

Die molekulare Diagnostik des Lungenkarzinoms

Onkogene Drivermutationen als prädiktive Marker

Parallel mit der Entwicklung hocheffizienter molekularer Techniken wird eine zunehmende Anzahl onkogener Drivermutationen bei nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) entdeckt. Dieser Artikel gibt eine Übersicht über bereits therapeutisch angehbare onkogene Drivermutationen und ihre Bedeutung als prädiktive Marker.

SPASENIJA SAVIC PRINCE

SZO 2015; 4: 6–10.



Spasenija Savic Prince

Während Jahrzehnten und trotz moderner Chemotherapieprotokolle blieb die Prognose von Patienten mit einem Lungenkarzinom gleichbleibend schlecht. Erst mit der Entdeckung onkogener Drivermutationen bei Adenokarzinomen (ADC) und der Entwicklung molekularer zielgerichteter Medikamente konnte die Prognose dieser genetisch definierten Lungenkarzinome signifikant verbessert werden. Molekularpathologische Untersuchungen sind heute ein wichtiger Bestandteil in der diagnostischen Aufarbeitung von Lungenkarzinomen; die Pathologie ist heute ein wichtiges «Mitglied» im multidisziplinären Team, welches die optimale Behandlung von Lungenkarzinompatienten ermöglicht.

Genetische Subtypisierung des NSCLC

Genetisch definierte Subtypen des NSCLC sind durch spezifische Genveränderungen charakterisiert, welche zu einer konstitutiven Aktivierung des entsprechenden Proteins führen und meist nicht gleichzeitig vorkommen, sondern sich gegenseitig ausschliessen. Trotz komplexer genetischer Veränderun-

gen sind das Wachstum und das Überleben der Tumorzelle von dieser einen onkogenen Mutation abhängig; die zielgerichtete Hemmung des entsprechenden Signalweges kann somit therapeutisch genutzt werden. Der Erfolg jeder zielgerichteten molekularen Therapie hängt von einem sensitiven und spezifischen prädiktiven Test ab, welcher die molekulare Alteration nachzuweisen vermag und somit entscheidend für die Selektion der für den Patienten am besten wirksamen Therapie ist. Heute gehört es zum Standard, alle nicht-plattenepithelial differenzierten NSCLC, unabhängig von klinisch-pathologischen Charakteristika (wie Raucherstatus, Alter, Geschlecht oder spezifische ADC-Morphologie), in fortgeschrittenen Tumorstadien (Stadium IV) auf EGFR-Mutationen und ALK-Rearrangements hin zu untersuchen (1). Zahlreiche weitere onkogene Drivermutationen, gegen welche zielgerichtete Medikamente bereits zur Verfügung stehen, sind bei ADC bekannt.

Heute werden NSCLC nicht nur nach EGFR-Mutationen und ALK-Rearrangements, deren Bedeutung in klinischen Studien belegt wurde, getestet. Es wird auch nach genetischen Alterationen gesucht, deren prädiktiver Wert für das Ansprechen auf eine entsprechende zielgerichtete Therapie bei anderen molekular definierten malignen Tumoren gezeigt werden konnte. Diese Mutationen stellen typischerweise eine sehr kleine Subgruppe an molekular definierten ADC dar, sodass entsprechende klinische Studien dazu äusserst schwierig durchgeführt werden können.

Genmutationen bei EGFR, KRAS, BRAF und HER2

EGFR

Bei Lungenkarzinomen wurde das Konzept der zielgerichteten molekularen Therapie und die entschei-

ABSTRACT

Molecular diagnostics in NSCLC

Today treatment with EGFR- and ALK-tyrosine kinase inhibitors is standard of care in patients with advanced stage non-squamous lung cancers, harbouring predictive EGFR and ALK mutations, respectively. Systematic studies of the cancer genome in lung cancer with advances in molecular technologies rapidly identify numerous other targetable oncogenic driver mutations. The article gives an overview of these mutations and their impact on molecular predictive testing.

Keywords: Non-small cell lung cancer, predictive molecular markers, personalized therapy.

dende Bedeutung prädiktiver molekularer Marker erst 2004 am Beispiel von EGFR (epidermal growth factor receptor) erkannt. Damals wurden erstmals aktivierende Mutationen in der Tyrosinkinasedomäne von EGFR als Basis für das Ansprechen auf EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) beschrieben. Diese Erkenntnis hat die Forschung auf dem Gebiet des Lungenkarzinoms beflügelt und die Diagnose und die Therapie des Lungenkarzinoms revolutioniert.

