Anwendungen der FISH in der Diagnostik von Lungenkarzinomen

Das Bronchialkarzinom ist die häufigste krebserkrankte Todesursache weltweit [23]. In ca. 85 % der Fälle wird ein nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom (NSCLC) diagnostiziert. Histologisch wird zwischen den Haupttypen pulmonalem Adenokarzinom („lung adenocarcinoma“, LUAD) und Plattenepithelkarzinom („lung squamous cell carcinoma“, LUSC) sowie weiteren seltenen Subtypen (NOS, adenosquames Bronchialkarzinom etc.) unterschieden [23]. Neben der morphologiebasierten Klassifikation wurde eine biomarkerbasierte Einteilung etabliert, die vor allem therapeutisch fundamental wegweisend ist.

Biomarkerbasierte Einteilung und Stellenwert der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Den Meilenstein für die biomarkerbasierte Therapie im NSCLC legte die Entdeckung der aktivierenden Mutationen im *EGFR*-Gen 2004 [19]. Seither wurden weitere therapierelevante Biomarker identifiziert, deren Analyse leitliniengemäß fester Bestandteil bei der Erstdiagnose jedes NSCLC im fortgeschrittenen Stadium ist [16]. Die Durchführung dieser Analysen variiert geografisch in Abhängigkeit der Verfügbarkeit von Arzneimitteln und den jeweils erforderlichen Tests. In Europa wird für alle Tumore mit Nicht-Plattenepithel-Histologie mindestens die

Untersuchung von *EGFR*, *BRAF*, *ALK*, *ROS1* sowie auch der PD-L1-Expressionsstatus gefordert [16, 20]. Idealerweise sollten die molekularen Analysen auf die neueren Zielstrukturen *MET*, *RET*, *ERBB2*, *NTRK* und *KRAS* ausgeweitet werden ([20]; **Abb. 1**). Bislang wird für LUSC nur die PD-L1-Testung verlangt [20], aber auch hier entwickelt sich das Feld der personalisierten Therapie weiter (**Abb. 1**). Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) hat früh Eingang in die Routinediagnostik des NSCLC gefunden, da sie es erlaubt, rasch, präzise und gewebsparend bestimmte genetische Veränderungen nachzuweisen. Obwohl neuere, umfassendere molekulare Methoden, wie z. B. die (RNA-)sequenzierungsbasierte Fusionsdetektion, an Aufmerksamkeit gewinnen, ist die FISH nach wie vor der Goldstandard zum Nachweis von therapie relevanten Gentranslokationen und Amplifikation im NSCLC.

Besondere Schwierigkeiten können sehr kleine Gewebeproben, artifiziell alteriertes Gewebe, Nekrose- oder Entzündungsareale mit vielen Makrophagen (falsch positive Sonden anreicherung) oder Fixierungsartefakte hervorrufen. Daher sollten alle Fälle immer (zusätzlich) von einem erfahrenen Auswerter gesichtet werden, der die zahlreichen möglichen Fallstricke kennt und interpretieren kann.

Ein aussagekräftiger Befund, der neben dem Ergebnis auch die verwendete Sonde, die Anzahl der gezählten Tumorzellen sowie den Schwellenwert der verwendeten Sonde angibt und vor allem das Untersuchungsergebnis in den kli-

nischen Kontext einordnet, ist bei jeder Analyse wünschenswert.

ALK

Eine *ALK*-Translokation in Form einer inversen Fusion mit dem *EML4*-Gen wurde erstmals 2007 nachgewiesen [24]. Mittlerweile sind über 15 *EML4*-*ALK*-Fusionsvarianten und weitere Fusionspartner bekannt [26]. Für die 3–5 % der Patienten mit *ALK*-positivem NSCLC ist seit 2012 Crizotinib (Xalkori®, Pfizer Oncology, New York, USA) durch die European Medicines Agency (EMA) zugelassen ohne Kopplung an eine festgelegte Nachweismethode [1]. Gängige *ALK* Dual-Colour-Break-Apart-Sonden markieren das 3'- (rot) und das 5'- (grün) Ende von *ALK*. Sind 5'- und 3'-Signale einer Tumorzelle verschmolzen, liegt definitionsgemäß ein Fusionsmuster vor (*ALK*-negativ). Ein Bruchmuster ist definiert durch separate 5'- und 3'-Signale in einem Abstand von 2 oder mehr Signaldurchmessern in einer Tumorzelle (**Tab. 1**). Dieser Abstand wurde basierend auf Testungen mit dem Vysis LSI *ALK* Break-Apart FISH Probe Kit (Abbott Laboratories, Illinois, USA.) festgelegt. Wird ein anderes analytisches Reagenz verwendet, kann die Sondengröße variieren, was Unterschiede in der Definition eines Bruchmusters zur Folge haben kann [26]. Generell empfiehlt es sich, immer die Anweisungen des jeweiligen Herstellers zu befolgen. Bei einer *ALK*-*EML4*-Inversion kann der Abstand auch kleiner sein (die Gene liegen in unmittelbarer Nachbarschaft voneinander auf Chromosom 2). Eine *EML4*/*ALK*-Tricheck-

Dieser Beitrag wurde in der Zeitschrift *Der Pathologe* 6 · (2020) 41:582–588. <https://doi.org/10.1007/s00292-020-00831-7> erstpubliziert. Zweitpublikation mit freundlicher Genehmigung der Autoren.

