μελέτη γονιδίων.

Αντιδραστήρια	Συγκεντρώσεις	
	Πρώτη αντίδραση (first)	Δεύτερη αντίδραση (nested)
DNA εκμαγείο	2,5 μl	2 μl
PCR Buffer10x	1x	1x
Εκκινητές 1μM (F και R)	1 μl (200nM)	2 μl (200nM)
MgCl ₂ (50mM)	0.4μl	0.4 μl
dNTPs (10μM)	0.2 μl (200nM)	0.4 μl (200nM)
Taq DNA Πολυμεράση (5 U/μl)	0.15μl	0.2μl
ddH ₂ O	Μέχρι τα 10 μl	Μέχρι τα 20 μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	10 μl	20 μl

Πίνακας 11. Βέλτιστες συνθήκες PCR για την ενίσχυση των εξωνίων 18-21 του *EGFR* γονιδίου.

	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική θερμική αποδιάταξη	94°C	15min	1
Θερμική αποδιάταξη (Denaturation)	94°C	20sec	40
Υβριδοποίηση εκκινητών (Annealing)	60°C	30sec	
Επιμήκυνση εκκινητών (Extension)	72°C	1min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	7min	1

Πίνακας 12. Βέλτιστες συνθήκες PCR για την ενίσχυση του εξωνίου 2 του *KRAS* γονιδίου.

	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική θερμική αποδιάταξη	94°C	5min	1
Θερμική αποδιάταξη (Denaturation)	94°C	20sec	35
Υβριδοποίηση εκκινητών (Annealing)	50°C/54°C	30sec	
Επιμήκυνση εκκινητών (Extension)	72°C	1min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	7min	1

Ο καθορισμός των βέλτιστων συνθηκών και συγκεντρώσεων των αντιδραστηρίων PCR για τα δέκα ζεύγη εκκινητών, πραγματοποιήθηκε με επαναλαμβανόμενες αντιδράσεις (με τη χρήση DNA απομονωμένου από κυτταρικές σειρές και από φυσιολογικό ιστό), στις οποίες ελέχθησαν οι σημαντικότερες μεταβλητές της κάθε αντίδρασης (η ποσότητα DNA, η συγκέντρωση των εκκινητών, του MgCl₂, η θερμοκρασία και ο χρόνος του σταδίου πρόσδεσης των εκκινητών).

Επιπλέον, λόγω του γεγονότος ότι η PCR μπορεί να δημιουργήσει αντίγραφα ακόμα και ενός μορίου DNA, να σημειωθεί ότι σε κάθε αντίδραση λαμβάνονταν όλες οι απαραίτητες προφυλάξεις, ώστε να αποφευχθεί επιμόλυνση του μίγματος της αντίδρασης με εξωγενή τμήματα DNA που μπορεί να χρησιμεύσουν ως εκμαγεία και να οδηγήσουν σε λανθασμένα αποτελέσματα.

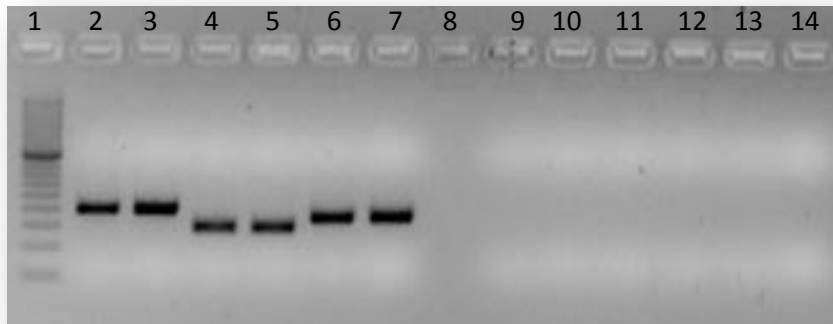
B.4 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης PCR σε πήκτωμα αγαρόζης

Για την πιστοποίηση του επιτυχούς αποτελέσματος και της ορθότητας των προϊόντων της PCR, ένα κλάσμα της δεύτερης αντίδρασης (ή nested) (π.χ. 5μl) αναμειγνύεται με χρωστική φορτώματος (loading buffer: 0.25% w/v μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.25% w/v κυανό του ξυλενίου, 25% w/v γλυκερόλη) και ηλεκτροφορεύεται σε οριζόντια συσκευή σε πήκτωμα αγαρόζης 2% w/v (Agarose, Invitrogen, 1X διάλυμα TAE) που περιείχε 5μg/ml βρωμιούχο αιθίδιο (Invitrogen). Το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) έχει την ιδιότητα να συμπλέκεται με τις βάσεις του DNA και να φθορίζει, όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία, σηματοδοτώντας με αυτόν τον

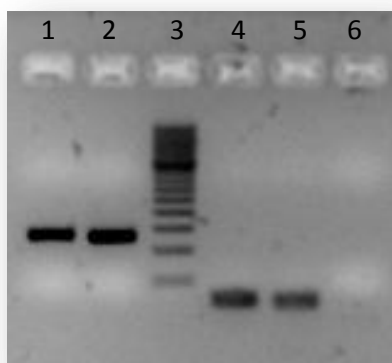
τρόπο τα δείγματα μας στο πήκτωμα αγαρόζης. Η ηλεκτροφόρηση βασίζεται στο ότι το DNA έχει αρνητικό φορτίο, με αποτέλεσμα να κινείται προς τον θετικό πόλο (άνοδο) όταν βρεθεί σε ηλεκτρικό πεδίο. Παράλληλα με τα δείγματα φορτώνεται πρότυπο μίγμα DNA με γνωστά μοριακά βάρη (DNA Ladder, Invitrogen), το οποίο μας επιτρέπει την ανίχνευση του αναμενόμενου μεγέθους των προϊόντων της PCR που ηλεκτροφορούνται.

Μετά την ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα αγαρόζης μεταφέρεται σε συσκευή υπεριώδους φωτός (Alphamager System, Alpha Innotech) για την παρατήρηση και φωτογράφιση των αποτελεσμάτων (Εικόνα 14, Εικόνα 15).

Σημείωση: Η παρασκευή 1X διαλύματος TAE έγινε από διάλυμα 50X TAE (Tris/Acetate/EDTA, για 1 λίτρο 50X: 242gr Tris base, 57.1ml Acetic acid, 100ml 0.5M EDTA pH 8.0 ddH₂O μέχρι τον όγκο των 1000ml).



Εικόνα 14. Πήκτωμα αγαρόζης μετά από ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR που ενισχύθηκαν χρησιμοποιώντας εκκινητές για τα εξώνια 18, 19 και 21 του γονιδίου *EGFR*. Θέση 1: 100 bp DNA μάρτυρας, 2-7: FFPE δείγματα για τα εξώνια 18 (2-3), 19(4-5) και 21(6-7), 8: κενό, 9-14: δείγματα αρνητικού ελέγχου της PCR.



Εικόνα 15. Πήκτωμα αγαρόζης μετά από ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR που ενισχύθηκαν χρησιμοποιώντας εκκινητές για το εξώνιο 2 του γονιδίου *KRAS*. Θέση 1 και 2: FFPE δείγματα, 3: 100 bp DNA μάρτυρας, 4-6: δείγματα αρνητικού ελέγχου της PCR.

B.5 Καθαρισμός και Αλληλούχιση των προϊόντων της PCR για την ανίχνευση μεταλλάξεων

Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

Προκειμένου να προσδιοριστεί η αλληλουχία των επιλεγμένων τμημάτων των γονιδίων *EGFR* και *KRAS*, τα αντίστοιχα θετικά προϊόντα της PCR υπόκεινται σε καθαρισμό, για την απομόνωση του δίκλωνου DNA-προϊόντος και την απομάκρυνση πρόσθετων στοιχείων που συνυπάρχουν στο διάλυμα της αντίδρασης (εκκινητές, ένζυμο, ελεύθερα νουκλεοτίδια, άλατα κλπ.).

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το kit QIAquick PCR purification (QIAGEN, Germany), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η διαδικασία ανάκτησης του DNA βασίζεται στην εκλεκτική δέσμευση του σε στήλη με μεμβράνη διοξειδίου του πυριτίου, υπό κατάλληλες συνθήκες ρυθμιστικών αλάτων και pH, ενώ οι πρόσθετες ουσίες διαπερνούν τη στήλη και απομακρύνονται. Η ανάκτηση του DNA έγινε με αποσταγμένο νερό (περίπου 38μl). Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20°C μέχρι τη χρησιμοποίησή τους.

Αλληλούχιση των προϊόντων της PCR

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας αποτελεί τον πιο άμεσο τρόπο για τον προσδιορισμό μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών ενός γονιδίου. Η μέθοδος (cycle sequencing) που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση μεταλλάξεων αποτελεί τροποποίηση της κλασσικής μεθόδου Sanger [ή μέθοδος «διδεοξυαναλόγων» (dideoxy termination method)] (Sanger, Nicklen and Coulson 1977). Ουσιαστικά πρόκειται για μια αντίδραση PCR που βασίζεται στην χρήση αποληκτικών τριφωσφορικών διδεοξυριβονουκλεοτιδίων (dideoxy nucleoside triphosphates, ddNTPs) ταυτόχρονα με τη χρησιμοποίηση των 4 βάσεων (dNTPs). Τα διδεοξυριβονουκλεοτίδια που χρησιμοποιούνται είναι σεσημασμένα με φθορίζουσες χρωστικές, ειδικές για το κάθε ανάλογο και η ενσωμάτωση τους στη νεοσυντιθέμενη πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα προκαλεί πρόωρο τερματισμό στη σύνθεσή της. Η συγκέντρωση των ddNTPs είναι χαμηλή σε σχέση με τη συγκέντρωση των dNTPs. Επιπλέον, χρησιμοποιείται ένας εκκινητής και όχι ζεύγος εκκινητών (πρόσθιος και ανάστροφος) όπως στην κλασική PCR κι έτσι προκύπτει γραμμική αντί εκθετική ενίσχυση προϊόντος. Στη μέθοδο Cycle Sequencing πραγματοποιείται μια αντίδραση με μείξη των τεσσάρων διαφορετικών έγχρωμων διδεοξυαναλόγων, οπότε απαιτείται μικρότερη ποσότητα DNA ως μήτρα (PCR προϊόν) σε σχέση με τη μέθοδο Sanger, όπου γίνεται χρησιμοποίηση τεσσάρων διαφορετικών αντιδράσεων για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας. Ο πολυμερισμός του DNA συντελείται από μία θερμοανθεκτική πολυμεράση ικανή να διατηρεί την ενεργότητα της ακόμα και στους 95°C.

Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που απαιτούνται για κάθε αντίδραση φαίνονται στον Πίνακας 13. Όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια περιέχονται στο BigDye[®] Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) εκτός από το ρυθμιστικό διάλυμα (400 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, pH 9.0, BigDye[®] Terminator v3.1 5X Sequencing Buffer, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) και από τους εκκινητές, οι οποίοι ήταν οι ίδιοι που χρησιμοποιήθηκαν και στην PCR. Συγκεκριμένα για τα εξώνια 18-21 του γονιδίου EGFR χρησιμοποιήθηκαν οι εσωτερικοί εκκινητές. Επιπλέον, όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε πλάκες 96 θέσεων. Προκειμένου να έχουμε μεγαλύτερη αξιοπιστία των αποτελεσμάτων σε κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση και των δυο αλυσίδων του PCR προϊόντος κάθε εξωνίου (σε διαφορετικές αντιδράσεις).

Οι αντιδράσεις Cycle Sequencing πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή DNA Engine PTE-200 (Peltier thermal cycler) και οι συνθήκες παρουσιάζονται στον Πίνακα 14 και ήταν κοινές για όλα τα τμήματα DNA που μελετήθηκαν.

Πίνακας 13. Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων των Cycle Sequencing αντιδράσεων.

Αντιδραστήρια	Συγκεντρώσεις αντίδρασης
DNA εκμαγείο	2,5 μl
5x buffer	0,6 μl
Εκκινητής 1μM (F ή R)	2 μl (200nM)
Ready Reaction Mix †	1μl
ddH ₂ O	Μέχρι όγκου 10 μl
Συνολικός όγκος	10 μl

† BigDye® Terminator Ready Reaction Mix v3.1 (Applied Biosystems)

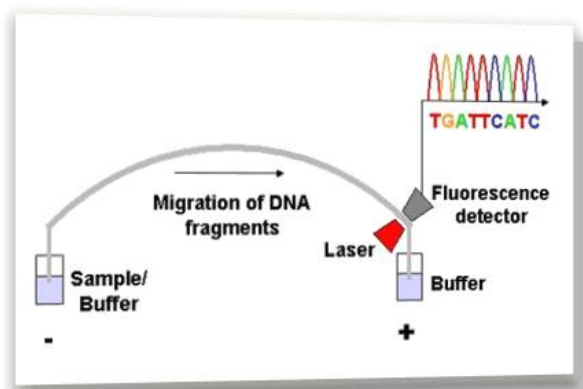
Πίνακας 14. Βέλτιστες συνθήκες του προγράμματος Cycle Sequencing.

	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική θερμική αποδιάταξη (Denaturation)	96°C	1min	1
Θερμική αποδιάταξη (Denaturation)	96°C	10sec	25
Υβριδοποίηση εκκινητών (Annealing)	50°C	5sec	
Επιμήκυνση εκκινητών (Extension)	60°C	4min	

Καθαρισμός προϊόντων επέκτασης (Purification of extension products)

Για να επιτύχουμε καλύτερα αποτελέσματα στον προσδιορισμό της αλληλουχίας των επιλεγμένων τμημάτων των γονιδίων *EGFR* και *KRAS*, οι αντιδράσεις του Cycle Sequencing υπόκεινται σε καθαρισμό, για την απομάκρυνση πρόσθετων στοιχείων που συνυπάρχουν στο διάλυμα της αντίδρασης (εκκινητές, ένζυμο, ελεύθερα ddNTPs, dNTPs, άλατα κλπ.) πριν από την ηλεκτροφόρηση τους στον αυτόματο αλληλουχιτή.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος κατακρήμνιση με χρήση αιθανόλης/EDTA ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή (Purification methods for BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit, Ethanol/EDTA precipitation, Applied Biosystems). Η διαδικασία καθαρισμού των αντιδράσεων αλληλούχισης γίνεται στην ίδια πλάκα που βρίσκονται τα δείγματα και βασίζεται στην κατακρήμνιση των τμημάτων DNA με τη χρήση αιθανόλης/EDTA και την απομάκρυνση των εναπομεινάντων αντιδραστηρίων. Τα καθαρισμένα πλέον προϊόντα επαναδιαλυτοποιούνται σε φορμαμίδιο (10μl, Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems, USA), το οποίο χρησιμοποιείται για την αποδιάταξη των τμημάτων DNA σε υψηλή θερμοκρασία και σταθεροποιεί την μονόκλωνη μορφή του αποδιαταγμένου-μετουσιωμένου DNA. Τέλος, ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων αυτών μέσω λεπτών τριχοειδών σωληναρίων σε αυτόματο αναλυτή αλληλουχιών (ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA), για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας τους (Εικόνα 16).

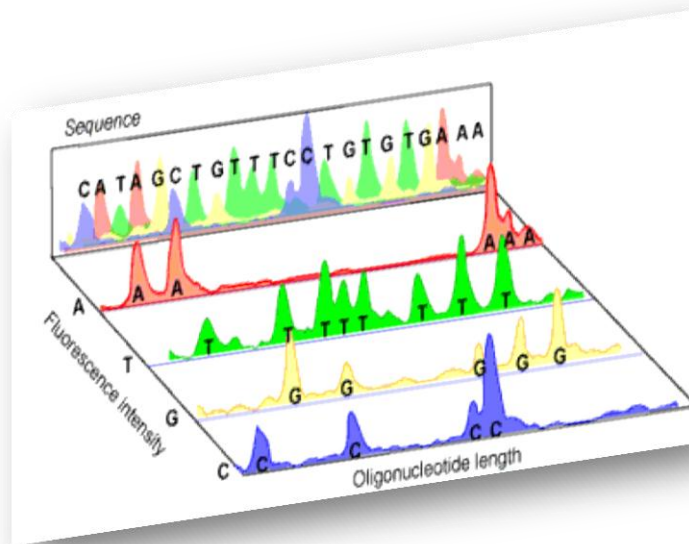


Εικόνα 16. Σχηματική απεικόνιση ηλεκτροφόρησης μέσω τριχοειδούς σε αυτόματο γενετικό αναλυτή.

B.6 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων σε Γενετικό Αναλυτή

Με τη χρήση αυτόματου αναλυτή αλληλουχιών (ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA), η ηλεκτροφορητική εικόνα αναγιγνώσκεται αυτόματα με τη βοήθεια δέσμης λέιζερ και τελικά η αλληλουχία των βάσεων καταγράφεται ως σύνολο έγχρωμων ηλεκτροφορητικών ταινιών, κάθε μια από τις οποίες υποδηλώνει την παρουσία μιας βάσης στην αλυσίδα (Εικόνα 17). Στην συνέχεια ακολουθεί επεξεργασία και ανάλυση των δεδομένων με ειδικό λογισμικό πρόγραμμα (SeqScape® software v5.1, Applied Biosystems). Με την χρήση του

προγράμματος αυτού τα δεδομένα (αλληλουχίες) συγκρίνονται με αλληλουχίες αναφοράς και επιτυγχάνεται η ανίχνευση των μεταλλάξεων. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν από την GenBank οι αλληλουχίες αναφοράς με αριθμό NM_005228.3 και NM_004985.3, για τα γονίδια *EGFR* και *KRAS*, αντίστοιχα.



Εικόνα 17. Ηλεκτροχρωματογράφημα μιας αντίδρασης αλληλούχισης. Καθώς τα θραύσματα DNA της αντίδρασης διαχωρίζονται μέσω της ηλεκτροφόρησης, ένα λέιζερ διαβάζει τον φθορισμό κάθε θραύσματος (μπλε, πράσινο, κόκκινο ή κίτρινο) και συγκεντρώνει τα δεδομένα σε μια εικόνα. Κάθε χρώμα ή η ένταση φθορισμού, αντιπροσωπεύει ένα διαφορετικό νουκλεοτίδιο (π.χ. μπλε για την αδενίνη C) και αποκαλύπτει την θέση του νουκλεοτιδίου στην αλληλουχία.

Η ευαισθησία της μεθοδολογίας που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση μεταλλάξεων, αξιολογήθηκε από τον προσδιορισμό της ελάχιστης συχνότητας μεταλλάξεων *EGFR* και *KRAS* που απαιτείται για την ανίχνευση τους από το σύστημα που ακολουθήθηκε στην παρούσα μελέτη. Αυτό επιτεύχθηκε με πειράματα ανάμειξης κυτταρικών σειρών με και χωρίς *EGFR* (H2073-WT-*EGFR* και HCC827-Del19-*EGFR*) ή *KRAS* (H2073-WT-*KRAS* και A549-G12D-*KRAS*) μεταλλάξεις. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι οι μεταλλάξεις Del19 και G12D στα γονίδια *EGFR* και *KRAS*, αντίστοιχα, είναι δυνατόν να ανιχνευτούν όταν υπάρχουν στο 10% και 20% των κυττάρων του δείγματος, αντίστοιχα.

Στην παρούσα μελέτη, η ανίχνευση κάποιας μετάλλαξης σε ένα δείγμα ταυτοποιήθηκε επαναλαμβάνοντας τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω

ξεκινώντας από την αρχή με νέα PCR, για το ίδιο δείγμα DNA. Η ανίχνευση της ίδιας μετάλλαξης και την δεύτερη φορά επιβεβαιώνει το ορθό της πειραματικής διαδικασίας.

B.7 Προσδιορισμός της γονιδιακής ενίσχυσης του *EGFR* με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου

Η PCR σε πραγματικό χρόνο, η οποία συχνά αναφέρεται και ως quantitative Real Time PCR (qPCR), αποτελεί σημαντικό εργαλείο στην έρευνα σήμερα, καθώς συνδυάζει τον πολλαπλασιασμό τμημάτων νουκλεϊκών οξέων, με τη σύγχρονη παρακολούθηση της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο, την ανίχνευση των παραγόμενων προϊόντων και την ποσοτικοποίηση τους κατά απόλυτες και σχετικές τιμές.

Στη PCR πραγματικού χρόνου η ανίχνευση και η παρακολούθηση των προϊόντων εν τη γενέσει τους επιτυγχάνεται με τη χρήση σεσημασμένων μορίων εκκινητών (ειδική σήμανση) ή φθοριζόντων μορίων που δεσμεύονται στην επιθυμητή αλληλουχία (μη ειδική σήμανση). Τα μόρια-σημαντές παράγουν φθορίζον σήμα, η ποσότητα του οποίου είναι ανάλογη με την ποσότητα του προϊόντος που ενισχύεται στην αντίδραση.

Στην παρούσα μελέτη, για την σήμανση και την ανίχνευση των προϊόντων στην PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί σεσημασμένοι ιχνηθέτες (TaqMan probes). Οι ιχνηθέτες TaqMan είναι ολιγονουκλεοτίδια σεσημασμένα με φθορίζον μόριο (χρωστική αναφοράς, reporter dye, στην παρούσα μελέτη FAM/VIC) στο 5' άκρο και ένα μόριο-σιγαστή (quencher) στο 3' άκρο. Τα ελεύθερα μόρια του ιχνηθέτη δεν φθορίζουν, γιατί φέρουν το quencher. Κατά τη διάρκεια της φάσης επιμήκυνσης, ο ιχνηθέτης που είναι συμπληρωματικός στην επιθυμητή αλληλουχία, δεσμεύεται στο μονόκλωνο μόριο. Όταν η Taq DNA πολυμεράση φτάσει τον ιχνηθέτη, αποκλίνει από την πορεία της και κόβει ενδονουκλεϊκά τον ιχνηθέτη. Έτσι ο quencher ελευθερώνεται και το φθοριόχρωμα φθορίζει. Στην περίπτωση αυτή, η υδρόλυση του ιχνηθέτη από την Taq DNA πολυμεράση είναι απαραίτητη για τη δημιουργία σήματος.

Μετά το τέλος της αντίδρασης υπολογίζεται ο λόγος σήματος/θορύβου, που ουσιαστικά αντιστοιχεί σε λόγο κομμένων/μη κομμένων ιχνηθετών. Το σημείο της καμπύλης στην οποία το ποσό του σήματος φθορισμού είναι σαφώς επάνω από το θόρυβο (Threshold), καλείται Threshold cycle ή Ct (κύκλου). Όσο μικρότερη είναι η τιμή του Ct, τόσο μεγαλύτερο εκπεμπόμενο σήμα ανιχνεύεται που σημαίνει ότι περισσότερα μόρια του ιχνηθέτη έχουν υδρολυθεί.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως με την μέθοδο της Real Time PCR υπάρχει η δυνατότητα όχι μόνο της παρακολούθησης της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο, αλλά και του προσδιορισμού της ποσότητας των παραγόμενων προϊόντων με απόλυτο ή σχετικό υπολογισμό. Η απόλυτη ποσοτικοποίηση προσδιορίζει τον αριθμό αντιγράφων του αρχικού δείγματος με χρήση καμπύλης ποσοτικοποίησης, ενώ η σχετική ποσοτικοποίηση προσδιορίζει τις αλλαγές των επιπέδων του mRNA ενός γονιδίου σε σχέση με το επίπεδο έκφρασης ενός εσωτερικού γονιδίου αναφοράς.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η σχετική ποσοτικοποίηση για τον υπολογισμό της μεταβολής του αριθμού των αντιγράφων του *EGFR* γονιδίου (ή αλλιώς γονιδιακή ενίσχυση, gene amplification) σε σχέση με κάποιο δείγμα-μάρτυρα. Ως δείγμα-μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε DNA που απομονώθηκε από PBMCs υγιών αιμοδοτών. Ταυτόχρονα ενισχύθηκε αλληλουχία αναφοράς, δηλαδή αλληλουχία από κάποιο γονίδιο του οποίου ο αριθμός των αντιγράφων του είναι φυσιολογικός – σταθερός σε όλα τα κύτταρα, με σκοπό την εξομάλυνση των διαφορών στην αρχική ποσότητα DNA μεταξύ των δειγμάτων. Η αλληλουχία αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε ήταν του γονιδίου *TOP3A* (topoisomerase (DNA) III alpha).

Σχετικά με το γονίδιο αναφοράς *TOP3A*, το οποίο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17 (θέση 17p12-p11.2), κωδικοποιεί για μια DNA τοποϊσομεράση, ένα ένζυμο που ελέγχει και τροποποιεί την χωροδιάταξη (τοπολογία) του DNA κατά τη μεταγραφή. Αυτό το ένζυμο καταλύει την παροδική διάσπαση και την επανασύνδεση ενός μονού κλώνου του DNA που επιτρέπει οι αλυσίδες να περάσουν η μία μέσα από την άλλη, μειώνοντας έτσι τον αριθμό των υπερπεριελίξεων και μεταβάλλοντας την τοπολογία του DNA. Αυτό το ένζυμο σχηματίζει σύμπλοκο με ένα άλλο μόριο (BLM) και συμμετέχει στην ρύθμιση του ανασυνδυασμού στα σωματικά κύτταρα.

Όλα τα πειράματα, για τον προσδιορισμό του αριθμού των αντιγράφων του *EGFR* γονιδίου, πραγματοποιήθηκαν σε μηχανήμα ABI 7900HT Fast Real-Time PCR

System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) και για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα SDS έκδοσης 2.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Συγκεκριμένα, όσον αφορά την αντίδραση της Real Time PCR προστέθηκαν 2.5μl γενωμικού DNA (20ng) από τα δείγματα των όγκων των ασθενών με ΜΜΚΠ, κυτταρικές σειρές και υγιείς αιμοδοτές. Κάθε αντίδραση PCR περιείχε 1X Platinum® qPCR SuperMix-UDG mix (Invitrogen), 900nM από κάθε εκκινητή και 150mM από τον ιχνηθέτη σε τελικό όγκο 12.5 μl. Το μίγμα αρχικά επώαστηκε στους 95°C για 15 λεπτά και ακολούθησαν 40 κύκλοι ενίσχυσης, οι οποίοι περιλάμβαναν αποδιάταξη στους 95°C για 15 δευτερόλεπτα και υβριδισμό / επιμήκυνση στους 60°C για 60 δευτερόλεπτα. Οι αλληλουχίες των εκκινητών καθώς και των ιχνηθετών των γονιδίων *EGFR* και *TOP3A* παρουσιάζονται στον Πίνακα 15. Όλες οι αντιδράσεις για κάθε δείγμα και για κάθε γονίδιο έγιναν σε τριπλέτες.

Ο υπολογισμός της γονιδιακή ενίσχυσης του *EGFR* σε σχέση με το γονίδιο αναφοράς έγινε χρησιμοποιώντας τον τύπο $2^{-\Delta\Delta Ct}$, όπου $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{δείγματος}} (Ct[EGFR]_{\text{δείγματος}} - Ct[TOP3A]_{\text{δείγματος}}) - \Delta Ct_{\text{μάρτυρα}} (Ct[EGFR]_{\text{μάρτυρα}} - Ct[TOP3A]_{\text{μάρτυρα}})$. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε DNA που απομονώθηκε από μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος υγιών αιμοδοτών.

