

Aus dem  
CharitéCentrum für diagnostische und präventive Labormedizin  
Institut für Pathologie  
Direktor: Prof. Dr. David Horst

## **Habilitationsschrift**

# **Implementierung eines prädiktiven Biomarkers in den diagnostischen Routinealltag am Beispiel der Anaplastischen Lymphom Kinase (ALK) im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC)**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Pathologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinische Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Maximilian Georg Arnulf von Laffert  
geboren in Frankfurt am Main

Eingereicht: April/2018

Dekan: Prof. Dr. med. Axel R. Pries

1. Gutachter/in: Prof. Dr. Christoph Röcken, Kiel

2. Gutachter/in: Prof. Dr. Ruth Knüchel-Clarke, Aachen

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b> .....	V
<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 Epidemiologie und Subtypen des Lungenkarzinoms.....	1
1.2 Zielgerichtete Therapiemöglichkeiten beim lokal fortgeschrittenen und metastasierten nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom.....	2
1.3 Die Anaplastische Lymphom Kinase (ALK).....	3
1.4 Die Anaplastische Lymphom Kinase (ALK) im Kontext des anaplastischen großzelligen Lymphoms (ALCL) sowie bei weiteren Erkrankungen .....	4
1.5 Die Rolle der Anaplastischen Lymphom Kinase (ALK) im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) .....	5
1.6 Möglichkeiten der ALK-Testung mittels Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) und Immunhistologie (IHC).....	7
1.7 Die Bedeutung von Ringversuchen im Rahmen der Qualitätssicherungs-Initiative Pathologie (QuIP) .....	9
1.8 Zielstellung.....	10
<b>2. Eigene Arbeiten</b> .....	11
2.1 Vorbereitung eines ALK-Ringversuches (interner Paneltest): Verlässlichkeit der ALK-Testung mittels FISH, diagnostische Fallstricke und die (vorläufige) Bedeutung der ALK-IHC .....	11
2.2 Durchführung des ersten ALK-Ringversuches in Deutschland, Österreich und der Schweiz: Flächendeckende zertifizierte ALK-Diagnostik, sowie Rückschlüsse für den künftigen Routinealltag .....	21
2.3 Parallele ALK-, ROS1- und MET- Testung im NSCLC mit Fokus auf die ALK-IHC und FISH.....	29
2.4 Multizentrische Implementierung der ALK-IHC in den diagnostischen Routinealltag.....	38
2.5 Die Frequenz von ALK-FISH-„Borderline“-Fällen und der Umgang mit diesen im diagnostischen Alltag .....	48
<b>3. Diskussion</b> .....	57
3.1 Flächendeckende Qualität der ALK-Testung nach zwei Ringversuchen.....	58
3.2 Nachweis von ALK-Alterationen mittels ISH (FISH und CISH) .....	58
3.3 Nachweis von ALK-Alterationen mittels IHC .....	61
3.4 ALK-diskrepante Fälle mittels IHC und ISH .....	62

3.5 Interpretation diskordanter ALK-Pattern und Stellenwert des Next Generation Sequencing (NGS).....	64
3.6 Rückschlüsse und Ausblick für weitere eigene Arbeiten .....	69
<b>4. Zusammenfassung</b> .....	<b>70</b>
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>71</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>89</b>
<b>Erklärung</b> .....	<b>90</b>

**Meinen Eltern und Großeltern gewidmet**

## Abkürzungen

ATIC	5-Aminoimidazole-4-Carboxamide Ribonucleotide Formyltransferase/IMP Cyclohydrolase
AKT	Proteinkinase B
ALCL	Anaplastic Large Cell Lymphoma (anaplastisches großzelliges Lymphom)
ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase (anaplastische Lymphom Kinase)
ALO17	ALK Lymphoma Oligomerization Partner on Chromosome 17
Bcl2	B cell lymphoma-2
Bcl6	B cell lymphoma-6
BDP	Berufsverband Deutscher Pathologen
BRAF	V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B
CD	Cluster of Differentiation
CDx	Companion Diagnostic
CISH	Chromogene in-situ Hybridisierung
CLIP4	CAP-Gly Domain Containing Linker Protein Family Member 4
CLTC	Clathrin Heavy Chain
DGP	Deutsche Gesellschaft für Pathologie
DLBCL	Diffuse Large B-cell Lymphoma (diffus großzelliges B-Zell-Lymphom)
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EIF2AK4	Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 4
EMA	European Medicines Agency
EML4	Echinoderm Microtubule-Associated Protein-Like 4
EQA	External Quality Assessment
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
ESP	European Society of Pathology
ETOP	European Thoracic Oncology Platform
FDA	Food and Drug Administration
FISH	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung
FS	Fused Signal
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
HARP	Heparin Affinity Regulatory Peptide
HBNF	Heparin-Binding Neurothrophic Factor

HER-2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HPV	Humane Papillomaviren
HRB	Handelsregisterabteilung B
H&E	Hämatoxylin und Eosin
IHC	Immunchemie/Immunhistologie
IgH	Immunglobulin H
IMT	Inflammatorischer myofibroblastischer Tumor
ISH	in-situ Hybridisierung
JAK 3	Janus Kinase 3
Kb	Kilobase (1Kb = 1000 Nukleotide)
kDa	Kilodalton
Ki-1	Kiel-1
KIF5B	Kinesin Family Member 5B
KLC1	Kinesin Light Chain 1
KRAS	V-Ki-Ras2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MET	Tyrosine-Protein Kinase Met/Hepatocyte Growth Factor Receptor (HGFR)
MK	Midkine
MSN	Moesin
mRNA	messenger RNA
Myc	Myelocytomatose
MYH 9	(Non-Muscle) Myosin Heavy Chain 9
NGS	Next Generation Sequencing
NHL	Non-Hodgkin-Lymphoma
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer (nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom)
NPM	Nucleophosmin
OSF-1	Osteoblast-Specific Factor 1
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD-L1	Programmed Death-Ligand 1
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PLC- $\gamma$	Phospholipase C- $\gamma$
PTN	Pleiotrophin
QuIP	Qualitätssicherungs-Initiative Pathologie

RAS	Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
RfB	Referenzinstitut für Bioanalytik
RNA	Ribonucleic Acid
ROS1	Proto-Oncogene Tyrosine-Protein Kinase ROS
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SCLC	Small Cell Lung Cancer (kleinzelliges Lungenkarzinom)
SRS	Single Red Signal
SS	Split Signal
STAT 3	Signal Transducer and Activator of Transcription
TBC	Tuberkulose
TFG	TRK-Fused Gene
TKI	Tyrosin Kinase Inhibitor
TMA	Tissue Micro Array
TPM3	Tropomyosin 3
TPM 4	Tropomyosin 4
TTF1	Thyroidaler Transkriptionsfaktor
WHO	World Health Organization

## 1. Einleitung

### 1.1 Epidemiologie und Subtypen des Lungenkarzinoms

Im Jahre 2012 lag die Zahl der Neuerkrankungen an Krebs weltweit bei 14.1 Millionen Menschen [1]. Im selben Jahr verstarben 8.6 Millionen Menschen an einer Krebserkrankung [1]. Hierbei entfielen auf das Lungenkarzinom, welches die häufigste Krebserkrankung darstellt, 1.8 Millionen Neuerkrankungen (13% der weltweiten Krebsinzidenz) und 1.6 Millionen Todesfälle (20% der weltweiten Krebsmortalität) [1]. In Deutschland beliefen sich die Gesamtzahlen 2013 auf 482.470 Krebsneuerkrankungen (Frauen: 229.920; Männer: 252.550), sowie 223.093 Krebstodesfälle (Frauen: 101.779; Männer: 121.314). Bezogen auf das Lungenkarzinom waren dies im selben Jahr 53.500 Neuerkrankungen (Frauen: 18.810; Männer: 34.690) und 44.848 Todesfälle (Frauen: 15.140; Männer: 29.708) [2,3].

In den letzten 20 Jahren hat sich die diagnostische und therapeutische Betrachtung des Lungenkrebses grundlegend geändert [4,5,6]. War zunächst lediglich die Unterscheidung zwischen kleinzelligem (SCLC) und nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) im Rahmen des klinisch-therapeutisch Kontextes relevant, so definiert die aktuelle WHO-Klassifikation histomorphologische Subtypen, die unter Umständen gehäuft mit bestimmten molekularpathologischen Alterationen assoziiert sein können [4,5,6]. Als Haupttypen des NSCLC sind das Adenokarzinom (ca. 45%) und das Plattenepithelkarzinom (ca. 30%) mit ihren entsprechenden unterschiedlichen histologischen Wachstumsmustern oder Mischformen zu nennen, zusätzlich findet in letzter Zeit mehr und mehr der Begriff des nicht-plattenepithelialen (non-squamous) NSCLC Verwendung [4,5,6]. Das SCLC gehört in die Gruppe der neuroendokrinen Tumoren (mit dem typischen und atypischen Karzinoid, sowie dem großzelligen neuroendokrinen Karzinom) und macht ca. 15% der histologischen Subtypen aus [4,5,6].

## **1.2 Zielgerichtete Therapiemöglichkeiten beim lokal fortgeschrittenen und metastasierten nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom**

Die Therapie des NSCLC basiert in Abhängigkeit des Stadiums im Wesentlichen auf Operation, Chemotherapie und Bestrahlung [3,6,7]. Circa 35-40% der Patienten werden im Stadium IV diagnostiziert [3,6,7]. Der Therapieansatz ist hier in der Mehrzahl der Fälle palliativ, allerdings gab es insbesondere beim Adenokarzinom der Lunge in den letzten Jahren nennenswerte therapeutische Fortschritte [3,4,6,7,8]. Neben den klassischen carboplatin- und cisplatinbasierten Chemotherapeutika, spielen zielgerichtete Therapien unter bestimmten Voraussetzungen mittlerweile eine immer größere Rolle [4,6,8]. Diese in der englischen (und teilweise auch deutschen) Literatur als „targeted therapies“ bezeichneten Medikamente werden prinzipiell hinsichtlich ihrer therapeutischen Angriffspunkte unterschieden: Monoklonale Antikörper, welche gegen einen bestimmten Rezeptor an der Zelloberfläche gerichtet sind, enden auf „mab“. Ein bekanntes Beispiel ist der HER2-Rezeptorblocker Trastuzumab (Herceptin) insbesondere im Rahmen der Therapie des Mamma- und Magenkarzinoms [3,4,8,9]. Medikamente, welche hingegen am intrazellulären Rezeptorabschnitt binden, werden als „small molecules“ bezeichnet. Die Wirkstoffnamen dieser Kinasehemmer enden auf „mib“ oder „nib“ [3,4,8,9].

Beginnend in den Jahren 2003/2004 mit der Zulassung der ersten Inhibitoren gegen den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR), Gefitinib (Iressa) und Erlotinib (Tarceva), durch die Food and Drug Administration (FDA) und im weiteren Verlauf durch die European Medicines Agency (EMA), sind aktuell eine Vielzahl von „small molecules“ in der Erst- und Zweitlinientherapie des lokal fortgeschrittenen und metastasierten NSCLC zugelassen [4,8,10]. Als weitere Zielstrukturen sind hier neben der anaplastischen Lymphom Kinase (ALK), mit welcher sich die vorliegende Arbeit beschäftigt, KRAS, ROS1, BRAF, MET, HER2 und in letzter Zeit insbesondere PD-L1 zu nennen [4,7,8,10,11,12]. In den meisten Fällen wird der Nachweis der therapielevanten Mutation am Tumorgewebe als Basis für eine Medikamentengabe gefordert [3,4,10,11]. Der stete Zuwachs an neuen therapielevanten Markern stellt eine Herausforderung für die Routinediagnostik dar. Diese besteht im Wesentlichen darin, dass bei gleichbleibender (oftmals geringer) Menge an Tumorzellgehalt immer mehr immunhistologische und molekularpathologische Untersuchungen in den Routinealltag der pathologischen Institute integriert werden müssen [12,13,14]. Dieser

Sachverhalt soll in der vorliegenden Arbeit am Beispiel der ALK-Alteration im NSCLC verdeutlicht werden.

### **1.3 Die Anaplastische Lymphom Kinase (ALK)**

Der ALK-Genlocus liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 (2p23) und umfasst 2 lange Introns und 29 Exons [15,16]. Das humane ALK-Gen kodiert ein aus 1620 Aminosäuren bestehendes ca. 180 kDa schweres Protein, welches nach posttranslationaler Modifikation ein Gewicht von ca. 220 kDa aufweist [17,18,19]. Ferner existiert ein 140 kDa ALK-Protein, welches möglicherweise durch Modifikationen der Extrazellulärregion des 220 kDa ALK-Proteins gebildet wird und somit eine 80 kDa Einheit entstehen lässt, deren Funktion bisher unbekannt ist [18, 20]. Der ALK-Rezeptor gehört zu den klassischen Rezeptor-Tyrosinkinase-Rezeptoren und bildet zusammen mit dem Leukozyten Tyrosinkinase-Rezeptor die Untergruppe der Insulin-Rezeptor Superfamilie [18,21]. Der ALK-Rezeptor ist aus einer extrazellulären Liganden-bindenden Domäne, einem transmembranären Abschnitt und einer intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne aufgebaut [22,23,24]. Gut untersucht ist die physiologische Aktivierung des ALK-Rezeptors im Rahmen der Embryogenese beim Säugetier [18]. Eine Rezeptoraktivierung führt zur Phosphorylierung und kann unter anderem durch PTN (Pleiotrophin), OSF-1 (Osteoblast-Specific Factor 1), HARP (Heparin Affinity Regulatory Peptide), HBNF (Heparin-Binding Neurotrophic Factor) oder MK (Midkine) erfolgen [18,25,26,27,28,29].

Dem gegenüber steht eine Liganden-unabhängige, pathologische Aktivierung im Sinne einer Autophosphorylierung. Diese können aktivierende Punktmutationen, Amplifikationen oder Genfusionen zu Grunde liegen [30]. Insbesondere letztere sind im medizinischen Kontext interessant. Ursächlich hierfür sind Inversionen oder Translokationen einzelner Chromosomenabschnitte [30]. In der Folge kommt es zur Aktivierung verschiedener Signalfadkaskaden. Hier sind unter anderem RAS-ERK, JAK3-STAT3, PI3K-AKT, sowie PLC- $\gamma$  zu nennen [18,30,31,32]. In der Folge kommt es zu Proliferation, Hemmung der Apoptose, Progression des Zellzyklus, sowie zu einer verbesserten Möglichkeit der Zellmigration [18,30,31,32].