Abb. 1 ▲ Therapierelevante Biomarker: Darstellung der NSCLC-relevanten (NSCLC, nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom) Biomarker und der Etappen der molekularen Aufarbeitung. Unabdingbare Biomarker sind in *fett* hervorgehoben. *RET*-FISH- und *NTRK*-IHC werden erst bei Negativität der anderen Marker ergänzt. *pulmonale Adenokarzinome und Nicht-Plattenepithel-Histologie; **MET-IHC-Vorscreening; FISH wird zur Bestätigung benötigt; *LUAD* pulmonales Adenokarzinom, *LUSC* Plattenepithelkarzinom, *wt* wildtyp, *mut* mutiert, *amp* amplifiziert, + positiv, – negativ, ~ diskrepanz/zweifelhaft

Sonde (wie ZytoLight® SPEC ALK/EML4 TriCheck™, ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Deutschland), die zusätzlich *EML4* (blau) markiert, erleichtert den Nachweis einer *ALK-EML4*-Translokation [8]. Visualisiert wird eine *ALK-EML4*-Fusion durch separate grüne und rote Signale mit jeweils einem kolokalisierten blauen Signal (zusätzliches blaues Signal durch Bruch und *EML4*-Genumlagerung) (Abb. 2). Eine Nicht-*EML4-ALK*-Translokation weist ein *ALK*-Bruchmuster ohne Änderung der *EML4*-Signale auf [22]. Für robust reproduzierbare Ergebnisse sollten Tumorzellen in mindestens 4 verschiedene Gesichtsfeldern ausgezählt werden, da eine gewisse intratumorale Heterogenität vorliegen kann [26]. Positive Studienergebnisse, die zur Zulassung von *ALK-TKI* führten, motivierten zu einem Grenzwert von 15% [13] bezogen auf mindestens 50 ausgewertete Tumorzellen [26]. In der Mehrheit der Fälle kann der *ALK*-Status im NSCLC anhand des Cutoff von 15%

zuverlässig bestimmt werden. Grenzfälle mit 10–20% *ALK*-positiven Tumorzellen sollten reevaluiert und mittels einer weiteren Testmethode untersucht werden [26]. Diagnostisch anspruchsvoll sind zudem Tumoren mit einem isolierten 3'-Signalmuster beruhend auf einer Deletion des 5'-Signals nach Neuordnung der *ALK*-Tyrosinkinase-Domäne im 3'-Ende. Diese machen bis zu 5% der positiven Fälle aus. Die TriCheck™-Sonde kann hier das Vorliegen einer *ALK/EML4*-Fusion bestätigen [22]. Das extrem selten vorkommende Signalmuster mit isolierten 5'-Signalen wurde jedoch initial als negativ gewertet [26]. In kleinen Fallserien wurden bei Tumoren mit intratumoral 60–87% isolierten 5'-Signalen und positiver *ALK*-IHC eine *ALK*-Translokation mittels sequenzierungs-basierten Verfahren nachgewiesen und die Patienten erfolgreich mit Crizotinib therapiert [6]. Dies unterstreicht die Bedeutung der Validierung schwieriger Signalmuster mittels orthogonaler

Methoden. Hierfür empfiehlt sich vor allem die (RNA-)sequenzierungs-basierte Fusionsdetektion. Bei gängigeren *ALK*-Mustern ist die IHC sequenzierungs-basierten Methoden gleichwertig, da die immunhistochemische *ALK*-Proteinexpression überzeugend mit dem Vorhandensein einer *ALK*-Translokation korreliert, sodass die *ALK*-IHC als Screeninginstrument und sogar als Primärtest für die Auswahl von Patienten für die *ALK-TKI*-Therapie zugelassen ist [16, 20]. Über die IHC ist allerdings die Identifikation des jeweiligen Fusionspartners oder der jeweiligen *ALK*-Variante nicht möglich, was offenbar prognostische Relevanz hat [15] und von großem akademischem Interesse ist. Aktuell hat der Nachweis der Variante im klinischen Alltag bei der Primärdiagnostik jedoch keine therapeutische Konsequenz und wird daher nicht routinemäßig durchgeführt.