Προκειμένου να εφαρμοστεί η παραπάνω μέθοδος ποσοτικοποίησης, οι εκκινητές για την αλληλουχία-στόχο (*EGFR*) και για την αλληλουχία-αναφοράς (*TOP3A*) πρέπει να έχουν ίση αποδοτικότητα. Αυτό πιστοποιήθηκε με τον έλεγχο της γραφικής παράστασης (πρότυπη καμπύλη) των ΔCt μεταξύ των γονιδίων αναφοράς και στόχου σε τέσσερις διαδοχικές αραιώσεις (125, 12.5, 1.25, 0.125 ng) DNA από PBMCs υγιών αιμοδοτών.

Η οριακή τιμή (cutoff value) που χρησιμοποιήθηκε για να ορίσουμε αν σε ένα δείγμα υπάρχει γονιδιακή ενίσχυση του *EGFR* καθορίστηκε αναλύοντας με αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου 14 φυσιολογικά FFPE δείγματα πνεύμονα. Έτσι το όριο για την γονιδιακή ενίσχυση του *EGFR* σε ένα δείγμα όγκου ορίστηκε ως η μέση τιμή των φυσιολογικών δειγμάτων προσθέτοντας 2 τυπικές αποκλίσεις.

Για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας της μεθόδου πραγματοποιήθηκε ανάμειξη αραιώσεων της κυτταρικής σειράς HCC827, η οποία έχει αυξημένο αριθμό

αντιγράφων του EGFR γονιδίου, με την κυτταρική σειρά H2073 (ή DNA από PBMCs υγιών αιμοδοτών) που δεν εμφανίζει EGFR γονιδιακή ενίσχυση. Έτσι μετά από πειράματα καταλήξαμε ότι η μέθοδος που αναπτύχθηκε μπορεί να ανιχνεύσει αυξημένο αριθμό αντιγράφων του EGFR γονιδίου σε γενωμικό DNA μετά από ανάμειξη 10% HCC827 κυττάρων με 90% H2073 κυττάρων.

Πίνακας 15. Αλληλουχίες εκκινητών και ιχνηθετών των γονιδίων *EGFR* και *TOP3A*.

EGFR γονίδιο	Πρόσθιος εκκινητής (F)	5'-TTCAGGGCATGAACTACTTGGA-3'
	Ανάστροφος εκκινητής (R)	5'-ACATGCTGCGGTGTTTTAC-3'
	TaqMan ιχνηθέτης (probe)	FAM-ACCGTCGCTTGGTGC-NFQ*
TOP3A γονίδιο	Πρόσθιος εκκινητής (F)	5'-CCACTGCGAACTTAAGAAAACCTTG-3'
	Ανάστροφος εκκινητής (R)	5'-TTCTCTATCACAGTCAGTCCAGATCA-3'
	TaqMan ιχνηθέτης (probe)	VIC-AACGAGAGACTCGCCAGT-NFQ*

*: Οι ιχνηθέτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη δεν έφεραν στο 3' άκρο τους χρωστική απόσβεσης του φθορισμού (Nonfluorescent Quencher-NFQ).

B.8 Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS έκδοση 14 (και έκδοση 20) (SPSS, Inc., Chicago, IL). Η συσχέτιση των μεταλλάξεων με τα κλινικο-παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών έγινε με βάση τη δοκιμασία Fisher (Fisher exact test) ή το χ^2 τεστ. Οι χρόνοι επιβίωσης υπολογίστηκαν με βάση τη μέθοδο Kaplan-Meier. Η μονοπαραγοντική σύγκριση των χρόνων με τα επίπεδα των μοριακών χαρακτηριστικών έγινε με τη δοκιμασία Log-rank. Σε όλους τους ελέγχους που πραγματοποιήθηκαν ως επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε το 5% (0.05).

Η πολυπαραγοντική ανάλυση της προβλεπτικής αξίας των κλινικών και των μοριακών χαρακτηριστικών έγινε με βάση το μοντέλο παλινδρόμησης κατά Cox (Cox proportional hazards model).

Ο συνολικός χρόνος επιβίωσης (OS) υπολογίστηκε σε μήνες ξεκινώντας από την ημερομηνία διάγνωσης των ασθενών ως την ημερομηνία θανάτου ή ως την ημερομηνία τελευταίας επαφής στην περίπτωση που δεν είχε πεθάνει ο ασθενής. Το ελεύθερο νόσου διάστημα (DFS) υπολογίστηκε από την ημερομηνία διάγνωσης ως την ημερομηνία τοπικής υποτροπής ή απομακρυσμένης μετάστασης, ή θανάτου χωρίς υποτροπή, ή ως την ημερομηνία τελευταίας επαφής στην περίπτωση που δεν είχε υποτροπιάσει ο ασθενής.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1 Ανίχνευση *EGFR* και *KRAS* μεταλλάξεων σε Έλληνες ασθενείς με ΜΜΚΠ

1.1 Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Η παρούσα μελέτη περιλαμβάνει συνολικά 639 Έλληνες ασθενείς με ΜΜΚΠ, τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των οποίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 16. Η μέση ηλικία του υπό μελέτη πληθυσμού είναι τα 62 έτη, η πλειοψηφία είναι άνδρες (72.5%), καπνιστές (53.1%) και ο κυρίαρχος ιστολογικός τύπος είναι το αδενοκαρκίνωμα (65.4%). Οι μισοί περίπου ασθενείς διέθεταν χειρουργικά δείγματα τα οποία ελέγχθηκαν ως προς τα μοριακά χαρακτηριστικά. Για τους υπόλοιπους ασθενείς υπήρχε διαθέσιμο υλικό είτε από βρογχικές βιοψίες, είτε από κυτταρολογικές, είτε από βιοψίες λεμφαδένων ή και απομακρυσμένων μεταστάσεων. Η πλειονότητα του υλικού που αναλύθηκε αφορούσε υλικό από τον πρωτοπαθή όγκο των ασθενών.

Να σημειωθεί ότι η προβλεπτική αξία των υπό μελέτη μοριακών χαρακτηριστικών, όπως περιγράφεται σε επόμενες ενότητες, μελετήθηκε σε υποομάδα του αρχικού πληθυσμού για δυο κυρίως λόγους. Καθοριστικοί παράγοντες αποτέλεσαν, πρώτον, η διαθεσιμότητα κατάλληλου υλικού και κατά δεύτερο λόγο συγκεκριμένοι κλινικοί παράμετροι των ασθενών.

Πίνακας 16. Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά όλων των ασθενών με ΜΜΚΠ που συμμετείχαν στην μελέτη.

Χαρακτηριστικά	Σύνολο ασθενών	
	Πλήθος	Ποσοστό (%)
Μέση ηλικία (χρόνια)	62	
Εύρος	33 - 89	
Φύλο		
Άρρεν	463	72.5
Θήλυ	176	27.5
Ιστολογικός τύπος		
Αδενοκαρκίνωμα	388	65.4
Πλακώδες	103	17.4
Βρογχοκυψελιδικό	31	5.2
Μεικτού τύπου	26	4.4
Μεγαλοκυτταρικό	31	5.2
Αδιαφοροποίητο	14	2.4
Άγνωστο	46	--
Καπνιστική συνήθεια		
Καπνιστές	211	53.1
Πρώην καπνιστές	72	18.1
Μη καπνιστές	114	28.7
Άγνωστο	242	---
Είδος δείγματος		
Χειρουργικό	277	43.3
Βιοψιακό	329	51.5
Κυτταρολογικό	33	5.2
Προέλευση δείγματος		
Πρωτοπαθή όγκο	532	83.3
Μετάσταση	107	16.7
Γεωγραφική προέλευση		
Κρήτη	306	47.9
Αθήνα	276	43.2
Θεσσαλονίκη	38	5.9
Ιωάννινα	13	2.0
Πάτρα	6	0.9

1.2 Ποσοστά ανίχνευσης μεταλλάξεων στο γονίδιο *EGFR*

Συνολικά ανιχνεύθηκαν 109 μεταλλάξεις, ως μονές ή διπλές, όπου περιλαμβάνονται 52 διαφορετικές μεταλλάξεις και κατανέμονται στα τέσσερα εξώνια 18 - 21. Συγκεκριμένα μια μόνο μετάλλαξη βρέθηκε σε 100 όγκους, ενώ δυο μαζί σε 9 όγκους (Πίνακας 18 και Πίνακας 19). Οι περισσότερες μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν στο εξώνιο 19 (44.5%) και στο εξώνιο 21 (28.2%) και ακολουθούν τα εξώνια 18 (19.1%) και 20 (8.2%). Στον Πίνακα 17 παρουσιάζεται το πρότυπο των μεταλλάξεων ανά εξώνιο. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας δεν ήταν εφικτός για όλα τα δείγματα σε όλα τα εξώνια.

Όλες οι μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν είχαν ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση αμινοξέος, με εξαίρεση μια μετάλλαξη (c.2434C>T) που ανιχνεύθηκε στο εξώνιο 21 που έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό κωδικονίου λήξης. Πιο συγκεκριμένα, σε όλα εξώνια που αναλύθηκαν βρέθηκε ότι το 65% (71/109) των μεταλλάξεων ήταν σημειακές (αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου) και οδηγούν σε αντικατάσταση ενός αμινοξέος. Ενώ απαλοιφές νουκλεοτιδίων εντός πλαισίου ανάγνωσης ανιχνεύθηκαν μόνο στο εξώνιο 19 σε ποσοστό 34.8% (38/109). Η πιο συχνή απαλοιφή νουκλεοτιδίων είναι η έλλειψη delE746_A750 (25/38, 65.7%). Ο αριθμός των νουκλεοτιδίων που απαλειφόταν κυμάνθηκε μεταξύ 12 και 18, ενώ σε επίπεδο πρωτεΐνης ο αριθμός αυτός αντιστοιχεί σε πέντε με έξι αμινοξέα.

Μια άλλη ομάδα *EGFR* μεταλλάξεων είναι οι διπλές, που σημαίνει ταυτόχρονη ανίχνευση δυο μεταλλάξεων ανά δείγμα, είτε στο ίδιο είτε σε διαφορετικό εξώνιο. Έτσι σε 9 δείγματα όγκων βρέθηκαν διπλές μεταλλάξεις και μάλιστα σε τρία από αυτά, η μια από τις δυο μεταλλάξεις ήταν η γνωστή L858R (Πίνακας 19).

Πίνακας 17. Ποσοστά ανίχνευσης μεταλλάξεων στα γονίδια *EGFR* και *KRAS* (ανά εξώνιο).

		Αγρίου τύπου (wt)	Μεταλλάξεις	
		Πλήθος (ποσοστό)	Πλήθος (ποσοστό)	Σύνολο[‡]
Εξώνια <i>EGFR</i>	18	562 (96.4)	21 (3.6)	583
	19	581 (92.2)	49 (7.8)	630
	20	330 (97.3)	9 (2.7)	339
	21	589 (95.0)	31 (5.0)	620
Εξώνιο <i>KRAS</i>	2	316 (79.2)	83 (20.8)	399

[‡] Ο αριθμός των δειγμάτων για την ανίχνευση των μεταλλάξεων στα εξώνια των γονιδίων *EGFR* και *KRAS* διαφέρει λόγω είτε ανεπάρκειας του υλικού είτε κακής ποιότητας του DNA.

Η συχνότητα εμφάνισης των *EGFR* μεταλλάξεων στον υπό μελέτη πληθυσμό είναι 15.8% (100/634). Με κριτήριο το είδος των μεταλλάξεων οι ασθενείς με μεταλλάξεις κατηγοριοποιήθηκαν σε δύο ομάδες: σε αυτούς που έφεραν τις «κλασσικές» (hotspots) ενεργοποιητικές μεταλλάξεις (απαλοιφές νουκλεοτιδίων στο εξώνιο 19, L858R, G719D και E746V) και σε εκείνους που είχαν «άλλες» μεταλλάξεις. Το ποσοστό ανίχνευσης των «κλασσικών» ενεργοποιητικών μεταλλάξεων ήταν 8.4% (53/634), ενώ οι «άλλες» ανιχνεύθηκαν σε ποσοστό 7.4% (47/634). Με τον όρο «άλλες» μεταλλάξεις εννοούμε αυτές που έχουν αναφερθεί στο παρελθόν ή είναι νέες. Για τον λόγο ότι δεν είναι σαφής η επίδραση αυτών των μεταλλάξεων στην *EGFR* πρωτεΐνη, αποφασίσαμε να τις ξεχωρίσουμε από τις υπόλοιπες μεταλλάξεις στις αναλύσεις που έγιναν και αναφέρονται παρακάτω.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι οι «άλλες» (μη κλασσικές) μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα δεν αποτελούν πολυμορφισμούς μονών νουκλεοτιδίων, πραγματοποιήθηκε ανάλυση μεταλλάξεων του αντίστοιχου φυσιολογικού ιστού ή αίματος των ασθενών όπου αυτό βέβαια ήταν εφικτό. Σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις οι μεταλλάξεις δεν ανιχνεύθηκαν σε φυσιολογικούς ιστούς, αποδεικνύοντας την σωματική τους προέλευση. Εξάιρεση αποτελεί η ανίχνευση της μετάλλαξης p.V843I (c.2527G>A) στο εξώνιο 21 του *EGFR* τόσο στο αίμα όσο και στον φυσιολογικό ιστό τους ασθενούς, αποδεικνύοντας ότι πρόκειται για μετάλλαξη γαμετικής προελεύσεως.

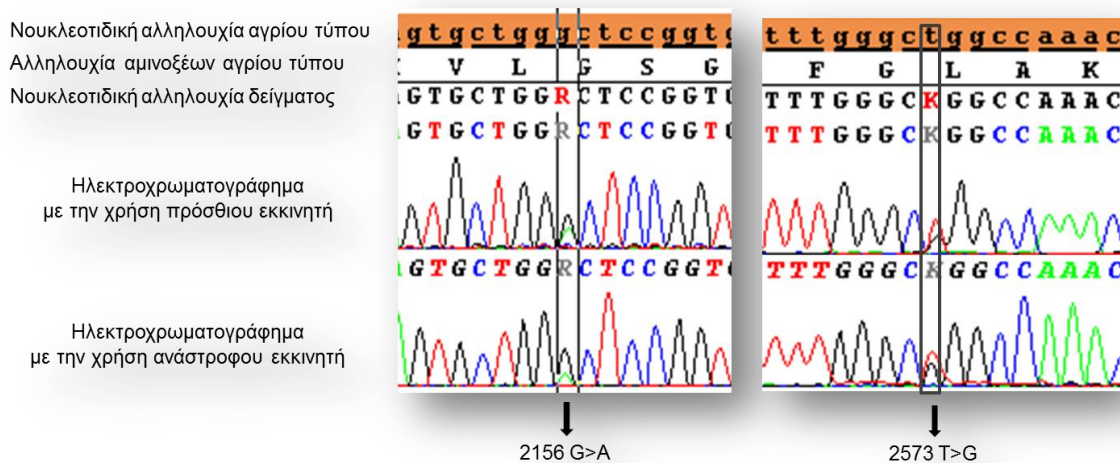
Πίνακας 18. Είδη *EGFR* μεταλλάξεων και κατανομή τους ανά εξώνιο.

<i>EGFR</i>	Αντικατάσταση νουκλεοτιδίου	Αντικατάσταση αμινοξέος	Συχνότητα εμφάνισης	Παρατηρήσεις
Εξώνιο 18 21/109 (19.1%)	2071C>T	P691S	1	Έχει αναφερθεί (Pallis et al. 2007)
	2075T>C	L692P	4	--
	2092G>A	A698T	1	Έχει αναφερθεί (Penzel et al. 2011)
	2104G>A	A702T	1	Έχει αναφερθεί η A702S (Xu et al. 2009)
	2107C>T/ 2108T>C	L703F/P	2	Έχει αναφερθεί (Pallis et al. 2007, Xu et al. 2009)
	2125G>A	E709K	1	Έχει αναφερθεί (Han et al. 2005)
	2129C>A	T710N	1	Έχει αναφερθεί η T710A (Metzger et al. 2011)
	2131G>A	E711K	1	Έχει αναφερθεί (Pallis et al. 2007)
	2156G>A	G719D	1	Κλασσική μετάλλαξη
	2171 G>C /2170 G>A	G724D/S	4	Έχει αναφερθεί (Chung et al. 2009)
	2176G>A	V726M	1	Έχει αναφερθεί (Pallis et al. 2007)
	2179T>C	Y727H	3	Έχει αναφερθεί (Stabile et al. 2005)
	Εξώνιο 19 49/109 (44.5%)	2185G>A	G729R	1
2197C>T		P733S	1	Έχει αναφερθεί (Santis et al. 2011)
2203G>A		G735S	1	Έχει αναφερθεί (Tsao et al. 2005)
2221C>T		P741S	1	Έχει αναφερθεί η P741L (Wheler et al. 2013)
2228C>T		A743V	2	Έχει αναφερθεί η A743T (Taga et al. 2012)
2237A>T		E746V	1	Έχει αναφερθεί (Pallis et al. 2007)
2237_2250del		delE746_A750	25	Κλασσική μετάλλαξη
2237_2251del		delE746_T751insA	1	Κλασσική μετάλλαξη
2236_2255del+TC		delE746_S752insV	1	Κλασσική μετάλλαξη
2237_2257del+TCT		delE746_P753insVS	2	Κλασσική μετάλλαξη
2239_2249del+C		delL747_A750insP	4	Κλασσική μετάλλαξη
2239_2253del		delL747_T751	3	Κλασσική μετάλλαξη
2239_2257del		delL747_P753insS	2	Κλασσική μετάλλαξη

	2240T>C	L747S	1	Έχει αναφερθεί (Jia and Chen 2011)
	2247A>C	E749D	1	Έχει αναφερθεί η E749G (Penzel et al. 2011)
	2251A>G	T751A	1	Έχει αναφερθεί η T751I (Tsao et al. 2005)
	2263G>A ομόζυγη	A755T	1	Έχει αναφερθεί η A755D (Smith et al. 2008)
Εξώνιο 20 9/109 (8.2%)	2285 A>T	E762V	1	--
	2315C>T	P772L	1	Έχει αναφερθεί η P772H (Sun et al. 2012)
	2369C>T	T790M	1	Κλασσική μετάλλαξη που προσδίδει αντοχή
	2341T>G	C781P	1	--
	2377A>G	M793V	1	--
	2390T>A	C797R	1	Έχει αναφερθεί η C797Y (Foster et al. 2010)
	2392T>C	L798P	1	Έχει αναφερθεί η L798F (Tsao et al. 2005)
	2404G>A	V802I	1	Έχει αναφερθεί (Pennycuick et al. 2012)
	2417A>G	K806R	1	Έχει αναφερθεί η K806E (Hsieh et al. 2006)
2434C>T	Q812 STOP	1	Έχει αναφερθεί η Q812R (Koyama et al. 2006)	
Εξώνιο 21 31/109 (28.4%)	2513T>C	L838P	1	Έχει αναφερθεί (Hsieh et al. 2006)
	2509G>A	D837N	1	Έχει αναφερθεί η D837G (Penzel et al. 2011)
	2516C>A	A839E	1	Έχει αναφερθεί η A839V (Huang et al. 2004)
	2527G>A	V843I	2	Έχει αναφερθεί (Shih et al. 2006)
	2539A>G	T847A	2	Έχει αναφερθεί η T847I (Tsao et al. 2005)
	2566T>C	F856S	1	Έχει αναφερθεί (Okami et al. 2007)
	2570G>A	G857E	1	Έχει αναφερθεί (Pallis et al. 2007)
	2573T>G	L858R	12	Κλασσική μετάλλαξη
	2575G>A	A859R	1	Έχει αναφερθεί η A859T (Han et al. 2005)
	2578A>G	K860G	1	Έχει αναφερθεί η K860I (Chen et al. 2008)
	2582T>C	L861P/Q	2	Έχει αναφερθεί (Lynch et al. 2004)
	2587G>A	G863S	3	Έχει αναφερθεί (Chang et al. 2011)
	2611G>A	A871T	1	Έχει αναφερθεί η A871G (Shih et al. 2006)
Σύνολο			110 (100)	

Πίνακας 19. Διπλές σημειακές *EGFR* μεταλλάξεις.

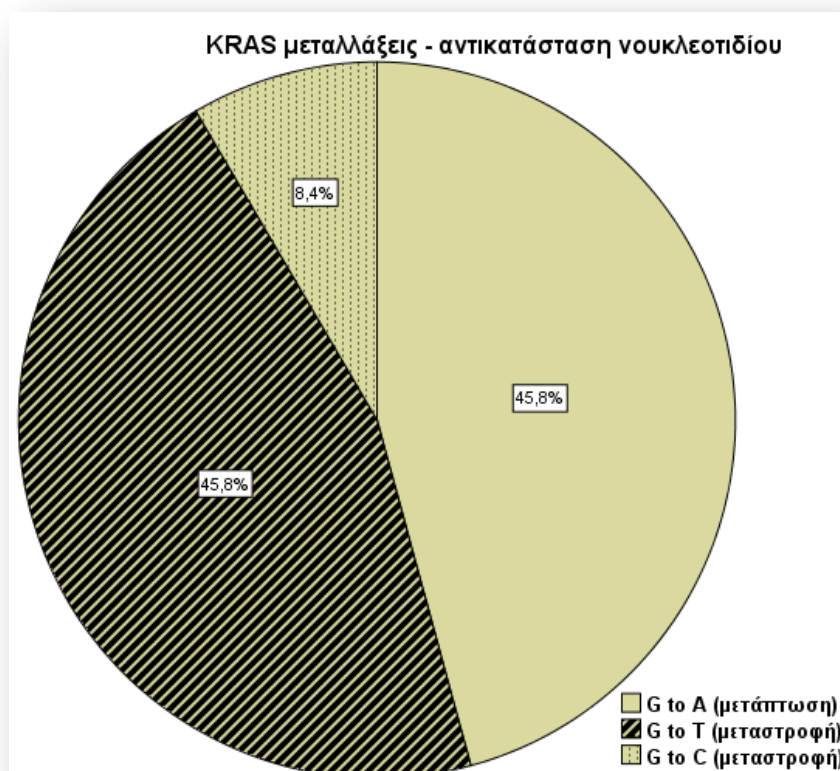
1 ^η μετάλλαξη		2 ^η μετάλλαξη	
Εξώνιο	Αντικατάσταση αμινοξέος	Εξώνιο	Αντικατάσταση αμινοξέος
18	E709K	21	L858R
20	C797R	21	A871T
18	G724D	19	A743V
18	L692P	21	F856S
18	L703F	21	G863S
21	L861P	21	L858R
21	Q812stop	21	V843I
21	T847A	21	G863S
21	V843I	21	L858R



Εικόνα 18. Ανάλυση μεταλλάξεων στα εξώνια 18 και 21 του γονιδίου *EGFR*. Το ηλεκτροχρωματογράφημα του δείγματος «98992» στο εξώνιο 18 (αριστερή φωτογραφία) δείχνει την αντικατάσταση της γουανίνης από μια αδενίνη (c.2156 G>A) με αποτέλεσμα την αντικατάσταση του αμινοξέος γλυκίνης από το γλουταμινικό οξύ στο κωδικόνιο 719 (p.G719D). Αντίστοιχα στην δεξιά φωτογραφία, το ηλεκτροχρωματογράφημα του δείγματος «76355» στο εξώνιο 21 δείχνει την αντικατάσταση της θυμίνης από μια γουανίνη (c.2573 T>G) με αποτέλεσμα την αντικατάσταση του αμινοξέος λευκίνης από την αργινίνη στο κωδικόνιο 858 (p.L858R).

1.3 Ποσοστά ανίχνευσης μεταλλάξεων στο KRAS γονίδιο

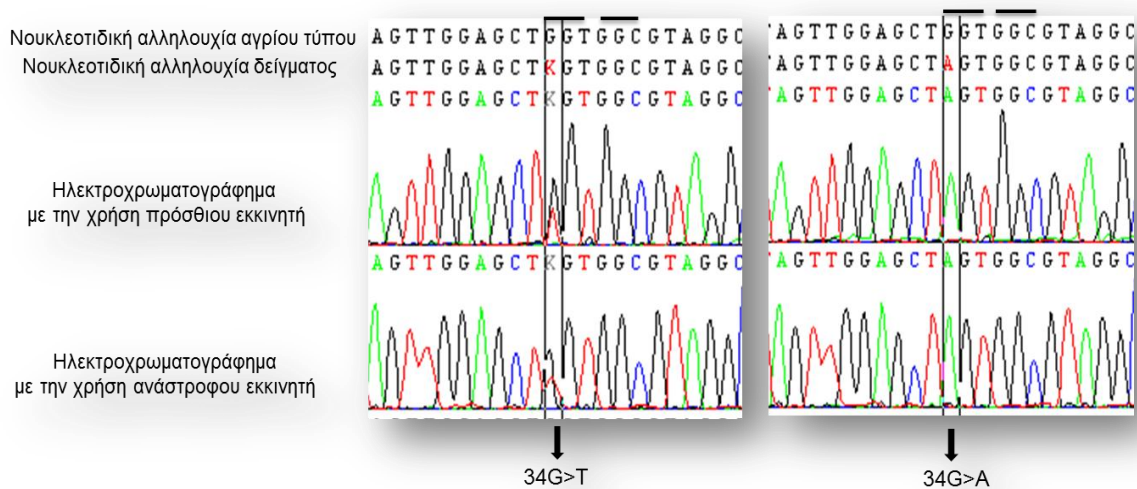
Η ανίχνευση των μεταλλάξεων στο KRAS γονίδιο πραγματοποιήθηκε επιτυχώς σε 399 δείγματα από τα οποία τα 83 (20.8%) έφεραν μεταλλάξεις στο εξώνιο 2 του γονιδίου (Πίνακας 17). Συγκεκριμένα, οι 77 μεταλλάξεις βρέθηκαν στο κωδικόνιο 12 (92.8%) και οι υπόλοιπες έξι (7.2%) στο κωδικόνιο 13. Όλες οι μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν στο εξώνιο 2 του KRAS γονιδίου ήταν απλές αντικαταστάσεις ενός νουκλεοτιδίου και το αποτέλεσμα ήταν αντικατάσταση ενός αμινοξέος σε επίπεδο πρωτεΐνης. Σε επίπεδο DNA και αντικατάστασης νουκλεοτιδίου, εντοπίστηκαν 38 (45.7%) μεταπτώσεις, αντικατάσταση της γουανίνης από την αδενίνη (G>A) και 45 (54.3%) μεταστροφές, αντικατάσταση της γουανίνης από την θυμίνη (G>T, 45.8%) ή την κυτοσίνη (G>C, 8.4%) (Διάγραμμα 1). Σε επίπεδο πρωτεΐνης εντοπίστηκαν αντικαταστάσεις της γλυκίνης στις θέσεις 12 και 13 από πέντε διαφορετικά αμινοξέα: το γλουταμινικό οξύ (12D ή 13D, 33.7%), τη βαλίνη (12V, 24.1%), την κυστεΐνη (12C ή 13C, 21.7%), την σερίνη (12S, 12%) και την αλανίνη (12A, 8.4%) (Πίνακας 20).



Διάγραμμα 1. Συχνότητα αντικατάστασης του νουκλεοτιδίου γουανίνης από την αδενίνη, θυμίνη και κυτοσίνη στα κωδικόνια 12 και 13 του εξωνίου 2 του KRAS γονιδίου.

Πίνακας 20. Είδη *KRAS* μεταλλάξεων ανά κωδικόνιο.

