

## Klinisch relevante Biomarker des nicht kleinzelligen Lungenkarzinoms

### Diagnostik, Prognose, Therapie und Prävention

Alex Soltermann, Holger Moch

**Das Lungenkarzinom ist eine heterogene Tumorentität, die mit molekularen Markern zunehmend genauer unterteilt wird. Diese Marker haben diagnostische, prädiktive oder prognostische Bedeutung. Damit wird eine individuellere und wirksamere beziehungsweise nebenwirkungsärmere Therapie ermöglicht. Die Unterteilung des nicht kleinzelligen Lungenkarzinoms in Adeno- und Plattenepithelkarzinom sowie die Bestimmung des EGFR-Mutations-Status des Adenokarzinoms sind von zentraler Bedeutung.**



Dr. med.  
Alex Soltermann



Prof. Holger Moch

Die chemotherapeutische Kombination von Erlotinib (Tarceva®; EGFR-Inhibitor) und Bevacizumab (Avastin®; VEGF-Inhibitor) wird als Erstlinientherapie beim fortgeschrittenen Adenokarzinom inzwischen standardmässig eingesetzt. Das Ansprechen auf Erlotinib ist jedoch einerseits mit dem Vorhandensein einer EGFR-Mutation verbunden, andererseits ist Bevacizumab wegen Blutungskomplikationen beim Plattenepithelkarzinom kontraindiziert.

#### Histotyp und Subtyp

Durch die neuen Erkenntnisse der Molekularpathologie der Lungenkarzinome wächst interessanterweise die Bedeutung der exakten histologischen Klassifikation. Gemäss WHO-Definition wird das Lungenkarzinom in nicht kleinzellig versus kleinzellig unterteilt, wobei der Begriff nicht kleinzellig die drei Histotypen Adenokarzinom, Plattenepithelkarzinom und grosszelliges Karzinom umfasst (1). Diese Einteilung beruht auf Kriterien, die durch die

HE- (Hämatoxylin-Eosin) beziehungsweise AB-PAS- (Alcianblue-periodic Acid Schiff) gefärbten histologischen Schnitte definiert sind: Kleinzellig heisst, dass die Durchmesser der Tumorzellen weniger als 3 Lymphozytendurchmesser und damit weniger als 50 Mikrometer betragen. Für ein Adenokarzinom (AD) wird der Nachweis einer glandulären Differenzierung oder die Bildung von saurem Muzin gefordert, welches sich in der AB-Färbung hellblau darstellt. Solche Schleimtropfen müssen in jeweils fünf Tumorzellen in zwei Gesichtsfeldern bei hoher Vergrösserung auftreten. Das Plattenepithelkarzinom (SQ) weist Verhornung und/oder Interzellularbrücken auf. Karzinome bestehend aus Tumorzellen mit grossen blasigen Kernen mit prominenten Nukleolen, aber ohne Schleimbildung oder Verhornung, werden als grosszellig (LC) bezeichnet.

Das Adenokarzinom wird in die vier Subtypen eingeteilt: glandulär-azinär (AC), bronchiolo-alveolär (BAC), solid (SOL) und papillär (PAP) (2). Das BAC wird subklassifiziert in BAC muzinös und BAC nicht muzinös. Die meisten Adenokarzinome setzen sich aus Mischungen dieser Subtypen zusammen, welche histologisch beschrieben und in Zukunft analog zu den Keimzelltumoren des Hodens wahrscheinlich in Prozenten angegeben werden müssen. Damit wird auch der Begriff bronchiolo-alveoläres Karzinom in Abgrenzung zum «normalen Adenokarzinom» obsolet. Diese Subtypen haben klinische Bedeutung, da EGFR-Mutationen häufiger beim papillären Adenokarzinom gefunden werden, was die Frage nach der molekularen Tumorheterogenität beziehungsweise einem zukünftigen Tumor-Mapping aufwirft (3). Das solide Wachstumsmuster entspricht einem Tumorgrad 5 und ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert.