Die in vivo Funktion von ALK im Rahmen der Embryogenese wurde bisher am besten bei der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass ALK eine Aktivierung des ERK-Signalweges auslösen kann [33], sowie eine

wesentliche Rolle in der Entwicklung der viszeralen Muskulatur des Darmes spielt [34]. So schlüpfen aus ALK-defizienten Drosophila-Embryos „darmlose“ Larven, welche in der Folge versterben [34]. Bei Säugetieren übernimmt ALK eine Rolle in der Entwicklung und Funktion des Nervensystems, eine Hypothese die von der kontinuierlichen ALK mRNA-Expression im gesamten Nervensystem während der Embryogenese der Maus abgeleitet wird [17,35]. Beim Aspekt der Zellmigration im Rahmen der Entwicklung von Neuronenfortsätzen (Neuriten) erscheint der MAP-Kinase-Signalweg von zentraler Bedeutung [20]. Bei der Maus verringert sich der Gehalt an ALK-Transkripten, sowie des ALK-Proteins nach der Geburt, das Minimum wird im Alter von drei Wochen erreicht und bleibt dann bei den erwachsenen Tieren konstant auf einem niedrigen Level erhalten [17]. Immunhistologische Untersuchungen an adultem humanen Gewebe konnten ebenfalls ein schwaches ALK-Muster im zentralen Nervensystem, vergleichbar zu dem in der Maus, nachweisen [36]. Ferner wurden ALK mRNA-Transkripte unterschiedlicher Länge (möglicherweise verschiedenen Splicing-Varianten entsprechend) in humanem Gewebe von Hoden, Prostata, Gehirn, Dünn- und Dickdarm nachgewiesen [37]. Dies favorisiert nachhaltig eine gewisse Rolle im Rahmen der embryologischen Entwicklung, allerdings fehlen bisher, darüberhinausgehende Arbeiten an humanem Gewebe.

#### **1.4 Die Anaplastische Lymphom Kinase (ALK) im Kontext des anaplastischen großzelligen Lymphoms (ALCL) sowie bei weiteren Erkrankungen**

1985 wurde ein neuer Subtyp des Non-Hodgkin-Lymphoms (NHL) beschrieben, dieser zeigte immunhistochemisch eine Expression des Oberflächenmarkers CD-30 (Ki-1) und wurde zunächst als Ki-1 positives anaplastisches großzelliges Lymphom (ALCL) bezeichnet [37,38]. Ende der 80iger Jahre konnte bei dieser Entität eine das ALK-Gen involvierende Translokation zwischen Chromosom 2 und 5 nachgewiesen werden [39,40]. Der entsprechende Fusionspartner Nucleophosmin (NPM) wurde 1994 beschrieben [37]. Dieses sogenannte ALK-positive ALCL ist ein von den T-Zellen abgeleitetes CD30 positives NHL, welches insbesondere bei Kindern und jungen Erwachsenen auftritt [41]. Zumeist liegt die oben angesprochene Translokation zwischen den Chromosomenabschnitten 2p23 und 5q35 vor, welche das NPM-ALK Fusionsprotein entstehen lässt [41]. In der Zwischenzeit konnten zahlreiche weitere

Fusionspartner beschrieben werden, hier sind in erster Linie folgende zu nennen: ALO17, TFG, MSN, TPM 3 und 4, ATIC, MYH 9 und CLTC [18,41]. Das ALK-positive ALCL weist eine bessere Prognose als das ALK-negative auf, der entsprechende Nachweis (im Routinealltag zumeist Nachweis des Proteins) gehört zum diagnostischen Standard [41].

Ferner können Alterationen des ALK-Gens bei den unterschiedlichsten Entitäten vorkommen und entsprechende Subtypen definieren. So weist das diffuse großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL) mit den Fusionsproteinen CLTC-ALK und NPM-ALK einen aggressiven klinischen Verlauf und ein schlechtes Therapieansprechen auf, wohingegen der inflammatorische myofibroblastische Tumor (IMT) mit seiner großen Anzahl an ALK-Fusionspartnern eine bessere Prognose als der ALK-negative IMT besitzt [18]. Neben diesen klassischen Fusionen, welche unter anderem auch beim Ösophagus-, Nierenzell-, Magen-, Mamma- und Ovarialkarzinom beschrieben wurden, können auch ALK-Punktmutationen oder Überexpressionen vorliegen [15]. Auch wenn die genaue Funktionsweise letzterer bislang noch nicht bekannt ist, kann sie unter anderem beim Neuroblastom, malignen Melanom, Rhabdomyosarkom und Glioblastom eine Rolle spielen [18,43,44]. Punktmutationen können hingegen im anaplastischen Schilddrüsenkarzinom, aber auch im Neuroblastom, IMT oder NSCLC vorkommen [15,18,31,42,43,44]. Während die ALK-Alterationen insbesondere in den zuletzt genannten Karzinomen teilweise lediglich Einzelfallbeschreibungen darstellen und bisher keinen Eingang in den klinischen Alltag erfahren haben, sollte mit der Beschreibung des ALK-positiven NSCLC ein bemerkenswertes therapeutisches Kapitel eingeleitet werden [45].

### **1.5 Die Rolle der Anaplastischen Lymphom Kinase (ALK) im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC)**

2007 wurde erstmals das Echinoderm Microtubule-Associated Protein-Like 4 (EML4) - ALK-Fusionsprotein im NSCLC beschrieben [45]. Mittlerweile wurden mindestens 15 verschiedene EML4-ALK Varianten, sowie andere ALK-Fusionspartner detektiert [30,46,47,48,49,50]. Der Bruchpunkt im ALK-Gen ist weitestgehend konstant und involviert die in Exon 20 (seltener Exon 19 oder Intron 19) lokalisierte ALK-Tyrosinkinase-Domäne, wohingegen die N-terminale Region hinsichtlich des

Bruchpunktes und somit des Partners variabel ist [30,48,49,50,51]. In der Folge eines solchen Bruchereignisses rückt der Fusionspartner (zumeist EML4 am 5`-Ende) an das ALK-Gen (am 3`-Ende) heran und fungiert als Promotor [15,18,30,31,32,49,50]. Die entstehenden Fusionstranskripte werden in chimäre Proteine translatiert und führen auf zytoplasmatischer Ebene nach Dimerisierung beziehungsweise Oligomerisierung zu einer dauerhaften Aktivität (Phosphorylierung), welche mittels der oben beschriebenen Signalfadkaskaden (siehe Kapitel 1.3) ein entsprechendes Tumorwachstum induzieren kann [15,18,30,31,32,49,50]. In ca. 90% der EML4-ALK Fusionen, welche formal nicht das Produkt von Translokationen, sondern parazentrischer Inversionen auf Chromosom 2 darstellen, handelt es sich um die Varianten 1, 2 oder 3a/b [30,48,52]. Aber auch „echte“ Translokationen mit den Fusionspartnern TFG, KIF5B oder KLC1 wurden beschrieben [53,54].

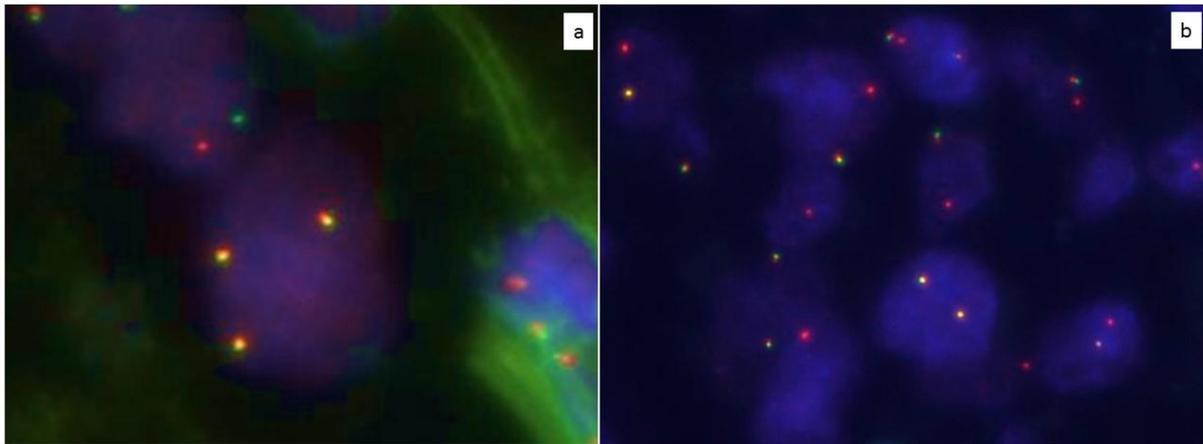
In Abhängigkeit der ethnischen Gruppe kommen ALK-Alterationen im Mittel bei ca. 2-7% der Adenokarzinome der Lunge vor (häufigeres Auftreten bei Asiaten) [11,50,54,55]. Weltweit geht man insgesamt von ca. 45.000 Patienten aus, die jährlich an einem ALK-positiven Lungenkrebs erkranken, auf Deutschland bezogen sind dies ca. 2.000 Patienten pro Jahr [11,50,54,55,56,57,58,59]. Betroffen sind vor allem jüngere, nie- oder nicht-(mehr) rauchende Patienten [11,50,54,55]. Dies sollte jedoch kein alleiniges Auswahlkriterium für eine ALK-Testung darstellen, zumal auch Raucher oder junge Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom betroffen sein können [11,50,54,55,56,57,58,59].

Von der ersten Beschreibung im NSCLC im Jahre 2007 [45] bis zur Zulassung des ersten ALK(MET/ROS1) - Inhibitors Crizotinib (Xalkori) durch die FDA (2011) und EMA (2012) vergingen nicht einmal 5 Jahre [60,61]. Die zur Zulassung führende Studie zeigte ein verbessertes Ansprechen und Überleben (3.4 vs. 7 Monate) bei ALK-positiven Patienten, die mit einem entsprechenden Inhibitor behandelt wurden [62,63]. In der Zwischenzeit wurden im klinischen Alltag Überlebensdaten von mehr als 19 Monaten berichtet [64,65,66,67]. Mittlerweile stehen in der Rezidiv- bzw. Resistenzsituation, weitere ALK-Inhibitoren wie Ceritinib (Zykadia), Alectinib (Alecensa) oder Brigatinib (Alunbrig) zur Verfügung [8].

## **1.6 Möglichkeiten der ALK-Testung mittels Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) und Immunhistologie (IHC)**

Die Methode der Wahl zur Beschreibung des ALK-Status (negativ oder positiv) in den zur Zulassung von Crizotinib führenden Studien war die Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) [62,63]. Diese galt seitdem als diagnostischer Goldstandard und der FISH Assay von Abbott (Vysis LSI ALK Break Apart Rearrangement Probe Kit; Abbott Molecular) wurde von der FDA im Zulassungstext entsprechend berücksichtigt [60].

Bei der FISH-Untersuchung wird das ALK-Gen mittels zweier fluoreszierender Sonden flankiert (umspannt), eine rot bzw. orange fluoreszierende Sonde bindet im 3´Bereich (3´ALK probe SpectrumOrange), eine grün fluoreszierende Sonde im 5´Bereich (5´ALK probe SpectrumGreen) [68]. Bei nicht Vorhandensein eines ALK-Bruches liegen beide Sonden dicht nebeneinander bzw. übereinander und fluoreszieren orange (sogenanntes Fused Signal = FS). Im Falle einer Inversion oder Translokation kommt es zu einem Bruch innerhalb der ALK-Region, das grün markierte 5´Ende invertiert und wird somit vom rot markierten 3´Ende disloziert. Beide Markierungen liegen dann weiter voneinander entfernt, ein etwaiger Promotor ist nun näher an den 3´Bereich heranrückt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop stellt sich dies als sogenanntes Split Signal (SS) oder bei Verlust (Deletion) der 5´Region als sogenanntes Single Red Signal (SRS) dar. Bei einem SS entspricht der Abstand beider Signale mindestens dem Durchmesser von zwei Signalstärken (Abbildung 1) [62,68,69,70,71,72]. Im diagnostischen Alltag werden gemäß Hersteller zunächst mindestens 50 Tumorzellen ausgewertet, ein Fall gilt als ALK-negativ, wenn weniger als 5 von 50 Tumorzellen SS und/oder SRS aufweisen, hingegen als ALK-positiv, wenn mehr als 25 von 50 Tumorzellen SS und/oder SRS aufweisen. Im Falle des Auftretens von ALK-positiven Mustern in 5 bis 25 Tumorzellen werden weitere 50 Tumorzellen von einer zweiten Person ausgewertet. Ein Fall gilt als ALK-positiv, wenn die Summe beider Auswertungen mindestens 15% alterierte Signale aufweist [62,68,69,70,71,72].



**Abbildung 1:** Beispiele der im Text erläuterten Signal-Muster bei der ALK-FISH. Der obere Zellkern weist ein Split Signal (SS), wie bei einer Inversion/Translokation, auf. Im unteren Zellkern stellen sich drei fusionierte Signale (FS) dar (a). Mehrere Zellkerne mit Single Red Signals (SRS), sowie einzelne FS (b).

Nicht publizierte, eigene Originalabbildung, im Rahmen der Habilitation erstellt.

Neben der hier beschriebenen Methode der FISH wurden weitere Nachweisverfahren beschrieben. Hier sind zunächst die Chromogene in-situ Hybridisierung (CISH) [73,74] und die Immunhistologie (IHC) zu nennen. Insbesondere letztere erschien zunächst eine deutliche Vereinfachung (Zeit- und Kostenaspekt) im Vergleich zur FISH darzustellen. In den Jahren zwischen der Erstbeschreibung der EML4-ALK Fusion im NSCLC und der Erstzulassung des ALK-TKI propagierten verschiedene Arbeitsgruppen einen vielversprechenden Einsatz der ALK-IHC im Routinealltag [70,75,76,77,78]. Hierbei gilt es festzuhalten, dass sich die einzelnen Arbeiten zum damaligen Zeitpunkt auf unterschiedliche auf dem Markt verfügbare Antikörper bezogen. Die Validierungen und Auswertungen erfolgten jeweils in einem Labor („single-center“) [70,75,76,77,78]. In wie weit die entsprechenden Verfahren (Antikörper, Verdünnung, Detektionssystem) in der Breite, also in unterschiedlichen Laboren („multi-center“), verlässlich eingesetzt werden konnten, war zum damaligen Zeitpunkt unklar.

Auf den deutschsprachigen Raum bezogen können solche Fragestellungen im Rahmen von Ringversuchen beantwortet werden. Grundsätzlich geht es darum eine verlässliche Diagnostik in der Breite durch die regelmäßige Teilnahme an solchen Qualitätssicherungsverfahren mit etwaiger Zertifizierung des Teilnehmers zu gewährleisten.

## 1.7 Die Bedeutung von Ringversuchen im Rahmen der Qualitätssicherungs-Initiative Pathologie (QuIP)

Die Deutsche Gesellschaft für Pathologie (DGP) und der Berufsverband Deutscher Pathologen (BDP) haben im Jahre 2004 die Qualitätssicherungs-Initiative Pathologie (QuIP) gegründet. Diese stellt im Rahmen von Ringversuchen eine externe Qualitätssicherung im Bereich der diagnostischen IHC und Molekularpathologie sicher [79,80,81]. Hierbei soll in der Pathologie die Möglichkeit gewährleistet werden, Qualität und Reproduzierbarkeit von Labor- und Auswerteleistungen anhand externer Standards zu überprüfen [79,80,81]. Die Ringversuche reichen von klassischen immunhistologischen Nachweisen (z.B. Ki-67, Östrogen-/Progesteron-Rezeptor, HER2) über PCR-basierte Nachweise (z.B. RAS-, EGFR-Mutationen oder HPV und TBC) bis hin zu Auswertungen mittels in-situ Hybridisierung (z.B. HER2-Amplifikation, BCL6-, c-MYC/IGH- oder IGH/BCL2- Translokationen) [79,80,81].