<i>KRAS</i> γονίδιο	Αντικατάσταση νουκλεοτιδίου	Αντικατάσταση αμινοξέος	Συχνότητα εμφάνισης (%)	Σύνολο (%)
Κωδικόνιο 12	c.35G>A	G12D	26 (31.3)	77 (92.8)
	c.35G>T	G12V	20 (24.1)	
	c.35G>C	G12C	14 (16.9)	
	c.34G>A	G12S	10 (12.0)	
	c.35G>C	G12A	7 (8.4)	
Κωδικόνιο 13	c.37G>A	G13C	4 (4.8)	6 (7.2)
	c.38G>T	G13D	2 (2.4)	
<i>Σύνολο</i>				83 (100)



Εικόνα 19. Ανάλυση μεταλλάξεων στα κωδικόνια 12 και 13 του *KRAS* γονιδίου. Το ηλεκτροχρωματογράφημα του δείγματος «96258» (αριστερή φωτογραφία) δείχνει την αντικατάσταση της γουανίνης από μια θυμίνη (c.34G>T) με αποτέλεσμα την αντικατάσταση του αμινοξέος γλυκίνης από την κυστεΐνη στο κωδικόνιο 12 (p.G12C). Αντίστοιχα στην δεξιά φωτογραφία, το ηλεκτροχρωματογράφημα του δείγματος «98600» δείχνει την αντικατάσταση της γουανίνης από μια αδενίνη (όμοζυγη c.34G>A) με αποτέλεσμα την αντικατάσταση της γλυκίνης από την σερίνη στο κωδικόνιο 12 (p.G12A).

1.4 Μεταλλάξεις των γονιδίων *EGFR* / *KRAS* και κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά

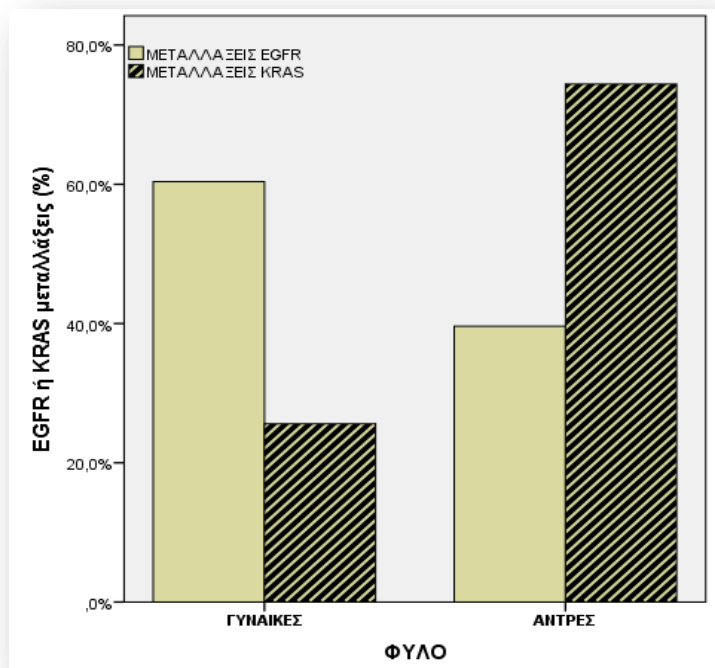
Τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών σύμφωνα την παρουσία των *EGFR* και *KRAS* μεταλλάξεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 21. Οι *EGFR* μεταλλάξεις ανιχνεύτηκαν σε ποσοστό 15.8% των όγκων (100/634) και σχετίζονται στατιστικά σημαντικά με το φύλο ($p=0.005$) και με το ιστορικό καπνίσματος ($p=0.004$), δηλαδή οι *EGFR* μεταλλάξεις εμφανίζονται συχνότερα στις γυναίκες χωρίς ιστορικό καπνίσματος με στατιστικά σημαντική διαφορά. Αυτές οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις παρέμειναν ακόμα και όταν εξετάσαμε χωριστά τις «κλασσικές» ενεργοποιητικές μεταλλάξεις. Οπότε στην ανάλυση αυτή οι «κλασσικές» ενεργοποιητικές μεταλλάξεις εμφανίζονται συχνότερα στις γυναίκες ($p=0.001$), μη καπνίστριες ($p=0.004$) και με ιστολογικό τύπο αδενοκαρκίνωμα ($p=0.015$) (Πίνακας 21), όπως παρουσιάζεται και στα αντίστοιχα διαγράμματα (Διάγραμμα 2, Διάγραμμα 3 και Διάγραμμα 4). Αντιθέτως, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ των μεταλλάξεων και του είδους ($p=0.16$) ή την προέλευση ($p=0.11$) του υλικού.

Όσον αφορά τις μεταλλάξεις στο γονίδιο *KRAS* ανιχνεύτηκαν στο 20.8% των όγκων και εντοπίστηκαν κυρίως στον αντρικό πληθυσμό (74.7%, Διάγραμμα 2), στα αδενοκαρκινώματα (81.6%, Διάγραμμα 3) και στους καπνιστές (65.2%, Διάγραμμα 4) (Πίνακας 21). Από την ανάλυση προέκυψε ότι οι *KRAS* μεταλλάξεις σχετίζονται με το κάπνισμα ($p=0.013$) και με τον ιστολογικό τύπο του αδενοκαρκινώματος ($p=0.008$). Εντούτοις, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ των μεταλλάξεων και του φύλου, του είδους ή της προέλευσης του υλικού (Πίνακας 21).

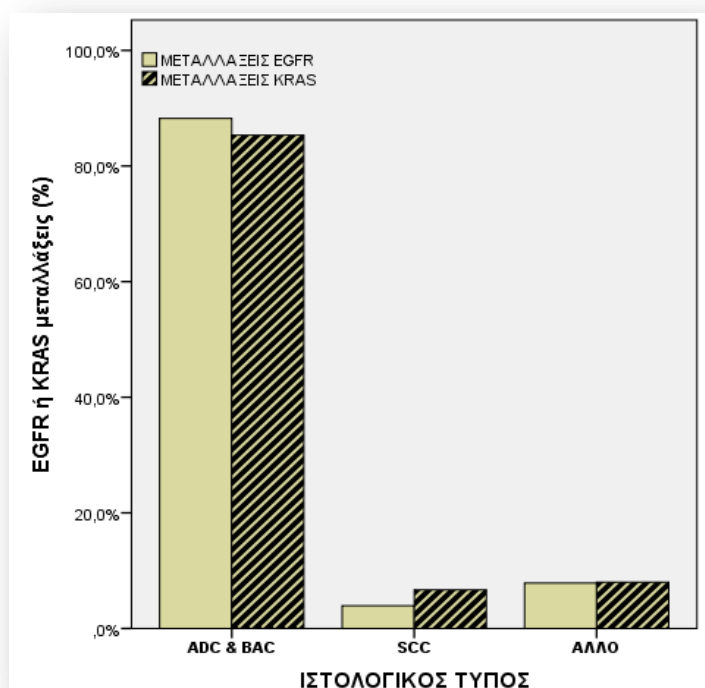
Πίνακας 21. Δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΜΜΚΠ ως προς το πρότυπο μεταλλάξεων των γονιδίων *EGFR* και *KRAS*.

Χαρακτηριστικά	Πρότυπο μεταλλάξεων						
	Γονίδιο <i>EGFR</i>			<i>p</i>	Γονίδιο <i>KRAS</i>		
	«Κλασσικές» μεταλλάξεις	«Άλλες» μεταλλάξεις	Αγρίου τύπου (wt)		Μεταλλάξεις	Αγρίου τύπου (wt)	<i>p</i>
Φύλο							
Άρρεν	21 (39.6)	40 (85.1)	399 (74.7)	0.001	62 (74.7)	228 (72.2)	0.64
Θήλυ	32 (60.4)	7 (14.9)	135 (25.3)		21 (25.3)	88 (27.8)	
Ιστολογικός τύπος							
Αδενοκαρκίνωμα	40 (78.4)	27 (61.4)	319 (64.6)	0.015	62 (81.6)	195 (64.1)	0.008
Πλακώδες	2 (3.9)	9 (20.5)	91 (18.4)		5 (6.6)	50 (16.4)	
Βρογχοκυψελιδικό	5 (9.8)	2 (4.5)	24 (4.9)		3 (3.9)	19 (6.2)	
Μεικτού τύπου	2 (3.9)	3 (6.8)	21 (4.3)		2 (2.6)	13 (4.3)	
Μεγαλοκυτταρικό	1 (2.0)	3 (6.8)	27 (5.5)		2 (2.6)	13 (4.3)	
Αδιαφοροποίητο	1 (2.0)	---	12 (2.4)		1 (1.3)	8 (2.6)	
Καπνιστική συνήθεια							
Καπνιστές	9 (26.5)	24 (61.5)	177 (54.8)	0.004	43 (65.2)	113 (47.7)	0.013
Πρώην καπνιστές	5 (14.7)	4 (10.3)	63 (19.5)		13 (19.7)	46 (19.4)	
Μη καπνιστές	20 (58.8)	11 (28.2)	83 (25.7)		10 (15.2)	78 (32.9)	
Είδος υλικού							
Χειρουργικό	25 (47.2)	23 (48.9)	227 (42.5)	0.16	41 (49.4)	161 (50.9)	0.9
Βιοψία	22 (41.5)	23 (48.9)	281 (52.6)		38 (45.8)	143 (45.3)	
Κυτταρολογικό	6 (11.3)	1 (2.1)	26 (4.9)		4 (4.8)	12 (3.8)	
Προέλευση υλικού							
Πρωτοπαθή όγκο	49 (92.5)	41 (87.2)	438 (82.0)	0.11	66 (79.5)	281 (88.9)	0.024
Μετάσταση	4 (7.5)	6 (12.8)	96 (18.0)		17 (20.5)	35 (11.1)	

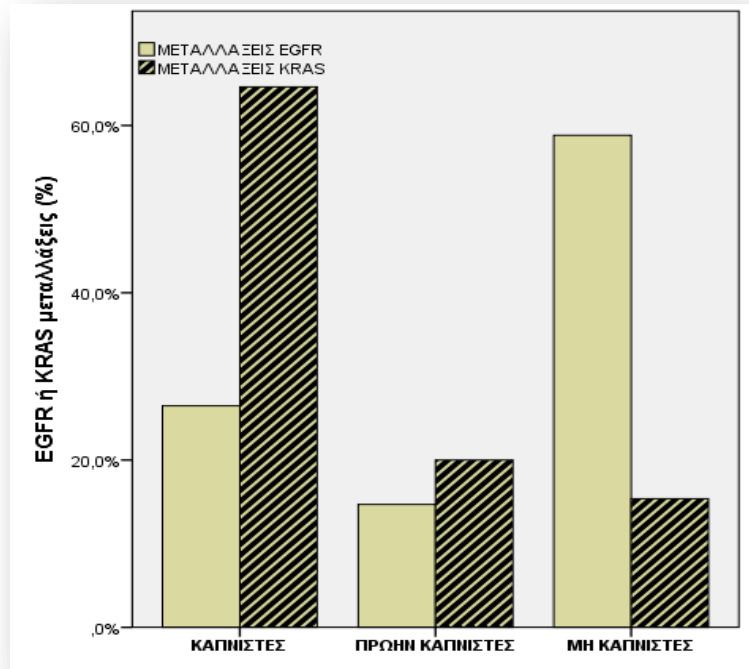
ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Οι τιμές *p* (τεστ χ^2) συγκρίνουν τη συχνότητα των *EGFR* ή *KRAS* μεταλλάξεων μεταξύ ανδρών και γυναικών, μεταξύ αδενοκαρκινώματος/BAC και των άλλων ιστολογικών τύπων, μεταξύ καπνιστών (έχουν συμπεριληφθεί οι πρώην καπνιστές) και μη, μεταξύ χειρουργικού παρασκευάσματος και των υπόλοιπων, αντίστοιχα.



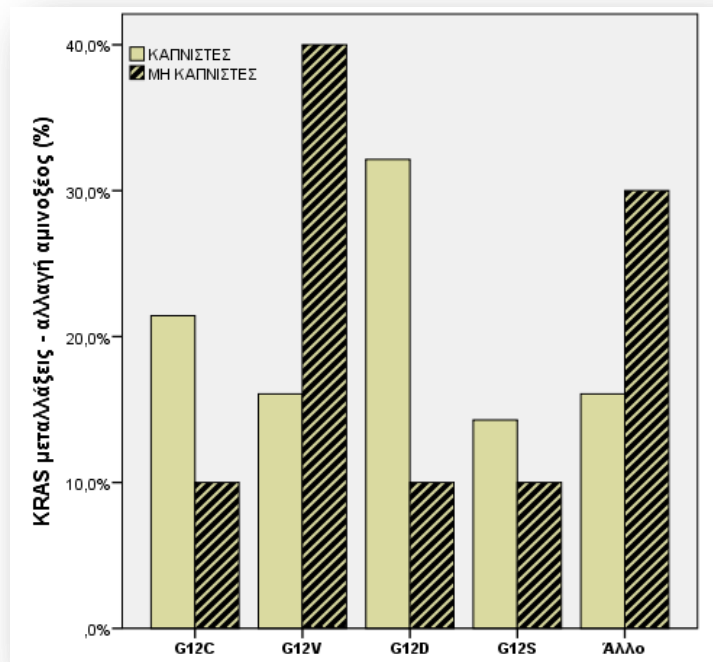
Διάγραμμα 2. Συχνότητα εμφάνισης των μεταλλάξεων στα γονίδια *EGFR* και *KRAS* στις γυναίκες και στους άντρες.



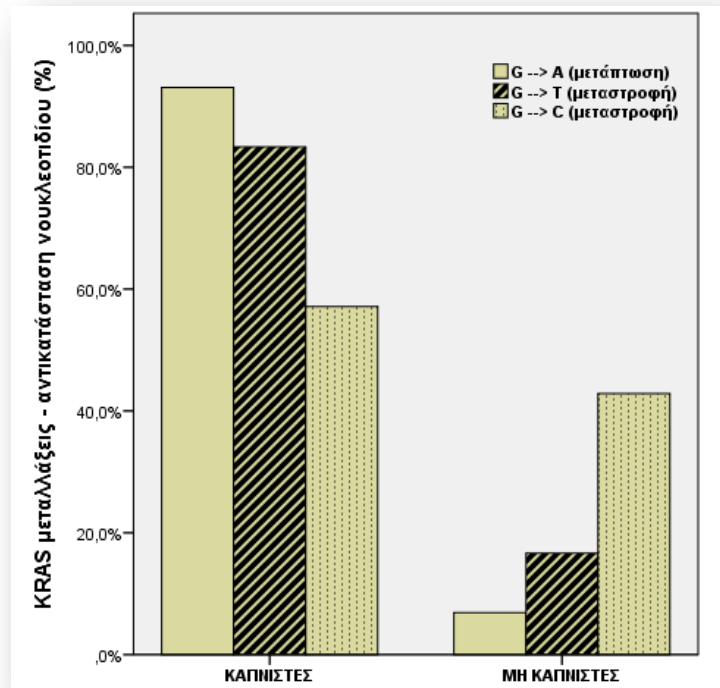
Διάγραμμα 3. Συχνότητα εμφάνισης των μεταλλάξεων στα γονίδια *EGFR* και *KRAS* ως προς τους διάφορους ιστολογικούς τύπους. ADC & BAC: Αδενοκαρκίνωμα & Βρογχοκυψελιδικό, SCC: πλακώδες, ΑΛΛΟ: περιλαμβάνει τους υπόλοιπους ιστολογικούς τύπους, όπως μεγαλοκυτταρικό, μεικτό και αδιαφοροποίητο.



Διάγραμμα 4. Συχνότητα εμφάνισης των μεταλλάξεων στα γονίδια *EGFR* και *KRAS* ως προς την καπνιστική συνήθεια.



Διάγραμμα 5. Ποσοστά ανίχνευσης των διαφορετικών *KRAS* μεταλλάξεων σε καπνιστές και μη (ΑΛΛΟ: συμπεριλαμβάνονται οι υπόλοιπες μεταλλάξεις, G12A, G13D, G13C).



Διάγραμμα 6. Ποσοστά εμφάνισης των διαφορετικών νουκλεοτιδίων στις *KRAS* μεταλλάξεις σε καπνιστές και μη.

2 Διερεύνηση της προβλεπτικής αξίας των *EGFR* και *KRAS* μεταλλάξεων σε ασθενείς με ΜΜΚΠ που έλαβαν 1^η γραμμή χημειοθεραπεία

2.1 Χαρακτηριστικά ασθενών

Το ερώτημα αυτό εξετάστηκε σε μια υποομάδα ασθενών του αρχικού πληθυσμού, η οποία αποτελείτο από 162 ασθενείς οι οποίοι έλαβαν σαν 1^η γραμμή χημειοθεραπεία. Ανάμεσά τους, υπήρχαν 66 ασθενείς των οποίων οι συσχετίσεις της ανταπόκρισης στην θεραπεία με gefitinib και της κλινικής έκβασης των ασθενών σύμφωνα με την παρουσία *EGFR* μεταλλάξεων είχαν ήδη μελετηθεί και ανακοινωθεί (Pallis et al. 2007). Τα κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών παρουσιάζονται σύμφωνα με την παρουσία *EGFR* και *KRAS* μεταλλάξεων στον Πίνακα 22. Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 60.5 έτη. Η πλειοψηφία ήταν άνδρες (77.8%), καπνιστές (71.6%) με ιστολογικό τύπο αδenoκαρκίνωμα έχοντας φυσική κατάσταση (performance status) (ECOG) 0-1 (72.8%). Επίσης οι περισσότεροι ασθενείς την στιγμή της διάγνωσης ήταν σταδίου IV (75.3%). Ενενήντα έξι (59.2%) και εξήντα έξι (40.8%) ασθενείς έλαβαν ως πρώτη γραμμή θεραπεία πλατινούχο και μη πλατινούχο συνδυασμό, αντίστοιχα. Ογδόντα επτά (53.7%) από τους ασθενείς έλαβαν επίσης αναστολείς της τυροσινικής κινάσης (TKIs), gefitinib, ως δεύτερη ή τρίτη γραμμή θεραπείας. Ο μέσος χρόνος παρακολούθησης των ασθενών ήταν 47.9 (κυμάνθηκε από 0.5 έως 142.8) μήνες. Το συνολικό ποσοστό αντικειμενικής ανταπόκρισης (ORR) για την πρώτη γραμμή θεραπείας ήταν 23.8% (38 από τους 159 ασθενείς που αξιολογήθηκαν), αν και δεν φάνηκε στατιστικά σημαντική διαφορά, οι ασθενείς που έλαβαν χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα είχαν υψηλότερο ποσοστό αντικειμενικής ανταπόκρισης από τους ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με μη-πλατινούχα σχήματα (28.7% vs. 16.9%, αντίστοιχα, $p=0.086$) (Πίνακας 23). Οι ασθενείς με ιστολογικό τύπο αδenoκαρκίνωματος ή βρογχοκυψελιδικό φαίνεται να έχουν μικρότερη πιθανότητα να ανταποκριθούν στην πρώτη γραμμή χημειοθεραπείας ($p=0.023$, Πίνακας 23). Κανένα από τα υπόλοιπα κλινικά χαρακτηριστικά δεν σχετίζονται σημαντικά με την ανταπόκριση στην πρώτη γραμμή θεραπείας (Πίνακας 23).

2.2 Πρότυπο *EGFR* και *KRAS* μεταλλάξεων

EGFR μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν σε 40 ασθενείς της υποομάδας ασθενών που έλαβαν 1^η γραμμή χημειοθεραπείας. Ενεργοποιητικές μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν σε 13 (8.2%) ασθενείς. Αναλυτικά έξι (3.7%) από αυτούς είχαν έλλειψη 12-15 νουκλεοτιδίων στο εξώνιο 19 (del 19) του *EGFR*, πέντε (3%) έφεραν την σημειακή μετάλλαξη L858R στο εξώνιο 21, ένας (0.6%) είχε την σημειακή μετάλλαξη G719D στο εξώνιο 18 και ακόμα ένας (0.6%) έφερε μια σημειακή μετάλλαξη, την E746V, στο εξώνιο 19. Επίσης σε 27 (16.6%) ασθενείς ανιχνεύθηκαν «άλλες» μεταλλάξεις. Μεταξύ των πέντε ασθενών που έφεραν την μετάλλαξη L858R, στους τρεις ανιχνεύθηκε επίσης μια δεύτερη είτε στο εξώνιο 18 είτε στο 21.

Η ανάλυση των *KRAS* μεταλλάξεων πραγματοποιήθηκε σε 133 (82%) ασθενείς της υπό μελέτης ομάδας ασθενών και μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν σε 30 (22.6%) από αυτούς. Οι πιο συχνές μεταλλάξεις εντοπίστηκαν στο κωδικόνιο 12 (29 από τους 30 ασθενείς με μεταλλάξεις), ενώ ανιχνεύθηκε αντικατάσταση αμινοξέος στο κωδικόνιο 13 σε μια μόνο περίπτωση. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι κανένας από τους ασθενείς με «κλασσικές» *EGFR* μεταλλάξεις δεν είχε και *KRAS* μεταλλάξεις. Παρόλα αυτά σε τέσσερις ασθενείς με τις «άλλες» *EGFR* μεταλλάξεις ανιχνεύθηκε και μετάλλαξη στο *KRAS*. Τα χαρακτηριστικών των ασθενών σύμφωνα με την παρουσία ή όχι *EGFR* και *KRAS* μεταλλάξεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 22. Φαίνεται ότι οι *KRAS* μεταλλάξεις σχετίζονται με τους ιστολογικούς τύπους, αδenoκαρκίνωμα ή βροχοκυψελιδικό ($p=0.029$). Από τους υπόλοιπους συνδυασμούς χαρακτηριστικών που εξετάστηκαν δεν διαπιστώθηκε καμιά στατιστικά σημαντική σχέση.

2.3 Ανταπόκριση στην πρώτη γραμμή χημειοθεραπείας σύμφωνα με το πρότυπο μεταλλάξεων *EGFR* και *KRAS*

Στον Πίνακα 24 παρουσιάζεται η σχέση της ανταπόκρισης στην πρώτη γραμμή χημειοθεραπείας με την παρουσία *EGFR* και *KRAS* μεταλλάξεων. Σε όλο τον πληθυσμό, η αντικειμενική ανταπόκριση δεν ήταν στατιστικά σημαντική μεταξύ των ασθενών που έφεραν ή όχι *EGFR* μεταλλάξεις (30% vs. 21.8%, αντίστοιχα, $p=0.29$). Εντούτοις, η αντικειμενική ανταπόκριση ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη (55.6%) για τους ασθενείς που έφεραν «κλασσικές» μεταλλάξεις σε σχέση με αυτούς

που ήταν αγρίου τύπου (21.8%) ($p=0.023$). Επιπλέον, στην υποομάδα ασθενών που έλαβαν θεραπεία με βάση την πλατίνα, η αντικειμενική ανταπόκριση ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη σε αυτούς που έφεραν «κλασσικές» μεταλλάξεις σε σχέση με αυτούς που ήταν αγρίου τύπου (62.5% vs.23.9%, αντίστοιχα, $p=0.021$). Αντιθέτως, οι «άλλες» *EGFR* μεταλλάξεις δεν σχετίζονται με την ανταπόκριση στη θεραπεία με πλατινούχο ($p=0.44$) ή μη ($p=0.56$) σχήμα. Δεδομένου ότι μόνο σ' έναν ασθενή με «κλασσικές» *EGFR* μεταλλάξεις χορηγήθηκε σαν πρώτη γραμμή θεραπεία μη πλατινούχο σκεύασμα, δεν έγινε περαιτέρω ανάλυση σε αυτή την υποομάδα.

Σε πολυπαραγοντική ανάλυση (προσαρμοσμένη για το φύλο, τη φυσική κατάσταση, το ιστορικό καπνίσματος, το στάδιο της ασθένειας, τον ιστολογικό τύπο και τα χημειοθεραπευτικά σχήματα), η παρουσία «κλασσικών» ενεργοποιητικών *EGFR* μεταλλάξεων αναδείχθηκε ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για την ανταπόκριση στην πρώτη γραμμή χημειοθεραπεία (αγρίου τύπου έναντι «κλασσικών» μεταλλάξεων, HR = 4.85, 95% CI: 1.13 – 20.83, $p = 0.034$, Πίνακας 25).

Η αντικειμενική ανταπόκριση στην πρώτη γραμμή χημειοθεραπεία μεταξύ των ασθενών με *KRAS* μεταλλάξεις (25%) (26.5%) και αυτών χωρίς μεταλλάξεις δεν διέφερε σημαντικά ($p= 0.87$, Πίνακας 24). Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά ως προς το ποσοστό αντικειμενικής ανταπόκρισης στους ασθενείς που έλαβαν πλατινούχο ή μη συνδυασμό ανάλογα με την παρουσία *KRAS* μεταλλάξεων ($p= 0.95$ και $p =0.86$, αντίστοιχα).

2.4 Χρόνος μέχρι την πρόοδο νόσου και συνολική επιβίωση σύμφωνα με το πρότυπο μεταλλάξεων *EGFR* και *KRAS*

Στον υπό μελέτη πληθυσμό, ο μέσος χρόνος μέχρι την πρόοδο νόσου ήταν 4.2 μήνες και η μέση συνολική επιβίωση 16.3 μήνες. Ο χρόνος μέχρι την πρόοδο νόσου δεν φάνηκε να σχετίζεται είτε με τις «κλασσικές» ενεργοποιητικές *EGFR* μεταλλάξεις (6.1 μήνες, 95% CI: 2.5 - 9.6 μήνες για τους ασθενείς με *EGFR* μεταλλάξεις έναντι 4.1 μηνών, 95% CI: 3.1 - 4.9 μήνες για τους ασθενείς αγρίου τύπου, $p= 0.81$), ή με τις *KRAS* μεταλλάξεις (4.2 μήνες, 95% CI: 2.6 - 5.8 μήνες για τους ασθενείς με *KRAS* μεταλλάξεις έναντι 4.7 μηνών, 95% CI: 3.6 - 5.8 μήνες για τους ασθενείς αγρίου τύπου, $p= 0.42$, Πίνακας 26). Ομοίως, δεν υπήρξε καμία διαφορά στον χρόνο μέχρι την πρόοδο νόσου

ανάλογα με την παρουσία *EGFR* ή *KRAS* μεταλλάξεων στους ασθενείς που χορηγήθηκε χημειοθεραπεία με πλατινούχο ή μη συνδυασμό (Πίνακας 26).

Οι ασθενείς με οποιαδήποτε *EGFR* μετάλλαξη είχαν τάση για μεγαλύτερη μέση συνολική επιβίωση σε σύγκριση με εκείνους που δεν έφεραν *EGFR* μεταλλάξεις, αν και δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά (29.2 μήνες έναντι 15.3 μηνών, $p = 0.069$, Πίνακας 26). Ωστόσο, οι ασθενείς που έφεραν τις «κλασσικές» *EGFR* μεταλλάξεις έζησαν σημαντικά περισσότερο από τους ασθενείς χωρίς *EGFR* μεταλλάξεις (54,7 μήνες για τους ασθενείς με *EGFR* μεταλλάξεις έναντι 15,3 μηνών για τους ασθενείς αγρίου τύπου, $p = 0.028$, Εικόνα 20A, HR = 2.94, 95% CI: 1.06 – 8, $p = 0.036$), ενώ η μέση συνολική επιβίωση των ασθενών με τις «άλλες» *EGFR* μεταλλάξεις δεν διέφερε σημαντικά από εκείνη των ασθενών που ήταν αγρίου τύπου για τον *EGFR* (Πίνακας 26).