Alle nicht eindeutigen Fälle (ungewöhnliches Signalmuster oder gängiges/

beschriebenes Signalmuster, aber Diskrepanz zwischen *ALK*-FISH und *ALK*-IHC) sollten immer ergänzend durch sequenzierungsbasierte Methoden getestet werden [16].

ROS1

Weit über 20 *ROS1*-Fusionspartner sind bekannt, dabei liegt der größte Teil nicht wie *ROS1* auf Chromosom 6. Etwa 1–2 % der pulmonalen Adenokarzinome zeigen eine *ROS1*-Translokation [26]. Der diagnostische Goldstandard ist die FISH mittels einer Dual-Colour-Break-Apart-FISH-Sonde. Diverse Probenets sind kommerziell erhältlich, die den 5'-Teil (telomer) und den 3'-Teil (zentromer) von *ROS1* erkennen, dabei variieren die Genabschnitte, die von den Sonden erfasst werden [26]. In allen bekannten Fusionsgenen ist die *ROS1*-Tyrosinkinase-Domäne am 3'-Ende [9]. Hier existieren 2 positive *ROS1*-Signal-kategorien (■ Tab. 1): Das „klassische“ Bruchmuster mit separaten grünen und roten Signalen im Mindestabstand von einem Signaldurchmesser (■ Abb. 2) und das „atypische“ Muster mit isolierten 3'-Signalen [9]. Der Grenzwert für ein positives Ergebnis liegt beim Nachweis von 15 % und mehr Tumorzellen mit „klassischem“ Bruchmuster oder „atypischem“ Muster [26]. Das atypische Muster, das in einer großen Kohorte von *ROS1*-translozierten LUAD in annähernd 50 % vorkommen kann, birgt die Gefahr eines falsch positiven Ergebnisses [9]. Somit sollten alle atypischen Muster mittels eines orthogonalen Verfahrens validiert werden, wobei hier sequenzierungsbasierte Tests empfehlenswert sind. Die *ROS1*-IHC eignet sich aufgrund einer hohen Sensitivität für eine *ROS1*-Translokation, bei allerdings geringer Spezifität [16, 20, 26] nur bedingt zur Validierung untypischer Muster. Sie kann aber zum Vorscreening herangezogen werden und insgesamt somit die Zahl der notwendigen FISH-Untersuchungen reduzieren.

Die Bedeutung eines nach konventionellem Grenzwert knapp positiven *ROS1*-FISH-Ergebnis bei gleichzeitig positiver *ROS1*-IHC und zusätzlichem Nachweis einer weiteren begleitenden

Wien klin Mag 2021 · 24:34–42 <https://doi.org/10.1007/s00740-020-00370-0>
© Der/die Autor(en) 2020

L. Hieggelke · A. M. Schultheis

Anwendungen der FISH in der Diagnostik von Lungenkarzinomen

Zusammenfassung

Die rasante Entwicklung im Bereich der Lungenkrebstherapie wurde maßgeblich auch durch die Entdeckung molekularer Marker und der damit verbundenen Möglichkeit einer personalisierten Therapie bestimmt. Die heutige Lungenkrebsdiagnostik stellt hohe Anforderungen an den Pathologen. An kleinen Gewebeproben muss nicht nur die Diagnose gestellt, sondern müssen auch alle therapie-relevanten Biomarker getestet werden. Das verlangte Mindestmaß bei fortgeschrittenem nichtkleinzelligen Lungenkarzinom („non small cell lung cancer“, NSCLC) mit Nicht-Plattenepithel-Histologie umfasst die Testung von *EGFR*, *BRAF*, *ALK*, *ROS1* und PD-L1. Für Plattenepithelkarzinome ist bislang nur die PD-L1-IHC (Immunhistochemie, IHC) gefordert. Nach Möglichkeit sollten neuere Biomarker wie *RET*, *MET*, *HER2*, *NTRK* und *KRAS* integriert werden. Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung („fluorescence in situ hybridization“, FISH) ist eine gut-etablierte Methode zum Nachweis

einer *ALK*-, *ROS1*- und *RET*-Translokation, wobei die *ALK*-IHC als gleichwertig anerkannt wurde. Die Relevanz der *MET*-FISH zum Amplifikationsnachweis im *First-line-Setting* ist umstritten. Nicht eindeutige Fälle sollten immer mit einem orthogonalen Verfahren validiert werden. Hierzu eignet sich bei *ALK* und *ROS1* die IHC mit dem Vorteil schneller und kostengünstiger Testergebnisse sowie geringen Gewebeverbrauchs. Bei allen anderen Translokationen oder bei Diskrepanz zwischen IHC und FISH sollte ein sequenzierungsbasiertes Verfahren ergänzt werden. Zur Detektion der seltenen *NTRK*-Fusionen eignet sich bei hoher Sensitivität ein IHC-Vorscreening; die sequenzierungsbasierte Analyse ist hier bei Positivität zur Bestätigung indiziert.