Die quantitative oder semiquantitative Auswertung erfordert eine Standardisierung der Verfahren, um eine Reproduzierbarkeit auch bei dezentraler Durchführung zu gewährleisten. Die Versuche werden in regelmäßigen Abständen (in der Regel alle ein bis zwei Jahre) durchgeführt, die teilnehmenden pathologischen Institute und Praxen müssen für eine Zertifizierung eine bestimmte Anzahl an Fällen korrekt beurteilen. Die Durchführung (Inhalt, Fallzahl, Logistik, Kriterien des Bestehens) wird von den sogenannten Panelinstituten (pro Ringversuch 2-3 Referenzpathologien) gemeinsam mit dem Referenzinstitut für Bioanalytik (RfB) oder der QuIP betreut [79,80,81]. Die Anforderungen an die entsprechenden Panelinstitute sind eine ausreichende Frequenz an eigenen Untersuchungen hinsichtlich des jeweiligen Markers, sowie wissenschaftliche Vorarbeiten auf dem entsprechenden Gebiet [79,80,81].

Die DGP und die QuIP führen in ihrer häufig zitierten Stellungnahme aus:

*„Am 11. Februar 2016 wurde die Qualitätssicherungs-Initiative Pathologie QuIP GmbH gegründet und inzwischen in das Handelsregister eingetragen (HRB 175419 B). Ziel des Übergangs in eine andere Rechtsform ist die Professionalisierung des Betriebs und die Vereinfachung der Zusammenarbeit mit der Industrie“ [79,80,81].*

Eine entsprechende Akkreditierung der QuIP nach DIN EN ISO/17043 wird angestrebt [79,80,81]. Ringversuche werden nicht nur auf nationaler Ebene, sondern auch auf europäischer Ebene durchgeführt (EQA: external quality assessment) [82,83]. Im Juni

2014 vereinbarten die DGP und die ESP (European Society of Pathology) die Ringversuche der jeweiligen anderen Fachgesellschaft anzuerkennen. Die Zertifikate tragen die Unterschriften beider Fachgesellschaften [84].

## **1.8 Zielstellung**

Im Rahmen der Arbeiten, welche der vorliegenden Habilitationsschrift zu Grunde liegen, haben wir zunächst ein retrospektives Lungentumorkollektiv zusammengestellt, um unter anderem geeignete Fälle für einen ALK-Ringversuch zu identifizieren. In der Vorbereitung eines solchen Ringversuches haben die beteiligten Panelinstitute die multizentrische Reproduzierbarkeit der FISH überprüft, die IHC vergleichend gegenübergestellt und etwaige diagnostische Fallstricke identifiziert. Im nachfolgenden Ringversuch, welcher die flächendeckende diagnostische Güte der ALK-Testung sicherstellen sollte, konnten sich die teilnehmenden Institute zertifizieren. Zusätzlich sollten vergleichende Erkenntnisse hinsichtlich der unterschiedlichen Nachweisverfahren, Antikörper und Sonden gewonnen werden. Diese Daten nahmen wir zum Anlass die IHC zunächst unizentrisch und dann multizentrisch im Rahmen einer europäischen Harmonisierungsstudie zu validieren. Die abschließende detaillierte Betrachtung der ALK-FISH Daten an 753 NSCLC hatte es zum Ziel etwaige Schwächen der FISH zu analysieren, um das Risiko von Fehlklassifikationen zu reduzieren bzw. um aufzuzeigen wann der Goldstandard FISH nicht mit der gebotenen Sicherheit als alleiniges diagnostisches Testverfahren eingesetzt werden sollte.

## 2. Eigene Arbeiten

### 2.1 Vorbereitung eines ALK-Ringversuches (interner Paneltest): Verlässlichkeit der ALK-Testung mittels FISH, diagnostische Fallstricke und die (vorläufige) Bedeutung der ALK-IHC

**Literatur:** Maximilian v. Laffert, Arne Warth, Roland Penzel, Peter Schirmacher, Danny Jonigk, Hans Kreipe, Hans-Ulrich Schildhaus, Sabine Merkelbach-Bruse, Reinhard Büttner, Simone Reu, Rosi Kerler, Andreas Jung, Thomas Kirchner, Cornelius Wölfel, Iver Petersen, Regulo Rodriguez, Wolfram Jochum, Holger Bartsch, Annette Fisseler-Eckhoff, Erika Berg, Dido Lenze, Manfred Dietel, Michael Hummel. *Anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangement in non-small cell lung cancer (NSCLC): results of a multi-centre ALK-testing.*

Lung Cancer 2013; 81: 200-206

doi: 10.1016/j.lungcan.2013.04.015. Epub 2013 May 10. PMID: 23669200 [85].

<https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2013.04.015>

Seit der Zulassung von Crizotinib gehört die ALK-Testung zum diagnostischen Standard beim NSCLC [11]. Während die FDA zum damaligen Zeitpunkt (2011) auf die zur Medikamentenzulassung führenden Studien Bezug nahm und die FISH als companion diagnostic (CDx) festlegte, ist der EMA-Zulassungstext (2012) methodenoffen verfasst [60,61]. Es wird lediglich der Nachweis von ALK-Positivität gefordert, ein spezifischer Test wird nicht vorgegeben [61]. Im Rahmen der Vorbereitung eines ALK-Ringversuches, der die Güte der ALK-Diagnostik in der Breite im Rahmen der QuIP gewährleisten sollte, haben wir zunächst einen tissue micro array (TMA)-basierten internen ALK-Paneltest (acht Institute für Pathologie) durchgeführt. Ziel war es, geeignete Fälle auszuwählen, sowie die multizentrische Reproduzierbarkeit der Testung zu überprüfen. Da zum damaligen Zeitpunkt eine relativ gute Konkordanz von ALK-FISH und ALK-IHC von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben wurde [75,76,77,78], führten die acht Institute neben der FISH auch eine Testung mittels IHC durch. Weil Ringversuche prinzipiell methodenoffen gestaltet werden, wurden keine Vorgaben zu etwaigen Sonden oder Antikörpern gemacht. Die einzelnen Teilnehmer untersuchten an den ihnen zugesandten TMA-Leerschnitten zehn gut charakterisierte Adenokarzinome der Lunge

(5x ALK-FISH-positiv, 5x ALK-FISH-negativ) bezüglich Ihres ALK-Status. Neben der Frage nach Negativität oder Positivität mittels IHC und FISH sollte der prozentuale Anteil an SS und/oder SRS pro Fall dokumentiert werden. Hervorzuheben ist hierbei ein Tumor mit (gemäß Vortestung) SS in circa 20% der Tumorzellen. Es handelt sich folglich um einen ALK-positiven Tumor mit Bruchsignalen in der Nähe des definierten 15% Cutoffs für ALK-FISH-Positivität (siehe auch Einleitung 1.6). Bei diesem Fall konnte vorab mittels RT-PCR eine EML4-ALK Fusionsvariante 1 nachgewiesen werden.

Die einzelnen Ergebnisse der Teilnehmer wurden zentral (in Berlin) gesammelt, ausgewertet und im Verlauf bei einem gemeinsamen Treffen diskutiert. Es zeigte sich, dass die FISH als Methode der Wahl zur ALK-Testung insgesamt gut geeignet ist. Vier der fünf ALK-negativen Fälle konnten sicher als solche klassifiziert werden. Schwierigkeiten ergaben sich lediglich bei einem Fall. Hierbei handelte es sich um ein Karzinom mit einem hohen extrazellulären Gehalt an Muzin. Dies kann zu einer starken Autofluoreszenz führen, welche die Auswertung erschweren bzw. unmöglich machen kann. Im Routinealltag muss in solch einem Fall die FISH wiederholt werden (z.B. an einem anderen Tumorblock mit weniger Muzingehalt).

Vier der fünf positiven Fälle konnten ebenfalls verlässlich mittels FISH ausgewertet werden. Ausgenommen hiervon war der oben beschriebene Tumor mit SS in ca. 20% der Tumorzellkerne. Dieser Fall wurde von drei der acht teilnehmenden Institute als ALK-negativ diagnostiziert (folgende SS-Werte wurden angegeben: 0%, 10%, 13%). Zwei der fünf Teilnehmer, die diesen Fall als positiv klassifizierten, gaben alterierte Signale in genau 15% der Zellkerne an, also exakt die Cutoff-Grenze. Die weiteren drei Institute zählten Bruchsignale in 20%, 30% und 34% der Tumorzellkerne. Auf den klinischen Alltag bezogen hätte dies bedeutet, dass der betroffene Patient, je nachdem wo die Diagnostik stattgefunden hätte, in drei von acht Zentren keinen ALK-TKI verschrieben bekommen hätte.

Ebenso problematisch für den diagnostischen Alltag und gleichsam überraschend, waren die äußerst heterogenen IHC-Ergebnisse. Es zeigte sich, dass eine verlässliche multizentrische Diagnostik ohne entsprechende vorherige Validierung der Methodik nicht möglich erschien. Lediglich ein Teilnehmer konnte bei allen fünf ALK-FISH-positiven Fällen eine Proteinexpression (und dies teilweise äußerst schwach) nachweisen. Die Ursache dieser heterogenen IHC-Ergebnisse lag darin begründet, dass die Teilnehmer die handelsüblichen, teilweise in Publikationen beschriebenen

Antikörper-Klone verschiedenster Anbieter mit unterschiedlichen Verdünnungen und Detektionssystemen verwendeten. Insgesamt wurde auf vier verschiedene Anbieter (Cell-Signaling, Dako, Novoastra, Ventana), beziehungsweise auf drei unterschiedliche Klone (ALK-1, D5F3, 5A4) zurückgegriffen.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass

- a.) der mittels dieser Arbeit geplante erste ALK-Ringversuch TMA-basiert durchgeführt werden kann,
- b.) die dort eingesetzte, zur Zertifizierung führende Methode ISH-basiert sein sollte,
- c.) die bis dato noch nicht gut in der Literatur beschriebenen Fälle mit ALK-Brüchen knapp um den 15% Schwellenwert aufgrund der Interpretationsschwierigkeiten (falsch negativ) zunächst nicht für Ringversuche geeignet sind,
- d.) die IHC als Basistest für eine Zertifizierung im Rahmen eines Ringversuches, zumindest zum damaligen Zeitpunkt (noch) nicht geeignet war.

Es wurde beschlossen die ALK-IHC im sich anschließenden Ringversuch fakultativ abzufragen, um weitere Erkenntnisse über die verschiedenen Klone und deren Anwendungen zu erlangen. Hinsichtlich der Tumoren nahe des Schwellenwertes, in der vorliegenden Arbeit als „Borderline“-Fall bezeichnet, sollte sich in der Folge die Frage nach deren Häufigkeit und klinischen Bedeutung stellen.















## **2.2 Durchführung des ersten ALK-Ringversuches in Deutschland, Österreich und der Schweiz: Flächendeckende zertifizierte ALK-Diagnostik, sowie Rückschlüsse für den künftigen Routinealltag**

**Literatur:** Maximilian von Laffert, Roland Penzel, Peter Schirmacher, Arne Warth, Dido Lenze, Michael Hummel, Manfred Dietel.

*Multicenter ALK Testing in Non–Small-Cell Lung Cancer: Results of a Round Robin Test.*

J Thorac Oncol 2014; 9:1464–1469

doi: 10.1097/JTO.0000000000000307. PMID: 25170635 [86].

<https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000307>

Diese Arbeit beschreibt die Durchführung des ersten ALK-Ringversuches in Deutschland, Österreich und der Schweiz. Basis waren 10 Adenokarzinome der Lunge (5x ALK-negativ; 5x ALK-positiv). Diese waren teilweise Bestandteil des unter 2.1 beschriebenen, vorbereitenden Paneltests. Vorab erfolgte die erneute Testung aller eingeschlossenen Fälle am Flächenschnitt und am TMA durch die beiden hauptverantwortlichen Institute des Panels (Berlin und Heidelberg). Gemäß dieser Validierung wurden lediglich Karzinome mit einem eindeutig negativen oder positiven ALK-Status eingeschlossen (SS/SRS < 4% oder >40%).

60.4% (32/53) der Teilnehmer konnten sich in diesem ISH-basierten Ringversuch zertifizieren. Hierbei war es unerheblich ob die Untersucher auf die Methode der FISH oder CISH zurückgriffen. Gleichwertig waren ebenso die verschiedenen Sonden der einzelnen ISH-Anbieter (Abbott, Kreatech, Zytovision). Bezogen auf die als positiv gewerteten Tumorzellen innerhalb eines Falles zeigte sich interessanterweise eine hohe Variabilität. So wurde ein und derselbe ALK-negative Fall von unterschiedlichen Auswertern mit 0% bis 13% SS/SRS klassifiziert, bei einem ALK-positiven Fall lagen die Werte gar zwischen 15% und 95%.

Die bereits in der Vorbereitung dieses Ringversuches gewonnenen vorläufigen Erkenntnisse hinsichtlich der Heterogenität der ALK-IHC wurden nachhaltig bestätigt. Lediglich 5.7% (2/35) der Teilnehmer, die eine IHC durchgeführt haben, hätten alle fünf ALK-positiven Fälle als solche identifiziert. Hierbei zeigten sich die Klone D5F3 (Ventana) und 5A4 (Novocastra) als möglicherweise vielversprechend für den Einsatz in der Routinediagnostik.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass auch Fälle mit einem, gemäß Vortestung, eindeutigen ALK-Status sehr heterogene Ergebnisse hinsichtlich der ausgewerteten SS/SRS-Prozentzahlen liefern können. Dies konnte auch bei Teilnehmern beobachtet werden, deren TMA-Schnittebenen nur wenige Mikrometer auseinanderlagen. Ein biologisches Phänomen (Tumorheterogenität) scheint somit weniger wahrscheinlich, als ein technisches bzw. auswertungsbasiertes. Diese Variabilität kann zumindest teilweise durch die Zuhilfenahme einer entsprechenden Software und/oder durch Workshops ausgeglichen werden [87]. Ferner zeigte diese Arbeit die Notwendigkeit der Harmonisierung der IHC-basierten ALK-Diagnostik.













## 2.3 Parallele ALK-, ROS1- und MET- Testung im NSCLC mit Fokus auf die ALK-IHC und FISH

**Literatur:** Philipp Jurmeister, Dido Lenze, Erika Berg, Stefanie Mende, Frank Schäper, Udo Kellner, Hermann Herbst, Christine Sers, Jan Budczies, Manfred Dietel, Michael Hummel, Maximilian von Laffert.