#### Immunhistochemie

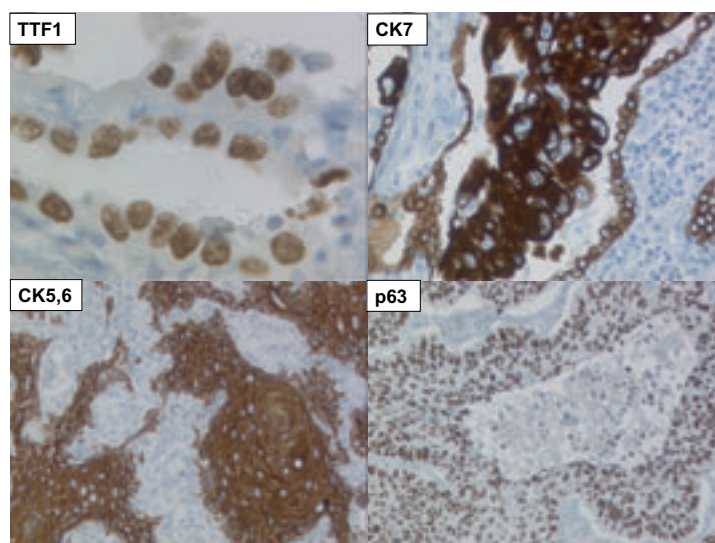
Diese Klassifikationen lassen sich bei Vorliegen eines Operationspräparates mit vollständig aufgearbeitetem Primärtumor mittels der erwähnten histochemischen Färbungen in den meisten Fällen vornehmen. Allerdings sind Histotypkombinationen wie zum Beispiel das adeno-squamöse Karzinom (AQ) nicht selten.

Wesentlich schwieriger wird die Klassifikation in kleinen Bronchialbiopsien, Pleuraergüssen oder Metastasenpunktionen. Dieses Gewebematerial wird typischerweise von Patienten mit fortgeschrittenem, chemotherapiebedürftigem Tumor gewonnen. Hier kommt man häufig nur zur Aussage, dass es sich um ein wenig differenziertes nicht kleinzelliges Karzinom handelt.

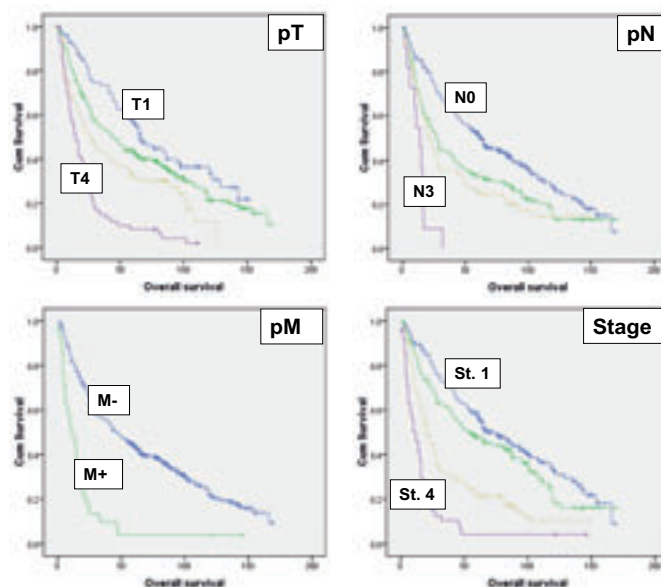
Biopsien, zytologische Ausstriche oder auch zytologische Zellblöcke können immunhistochemisch mit einer zwei- (TTF1/CK5,6) oder eventuell vierfachen (TTF1/CK7 versus CK5,6/p63) Antikörperfärbung weiter untersucht werden (4). Die Marker TTF1 (thyroid transcription factor 1) und CK7 (Zytokeratin 7) sind assoziiert mit Adeno-, CK5,6 (Zytokeratin 5/6) und p63 mit Plattenepithelkarzinom (Abbildung 1). TTF1 ist sehr spezifisch für das Adenokarzinom, beim muzinösen BAC sowie dem soliden Subtyp allerdings häufig nicht nachweisbar, was die Sensitivität verringert. Dieser Marker ist auch von prognostischem Interesse, da eine hohe Proteinexpression mit besseren Überlebenschancen korreliert (5). p63 wiederum weist eine mässige Spezifität für die Plattenepitheldifferenzierung auf, da 25 Prozent der Adenokarzinome dieses Protein exprimieren. Bei grosszelligen Karzinomen ist abzuklären, ob eine neuroendokrine Differenzierung vorliegt. Dies hilft bei der Unterscheidung von grosszellig nicht neuroendokrinen (LC) versus grosszellig neuroendokrinen (LC-NEC) Karzinom. Trotz zusätzlicher IHC bleiben einzelne Tumoren mit wenig differenziertem, solidem Wachstum, typischerweise TTF1-/p63+, nicht klassifizierbar, sodass weitergehende Algorithmen, wie der kommerzielle Assay Pulmotype®, in Erprobung sind (6).