Schlüsselwörter

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung · Biomarker · Molekulare Methode · Bronchialkarzinom · Immunhistochemie

Application of FISH in the diagnosis of lung cancer

Abstract

Rapid advancements in the area of lung cancer therapy were determined by the discovery of molecular markers and the possibility of their therapeutic exploitation. Today's lung cancer diagnosis places high demands on pathologists. In the majority of cases, small tissue samples must suffice for diagnosis and testing of all relevant biomarkers. The minimum panel required for advanced non-small-cell lung carcinoma (NSCLC) with nonsquamous histology includes testing of *EGFR*, *BRAF*, *ALK*, *ROS1*, and PD-L1-expression. So far, only PD-L1-IHC (immunohistochemistry, IHC) is required for squamous cell carcinoma. If possible, newer biomarkers such as *RET*, *MET*, *HER2*, *NTRK*, and *KRAS* should be integrated in test panels. Fluorescence in situ hybridization (FISH) is a well-established molecular method for the detection of chromosomal aberrations, such as *ALK*-, *ROS1*-, and *RET*-translocations and amplifications, such as

Her2/neu or *MET*. The relevance of *MET*-FISH for the detection of amplifications in the first-line setting is controversial, but of high importance in the recurrent setting. All equivocal or discrepant results should be validated using orthogonal methods. IHC is a suitable, thoroughly validated method for *ALK* and *ROS1* aberration detection with the advantage of quick and cost-efficient test results and tissue conservation. All other translocations, or discrepancy between IHC and FISH, require a sequencing-based confirmation procedure. The low frequency of *NTRK* fusions, and high sensitivity of *NTRK*-IHC, suggest using IHC as a prescreening tool with subsequent sequencing-based analysis for IHC positive cases.

Keywords

Fluorescence-in-situ hybridization · Biomarker · Molecular methods · Lung cancer · Immunohistochemistry

Hier steht eine Anzeige.

Tab. 1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs(FISH)-Signalmuster: Schematische Übersicht der Signalmuster der *ALK*-/*ROS1*- und *RET*-FISH-Sonde und ihre Interpretation bezüglich des Vorliegens einer Translokation

Sonden/Norm-Signalverteilung	Aberrante Signalverteilung	Interpretation
<i>ALK</i>	<i>ALK</i> - <i>EML4</i>	Nicht- <i>ALK</i> - <i>EML4</i> -Translokation

	<i>ALK</i> - <i>EML4</i> -Inversion
	<i>ALK</i> isolierte 3'-Signale (rot)	<i>ALK</i> -Translokationsstatus positiv (≥ 15 % Bruchsignale in den Tumorzellen)
	Ohne <i>EML4</i>	<i>ALK</i> -Translokationsstatus (≥ 15 % <i>ALK</i> -isolierte 3'-Signale)
	Mit <i>EML4</i>	Interpretation im Kontext der <i>ALK</i> -Immunhistochemie, ggf. Bestätigung durch sequenzierungsbasiertes Verfahren
	<i>ALK</i> isolierte 5'-Signale (grün)	<i>ALK</i> -Translokationsstatus (≥ 15 % <i>ALK</i> -isolierte 5'-Signale) in Kombination mit einer positiven <i>ALK</i> -Immunhistochemie ein sequenzierungsbasiertes Verfahren anschließen
<i>ROS1</i> und <i>RET</i>	<i>ROS1</i> -/ <i>RET</i> -Translokation	<i>ROS1</i> -Translokationsstatus positiv (≥ 15 % Bruchsignale in den Tumorzellen); <i>RET</i> -Translokationsstatus (≥ 20 % Bruchsignale in den Tumorzellen)

	<i>ROS1</i> -/ <i>RET</i> -isolierte 3'-Signale (grün)	<i>ROS1</i> -Translokationsstatus positiv (<i>ROS1</i> -isolierte 3'-Signale ≥ 20 %); <i>RET</i> -Translokationsstatus (<i>RET</i> -isolierte 3'-Signale ≥ 20 %) Bestätigung mittels sequenzierungsbasierten Verfahrens
	<i>ROS1</i> -/ <i>RET</i> - atypische Signalmuster (isolierte 5'-Signale (rot))	<i>ROS1</i> -/ <i>RET</i> -Translokationsstatus zweifelhaft; bei allen konstant aberranten Mustern u. a. isolierte 5'-Signale in >20 % der Zellen sollte eine Validierung mittels eines orthogonalen/sequenzierungsbasierten Verfahrens durchgeführt werden

Treibermutationen (wie z. B. *EGFR*) ist nicht abschließend geklärt [29].