*Parallel screening for ALK, MET and ROS1 alterations in non-small cell lung cancer with implications for daily routine testing.*

Lung Cancer 2015; 87:122-129

doi: 10.1016/j.lungcan.2014.11.018. Epub 2014 Dec 6. PMID: 25534130 [88].

<https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2014.11.018>

Der ALK-TKI Crizotinib wurde ursprünglich als MET-Inhibitor entwickelt und zeigt zusätzliche Wirksamkeit bei ROS1-alterierten NSCLC [89,90,91,92]. Aus diesem Grunde haben wir in der vorliegenden Arbeit ein nicht-vorselektiertes Lungenkrebskollektiv, bestehend aus 473 Fällen (335 Adenokarzinome, 108 Plattenepithelkarzinome, 7 adeno-squamöse Karzinome, sowie 23 nicht genauer spezifizierbare NSCLC) zusammengestellt und TMA-basiert hinsichtlich aller drei genannter Marker untersucht. Die Auswertung erfolgte bezüglich ALK und MET mittels IHC und FISH, die ROS1-Testung erfolgte mittels FISH. Hierbei konnten wir nachvollziehend beschreiben, dass 2.6% bzw. 1.3% der Adenokarzinome ALK- bzw. ROS1-Alterationen aufweisen [76,77,78]. MET-Alterationen ließen sich hingegen bei 10.6% der Adenokarzinome und 5% der Plattenepithelkarzinome nachweisen [93,94]. Der bereits oben erwähnte ALK-Klon D5F3 (Ventana Optiview-System) bestätigte in allen Fällen das Ergebnis der ALK-FISH. Hierunter fielen auch zwei „Borderline“-Fälle mit SS/SRS in 18% bzw. 20% der Tumorzellkerne. Ferner ließ sich ein ALK-IHC-positiver Fall nachweisen, welcher auch nach mehrfacher Wiederholung weder mittels FISH, noch mittels RT-PCR ausgewertet werden konnte. Ein solcher Sachverhalt stellt zwar eine Einzelfallsituation dar, zeigt jedoch die Notwendigkeit neben der FISH auf eine weitere verlässliche diagnostische Option zurückgreifen zu können. Hinsichtlich MET zeigten ca. 10% der Fälle ein diskordantes Ergebnis mittels IHC und FISH. Es stellt sich die Frage ob künftig die Proteinexpression oder die Amplifikation klinisch bedeutsamer sein wird. Bezüglich eines etwaigen diagnostischen Algorithmus

erscheint es interessant, dass kein Fall eine synchrone ALK-, ROS1- und MET- FISH-Positivität aufwies.















## 2.4 Multizentrische Implementierung der ALK-IHC in den diagnostischen Routinealltag

**Literatur:** Maximilian von Laffert, Arne Warth, Roland Penzel, Peter Schirmacher, Keith M. Kerr, Göran ElMBERGER, Hans-Ulrich Schildhaus, Reinhard Büttner, Fernando Lopez-Rios, Simone Reu, Thomas Kirchner, Patrick Pauwels, Katja Specht, Enken Drecoll, Heinz Höfler, Daniela Aust, Gustavo Baretton, Lukas Bubendorf, Sonja Stallmann, Annette Fisseler-Eckhoff, Alex Soltermann, Verena Tischler, Holger Moch, Frederique Penault-Llorca, Hendrik Hager, Frank Schäper, Dido Lenze, Michael Hummel, Manfred Dietel.

*Multicenter immunohistochemical ALK-testing of non-small-cell lung cancer shows high concordance after harmonization of techniques and interpretation criteria.*

J Thorac Oncol 2014; 9:1685-1692

doi: 10.1097/JTO.0000000000000332. PMID: 25436802 [95].

<https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000332>

Aufbauend auf den vorangestellten Ergebnissen haben wir in dieser Arbeit die Validität der ALK-Testung mittels IHC (D5F3 Optiview System) in einem multizentrischen Ansatz untersucht. Europaweit führten 16 Institute für Pathologie eine TMA-basierte ALK-Testung bei 15 Fällen durch. Hierbei durfte lediglich die oben genannte IHC, nicht die FISH für die Bewertung des ALK-Status herangezogen werden. Bei den ausgewählten Fällen handelte es sich hinsichtlich des ALK-Status um im Vorfeld gut charakterisierte Tumoren (siehe unter anderem Arbeiten unter Kapitel 2.1, 2.2 und 2.3). Neben sieben eindeutig ALK-FISH-negativen und fünf eindeutig positiven Fällen, wurden zwei „Borderline“-Fälle (wie oben beschrieben), sowie eine ALK-positive Zelllinie (H2228) ausgewählt. Maßgeblich waren Harmonisierung von Methodik und Auswertung (Interpretation der ALK-IHC). Basierend auf 50 Testfällen erhielten alle Teilnehmer zunächst eine webbasierte Schulung hinsichtlich der immunhistologischen Auswertemodalitäten (negativ vs. positiv). Die Teilnehmer führten dann die Färbungen auf vergleichbaren Plattformen (Färbeautomaten) mittels eines an ein biotinfreies Verstärkersystem gekoppelten Antikörpers durch.

Alle 16 Teilnehmer konnten die sieben ALK-negativen Fälle als solche klassifizieren. Sechs der acht ALK-positiven Fälle wurden von allen Teilnehmern als ALK-positiv identifiziert. Hierbei muss besonders hervorgehoben werden, dass diese sechs

Tumoren die beiden „Borderline“-Fälle enthielten. Letztere zeigten eine kräftige zytoplasmatische Expression des ALK-Proteins in (fast) allen Tumorzellen und konnten somit eindeutig und problemlos als positiv identifiziert werden. Die weiteren zwei der acht ALK-positiven Fälle wiesen hingegen bei fünf Instituten ein heterogenes, etwas abgeschwächtes, teils punktförmiges („stippled“) Färbemuster auf. Die entsprechenden Teilnehmer wiesen darauf hin, dass sie ein solches Färbemuster im Routinealltag als „fraglich positiv“ einschätzen würden und unter diesen Umständen zwingend eine weitere Methode der ALK-Testung (FISH, RT-PCR) anschließen würden.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass nach Harmonisierung der Interpretationsmodalitäten und der Methodik eine multizentrische, also flächendeckende, IHC-basierte ALK-Testung verlässlich in den Routinealltag integriert werden kann. Dies erscheint insbesondere hilfreich im Rahmen der Detektion sogenannter „Borderline“-Fälle. Die Ergebnisse demonstrieren einerseits, dass bei einer eindeutig-kräftigen und zytoplasmatisch positiven Färbung das alleinige IHC-Ergebnis als Grundlage für die konsekutive TKI-Gabe ausreichen kann, andererseits, dass es durchaus Färbemuster gibt bei denen eine weitere Testung mittels einer zusätzlichen Methode angeschlossen werden muss.

















## 2.5 Die Frequenz von ALK-FISH-„Borderline“-Fällen und der Umgang mit diesen im diagnostischen Alltag

**Literatur:** Maximilian von Laffert, Albrecht Stenzinger, Michael Hummel, Wilko Weichert, Dido Lenze, Arne Warth, Roland Penzel, Hermann Herbst, Udo Kellner, Philipp Jurmeister, Peter Schirmacher, Manfred Dietel, Frederick Klauschen.

*ALK-FISH borderline cases in non-small cell lung cancer: Implications for diagnostics and clinical decision making.*

Lung Cancer 2015; 90:465-471

doi: 10.1016/j.lungcan.2015.09.022. Epub 2015 Oct 23. PMID: 26547803 [96].

<https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2015.09.022>

Die bisherigen Arbeiten konnten aufzeigen, dass die ALK-Testung mittels ISH bei eindeutig positiven und negativen Fällen im deutschsprachigen Raum gewährleistet werden kann (60% der Teilnehmer zertifizierten sich im ersten ALK-Ringversuch 2013, hinsichtlich des zweiten Ringversuches im Jahre 2014 siehe Diskussion). Ferner kann die IHC nach entsprechender Validierung den Testalgorithmus sinnvoll ergänzen, in bestimmten Fällen sogar die ISH ersetzen. Unklar blieb bis dato jedoch, welche Bedeutung den Fällen mit SS/SRS im Bereich des 15% Cutoffs („Borderline“-Intervall bzw. Graubereich) zukommt.

Dieser definierte Schwellenwert leitet sich unter anderem von der Beobachtung ab, dass Split Signale in bis zu 11% der Zellkerne bei ALK-negativen Tumoren und im gesunden Lungengewebe nachgewiesen werden können [69,71,72,97]. Ferner konnte gezeigt werden, dass ca. 8.5% der Lungenkarzinome ALK-SS in 10-15% der Tumorzellkerne aufweisen [98]. Diese Daten nahmen wir zum Anlass, um unser unter Kapitel 2.3 beschriebenes Kollektiv zu erweitern und einen speziellen Fokus auf Lungenkarzinome mit SS/SRS zwischen 10% und 20% zu legen. Hierbei berechneten wir zusätzlich die Wahrscheinlichkeit, einen Fall, der in diesem Graubereich liegt, als falsch positiv oder falsch negativ zu klassifizieren.

94.3% (710/753) der untersuchten NSCLC lagen außerhalb des hier definierten ALK-FISH Graubereiches (SS/SRS <10% oder >20%). Mittels der oben beschriebenen validierten ALK-IHC zeigte sich in all diesen Fällen ein konkordantes Ergebnis. 5.7% (43/753) aller Tumoren wiesen ALK-Alterationen zwischen 10% und 20% auf. In drei von diesen Fällen (14%,18% und 20% SS/SRS) konnte mittels IHC das ALK-Protein

nachgewiesen werden. Unter der Annahme einer starren 15% Cutoff-Linie, wären in der vorliegenden Arbeit sechs Patienten als IHC/FISH diskordant eingestuft worden (5x FISH+/IHC-; 1x FISH-/IHC+). Während die IHC auf zytoplasmatischer Ebene das aktivierte ALK-Protein nachweist, bildet die FISH Umlagerungen auf DNA-Ebene ab und lässt etwaige posttranslationale Modifikationen außer Acht. Nimmt man nun an, dass das biologisch und therapeutisch relevante Ereignis mittels einer gut validierten IHC abgebildet werden kann, hätten im Falle einer nur auf einer FISH basierenden ALK-Testung in der vorliegenden Kohorte fünf Patienten gegebenenfalls fälschlicherweise einen ALK-TKI bekommen, während dieser einem Patienten vorenthalten worden wäre.

Ferner haben wir, in Relation zur Gesamtzahl an ausgewerteten Tumorzellen, getestet mit welcher Wahrscheinlichkeit ein ALK-positiver Fall mit SS/SRS im Bereich von 15-20% als negativ (also falsch negativ) und ein ALK-negativer Fall mit SS/SRS im Bereich von 10-14% als positiv (also falsch positiv) fehlklassifiziert wird. Ein konkretes Beispiel: Ein Tumor mit 20% ALK-alerierten Signalen wird mit einer Wahrscheinlichkeit von 26% als falsch negativ klassifiziert, wenn 30 Tumorzellen ausgewertet werden. Diese Wahrscheinlichkeit sinkt in Anhängigkeit der untersuchten Tumorzellkerne (n=50, 100, 200) auf 19%, 8% bzw. 2%. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass im diagnostischen Alltag oftmals Tumorbiopsien mit einem nur geringen Tumorzellgehalt untersucht werden können [84,99]. Vor diesem Hintergrund erscheint es sinnvoll bei der Interpretation der ALK-FISH einen Graubereich (SS/SRS 10-20%) zu definieren. Unter dieser Maßgabe kann die Wahrscheinlichkeit eines falsch positiven oder negativen FISH-Ergebnisses bei einer Auswertung von mindestens 100 Tumorzellen unter 1% gehalten werden. Fälle innerhalb des „Borderline“-Intervalls sollten mittels einer weiteren Methode (z.B. wie hier vorgeschlagen mit der IHC) hinsichtlich des ALK-Status untersucht werden.















### 3. Diskussion

Die Frequenz der ALK-positiven NSCLC (nicht-squamöser Typ, zumeist Adenokarzinome) variiert hinsichtlich verschiedener Ethnien und wird in Europa mit 2-7% angegeben [11,50,54,55]. Die unter Abschnitt 2.3 beschriebene Häufigkeit von 2.6% fällt in dieses Intervall. Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass sich das untersuchte Kollektiv aus Operationsmaterial zusammensetzte, da wir unter anderem das Ziel verfolgt haben, für die durchgeführten Ringversuche ausreichend Tumorgewebe zu gewinnen. Für diesen Zweck ist mittels Biopsie gewonnenes Material nicht geeignet. Da Resektionen von Lungentumoren in der Regel in relativ frühen Stadien erfolgen, handelt es sich bei operativen Tumorpräparaten der Lunge zumeist um niedrigere Tumorstadien, bei denen in den allermeisten Fällen (noch) keine Fernmetastasierung vorliegt. Interessehalber haben wir eine retrospektive Analyse der letzten 250 auf ALK untersuchten Lungenkarzinome in unserem Institut durchgeführt (Zeitraum 2015-2017, Biopsien, zumeist Stadium III/IV). Die Frequenz ALK-positiver Lungenkarzinome lag hier bei 7.6% (19/250).

Die Anzahl der an der Biopsie zu testenden Biomarker wird künftig weiter zunehmen. Die prozentuale Häufigkeit der einzelnen prädiktiven Marker wird dabei im niedrigen einstelligen Prozentbereich liegen. Vor diesem Hintergrund erscheint es praktikabel, je nach Materialbeschaffenheit, auf unterschiedliche Methoden zurückgreifen zu können. Die hier vorgestellten Arbeiten befassen sich mit der Frage nach methodisch-validen, sowie in der Zusammenschau zeit- und auch kostensparenden Ansätzen zur ALK-Testung im NSCLC.