#### Prognose und Prädiktion

Die Prognose des nicht kleinzelligen Lungenkarzinoms lässt sich anhand des klinisch-pathologischen TNM-Stadiums gut ableiten (Abbildung 2). Die TNM-Klassifikation wurde in den letzten Jahren überarbeitet und sollte spätestens bis 1. Januar 2010 in der neuen 7. Auflage angewendet werden (7). Prognostische Biomarker sind in diesem Kontext zurzeit eher von untergeordnetem Interesse. Dahinter steht



**Abbildung 1:** Immunhistochemische Vierfachbestimmung zur Differenzierung von Adeno- und Plattenepithelkarzinom. TTF1 bei nicht muzinösem BAC-Adenosubtyp. CK7 bei solidem Subtyp, randlich nicht neoplastische Pneumozyten. CK5,6 bei infiltrativ wachsendem Plattenepithelkarzinom. p63 bei Plattenepithelkarzinom mit zentraler Nekrose.



**Abbildung 2:** Gesamtüberlebensdauer in Monaten unserer Zürcher NSCLC-Kohorte nach pT, pN und pM sowie Tumorstadium (Kaplan-Meier, Log-rank-Test). Einschluss von 532 operierten Patienten 1993–2002 mit 5-Jahres-Überleben: 250 (47%) Adeno-, 262 (49%) Plattenepithel- und 20 (4%) adeno-squamöse Karzinome; alle p-Werte < 0,001.

folgende Überlegung: Die Lymphknotenmetastasierung ist ein komplexer zellbiologischer Prozess mit den Etappen Ablösung aus dem Zellverband, Durchbrechen der Basalmembran, Wanderung durch die extrazelluläre Matrix, Einbruch in die Lymphgefäße und Etablierung einer Metastase innerhalb des Immunsystems. Es ist deshalb nicht allzu wahrscheinlich, dass ein einzelnes Protein in einer multivariaten Cox-Regression zuverlässiger ist als das klinisch-pathologische TNM-Stadium. Prognostische Marker sind hauptsächlich für Patienten mit operierten pT1/2-Tumoren von Bedeutung, da in diesem Stadium nach der Operation keine weitere Therapie erfolgt. Auf grosses onkologisches Interesse stossen prädiktive Biomarker, welche ein Ansprechen auf eine bestimmte Therapie vorhersagen können, da sowohl unnötige Kosten wie schwere Nebenwirkungen reduziert werden könnten. Die beiden wichtigsten prädiktiven Marker für das Lungenkarzinom sind derzeit EGFR (epidermal growth factor receptor, HER1) und ERCC1 (excision repair cross-complementation group 1).