RET

Die Prävalenz der *RET*-Translokation beträgt in LUAD 1–2 % [11]. Bislang sollte die Testung nur im Rahmen eines erweiterten Panels oder bei initial negativem *EGFR*-, *ALK*- und *ROS1*-Ergebnis durchgeführt werden [16]. Verschiedene Fusionspartner wurden identifiziert, wobei die *RET*-Fusion mit *KIF5B* auf dem gleichen Chromosom (chr10) am besten charakterisiert ist. Analog zur *ALK*-*EML4*-Fusion liegt eine parazentrische Inversion vor [11]. Allen Fusionen ist die ligandenunabhängige Aktivierung der *RET*-Tyrosinkinase gemeinsam, was das Ansprechen auf Multikinaseinhibitoren erklärt [11]. Diagnostisch ist die *RET*-FISH-Analyse eine hochsensitive Nachweismethode einer *RET*-Fusion [27]. Das häufigste Signalmuster ist ein Fusionssignal neben einem separaten 3'-

und 5'-Signal ([14]; ■ Abb. 2). In Analogie zu *ROS1* sind auch translozierte *RET*-Fälle mit isoliertem 3'-Signal als prädominiertes FISH-Signalmuster beschrieben, die in einem Kollektiv knapp ein Drittel ausmachen können [14].

Für die *RET*-IHC besteht bisher keine Anwendungsempfehlung [16], sodass in zweifelhaften Fällen hier immer eine sequenzierungsbasierte Analyse zur Bestätigung einer *RET*-Fusion angestrebt werden sollte.

Nach Studien ist ein Grenzwert ab 20 % Zellen mit einem aberranten Signalmuster für ein positives Ergebnis plausibel ([14, 27]; ■ Tab. 1). Die Beurteilung ist besonders herausfordernd, da geteilte *RET*-Signale zum Teil im Abstand von nur einem Signaldurchmesser liegen [14]. Daher empfiehlt sich besonders bei der *RET*-FISH die Auswertung durch erfahrene Pathologen/Auswerter.

MET

MET codiert den „hepatocyte growth factor receptor“ (HGFR) und liegt auf Chromosom 7. Initial wurden eine *MET*-Genaberrationen im Rahmen einer erworbenen Resistenz auf *EGFR*-TKIs nachgewiesen [4]. Die Rolle von *MET*-Genveränderungen als onkogene Treiber ist nicht abschließend geklärt. Bisher hat sich der Nachweis von 2 teilweise überlappenden *MET*-Alterationen in NSCLC hinsichtlich therapeutischer Ansätze als vielversprechend erwiesen: *MET*-Exon-14(*MET*Ex14)-skipping-Mutationen, die durch ein Überspringen von Exon 14 einen reduzierten Proteinabbau zur Folge haben [12] und die Amplifikation des *MET*-Gens [3, 10]. Die Nachweismethode der Wahl einer Amplifikation ist die FISH Analyse. Dual-Colour-FISH-Sonden markieren das *MET*-Gen und den zentromeren Teil von Chromosom 7 (*CEN* 7). Bei der Polysomie ist die Kopieanzahl beider Sonden identisch und

Hier steht eine Anzeige.

Abb. 2 ▲ Fusionsdetektion. **a** Kräftig zytoplasmatische Immunhistochemie (IHC)-Positivität für ALK (Klon 1A4, Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland) in der Metastase eines pulmonalen Adenokarzinoms (Vergr. 40:1). **b** korrespondierendes positives ALK-FISH-Ergebnis mit 78 % separaten 3'-Signalen (rot), kolokalisiert mit *EML4* (blau, Vergr. 63:1). **c** Zytoplasmatisch kräftiger ROS1-IHC-Nachweis (Klon D4D6, Cell signaling, Danvers, USA) (Vergr. 40:1). **d** korrespondierend positive ROS1-FISH (ZytoLight® SPEC ROS1 Dual Color Break Apart Probe, ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Deutschland) mit separaten roten und grünen Signalen (Bruchmuster, Vergr. 63:1). **e** Gering differenziertes pulmonales Adenokarzinom in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Vergr. 40:1). **f** Positive RET-FISH (ZytoLight® SPEC RET Dual Color Break Apart Probe, ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Deutschland) mit separaten (extra) grünen Signalen in allen Tumorzellen (Vergr. 63:1) validiert durch einen RET-Translokationsnachweis mittels sequenzierungsbasierter Analyse (ARCHER®, Archer FusionPlex, Archer Dx, Boulder, CO, USA)

gesteigert (>2 /Zelle). Eine echte Amplifikation liegt bei isoliert vermehrten *MET*-Signalen vor, was die Ratio (*MET/CEN 7*) anhebt ([10]; ■ **Abb. 3**). *MET*-Amplifikationen sind in gleicher Frequenz in LUAD und LUSC nachzuweisen [21]. Aufgrund von fokal amplifizierten Tumorklonen („hot spots“) und Fällen mit isoliert