Παρ' όλα αυτά, στην πολυπαραγοντική ανάλυση (προσαρμοσμένη για το φύλο, τη φυσική κατάσταση, το ιστορικό καπνίσματος, το στάδιο της ασθένειας, τον ιστολογικό τύπο και τα χημειοθεραπευτικά σχήματα) η παρουσία των «κλασσικών» *EGFR* μεταλλάξεων δεν φάνηκε να αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα καλύτερης επιβίωσης (αγρίου τύπου εναντίον «κλασσικές», HR = 2,25, 95% CI: 0,81 - 6,24, $p = 0.117$). Για την υποομάδα των ασθενών που έλαβαν πρώτη γραμμή χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα, η μέση συνολική επιβίωση ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στους ασθενείς με τις «κλασσικές» *EGFR* μεταλλάξεις (35.9 μήνες για τους ασθενείς με μεταλλάξεις έναντι 15.3 μηνών για τους ασθενείς αγρίου τύπου, $p = 0.043$). Αντίθετα, φάνηκε να μην υπάρχει σημαντική σχέση μεταξύ των *KRAS* μεταλλάξεων και της συνολικής επιβίωσης (14.5 μήνες για τους ασθενείς με μεταλλάξεις έναντι 18.5 μηνών για τους ασθενείς αγρίου τύπου για το *KRAS*, $p = 0.52$, Εικόνα 20B).

2.5 Επίδραση της θεραπείας με αναστολείς της τυροσυνικής κινάσης του EGFR (gefitinib)

Το 53.7% των ασθενών έλαβαν gefitinib ως δεύτερη ή τρίτη γραμμή θεραπεία. Μεταξύ αυτών, σε 7 (8%) ασθενείς ανιχνεύτηκαν οι «κλασσικές» μεταλλάξεις και σε 22 (25.3%) οι «άλλες» *EGFR* μεταλλάξεις. Η μέση συνολική επιβίωση των ασθενών με τις «κλασσικές» *EGFR* μεταλλάξεις ήταν σημαντικά

μεγαλύτερη από εκείνη των ασθενών χωρίς μεταλλάξεις που έλαβαν επίσης gefitinib (54.7 μήνες έναντι 22.1 μηνών, αντίστοιχα, $p = 0.037$, Εικόνα 20Γ), όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι «άλλες» μεταλλάξεις δεν σχετίζονται με την συνολική επιβίωση των ασθενών (Pallis et al. 2007). Επιπλέον, δεν φάνηκε σημαντική διαφορά όσον αφορά τη συνολική επιβίωση των ασθενών με ($n=15$) ή δίχως ($n=56$) *KRAS* μεταλλάξεις, που έλαβαν gefitinib (μέση συνολική επιβίωση, 22.7 μήνες έναντι 29.2 μηνών, αντίστοιχα, $p = 0.56$, Εικόνα 20Δ).

Πίνακας 22. Κλινικόπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών σύμφωνα με το πρότυπο μεταλλάξεων των γονιδίων *EGFR* και *KRAS*.

	Σύνολο ασθενών (%)	<i>EGFR</i>			<i>p</i>	<i>KRAS</i>		<i>p</i>
		«Κλασσικές» μεταλλάξεις (n=9)	«Άλλες» μεταλλάξεις (n=31)	Αγρίου τύπου (n=122)		Μεταλλάξεις (n=30)	Αγρίου τύπου (n=103)	
Χαρακτηριστικά	Σύνολο ασθενών (%)	N (%)	N (%)	N (%)	<i>p</i>	N (%)	N (%)	<i>p</i>
Μέση ηλικία (χρόνια)	60.5	62	57	62		58	62	
Εύρος	35-83	46-72	40-79	35-83		35-74	40-74	
Φύλο								
Άρρεν	126 (77.8)	5 (55.6)	25 (80.6)	96 (80.6)	0.24	24 (80.0)	82 (79.6)	0.96
Θήλυ	36 (22.2)	4 (44.4)	6 (19.4)	26 (21.3)		6 (20.0)	21 (20.4)	
Φυσική κατάσταση								
0-1	118 (72.8)	7 (77.8)	21 (67.7)	90 (73.8)	0.75	22 (73.3)	76 (73.8)	0.96
2	44 (27.2)	2 (22.2)	10 (32.3)	32 (26.2)		8 (26.7)	27 (26.2)	
Ιστολογικός τύπος								
Αδενοκαρκίνωμα & Βronχοκυψελιδικό	117 (72.2)	5 (55.6)	21 (67.7)	91 (74.6)	0.38	26 (86.7)	68 (66.0)	0.029
Άλλο	45 (27.8)	4 (44.4)	10 (32.3)	31 (25.4)		4 (13.3)	35 (34.0)	
Καπνιστική συνήθεια								
Καπνιστές	116 (71.6)	5 (55.6)	25 (80.6)	86 (71.1)	0.30	21 (70.0)	75 (72.8)	0.70
Μη καπνιστές	46 (28.4)	4 (44.4)	6 (19.4)	35 (28.9)		9 (30.0)	28 (27.2)	
Στάδιο								
IIIB	40 (24.7)	2 (22.2)	11 (35.5)	42 (34.4)	0.74	13 (43.3)	38 (36.9)	0.52
IV	122 (75.3)	7 (77.8)	20 (64.5)	80 (65.6)		17 (56.7)	65 (63.1)	
1^η γραμμή χημειοθεραπεία								
Πλατινούχα	96 (59.2)	8 (88.9)	15 (48.4)	73 (59.8)	0.09	18 (60.0)	64 (62.1)	0.83
Μη πλατινούχα	66 (40.8)	1 (11.1)	16 (51.6)	49 (40.2)		12 (40.0)	39 (37.9)	

Θεραπεία EGFR-TKI ως 2^η ή 3^η γραμμή							
Gefitinib	87(53.7)	7(8.0)	22(25.3)	58(66.7)		15(21.1)	56(78.9)

^a αναφέρεται στο στάδιο στην έναρξη της 1η γραμμής χημειοθεραπείας

Πίνακας 23. Ανταπόκριση στην 1η γραμμή χημειοθεραπεία σύμφωνα με τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

Χαρακτηριστικά	CR+PR* (n=38)		SD+PD* (n=121)		p
	N	%	N	%	
Φύλο					
Άρρεν	31	25.2	92	74.8	0.47
Θήλυ	7	19.4	29	80.6	
Φυσική κατάσταση					
0-1	29	24.6	89	75.4	0.73
2	9	21.9	32	78.1	
Ιστολογικός τύπος					
Αδενοκαρκίνωμα & Βρογχοκυψελιδικό	22	19.1	93	80.9	0.023
Άλλο	16	36.3	28	63.7	
Καπνιστική συνήθεια					
Καπνιστές	28	24.7	85	75.3	0.73
Μη καπνιστές	10	22.2	35	77.8	
Στάδιο^α					
IIIB	17	30.9	38	69.1	0.13
IV	21	31.4	83	68.6	
1^η γραμμή χημειοθεραπεία					
Πλατινούχα	27	28.7	67	71.3	0.086
Μη πλατινούχα	11	16.9	54	83.1	

Συντομογραφίες: CR: πλήρης απάντηση, PR: μερική απάντηση, SD: σταθερή νόσος, PD: πρόοδος νόσου.

Πίνακας 24. Ανταπόκριση στην 1^η γραμμή χημειοθεραπεία σύμφωνα με το πρότυπο των *EGFR* και *KRAS* μεταλλάξεων.

Πρότυπο μεταλλάξεων	Ολόκληρος πληθυσμός				Θεραπεία με πλατινούχο συνδυασμό				Θεραπεία με μη πλατινούχο συνδυασμό			
	Σύνολο	CR+PR (%)	SD+PD (%)	<i>p</i>	Σύνολο	CR+PR (%)	SD+PD (%)	<i>p</i>	Σύνολο	CR+PR (%)	SD+PD (%)	<i>p</i>
<i>EGFR</i>												
Αγρίου τύπου	119	26 (21.8)	93 (78.2)		71	17 (23.9)	54 (76.1)		48	9 (18.8)	39 (81.3)	
Μεταλλάξεις*	40	12 (30.0)	28 (70.0)	0.29	23	10 (43.5)	13 (56.5)	0.072	17	2 (11.8)	15 (88.2)	0.51
«Κλασσικές» μεταλλάξεις	9	5 (55.6)	4 (44.4)	0.023	8	5 (62.5)	3 (37.5)	0.021	1	-	1 (100.0)	0.63
«Άλλες» μεταλλάξεις	31	7 (22.6)	24 (77.4)	0.93	15	5 (33.3)	10 (66.7)	0.44	16	2 (12.5)	14 (87.5)	0.56
<i>KRAS</i>												
Αγρίου τύπου	102	27 (26.5)	75 (73.5)	0.87	63	19 (30.2)	44 (69.8)	0.95	39	8 (20.5)	31(79.5)	0.86
Μεταλλαγμένο	28	7 (25.0)	21 (75)		17	5 (29.4)	12 (70.6)		11	2 (18.2)	9 (81.8)	

* Στις μεταλλάξεις συμπεριλαμβάνονται όλες, κλασσικές και μη. Συνομογραφίες: CR: πλήρης απάντηση, PR: μερική απάντηση, SD: σταθερή νόσος, PD: πρόοδος νόσου.

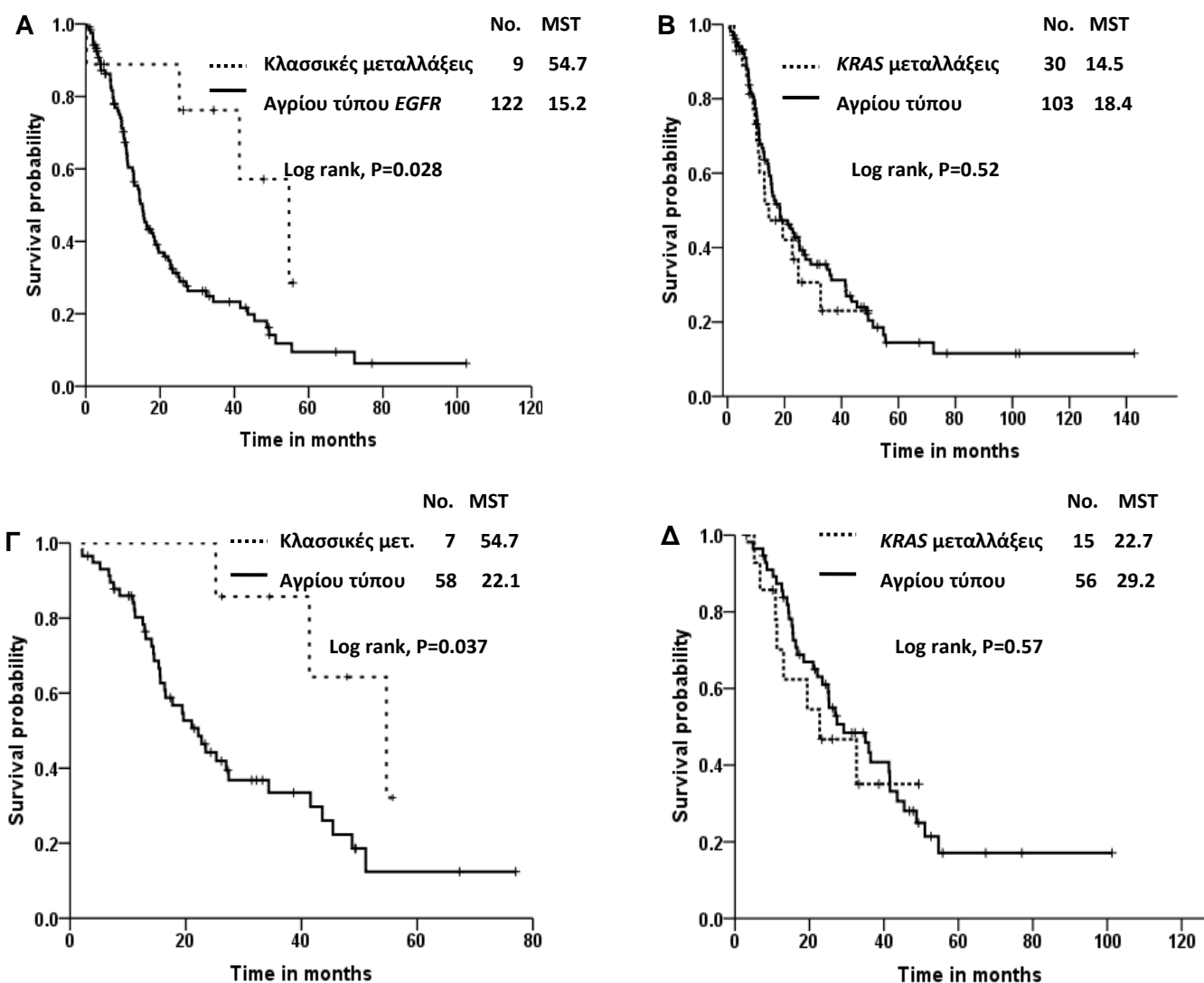
Πίνακας 25. Πολυπαραγοντική ανάλυση για την ανταπόκριση στην 1^η γραμμή χημειοθεραπείας.

Παράγοντας	HR*	95% CI	p-value
Φύλο (Άρρεν έναντι Θήλυ)	1.023	0.31-3.29	0.970
Φυσική κατάσταση (0&1 έναντι 2)	1.027	0.34-3.08	0.962
Καπνιστική συνήθεια (Ναι έναντι Όχι)	1.190	0.43-3.22	0.733
Ιστολογικός τύπος (Adeno & BAC έναντι Άλλο)	2.907	1.15-7.32	0.024
Στάδιο (Μεταστατικό έναντι Μη μεταστατικό)	3.279	1.34-8.01	0.009
Πρότυπο μεταλλάξεων <i>EGFR</i> (Αγρίου τύπου έναντι Κλασσικές μετ.)	4.851	1.13-20.83	0.034
Χημειοθεραπεία (Μη πλατινούχος έναντι Πλατινούχος συνδυασμός)	2.022	0.75-5.41	0.161
*HR: Σχετικός κίνδυνος θανάτου			

Πίνακας 26. Μέσος χρόνος μέχρι την πρόοδο νόσου και συνολική επιβίωση (σε μήνες) σύμφωνα με το πρότυπο των *EGFR* και *KRAS* μεταλλάξεων.

Πρότυπο μεταλλάξεων	Ολόκληρος πληθυσμός					Θεραπεία με πλατινούχο συνδυασμό					Θεραπεία με μη πλατινούχο συνδυασμό				
	Σύνολο	TTP	<i>p</i>	OS	<i>p</i>	Σύνολο	TTP	<i>p</i>	OS	<i>p</i>	Σύνολο	TTP	<i>p</i>	OS	<i>p</i>
<i>EGFR</i>															
Αγρίου τύπου	119/122	4.1		15.3		73	4.1		15.3		49	4.0		15.2	
Μεταλλάξεις*	40	4.4	0.69	29.2	0.069	23	5.0	0.81	35.9	0.043	17	2.4	0.33	16.7	0.84
«Κλασσικές» μεταλλάξεις	9	6.1	0.81	54.7	0.028	8	6.1	0.74	54.7	0.014	1	0.2	-	0.2	-
«Άλλες» μεταλλάξεις	31	4.2	0.57	25.0	0.34	15	4.8	0.93	32.7	0.41	16	2.4	0.46	16.7	0.65
<i>KRAS</i>															
Αγρίου τύπου	102/103	4.7		18.5		63/64	5.5		22.1		39	3.0		15.3	
Μεταλαγμένο	28/30	4.2	0.42	14.5	0.52	17/18	6.1	0.83	11.2	0.11	11/12	6.4	0.15	22.7	0.39

* Συμπεριλαμβάνονται όλες οι μεταλλάξεις, κλασσικές και μη. TTP: Χρόνος μέχρι την πρόοδο νόσου, OS: συνολική επιβίωση.



Εικόνα 20. Καμπύλες επιβίωσης (Kaplan-Meier) των ασθενών ανάλογα με την παρουσία *EGFR* ή *KRAS* μεταλλάξεων (A, B) και τη θεραπεία με gefitinib (Γ, Δ). A: Ασθενείς με ή χωρίς *EGFR* μεταλλάξεις. B: Ασθενείς με ή χωρίς *KRAS* μεταλλάξεις. Γ: Ασθενείς που έλαβαν θεραπεία gefitinib με ή χωρίς *EGFR* μεταλλάξεις. Δ: Ασθενείς που έλαβαν θεραπεία gefitinib με ή χωρίς *KRAS* μεταλλάξεις. MST: μέσος χρόνος επιβίωσης σε μήνες.

3 Ανίχνευση μεταλλάξεων στον πρωτοπαθή όγκο και στην αντίστοιχη μετάσταση

3.1 Χαρακτηριστικά ασθενών

Για να μελετήσουμε αν και κατά πόσο διαφέρει το πρότυπο των μεταλλάξεων στον πρωτοπαθή όγκο και στην αντίστοιχη μετάσταση αναλύθηκαν συνολικά 25 ασθενείς με προχωρημένο ΜΜΚΠ, οι οποίοι συμπεριλαμβάνονται στο αρχικό πληθυσμό της παρούσας διατριβής. Τα κλινικο-παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά παρουσιάζονται χωριστά για κάθε ασθενή στον Πίνακα 27. Συνοπτικά, είκοσι δύο (88%) ασθενείς ήταν άνδρες, δεκαοκτώ (72%) ασθενείς είχαν αδenoκαρκίνωμα (ADC), 22 (88%) είχαν ιστορικό καπνίσματος και η μέση ηλικία τους ήταν τα 55 έτη (εύρος, 41-70). Μεταξύ των 50 δειγμάτων που αναλύθηκαν (25 πρωτοπαθείς όγκοι και 25 μεταστάσεις), 26 (52%) δείγματα ήταν χειρουργικά παρασκευάσματα και 24 (48%) βιοπτικά. Όσον αφορά τις θέσεις όπου εμφάνισαν μετάσταση οι ασθενείς κατανέμονται ως εξής: εννέα ασθενείς με μετάσταση στον πνεύμονα, πέντε ασθενείς στο θωρακικό τοίχωμα, τέσσερις στα επινεφρίδια, τρεις στον εγκέφαλο, δυο στα οστά, ένα στο ήπαρ και ένα στο δέρμα. Οι μεταστάσεις ήταν μετάχρονες σε όλες τις περιπτώσεις. Ο διάμεσος χρόνος που μεσολάβησε μεταξύ της αφαίρεσης του πρωτοπαθούς όγκου και της αντίστοιχης μετάστασης ήταν 30 μήνες (εύρος 4-143). Τέλος να αναφερθεί ότι εννέα (36%) ασθενείς έλαβαν θεραπεία TKIs στα πλαίσια ενός προγράμματος (Expanded Access Program) (Πίνακας 28).

3.2 Πρότυπο μεταλλάξεων του γονιδίου *EGFR* στον πρωτοπαθή όγκο και στην μετάσταση

Το πρότυπο των *EGFR* μεταλλάξεων στους πρωτοπαθείς όγκους και τις αντίστοιχες μεταστάσεις παρουσιάζεται στον Πίνακα 28. Μεταλλάξεις του *EGFR* εντοπίστηκαν στον πρωτοπαθή όγκο πέντε (20%) ασθενών, τρεις από τις οποίες ήταν οι καλά χαρακτηρισμένες «κλασσικές» (hotspot) μεταλλάξεις στο εξώνιο 19 (Del746-750 και E746V, περίπτωση 18, 20 και 23), ενώ οι υπόλοιπες δύο ήταν νέες σημειακές μεταλλάξεις στα εξώνια 18 και 21 (L692P και G857E, περίπτωση 17 και 19), αντίστοιχα. Οι αντίστοιχες μεταστάσεις των πρωτοπαθών μεταλλαγμένων όγκων Del746 - 750 (περίπτωση 23), E746V (περίπτωση 18), L692P (περίπτωση 17) και G857E

(περίπτωση 19) ήταν άγριου τύπου όσον αφορά την παρουσία *EGFR* μεταλλάξεων. Όσον αφορά τις μεταστάσεις, *EGFR* μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν σε τρεις (12%) ασθενείς (Πίνακας 28). Η μετάσταση του ενός από αυτούς τους ασθενείς έφερε την ίδια *EGFR* μετάλλαξη (Del19) όπως στον πρωτοπαθή όγκο, αλλά και μια ακόμα, την T790M στο εξώνιο 20 (περίπτωση. 20). Αντίθετα, άλλοι δύο ασθενείς έφεραν δύο νέες μεταλλάξεις στο εξώνιο 18 (L692P και V717A, περίπτωση 12) και την μετάλλαξη T847A (περίπτωση 13) στο εξώνιο 21, οι οποίες δεν ανιχνεύτηκαν στον αντίστοιχο πρωτοπαθή όγκο των ασθενών.

Σύμφωνα με το πρότυπο των *EGFR* μεταλλάξεων οι ασθενείς μπορούν να ταξινομηθούν ως εξής: (α) σε δεκαοχτώ (72%) ασθενείς το γονίδιο του *EGFR* ήταν άγριου τύπου τόσο στον πρωτοπαθή τους όγκο όσο και στην αντίστοιχη μετάσταση, (β) τέσσερις ασθενείς (16%) έφεραν μεταλλάξεις μόνο στον πρωτοπαθή όγκο και δυο (8%) μόνο στην μετάσταση, ενώ σε έναν (4%) ασθενή ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις και στον πρωτοπαθή και στην μετάσταση. Ως εκ τούτου, το πρότυπο μεταλλάξεων του *EGFR* έδειξε ασυμφωνία μεταξύ του πρωτοπαθούς όγκου και της αντίστοιχης μετάστασης σε 7 από τους 25 ασθενείς, ποσοστό 28% (Πίνακας 29). Η ασυμφωνία αυτή δεν φάνηκε να είναι στατιστικά σημαντική με την δοκιμή McNemar ($p=0.688$).

3.3 Πρότυπο μεταλλάξεων του γονιδίου *KRAS* στον πρωτοπαθή όγκο και στην μετάσταση

Στα 25 ζεύγη πρωτοπαθών όγκων και αντίστοιχων μεταστάσεων ανιχνεύθηκαν επίσης και μεταλλάξεις του γονιδίου *KRAS*. Συγκεκριμένα, στον πρωτοπαθή όγκο, *KRAS* μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν σε πέντε (20%) ασθενείς (περίπτωση 8, 10, 22, 23 και 25) και στην μετάσταση σε πέντε (20%) ασθενείς (περίπτωση 9, 10, 11, 16 και 23), αντίστοιχα (Πίνακας 28). Μάλιστα δυο ασθενείς (περίπτωση 10 και 23) έφεραν την ίδια μετάλλαξη τόσο στον πρωτοπαθή όγκο όσο και στην αντίστοιχη μετάσταση. Μάλιστα στον ασθενή που έφερε την μετάλλαξη G12C (περίπτωση 23) ανιχνεύτηκε επίσης η απαλοιφή 746-750 στο εξώνιο 19 του *EGFR* στον πρωτοπαθή όγκο και όχι στην μετάσταση. Αυτό επιβεβαιώθηκε με τρεις ανεξάρτητες PCR, όπου κάθε φορά χρησιμοποιήθηκε γενωμικό DNA που απομονώθηκε από διαδοχικές τομές του κύβου παραφίνης. Όσον αφορά το πρότυπο μεταλλάξεων του *KRAS* μεταξύ του πρωτοπαθούς όγκου και της μετάστασης παρατηρήθηκε ασυμφωνία

σε ποσοστό 24% (έξι ασθενείς), η οποία δεν ήταν στατιστικά σημαντική με την δοκιμή McNemar ($p=1$) (Πίνακας 29).

3.4 Απάντηση στη θεραπεία με αναστολείς της τυροσινικής κινάσης του EGFR σύμφωνα με το πρότυπο μεταλλάξεων των γονιδίων EGFR και KRAS

Εννέα ασθενείς έλαβαν gefitinib ως πρώτη (περίπτωση 23 και 18), τρίτη (περίπτωση 15, 16, 19, 20 και 22) ή τέταρτη (περίπτωση 14 και 17) γραμμή θεραπείας. Τρεις ασθενείς έλαβαν gefitinib πριν από τη βιοψία της μετάχρονης μετάστασης (περίπτωση 17, 18 και 20) και έξι μετά την βιοψία της μετάστασης (περίπτωση 14, 15, 16, 22 και 23). Σε πέντε (56%) ασθενείς επιτεύχθηκε σταθεροποίηση της νόσου και σε τέσσερις (44%) πρόοδος νόσου (Πίνακας 27). Όλοι οι ασθενείς που εμφάνισαν πρόοδο νόσου υπό τη θεραπεία με gefitinib δεν είχαν EGFR μεταλλάξεις τόσο στον πρωτοπαθή όγκο όσο και στην μετάσταση (περίπτωση 14, 15, 16 και 22), από τους οποίους, δυο ασθενείς έφεραν KRAS μεταλλάξεις στον πρωτοπαθή όγκο (περίπτωση 22) ή στην μετάσταση (περίπτωση 16). Ωστόσο, όλοι οι ασθενείς με σταθερή πορεία νόσου έφεραν EGFR μεταλλάξεις στον πρωτοπαθή όγκο (περίπτωση 17, 18, 19, 20 και 23). Από αυτούς, τρεις ασθενείς έφεραν τις καλά χαρακτηρισμένες ενεργοποιητικές μεταλλάξεις στο εξόνιο 19 (περίπτωση 18, 20 και 23) και δυο έφεραν EGFR μεταλλάξεις με άγνωστη λειτουργία (περίπτωση 17 και 19). Συγκεκριμένα οι ασθενείς (περίπτωση 18 και 20) που έλαβαν gefitinib πριν από την μετάχρονη μετάσταση ανέπτυξαν μεταστάσεις, οι οποίες ήταν είτε αγρίου τύπου για το γονίδιο EGFR (περίπτωση 18) είτε απέκτησαν επίκτητη αντίσταση λόγω ύπαρξης της μετάλλαξης T790M στο εξόνιο 20 του EGFR (περίπτωση 20). Όσον αφορά την περίπτωση 23, ο ασθενής έλαβε gefitinib μετά την εμφάνιση της μετάστασης, έφερε EGFR και KRAS μεταλλάξεις, όπου στον πρωτοπαθή όγκο και στην μετάσταση ανιχνεύτηκε η ίδια KRAS μετάλλαξη.

Πίνακας 27. Κλινικόπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών με ΜΜΚΠ στους οποίους μελετήθηκε το πρότυπο των *EGFR* και *KRAS* μεταλλάξεων.