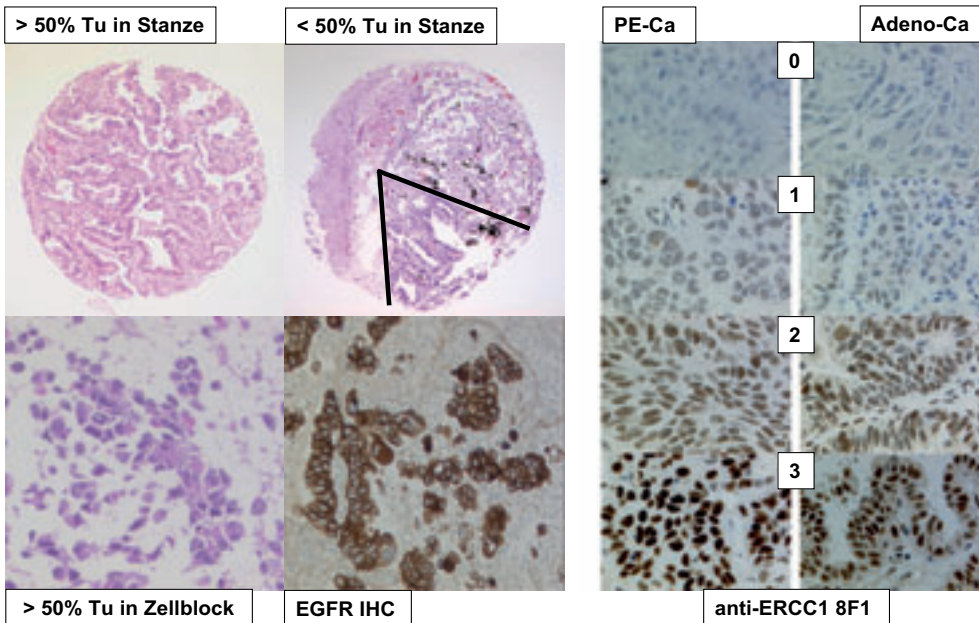
## EGFR

Der EGFR ist eine Zellmembran-ständige Rezeptortyrosinkinase, deren tumorale Aktivität mit verschiedenen Inhibitoren geblockt werden kann. Diese Inhibition ist besonders effektiv, wenn im Rahmen der sogenannten oncogenen Abhängigkeit (oncogene addiction) weitere Rezeptoren wie HER2, HER3 und HER4

ausfallen und zusätzlich bestimmte Mutationen im EGFR-Molekül auftreten (8). Neben Sensitivitätsmutationen wie L858R gibt es inzwischen nach Therapie oder auch primär Resistenzmutationen wie T790M. Der Stellenwert einer erhöhten Genkopienzahl von EGFR wird nach wie vor kontrovers diskutiert, scheint tendenziell aber wichtig zu sein (9–11). Problematisch sind dabei technische Aspekte, insbesondere die Schnittdicke. Für die FISH-Analyse (fluorescent in-situ hybridization) werden routinemässig 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Der Tumorzellkern weist jedoch einen Durchmesser von > 30 bis 50 µm auf. Dies bedeutet, dass nur ein Teil der Genkopien pro Kern gezählt wird, sodass eine adäquate Normalisierung des Wertes erforderlich ist. Die Bestimmung des EGFR-Status umfasst in unserem Institut zurzeit eine Genotypisierung der Exone 18 bis 21 (worin die meisten Mutationen liegen) mittels PCR und direkter Sequenzierung, eine Messung der Genkopienzahl mittels FISH und eine immunhistochemische Bestimmung der Proteinexpression (Abbildung 3 und 4). Diese Analyse kann auch an Biopsien oder Zellblöcken zytologischer Flüssigkeiten beziehungsweise von Punktaten durchgeführt werden. Voraussetzung dafür ist, dass genügend Tumorzellen vorhanden sind und deren Anteil mehr als 50 Prozent aller Zellen beträgt, um einen falschnegativen Verdünnungseffekt zu vermeiden. Es wird deshalb routinemässig eine Anreicherung durch Mikrodissektion mit einer 600-Mikrometer-Stanze durchgeführt.