IHC und FISH wurden vergleichend gegenübergestellt und auf etwaige Fallstricke der jeweiligen Methoden hingewiesen. Diesbezüglich sind in erster Linie zu nennen:

- a.) FISH-„Borderline“-Fälle
- b.) ein mögliches schwaches immunhistologisches Färbeprofil im Sinne eines sogenannten „stippled staining pattern“
- c.) diskordante Ergebnisse mittels IHC und FISH

### **3.1 Flächendeckende Qualität der ALK-Testung nach zwei Ringversuchen**

In der Zwischenzeit wurde nach dem oben beschriebenen internen (2012) und dem ersten externen Ringversuch (2013) ein zweiter Ringversuch (2014) durchgeführt. Ein weiterer ist für das Jahr 2018 geplant. Die Zertifizierungsrate von 60.4% im ersten externen Ringversuch erscheint zunächst niedrig. Diese ist jedoch vergleichbar mit den Ergebnissen anderer erstmalig durchgeführter Ringversuche. So lag die Erfolgsquote im ersten ALK-Qualitätstest in Italien bei 70.2% (26/37) [100]. Beim ersten externen PD-L1 Ringversuch (IHC-basiert) im NSCLC lag die Zertifizierungsrate bei 72.3% (60/83) [101]. Es zeigt sich, dass einerseits der Art der Testmethode, andererseits der Erfahrung des Auswertenden (diagnostische Anzahl im Routinealltag) eine wesentliche Bedeutung zukommt. Dies wird ferner verkompliziert, wenn das zu testende Ereignis, wie bei den ALK-Alterationen, ein relativ seltenes darstellt. In unseren eigenen, den Ringversuch vorbereitenden FISH-Untersuchungen haben wir den ersten ALK-positiven Fall (erst) nach 250 untersuchten Fällen detektiert. Betrachtet man die Durchfallraten in den nachfolgenden Ringversuchen, so zeigt sich ein Lerneffekt. Beim zweiten PD-L1-Ringversuch lag eine moderate Verbesserung vor, 76.6% (72/94) der Teilnehmer konnten sich zertifizieren [102]. Beim zweiten italienischen ALK-Qualitätszirkel lag die Quote bei 86.4% (32/37) [101] und in dem von uns 2014 durchgeführten zweiten ALK-Ringversuch bei 92.5% (37/40) [Daten nur teilweise in 84 publiziert]. Hierbei ist darauf hinzuweisen, dass bei letzterem insbesondere Teilnehmer zur Anmeldung aufgefordert wurden, welche sich im ersten Durchgang nicht zertifiziert hatten.

Zusammenfassend haben sich in Deutschland, Österreich und der Schweiz nach Durchführung eines internen Paneltests, sowie nach zwei externen Ringversuchen insgesamt 71 Institute für Pathologie bezüglich der ALK-Testung (ISH-basiert) zertifiziert. Dies unterstreicht die universitäre und außeruniversitäre diagnostische Güte im deutschsprachigen Raum.

### **3.2 Nachweis von ALK-Alterationen mittels ISH (FISH und CISH)**

Die Ringversuchsdaten beschreiben insgesamt eine robuste Testsituation mittels ALK-ISH. Hinsichtlich der Einzelfallanalyse der ALK-positiven Fälle zeigten sich allerdings deutliche Schwankungen bezüglich der Anzahl an absoluten Bruchsignalen. So

wurden von den unterschiedlichen Auswertern in ein und demselben Fall Split Signale zwischen 15% und 95% angegeben. Diese Unterschiede wurden auch bei Teilnehmern beobachtet, deren Gewebeschnitte nur wenige Mikrometer voneinander entfernt waren. Vergleichbare Varianzen im Rahmen anderer Ringversuch (z.B. Nachweis genomischer Veränderungen bei Non-Hodgkin-Lymphomen mittels ISH) sind bekannt: Die Schwankungsbreite der angegebenen alterierten Signale lag innerhalb eines Tumors bei der Myc/IgH-Translokationsanalyse zwischen 52% und 87%, bei IgH/Bcl2 zwischen 35% und 94%, bei der Myc-Bruchpunktanalyse zwischen 35% und 94% und bei Bcl6 zwischen 25% und 90% [103]. Es sei darauf hingewiesen, dass die Signalabstände bei den genannten Translokationen in der Regel größer sind als jene bei den ALK-Alterationen, da letztere zumeist parazentrische Inversionen darstellen [45,54,85]. Insgesamt spielen bei der Bewertung eines Bruchsignales interpretatorische und technische Aspekte eine entscheidende Rolle [104]. So kann es hinsichtlich der Beurteilung eines Bruchsignales als echten Bruch erhebliche Varianzen geben. Generell stellt sich die Frage, ob der Durchmesser eines etwaigen Bruches mehr, weniger oder genau zwei Signalstärken beträgt. Dieses dreidimensionale (3D) Phänomen in einer zweidimensionalen (2D) Bildgebung sicher zu detektieren, kann insbesondere dann problematisch werden, wenn die Bruchsignale nur knapp zwei Signalstärken auseinanderliegen. Bei diesen subtilen Bruchereignissen können zusätzlich eingesetzte Bildanalyseverfahren hilfreich sein [87].

Etwaige Fehlinterpretationen können ferner durch die Dicke des zu untersuchenden Paraffinschnittes entstehen. Diese sollte mindestens vier Mikrometer betragen. Bei dünneren Schnitten können sogenannte „Pseudo“-SRS auftreten. Hierbei handelt es sich um schnittbedingte Phänomene bei denen lediglich die 3´Region und nicht die 5´Region des ALK-Gens einer Tumorzelle „angeschnitten“ wird [persönliche Erfahrung aus der Diagnostik, sowie Diskussionsgegenstand im Rahmen des Workshops der internationalen Akademie für Pathologie - „Theorie und Praktikum: Molekulare Pathologie“- Teilnahme 04.-06. September 2014]. Berücksichtigt man diese Aspekte und unterstützt die ISH-Auswertung mittels zusätzlicher Interpretations-Workshops und Bildanalyseverfahren, können entsprechende Fehlinterpretationen reduziert, jedoch nicht komplett vermieden werden [87]. Problematisch ist dies allerdings erst dann, wenn Fehlinterpretationen einzelner Bruchsignale (echter vs. falscher Bruch) in der Summe zur Fehlklassifikation eines gesamten Tumors führen (ALK-negativ vs.

positiv). Bei eindeutig positiven Fällen fällt demgegenüber weniger ins Gewicht, ob dieser nun z.B. 70% oder 80% an alterierten Signalen aufweist. Es handelt sich bei diesen Werten nicht um eine absolute biologische Abbildung der ALK-Alterationen. Dies belegen Untersuchungen, welche zeigen konnten, dass das Therapieansprechen ALK-positiver NSCLC auf den Inhibitor unabhängig von der Gesamtzahl der Brüche ist [97,98]. Es geht also letztendlich um die Frage, ob eine echte biologische Positivität vorliegt. Problematisch für die Interpretation wird dies, wenn die Auswertung der ISH Werte knapp ober- oder unterhalb des diagnostischen Schwellenwertes von 15% liefert. Ein falsch positives oder falsch negatives Ergebnis kann dann nicht mit der gebotenen Sicherheit ausgeschlossen werden. Bei diesen potentiell unkorrekt klassifizierten Fällen handelt es sich um einen nicht zu vernachlässigenden Anteil. So waren es in unserem Kollektiv immerhin ca. 6% der NSCLC, welche Brüche im Intervall zwischen 10% und 20% aufwiesen. In der Literatur wird der Anteil der Lungenkarzinome mit Bruchsignalen im Intervall zwischen 10% und 15% sogar mit 8.5% ausgewiesen, dem gegenüber stehen Bruchsignale in bis zu 11% der Zellkerne des normalen (gesunden) Lungenparenchyms [69,71,97]. Letzteres untermauert, dass es sich bei ALK-positiven Tumoren mit Bruchsignalen nahe des Schwellenwertes um ein technisches Dilemma handelt. Ferner zeigen die Daten zur Proteinexpression mittels validierter IHC eine Expression des ALK-Proteins in (fast) allen Tumorzellen [95]. Somit ist es insbesondere bei ALK-FISH „Borderline“ Ergebnissen unerlässlich auf eine weitere Testoption (z.B. IHC) zurückzugreifen.

Zusätzlich stellt sich die Frage in wie weit die Wahl der ALK-Sonde einen Einfluss auf die Auswertung hat. Die Ringversuchsdaten zeigen, dass neben der gängigen FISH-Sonde von Abbott, welche von der FDA empfohlen bzw. vorgeschrieben wird [60], auch weitere im Handel erhältliche (kostengünstigere) Sonden anderer Anbieter (Kreatech, Zytovision) verlässlich zur Detektion von ALK-Brüchen eingesetzt werden können [86]. Dies ist auch für die CISH zutreffend, welche im Rahmen der beiden externen Ringversuche und in weiteren Studien vergleichbare Ergebnisse zur FISH lieferte [73,74,86,105]. Derartige Erkenntnisse sind für eine gute flächendeckende diagnostische Versorgung unerlässlich, zumal nicht erwartet werden kann, dass jede pathologische Einrichtung auf kostenintensive und technisch aufwendige Verfahren wie die Fluoreszenzmikroskopie zurückgreifen kann. Im Gegensatz zur FDA fordert die EMA, wie in der Einleitung beschrieben, lediglich den Nachweis von „ALK-positiven“ Tumoren. Dieser Sachverhalt stellt einerseits eine Chance dar und wird gut

im Rahmen der prinzipiell methodenoffen gestalteten Ringversuche abgebildet. Er stellt jedoch andererseits auch ein gewisses Risiko dar, da theoretisch auf alle verfügbaren Methoden zurückgegriffen werden kann. Im Vorfeld ist aus diesem Grunde eine entsprechende Validierung der Methoden unabdingbar. Dies zeigen insbesondere die immunhistologischen Daten der hier vorgestellten Arbeiten.

### 3.3 Nachweis von ALK-Alterationen mittels IHC

Einzelne Arbeiten zeigten zunächst erfolgversprechende Ergebnisse beim Nachweis von ALK-Alterationen mittels IHC [70,76,77,78]. Hierbei handelte es sich um monozentrische Ansätze, die sich allerdings zunächst nicht problemlos in die Breite (multizentrisch) übertragen ließen (falsch positive oder negative Ergebnisse). So zeigten sich im Rahmen der Ringversuche äußerst heterogene immunhistologische Ergebnisse [85,86]. Ursache hierfür war das relativ breite Spektrum an verfügbaren Antikörpern diverser Anbieter (unterschiedliche Klone, Verdünnungen und Detektionssysteme). Lediglich die nachstehend genannten IHC-Klone, Verdünnungen und Detektionssysteme lieferten in beiden Ringversuchen verlässliche Ergebnisse hinsichtlich der Proteinexpression:

- a.) D5F3 (Ventana); bereits vom Hersteller vorverdünnt (ready to use); Detektion: Optiview (Ventana)
- b.) D5F3 (Cell Signaling); Verdünnung: 1:250; Detektion: EnvisionFlex (Dako)
- c.) 5A4 (Novocastra); Verdünnung: 1:10; Detektion: Optiview (Ventana)
- d.) 5A4 (Novocastra); Verdünnung: 1:10; Detektion: BOND III (Leica)
- e.) 5A4 (Zytovision); Verdünnung: 1:15; Detektion: EnvisionFlex (Dako)

In der Zwischenzeit konnte der verlässliche Einsatz der oben genannten Klone mittels multizentrischer Studien beschrieben werden [95,106].

*„Im Rahmen der European Thoracic Oncology Platform (ETOP) wurde der 5A4-Klon (Novocastra) validiert [106]. Die Auswertung erfolgt mittels IHC-Score (0–3). Mit diesem Ansatz konnte eine gute Vorauswahl ALK-positiver Tumoren getroffen werden. Von 1281 Fällen waren 80 positiv (48x IHC1+; 10x IHC2+; 22x IHC3+), bei 28 Fällen (28/80: 35%) konnte eine ALK-Alteration mittels FISH bestätigt werden. Die Übereinstimmung von IHC und FISH lag bei Score 1 bei*

*4,2 %, bei Score 2 bei 60,0% und bei Score 3 bei 90,9 %. Es erscheint notwendig, bei Score 1 und 2 immer eine FISH anzuschließen (Sicherung der Diagnostik), wohingegen eine starke Proteinexpression (Score 3) durchaus als hinreichend aussagekräftig und therapierelevant interpretiert werden kann, auch wenn in der beschriebenen Studie bei zwei Fällen mit maximaler ALK-Expression keine Alteration mittels FISH detektiert werden konnte“ [107].*

Letzteres stützt die oben genannten Überlegungen technisch bedingter falsch negativer FISH-Ergebnisse [95,96,107]. Einen weiteren Ansatz der verlässlichen ALK-IHC-Testung haben wir im Rahmen der „Europäischen Harmonisierungsstudie“ (siehe 2.4) mittels des D5F3-Optiview Systems (Ventana) beschrieben [95]. Vor Durchführung dieser Studie wurde der Antikörper vorab an 40 ALK-FISH-positiven Fällen validiert [108], sowie an 103 Fällen ein entsprechender Interpretationsalgorithmus (sehr gute Reproduzierbarkeit zwischen verschiedenen Auswertern) etabliert [109]. Der wesentliche Unterschied zu dem oben genannten Ansatz beim 5A4 Klon besteht in einem binären Auswerteschema, d.h. es erfolgt (gemäß Hersteller) eine Bewertung als negativ oder positiv (kein Score) [110]. Obgleich ein vermeintlich einfacheres Auswerteschema vorliegt wurden auch hier vereinzelt Fälle mit heterogenem und schwachem Färbemuster beobachtet, welches eine weiterführende Analyse (z.B. FISH, CISH, RT-PCR) erforderlich macht [95]. Viele weitere Arbeiten und Validierungsstudien konnten den verlässlichen Einsatz beider Klone bestätigen [111,112,113,114,115,116,117,118,119]. Ein weiterer potentiell verlässlicher Antikörper stellt der 1A4-Klone (Origene) dar, dieser lieferte vergleichbare Färbeergebnisse zum D5F3 Optiview System [120].

Neben der Überprüfung und Darstellung der diagnostischen Güte, können Ringversuche somit ebenfalls dazu dienen, Erkenntnisse hinsichtlich weiterer diagnostischer Optionen zu erlangen. Der für 2018 geplante Ringversuch wird zeigen, in wie weit diese IHC-Ansätze mittlerweile in der Breite verlässlich eingesetzt werden.

### **3.4 ALK-diskrepante Fälle mittels IHC und ISH**

In der Mehrzahl der Fälle können somit validierte IHC und ISH gut zur Bestimmung des ALK-Status eingesetzt werden. Dennoch beschreiben einzelne Arbeiten Fehlklassifikationen in bis zu 25% der Fälle, falls nur eine der beiden Testmethoden angewendet werden würde [121]. Fasst man die oben genannten Kriterien zusammen,

muss man bei der Bewertung solcher Zahlen allerdings auf zwei wesentliche Aspekte achten:

- a) Welcher IHC-Klon wurde eingesetzt?
- b) Wie viele der diskrepanten Fälle liegen im ALK-FISH „Borderline“ Intervall?

In der oben zitierten Arbeit [121] wurden 3244 NSCLC vergleichend mittels FISH und IHC untersucht. Bei letzterer wurde der 5A4 Klon von Abcam eingesetzt. Dieser zeigte in unseren Ringversuchen nur mäßige Erfolge, teilweise mit nur sehr schwachen Färbemustern und wurde bisher nicht in einem multizentrischen Ansatz validiert [86]. Hinzu kommt, dass in der genannten Arbeit [121] 31% (36/116) der FISH-positiven Fälle mittels IHC-negativ waren. Von diesen lagen 55.6% (20/36) im „Borderline“-Bereich (15-20%) und zeigten interessanterweise ein heterogenes Therapieansprechen [121].