Aktivierende somatische Mutationen in den Exonen 18 bis 21 der Tyrosinkinasedomäne des EGFR-Gens führen zu einer ligandenunabhängigen Aktivierung des EGFR. In westeuropäischen Patientenkollektiven sind 8 bis 15% der ADC EGFR-mutiert. Deletionen im Exon 19 und die L858R-Punktmutation im Exon 21 machen 85% aller dieser Mutationen aus und sind prädiktiv für das Ansprechen auf eine Therapie mit einem EGFR-TKI. Selten kommen jedoch auch Mutationen vor (meist im Exon 20; z.B. die Punktmutation T790M oder kleine Insertionen), welche mit einer primären Resistenz auf Erstgeneration-EGFR-TKI assoziiert sind.

Nach einem initialen Ansprechen auf EGFR-TKI entwickeln Patienten mit einem EGFR-mutierten NSCLC eine Resistenz auf die Behandlung und zeigen nach 9 bis 14 Monaten eine Tumorprogression. Sekundäre Mutationen im EGFR, welche die Bindung des EGFR-TKI an den Rezeptor hemmen (z.B. T790M-Mutation), eine Aktivierung anderer Signalwege (z.B. durch eine MET-Amplifikation oder ein ALK-Rearrangement), aber auch eine Transformation in ein kleinzelliges Lungenkarzinom wurden als Mechanismen einer sekundären Resistenz beschrieben.

KRAS

KRAS-Mutationen im Exon 2 führen zu einer EGFR-unabhängigen konstitutiven Aktivierung des RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweges. Sie sind die häufigsten onkogenen Drivermutationen mit einer Prävalenz von 25 bis 30% bei ADC. Obwohl eine direkte Hemmung von KRAS bisher therapeutisch nicht effektiv war, ist die Kenntnis des KRAS-Status für die Selektion weiterer genetischer Untersuchungen hilfreich. Da sich onkogene Drivermutationen gegenseitig ausschließen, ist die Kenntnis des KRAS-Status eine einfache interne Qualitätskontrolle dafür, dass die molekularen Analysen valide sind. Lungenkarzinome mit EGFR- und KRAS-Wildtyp sollten auf ALK- und ROS1-Gen-Rearrangements hin untersucht werden.

BRAF

BRAF-Mutationen wurden erstmals vor zirka 10 Jahren in malignen Melanomen beschrieben, welche bei 40 bis 60% eine aktivierende V600E-Mutation im Exon 15 aufweisen. Gegen BRAF gerichtete TKI sind in der Behandlung von malignen Melanomen mit einer aktivierenden V600E-Mutation bereits zugelast-

sen. BRAF-Mutationen haben eine Prävalenz von 1 bis 5% bei ADC der Lunge. Etwa 50% entsprechen V600E-Mutationen und kommen häufiger bei Nichtrauchern und weiblichen Patienten vor. Gegen BRAF gerichtete TKI zeigen eine Wirksamkeit bei ADC mit einer V600E-Mutation (2). Die übrigen Mutationen liegen überwiegend im Exon 11. Diese non-V600E-Mutationen scheinen eine andere Subgruppe von ADC zu definieren; sie finden sich überwiegend bei Rauchern und scheinen gegen entsprechende zielgerichtete Medikamente resistent zu sein.

HER2

Aktivierende Insertionen im Exon 20 des HER2-Gens haben bei ADC eine Prävalenz von 1 bis 2%. HER2-mutierte ADC zeigen in ersten Studien ein Ansprechen gegen HER2-gerichtete TKI und monoklonale Antikörper. Im Gegensatz zu HER2-amplifizierten Mammakarzinomen zeigten HER2-amplifizierte NSCLC keine Wirksamkeit gegen eine HER2-gerichtete Therapie (3).

Rezeptor-Tyrosinkinase-Gen-Rearrangements: ALK, ROS1 und RET

ALK ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK), welche normalerweise nicht in der Lunge exprimiert wird. Das EML4-ALK-Fusionsgen wurde erst 2007 entdeckt und zeigt eine konstitutive Aktivierung der ALK-Kinase. ALK-Rearrangements haben eine Prävalenz von 3 bis 5% bei unselektionierten ADC, liegen aber bei Adenokarzinomen mit EGFR- und KRAS-Wildtyp bei zirka 10%.

Nur 4 Jahre nach der Entdeckung von EML4-ALK wurde aufgrund erster positiver klinischer Studienergebnisse Crizotinib für die Therapie von fortgeschrittenen NSCLC mit einem ALK-Rearrangement zugelassen. Parallel dazu erfolgte erstmals in der Geschichte zielgerichteter Medikamente auch die Zulassung des entsprechenden prädiktiven Testes, des «Vysis-ALK-FISH-Proben.Kits» (Abbott Mol. Inc., Des Plaines, IL, USA). Eine Untersuchung auf ein ALK-Rearrangement ist bei nicht-plattenepithelialen NSCLC mit EGFR- und KRAS-Wildtyp empfohlen.