Αριθμός ασθενών	Ηλικία	Φύλο	Ιστολογικός τύπος	Στάδιο ^α	Καπνιστική συνήθεια	Δείγμα ιστού ^β Π ^γ / Μ ^δ	Θέση μετάστασης	Χρόνος ^ε μεταξύ Π και Μ	Θεραπεία μεταξύ Π και Μ
1	60	A	ADC	IV	Καπνιστής	B/B	Δέρμα	10	1 st GEM/CDDP 2 nd TXT/CARBO
2	54	A	SCC	II	Καπνιστής	X/X	Πνεύμονας	20	Καμία
3	70	A	ADC	III	Πρώην	B/B	Πνεύμονας	55	ADJ NVB 1 st TXT/GEM
4	44	A	ADC	III	Καπνιστής	X/B	Πνεύμονας	65	ADJ CDDP/V-16 1 st TAXOL 2 nd CPT/GEM IRESSA CPT/CDDP
5	55	A	ADC	III	Καπνιστής	X/X	Πνεύμονας	23	1 st TXT/CDDP
6	63	A	ADC	IV	Καπνιστής	B/B	Πνεύμονας	4	Καμία
7	66	A	BAC	III	Μη καπνιστής	X/B	Θωρακικό τοίχωμα	12	Καμία
8	57	A	LCC	III	Καπνιστής	X/B	Θωρακικό τοίχωμα	4	1 st NVB/CDDP 2 nd TXT/GEM

9	55	A	ADC	III	Πρώην	X/X	Θωρακικό τοίχωμα	15	1 ST TXT/NVB TXT/CDDP 2 ND TAXOL/GEM
10	49	A	ADC	II	Καπνιστής	X/X	Επινεφρίδιο	28	ADJ GEM/CDDP 1 ST TXT/GEM 2 ND NVB/CARBO
11	50	Θ	ADC	IV	Καπνιστής	B/B	Εγκέφαλος	36	ADJ TAXOL/CARBO
12	68	A	ADC	III	Καπνιστής	X/X	Εγκέφαλος	10	TXT/CDDP
13	44	A	GCC	IV	Καπνιστής	B/B	Πνεύμονας	74	1 ST TXT/CDDP
14	56	A	ADC	IV	Καπνιστής	B/X	Επινεφρίδιο	17	Καμία
15	53	A	ADC	III	Καπνιστής	X/B	Θωρακικό τοίχωμα	2	1 ST TXT/CDDP
16	41	A	ADC	IV	Καπνιστής	X/B	Πνεύμονας	143	Καμία
17	56	A	ADC	IV	Πρώην	B/X	Επινεφρίδιο	36	1 ST TXT/CDDP 2 ND TXT CPT/FEM 3 RD IRESSA
18	42	Θ	ADC	II	Μη καπνιστής	X/X	Ήπαρ	30	NEOAJ TXT/GEM,IRESSA ADJ,NVB/CDDP,1 ST NV B/CDDP TXT/GEM

19	55	A	ADC	III	Πρώην	X/B	Οστά	2	Καμία
20	46	A	SCC	III	Καπνιστής	X/B	Πνεύμονας	45	1 ST TXT/CDDP 2 ND TXT/CARBO 3 RD IRESSA
21	62	A	LCC	III	Μη καπνιστής	X/B	Οστά	48	ADJ GEM/CDDP
22	67	A	ADC	IV	Καπνιστής	B/X	Επινεφρίδιο	14	Καμία
23	53	A	ADC	IV	Καπνιστής	X/B	Εγκέφαλος	21	Καμία
24	52	Θ	BAC	II	Καπνιστής	X/X	Πνεύμονας	51	Καμία
25	63	M	ADC	IV	Καπνιστής	B/B	Thoracic wall	1	Καμία

Συντομογραφίες: ADC: αδenoκαρκίνωμα, ADC/BAC: αδenoκαρκίνωμα με βρογχοκυψελιδικά χαρακτηριστικά, GCC: γιγαντοκυτταρικό καρκίνωμα, LCC: μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα, SCC: πλακώδες, A: Άρρεν, Θ: Θήλυ. ^α Το στάδιο αντιστοιχεί με εκείνο τη στιγμή της διάγνωσης. ^β Δείγμα ιστού: Β:βιοψία, Χ: χειρουργείο. ^γ Π: πρωτοπαθής όγκος. ^δ Μ: μετάσταση. ^ε Χρόνος σε μήνες.

Πίνακας 28. Κατανομή των *EGFR* και *KRAS* μεταλλάξεων στον πρωτοπαθή όγκο και στην αντίστοιχη μετάσταση.

Ασθενείς	EGFR μεταλλάξεις		K-RAS μεταλλάξεις		Θεραπεία *	Ανταπόκριση
	Πρωτοπαθής όγκος	Μετάσταση	Πρωτοπαθής όγκος	Μετάσταση		
1	wt	wt	wt	wt	Όχι	-
2	wt	wt	wt	wt	Όχι	-
3	wt	wt	wt	wt	Όχι	-
4	wt	wt	wt	wt	Όχι	-
5	wt	wt	wt	wt	Όχι	-
6	wt	wt	wt	wt	Όχι	-
7	wt	wt	wt	wt	Όχι	-
8	wt	wt	G12S	wt	Όχι	-
9	wt	wt	wt	G13S	Όχι	-
10	wt	wt	G12V	G12V	Όχι	-
11	wt	wt	wt	G12S	Όχι	-
12	wt	L692P, V717A	wt	wt	Όχι	-
13	wt	T847A	wt	wt	Όχι	-
14	wt	wt	wt	wt	Ναι	PD
15	wt	wt	wt	wt	Ναι	PD
16	wt	wt	wt	G12A	Ναι	PD
17	L692P	wt	wt	wt	Ναι	SD
18	E746V	wt	wt	wt	Ναι	SD
19	G857E	wt	wt	wt	Ναι	SD
20	E746-A750 del	E746-A750 del, T790M	wt	wt	Ναι	SD
21	wt	Wt	wt	wt	Όχι	-
22	wt	wt	G12D	wt	Ναι	PD
23	E746-A750 del	wt	G12C	G12C	Ναι	SD

24	wt	wt	wt	wt	Όχι	-
25	wt	wt	G12C	wt	Όχι	-

* Θεραπεία με Gefitinib. Συντομογραφίες: wt: αγρίου τύπου.

Πίνακας 29. Σύγκριση του πρωτοπαθούς όγκου και της αντίστοιχης μετάστασης ως προς το πρότυπο μεταλλάξεων στα γονίδια *EGFR* και *KRAS*.

	Πρωτοπαθής όγκος / Μετάσταση				Ασυμφωνία
	wt/wt	wt/mut	mut/wt	mut/mut	
<i>EGFR</i>	18 (72%)	2 (8%)	4 (16%)	1*(4%)	7 cases (28%)
<i>KRAS</i>	17 (68%)	3 (12%)	3 (12%)	2 (8%)	6 cases (24%)

Συντομογραφίες: wt: αγρίου τύπου, mut: μεταλλαγμένο. * Αντιστοιχεί στον ασθενή-περίπτωση 20, (Πίνακας 28).

4 Προσδιορισμός της γονιδιακής ενίσχυσης του *EGFR* σε ασθενείς με ΜΜΚΠ

Η ανίχνευση της γονιδιακής ενίσχυσης του *EGFR* πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς που είχαν επαρκές υλικό από τον πρωτοπαθή όγκο για ανάλυση και έλαβαν ως θεραπεία αναστολείς της τυροσινικής κινάσης του *EGFR*. Συνολικά αναλύθηκαν 116 ασθενείς και αξιοποιήσιμα αποτελέσματα τελικώς αποκομίσαμε για τους 83. Έτσι έξι (7.2%) από τους 83 ασθενείς είχαν αυξημένο αριθμό αντιγράφων του *EGFR* γονιδίου στον πρωτοπαθή όγκο τους. Για τους υπόλοιπους ασθενείς ο αριθμός των αντιγράφων του *EGFR* γονιδίου ήταν φυσιολογικός. Κανένας ασθενής με γονιδιακή ενίσχυση δεν έφερε μεταλλάξεις στο γονίδιο *KRAS*, ενώ σε δυο ανιχνεύτηκε απαλοιφή μερικών νουκλεοτιδίων στο εξώνιο 19 του *EGFR*.

Η γονιδιακή ενίσχυση του *EGFR* γονιδίου συσχετίστηκε με τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών (Πίνακας 30). Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της ενίσχυσης του *EGFR* γονιδίου και του φύλου, της καπνιστικής συνήθειας, του ιστολογικού τύπου του όγκου, του σταδίου της νόσου και της φυσικής κατάστασης των ασθενών.

Μεταξύ των 106 ασθενείς που αξιολογηθούν ως προς την ανταπόκριση στους αναστολείς της τυροσινικής κινάσης του *EGFR*, οι 15 (14,1%) απάντησαν (είχαν πλήρη ή μερική ανταπόκριση) στη θεραπεία. Για τους δεκατέσσερις από τους δεκαπέντε ασθενείς είχαμε μοριακά δεδομένα των όγκων τους. Έτσι λοιπόν πέντε (33.3%) από αυτούς έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο του *EGFR*, μεταξύ των οποίων 2 (14.2%) είχαν ενίσχυση στο γονίδιο του *EGFR*. Επιπλέον, σε 31 από τους 44 (41.5%) ασθενείς που εμφάνισαν σταθερή νόσο, προσδιορίστηκε το πρότυπο των *EGFR* και *KRAS* μεταλλάξεων και της γονιδιακής ενίσχυσης του *EGFR*. Σε δυο (6.4%) από τους ασθενείς αυτούς ανιχνεύτηκε ενίσχυση του *EGFR* γονιδίου στον πρωτοπαθή όγκο. Τέλος από τους 47 που εμφάνισαν πρόοδο νόσου, οι 35 ελέγχθηκαν για τα υπό μελέτη μοριακά χαρακτηριστικά. Αξίζει να αναφερθεί ότι 9 (25.7%) ασθενείς έφεραν *KRAS* μεταλλάξεις, ένας (3.2%) είχε απαλοιφή στο εξώνιο 19 και δυο (5.6%) εμφάνισαν ενίσχυση του *EGFR* γονιδίου.

Επίσης θελήσαμε να εξετάσουμε αν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της γονιδιακής ενίσχυσης και της ανταπόκρισης στην θεραπεία με τους αναστολείς του EGFR. Όμως η γονιδιακή ενίσχυση δεν βρέθηκε να σχετίζεται με την αποτελεσματικότητα της θεραπείας όσον αφορά το ποσοστό αντικειμενικής ανταπόκρισης (ORR) και το ποσοστό ελέγχου της νόσου (DCR) ($p=0.29$ και $p=0.61$, αντίστοιχα).

Τέλος, διερευνήσαμε την σχέση μεταξύ της γονιδιακής ενίσχυσης, του χρόνου ελεύθερου νόσου, της συνολικής επιβίωσης και δεν βρέθηκε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση, όπως παρουσιάζεται και στον

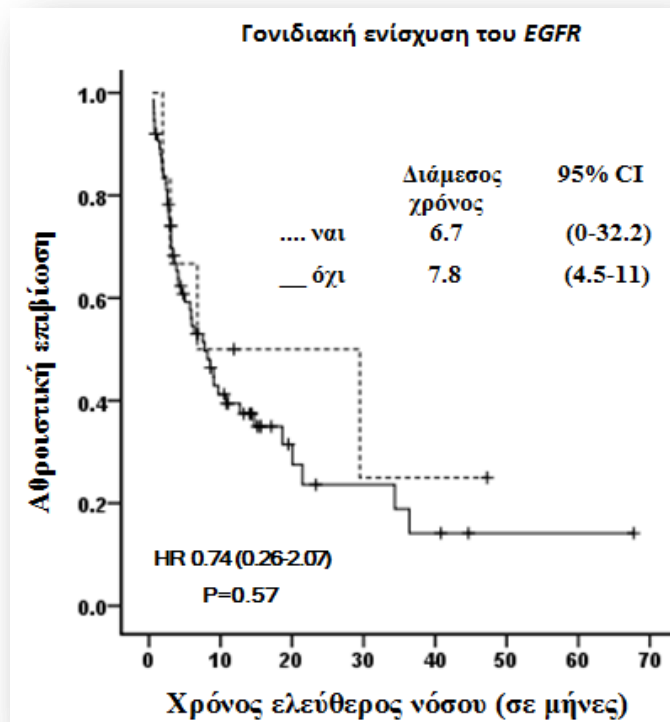
Πίνακας 31 (χρόνος ελεύθερος νόσου: HR 0.74, 95% CI 0.26-2.07, $p=0.57$, συνολική επιβίωση: HR 0.72, 95% CI 0.22-2.36, $p=0.59$) (Εικόνα 21).

Πίνακας 30. Κλινικό-παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά ασθενών σύμφωνα με την γονιδιακή ενίσχυση του *EGFR*.

Χαρακτηριστικά	Γονιδιακή ενίσχυση του <i>EGFR</i> (gene amplification) (n=83)				p
	Ναι		Όχι		
	N	%	N	%	
Φύλο					
Άρρεν	4	4.8	49	59	0.88
Θήλυ	2	2.4	28	33.7	
Ιστολογικός τύπος					
Αδενοκαρκίνωμα	5	6	62	74.7	0.86
Άλλο	1	1.2	15	18.1	
Καπνιστική συνήθεια					
Καπνιστές	4	4.8	43	51.8	0.60
Μη καπνιστές	2	2.4	34	41	
Στάδιο νόσου					
IIIb	0	0	28	33.7	0.07
IV	6	7.2	49	59	
Φυσική κατάσταση					
0	4	4.8	51	61.4	0.98
1+2	2	2.4	26	31.3	

Πίνακας 31. Συσχέτιση της γονιδιακής ενίσχυσης του *EGFR* με τον χρόνο ελεύθερο νόσου και την συνολική επιβίωση.

Γονιδιακή ενίσχυση <i>EGFR</i>	Χρόνος ελεύθερος νόσου (n=81)			Συνολική επιβίωση (n=83)		
	N	HR (95% CI)	p	N	HR (95% CI)	p
Ναι	6	0.74(0.26-2.07)	0.75	6	0.724(0.22-2.36)	0.59
Όχι	75			77		



Εικόνα 21. Καμπύλη επιβίωσης (Kaplan-Meier) των ασθενών ως προς την γονιδιακή ενίσχυση του *EGFR*.

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η γνώση των γενετικών πληροφοριών ασθενών με ΜΜΚΠ έχει μεγάλη σημασία για τη λήψη της κατάλληλης θεραπευτικής επιλογής σε εξατομικευμένο επίπεδο. Στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα τα γονίδια *EGFR* και *KRAS* φέρουν συχνά μεταλλάξεις και ο προγνωστικός και προβλεπτικός τους ρόλος δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί. Ο στόχος αυτής της μελέτης ήταν να διερευνήσει την προβλεπτική αξία των μεταλλάξεων στα γονίδια *EGFR* και *KRAS* σε ασθενείς με προχωρημένο ΜΜΚΠ.

Η συχνότητα εμφάνισης των «κλασικών» *EGFR* σωματικών μεταλλάξεων έχει αναφερθεί ότι κυμαίνεται μεταξύ 3 - 13% και 30 - 40% σε πληθυσμούς Καυκάσιας και Ασιατικής καταγωγής, αντίστοιχα (Calvo and Baselga 2006, Shigematsu et al. 2005). Ωστόσο, λίγα είναι τα διαθέσιμα δεδομένα ως προς τα ποσοστά ανίχνευσης μεταλλάξεων σε ενδο-εθνότητες σε όλη την Ευρώπη. Μια μελέτη του 2006 σε 60 Έλληνες ασθενείς με ΜΜΚΠ, το ποσοστό των σωματικών *EGFR* μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκε ήταν 15% (Murray et al. 2006), ενώ σε μια άλλη μελέτη που συμπεριέλαβε 50 Έλληνες ασθενείς με καρκίνο αγνώστου πρωτοπαθούς αναφέρθηκαν δύο μεταλλάξεις (Dona et al. 2007). Στη παρούσα μελέτη, η ταυτοποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των εξώνων 18-21 του *EGFR* γονιδίου σε Έλληνες ασθενείς με ΜΜΚΠ απεκάλυψε την παρουσία «κλασικών» *EGFR* μεταλλάξεων σε ποσοστό 8.4% (53/634) που είναι σε συμφωνία με άλλες μελέτες (Dona et al. 2007, Murray et al. 2006), ενώ 47 (7.4%) ασθενείς έφεραν «άλλες» μεταλλάξεις.

Στην παρούσα μελέτη, οι γνωστές απαλοιφές νουκλεοτιδίων στο εξώνιο 19 ανιχνεύτηκαν σε ποσοστό 71%, ενώ η παρανοηματική μετάλλαξη L858R στο 22.6%. Οι μεταλλάξεις αυτές αποτελούν το 90% των ενεργοποιητικών μεταλλάξεων που ανιχνεύονται στο γονίδιο του *EGFR*. Τα ποσοστά αυτά είναι σε συμφωνία με τα δεδομένα από άλλους πληθυσμούς της Ευρώπης (del19 σε 62.2% και L858R σε 37.8%) (Rosell et al. 2009). Σχετικά με τις απαλοιφές στο εξώνιο 19, όλες ήταν εντός πλαισίου ανάγνωσης και αφορούσαν διαγραφές νουκλεοτιδίων γύρω από την περιοχή E746_S752. Αυτές οι απαλοιφές εντοπίζονται πολύ κοντά στο αμινοξύ K745, ένα πολύ καλά συντηρημένο αμινοξύ και ύψιστης σημασίας για τη δέσμευση του ATP στην περιοχή της τυροσινικής κινάσης (Pao et al. 2004).

Όσον αφορά τις «άλλες» μεταλλάξεις, ο Tsao και οι συνεργάτες του, σε μια παρόμοια μελέτη αναφέρουν επίσης υψηλή συχνότητα ανίχνευσης των «άλλων» *EGFR* μεταλλάξεων σε FFPE δείγματα μετά από μικροτόμηση (Tsao et al. 2005). Η μικροτόμηση σε δείγματα όγκου με χαμηλό ποσοστό ή/και άνιση κατανομή καρκινικών κυττάρων επιτρέπει την ανίχνευση μεταλλάξεων με υψηλότερη ευαισθησία. Αυτό θα μπορούσε να είναι ένας λόγος που να εξηγεί την συχνότητα των «άλλων» μεταλλάξεων που παρατηρήθηκε σε αυτή την μελέτη. Από την άλλη πλευρά, η μικρή ποσότητα αλλά και η προέλευση του DNA που χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο στην PCR θα μπορούσε να δημιουργήσει ψευδείς μεταλλάξεις (Do and Dobronic 2012). Ωστόσο, στην περίπτωση μας η τελευταία εκδοχή είναι απίθανη, δεδομένου ότι έγινε ταυτοποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του *EGFR* σε φυσιολογικό ιστό από 22 ασθενείς με *EGFR* μεταλλάξεις και δεν ανιχνεύθηκε καμία μετάλλαξη.

Στις μελέτες των Lynch (Lynch et al. 2004) και Paez (Paez et al. 2004), ανιχνεύθηκε μία μόνο μετάλλαξη ανά δείγμα όγκου. Ωστόσο, μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν την παρουσία περισσότερων από μία μεταλλάξεις ανά δείγμα όγκου (Huang et al. 2004, Murray et al. 2006, Pao et al. 2004, Taron et al. 2005). Στην παρούσα μελέτη, δυο *EGFR* μεταλλάξεις (στο ίδιο ή σε διαφορετικό εξώνιο) ανιχνεύθηκαν σε 9 ασθενείς, που αντιστοιχεί στο 8% (9/109) όλων των μεταλλάξεων και στο 1.4% όλων των ασθενών. Το παρατηρούμενο μοτίβο μεταλλάξεων δείχνει ότι οι σπάνιες μεταλλάξεις είναι δυνατόν να συνυπάρχουν με άλλες σπάνιες μεταλλάξεις, όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως από άλλες μελέτες (Gazdar et al. 2004), αλλά μπορεί να συνυπάρχουν με τις κλασσικές μεταλλάξεις, όπως είναι η L858R (με την E709K, L861P, V843I) ή η έλλειψη στο εξώνιο 19 (με την μετάλλαξη T790M) (Kobayashi et al. 2005). Επομένως, εκτός από τις κλασσικές ανιχνεύονται και άλλες λιγότερο συχνές μεταλλάξεις, διαμορφώνοντας διάφορα μοτίβα μεταλλάξεων. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με παρόμοιες μελέτες (Gazdar et al. 2004, Shigematsu et al. 2005, Kosaka et al. 2004), μάλιστα μια αναφέρει ότι τα μοτίβα των *EGFR* μεταλλάξεων είναι πιο σύνθετα σε ασθενείς Ανατολίτικης καταγωγής σε σχέση με τις άλλες εθνικότητες (Tam et al. 2006). Μέχρι τώρα, μόνο λίγοι τύποι μεταλλάξεων (κλασσικές) έχει αποδειχθεί ότι προσδίδουν επιπλέον δραστηριότητα στην τυροσινική κινάση και ευαισθησία στους αναστολείς της κινάσης του *EGFR* χρησιμοποιώντας in vitro μοντέλα (Lynch et al. 2004). Η λειτουργική σημασία των άλλων τύπων μεταλλάξεων δεν είναι πλήρως

κατανοητή και φυσικά δεν είναι όλες οι μεταλλάξεις ενεργοποιητικές. Επειδή το προφίλ μεταλλάξεων είναι δυνατόν να έχει σημαντικές θεραπευτικές συνέπειες, θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθεί η λειτουργικότητα των διαφόρων μονών και διπλών *EGFR* μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκαν και στην μελέτη αυτή για την καλύτερη εκτίμηση και πρόβλεψη του κλινικού οφέλους της θεραπείας με TKI.

Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *EGFR* εμφανίζονται συχνότερα στα αδενοκαρκινώματα, στις γυναίκες και στους ασθενείς χωρίς ιστορικό καπνίσματος (Πίνακας 21). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με παρόμοιες μελέτες και επιβεβαιώνουν την παρουσία ενός διαφορετικού βιολογικού προφίλ, αντίθετο από αυτό που περιγράφεται στον καρκίνο του πνεύμονα που οφείλεται στην έκθεση καπνού (Shigematsu et al. 2005). Παρά το γεγονός αυτό, μια σημαντική μειοψηφία (5.8%, 14/240) των πρώην και νυν καπνιστών φέρει *EGFR* μεταλλάξεις στους όγκους τους, εύρημα που έρχεται σε αντίθεση με την εξαίρεση των καπνιστών από τον έλεγχο ανίχνευσης μεταλλάξεων στο γονίδιο του *EGFR*.

Η συχνότητα ανίχνευσης *KRAS* μεταλλάξεων στα κωδικόνια 12 και 13 είναι 20.8% μεταξύ των 399 δειγμάτων που αναλύθηκαν. Αυτό συμφωνεί με την μελέτη του Huncharek και των συνεργατών του (Huncharek et al. 1999), όπου συγκέντρωσαν τα αποτελέσματα πολλών μελετών και υπολόγισαν ότι η συχνότητα εμφάνισης των *KRAS* μεταλλάξεων στους Καυκάσιους είναι περίπου 25%, ενώ στους Ασιάτες 8% (Wang et al. 1998). Όπως ήταν αναμενόμενο, οι περισσότερες *KRAS* μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν στους πρώην και νυν καπνιστές και σύμφωνα με άλλες μελέτες (Mao et al. 2010) διαπιστώθηκε ότι το 8.8% των μη καπνιστών έφεραν *KRAS* μεταλλάξεις. Επίσης βρέθηκε ότι οι *KRAS* μεταλλάξεις σχετίζονται με τον ιστολογικό τύπο, αδενοκαρκίνωμα. Αν και στις περισσότερες μελέτες, η ανίχνευση των *KRAS* μεταλλάξεων φαίνεται να αποκλείει τις *EGFR*, γεγονός που υποδηλώνει την παρουσία των διαφορετικών μονοπατιών στην καρκινογένεση του πνεύμονα, τα δεδομένα μας δείχνουν ότι οι *KRAS* μεταλλάξεις μπορεί, σε σπάνιες περιπτώσεις, να συνυπάρχουν με μεταλλάξεις του *EGFR* (0.9%) πράγμα που συμφωνεί με προηγούμενη μελέτη (Han et al. 2006).

Πέραν από την εύρεση του ποσοστού και του είδους των μεταλλάξεων σε Έλληνες ασθενείς με MMKP, στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η προβλεπτική αξία των μεταλλάξεων σε υποομάδα 162 ασθενών του αρχικού πληθυσμού που έλαβαν ως

πρώτη γραμμή χημειοθεραπεία. Τα δεδομένα αποδεικνύουν ότι η ανταπόκριση στην χημειοθεραπεία ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στους ασθενείς που έφεραν «κλασσικές» ενεργοποιητικές *EGFR* μεταλλάξεις (55,6%) σε σύγκριση με την ανταπόκριση των ασθενών χωρίς *EGFR* μεταλλάξεις (21,8%). Επιπλέον, η παρουσία των κλασσικών ενεργοποιητικών *EGFR* μεταλλάξεων φαίνεται να αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα ανταπόκρισης στην πρώτη γραμμή χημειοθεραπείας. Αντιθέτως, οι *KRAS* μεταλλάξεις δεν σχετίζονται με την ανταπόκριση στην πρώτη γραμμή χημειοθεραπείας. Ομοίως, μια άλλη μελέτη έδειξε ότι μεταξύ των ασθενών που φέρουν *EGFR* μεταλλάξεις, οι μόνοι που ανταποκρίθηκαν στη χημειοθεραπεία ήταν εκείνοι που έφεραν απαλοιφές στο εξόνιο 19 (Cappuzzo et al. 2007).

Εφόσον οι μεταλλάξεις των γονιδίων *EGFR* και *KRAS* αποτελούν δείκτες ευαισθησίας και μη ανταπόκρισης στους αναστολείς του EGFR (TKIs), αντίστοιχα, το εύρημα αυτό έχει σημαντικές επιπτώσεις στο σχεδιασμό των κλινικών δοκιμών που θα συγκρίνουν τους αναστολείς του EGFR (TKIs) με την συμβατική χημειοθεραπεία. Επιπλέον, τα ευρήματά μας δείχνουν ότι η παρουσία των *EGFR* και *KRAS* μεταλλάξεων δεν σχετίζεται με τον χρόνο μέχρι την υποτροπή στην πρώτη γραμμή χημειοθεραπεία. Ο Hotta και οι συνεργάτες του (Hotta et al. 2007) έδειξαν ότι οι *EGFR* μεταλλάξεις σχετίζονται σημαντικά με καλύτερη επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου (PFS) σε 54 Ιάπωνες ασθενείς με προχωρημένο ΜΜΚΠ που έλαβαν πρώτη γραμμή χημειοθεραπεία, ενώ δεν βρήκαν συσχέτιση μεταξύ της αντικειμενικής ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία και την παρουσίας *EGFR* μεταλλάξεων. Ωστόσο, προηγούμενες μελέτες στο ΜΜΚΠ έδειξαν ότι η παρουσία *EGFR* ή *KRAS* μεταλλάξεων δεν σχετίζεται με την ανταπόκριση και την επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου των ασθενών που έλαβαν χημειοθεραπεία (Lee et al. 2005, Takano et al. 2008).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αποδεικνύουν επίσης ότι η παρουσία των «κλασσικών» ενεργοποιητικών *EGFR* μεταλλάξεων και όχι των *KRAS* σχετίζεται με σημαντική βελτίωση της επιβίωσης των ασθενών με προχωρημένο ΜΜΚΠ (Εικόνα 20Α). Ωστόσο, πρέπει να αναφερθεί ότι επειδή η χημειοθεραπεία και οι αναστολείς της τυροσινικής κινάσης του EGFR χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικά σε μία υποομάδα ασθενών (επτά ασθενείς έφεραν «κλασσικές» *EGFR* μεταλλάξεις και 58 ήταν αγρίου τύπου για το *EGFR* γονίδιο) είναι ασαφές εάν η μεγαλύτερη επιβίωση οφειλόταν στο υψηλότερο ποσοστό απόκρισης που επιτεύχθηκε με την

χημειοθεραπεία λόγω παρουσίας των *EGFR* μεταλλάξεων ή λόγω χορήγησης των αναστολέων ή αμφότερα. Πράγματι, η χορήγηση των αναστολέων (gefitinib) συνδέθηκε με ένα σημαντικό όφελος επιβίωσης σε ασθενείς που έφεραν «κλασσικές» ενεργοποιητικές *EGFR* μεταλλάξεις, αλλά όχι σε ασθενείς με *KRAS* μεταλλάξεις (Εικόνα 20Γ & Δ).