## ERCC1

Der Begriff NER-Programm (nucleotide excision repair) bezeichnet einen komplexen zellbiologischen Mechanismus zur Reparatur geschädigter DNA. Dabei werden unter anderem auch Addukte von Cisplatin von der DNA entfernt. Innerhalb dieses Programms soll ERCC1 das wichtigste, taktgebende Protein sein. Es gilt darum das ERCC1-Paradoxon (12): Tumorzellen, die viel ERCC1-Protein exprimieren, sprechen schlechter auf cisplatinhaltige Chemotherapie an, da die Addukte besser entfernt werden. Bei nicht chemotherapierten Patienten ist die Gesamtüberlebensdauer hingegen länger, da ein funktionierendes NER-System besteht. Tumorzellen mit schwacher ERCC1-Expression sind chemosensitiver, die Überlebenszeit ist aber wegen defekter NER verkürzt. Dieses Konzept ist etwas stark simplifiziert, da neben ERCC1 zahlreiche weitere Proteine im NER-Programm einen wichtigen Beitrag leisten. Wie bei EGFR sind biologische Effekte nicht nur durch die Schwankungen der Proteinexpression zu erklären, sondern auch durch funktionell relevante Mutationen. Somit eröffnet sich hier die gleiche Diskussion wie beim EGFR (13, 14). An unserem Institut ist bis anhin die Immunhistochemie für ERCC1 etabliert, und sie wird bei Lungenkarzinomen sowie Pleuramesotheliomen angewendet. Die Proteinexpression wird anhand eines semiquantitativen Punktwerts von 0 bis 3 beschrieben, wobei der Antikörper 8F1 verwendet wird (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Aktuelle Bestimmung des EGFR- und ERCC1-Status am Institut für Klinische Pathologie, Universitätsspital Zürich. Linke Bildhälfte: Stanze aus Operationspräparat mit 100% tumorhaltiger Oberfläche (links oben) oder < 50% nur im markierten Sektor, angrenzend Gefässanschnitt beziehungsweise Lungenalveolen mit Anthrakose (rechts oben); Zellblockoberfläche mit ausschliesslich Tumorzellen aus Lymphknoten-FNP (links unten); EGFR-IHC mit membranärer Proteinexpression Score 3 (rechts unten). Rechte Bildhälfte: ERCC1-IHC mit nukleärer Proteinexpression Score 0 bis 3 bei Plattenepithel- und Adenokarzinom (AK 8F1).

## «Tumor-Microenvironment»

Ein Karzinom besteht aus malignen, invasiv wachsenden epithelialen Zellen, welche epitheliale Proteine wie Zytokeratin, aber keine mesenchymalen wie zum Beispiel Vimentin exprimieren. Das Karzinom entsteht über die Vorstufe der Dysplasie durch progressive Akkumulation genetischer Mutationen. Neuerdings wird der direkten zellulären Umgebung des Tumors, dem sogenannten «Tumor-Microenvironment», hohe Bedeutung zugemessen, da epitheliale Zellverbände in ein stark fibrogenes desmoplastisches Stroma eingebettet sind. Dieses besteht aus CAF (cancer-asso-

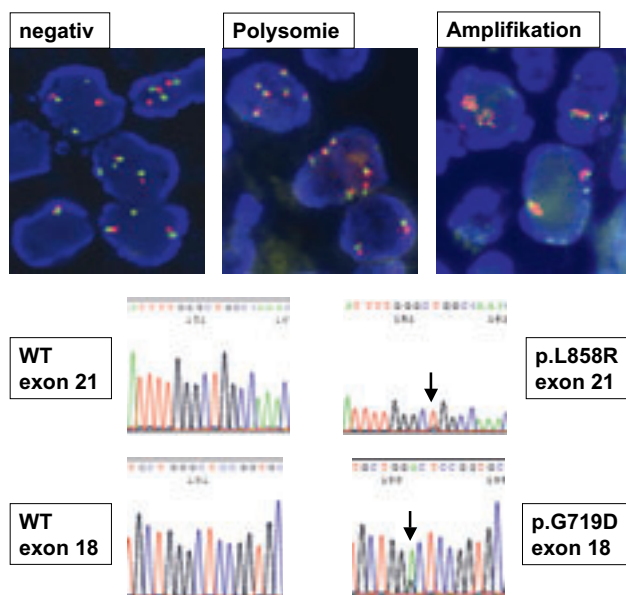
ciated fibroblasts), TAM (tumor-associated macrophages) und TEC (tumor-associated endothelial cells) sowie extrazellulärer Matrix und löslichen Faktoren wie TGF-beta (transforming growth factor beta) (15, 16). Um diese fibrilläre Matrix zu infiltrieren, müssen die Karzinomzellen eine morphologische Differenzierung durchlaufen, die sogenannte epithelial-mesenchymale Transition. Dabei lösen sie sich aus dem Zellverband mittels Verlust von Adhäsionsproteinen wie E-Cadherin und Akquisition mesenchymaler Proteine wie Vimentin oder Periostin, welche ihnen migratorische Eigenschaften verleihen (17, 18). Es ist darum naheliegend, eine kombinierte, auf das

Microenvironment zielende Therapie zu planen. Diese umfasst die Inhibition von tumorständigen Zellmembranrezeptoren (Erlotinib), Hemmung der Tumor-Neoangiogenese (Bevacizumab) und Beeinflussung von Tumorstroma und tumorassoziertem Immunsystem (19). Verschiedene Antikörper, wie L19 oder F16, gegen stromale Proteine wie Fibronectin oder Tenascin sind hierzu in klinischer Erprobung (20).