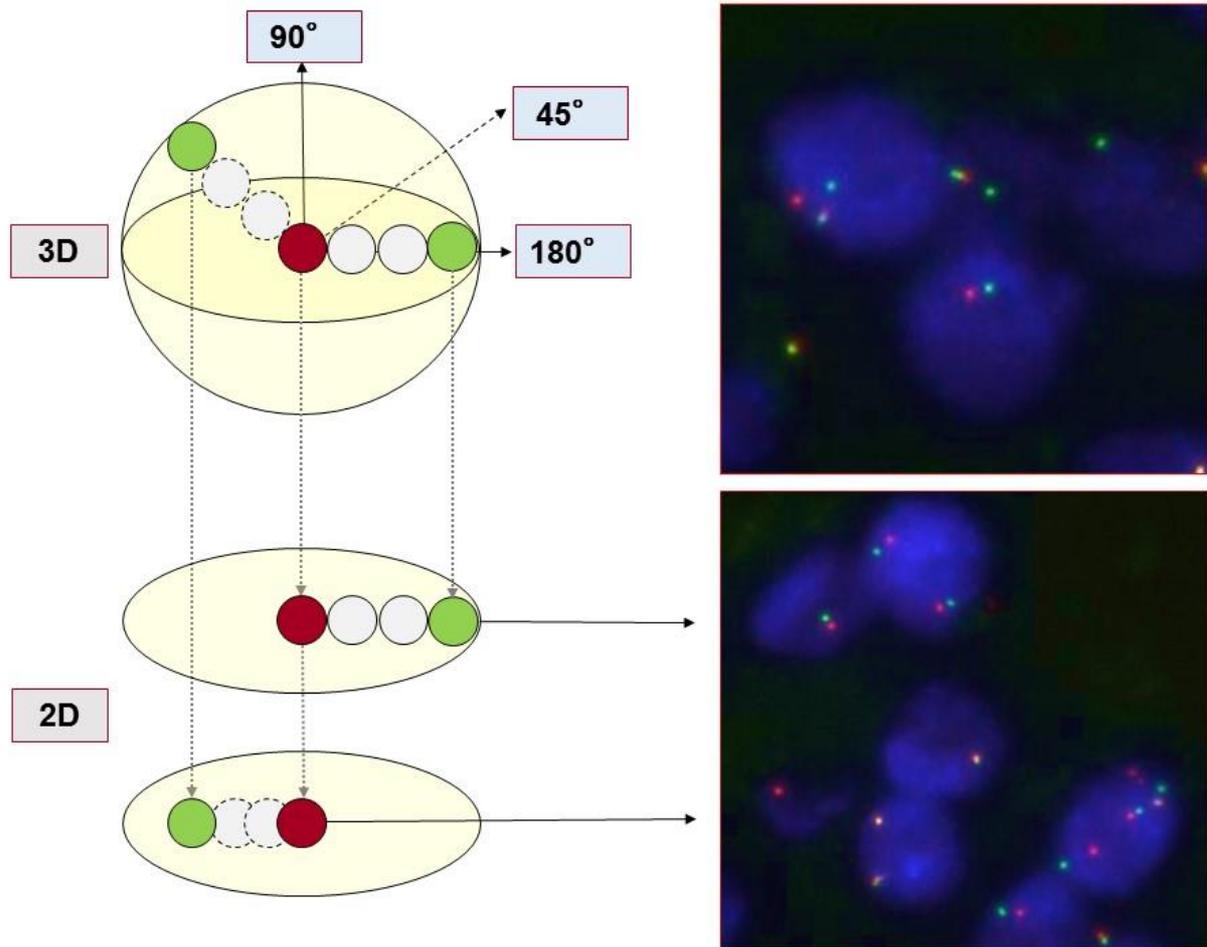
Betrachtet man in der Literatur hingegen insbesondere jene Arbeiten, welche auf validierte IHC-Testverfahren zurückgriffen, zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung mit den FISH-Ergebnissen [69,95,106,116,117,118,119,120]. Dennoch wird man in der täglichen Routine, auch nach methodischer Harmonisierung, immer wieder Fälle mit einem diskrepanten ALK-Status nachweisen können. Die möglichen Konstellationen haben wir in einer gemeinsamen Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Pathologie und der AG Thorakale Onkologie der Arbeitsgemeinschaft Onkologie/Deutsche Krebsgesellschaft e.V., deren Empfehlungen zur ALK-Testung Eingang in die S3 Leitlinie gefunden haben [3], zusammengefasst und entsprechend kommentiert [107]. Rein prinzipiell können demnach folgende diagnostisch problematische ALK-Konstellationen vorliegen:

1. IHC-positiv/FISH-negativ bzw. „Borderline“-negativ.
2. IHC-negativ/FISH-„Borderline“-positiv.
3. IHC-negativ/FISH-positiv.

Bei der weiterführenden Interpretation solcher Befundkonstellationen ist der Einsatz zusätzlicher Verfahren notwendig. In erster Linie sind hier PCR-basierte Verfahren bzw. das Next Generation Sequencing (NGS) zu nennen.

### **3.5 Interpretation diskordanter ALK-Pattern und Stellenwert des Next Generation Sequencing (NGS)**

Sowohl hinsichtlich IHC-positiver/FISH-negativer bzw. „Borderline“-negativer Fälle [96,99,104,122,123,124,125,126], als auch hinsichtlich IHC-negativer/FISH „Borderline“-positiver Fälle [96,104,111,112,113,114,115,116,117,120,121,125,127] existiert in der Literatur eine gute Datenlage. Hier sind insbesondere die bereits oben beschriebenen technischen Aspekte der FISH als ursächlich für die diskrepanten Ergebnisse zu nennen [104]. Dies wird gut durch Fallberichte und kleinere Fallserien untermauert. So konnte bei IHC-positiven/FISH-negativen Patienten einerseits mittels RT-PCR ein Fusionstranskript nachgewiesen werden, andererseits das Ansprechen auf einen ALK-TKI dokumentiert wurden [122,123,124,125]. Weiterhin konnte an einem Kollektiv von 1070 Patienten gezeigt werden, dass 35% der biologisch ALK-positiven NSCLC mittels FISH als negativ fehlklassifiziert werden [126]. Neben den oben beschriebenen methodisch-technischen Artefakten, welche eben auch bei den klassischen EML4-ALK Varianten zu Interpretationsschwierigkeiten führen können, sind hier ebenfalls die weniger klassischen ALK-Fusionspartner, die unter Umständen nur einen sehr kurzen Genabschnitt in die Inversion miteinbeziehen, zu nennen. Beschrieben wurde in der hier zitierten Arbeit z.B. die EIF2AK4-ALK Fusion [126]. Das betroffene Fragment zwischen Intron 19 des ALK-Gens und Intron 16 des benachbarten CLIP4-Gens umfasst lediglich 94 kb, dies entspricht 94.000 Nukleotiden. Im Vergleich hierzu sind die flankierenden Sonden im 3´-Bereich (300 kb) und 5´-Bereich (442 kb) deutlich größer. Eine sattgehabte Inversion verändert den Abstand beider Sonden zueinander somit nicht nennenswert (zumindest nicht sichtbar) [126]. Die betroffenen DNA-Abschnitte liegen folglich zu dicht nebeneinander. Der Bruch kann somit nicht mittels der handelsüblichen Sonden detektiert werden. Demgegenüber stehen allerdings klassische EML4-ALK Varianten (zum Beispiel Variante 1) [85,128], die eigentlich problemlos detektiert werden sollten, allerdings immer wieder mittels FISH nicht sicher erkannt werden. Dies liegt in den bereits oben beschriebenen technischen Artefakten (2D-3D Phänomen, siehe Abbildung 2), sowie etwaiger unterschiedlicher Interpretationen des Auswertes begründet.



**Abbildung 2:** Darstellung etwaiger Unterschiede von Signalabständen bei Split Signalen (SS) in der Projektion auf die zweite Dimension (2D), modifiziert nach Savic und Bubendorf [129]. In der dreidimensionalen Darstellung (3D) umfassen die SS-Abstände mindestens 2 Signaldurchmesser. Hinsichtlich der 2D-Projektion kann es passieren, dass sich eindeutige Splits ( $\geq 2$  SS) als subtilere Signale darstellen. Hier liegen die SS-Abstände teilweise deutlich unter dem Durchmesser von 2 Signalstärken (siehe FISH-Bilder auf der rechten Seite).

Nicht publizierte, eigene Originalabbildung, im Rahmen der Habilitation erstellt.

Bei den IHC-negativen/FISH-„Borderline“-positiven Fällen ist das FISH-Ergebnis, insofern eine validierte IHC durchgeführt wurde, zu vernachlässigen [111,112,113,114]. Recht ausführlich konnte dies bei fünf Patienten mit diskrepantem ALK-Profil beschrieben werden [111,112]. Die IHC (5x negativ) wurde mittels des validierten D5F3-Klons (Ventana) durchgeführt, die FISH lieferte klassische „Borderline“-Werte (15%, 15%, 17%, 17%, 18%). Interessanterweise zeigten zwei der fünf Patienten ein Ansprechen auf Crizotinib. Weiterführende Untersuchungen (MET- und ROS-IHC) konnten bei eben diesen beiden Patienten den Nachweis der

immunohistochemischen MET-Positivität erbringen und den Therapieerfolg über diese diagnostische Achse erklären. Formal waren also alle fünf Tumoren ALK-negativ [111,112]. Uns liegen aktuell an der Charité klinisch-therapeutische Daten zu vier Lungenkrebs-Patienten mit ALK-FISH-Ergebnissen im "Borderline"-Intervall vor (alle mit negativer IHC). Keiner dieser vier Patienten zeigte ein Ansprechen auf einen ALK-TKI (Publikation in Vorbereitung). Dies zeigt einmal mehr, dass bei einem im Graubereich liegenden ALK-FISH-Ergebnis die Klassifizierung des Falles in erster Linie auf dem Boden einer gut validierten IHC erfolgen sollte. Dies gilt umso mehr, wenn bei der FISH materialbedingt weniger als 50 Tumorzellen ausgewertet werden können [96,99].

Weniger eindeutig ist hingegen die Datenlage bezüglich IHC-negativer und mittels FISH eindeutig positiver Tumoren (Bruchsignale deutlich über dem Schwellenwert). Lediglich einzelne Fälle wurden bisher beschrieben [125,130,131,132]. Soweit untersucht und dokumentiert konnte bei diesen weder ein Fusionstranskript noch ein adäquates Therapieansprechen nachgewiesen werden [125,130,131,132]. Wir selbst konnten in der Zwischenzeit drei solcher Fälle detektieren, leider ohne klinisch-therapeutische Daten. Interessanterweise zeigten zwei von diesen in der FISH ein SRS-Muster. Mittels NGS konnte bei allen dreien kein ALK-Fusionstranskript oder eine entsprechende ALK-Fusionsvariante nachgewiesen werden [133]. Das Auftreten dieser Konstellationen scheint allerdings gehäuft mit SRS-Mustern vergesellschaftet zu sein [125]. Neben möglichen qualitativen Aspekten im Sinne von Über- oder Unterfixierung des Gewebes werden echte biologische Ursachen diskutiert. So kann zwar eine Deletion im Bereich der 5' Region des ALK-Gens vorliegen, eine konsekutive Transkription und Translation bleibt aber aus (sogenanntes nicht-produktives Rearrangement) [125]. Klinische Fall/Kontrollstudien werden künftig helfen diese Überlegungen zu untermauern.

Bei den nicht auf einen ALK-TKI ansprechenden Tumoren in den FISH-basierten Zulassungsstudien könnte es sich also neben "Borderline"-Fällen auch um Tumoren mit eben solchen nicht-produktiven Rearrangements gehandelt haben [62,63]. Die diesbezüglich verfügbaren Daten zur Proteinexpression sind leider äußerst spärlich [62,63,134]. Auf die Möglichkeit falsch positiver ALK-FISH Fälle in der oben zitierten Arbeit [62] wurde allerdings unlängst hingewiesen [134]. So zeigten in dieser Arbeit [62] 46 von 82 Patienten ein partielles Therapieansprechen, einer von 82 Patienten eine komplette Remission. Dies entspricht einem Gesamttherapieansprechen von

57%. Bezieht man sich allerdings nur auf die Daten, die mittels IHC und/oder RT-PCR generiert wurden, liegt die Rate des Therapieansprechens bei immerhin 81% (22/27 Patienten) [134].

In einer aktuellen Arbeit (submitted) haben wir insgesamt 25 Fälle mittels NGS bezüglich des ALK-Status untersucht und hierbei insbesondere einen Fokus auf diskrepante Fälle gelegt [133]. Die Tumoren mit konkordantem ALK-Pattern (IHC-negativ/FISH-negativ; IHC-positiv/FISH-positiv) spiegelten erwartungsgemäß das jeweilige Ergebnis auf RNA-Ebene wieder. Hinsichtlich der diskordanten IHC- und FISH-Ergebnisse stützten die NGS-Daten das jeweilige Ergebnis der immunhistologischen Untersuchungen. Im Einzelnen zeigten diese Fälle die folgenden Ergebniskonstellationen:

4x IHC-negativ / FISH-„Borderline“-negativ / NGS-negativ

5x IHC-negativ / FISH-„Borderline“-positiv / NGS-negativ

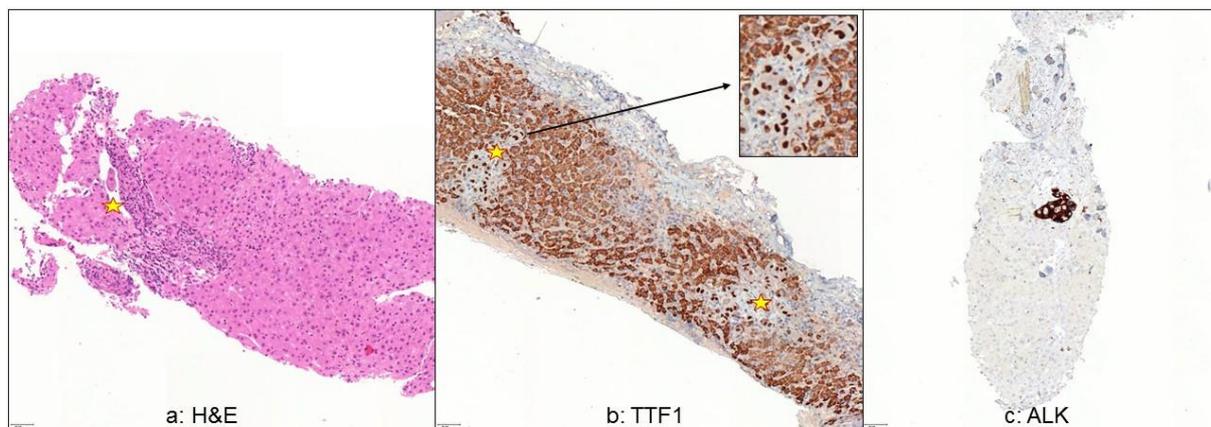
3x IHC-negativ / FISH-positiv / NGS-negativ

2x IHC-positiv / FISH-„Borderline“-positiv / NGS-positiv

Ferner wurde ein Fall untersucht, welcher mittels IHC ein unklares und unspezifisches Färbemuster aufwies. Dieses Expressionsmuster machte zur Absicherung eine weitere Untersuchung notwendig. Die FISH lieferte hierbei ein Ergebnis im „Borderline“-Intervall und war somit wenig hilfreich für die Gesamteinschätzung. Mittels NGS konnte kein Fusionstranskript und keine Fusionsvariante nachgewiesen werden. In der Zusammenschau war der Einsatz der NGS-Methode als weiteres Verfahren notwendig, um das fragliche Färbemuster aufzuklären. Mit IHC und/oder FISH alleine wäre dieser Fall nicht sicher zu klären gewesen. Ähnliches untermauern rezente Einzelfallberichte [128]. Insgesamt zeigt dies die Notwendigkeit unter bestimmten Umständen auf weitere Methoden wie z.B. RT-PCR oder NGS zurückgreifen zu können [128,135,136,137]. Hierbei sollte ein aus drei oder mehr Methoden bestehender diagnostischer Algorithmus weniger das Ziel sein, als vielmehr die Möglichkeit genutzt werden, zusätzliche Daten bezüglich der unterschiedlichen Fusionsvarianten zu generieren, um diese künftig in den Kontext eines etwaig unterschiedlichen Therapieansprechens setzen zu können [135,138]. So wurde jüngst berichtet, dass Lungentumoren mit einer EML4-ALK Fusionsvariante 3 einen

aggressiveren Verlauf, sowie ein frühes Versagen der Therapie (Chemotherapie, Bestrahlung, TKI) aufweisen können [139].