Πρόσφατα, μια άλλη μελέτη (Marks et al. 2008) έδειξε ότι, σε περίπτωση μη χορήγησης *EGFR*-στοχευμένης θεραπείας, οι ασθενείς με ΜΜΚΠ πρώιμου σταδίου και μεταλλάξεις στους όγκους τους έχουν 90% (95% CI: 70-97%) τριετή συνολική επιβίωση σε σύγκριση με το 66% (95 % CI: 48-79%) για τους ασθενείς με *KRAS* μεταλλάξεις στους όγκους, αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα ότι ένα γενετικά καθορισμένο υποσύνολο ασθενών με ΜΜΚΠ μπορεί να έχει μια πιο ευνοϊκή φυσική πορεία. Ομοίως, παλαιότερες αναλύσεις δείχνουν ότι οι *EGFR* μεταλλάξεις σχετίζονται με την επιβίωση, ανεξάρτητα από το είδος της χορηγούμενης θεραπείας, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι μεταλλάξεις του *EGFR* μπορεί να αποτελούν καλό προγνωστικό παράγοντα επιβίωσης σε ασθενείς με προχωρημένο ΜΜΚΠ (Bell et al. 2005, Eberhard et al. 2005). Ο Kosaka και οι συνεργάτες του (Kosaka et al. 2009) έδειξαν ότι οι Ιάπωνες ασθενείς με *EGFR* μεταλλάξεις επέζησαν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από εκείνους που δεν έφεραν, αλλά οι μεταλλάξεις *EGFR* δεν αποτέλεσαν ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για τους ασθενείς αυτούς. Επίσης, άλλες μελέτες δεν θα μπορούσε να αποδείξει μια σημαντική διαφορά στη συνολική επιβίωση ανάλογα με την παρουσία *EGFR* μεταλλάξεων, τον αριθμό αντιγράφων του *EGFR* γονιδίου ή την έκφραση του *EGFR* (Dziadziuszko et al. 2007, Shigematsu et al. 2005).

Διαφορές μεταξύ των μελετών σχετικά με την προγνωστική αξία των *EGFR* μεταλλάξεων θα μπορούσε να εξηγηθούν, τουλάχιστον εν μέρει, από μια πιθανή συσχέτιση μεταξύ των *EGFR* μεταλλάξεων και της αποτελεσματικότητας της χημειοθεραπείας. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι οι *EGFR* μεταλλάξεις μπορεί αποτελούν καλό προβλεπτικό δείκτη σε θεραπεία με gefitinib και docetaxel (Douillard et al. 2007, Sekine et al. 2007). Στην παρούσα μελέτη, οι περισσότεροι από τους ασθενείς με *EGFR* μεταλλάξεις έλαβαν χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα και σε αυτή την υποομάδα των ασθενών, οι *EGFR* μεταλλάξεις συσχετίστηκαν με σημαντικά μεγαλύτερη επιβίωση.

Συμπερασματικά, τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι οι ενεργοποιητικές *EGFR* μεταλλάξεις σχετίζονται με καλύτερη ανταπόκριση στην πρώτη γραμμή χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα και μπορεί επίσης να αποτελούν καλό προγνωστικό παράγοντα σε ασθενείς με προχωρημένο ΜΜΚΠ. Ωστόσο, η παρούσα μελέτη έχει κάποιους περιορισμούς, δεδομένου ότι αντιπροσωπεύει αναδρομική ανάλυση μιας ομάδας ασθενών από ένα ακαδημαϊκό ίδρυμα και το μέγεθος δείγματος που περιλαμβάνει είναι σχετικά μικρό. Στο μέλλον θα χρειαστούν σχεδιασμένες μελέτες για να επιβεβαιώσουν τα ευρήματά μας.

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι οι ενεργοποιητικές μεταλλάξεις στα εξόνια 18, 19 και 21 του *EGFR* γονιδίου σχετίζονται με το 75% - 95% της αντικειμενικής απόκρισης στους αναστολείς TKIs του *EGFR*, ενώ οι *KRAS* μεταλλάξεις συνδέονται με μειωμένη ευαισθησία σε αυτούς τους παράγοντες (Pao et al. 2005b, Sharma et al. 2007). Αντιθέτως, σε κλινικές μελέτες, έχει δειχθεί ότι ένα σημαντικό ποσοστό των ασθενών με κλινικό όφελος της θεραπείας με TKIs δεν σχετίζεται με την παρουσία μεταλλάξεων του *EGFR* (Sharma et al. 2007). Ωστόσο, από όλους ασθενείς που διαγιγνώσκονται με ΜΜΚΠ, το 65-75% έχει προχωρημένη νόσο, που σημαίνει ότι οι ασθενείς έχουν αναπτύξει μεταστάσεις κατά την αρχική διάγνωση ή αναπτύσσουν στην πορεία της νόσου. Στις περισσότερες μελέτες, η παρουσία *EGFR* και *KRAS* μεταλλάξεων εξετάστηκε στον πρωτοπαθή όγκο, αλλά έχει δειχθεί ότι ο καρκίνος του πνεύμονα συχνά παρουσιάζει ετερογένεια σε μοριακό επίπεδο, ακόμη και εντός του ίδιου όγκου. Επιπλέον, τα μοριακά χαρακτηριστικά μπορεί να διαφέρουν μεταξύ του πρωτοπαθούς όγκου και της μετάστασης. Το κλασικό μοντέλο που εξηγεί την μεταστατική διαδικασία προτείνει ότι τα περισσότερα κύτταρα ενός δεδομένου πρωτοπαθούς όγκου έχουν χαμηλό μεταστατικό δυναμικό και μόνο μερικά κύτταρα αποκτούν αρκετές σωματικές μεταλλάξεις ώστε να γίνουν μεταστατικά (Bernards and Weinberg 2002). Επομένως, είναι σημαντικό να εξακριβωθεί ο βαθμός συσχέτισης μεταξύ των πρωτοπαθών όγκων και των αντίστοιχων μεταστάσεων σε σχέση με το πρότυπο των *EGFR* και *KRAS* μεταλλάξεων για την επιλογή ασθενών οι οποίοι είναι πιθανότερο να επωφεληθούν από τη θεραπεία με τους αναστολείς TKI του *EGFR*. Επιπλέον, είναι πιθανόν αυτή η ασυμφωνία να αποτελεί μια ερμηνεία στο παρατηρούμενο κλινικό όφελος ασθενών χωρίς *EGFR* μεταλλάξεις ή στην έλλειψη ανταπόκρισης σε ασθενείς με μεταλλάξεις.

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η παρουσία των *EGFR* και *KRAS* μεταλλάξεων σε 25 ζεύγη πρωτοπαθών όγκων ΜΜΚΠ και των αντίστοιχων μεταστάσεων τους, ώστε να διερευνηθεί εάν το πρότυπο των *EGFR* και *KRAS* μεταλλάξεων άλλαξε κατά την διάρκεια της προόδου της νόσου. Έτσι διαπιστώθηκε ότι οι μεταστάσεις δεν έχουν πάντα το ίδιο πρότυπο μεταλλάξεων με τον αντίστοιχο πρωτοπαθή όγκο. Σύμφωνα με τα ευρήματά μας, η ασυμφωνία, του πρωτοπαθούς όγκου και της αντίστοιχης μετάστασης, ως προς την παρουσία των *EGFR* και *KRAS* μεταλλάξεων ήταν 28% και 24%, αντίστοιχα. Επίσης, δύο άλλες παρόμοιες μελέτες σε όγκους ΜΜΚΠ βρήκαν ασυμφωνία 32% και 27% όμως όσον αφορά την γονιδιακή ενίσχυση του *EGFR* (Italiano et al. 2006, Bozzetti et al. 2008). Από όσο γνωρίζουμε υπάρχουν και πιο πρόσφατες παρόμοιες μελέτες, που αναφέρουν μικρότερα ποσοστά ασυμφωνίας. Παραδείγματος χάριν, η ομάδα του Schmid εξετάζοντας 96 ασθενείς, ανέφερε ότι το προφίλ των *EGFR* και *KRAS* μεταλλάξεων στους πρωτοπαθείς όγκους και τις αντίστοιχες μεταστάσεις λεμφαδένων διέφερε σε 6 (6,25%) και 25 (26%) ασθενείς, αντιστοίχως (Schmid et al. 2009), ενώ η Sun και οι συνεργάτες της μελετώντας 80 Κινέζους ασθενείς με ΜΜΚΠ, αναφέρουν ότι το προφίλ των *EGFR* και *KRAS* μεταλλάξεων στους πρωτοπαθείς όγκους και τους αντίστοιχους τοπικούς λεμφαδένες διαφέρει σε 6 (7.5%) και 7 (8.75%) περιπτώσεις, αντίστοιχα (Sun et al. 2011).

Από την άλλη πλευρά, μια άλλη μελέτη που περιέλαβε έξι ασθενείς με ΜΜΚΠ, Ασιατικής καταγωγής ανέφερε συμφωνία 100% ως προς την παρουσία *EGFR* μεταλλάξεων (Matsumoto et al. 2006). Αυτή η διαφορά μπορεί να σχετίζεται με τις διαφορετικά θέσεις των μεταστατικών όγκων που αναλύθηκαν στην παρούσα μελέτη (πέντε διαφορετικές απομακρυσμένες μεταστάσεις), ενώ η μελέτη του Matsumoto συμπεριέλαβε δείγματα όγκων μόνο από εγκεφαλικές μεταστάσεις (Matsumoto et al. 2006). Είναι πιθανόν οι διαφορετικές θέσεις της μετάστασης στον ΜΜΚΠ να αντιπροσωπεύουν την ανάπτυξη διαφορετικών κλώνων. Εναλλακτικά, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε ότι η αιτία για αυτή τη διαφορά θα μπορούσε να είναι η διαφορετική εθνικότητα των ασθενών ή / και τα διαφορετικά είδη των *EGFR* μεταλλάξεων (Tsao et al. 2006, Pallis et al. 2007). Στην παρούσα μελέτη, όπου περιλαμβάνονται μόνο Καυκάσιοι ασθενείς, ανιχνεύθηκαν τρεις κλασσικές ενεργοποιητικές (Del19 και E746V) και τέσσερις μη-κλασσικές *EGFR* μεταλλάξεις

(T847A, L692PV717A, L692P και G857E), ενώ στην μελέτη του Matsumoto αναφέρονται μόνο οι κλασσικές ενεργοποιητικές μεταλλάξεις (Del19 και L858R) του *EGFR* (Matsumoto et al. 2006). Όσον αφορά τις μη-κλασσικές μεταλλάξεις, είναι απίθανο να αποτελούν λάθος του ενζύμου κατά την αντίδραση της PCR, καθώς οι *EGFR* μεταλλάξεις L692F, T847I και G857E έχουν αναφερθεί στο παρελθόν (Fujimoto et al. 2005, Hsieh et al. 2006, Tsao et al. 2005). Ο χρόνος που έχει μεσολαβήσει μεταξύ της διάγνωσης του πρωτοπαθούς όγκου και της αντίστοιχης μετάστασης στους ασθενείς (περίπτωση 13 και 12, Πίνακας 28) που φέρουν τις προαναφερθείσες μεταλλάξεις ήταν 74.5 και 10 μήνες, αντίστοιχα. Επομένως, η απόκτηση νέων μεταλλάξεων μπορούν να αναπτυχθούν κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της μεταστατικής διαδικασίας.

Η χορήγηση των αναστολέων TKIs θα μπορούσε να αποτελεί μια πρόσθετη εξήγηση της παρατηρούμενης ασυμφωνίας των *EGFR* μεταλλάξεων. Τρεις από τους 25 ασθενείς έλαβαν gefitinib πριν από την ανάπτυξη της μετάχρονης μετάστασης, ενώ στη μελέτη του Matsumoto κανένας από τους ασθενείς δεν έλαβε ως θεραπεία αναστολείς TKIs (Matsumoto et al. 2006). Επίσης είναι γνωστό ότι σε ασθενείς με ΜΜΚΠ που έχουν *EGFR*-εξαρτώμενους πρωτοπαθείς όγκους και λαμβάνουν ως θεραπεία TKIs, μπορούν να αναπτύξουν μεταστάσεις, όπου το μονοπάτι σηματοδότησης του *EGFR* να αναιρείται ή να αποκτάται αντίσταση λόγω παρουσίας δευτερευόντων *EGFR* μεταλλάξεων, όπως είναι η μετάλλαξη T790M ή λόγω γονιδιακής ενίσχυσης του *MET* (Daneshmand et al. 2003, Engelman et al. 2007, Gazdar and Minna 2005, Lutterbach et al. 2007). Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι στους ασθενείς που δεν έλαβαν TKIs πριν την βιοψία των μεταστάσεων, παρατηρήθηκε ασυμφωνία 18% (4 από 22 ασθενείς) μεταξύ των πρωτοπαθών όγκων και των αντίστοιχων μεταστάσεων. Ωστόσο, μια τελική εξήγηση της παρατηρούμενης ασυμφωνίας, η οποία δεν μπορεί να μην θεωρηθεί σημαντική, αφορά την ετερογένεια εμφάνισης χαμηλής συχνότητας *EGFR* μεταλλάξεων στον όγκο (Sakurada et al. 2008).

Τα ευρήματά μας σχετικά με το πρότυπο των *KRAS* μεταλλάξεων είναι σε συμφωνία με μια προηγούμενη μελέτη που αποδεικνύει ότι οι *KRAS* μεταλλάξεις του πρωτοπαθούς όγκου δεν προβλέπουν πάντοτε την ύπαρξη μεταλλάξεων στις οστικές μεταστάσεις του ΜΜΚΠ (Badalian et al. 2007) ή στις μεταστάσεις λεμφαδένων

(Schmid et al. 2009). Επίσης, ο Monaco και οι συνεργάτες του συγκρίνοντας 40 ζεύγη πρωτοπαθών όγκων του πνεύμονα με τις αντίστοιχες μεταστάσεις τους βρήκαν ασυμφωνία σε εννέα περιπτώσεις (22.5%), ως προς την παρουσία *KRAS* μεταλλάξεων (Monaco et al. 2010). Παρόμοια ποσοστά έχουν επίσης αναφερθεί σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου (Tortola et al. 2001). Μολονότι οι *KRAS* μεταλλάξεις φαίνεται να σχετίζονται με πρώιμη ανάπτυξη του ΜΜΚΠ, είναι επίσης πιθανόν οι μεταλλάξεις αυτές χάνονται αργότερα κατά τη διάρκεια εξέλιξης του όγκου (Burmer and Loeb 1989, Li et al. 1994). Αυτό μπορεί εν μέρει να εξηγήσει την ασυμφωνία της παρουσίας *KRAS* μεταλλάξεων μεταξύ πρωτοπαθών όγκων και μετάχρονων μεταστάσεων.

Μια άλλη εξήγηση της παρατηρούμενης ασυμφωνίας ως προς το πρότυπο των *EGFR* και *KRAS* μεταλλάξεων θα μπορούσε να σχετίζεται με τη χορηγούμενη χημειοθεραπεία. Ωστόσο, όπως φαίνεται στον Πίνακα 28, μεταξύ των 10 ασθενών που δεν είχαν λάβει καμία θεραπεία πριν την βιοψία της μεταστατικής εστίας, αναπτύχθηκαν πέντε μεταστάσεις με διαφορετικό πρότυπο μεταλλάξεων από εκείνο των αντίστοιχων πρωτοπαθών όγκων. Έτσι, αν και η επιλογή καρκινικών κλώνων λόγω των διαφορετικών θεραπειών θα μπορούσε να είναι μια εξήγηση για το διαφορετικό μοριακό μοτίβο στον πρωτοπαθή όγκο και στην μετάσταση, τα ευρήματά μας υποδεικνύουν ότι ο γονότυπος της μετάσταση μπορεί να είναι διαφορετικός από εκείνον του αντίστοιχου πρωτοπαθούς όγκου ανεξάρτητα από την χημειοθεραπεία που χορηγήθηκε.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι οι *EGFR* και *KRAS* μεταλλάξεις αποκλείουν η μια την άλλη, υποδηλώνοντας διαφορετικές οδούς στην καρκινογένεση του πνεύμονα. Ωστόσο, όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα στοιχεία μας δείχνουν ότι οι *KRAS* μεταλλάξεις μπορεί να συνυπάρχουν με τις μεταλλάξεις του *EGFR* (Fujimoto et al. 2005, Han et al. 2006). Μεταξύ των πέντε ασθενών που έφεραν *EGFR* μεταλλάξεις στον πρωτοπαθή τους όγκο, ένας ασθενής ταυτόχρονα είχε μετάλλαξη και στο *KRAS* γονίδιο (G12C και απαλοιφή στο εξόνιο 19 του *EGFR*). Στην μετάχρονη μετάσταση ανιχνεύτηκε μόνο η *KRAS* μετάλλαξη. Ο ασθενής αυτός έλαβε gefitinib μετά την βιοψία της μετάστασης και είχε σταθερή νόσο για 3.5 μήνες. Η περιορισμένη διάρκεια της ανταπόκρισης είναι συμβατή με τη γνώση ότι η παρουσία των *KRAS* μεταλλάξεις σχετίζονται με αντοχή στους TKIs.

Εν κατακλείδι, τα ευρήματά μας δείχνουν ασυμφωνία ως προς το πρότυπο των *EGFR* και *KRAS* μεταλλάξεων μεταξύ του πρωτοπαθούς όγκου και της αντίστοιχης μετάστασης σε ασθενείς με ΜΜΚΠ και αυτό μπορεί να έχει θεραπευτικές επιπτώσεις στην στοχευμένη θεραπεία με αναστολείς του *EGFR*. Για τους ασθενείς με μεταστάσεις θα πρέπει να εξετάζεται η παρουσία *KRAS* και *EGFR* μεταλλάξεων τόσο στον πρωτοπαθή όγκο όσο και στην μετάσταση για τη λήψη ουσιαστικών αποφάσεων σχετικά με την κατάλληλη χρήση των στοχευμένων θεραπειών.

Ο καρκίνος του πνεύμονα μπορεί να είναι μία νόσος, έχει όμως ποικίλα πρόσωπα και σίγουρα ο κάθε ασθενής είναι μοναδικός. Τα μέχρι σήμερα δεδομένα υποδεικνύουν την επιτακτική ανάγκη αλλαγής νοοτροπίας στη θεραπευτική προσέγγιση των ασθενών με προχωρημένο καρκίνο του πνεύμονα. Η εξατομικευμένη αντιμετώπιση δημιουργεί νέες απαιτήσεις, όπως η αξιολόγηση συγκεκριμένων κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών, η ιστολογική ταυτοποίηση και η περαιτέρω μοριακή ανάλυση του όγκου, έχοντας ως απώτερο στόχο την επιλογή της πλέον ενδεδειγμένης θεραπείας για την ουσιαστική αύξηση της επιβίωσης των ασθενών.

Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ahrendt, S. A., P. A. Decker, E. A. Alawi, Y. R. Zhu Yr, M. Sanchez-Cespedes, S. C. Yang, G. B. Haasler, A. Kajdacsy-Balla, M. J. Demeure & D. Sidransky (2001) Cigarette smoking is strongly associated with mutation of the K-ras gene in patients with primary adenocarcinoma of the lung. *Cancer*, 92, 1525-30.
- Akerley, W., K. M. Boucher, J. S. Bentz, K. Arbogast & T. Walters (2009) A phase II study of erlotinib as initial treatment for patients with stage IIIB-IV non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 4, 214-9.
- Amador, M. L., D. Oppenheimer, S. Perea, A. Maitra, G. Cusatis, C. Iacobuzio-Donahue, S. D. Baker, R. Ashfaq, C. Takimoto, A. Forastiere & M. Hidalgo (2004) An epidermal growth factor receptor intron 1 polymorphism mediates response to epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cancer Res*, 64, 9139-43.
- Amann, J., S. Kalyankrishna, P. P. Massion, J. E. Ohm, L. Girard, H. Shigematsu, M. Peyton, D. Juroske, Y. Huang, J. Stuart Salmon, Y. H. Kim, J. R. Pollack, K. Yanagisawa, A. Gazdar, J. D. Minna, J. M. Kurie & D. P. Carbone (2005) Aberrant epidermal growth factor receptor signaling and enhanced sensitivity to EGFR inhibitors in lung cancer. *Cancer Res*, 65, 226-35.
- Anderson, M. W., S. H. Reynolds, M. You & R. M. Maronpot (1992) Role of proto-oncogene activation in carcinogenesis. *Environ Health Perspect*, 98, 13-24.
- Arao, T., H. Fukumoto, M. Takeda, T. Tamura, N. Saijo & K. Nishio (2004) Small in-frame deletion in the epidermal growth factor receptor as a target for ZD6474. *Cancer Res*, 64, 9101-4.
- Arteaga, C. L. (2002) Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? *Oncologist*, 7 Suppl 4, 31-9.
- Badalian, G., T. Barbai, E. Raso, K. Derecskei, M. Szendroi & J. Timar (2007) Phenotype of bone metastases of non-small cell lung cancer: epidermal growth factor receptor expression and K-RAS mutational status. *Pathol Oncol Res*, 13, 99-104.
- Barbacid, M. (1990) ras oncogenes: their role in neoplasia. *Eur J Clin Invest*, 20, 225-35.
- Batzer, A. G., D. Rotin, J. M. Urena, E. Y. Skolnik & J. Schlessinger (1994) Hierarchy of binding sites for Grb2 and Shc on the epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol*, 14, 5192-201.
- Beckles, M. A., S. G. Spiro, G. L. Colice & R. M. Rudd (2003) Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes. *Chest*, 123, 97S-104S.
- Bell, D. W., T. J. Lynch, S. M. Hasserlat, P. L. Harris, R. A. Okimoto, B. W. Brannigan, D. C. Sgroi, B. Muir, M. J. Riemenschneider, R. B. Iacona, A. D. Krebs, D. H. Johnson, G. Giaccone, R. S. Herbst, C. Manegold, M. Fukuoka, M. G. Kris, J. Baselga, J. S. Ochs & D. A. Haber (2005) Epidermal growth factor receptor mutations and gene amplification in non-small-cell lung cancer: molecular analysis of the IDEAL/INTACT gefitinib trials. *J Clin Oncol*, 23, 8081-92.
- Bernards, R. & R. A. Weinberg (2002) A progression puzzle. *Nature*, 418, 823.
- Bhargava, R., W. L. Gerald, A. R. Li, Q. Pan, P. Lal, M. Ladanyi & B. Chen (2005) EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations. *Mod Pathol*, 18, 1027-33.
- Bleeker, W. K., J. J. Lammerts van Bueren, H. H. van Ojik, A. F. Gerritsen, M. Pluyter, M. Houtkamp, E. Halk, J. Goldstein, J. Schuurman, M. A. van Dijk, J. G. van de Winkel & P. W. Parren (2004) Dual mode of action of a human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for cancer therapy. *J Immunol*, 173, 4699-707.
- Bos, J. L. (1989) ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*, 49, 4682-9.

- Bozzetti, C., M. Tiseo, C. Lagrasta, R. Nizzoli, A. Guazzi, F. Leonardi, D. Gasparro, E. Spiritelli, M. Rusca, P. Carbognani, M. Majori, V. Franciosi, G. Rindi & A. Ardizzoni (2008) Comparison between epidermal growth factor receptor (EGFR) gene expression in primary non-small cell lung cancer (NSCLC) and in fine-needle aspirates from distant metastatic sites. *J Thorac Oncol*, 3, 18-22.
- Bray, F. I. & E. Weiderpass (2010) Lung cancer mortality trends in 36 European countries: secular trends and birth cohort patterns by sex and region 1970-2007. *Int J Cancer*, 126, 1454-66.
- Broermann, P., K. Junker, B. H. Brandt, A. Heinecke, L. Freitag, F. Klinke, W. E. Berdel & M. Thomas (2002) Trimodality treatment in Stage III nonsmall cell lung carcinoma: prognostic impact of K-ras mutations after neoadjuvant therapy. *Cancer*, 94, 2055-62.
- Bromberg, J. (2002) Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest*, 109, 1139-42.
- Burgess, A. W., H. S. Cho, C. Eigenbrot, K. M. Ferguson, T. P. Garrett, D. J. Leahy, M. A. Lemmon, M. X. Sliwkowski, C. W. Ward & S. Yokoyama (2003) An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell*, 12, 541-52.
- Burmer, G. C. & L. A. Loeb (1989) Mutations in the KRAS2 oncogene during progressive stages of human colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 2403-7.
- Cadranel, J., E. Quoix, L. Baudrin, P. Mourlanette, D. Moro-Sibilot, J. F. Morere, P. J. Souquet, J. C. Soria, F. Morin & B. Milleron (2009) IFCT-0401 Trial: a phase II study of gefitinib administered as first-line treatment in advanced adenocarcinoma with bronchioloalveolar carcinoma subtype. *J Thorac Oncol*, 4, 1126-35.
- Cai, Y. C., Z. Jiang, F. Vittimberga, X. Xu, L. Savas, B. Woda, M. Callery & B. Banner (1999) Expression of transforming growth factor- α and epidermal growth factor receptor in gastrointestinal stromal tumours. *Virchows Arch*, 435, 112-5.
- Calvo, E. & J. Baselga (2006) Ethnic differences in response to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *J Clin Oncol*, 24, 2158-63.
- Campbell, S. L., R. Khosravi-Far, K. L. Rossman, G. J. Clark & C. J. Der (1998) Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene*, 17, 1395-413.
- Cappuzzo, F., C. Ligorio, L. Toschi, E. Rossi, R. Trisolini, D. Paioli, E. Magrini, G. Finocchiaro, S. Bartolini, A. Cancellieri, F. R. Hirsch, L. Crino & M. Varella-Garcia (2007) EGFR and HER2 gene copy number and response to first-line chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Thorac Oncol*, 2, 423-9.
- Carpenter, C. L., K. R. Auger, M. Chanudhuri, M. Yoakim, B. Schaffhausen, S. Shoelson & L. C. Cantley (1993) Phosphoinositide 3-kinase is activated by phosphopeptides that bind to the SH2 domains of the 85-kDa subunit. *J Biol Chem*, 268, 9478-83.
- Carpenter, G. (1987) Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Annu Rev Biochem*, 56, 881-914.
- Carpenter, G. & S. Cohen (1990) Epidermal growth factor. *J Biol Chem*, 265, 7709-12.
- Chang, Y. L., C. T. Wu, J. Y. Shih & Y. C. Lee (2011) EGFR and p53 status of pulmonary pleomorphic carcinoma: implications for EGFR tyrosine kinase inhibitors therapy of an aggressive lung malignancy. *Ann Surg Oncol*, 18, 2952-60.
- Chattopadhyay, A., M. Vecchi, Q. Ji, R. Mernaugh & G. Carpenter (1999) The role of individual SH2 domains in mediating association of phospholipase C- γ 1 with the activated EGF receptor. *J Biol Chem*, 274, 26091-7.
- Chen, Z., J. Feng, J. S. Saldivar, D. Gu, A. Bockholt & S. S. Sommer (2008) EGFR somatic doublets in lung cancer are frequent and generally arise from a pair of driver mutations uncommonly seen as singlet mutations: one-third of doublets occur at five pairs of amino acids. *Oncogene*, 27, 4336-43.
- Chiba, I., T. Takahashi, M. M. Nau, D. D'Amico, D. T. Curiel, T. Mitsudomi, D. L. Buchhagen, D. Carbone, S. Piantadosi, H. Koga & et al. (1990) Mutations in the p53 gene are

- frequent in primary, resected non-small cell lung cancer. Lung Cancer Study Group. *Oncogene*, 5, 1603-10.
- Chung, J. H., G. Choe, S. Jheon, S. W. Sung, T. J. Kim, K. W. Lee, J. H. Lee & C. T. Lee (2009) Epidermal growth factor receptor mutation and pathologic-radiologic correlation between multiple lung nodules with ground-glass opacity differentiates multicentric origin from intrapulmonary spread. *J Thorac Oncol*, 4, 1490-5.
- Citri, A., K. B. Skaria & Y. Yarden (2003) The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res*, 284, 54-65.
- Cohen, P. (2001) The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture. *Eur J Biochem*, 268, 5001-10.
- Cohen, S., H. Ushiro, C. Stoscheck & M. Chinkers (1982) A native 170,000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasma membrane vesicles. *J Biol Chem*, 257, 1523-31.
- Costa, D. B., B. Halmos, A. Kumar, S. T. Schumer, M. S. Huberman, T. J. Boggon, D. G. Tenen & S. Kobayashi (2007) BIM mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in lung cancers with oncogenic EGFR mutations. *PLoS Med*, 4, 1669-79; discussion 1680.
- Cragg, M. S., J. Kuroda, H. Puthalakath, D. C. Huang & A. Strasser (2007) Gefitinib-induced killing of NSCLC cell lines expressing mutant EGFR requires BIM and can be enhanced by BH3 mimetics. *PLoS Med*, 4, 1681-89; discussion 1690.
- D'Amico, D., D. Carbone, T. Mitsudomi, M. Nau, J. Fedorko, E. Russell, B. Johnson, D. Buchhagen, S. Bodner, R. Phelps & et al. (1992) High frequency of somatically acquired p53 mutations in small-cell lung cancer cell lines and tumors. *Oncogene*, 7, 339-46.
- Daneshmand, M., D. A. Parolin, H. W. Hirte, P. Major, G. Goss, D. Stewart, G. Batist, W. H. Miller, Jr., S. Matthews, L. Seymour & I. A. Lorimer (2003) A pharmacodynamic study of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 in metastatic colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res*, 9, 2457-64.
- de Bono, J. S. & E. K. Rowinsky (2002) The ErbB receptor family: a therapeutic target for cancer. *Trends Mol Med*, 8, S19-26.
- Do, H. & A. Dobrovic (2012) Dramatic reduction of sequence artefacts from DNA isolated from formalin-fixed cancer biopsies by treatment with uracil- DNA glycosylase. *Oncotarget*, 3, 546-58.
- Douillard, J. Y., E. Kim, V. Hirsh, T. Mok, M. Socinski, R. Gervais, Y. L. Wu, L. Y. Li, M. Sellers & E. Lowe (2007) Gefitinib (IRESSA) versus docetaxel in patients with locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer pre-treated with platinum-based chemotherapy: a randomized, open-label Phase III study (INTEREST). *Journal of Thoracic Oncology*, 2, S305-S306.
- Dova, L., G. Pentheroudakis, I. Georgiou, V. Malamou-Mitsi, G. Vartholomatos, G. Fountzilas, N. Kolaitis, E. Kitsiou & N. Pavlidis (2007) Global profiling of EGFR gene mutation, amplification, regulation and tissue protein expression in unknown primary carcinomas: to target or not to target? *Clin Exp Metastasis*, 24, 79-86.
- Dziadziuszko, R., B. Holm, B. G. Skov, K. Osterlind, M. V. Sellers, W. A. Franklin, P. A. Bunn, Jr., M. Varella-Garcia & F. R. Hirsch (2007) Epidermal growth factor receptor gene copy number and protein level are not associated with outcome of non-small-cell lung cancer patients treated with chemotherapy. *Ann Oncol*, 18, 447-52.
- Eberhard, D. A., B. E. Johnson, L. C. Amler, A. D. Goddard, S. L. Heldens, R. S. Herbst, W. L. Ince, P. A. Janne, T. Januario, D. H. Johnson, P. Klein, V. A. Miller, M. A. Ostland, D. A. Ramies, D. Sebisano, J. A. Stinson, Y. R. Zhang, S. Seshagiri & K. J. Hillan (2005) Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J Clin Oncol*, 23, 5900-9.