amplifizierten Zellen in fleckförmiger Verteilung im gesamten Tumorgewebe ist ein komplettes Tumorscreening unerlässlich. Bislang wurde empfohlen, 60 Tumorzellen in 3 Arealen mit der höchsten *MET*-Genkopiezahl auszuzählen (3×20 Zellen). Verschiedene Auswertungsalgorithmen wurden postu-

liert [3, 21]: Neben einem *MET/CEN 7*-Verhältnis $\geq 2,0$ werden Fälle mit einer durchschnittlichen *MET*-Genkopiezahl von ≥ 5 bzw. ≥ 6 als positiv gewertet sowie eine intermediär ($\geq 50\%$ mit ≥ 5 *MET*-Genkopien) und eine niedrige *MET*-Amplifikation ($\geq 40\%$ mit ≥ 4 Kopien) abgegrenzt.

Der Stellenwert der *MET*-Amplifikation im primären Bronchialkarzinom bleibt jedoch umstritten und nach aktuellen Studien als Prognosefaktor für das Ansprechen einer *MET*-Inhibitor-Therapie dem Nachweis einer *METex14*-skipping-Mutation unterlegen [30]. Die therapeutische Rolle einer Top-Level-*MET*-Amplifikation (durchschnittlich ≥ 10 *MET*) in LUSC, die mit einer besonders schlechten Prognose assoziiert ist [18], bleibt noch offen. Nach aktueller Empfehlung soll die *MET*-Analyse integriert in erweiterte Biomarkerpanels nach negativem Ergebnis für *EGFR*, *ALK* und *ROS1* und vor allem in der Resistenzsituation (s. Abschn. „Diagnostik bei erworbener Arzneimittelresistenz“) durchgeführt werden [16]. Die *MET*-IHC ist nicht standardisiert und korreliert nur mit einer *MET*-Amplifikation, während das IHC-Ergebnis bei einer *MET*-Exon-14-skipping-Mutation heterogen und offenbar ohne Vorhersagewert ist [2].

Neue Biomarker

Zu den neueren Biomarkern gehören vor allem die Gene der neurotrophen Tropomyosinrezeptorkinase (NTRK) – *NTRK1*, *NTRK2* und *NTRK3* –, die 3 TRK-Proteine (TRKA, TRKB und TRKC) codieren. *NTRK*-Translokationen treten in bis zu 4 % der NSCLC auf [28]. Vielversprechende Studienergebnisse führten bereits zur FDA-Zulassung von Larotrectinib, einem selektiven pan-TRK-Inhibitor [28]. Der Nachweis im Rahmen der Zulassungsstudien erfolgte NGS-basiert oder mittels FISH. Eine Multiplex-FISH mit 3 separaten FISH-Assays ist technisch möglich und aussagekräftig, aber teuer, zeitaufwendig und erfordert viel Erfahrung bei der Interpretation. Gut in der Diagnostik etabliert ist bisher nur die *ETV6-NTRK*-FISH [17]. Die panNTRK-IHC zeigte

Abb. 3 ◀ MET-Nachweis. **a** Feinnadelpunktion eines pulmonalen Adenokarzinoms (HE-Färbung, Vergr. 40:1). **b** Nachweis der *MET*-Amplifikation mit Ratio (*MET*/*CEN 7*) 2,06 und durchschnittlicher *MET*-Genkopiezahl von 12,15 mittels FISH (ZytoLight® SPEC *MET*/*CEN 7* Dual Color Probe, ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Deutschland) (Vergr. 63:1). **c** Kräftige zytoplasmatische *MET*-IHC-Positivität (Klon SP44, Roche, Basel, Schweiz) (Vergr. 40:1). **d** Korrespondierende *MET*-Amplifikation mit Ratio (*MET*/*CEN 7*) von 3,7 und durchschnittlicher *MET*-Genkopiezahl von 7,70 (Vergr. 63:1)

in Studien einen zuverlässigen Nachweis aller *NTRK*-Fusionen und wird daher vor allem zum Vorscreening einer *NTRK*-Fusion empfohlen [7], wobei schon der geringste IHC-Proteinnachweis eine Multipanel-*NTRK*-Genanalyse oder FISH-Analyse nach sich ziehen sollte [17].