Zusammenfassend zeigen diese Überlegungen, dass zukünftig neben der immunhistologischen ALK-Analyse die Bedeutung des NGS zunehmen wird bzw. zum aktuellen Zeitpunkt bereits zugenommen hat, wohingegen die ISH vergleichsweise in den Hintergrund rücken könnte [128,135,136,140]. Der bereits weiter oben angesprochene und für 2018 geplante ALK Ringversuch wird diese Aspekte berücksichtigen. Die genannten Methoden (validierte IHC, ISH, NGS) werden vergleichend gegenübergestellt werden können. In der Folge sollten weiterführende, multizentrisch basierte Rückschlüsse hinsichtlich des diagnostischen Algorithmus gewonnen werden können. Allerdings kann es in der Routine immer wieder vorkommen, dass aufgrund eines geringen Tumorzellgehaltes (vereinzelt liegende Zellen) lediglich eine Methode durchgeführt werden kann (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** 55-jähriger Patient mit einem hepatisch metastasierten NSCLC (Typ Adenokarzinom). Die Lebermetastase (a) wurde mittels Biopsie im Randbereich getroffen (kleiner Tumorzapfen im Gefäß mit Stern markiert). Tiefere Stufen (b) zeigen abschnittsweise ein Adenokarzinomfiltrat mit nukleärer Positivität für TTF1 (Sterne). Aufgrund des spärlichen Tumorzellgehaltes konnte lediglich eine ALK-IHC durchgeführt werden (c). Diese zeigte eine eindeutige zytoplasmatische Positivität in den wenigen Tumorzellen. In einer probatorisch durchgeführten FISH waren keine Karzinomzellen mehr nachweisbar. Die Therapieentscheidung für den ALK-TKI wurde auf Basis der IHC getroffen. Nicht publizierte, eigene Originalabbildung, im Rahmen der Habilitation erstellt.

### **3.6 Rückschlüsse und Ausblick für weitere eigene Arbeiten**

In den hier vorgestellten Arbeiten haben wir uns dem Nachweis von ALK-Alterationen im NSCLC auf verschiedenen Ebenen genähert. Zu Beginn ließen die Schwankungen der ALK-FISH-Ergebnisse innerhalb eines Tumors auch an die Möglichkeit einer Heterogenität im biologischen Sinne denken, zumal die Heterogenität verschiedener Alteration (Mutationen, Deletionen, Amplifikationen) in Lungentumoren ein aktuelles Thema und zurzeit frequentiert untersuchtes Gebiet darstellt [141].

Die weiteren Untersuchungen zeigten allerdings, dass es sich bei den intratumoralen heterogenen ALK-FISH-Ergebnissen in erster Linie um eine technische und nicht um eine biologische Heterogenität handelt. Allerdings können selten Konstellationen vorliegen, bei denen sich FISH-basiert ein eindeutiges Rearrangement in der ALK-Region nachweisen lässt, jedoch in der Folge weder Transkript noch finales Strukturprotein im Sinne eines aktivierten Rezeptors nachweisbar sind (sogenanntes nicht-produktives Rearrangement).

Die hier angedeuteten Überlegungen bezüglich potentiell möglicher Diskrepanzen zwischen den auf DNA-Ebene nachweisbaren und den auf Proteinebene letztendlich nicht umgesetzten Ereignissen (vom Gen zum Phän) versuchen wir aktuell weiterführend zu beleuchten. Hierzu untersuchen wir vergleichend unterschiedliche Regionen innerhalb einzelner Lungentumoren (Frischgewebe). Einerseits werden diese unterschiedlichen Regionen mittels NGS (Comprehensive Cancer Panel) hinsichtlich des Vorkommens bekannter genetischen Alterationen untersucht, andererseits erfolgt vergleichend die Massenspektrometrie-basierte Bestimmung des Phosphoproteoms in diesen Tumorregionen. Der Vergleich der verschiedenen Areale innerhalb eines Tumors (räumliche Ausprägung) mittels beider Methoden (DNA-basiert vs. Protein-basiert) soll dabei helfen, weitere funktionelle Einblicke in einzelne Signalpfadkaskaden zu erlangen.

#### **4. Zusammenfassung**

Im aktuellen Zeitalter der zielgerichteten Krebstherapien müssen sich pathologische Institute in regelmäßigen Abständen auf immer wieder neu zu testende prädiktive Biomarker einstellen. Das bedeutet, dass potentielle Testverfahren validiert werden müssen, sowie der Nachweis der entsprechenden diagnostischen Güte im Rahmen von Ringversuchen gezeigt werden muss. Je seltener das zu testende Ereignis bei der entsprechenden Erkrankung vorkommt, umso schwieriger wird die Gesamtsituation. Dies erfordert institutsübergreifende Kooperationen.

In der vorliegenden Arbeit konnten wir den Stellenwert der Ringversuche am Beispiel der ALK-Alterationen im NSCLC herausarbeiten. Wir konnten zeigen, dass der diagnostische Goldstandard (FISH) unter gewissen Umständen kritisch betrachtet werden muss. Hinsichtlich der in den Ringversuchen eingesetzten ISH-Verfahren (FISH und CISH), sowie bezüglich der verschiedenen Sonden unterschiedlicher Anbieter zeigten sich keine Vor- oder Nachteile. Die Daten zeigen weiterhin, dass nur bestimmte Antikörper-Klone nach Harmonisierung der Methodik im immunhistologisch diagnostischen Alltag verlässlich eingesetzt werden können. Dieser Ansatz ist nicht nur zeit- und kostensparend, sondern verbessert zusätzlich die diagnostische Sicherheit insbesondere bei den „Borderline“-Fällen.

Bisherige und zukünftig NGS-basierte Daten werden dabei helfen, die IHC nicht nur als Screening-Methode, sondern gegebenenfalls als „stand-alone“ Test zu etablieren. Dennoch, in immunhistologisch unklaren Fällen sollte mindestens eine weitere Methode (ISH, NGS) angewendet werden können. Hierbei ist das Wissen um deren Vor- und Nachteile und der damit verbundenen Ergebnisinterpretation entscheidend. In der Folge wird die FISH, welche die Methode der Wahl in den zur Medikamentenzulassung führenden Studien war, möglicherweise an ihrer zentralen Bedeutung verlieren. Begründet ist dies nicht nur in etwaigen technischen Artefakten, auch wirtschaftliche Argumente (Kosten, technischer und zeitlicher Aufwand, Bearbeitungszeit) spielen letztendlich eine Rolle. Ein Screening aller Lungenkrebsfälle mittels FISH ist nicht in jeder Institution umzusetzen, mittels IHC ist dies leichter möglich. Ferner erlauben es die zur Verfügung stehenden NGS-Panel neben ALK weitere Marker wie z.B. ROS1 parallel mit zu testen, um eine qualifizierte Entscheidung für eine optimale Therapie zu ermöglichen.

## Literaturverzeichnis

1. Brambilla E, Travis WD. Lung Cancer. In Stewart BW, Wild CP (eds.): World Cancer Report 2014: pp: 350-361  
([http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx))  
(Zugriff am: 14.12.2017)
2. [http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Epidemiologie/Kapitel2\\_Epidemiologie.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Epidemiologie/Kapitel2_Epidemiologie.pdf?__blob=publicationFile) (Seite 21)  
(Zugriff am: 14.12.2017)
3. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms, Langversion 0.1 Konsultationsfassung, 2017, AWMF-Registernummer: 020/007OL  
<http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Lungenkarzinom.98.0.html>  
(Zugriff am: 14.12.2017)
4. Ku BM, Sun JM, Lee SH, Ahn JS, Park K, Ahn MJ. An update on biomarkers for kinase inhibitor response in non-small-cell lung cancer. Expert Rev Mol Diagn 2017; 17:933-942
5. Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck RE. Lung cancer: diagnosis and management. Am Fam Physician 2007; 75:56-63
6. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. WHO Classification of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. 4<sup>th</sup> edition, Lyon 2015, pp: 9-109
7. DGHO - Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V. (Hrsg.): Onkopedia Leitlinien Lungenkarzinom, nicht kleinzellig (NSCLC), Leitlinie ICF10: C34.-, Empfehlung der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen  
[https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/lungenkarzinom-nicht-kleinzellig-nsclc/@\\_@view/html/index.html](https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/lungenkarzinom-nicht-kleinzellig-nsclc/@_@view/html/index.html)  
(Zugriff am: 14.12.2017)
8. Heigener DF, Reck M. Lung cancer: What has been confirmed in therapy? Internist (Berl) 2017; 58:1258-1263
9. Rüschoff J, Hanna W, Bilous M, Hofmann M, Osamura RY, Penault-Llorca F, van de Vijver M, Viale G. HER2 testing in gastric cancer: a practical approach.

Mod Pathol 2012; 25:637-650

10. Reinmuth N, Gröschel A, Reck M. New developments in treatment of non-small cell lung cancer. *Pneumologie* 2013; 67:634-638
11. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, Chitale DA, Dacic S, Giaccone G, Jenkins RB, Kwiatkowski DJ, Saldivar JS, Squire J, Thunnissen E, Ladanyi M. 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. *J Thorac Oncol* 2013; 8:823-859
12. Dietel M, Jöhrens K, Laffert MV, Hummel M, Bläker H, Pfitzner BM, Lehmann A, Denkert C, Darb-Esfahani S, Lenze D, Heppner FL, Koch A, Sers C, Klauschen F, Anagnostopoulos I. A 2015 update on predictive molecular pathology and its role in targeted cancer therapy: a review focussing on clinical relevance. *Cancer Gene Ther* 2015; 22:417-430
13. Kerr KM. Personalized medicine for lung cancer: new challenges for pathology. *Histopathology* 2012; 60:531-546
14. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger K, Yatabe Y, Ishikawa Y, Wistuba I, Flieder DB, Franklin W, Gazdar A, Hasleton PS, Henderson DW, Kerr KM, Petersen I, Roggli V, Thunnissen E, Tsao M. Diagnosis of lung cancer in small biopsies and cytology: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification. *Arch Pathol Lab Med* 2013; 137:668-684
15. Hallberg B, Palmer RH. Mechanistic insight into ALK receptor tyrosine kinase in human cancer biology. *Nat Rev Cancer* 2013; 13:685-700
16. Kutok JL, Aster JC. Molecular biology of anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2002; 20:3691-3702
17. Iwahara T, Fujimoto J, Wen D, Cupples R, Bucay N, Arakawa T, Mori S, Ratzkin B, Yamamoto T. Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene* 1997; 14:439-449
18. Palmer RH, Vernersson E, Grabbe C, Hallberg B. Anaplastic lymphoma kinase: signalling in development and disease. *Biochem J* 2009; 420:345-361
19. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9UM73> (Zugriff am: 11.12.2017)

20. Moog-Lutz C, Degoutin J, Gouzi JY, Frobert Y, Brunet-de Carvalho N, Bureau J, Creminon C, Vigny M. Activation and inhibition of anaplastic lymphoma kinase receptor tyrosine kinase by monoclonal antibodies and absence of agonist activity of pleiotrophin. *J Biol Chem* 2005; 280:26039–26048
21. Robinson DR, Wu YM, Lin SF. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 2000; 19:5548-5557
22. Motegi A, Fujimoto J, Kotani M, Sakuraba H, Yamamoto T. ALK receptor tyrosine kinase promotes cell growth and neurite outgrowth. *J Cell Sci* 2004; 117:3319-3329
23. Degoutin J, Vigny M, Gouzi JY. ALK activation induces Shc and FRS2 recruitment: Signaling and phenotypic outcomes in PC12 cells differentiation. *FEBS Lett* 2007; 581:727-734
24. Mathivet T, Mazot P, Vigny M. In contrast to agonist monoclonal antibodies, both C-terminal truncated form and full length form of Pleiotrophin failed to activate vertebrate ALK (anaplastic lymphoma kinase)? *Cell Signalling* 2007; 19:2434-2443
25. Merenmies J, Rauvala H. Molecular cloning of the 18-kDa growth-associated protein of developing brain. *J Biol Chem* 1990; 265:16721-16724
26. Tezuka K, Takeshita S, Hakeda Y, Kumegawa M, Kikuno R, Hashimoto-Gotoh T. Isolation of mouse and human cDNA clones encoding a protein expressed specifically in osteoblasts and brain tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 173:246-251
27. Courty J, Dauchel MC, Caruelle D, Perderiset M, Barritault D. Mitogenic properties of a new endothelial cell growth factor related to pleiotrophin. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 180:145-151
28. Kovesdi I, Fairhurst JL, Kretschmer PJ, Böhlen P. Heparin-binding neurotrophic factor (HBNF) and MK, members of a new family of homologous, developmentally regulated proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 172:850-854
29. Tomomura M, Kadomatsu K, Matsubara S, Muramatsu T. A retinoic acid-responsive gene, MK, found in the teratocarcinoma system. Heterogeneity of the transcript and the nature of the translation product. *J Biol Chem* 1990; 265:10765-10770