## Prävention

Der Lungenkrebs wird nach wie vor oft erst im späten Stadium diagnostiziert. Wirksame Strategien der primären und sekundären Prävention sind erforderlich, um Morbidität und Mortalität signifikant zu senken. Die Früherkennung erscheint durch die Tatsache erschwert, dass der Tumor innerhalb eines vorwiegend lufthaltigen Raums entsteht, welcher keine eigentliche Invasionsbarriere darstellt. Dieses Karzinom ist allerdings grösstenteils vermeidbar, da weit über 90 Prozent der Patienten Raucher sind beziehungsweise früher geraucht haben. Das wissenschaftliche Interesse für das Adenokarzinom bei nicht rauchenden Frauen asiatischen Ursprungs mit EGFR-Mutation ist zwar gross, eine solche Patientin aber in der Schweiz eine seltene Ausnahme. Rauchen hat in letzter Zeit an Attraktivität verloren, sodass sich die Anstrengungen der Primärprävention, zum Beispiel in Rekrutenschulen oder für eine rauchfreie Arbeitsumgebung, positiv auswirken dürften.

Im Sinne der sekundären Prävention stellt sich die zentrale Frage, mit welchem Biomarker



**Abbildung 4:** Aktueller EGFR-Status. Obere Bildhälfte: EGFR-FISH mit Beispielen für normale Zellen, hochgradige Polysomie ( $\geq 4$  Kopien in 40% der Zellen) und Amplifikation (Cluster). Untere Bildhälfte: EGFR-Genotypisierung mittels PCR; Nachweis von Punktmutation L858R auf Exon 21 beziehungsweise G719D auf Exon 18; Mutationspeak kleiner beziehungsweise grösser als Wildtyp-Hintergrund.

man das pT1-Stadium erfassen könnte. Bekannterweise haben Patienten mit Tumoren in der Grösse von 5 bis 10 mm, das heisst an der Grenze zwischen AAH (atypischer adenomatöser Hyperplasie) und Adenokarzinom vom reinen BAC-Subtyp, eine exzellente Prognose. Solche Tumoren sind mittels CT-Screening detektierbar (21). Dessen Effektivität könnte möglicherweise durch eine vorausgehende Triage mit einem molekularen Marker gesteigert werden. Ein solcher Frühmarker müsste entweder in das Bronchiallumen oder in das periphere Blut abgegeben werden. Anekdotisch ist zu erwähnen, dass Hunde die Fähigkeit besitzen sollen, maligne Tumoren wie Melanom, Nierenzell- oder Lungenkarzinom zu riechen, da diese spezifische volatil-organische Stoffe zu produzieren scheinen (22). Da das Lungenkarzinom stark fibrogen ist und auch kleine Läsionen bereits eine zentrale Narbe aufweisen, scheint es möglich, dass desmoplastische Stromaproteine wie Periostin relativ früh im peripheren Blut erscheinen (23, 24).

## Zusammenfassung

- Mit der Kombination TTF1/CK5,6 zusätzlich zu der konventionellen Morphologie lässt sich die Mehrheit der wenig differenzierten nicht kleinzelligen Lungenkarzinome in Adeno- oder Plattenepithelkarzinom einteilen.
- Vor einer Therapie mit EGFR-Inhibitoren sollte der EGFR-Mutations-Status abgeklärt werden, da bestimmte Mutationen prädiktiv für das Ansprechen sind.
- ERCC1 ist ein neuer potenzieller Marker für das Ansprechen auf platinolbasierte Chemotherapie.
- Weitergehende Kombinationstherapien gegen das «Tumor-Microenvironment» erscheinen zellbiologisch sinnvoll, bedürfen aber der klinischen Evaluation.
- Die Prognose des Lungenkarzinoms ist stark stadienabhängig, weswegen ein sogenannter «pT1-Marker» von zentralem Interesse ist. ◆

## Korrespondenzadresse:

Dr. med. A. Soltermann  
 Institut für Klinische Pathologie  
 UniversitätsSpital Zürich  
 Schmelzbergstrasse 12  
 8091 Zürich  
 E-Mail: alex.soltermann@usz.ch