Diagnostik bei erworbener Arzneimittelresistenz

Die erworbene Arzneimittelresistenz bleibt ein kritisches Hindernis für die Wirksamkeitsmaximierung gezielter Therapien im NSCLC. Zu den Mechanismen gehören zielabhängige und zielunabhängige Veränderungen. Der Minimalalgorithmus für die TKI-Resistenztestung ist nicht nur von akademischem Interesse, sondern maßgeblich für klinische Therapieentscheidungen und umfasst den Nachweis/die Bestätigung des initialen Treibermechanismus (*EGFR*-Mutation, *ALK*- oder *ROS1*-Translokation) sowie zusätzlich die Detektion einer möglichen *MET*-, *HER2*- oder *ALK*-Amplifikation als Resistenzmechanismus. Analog zur *MET*-FISH markieren Dual-Colour-Sonden das Zielgen (*ALK/HER2*) und das zugehörige Zentromer (*CEN 2/CEN 17*). Der Grenzwert für eine *HER2*-Amplifikation

liegt bei einer Ratio (*HER2/CEN 17*) von $\geq 2,2$ oder einer Genkopiezahl von >15 in 10 % der Zellen. Fälle im Graubereich (Ratio 1,8–2,2) sollten eingehend kontrolliert und mittels eines weiteren Verfahrens eingeordnet werden [25]. Eine *ALK*-Amplifikation wird bereits ab einer Ratio >2 angenommen [5].

Die Detektion von (High-level-) *MET*-Amplifikationen unter TKI- Resistenzentwicklung hat einen besonders hohen Stellenwert, da diese therapeutisch adressierbar sind (Kombination aus *EGFR*- und *MET*-TKI), und ist möglicherweise sogar höher einzuschätzen als in der Primärdiagnostik.

Fazit für die Praxis

- Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ist eine präzise, schnelle und relativ kostengünstige Nachweismethode von relevanten Genveränderungen im nichtkleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC).
- Bei der *ALK*-Testung darf die *ALK*-IHC (Immunhistochemie) als gleichwertig angesehen werden, eine Bestätigung mittels FISH-Analyse ist allerdings trotzdem angeraten.
- Für andere Biomarker (*ROS1*, *RET*) korreliert die IHC nicht eindeutig mit

der Translokation und FISH bleibt die Methode der Wahl.

- Next-Generation-Sequencing(NGS)-basierte Sequenzierungsverfahren sollten bei allen diskrepanten/ungewöhnlichen FISH-Fällen hinzugezogen werden.
- Beim Nachweis von Amplifikationen (u. a. *MET*) ist die FISH den sequenzierungsbasierten Verfahren bisher überlegen.
- Für alle FISH Analysen ist die gute Vorkenntnis des Untersuchers essenziell; die Signalmuster der Sonden müssen genau gekannt werden, die Ergebnisse im Gesamtkontext der Erkrankung interpretiert und hinterfragt werden.
- Die Erstellung eines FISH-Befundes mit aussagekräftigem Ergebnis, aber auch unter Angabe des verwendeten SONDENSYSTEMS, der Anzahl der gezählten Tumorzellen, des Schwellenwertes und auch ggf. Besonderheiten/Schwierigkeiten ist wünschenswert.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Anne M. Schultheis
Institut für Pathologie, Uniklinik Köln
Kerpener Str. 62, 50937 Köln, Deutschland
anne.schultheis@uk-koeln.de

Funding. Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Einhaltung ethischer Richtlinien

Interessenkonflikt. L. Hieggelke und A. M. Schultheis geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Für diesen Beitrag wurden von den Autoren keine Studien an Menschen oder Tieren durchgeführt. Für die aufgeführten Studien gelten die jeweils dort angegebenen ethischen Richtlinien.

Open Access Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden.

Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen.

Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Literatur

- Agency EM (2012) Eur Med Agency. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/xalkori-epar-public-assessment-report_en.pdf. Zugegriffen: 18. April 2020
- Castiglione R, Alidousty C, Holz B et al (2019) Comparison of the genomic background of MET-altered carcinomas of the lung: biological differences and analogies. *Mod Pathol* 32:627–638
- Drilon A, Cappuzzo F, Ou S-H et al (2017) Targeting MET in lung cancer: Will expectations finally be met? *J Thorac Oncol* 12:15–26
- Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T et al (2007) MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 316:1039–1043
- Gainor JF, Dardaei L, Yoda S et al (2016) Molecular mechanisms of resistance to first- and second-generation ALK inhibitors in ALK-rearranged lung cancer. *Cancer Discov* 6:1118–1133
- Guyard A, Charpy C, Théou-Anton N et al (2019) Isolated 5' signals are an atypical pattern to be considered as positive for ALK rearrangement: a brief report of three cases and review of the literature. *Transl Oncol* 12:784–787
- Hechtman JF, Benayed R, Hyman DM et al (2017) Pan-Trk immunohistochemistry is an efficient and reliable screen for the detection of NTRK fusions. *Am J Surg Pathol* 41:1547–1551
- Heydt C, Kostenko A, Merkelbach-Bruse S et al (2016) ALK evaluation in the world of multiplex testing: Network Genomic Medicine (NGM): the Cologne model for implementing personalised oncology. *Ann Oncol. Suppl* 3:iii25–iii34. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw303>. PMID:27573753
- Heydt C, Ruessler V, Pappesch R et al (2019) Comparison of in situ and extraction-based methods for the detection of ROS1 rearrangements in solid tumors. *J Mol Diagnostics* 21:971–984
- Kawakami H, Okamoto I, Okamoto W et al (2014) Targeting MET amplification as a new oncogenic driver. *Cancers* 6:1540–1552
- Kohno T, Tsuta K, Tsuchihara K et al (2013) RET fusion gene: translation to personalized lung cancer therapy. *Cancer Sci* 104:1396–1400
- Kong-Beltran M, Seshagiri S, Zha J et al (2006) Somatic mutations lead to an oncogenic deletion of met in lung cancer. *Cancer Res* 66:283–289
- Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR et al (2010) Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 363:1693–1703
- Lee SE, Lee B, Hong M et al (2015) Comprehensive analysis of RET and ROS1 rearrangement in lung adenocarcinoma. *Mod Pathol* 28:468–479
- Lin JJ, Zhu VW, Yoda S et al (2018) Impact of EML4-ALK variant on resistance mechanisms and clinical outcomes in ALK-positive lung cancer. *J Clin Oncol* 36:1199–1206
- Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL et al (2018) Updated molecular testing guideline for the selection of lung cancer patients for treatment with targeted Tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *Arch Pathol Lab Med* 142:321–346
- Marchiò C, Scaltriti M, Ladanyi M et al (2019) ESMO recommendations on the standard methods to detect NTRK fusions in daily practice and clinical research. *Ann Oncol* 30(9):1417–1427. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz204>. PMID:31268127
- Overbeck TR, Cron DA, Schmitz K et al (2020) Top-level MET gene copy number gain defines a subtype of poorly differentiated pulmonary adenocarcinomas with poor prognosis. *Transl Lung Cancer Res* 9(3):603–616. <https://doi.org/10.21037/tlcr-19-339>. PMID:32676323; PMCID:PMC7354108
- Paez JG, Janne PA, Lee JC et al (2004) EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304:1497–1500
- Planchard D, Popat S, Kerr K et al (2018) Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 29:iv192–iv237
- Schildhaus H-U, Schultheis AM, Rüschhoff J et al (2015) MET amplification status in therapy-Naïve Adeno- and Squamous cell carcinomas of the lung. *Clin Cancer Res* 21:907–915
- Smuk G, Pajor G, Szuhai K et al (2020) Attenuated isolated 3' signal: a highly challenging therapy relevant ALK FISH pattern in NSCLC. *Cancer Treat Res* 143:80–85
- Society AC (2020) Key statistics for lung cancer/What is lung cancer? <https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer/about/key-statistics.html>. Zugegriffen: 18. April 2020
- Soda M, Choi YL, Enomoto M et al (2007) Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 448:561–566
- Takezawa K, Pirazzoli V, Arcila ME et al (2012) HER2 amplification: a potential mechanism of acquired resistance to EGFR inhibition in EGFR-mutant lung cancers that lack the second-site EGFR T790M mutation. *Cancer Discov* 2:922–933
- Tsao MS, Hirsch FR, Yatabe Y et al (2016) IASLC Atlas of ALK and ROS1 testing in lung cancer. Editorial Rx Press, Aurora, Colorado
- Tsuta K, Kohno T, Yoshida A et al (2014) RET-rearranged non-small-cell lung carcinoma: a clinicopathological and molecular analysis. *Br J Cancer* 110:1571–1578
- Wang W, Xu C, Zhu Y et al (2018) P2.03-09 the real world of NTRK fusion data in the Chinese lung cancer populations: a multicenter study. *J Thorac Oncol* 13:S719
- Wiesweg M, Eberhardt WEE, Reis H et al (2017) High prevalence of concomitant oncogene mutations in prospectively identified patients with ROS1-positive metastatic lung cancer. *J Thorac Oncol* 12:54–64
- Wolf J, Seto T, Han J-Y et al (2019) Capmatinib (INC280) in METΔex14-mutated advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): Efficacy data from the phase II GEOMETRY mono-1 study. *J Clin Oncol* 37:9004–9004

Strategische Partnerschaft

Niedermolekulare Wirkstoffe sollen durch die Nutzung einer auf generativer Chemie basierenden Plattformtechnologie schneller entdeckt werden. Für diese Strategie haben das auf **maschinelle Lernlösungen** für die präklinische Arzneimittelforschung spezialisierte Biotechnologieunternehmen PostEra und das Pharmaunternehmen Pfizer eine mehrjährige strategische Partnerschaft geschlossen. Hochmoderne, skalierbare Modelle, die die umfangreichen Daten und das Fachwissen sowie die technologischen Möglichkeiten der beiden Partner verknüpfen, sollen in der **präklinischen Wirkstoffforschung** eingesetzt werden.

Quelle: Presseaussendung PostEra