

State of the Art und Trends in der Molekular Diagnostik

Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (NSCLC)

Der rasche Kenntniszugewinn an entscheidenden molekularen Veränderungen beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) parallel mit der Entwicklung neuer zielgerichteter Medikamente und technischer Möglichkeiten zum Nachweis prädiktiver Marker machen das Lungenkarzinom nach Jahrzehnten der Stagnation zu einem der dynamischsten Felder in der Onkologie. Die Entdeckung therapeutisch angebarter onkogener driver-Mutationen, wie EGFR und Anaplastic lymphoma kinase (ALK), hat die Diagnose und Therapie fortgeschrittener NSCLC in den letzten Jahren revolutioniert. Dieser Artikel gibt eine Übersicht aktuell etablierter und für die Therapie entscheidender molekularer prädiktiver Markeranalysen sowie einen Ausblick über zukünftige Entwicklungen in der molekularen Diagnostik beim Lungenkarzinom.



Dr. med. Spasenija Savic
Basel



Prof. Dr. med. Lukas Bubendorf
Basel

Le gain rapide dans la connaissance des altérations moléculaires clés dans le cancer du poumon à cellules non petites (CNPC) en parallèle avec le développement de nouveaux médicaments ciblés et les possibilités techniques pour la détection de marqueurs prédictifs font que le cancer du poumon après des décennies de stagnation est l'un des domaines les plus dynamiques en oncologie. La découverte de mutations driver oncogéniques convenants à une approche thérapeutique comme l'EGFR et l'ALK a révolutionnée ces dernières années le diagnostic et le traitement du CNPC avancé. Cet article donne un aperçu sur les analyses de marqueurs moléculaires prédictifs actuellement établis et critiques pour le traitement et un regard sur l'évolution future du diagnostic moléculaire dans le cancer du poumon.

Nachweis etablierter prädiktiver molekularer Marker beim Lungenkarzinom

Zum jetzigen Zeitpunkt sind aktivierende EGFR Mutationen und ALK Rearrangements die beiden einzigen in klinischen Studien validierten prädiktiven Marker, für welche zielgerichtete Medikamente beim NSCLC zugelassen sind.

Welche Lungenkarzinome sollen auf prädiktive Marker hin untersucht werden?

Bei unselektionierten Adenokarzinomen westeuropäischer Patientenkollektive liegt die Prävalenz aktivierender EGFR Mutationen und ALK Rearrangements bei ca. 10 bzw. 5%. EGFR Mutationen und ALK Rearrangements wurden äusserst selten bei Plattenepithelkarzinomen ohne Adenokarzinomkomponente beschrieben. Bei den meisten Plattenepithelkarzinomen mit beschriebener EGFR Mutation dürfte es sich um adenosquamöse Karzinome oder um Fehlinterpretationen eines wenig differenzierten Adenokarzinoms gehandelt haben (1). Die morphologische Subtypisierung von NSCLC, insbesondere die Unterscheidung zwischen einem Adenokarzinom und einem Plattenepithelkarzinom, ist somit nicht nur entscheidend für die Wahl der Chemotherapie, sondern auch für den Entscheid molekulare prädiktive Markeranalysen durchzuführen.

ren. Unabhängig von klinischen Faktoren wie Alter, Geschlecht und Raucherstatus sollten alle fortgeschrittenen nicht-plattenepithelialen NSCLC auf eine EGFR und ALK Mutation hin untersucht werden (2). Bei Nicht-Rauchern mit einem bioptisch oder zytologisch diagnostizierten Plattenepithelkarzinom muss an die Möglichkeit eines adenosquamösen Karzinoms gedacht werden, da reine Plattenepithelkarzinome praktisch ausschliesslich bei Rauchern vorkommen. Aufgrund der kleinen untersuchten Karzinomprobe besteht in dieser Situation die Möglichkeit, dass die Adenokarzinomkomponente nicht miterfasst wurde. In diesen Einzelfällen ist eine EGFR und ALK Analyse bei der Diagnose eines Plattenepithelkarzinoms ratsam.

Welches Tumormaterial eignet sich für prädiktive Markeranalysen?

70% der NSCLC werden in einem inoperablen, fortgeschrittenen Tumorstadium an kleinen Biopsien und Zytologien diagnostiziert. Dieses wenige Karzinommaterial muss für die Diagnose, die Karzinomsubtypisierung und die prädiktiven molekularen Markeranalysen ausreichen. Bis zu 40% aller NSCLC werden rein an zytologischem Material diagnostiziert, ohne dass bioptisches Tumorgewebe zur Verfügung steht. Konventionelle zytologische Präparate enthalten Karzinomzellen mit einer hervorragenden DNA Qualität und sind, entgegen der weit verbreiteten Meinung, sehr gut für DNA basierte Analysen geeignet (3). An unserem Institut führen wir erfolgreich etwa gleich viele prädiktive molekulare Markeranalysen an konventionellen Zytologien und formalinfixierten, paraffineingebetteten (FFPE) Biopsien durch.