- Ebi, N., H. Semba, S. J. Tokunaga, K. Takayama, H. Wataya, T. Kuraki, H. Yamamoto, S. J. Akamine, I. Okamoto & Y. Nakanishi (2008) A phase II trial of gefitinib monotherapy in chemotherapy-naive patients of 75 years or older with advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 3, 1166-71.
- Ebner, R. & R. Derynck (1991) Epidermal growth factor and transforming growth factor- α : differential intracellular routing and processing of ligand-receptor complexes. *Cell Regul*, 2, 599-612.
- Ellis, P. M., W. Morzycki, B. Melosky, C. Butts, V. Hirsh, F. Krasnoshtein, N. Murray, F. A. Shepherd, D. Soulieres, M. S. Tsao & G. Goss (2009) The role of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as therapy for advanced, metastatic, and recurrent non-small-cell lung cancer: a Canadian national consensus statement. *Curr Oncol*, 16, 27-48.
- Engelman, J. A., P. A. Janne, C. Mermel, J. Pearlberg, T. Mukohara, C. Fleet, K. Cichowski, B. E. Johnson & L. C. Cantley (2005) ErbB-3 mediates phosphoinositide 3-kinase activity in gefitinib-sensitive non-small cell lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 3788-93.
- Engelman, J. A., K. Zejnullahu, T. Mitsudomi, Y. Song, C. Hyland, J. O. Park, N. Lindeman, C. M. Gale, X. Zhao, J. Christensen, T. Kosaka, A. J. Holmes, A. M. Rogers, F. Cappuzzo, T. Mok, C. Lee, B. E. Johnson, L. C. Cantley & P. A. Janne (2007) MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science*, 316, 1039-43.
- Esteban, L. M., C. Vicario-Abejon, P. Fernandez-Salguero, A. Fernandez-Medarde, N. Swaminathan, K. Yienger, E. Lopez, M. Malumbres, R. McKay, J. M. Ward, A. Pellicer & E. Santos (2001) Targeted genomic disruption of H-ras and N-ras, individually or in combination, reveals the dispensability of both loci for mouse growth and development. *Mol Cell Biol*, 21, 1444-52.
- Ezzati, M., S. J. Henley, A. D. Lopez & M. J. Thun (2005) Role of smoking in global and regional cancer epidemiology: current patterns and data needs. *Int J Cancer*, 116, 963-71.
- Ezzati, M. & A. D. Lopez (2003) Estimates of global mortality attributable to smoking in 2000. *Lancet*, 362, 847-52.
- Fan, Z., Y. Lu, X. Wu & J. Mendelsohn (1994) Antibody-induced epidermal growth factor receptor dimerization mediates inhibition of autocrine proliferation of A431 squamous carcinoma cells. *J Biol Chem*, 269, 27595-602.
- Fan, Z., H. Masui, I. Altas & J. Mendelsohn (1993) Blockade of epidermal growth factor receptor function by bivalent and monovalent fragments of 225 anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res*, 53, 4322-8.
- Fenstermaker, R. A. & M. J. Ciesielski (2000) Deletion and tandem duplication of exons 2 - 7 in the epidermal growth factor receptor gene of a human malignant glioma. *Oncogene*, 19, 4542-8.
- Ferlay, J., H. R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers & D. M. Parkin (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*, 127, 2893-917.
- Foster, J. M., U. Radhakrishna, V. Govindarajan, J. H. Carreau, Z. Gatalica, P. Sharma, S. K. Nath & B. W. Loggie (2010) Clinical implications of novel activating EGFR mutations in malignant peritoneal mesothelioma. *World J Surg Oncol*, 8, 88.
- Frame, S. & A. Balmain (2000) Integration of positive and negative growth signals during ras pathway activation in vivo. *Curr Opin Genet Dev*, 10, 106-13.
- Fujimoto, N., M. Wislez, J. Zhang, K. Iwanaga, J. Dackor, A. E. Hanna, S. Kalyankrishna, D. D. Cody, R. E. Price, M. Sato, J. W. Shay, J. D. Minna, M. Peyton, X. Tang, E. Massarelli, R. Herbst, D. W. Threadgill, Wistuba, II & J. M. Kurie (2005) High expression of ErbB family members and their ligands in lung adenocarcinomas that are sensitive to inhibition of epidermal growth factor receptor. *Cancer Res*, 65, 11478-85.

- Fukuoka, M., S. Yano, G. Giaccone, T. Tamura, K. Nakagawa, J. Y. Douillard, Y. Nishiwaki, J. Vansteenkiste, S. Kudoh, D. Rischin, R. Eek, T. Horai, K. Noda, I. Takata, E. Smit, S. Averbuch, A. Macleod, A. Feyereislova, R. P. Dong & J. Baselga (2003) Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]. *J Clin Oncol*, 21, 2237-46.
- Gandhi, J., J. Zhang, Y. Xie, J. Soh, H. Shigematsu, W. Zhang, H. Yamamoto, M. Peyton, L. Girard, W. W. Lockwood, W. L. Lam, M. Varella-Garcia, J. D. Minna & A. F. Gazdar (2009) Alterations in genes of the EGFR signaling pathway and their relationship to EGFR tyrosine kinase inhibitor sensitivity in lung cancer cell lines. *PLoS One*, 4, e4576.
- Garrett, T. P., N. M. McKern, M. Lou, T. C. Elleman, T. E. Adams, G. O. Lovrecz, H. J. Zhu, F. Walker, M. J. Frenkel, P. A. Hoyne, R. N. Jorissen, E. C. Nice, A. W. Burgess & C. W. Ward (2002) Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell*, 110, 763-73.
- Gazdar, A. F. (2009) Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene*, 28 Suppl 1, S24-31.
- Gazdar, A. F. & J. D. Minna (2005) Inhibition of EGFR signaling: all mutations are not created equal. *PLoS Med*, 2, e377.
- Gazdar, A. F. & J. D. Minna (2008) Deregulated EGFR signaling during lung cancer progression: mutations, amplicons, and autocrine loops. *Cancer Prev Res (Phila)*, 1, 156-60.
- Gazdar, A. F., H. Shigematsu, J. Herz & J. D. Minna (2004) Mutations and addiction to EGFR: the Achilles 'heel' of lung cancers? *Trends Mol Med*, 10, 481-6.
- Gebhardt, F., K. S. Zanker & B. Brandt (1999) Modulation of epidermal growth factor receptor gene transcription by a polymorphic dinucleotide repeat in intron 1. *J Biol Chem*, 274, 13176-80.
- Gideon, P., J. John, M. Frech, A. Lautwein, R. Clark, J. E. Scheffler & A. Wittinghofer (1992) Mutational and kinetic analyses of the GTPase-activating protein (GAP)-p21 interaction: the C-terminal domain of GAP is not sufficient for full activity. *Mol Cell Biol*, 12, 2050-6.
- Gilmore, A. P., A. J. Valentijn, P. Wang, A. M. Ranger, N. Bundred, M. J. O'Hare, A. Wakeling, S. J. Korsmeyer & C. H. Streuli (2002) Activation of BAD by therapeutic inhibition of epidermal growth factor receptor and transactivation by insulin-like growth factor receptor. *J Biol Chem*, 277, 27643-50.
- Gong, Y., R. Somwar, K. Politi, M. Balak, J. Chmielecki, X. Jiang & W. Pao (2007) Induction of BIM is essential for apoptosis triggered by EGFR kinase inhibitors in mutant EGFR-dependent lung adenocarcinomas. *PLoS Med*, 4, e294.
- Gould, M. K., W. G. Kuschner, C. E. Rydzak, C. C. Maclean, A. N. Demas, H. Shigemitsu, J. K. Chan & D. K. Owens (2003) Test performance of positron emission tomography and computed tomography for mediastinal staging in patients with non-small-cell lung cancer: a meta-analysis. *Ann Intern Med*, 139, 879-92.
- Grandal, M. V. & I. H. Madshus (2008) Epidermal growth factor receptor and cancer: control of oncogenic signalling by endocytosis. *J Cell Mol Med*, 12, 1527-34.
- Grandal, M. V., R. Zandi, M. W. Pedersen, B. M. Willumsen, B. van Deurs & H. S. Poulsen (2007) EGFRvIII escapes down-regulation due to impaired internalization and sorting to lysosomes. *Carcinogenesis*, 28, 1408-17.
- Greulich, H., T. H. Chen, W. Feng, P. A. Janne, J. V. Alvarez, M. Zappaterra, S. E. Bulmer, D. A. Frank, W. C. Hahn, W. R. Sellers & M. Meyerson (2005) Oncogenic transformation by inhibitor-sensitive and -resistant EGFR mutants. *PLoS Med*, 2, e313.

- Guerra, C., N. Mijimolle, A. Dhawahir, P. Dubus, M. Barradas, M. Serrano, V. Campuzano & M. Barbacid (2003) Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell*, 4, 111-20.
- Hallberg, B., S. I. Rayter & J. Downward (1994) Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation. *J Biol Chem*, 269, 3913-6.
- Han, S. W., T. Y. Kim, P. G. Hwang, S. Jeong, J. Kim, I. S. Choi, D. Y. Oh, J. H. Kim, D. W. Kim, D. H. Chung, S. A. Im, Y. T. Kim, J. S. Lee, D. S. Heo, Y. J. Bang & N. K. Kim (2005) Predictive and prognostic impact of epidermal growth factor receptor mutation in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *J Clin Oncol*, 23, 2493-501.
- Han, S. W., T. Y. Kim, Y. K. Jeon, P. G. Hwang, S. A. Im, K. H. Lee, J. H. Kim, D. W. Kim, D. S. Heo, N. K. Kim, D. H. Chung & Y. J. Bang (2006) Optimization of patient selection for gefitinib in non-small cell lung cancer by combined analysis of epidermal growth factor receptor mutation, K-ras mutation, and Akt phosphorylation. *Clin Cancer Res*, 12, 2538-44.
- Hancock, J. F. & I. A. Prior (2005) Electron microscopic imaging of Ras signaling domains. *Methods*, 37, 165-72.
- Haura, E. B., J. Turkson & R. Jove (2005) Mechanisms of disease: Insights into the emerging role of signal transducers and activators of transcription in cancer. *Nat Clin Pract Oncol*, 2, 315-24.
- Hecht, S. S. (1999) Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst*, 91, 1194-210.
- Hidalgo, M., L. L. Siu, J. Nemunaitis, J. Rizzo, L. A. Hammond, C. Takimoto, S. G. Eckhardt, A. Tolcher, C. D. Britten, L. Denis, K. Ferrante, D. D. Von Hoff, S. Silberman & E. K. Rowinsky (2001) Phase I and pharmacologic study of OSI-774, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced solid malignancies. *J Clin Oncol*, 19, 3267-79.
- Hill, C. S. & R. Treisman (1995) Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell*, 80, 199-211.
- Hotta, K., K. Kiura, S. Toyooka, N. Takigawa, J. Soh, Y. Fujiwara, M. Tabata, H. Date & M. Tanimoto (2007) Clinical significance of epidermal growth factor receptor gene mutations on treatment outcome after first-line cytotoxic chemotherapy in Japanese patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 2, 632-7.
- Hsieh, M. H., Y. F. Fang, W. C. Chang, H. P. Kuo, S. Y. Lin, H. P. Liu, C. L. Liu, H. C. Chen, Y. C. Ku, Y. T. Chen, Y. H. Chang, B. L. Hsi, S. F. Tsai & S. F. Huang (2006) Complex mutation patterns of epidermal growth factor receptor gene associated with variable responses to gefitinib treatment in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 53, 311-22.
- Huang, S. F., H. P. Liu, L. H. Li, Y. C. Ku, Y. N. Fu, H. Y. Tsai, Y. T. Chen, Y. F. Lin, W. C. Chang, H. P. Kuo, Y. C. Wu, Y. R. Chen & S. F. Tsai (2004) High frequency of epidermal growth factor receptor mutations with complex patterns in non-small cell lung cancers related to gefitinib responsiveness in Taiwan. *Clin Cancer Res*, 10, 8195-203.
- Hubbard, S. R. (2004) Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 464-71.
- Hubbard, S. R. (2009) The juxtamembrane region of EGFR takes center stage. *Cell*, 137, 1181-3.
- Huncharek, M., J. Muscat & J. F. Geschwind (1999) K-ras oncogene mutation as a prognostic marker in non-small cell lung cancer: a combined analysis of 881 cases. *Carcinogenesis*, 20, 1507-10.
- Hunter, T. (1998) The role of tyrosine phosphorylation in cell growth and disease. *Harvey Lect*, 94, 81-119.
- Hynes, N. E., K. Horsch, M. A. Olayioye & A. Badache (2001) The ErbB receptor tyrosine family as signal integrators. *Endocr Relat Cancer*, 8, 151-9.

- Hynes, N. E. & H. A. Lane (2005) ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*, 5, 341-54.
- Inoue, A., K. Kobayashi, K. Usui, M. Maemondo, S. Okinaga, I. Mikami, M. Ando, K. Yamazaki, Y. Saijo, A. Gemma, H. Miyazawa, T. Tanaka, K. Ikebuchi, T. Nukiwa, S. Morita & K. Hagiwara (2009) First-line gefitinib for patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring epidermal growth factor receptor mutations without indication for chemotherapy. *J Clin Oncol*, 27, 1394-400.
- Italiano, A., F. B. Vandebos, J. Otto, J. Mouroux, D. Fontaine, P. Y. Marcy, N. Cardot, A. Thyss & F. Pedeutour (2006) Comparison of the epidermal growth factor receptor gene and protein in primary non-small-cell-lung cancer and metastatic sites: implications for treatment with EGFR-inhibitors. *Ann Oncol*, 17, 981-5.
- Jancik, S., J. Drabek, D. Radzioch & M. Hajduch (2010) Clinical relevance of KRAS in human cancers. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 150960.
- Janmaat, M. L., F. A. Kruyt, J. A. Rodriguez & G. Giaccone (2003) Response to epidermal growth factor receptor inhibitors in non-small cell lung cancer cells: limited antiproliferative effects and absence of apoptosis associated with persistent activity of extracellular signal-regulated kinase or Akt kinase pathways. *Clin Cancer Res*, 9, 2316-26.
- Jemal, A., F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward & D. Forman (2011) Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61, 69-90.
- Jemal, A., M. J. Thun, L. A. Ries, H. L. Howe, H. K. Weir, M. M. Center, E. Ward, X. C. Wu, C. Ehemann, R. Anderson, U. A. Ajani, B. Kohler & B. K. Edwards (2008) Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control. *J Natl Cancer Inst*, 100, 1672-94.
- Jett, J. R., S. E. Schild, R. L. Keith & K. A. Kesler (2007) Treatment of non-small cell lung cancer, stage IIIB: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*, 132, 266S-276S.
- Jia, X. L. & G. Chen (2011) EGFR and KRAS mutations in Chinese patients with adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer*, 74, 396-400.
- Jiang, J., H. Greulich, P. A. Janne, W. R. Sellers, M. Meyerson & J. D. Griffin (2005) Epidermal growth factor-independent transformation of Ba/F3 cells with cancer-derived epidermal growth factor receptor mutants induces gefitinib-sensitive cell cycle progression. *Cancer Res*, 65, 8968-74.
- Johnson, L., D. Greenbaum, K. Cichowski, K. Mercer, E. Murphy, E. Schmitt, R. T. Bronson, H. Umanoff, W. Edelmann, R. Kucherlapati & T. Jacks (1997) K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. *Genes Dev*, 11, 2468-81.
- Jorissen, R. N., F. Walker, N. Pouliot, T. P. Garrett, C. W. Ward & A. W. Burgess (2003) Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res*, 284, 31-53.
- Kobayashi, S., T. J. Boggon, T. Dayaram, P. A. Janne, O. Kocher, M. Meyerson, B. E. Johnson, M. J. Eck, D. G. Tenen & B. Halmos (2005) EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*, 352, 786-92.
- Konopka, J. B., S. M. Watanabe, J. W. Singer, S. J. Collins & O. N. Witte (1985) Cell lines and clinical isolates derived from Ph1-positive chronic myelogenous leukemia patients express c-abl proteins with a common structural alteration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 1810-4.
- Kosaka, T., Y. Yatabe, H. Endoh, H. Kuwano, T. Takahashi & T. Mitsudomi (2004) Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. *Cancer Res*, 64, 8919-23.
- Kosaka, T., Y. Yatabe, R. Onozato, H. Kuwano & T. Mitsudomi (2009) Prognostic implication of EGFR, KRAS, and TP53 gene mutations in a large cohort of Japanese patients with surgically treated lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*, 4, 22-9.

- Koyama, M., Y. Matsuzaki, S. Yogosawa, T. Hitomi, M. Kawanaka & T. Sakai (2007) ZD1839 induces p15INK4b and causes G1 arrest by inhibiting the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway. *Mol Cancer Ther*, 6, 1579-87.
- Koyama, N., Y. Jinn, K. Takabe, M. Yoshizawa, Y. Usui, N. Inase, S. Miyake, Y. Yoshizawa, K. Hagiwara & M. Kanazawa (2006) The characterization of gefitinib sensitivity and adverse events in patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res*, 26, 4519-25.
- Kris, M. G., R. B. Natale, R. S. Herbst, T. J. Lynch, Jr., D. Prager, C. P. Belani, J. H. Schiller, K. Kelly, H. Spiridonidis, A. Sandler, K. S. Albain, D. Cella, M. K. Wolf, S. D. Averbuch, J. J. Ochs & A. C. Kay (2003) Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. *JAMA*, 290, 2149-58.
- Kubota, K., Y. Nishiwaki, T. Tamura, K. Nakagawa, K. Matsui, K. Watanabe, T. Hida, M. Kawahara, N. Katakami, K. Takeda, A. Yokoyama, K. Noda, M. Fukuoka & N. Saijo (2008) Efficacy and safety of erlotinib monotherapy for Japanese patients with advanced non-small cell lung cancer: a phase II study. *J Thorac Oncol*, 3, 1439-45.
- Lam, W. K., N. W. White & M. M. Chan-Yeung (2004) Lung cancer epidemiology and risk factors in Asia and Africa. *Int J Tuberc Lung Dis*, 8, 1045-57.
- Lee, D. H., J. Y. Han, H. G. Lee, J. J. Lee, E. K. Lee, H. Y. Kim, H. K. Kim, E. K. Hong & J. S. Lee (2005) Gefitinib as a first-line therapy of advanced or metastatic adenocarcinoma of the lung in never-smokers. *Clin Cancer Res*, 11, 3032-7.
- Li, S., R. Rosell, A. Urban, A. Font, A. Ariza, P. Armengol, A. Abad, J. J. Navas & M. Monzo (1994) K-ras gene point mutation: a stable tumor marker in non-small cell lung carcinoma. *Lung Cancer*, 11, 19-27.
- Liebmann, C. (2001) Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. *Cell Signal*, 13, 777-85.
- Lowenstein, E. J., R. J. Daly, A. G. Batzer, W. Li, B. Margolis, R. Lammers, A. Ullrich, E. Y. Skolnik, D. Bar-Sagi & J. Schlessinger (1992) The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell*, 70, 431-42.
- Lutterbach, B., Q. Zeng, L. J. Davis, H. Hatch, G. Hang, N. E. Kohl, J. B. Gibbs & B. S. Pan (2007) Lung cancer cell lines harboring MET gene amplification are dependent on Met for growth and survival. *Cancer Res*, 67, 2081-8.
- Lynch, T. J., D. W. Bell, R. Sordella, S. Gurubhagavatula, R. A. Okimoto, B. W. Brannigan, P. L. Harris, S. M. Haserlat, J. G. Supko, F. G. Haluska, D. N. Louis, D. C. Christiani, J. Settleman & D. A. Haber (2004) Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*, 350, 2129-39.
- Mao, C., L. X. Qiu, R. Y. Liao, F. B. Du, H. Ding, W. C. Yang, J. Li & Q. Chen (2010) KRAS mutations and resistance to EGFR-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis of 22 studies. *Lung Cancer*, 69, 272-8.
- Marks, J. L., S. Broderick, Q. Zhou, D. Chitale, A. R. Li, M. F. Zakowski, M. G. Kris, V. W. Rusch, C. G. Azzoli, V. E. Seshan, M. Ladanyi & W. Pao (2008) Prognostic and therapeutic implications of EGFR and KRAS mutations in resected lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*, 3, 111-6.
- Marmor, M. D., K. B. Skaria & Y. Yarden (2004) Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 58, 903-13.
- Martin, P., C. M. Kelly & D. Carney (2006) Epidermal growth factor receptor-targeted agents for lung cancer. *Cancer Control*, 13, 129-40.
- Matsumoto, S., K. Takahashi, R. Iwakawa, Y. Matsuno, Y. Nakanishi, T. Kohno, E. Shimizu & J. Yokota (2006) Frequent EGFR mutations in brain metastases of lung adenocarcinoma. *Int J Cancer*, 119, 1491-4.

- McGrath, J. P., D. J. Capon, D. H. Smith, E. Y. Chen, P. H. Seeburg, D. V. Goeddel & A. D. Levinson (1983) Structure and organization of the human Ki-ras proto-oncogene and a related processed pseudogene. *Nature*, 304, 501-6.
- McInerney, J. M., M. A. Wilson, K. J. Strand & S. A. Chrysogelos (2001) A strong intronic enhancer element of the EGFR gene is preferentially active in high EGFR expressing breast cancer cells. *J Cell Biochem*, 80, 538-49.
- Metzger, B., L. Chambeau, D. Y. Begon, C. Faber, J. Kayser, G. Berchem, M. Pauly, J. Boniver, P. Delvenne, M. Dicato & T. Wenner (2011) The human epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in European patients with advanced colorectal cancer harbors infrequent mutations in its tyrosine kinase domain. *BMC Med Genet*, 12, 144.
- Molina, J. R., P. Yang, S. D. Cassivi, S. E. Schild & A. A. Adjei (2008) Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc*, 83, 584-94.
- Monaco, S. E., M. N. Nikiforova, K. Cieply, L. A. Teot, W. E. Khalbuss & S. Dacic (2010) A comparison of EGFR and KRAS status in primary lung carcinoma and matched metastases. *Hum Pathol*, 41, 94-102.
- Mountain, C. F. (2002) Staging classification of lung cancer. A critical evaluation. *Clin Chest Med*, 23, 103-21.
- Mukohara, T., J. A. Engelman, N. H. Hanna, B. Y. Yeap, S. Kobayashi, N. Lindeman, B. Halmos, J. Pearlberg, Z. Tsuchihashi, L. C. Cantley, D. G. Tenen, B. E. Johnson & P. A. Janne (2005) Differential effects of gefitinib and cetuximab on non-small-cell lung cancers bearing epidermal growth factor receptor mutations. *J Natl Cancer Inst*, 97, 1185-94.
- Murray, S., I. J. Dahabreh, H. Linardou, M. Manoloukos, D. Bafaloukos & P. Kosmidis (2008) Somatic mutations of the tyrosine kinase domain of epidermal growth factor receptor and tyrosine kinase inhibitor response to TKIs in non-small cell lung cancer: an analytical database. *J Thorac Oncol*, 3, 832-9.
- Murray, S., E. Timotheadou, H. Linardou, A. V. Vrettou, I. Kostopoulos, J. Skrickova, C. Papakostantinou, C. Christodoulou, D. Pectasides, E. Samantas, P. Papakostas, D. V. Skarlos, P. Kosmidis & G. Fountzilias (2006) Mutations of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain and associations with clinicopathological features in non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer*, 52, 225-33.
- Nicholson, R. I., J. M. Gee & M. E. Harper (2001) EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer*, 37 Suppl 4, S9-15.
- Niklinski, J., W. Niklinska, J. Laudanski, E. Chyczewska & L. Chyczewski (2001) Prognostic molecular markers in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 34 Suppl 2, S53-8.
- Ogiso, H., R. Ishitani, O. Nureki, S. Fukai, M. Yamanaka, J. H. Kim, K. Saito, A. Sakamoto, M. Inoue, M. Shirouzu & S. Yokoyama (2002) Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell*, 110, 775-87.
- Okami, J., K. Taniguchi, M. Higashiyama, J. Maeda, K. Oda, N. Orita, K. Koizumi, K. Kodama & K. Kato (2007) Prognostic factors for gefitinib-treated postoperative recurrence in non-small cell lung cancer. *Oncology*, 72, 234-42.
- Okudela, K., T. Woo & H. Kitamura (2010) KRAS gene mutations in lung cancer: particulars established and issues unresolved. *Pathol Int*, 60, 651-60.
- Olayioye, M. A., R. M. Neve, H. A. Lane & N. E. Hynes (2000) The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J*, 19, 3159-67.
- Paez, J. G., P. A. Janne, J. C. Lee, S. Tracy, H. Greulich, S. Gabriel, P. Herman, F. J. Kaye, N. Lindeman, T. J. Boggon, K. Naoki, H. Sasaki, Y. Fujii, M. J. Eck, W. R. Sellers, B. E. Johnson & M. Meyerson (2004) EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*, 304, 1497-500.
- Pallis, A. G., A. Voutsina, A. Kalikaki, J. Souglakos, E. Briasoulis, S. Murray, A. Koutsopoulos, M. Tripaki, E. Stathopoulos, D. Mavroudis & V. Georgoulis (2007) 'Classical' but not 'other' mutations of EGFR kinase domain are associated with clinical outcome in gefitinib-treated patients with non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*, 97, 1560-6.