Potenzielle Interessenkonflikte: keine

## Literatur:

1. Travis W.D. et al.: Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. 1<sup>st</sup> ed. Kleihues P, Sobin LH, editors. Lyon: IARC Press; 2004.
2. Kerr K.M.: Pulmonary adenocarcinomas: classification and reporting. *Histopathology* 2009; 54 (1): 12–27.
3. Motoi N. et al.: Lung adenocarcinoma: modification of the 2004 WHO mixed subtype to include the major histologic subtype suggests correlations between papillary and micropapillary adenocarcinoma subtypes, EGFR mutations and gene expression analysis. *Am J Surg Pathol* 2008; 32 (6): 810–827.
4. Downey P. et al.: If it's not CK5/6 positive, TTF-1 negative it's not a squamous cell carcinoma of lung. *APMIS* 2008; 116 (6): 526–529.
5. Perner S. et al.: TTF1 expression in non-small cell lung carcinoma: association with TTF1 gene amplification and improved survival. *J Pathol* 2009; 217 (1): 65–72.
6. Ring B.Z. et al.: A novel five-antibody immunohistochemical test for subclassification of lung carcinoma. *Mod Pathol* 2009 May 8, Epub ahead of print.
7. Travis W.D.: Reporting lung cancer pathology specimens. Impact of the anticipated 7th Edition TNM classification based on recommendations of the IASLC Staging Committee. *Histopathology* 2009; 54 (1): 3–11.
8. Sharma S.V. et al.: Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7 (5): 169–181.
9. Cappuzzo F. et al.: Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97 (9): 645–655.
10. Bunn P.A. et al.: Biological markers for non-small cell lung cancer patient selection for epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor therapy. *Clin Cancer Res* 2006; 12 (12): 3652–3656.
11. Cappuzzo F. et al.: Prospective study of gefitinib in epidermal growth factor receptor fluorescence in situ hybridization-positive/phospho-Akt-positive or never smoker patients with advanced non-small-cell lung cancer: the ONCOBELL trial. *J Clin Oncol* 2007; 25 (16): 2248–2255.
12. Olaussen K.A. et al.: DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 2006; 355 (10): 985–991.
13. Booton R. et al.: ERCC1 mRNA expression is not associated with response and survival after platinum-based chemotherapy regimens in advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2007; 2 (10): 902–906.
14. Gossage L., Madhusudan S.: Current status of excision repair cross complementing-group 1 (ERCC1) in cancer. *Cancer Treat Rev* 2007; 33 (6): 565–577.
15. Bhowmick N.A., Neilson E.G., Moses H.L.: Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 2004; 432 (7015): 332–337.
16. Hofmeister V., Schrama D., Becker J.C.: Anti-cancer therapies targeting the tumor stroma. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57 (1): 1–17.
17. Polyak K., Weinberg R.A.: Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 2009; 9 (4): 265–275.
18. Soltermann A. et al.: Prognostic significance of epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transition protein expression in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14 (22): 7430–7437.
19. Rybak J.N. et al.: Ligand-based vascular targeting of disease. *ChemMedChem* 2007; 2 (1): 22–40.
20. Pedretti M. et al.: Comparative immunohistochemistry of L19 and F16 in non-small cell lung cancer and mesothelioma: Two human antibodies investigated in clinical trials in patients with cancer. *Lung Cancer* 2009; 64 (1): 28–35.
21. Ashraf H. et al.: Effect of CT screening on smoking habits at 1-year follow-up in the Danish Lung Cancer Screening Trial (DLCST). *Thorax* 2009; 64 (5): 388–392.
22. McCulloch M. et al.: Diagnostic accuracy of canine scent detection in early- and late-stage lung and breast cancers. *Integr Cancer Ther* 2006; 5 (1): 30–39.
23. Sasaki H. et al.: Serum level of the periostin, a homologue of an insect cell adhesion molecule, as a prognostic marker in nonsmall cell lung carcinomas. *Cancer* 2001; 92 (4): 843–848.
24. Soltermann A. et al.: N-glycoprotein profiling of lung adenocarcinoma pleural effusions by shotgun proteomics. *Cancer* 2008; 114 (2): 124–135.