Methoden zum Nachweis von EGFR Mutationen und ALK Rearrangements

Das am weitesten verbreitete Verfahren zum Nachweis von EGFR Mutationen ist aktuell die direkte Gensequenzierung der Exone 18–21. Diese Methode hat den Vorteil, dass sie alle Mutationen nachweisen kann. Aufgrund der relativ geringen analytischen Sensitivität ist ein Tumorzellanteil von mind. 30% am Gesamtmaterial notwendig um falsch negative Resultate zu vermeiden. Meist sind Karzinomzellen und benigne Zellen auf dem gleichen zytologischen oder bioptischen Material nebeneinander vorhanden, was eine Tumorzellanreicherung, manuell oder mittels Lasermikrodissektion, erfordert. Nach Anreicherung reichen bereits 100 Tumorzellen von zytologischem Material bzw. 200 von FFPE Biopsien

(formalin-fixiertes paraffin-eingebettetes Gewebe) für die DNA Extraktion und direkte Gensequenzierung.

Der Goldstandard zum Nachweis eines ALK Rearrangements ist aktuell die break-apart Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH). Diese Untersuchungsmethode ist teuer, nicht in jedem Labor verfügbar und die Auswertung ist komplex und bedarf einiger Erfahrung. Das ALK Protein wird im normalen Lungengewebe nicht exprimiert und erst ein Rearrangement des ALK Gens führt zu einer ALK Expression. Ein immunhistochemisches ALK Screening wäre deutlich kostengünstiger, in jedem Labor verfügbar und das Resultat einfach zu interpretieren. Im Vergleich zu ALK positiven Lymphomen ist die Konzentration des ALK Proteins in ALK positiven Lungenkarzinomen jedoch deutlich geringer. Immunhistochemische Nachweismethoden mit dem für ALK Lymphome etablierten Antikörper ALK1 sind deshalb für die Detektion ALK positiver Lungenkarzinome nicht geeignet. Erst kürzlich wurden neue ALK Antikörper, wie z.B. 5A4 (Novocast-ra™, Leica Biosystems) und D5F3 (Ventana), mit hochsensitiven Nachweismethoden verfügbar und zeigen vielversprechende Resultate. Der 5A4 Antikörper eignet sich hervorragend zum Nachweis ALK positiver NSCLC auch an zytologischen Präparaten (4).

Zukünftige Entwicklungen in der molekularen Diagnostik beim Lungenkarzinom

Prädiktive molekulare Marker in klinischer Erprobung

Neben EGFR und ALK wurden zahlreiche weitere therapeutisch angehbare onkogene driver-Mutationen nicht nur bei Adenokarzinomen, sondern auch bei Plattenepithelkarzinomen der Lunge entdeckt (5, 6). HER2 und BRAF Mutationen, sowie ROS1 und RET Rearrangements sind Beispiele bereits therapeutisch angehbarer Veränderungen, deren zielgerichtete Behandlung in ersten Studien oder Fallberichten erfolgversprechende Resultate bei Adenokarzinomen der Lunge zeigen (7–10).

Nach initial gutem Ansprechen entwickeln leider alle Lungenkarzinome, im Median etwa nach einem Jahr, eine Resistenz gegen die Erstlinien-Tyrosinkinaseinhibitoren Gefitinib und Erlotinib bzw. gegen Crizotinib. Sekundäre Resistenzmutationen im Zielgen oder eine Aktivierung eines alternativen Signalweges wurden sowohl bei Lungenkarzinomen mit einer aktivierenden EGFR Mutation, als auch mit einem ALK Rearrangement beschrieben. Neue Zweitgeneration EGFR- und ALK Tyrosinkinaseinhibitoren sind in Entwicklung, welche auch bei Lungenkarzinomen mit sekundär erworbenen Resistenzmutationen wirksam sind. Die molekulare Charakterisierung von Rebiopsien bei Tumorprogression unter einer zielgerichteten Therapie dürfte in Zukunft entscheidend sein für die Anpassung der Therapie.

Die Herausforderung zahlreicher molekularer Markeranalysen

Das Resultat prädiktiver molekularer Markeranalysen sollte möglichst rasch zur Verfügung stehen, damit eine effektive Therapie eingeleitet werden kann. Andererseits müssen im Algorithmus prädiktiver molekularer Analysen die Kosten dieser teuren Untersuchungen mitberücksichtigt werden. Typischerweise kommen verschiedene onkogene driver-Mutationen bei NSCLC nicht gleichzeitig vor und schliessen sich gegenseitig aus (5). Wir gehen daher bei der Bestimmung prädiktiver molekularer Markeruntersuchungen im diagnostischen Alltag sequenziell vor: ALK und ROS1 werden immunhistochemisch vorgescannt und es werden mittels direkter Gensequenzierung EGFR (Exon 18–21), KRAS (Exon 2), HER2 (Exon 19–20) und BRAF (Exon 11 und 15) untersucht. Die