Wie bei EGFR-mutierten NSCLC entwickeln auch ALK-positive NSCLC eine sekundäre Resistenz auf die Behandlung. Sekundäre Mutationen bei ALK und eine Aktivierung anderer Signalwege wurden analog der Situation bei EGFR-mutierten Karzinomen als Mechanismen einer sekundären Resistenz beschrieben.

ROS1 und RET sind ebenfalls Rezeptor-Tyrosinkinasen und werden über Gen-Rearrangements aktiviert. Sie haben jeweils eine Prävalenz von 1 bis 2% bei unselektionierten ADC. Das ROS1-Protein hat eine sehr ähnliche Aminosäuresequenz wie das ALK-Protein, insbesondere im Bereich der Crizotinib-Bindungsstelle. Erste klinische Untersuchungen zeigen eine

sehr hohe Ansprechrate ROS1-positiver Lungenkarzinome auf Crizotinib von 72 bis 80% (4, 5).

Gegen RET gerichtete TKI zeigen in Fallberichten eine Wirksamkeit bei ADC mit einem RET-Rearrangement (6). Zahlreiche klinische Studien, die die Wirksamkeit verschiedener gegen RET gerichteter TKI bei RET-positiven NSCLC prüfen, sind aktuell im Gange. All diesen RTK-Gen-Rearrangements ist gemeinsam, dass die Bruchstelle in ALK, ROS1 respektive RET hoch konservativ ist, während die Bruchstellen in den Fusionspartnern stark variieren und zu den verschiedenen Fusionsvarianten führen. Für ALK zum Beispiel sind inzwischen über 20 verschiedene Fusionsvarianten bekannt. Der häufigste Fusionspartner ist EML4; aber auch andere Gene wie TGF und KIF5B können mit ALK fusionieren und die ALK-Kinase aktivieren. Die Herausforderung an einen molekularen Test ist, all diese Rearrangements zu erfassen.

Kürzlich wurden zwei weitere RTK-Gen-Rearrangements, welche NTRK1 und NRG1 involvieren, entdeckt. NRG1 wurden bei asiatischen Patienten mit muzinösen ADC beschrieben. Beide Rearrangements sind potenziell therapeutisch angebar.

Gen-Amplifikation: MET

MET ist ebenfalls eine Rezeptor-Tyrosinkinase. MET-Mutationen sind äusserst selten, aber Amplifikationen werden mit einer Prävalenz von 2 bis 4% bei NSCLC, ebenfalls überwiegend bei ADC, beschrieben. Eine MET-Amplifikation ist ein bekannter Mechanismus, welcher zur sekundären Resistenz EGFR-mutierter NSCLC auf eine EGFR-TKI-Therapie führt. Crizotinib wurde ursprünglich als MET-Inhibitor entwickelt, und MET-amplifizierte NSCLC scheinen auf Crizotinib anzusprechen (7).

Herausforderungen in der molekularen pathologischen Diagnostik

Die aktuell am weitesten verbreitete Methode zum Nachweis von Mutationen ist die direkte Gen-Sequenzierung nach PCR-Amplifikation der extrahierten DNA. Mit dieser Methode kann nur eine beschränkte Anzahl an Genen und Exonen parallel untersucht werden. Der Goldstandard zum Nachweis von Gen-Rearrangements und Amplifikationen ist die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Die Auswertung der ALK-FISH ist bekanntermassen anspruchsvoll. Sogar in erfahrenen Händen wurde eine falschpositive ALK-FISH-Rate von > 10% beschrieben (8). Hochsensitive, validierte und standardisierte immunhistochemische ALK-Tests stehen zur Verfügung. Echte Diskrepanzen zwischen ALK-FISH- und Immunhistochemie-Resultaten kommen aber selten vor, und ihre Bedeutung bezüglich Ansprechen auf eine Crizotinib-Therapie wird aktuell untersucht.