- Pao, W., V. Miller, M. Zakowski, J. Doherty, K. Politi, I. Sarkaria, B. Singh, R. Heelan, V. Rusch, L. Fulton, E. Mardis, D. Kupfer, R. Wilson, M. Kris & H. Varmus (2004) EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 13306-11.
- Pao, W., V. A. Miller, K. A. Politi, G. J. Riely, R. Somwar, M. F. Zakowski, M. G. Kris & H. Varmus (2005a) Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med*, 2, e73.
- Pao, W., T. Y. Wang, G. J. Riely, V. A. Miller, Q. Pan, M. Ladanyi, M. F. Zakowski, R. T. Heelan, M. G. Kris & H. E. Varmus (2005b) KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med*, 2, e17.
- Patterson, R. L., D. B. van Rossum, N. Nikolaidis, D. L. Gill & S. H. Snyder (2005) Phospholipase C-gamma: diverse roles in receptor-mediated calcium signaling. *Trends Biochem Sci*, 30, 688-97.
- Pedersen, M. W., N. Pedersen, L. Damstrup, M. Villingshoj, S. U. Sonder, K. Rieneck, L. F. Bovin, M. Spang-Thomsen & H. S. Poulsen (2005) Analysis of the epidermal growth factor receptor specific transcriptome: effect of receptor expression level and an activating mutation. *J Cell Biochem*, 96, 412-27.
- Pennycuik, A., T. Simpson, D. Crawley, R. Lal, G. Santis, P. Cane, K. Tobal & J. Spicer (2012) Routine EGFR and KRAS Mutation analysis using COLD-PCR in non-small cell lung cancer. *Int J Clin Pract*, 66, 748-752.
- Penzel, R., C. Sers, Y. Chen, U. Lehmann-Muhlenhoff, S. Merkelbach-Bruse, A. Jung, T. Kirchner, R. Buttner, H. H. Kreipe, I. Petersen, M. Dietel & P. Schirmacher (2011) EGFR mutation detection in NSCLC--assessment of diagnostic application and recommendations of the German Panel for Mutation Testing in NSCLC. *Virchows Arch*, 458, 95-8.
- Pirker, R., J. R. Pereira, A. Szczesna, J. von Pawel, M. Krzakowski, R. Ramlau, I. Vynnychenko, K. Park, C. T. Yu, V. Ganul, J. K. Roh, E. Bajetta, K. O'Byrne, F. de Marinis, W. Eberhardt, T. Goddemeier, M. Emig & U. Gatzemeier (2009) Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomised phase III trial. *Lancet*, 373, 1525-31.
- Pollack, V. A., D. M. Savage, D. A. Baker, K. E. Tsaparikos, D. E. Sloan, J. D. Moyer, E. G. Barbacci, L. R. Pustilnik, T. A. Smolarek, J. A. Davis, M. P. Vaidya, L. D. Arnold, J. L. Doty, K. K. Iwata & M. J. Morin (1999) Inhibition of epidermal growth factor receptor-associated tyrosine phosphorylation in human carcinomas with CP-358,774: dynamics of receptor inhibition in situ and antitumor effects in athymic mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 291, 739-48.
- Popescu, N. C., S. C. Amsbaugh, J. A. DiPaolo, S. R. Tronick, S. A. Aaronson & D. C. Swan (1985) Chromosomal localization of three human ras genes by in situ molecular hybridization. *Somat Cell Mol Genet*, 11, 149-55.
- Prenzel, N., O. M. Fischer, S. Streit, S. Hart & A. Ullrich (2001) The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer*, 8, 11-31.
- Reiter, J. L., D. W. Threadgill, G. D. Eley, K. E. Strunk, A. J. Danielsen, C. S. Sinclair, R. S. Pearsall, P. J. Green, D. Yee, A. L. Lampland, S. Balasubramaniam, T. D. Crossley, T. R. Magnuson, C. D. James & N. J. Mairle (2001) Comparative genomic sequence analysis and isolation of human and mouse alternative EGFR transcripts encoding truncated receptor isoforms. *Genomics*, 71, 1-20.
- Riely, G. J., M. G. Kris, D. Rosenbaum, J. Marks, A. Li, D. A. Chitale, K. Nafa, E. R. Riedel, M. Hsu, W. Pao, V. A. Miller & M. Ladanyi (2008) Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 14, 5731-4.

- Rivera, M. P., F. Detterbeck & A. C. Mehta (2003) Diagnosis of lung cancer: the guidelines. *Chest*, 123, 129S-136S.
- Robinson, L. A., J. C. Ruckdeschel, H. Wagner, Jr. & C. W. Stevens (2007) Treatment of non-small cell lung cancer-stage IIIA: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*, 132, 243S-265S.
- Rodenhuis, S. & R. J. Slebos (1990) The ras oncogenes in human lung cancer. *Am Rev Respir Dis*, 142, S27-30.
- Rom, W. N., J. G. Hay, T. C. Lee, Y. Jiang & K. M. Tchou-Wong (2000) Molecular and genetic aspects of lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*, 161, 1355-67.
- Rosell, R., T. Moran, C. Queralt, R. Porta, F. Cardenal, C. Camps, M. Majem, G. Lopez-Vivanco, D. Isla, M. Provencio, A. Insa, B. Massuti, J. L. Gonzalez-Larriba, L. Paz-Ares, I. Bover, R. Garcia-Campelo, M. A. Moreno, S. Catot, C. Rolfo, N. Reguart, R. Palmero, J. M. Sanchez, R. Bastus, C. Mayo, J. Bertran-Alamillo, M. A. Molina, J. J. Sanchez & M. Taron (2009) Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med*, 361, 958-67.
- Sahin, U., G. Weskamp, K. Kelly, H. M. Zhou, S. Higashiyama, J. Peschon, D. Hartmann, P. Saftig & C. P. Blobel (2004) Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol*, 164, 769-79.
- Sakurada, A., H. Lara-Guerra, N. Liu, F. A. Shepherd & M. S. Tsao (2008) Tissue heterogeneity of EGFR mutation in lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*, 3, 527-9.
- Sandgren, E. P., N. C. Luetke, R. D. Palmiter, R. L. Brinster & D. C. Lee (1990) Overexpression of TGF alpha in transgenic mice: induction of epithelial hyperplasia, pancreatic metaplasia, and carcinoma of the breast. *Cell*, 61, 1121-35.
- Sandler, A., R. Gray, M. C. Perry, J. Brahmer, J. H. Schiller, A. Dowlati, R. Lilenbaum & D. H. Johnson (2006) Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*, 355, 2542-50.
- Sanger, F., S. Nicklen & A. R. Coulson (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-7.
- Santis, G., R. Angell, G. Nickless, A. Quinn, A. Herbert, P. Cane, J. Spicer, R. Breen, E. McLean & K. Tobal (2011) Screening for EGFR and KRAS mutations in endobronchial ultrasound derived transbronchial needle aspirates in non-small cell lung cancer using COLD-PCR. *PLoS One*, 6, e25191.
- Sausville, E. & J. Verweij (2003) Highlights from the EORTC-NCI-AACR 2002 meeting: molecular targets and cancer therapeutics. *Clin Adv Hematol Oncol*, 1, 22-3.
- Scagliotti, G. V., P. Parikh, J. von Pawel, B. Biesma, J. Vansteenkiste, C. Manegold, P. Serwatowski, U. Gatzemeier, R. Digumarti, M. Zukin, J. S. Lee, A. Mellempgaard, K. Park, S. Patil, J. Rolski, T. Goksel, F. de Marinis, L. Simms, K. P. Sugarman & D. Gandara (2008) Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naive patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 26, 3543-51.
- Scaltriti, M. & J. Baselga (2006) The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res*, 12, 5268-72.
- Scheffzek, K., M. R. Ahmadian, W. Kabsch, L. Wiesmuller, A. Lautwein, F. Schmitz & A. Wittinghofer (1997) The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science*, 277, 333-8.
- Schlessinger, J. (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 103, 211-25.
- Schmid, K., N. Oehl, F. Wrba, R. Pirker, C. Pirker & M. Filipits (2009) EGFR/KRAS/BRAF mutations in primary lung adenocarcinomas and corresponding locoregional lymph node metastases. *Clin Cancer Res*, 15, 4554-60.
- Schonwasser, D. C., R. M. Marais, C. J. Marshall & P. J. Parker (1998) Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isoforms. *Mol Cell Biol*, 18, 790-8.

- Schubbert, S., K. Shannon & G. Bollag (2007) Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer*, 7, 295-308.
- Scott, W. J., J. Howington, S. Feigenberg, B. Movsas & K. Pisters (2007) Treatment of non-small cell lung cancer stage I and stage II: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*, 132, 234S-242S.
- Sekine, I., Y. Ichinose, Y. Nishiwaki, N. Yamamoto, M. Tsuboi, K. Nakagawa, T. Shinkai, H. Y. Jiang, T. Tamura & M. Fukuoka (2007) A randomized Phase III study to compare the overall survival of gefitinib (IRESSA) versus docetaxel in Japanese patients with previously treated advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 2, S339-S340.
- Sequist, L. V., R. G. Martins, D. Spigel, S. M. Grunberg, A. Spira, P. A. Janne, V. A. Joshi, D. McCollum, T. L. Evans, A. Muzikansky, G. L. Kuhlmann, M. Han, J. S. Goldberg, J. Settleman, A. J. Iafrate, J. A. Engelman, D. A. Haber, B. E. Johnson & T. J. Lynch (2008) First-line gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring somatic EGFR mutations. *J Clin Oncol*, 26, 2442-9.
- Sharma, S. V., D. W. Bell, J. Settleman & D. A. Haber (2007) Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*, 7, 169-81.
- Sharma, S. V. & J. Settleman (2009) ErbBs in lung cancer. *Exp Cell Res*, 315, 557-71.
- Shaw, R. J. & L. C. Cantley (2006) Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature*, 441, 424-30.
- Shigematsu, H., L. Lin, T. Takahashi, M. Nomura, M. Suzuki, Wistuba, II, K. M. Fong, H. Lee, S. Toyooka, N. Shimizu, T. Fujisawa, Z. Feng, J. A. Roth, J. Herz, J. D. Minna & A. F. Gazdar (2005) Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst*, 97, 339-46.
- Shih, J. Y., C. H. Gow, C. J. Yu, C. H. Yang, Y. L. Chang, M. F. Tsai, Y. C. Hsu, K. Y. Chen, W. P. Su & P. C. Yang (2006) Epidermal growth factor receptor mutations in needle biopsy/aspiration samples predict response to gefitinib therapy and survival of patients with advanced nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer*, 118, 963-9.
- Shtiegman, K., B. S. Kochupurakkal, Y. Zwang, G. Pines, A. Starr, A. Vexler, A. Citri, M. Katz, S. Lavi, Y. Ben-Basat, S. Benjamin, S. Corso, J. Gan, R. B. Yosef, S. Giordano & Y. Yarden (2007) Defective ubiquitinylation of EGFR mutants of lung cancer confers prolonged signaling. *Oncogene*, 26, 6968-78.
- Shtiegman, K. & Y. Yarden (2003) The role of ubiquitylation in signaling by growth factors: implications to cancer. *Semin Cancer Biol*, 13, 29-40.
- Silvestri, G. A., M. K. Gould, M. L. Margolis, L. T. Tanoue, D. McCrory, E. Toloza & F. Detterbeck (2007) Noninvasive staging of non-small cell lung cancer: ACCP evidenced-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*, 132, 178S-201S.
- Smith, G. D., B. E. Chadwick, C. Willmore-Payne & J. S. Bentz (2008) Detection of epidermal growth factor receptor gene mutations in cytology specimens from patients with non-small cell lung cancer utilising high-resolution melting amplicon analysis. *J Clin Pathol*, 61, 487-93.
- Sobin, L. H. & C. Wittekind. 2002. *TNM classification of malignant tumours*. New York ; [Chichester]: Wiley-Liss.
- Socinski, M. A., R. Crowell, T. E. Hensing, C. J. Langer, R. Lilenbaum, A. B. Sandler & D. Morris (2007) Treatment of non-small cell lung cancer, stage IV: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*, 132, 277S-289S.
- Socinski, M. A., D. E. Morris, G. A. Masters & R. Lilenbaum (2003) Chemotherapeutic management of stage IV non-small cell lung cancer. *Chest*, 123, 226S-243S.
- Sordella, R., D. W. Bell, D. A. Haber & J. Settleman (2004) Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science*, 305, 1163-1167.

- Spiro, S. G., M. K. Gould & G. L. Colice (2007) Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes: ACCP evidenced-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*, 132, 149S-160S.
- Stabile, L. P., J. S. Lyker, C. T. Gubish, W. Zhang, J. R. Grandis & J. M. Siegfried (2005) Combined targeting of the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer shows enhanced antiproliferative effects. *Cancer Res*, 65, 1459-70.
- Stamos, J., M. X. Sliwkowski & C. Eigenbrot (2002) Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *J Biol Chem*, 277, 46265-72.
- Sugio, K., H. Uramoto, T. Onitsuka, M. Mizukami, Y. Ichiki, M. Sugaya, M. Yasuda, M. Takenoyama, T. Oyama, T. Hanagiri & K. Yasumoto (2009) Prospective phase II study of gefitinib in non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor gene mutations. *Lung Cancer*, 64, 314-8.
- Sun, J. M., K. H. Lee, S. W. Kim, D. H. Lee, Y. J. Min, H. J. Yun, H. K. Kim, H. S. Song, Y. H. Kim, B. S. Kim, I. G. Hwang, K. Lee, S. J. Jo, J. W. Lee, J. S. Ahn, K. Park & M. J. Ahn (2012) Gefitinib versus pemetrexed as second-line treatment in patients with nonsmall cell lung cancer previously treated with platinum-based chemotherapy (KCSG-LU08-01): an open-label, phase 3 trial. *Cancer*, 118, 6234-42.
- Sun, L., Q. Zhang, H. Luan, Z. Zhan, C. Wang & B. Sun (2011) Comparison of KRAS and EGFR gene status between primary non-small cell lung cancer and local lymph node metastases: implications for clinical practice. *J Exp Clin Cancer Res*, 30, 30.
- Sun, S., J. H. Schiller & A. F. Gazdar (2007) Lung cancer in never smokers--a different disease. *Nat Rev Cancer*, 7, 778-90.
- Suzuki, S., Y. Dobashi, H. Sakurai, K. Nishikawa, M. Hanawa & A. Ooi (2005) Protein overexpression and gene amplification of epidermal growth factor receptor in nonsmall cell lung carcinomas. An immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization study. *Cancer*, 103, 1265-73.
- Taga, M., L. E. Mechanic, N. Hagiwara, K. H. Vahakangas, W. P. Bennett, M. C. Alavanja, J. A. Welsh, M. A. Khan, A. Lee, R. Diasio, E. Edell, A. Bungum, J. S. Jang, P. Yang, J. Jen & C. C. Harris (2012) EGFR somatic mutations in lung tumors: radon exposure and passive smoking in former- and never-smoking U.S. women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 21, 988-92.
- Takahashi, T., N. Yamamoto, T. Nukiwa, K. Mori, M. Tsuboi, T. Horai, N. Masuda, K. Eguchi, T. Mitsudomi, S. Yokota, Y. Segawa, Y. Ichinose, M. Fukuoka & N. Saijo (2010) Phase II study of erlotinib in Japanese patients with advanced non-small cell lung cancer. *Anticancer Res*, 30, 557-63.
- Takano, T., T. Fukui, Y. Ohe, K. Tsuta, S. Yamamoto, H. Nokihara, N. Yamamoto, I. Sekine, H. Kunitoh, K. Furuta & T. Tamura (2008) EGFR mutations predict survival benefit from gefitinib in patients with advanced lung adenocarcinoma: a historical comparison of patients treated before and after gefitinib approval in Japan. *J Clin Oncol*, 26, 5589-95.
- Tam, I. Y., L. P. Chung, W. S. Suen, E. Wang, M. C. Wong, K. K. Ho, W. K. Lam, S. W. Chiu, L. Girard, J. D. Minna, A. F. Gazdar & M. P. Wong (2006) Distinct epidermal growth factor receptor and KRAS mutation patterns in non-small cell lung cancer patients with different tobacco exposure and clinicopathologic features. *Clin Cancer Res*, 12, 1647-53.
- Tamura, K., I. Okamoto, T. Kashii, S. Negoro, T. Hirashima, S. Kudoh, Y. Ichinose, N. Ebi, K. Shibata, T. Nishimura, N. Katakami, T. Sawa, E. Shimizu, J. Fukuoka, T. Satoh & M. Fukuoka (2008) Multicentre prospective phase II trial of gefitinib for advanced non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor mutations: results of the West Japan Thoracic Oncology Group trial (WJTOG0403). *Br J Cancer*, 98, 907-14.

- Taron, M., Y. Ichinose, R. Rosell, T. Mok, B. Massuti, L. Zamora, J. L. Mate, C. Manegold, M. Ono, C. Queralt, T. Jahan, J. J. Sanchez, M. Sanchez-Ronco, V. Hsue, D. Jablons, J. M. Sanchez & T. Moran (2005) Activating mutations in the tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor are associated with improved survival in gefitinib-treated chemorefractory lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res*, 11, 5878-85.
- Taylor, R., F. Najafi & A. Dobson (2007) Meta-analysis of studies of passive smoking and lung cancer: effects of study type and continent. *Int J Epidemiol*, 36, 1048-59.
- Thomas, M., U. Gatzemeier, R. Goerg, W. Matthiessen, H. Morr, N. Schonfeld, D. Ukena & G. Stamatis (2000) [Recommendations on the diagnosis of bronchial carcinoma. German Pneumology Society]. *Pneumologie*, 54, 361-71.
- Tice, D. A., J. S. Biscardi, A. L. Nickles & S. J. Parsons (1999) Mechanism of biological synergy between cellular Src and epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 1415-20.
- Tortola, S., R. Steinert, M. Hantschick, M. A. Peinado, I. Gastinger, P. Stosiek, H. Lippert, W. Schlegel & M. A. Reymond (2001) Discordance between K-ras mutations in bone marrow micrometastases and the primary tumor in colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 19, 2837-43.
- Travis, W. D. 2004. *Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart*. Lyon ; [Great Britain]: IARC Press.
- Travis, W. D., E. Brambilla, M. Noguchi, A. G. Nicholson, K. R. Geisinger, Y. Yatabe, D. G. Beer, C. A. Powell, G. J. Riely, P. E. Van Schil, K. Garg, J. H. Austin, H. Asamura, V. W. Rusch, F. R. Hirsch, G. Scagliotti, T. Mitsudomi, R. M. Huber, Y. Ishikawa, J. Jett, M. Sanchez-Cespedes, J. P. Sculier, T. Takahashi, M. Tsuboi, J. Vansteenkiste, I. Wistuba, P. C. Yang, D. Aberle, C. Brambilla, D. Flieder, W. Franklin, A. Gazdar, M. Gould, P. Hasleton, D. Henderson, B. Johnson, D. Johnson, K. Kerr, K. Kuriyama, J. S. Lee, V. A. Miller, I. Petersen, V. Roggli, R. Rosell, N. Saijo, E. Thunnissen, M. Tsao & D. Yankelewitz (2011) International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*, 6, 244-85.
- Tsao, A. S., X. M. Tang, B. Sabloff, L. Xiao, H. Shigematsu, J. Roth, M. Spitz, W. K. Hong, A. Gazdar & I. Wistuba (2006) Clinicopathologic characteristics of the EGFR gene mutation in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 1, 231-9.
- Tsao, M. S., A. Sakurada, J. C. Cutz, C. Q. Zhu, S. Kamel-Reid, J. Squire, I. Lorimer, T. Zhang, N. Liu, M. Daneshmand, P. Marrano, G. da Cunha Santos, A. Lagarde, F. Richardson, L. Seymour, M. Whitehead, K. Ding, J. Pater & F. A. Shepherd (2005) Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med*, 353, 133-44.
- Uhm, J. E., B. B. Park, M. J. Ahn, J. Lee, J. S. Ahn, S. W. Kim, H. T. Kim, J. S. Lee, J. H. Kang, J. Y. Cho, H. S. Song, S. H. Park, C. H. Sohn, S. W. Shin, J. H. Choi & K. Park (2009) Erlotinib monotherapy for stage IIIB/IV non-small cell lung cancer: a multicenter trial by the Korean Cancer Study Group. *J Thorac Oncol*, 4, 1136-43.
- Umekita, Y., Y. Ohi, Y. Sagara & H. Yoshida (2000) Co-expression of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor- α predicts worse prognosis in breast-cancer patients. *Int J Cancer*, 89, 484-7.
- Vivanco, I. & C. L. Sawyers (2002) The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*, 2, 489-501.
- Wakeling, A. E., S. P. Guy, J. R. Woodburn, S. E. Ashton, B. J. Curry, A. J. Barker & K. H. Gibson (2002) ZD1839 (Iressa): an orally active inhibitor of epidermal growth factor signaling with potential for cancer therapy. *Cancer Res*, 62, 5749-54.
- Wang, Y. C., H. S. Lee, S. K. Chen, S. C. Yang & C. Y. Chen (1998) Analysis of K-ras gene mutations in lung carcinomas: correlation with gender, histological subtypes, and clinical outcome. *J Cancer Res Clin Oncol*, 124, 517-22.

- Westra, W. H., R. J. Slebos, G. J. Offerhaus, S. N. Goodman, S. G. Evers, T. W. Kensler, F. B. Askin, S. Rodenhuis & R. H. Hruban (1993) K-ras oncogene activation in lung adenocarcinomas from former smokers. Evidence that K-ras mutations are an early and irreversible event in the development of adenocarcinoma of the lung. *Cancer*, 72, 432-8.
- Wheeler, D. L., E. F. Dunn & P. M. Harari (2010) Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. *Nat Rev Clin Oncol*, 7, 493-507.
- Wheler, J. J., G. S. Falchook, A. M. Tsimberidou, D. S. Hong, A. Naing, S. A. Piha-Paul, S. S. Chen, S. Fu, B. Stephen, J. Y. Fok, F. Janku & R. Kurzrock (2013) Aberrations in the epidermal growth factor receptor gene in 958 patients with diverse advanced tumors: implications for therapy. *Ann Oncol*, 24, 838-42.
- Willmarth, N. E. & S. P. Ethier (2006) Autocrine and juxtacrine effects of amphiregulin on the proliferative, invasive, and migratory properties of normal and neoplastic human mammary epithelial cells. *J Biol Chem*, 281, 37728-37.
- Wong, A. J., S. H. Bigner, D. D. Bigner, K. W. Kinzler, S. R. Hamilton & B. Vogelstein (1987) Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 6899-903.
- Wong, A. J., J. M. Ruppert, S. H. Bigner, C. H. Grzeschik, P. A. Humphrey, D. S. Bigner & B. Vogelstein (1992) Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 2965-9.
- Xu, J. M., Y. Han, H. Q. Duan, E. M. Gao, Y. Zhang, X. Q. Liu, J. S. Zhang, L. Toschi, D. Galetta, A. Azzariti & A. Paradiso (2009) EGFR mutations and HER2/3 protein expression and clinical outcome in Chinese advanced non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib. *J Cancer Res Clin Oncol*, 135, 771-82.
- Yang, C. H., C. J. Yu, J. Y. Shih, Y. C. Chang, F. C. Hu, M. C. Tsai, K. Y. Chen, Z. Z. Lin, C. J. Huang, C. T. Shun, C. L. Huang, J. Bean, A. L. Cheng, W. Pao & P. C. Yang (2008) Specific EGFR mutations predict treatment outcome of stage IIIB/IV patients with chemotherapy-naive non-small-cell lung cancer receiving first-line gefitinib monotherapy. *J Clin Oncol*, 26, 2745-53.
- Yarden, Y. (2001) The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer*, 37 Suppl 4, S3-8.
- Yarden, Y. & M. X. Sliwkowski (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 127-37.
- Yeatman, T. J. (2004) A renaissance for SRC. *Nat Rev Cancer*, 4, 470-80.
- Yonemura, Y., H. Takamura, I. Ninomiya, S. Fushida, K. Tsugawa, M. Kaji, Y. Nakai, S. Ohoyama, A. Yamaguchi & I. Miyazaki (1992) Interrelationship between transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in advanced gastric cancer. *Oncology*, 49, 157-61.
- Yoshioka, H., K. Hotta, K. Kiura, N. Takigawa, H. Hayashi, S. Harita, S. Kuyama, Y. Segawa, H. Kamei, S. Umemura, A. Bessho, M. Tabata & M. Tanimoto (2010) A phase II trial of erlotinib monotherapy in pretreated patients with advanced non-small cell lung cancer who do not possess active EGFR mutations: Okayama Lung Cancer Study Group trial 0705. *J Thorac Oncol*, 5, 99-104.
- Youlden, D. R., S. M. Cramb & P. D. Baade (2008) The International Epidemiology of Lung Cancer: geographical distribution and secular trends. *J Thorac Oncol*, 3, 819-31.
- Yun, C. H., T. J. Boggon, Y. Li, M. S. Woo, H. Greulich, M. Meyerson & M. J. Eck (2007) Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity. *Cancer Cell*, 11, 217-27.

- Zandi, R., A. B. Larsen, P. Andersen, M. T. Stockhausen & H. S. Poulsen (2007) Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor. *Cell Signal*, 19, 2013-23.
- Zhang, X., J. Gureasko, K. Shen, P. A. Cole & J. Kuriyan (2006) An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell*, 125, 1137-49.
- Zhou, B. B., M. Peyton, B. He, C. Liu, L. Girard, E. Caudler, Y. Lo, F. Baribaud, I. Mikami, N. Reguart, G. Yang, Y. Li, W. Yao, K. Vaddi, A. F. Gazdar, S. M. Friedman, D. M. Jablons, R. C. Newton, J. S. Fridman, J. D. Minna & P. A. Scherle (2006) Targeting ADAM-mediated ligand cleavage to inhibit HER3 and EGFR pathways in non-small cell lung cancer. *Cancer Cell*, 10, 39-50.
- Zhou, S., S. Ren, L. Yan, L. Zhang, L. Tang, J. Zhang & C. Zhou (2009) Clinical efficacy of erlotinib in patients previously treated for advanced non-small cell lung cancer. *Respirology*, 14, 709-15.