ALK und ROS1 Immunhistochemie liegt bereits nach 24 Stunden vor und die Sequenzierungsergebnisse in der Regel nach fünf Arbeitstagen. Etwa 30% der untersuchten fortgeschrittenen nicht-plattenepithelialen NSCLC zeigen eine EGFR oder KRAS Mutation. In diesen Fällen wird auf eine weiterführende ALK- und ROS1-FISH Untersuchung verzichtet. Bei Fehlen einer EGFR oder KRAS Mutation erfolgt die ALK- und ROS1-FISH Untersuchung, deren Resultate in der Regel innert weiterer drei Arbeitstage vorliegen. Das gleichzeitige Vorkommen von HER2 bzw. BRAF Mutationen mit ALK- oder ROS1 Rearrangements ist noch nicht genügend untersucht, so dass der Nachweis einer entsprechenden Mutation die FISH Untersuchungen nicht ausschliesst. Bei immunhistochemischer ALK oder ROS1 Expression erfolgt sofort die Bestätigung mittels FISH noch bevor die Gensequenzierungsergebnisse vorliegen.

Neue Technologie-Plattformen beruhend auf der massiven parallelen Sequenzierung (oder auch „Next Generation Sequencing“) sind nun kommerziell verfügbar und können simultan zahlreiche genetische Veränderungen gleichzeitig, schnell und kostengünstig mit hoher analytischer Sensitivität nachweisen. Diese Technologie wird in naher Zukunft die Verfügbarkeit therapeutisch entscheidender genetischer Informationen beschleunigen und bisher etablierte kosten- und zeitintensive molekulare Methoden ablösen.

Dr. med. Spasenija Savic

Institut für Pathologie, Universitätsspital Basel
Schönbeinstrasse 40, 4003 Basel
spasenija.savicprince@usb.ch

Prof. Dr. med. Lukas Bubendorf

Leitender Arzt, Universitätsspital Basel, Schönbeinstrasse 40, 4003 Basel
bubendorfl@uhbs.ch

+ Literatur

am Online-Beitrag unter: www.medinfo-verlag.ch

Take-Home Message

- ◆ Die korrekte NSCLC Subtypisierung ist entscheidend für die Wahl der Therapie und der prädiktiven molekularen Markeruntersuchungen
- ◆ Ist sowohl zytologisches als auch biotisches Tumormaterial vorhanden, sollten die Proben für die korrekte Karzinomsubtypisierung und die allfälligen molekularen prädiktiven Markeruntersuchungen miteinander verglichen werden
- ◆ Zytologische Präparate sind genauso gut geeignet wie Biopsien für molekulare prädiktive Markeranalysen
- ◆ Die ALK Immunhistochemie eignet sich sehr gut zum Vorscreening ALK positiver Lungenkarzinome

Message à retenir

- ◆ Le sous-typage correct du CPNC est crucial pour le choix de la thérapie et des études de marqueurs moléculaires prédictifs
- ◆ Tant du matériel tumoral cytologique et biopsique est disponible, les échantillons pour le sous-typage correct du carcinome et pour les analyses éventuelles de marqueurs moléculaires prédictifs doivent être comparées
- ◆ Préparations cytologiques conviennent aussi bien que des biopsies pour l'analyse des marqueurs moléculaires prédictifs
- ◆ L'immunohistochimie ALK est très utile pour la présélection du cancer du poumon ALK positif

Literatur:

1. Rekhtman N, Paik PK, Arcila ME et al. Clarifying the spectrum of driver oncogene mutations in biomarker-verified squamous carcinoma of lung: lack of EGFR/ KRAS and presence of PIK3CA/AKT1 mutations. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(4):1167-76. Epub 2012/01/10
2. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB et al. Molecular Testing Guideline for Selection of Lung Cancer Patients for EGFR and ALK Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2013;8(7):823-59. Epub 2013/04/05
3. Savic S, Bihl MP, Bubendorf L. Non-small cell lung cancer. Subtyping and predictive molecular marker investigations in cytology. *Der Pathologe*. 2012;33(4):301-7. Epub 2012/06/20. Nichtkleinzellige Lungenkarzinome. Subklassifikation und prädiktive molekulare Markeruntersuchungen in der Zytologie
4. Savic S, Bode B, Diebold J et al. Detection of ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancers on Cytological Specimens: High Accuracy of Immunocytochemistry with the 5A4 Clone. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2013. Epub 2013/05/22
5. Pao W, Hutchinson KE. Chipping away at the lung cancer genome. *Nature medicine*. 2012;18(3):349-51. Epub 2012/03/08
6. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature*. 2012;489(7417):519-25. Epub 2012/09/11.
7. Mazieres J, Peters S, Lepage B et al. Lung Cancer That Harbors an HER2 Mutation: Epidemiologic Characteristics and Therapeutic Perspectives. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(16):1997-2003. Epub 2013/04/24
8. Gautschi O, Pauli C, Strobel K et al. A patient with BRAF V600E lung adenocarcinoma responding to vemurafenib. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2012;7(10):e23-4. Epub 2012/06/30
9. Bergethon K, Shaw AT, Ou SH et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(8):863-70. Epub 2012/01/05
10. Gautschi O, Zander T, Keller FA et al. A patient with lung adenocarcinoma and RET fusion treated with vandetanib. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2013;8(5):e43-4. Epub 2013/04/16