Das «Next-Generation-Sequencing»

Aus Kostengründen erfolgt die Untersuchung verschiedener Gene oft sequenziell, was aber zu einer Verzögerung der definitiven Berichterstattung und Einleitung der adäquaten Therapie führen kann. Das «Next-Generation-Sequencing» (NGS) hat Einzug in die Routinopathologie gehalten und ist eine hochsensitive Testplattform, welche simultan eine grosse Anzahl an Genen und Exonen zeitnahe und kosteneffizient untersuchen kann (9). Die Pathologie des Universitätsspitals Basel hat für die prädiktiven Mutationsanalysen im April 2015 von der klassischen direkten Gensequenzierung auf eine NGS-Plattform gewechselt. Hierbei werden mittels zielgerichteter Sequenzierung 50 verschiedene klinisch relevante Gene gleichzeitig untersucht (Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2). Tumormaterial von konventionellen Zytologien und von kleinen Biopsien reicht in 95% der Fälle für die NGS gut aus. Sehr zellarme Proben werden mittels direkter Gensequenzierung untersucht. Zytologische Präparate sind nach wie vor genauso gut geeignet wie Biopsien für molekulare Markeruntersuchungen. Zytologische Präparate zeichnen sich durch eine hohe DNA-Qualität aufgrund intakter Zellkerne und der alkoholbasierten Fixation aus. Wenn beide Probenarten vorhanden und sowohl auf dem zytologischen als auch auf dem Biopsiematerial ausreichend Tumorzellen vorhanden sind, führen wir die molekularen Untersuchungen bevorzugt an der Zytologie durch. Dies erlaubt, das paraffineingebettete Tumormaterial der Biopsie für allfällige zukünftige Untersuchungen zu asservieren. Molekulare Veränderungen sind im Verlauf der Erkrankung und unter Therapie dynamisch, und Resistenzen auf zielgerichtete Medikamente stellen eine grosse therapeutische Herausforderung dar. Wiederholte molekulare Untersuchungen bei Tumorprogression oder Metastasierung sind zur optimalen Anpassung der Therapie notwendig. Die hohe Sensitivität der NGS-Technologie ermöglicht eine nicht invasive Detektion gezielter genetischer Veränderungen im Blut beziehungsweise im Plasma. Dies eröffnet neue Möglichkeiten einer nicht invasiven Kontrolle des Therapieansprechens und der Dynamik molekularer Veränderungen im Verlaufe der Tumorerkrankung. Eine sinnvolle, therapeutisch relevante Interpretation dieser komplexen und im Verlauf dynamischen molekularen Daten stellt eine neue Herausforderung dar und bedarf eines multidisziplinären Expertenteams. ▲

Dr. med. Spasenija Savic Prince

Pathologie

Universitätsspital Basel

4031 Basel

E-Mail: spasenija.savicprince@usb.ch

Quellen:

1. Lindeman NI, Cagle PT 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. *Arch Pathol Lab Med* 2013; 137: 828–860.
2. Gautschi O, Milia J et al.: Targeted Therapy for Patients with BRAF-Mutant Lung Cancer: Results from the European EURAF Cohort. *J Thorac Oncol* 2015; 10: 1451–1457.
3. Kris MG, Camidge DR et al.: Targeting HER2 aberrations as actionable drivers in lung cancers: phase II trial of the pan-HER tyrosine kinase inhibitor dacomitinib in patients with HER2-mutant or amplified tumors. *Ann Oncol* 2015; 26: 1421–1427.
4. Shaw AT, Ou SI et al.: Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2014; 371: 1963–1971.
5. Mazières J, Zalcman G et al.: Crizotinib therapy for advanced lung adenocarcinoma and a ROS1 rearrangement: results from the EUROS1 cohort. *J Clin Oncol* 2015; 33: 992–999.
6. Kohno T, Nakaoku T et al.: Beyond ALK-RET, ROS1 and other oncogene fusions in lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* 2015; 4: 156–164.
7. Camidge DR, Ou SI et al.: Efficacy and safety of crizotinib in patients with advanced c-MET-amplified non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 2014; 32: 5s (suppl; abstr 8001)
8. Savic S, Diebold J et al.: Screening for ALK in non-small cell lung carcinomas: 5A4 and D5F3 antibodies perform equally well, but combined use with FISH is recommended. *Lung Cancer* 2015; 89: 104–109.
9. Gagan J, Van Allen EM et al.: Next-generation sequencing to guide cancer therapy. *Genome Med* 2015; 29: 80.

Merkmale

- ▲ **Die Untersuchung auf EGFR-Mutationen und ALK-Rearrangements** ist Standard bei allen nicht plattenepithelial differenzierten, fortgeschrittenen NSCLC (Stadium IV) und entscheidet über die Wahl der Therapie.
- ▲ **Zahlreiche weitere onkogene Drivermutationen**, gegen die zielgerichtete Medikamente bereits zur Verfügung stehen, sind bei Adenokarzinomen bekannt.
- ▲ **Das «Next-Generation-Sequencing» (NGS)** hat Einzug in die Routinopathologie gehalten und erlaubt, simultan eine grosse Anzahl an Genen und Exonen zeitnahe und kosteneffizient zu untersuchen.
- ▲ **Auch in der Ära des NGS** sind konventionelle zytologische Präparate genauso gut geeignet wie kleine Biopsien für molekulare prädiktive Markeranalysen.