30. Sabir SR, Yeoh S, Jackson G, Bayliss R. EML4-ALK Variants: Biological and Molecular Properties, and the Implications for Patients. *Cancers (Basel)* 2017; 118:1-9
31. Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, Piva R, Inghirami G. The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8:11-23
32. Ladanyi M. Aberrant ALK tyrosine kinase signaling. Different cellular lineages, common oncogenic mechanisms. *Am J Pathol* 2000; 157:341-345
33. Lorén CE, Scully A, Grabbe C, Edeen PT, Thomas J, McKeown M, Hunter T, Palmer RH. Identification and characterization of DAlk: a novel *Drosophila melanogaster* RTK which drives ERK activation in vivo. *Genes Cells* 2001; 6:531-544
34. Lorén CE, Englund C, Grabbe C, Hallberg B, Hunter T, Palmer RH. A crucial role for the Anaplastic lymphoma kinase receptor tyrosine kinase in gut development in *Drosophila melanogaster*. *EMBO Rep* 2003; 4:781-786
35. Morris SW, Naeve C, Mathew P, James PL, Kirstein MN, Cui X, Witte DP. ALK, the chromosome 2 gene locus altered by the t(2;5) in non-Hodgkin's lymphoma, encodes a novel neural receptor tyrosine kinase that is highly related to leukocyte tyrosine kinase (LTK). *Oncogene* 1997; 14:2175-2188
36. Pulford K, Lamant L, Morris SW, Butler LH, Wood KM, Stroud D, Delsol G, Mason DY. Detection of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and nucleolar protein nucleophosmin (NPM)-ALK proteins in normal and neoplastic cells with the monoclonal antibody ALK1. *Blood* 1997; 89:1394-1404
37. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, Look AT. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 1994; 263:1281-1284
38. Stein H, Mason DY, Gerdes J, O'Connor N, Wainscoat J, Pallesen G, Gatter K, Falini B, Delsol G, Lemke H, Schwarting R, Lennert K. The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood* 1985; 66:848-858
39. Rimokh R, Magaud JP, Berger F, Samarut J, Coiffier B, Germain D, Mason DY. A translocation involving a specific breakpoint (q35) on chromosome 5 is characteristic of anaplastic large cell lymphoma ('Ki-1 lymphoma'). *Br J*

- Haematol 1989; 71:31-36
40. Le Beau MM, Bitter MA, Larson RA, Doane LA, Ellis ED, Franklin WA, Rubin CM, Kadin ME, Vardiman JW. The t(2;5)(p23;q35): a recurring chromosomal abnormality in Ki-1-positive anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia* 1989; 3:866-870
  41. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Arber DA, Hasserjian RP, Le Beau MM, Orazi A, Siebert R. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4<sup>th</sup> edition, Lyon 2017, pp: 413-420
  42. Dirks WG, Fähnrich S, Lis Y, Becker E, MacLeod RA, Drexler HG. Expression and functional analysis of the anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene in tumor cell lines. *Int J Cancer* 2002; 100:49-56
  43. Busam KJ, Vilain RE, Lum T, Busam JA, Hollmann TJ, Saw RP, Coit DC, Scolyer RA, Wiesner T. Primary and Metastatic Cutaneous Melanomas Express ALK Through Alternative Transcriptional Initiation. *Am J Surg Pathol* 2016; 40:786-795
  44. Hallberg B, Palmer RH. The role of the ALK receptor in cancer biology. *Ann Oncol* 2016; 27 Suppl 3:iii4-iii15
  45. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, Fujiwara S, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Bando M, Ohno S, Ishikawa Y, Aburatani H, Niki T, Sohara Y, Sugiyama Y, Mano H. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007; 448:561-566
  46. Perner S, Wagner PL, Demichelis F, Mehra R, Lafargue CJ, Moss BJ, Arbogast S, Soltermann A, Weder W, Giordano TJ, Beer DG, Rickman DS, Chinnaiyan AM, Moch H, Rubin MA. EML4-ALK fusion lung cancer: a rare acquired event. *Neoplasia* 2008; 10:298-302
  47. Mano H. Non-solid oncogenes in solid tumors: EML4-ALK fusion genes in lung cancer. *Cancer Sci* 2008; 99:2349-2355
  48. Horn L, Pao W. EML4-ALK: honing in on a new target in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27:4232-4235
  49. Hofman P. ALK in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Pathobiology, Epidemiology, Detection from Tumor Tissue and Algorithm Diagnosis in a Daily Practice. *Cancers* 2017; 9:107

50. Niu X, Chuang JC, Berry GJ, Wakelee HA. Anaplastic Lymphoma Kinase Testing: IHC vs. FISH vs. NGS. *Curr Treat Options Oncol* 2017; 18:71. 10.1007/s11864-017-0513-x
51. Penzel R, Schirmacher P, Warth A. A novel EML4-ALK variant: exon 6 of EML4 fused to exon 19 of ALK. *J Thorac Oncol* 2012; 7:1198-1199
52. Wong DW, Leung EL, So KK, Tam IY, Sihoe AD, Cheng LC, Ho KK, Au JS, Chung LP, Pik Wong M; University of Hong Kong Lung Cancer Study Group. The EML4-ALK fusion gene is involved in various histologic types of lung cancers from nonsmokers with wild-type EGFR and KRAS. *Cancer* 2009; 115:1723-1733
53. Solomon B, Varella-Garcia M, Camidge DR. ALK gene rearrangements: a new therapeutic target in a molecularly defined subset of non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2009; 4:1450-1454
54. Thunnissen E, Bubendorf L, Dietel M, Elmberger G, Kerr K, Lopez-Rios F, Moch H, Olszewski W, Pauwels P, Penault-Llorca F, Rossi G. EML4-ALK testing in non-small cell carcinomas of the lung: a review with recommendations. *Virchows Arch* 2012; 461:245-257
55. Novello S, Barlesi F, Califano R, Cufer T, Ekman S, Levra MG, Kerr K, Popat S, Reck M, Senan S, Simo GV, Vansteenkiste J, Peters S. ESMO Guidelines Committee. Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2016; 27 Suppl 5:v1-v27
56. Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, Nomura K, Ninomiya H, Okui M, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Soda M, Choi YL, Niki T, Mano H, Ishikawa Y. EML4-ALK fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers. *J Thorac Oncol* 2008; 3:13-17
57. Choi YL, Takeuchi K, Soda M, Inamura K, Togashi Y, Hatano S, Enomoto M, Hamada T, Haruta H, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Ueno T, Takada S, Yamashita Y, Sugiyama Y, Ishikawa Y, Mano H. Identification of novel isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2008; 68:4971-4976
58. Koivunen JP, Mermel C, Zejnullahu K, Murphy C, Lifshits E, Holmes AJ, Choi HG, Kim J, Chiang D, Thomas R, Lee J, Richards WG, Sugarbaker DJ, Duckyo C, Lindeman N, Marcoux JP, Engelman JA, Gray NS, Lee C, Meyerson M,

- Jänne PA. EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14:4275-4283
59. Shinmura K, Kageyama S, Tao H, Bunai T, Suzuki M, Kamo T, Takamochi K, Suzuki K, Tanahashi M, Niwa H, Ogawa H, Sugimura H. EML4-ALK fusion transcripts, but no NPM-, TPM3-, CLTC-, ATIC-, or TFG-ALK fusion transcripts, in non-small cell lung carcinomas. *Lung Cancer* 2008; 61:163-169
60. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-crizotinib>  
(Zugriff am: 14.12.2017)
61. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Public\\_assessment\\_report/human/002489/WC500134761.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/002489/WC500134761.pdf)  
(Zugriff am: 14.12.2017)
62. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, Ou SH, Dezube BJ, Jänne PA, Costa DB, Varella-Garcia M, Kim WH, Lynch TJ, Fidias P, Stubbs H, Engelman JA, Sequist LV, Tan W, Gandhi L, Mino-Kenudson M, Wei GC, Shreeve SM, Ratain MJ, Settleman J, Christensen JG, Haber DA, Wilner K, Salgia R, Shapiro GI, Clark JW, Iafrate AJ. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2010; 363:1693-1703
63. Shaw AT, Yeap BY, Solomon B, Riely GJ, Gainor J, Engelman JA, Shapiro GI, Costa DB, Ou SH, Butaney M, Salgia R, Maki RG, Varella-Garcia M, Doebele RC, Bang YJ, Kulig K, Selaru P, Tang Y, Wilner KD, Kwak EL, Clark JW, Iafrate AJ, Camidge DR. Effect of crizotinib on overall survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring ALK gene rearrangement: a retrospective analysis. *Lancet Oncol* 2011; 12:1004-1012
64. Duruisseaux M, Besse B, Cadranet J, Pérol M, Mennecier B, Bigay-Game L, Descourt R, Dansin E, Audigier-Valette C, Moreau L, Hureauux J, Veillon R, Otto J, Madroszyk-Flandin A, Cortot A, Guichard F, Boudou-Rouquette P, Langlais A, Missy P, Morin F, Moro-Sibilot D. Overall survival with crizotinib and next-generation ALK inhibitors in ALK-positive non-small-cell lung cancer (IFCT-1302 CLINALK): a French nationwide cohort retrospective study. *Oncotarget* 2017; 8:21903-21917
65. Nishio M, Kim DW, Wu YL, Nakagawa K, Solomon B, Shaw AT, Hashigaki S, Ohki E, Usari T, Paolini J, Polli A, Wilner KD, Mok T. Crizotinib Versus Chemotherapy in Asian Patients with Advanced ALK-positive Non-small Cell

- Lung Cancer. *Cancer Res Treat* 2017; 10.4143/crt.2017.280
66. Tufman AL, Edelmann M, Gamarra F, Reu S, Borgmeier A, Schrödl K, Zauber R, Müller-Lisse U, Huber RM. 160. Preselection based on clinical characteristics in German non-small-cell lung cancer patients screened for EML4-ALK translocation. *J Thorac Oncol* 2014; 9:109-113
67. Kimura H, Nakajima T, Takeuchi K, Soda M, Mano H, Iizasa T, Matsui Y, Yoshino M, Shingyoji M, Itakura M, Itami M, Ikebe D, Yokoi S, Kageyama H, Ohira M, Nakagawara A. ALK fusion gene positive lung cancer and 3 cases treated with an inhibitor for ALK kinase activity. *Lung Cancer* 2012; 75:66-72
68. [https://www.molecular.abbott/sal/en-us/staticAssets/ALK%20US%20CE%20Clinical%20PI\\_R3\\_mw001\\_3060.pdf](https://www.molecular.abbott/sal/en-us/staticAssets/ALK%20US%20CE%20Clinical%20PI_R3_mw001_3060.pdf)  
(Zugriff am: 14.12.2017)
69. McLeer-Florin A, Moro-Sibilot D, Melis A, Salameire D, Lefebvre C, Ceccaldi F, de Fraipont F, Brambilla E, Lantuejoul S. Dual IHC and FISH testing for ALK gene rearrangement in lung adenocarcinomas in a routine practice: a French study. *J Thorac Oncol* 2012; 7:348-354
70. Boland JM, Erdogan S, Vasmatazis G, Yang P, Tillmans LS, Johnson MR, Wang X, Peterson LM, Halling KC, Oliveira AM, Aubry MC, Yi ES. Anaplastic lymphoma kinase immunoreactivity correlates with ALK gene rearrangement and transcriptional up-regulation in non-small cell lung carcinomas. *Hum Pathol* 2009; 40:1152-1158
71. Camidge DR, Kono SA, Flacco A, Tan AC, Doebele RC, Zhou Q, Crino L, Franklin WA, Varella-Garcia M. Optimizing the detection of lung cancer patients harboring anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangements potentially suitable for ALK inhibitor treatment. *Clin Cancer Res* 2010; 16:5581-5590
72. Camidge DR, Hirsch FR, Varella-Garcia M, Franklin WA. Finding ALK-positive lung cancer: what are we really looking for? *J Thorac Oncol* 2011; 6:411-413
73. Wagner F, Streubel A, Roth A, Stephan-Falkenau S, Mairinger T. Chromogenic in situ hybridisation (CISH) is a powerful method to detect ALK-positive non-small cell lung carcinomas. *J Clin Pathol* 2014; 67:403-407
74. Schildhaus HU, Deml KF, Schmitz K, Meiboom M, Binot E, Hauke S, Merkelbach-Bruse S, Büttner R. Chromogenic in situ hybridization is a reliable

- assay for detection of ALK rearrangements in adenocarcinomas of the lung. *Mod Pathol* 2013; 26:1468-1477
75. Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, Soda M, Hatano S, Inamura K, Takada S, Ueno T, Yamashita Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Ishikawa Y, Mano H. KIF5B-ALK, a novel fusion oncokinase identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15:3143–3149
76. Yi ES, Boland JM, Maleszewski JJ, Roden AC, Oliveira AM, Aubry MC, Erickson-Johnson MR, Caron BL, Li Y, Tang H, Stoddard S, Wampfler J, Kulig K, Yang P. Correlation of IHC and FISH for ALK gene rearrangement in non-small cell lung carcinoma: IHC score algorithm for FISH. *J Thorac Oncol* 2011; 6:459-465
77. Mino-Kenudson M, Chirieac LR, Law K, Hornick JL, Lindeman N, Mark EJ, Cohen DW, Johnson BE, Jänne PA, Iafrate AJ, Rodig SJ. A novel, highly sensitive antibody allows for the routine detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas by standard immunohistochemistry. *Clin Cancer Res* 2010; 16:1561-1571
78. Paik JH, Choi CM, Kim H, Jang SJ, Choe G, Kim DK, Kim HJ, Yoon H, Lee CT, Jheon S, Choe JY, Chung JH. Clinicopathologic implication of ALK rearrangement in surgically resected lung cancer: a proposal of diagnostic algorithm for ALK-rearranged adenocarcinoma. *Lung Cancer* 2012; 76:403-409
79. <https://www.pathologie-dgp.de/pathologie/quip-qualitaetssicherung/>  
(Zugriff am: 14.12.2017)
80. [https://quip.eu/de\\_DE/](https://quip.eu/de_DE/)  
(Zugriff am: 14.12.2017)
81. <http://www.quip-ringversuche.de>  
(Zugriff am: 14.12.2017)
82. van Krieken JH, Normanno N, Blackhall F, Boone E, Botti G, Carneiro F, Celik I, Ciardiello F, Cree IA, Deans ZC, Edsjö A, Groenen PJ, Kamarainen O, Kreipe HH, Ligtenberg MJ, Marchetti A, Murray S, Opdam FJ, Patterson SD, Patton S, Pinto C, Rouleau E, Schuurin E, Sterck S, Taron M, Tejpar S, Timens W, Thunnissen E, van de Ven PM, Siebers AG, Dequeker E. Guideline on the requirements of external quality assessment programs in molecular pathology. *Virchows Arch* 2013; 462:27-37

83. van Krieken JH, Siebers AG, Normanno N; Quality Assurance for Molecular Pathology group. European consensus conference for external quality assessment in molecular pathology. *Ann Oncol* 2013; 24:1958-1963
84. Dietel M, Bubendorf L, Dingemans AM, Doms C, Elmberger G, García RC, Kerr KM, Lim E, López-Ríos F, Thunnissen E, Van Schil PE, von Laffert M. Diagnostic procedures for non-small-cell lung cancer (NSCLC): recommendations of the European Expert Group. *Thorax* 2016; 71:177-1784
85. von Laffert M, Warth A, Penzel R, Schirmacher P, Jonigk D, Kreipe H, Schildhaus HU, Merkelbach-Bruse S, Büttner R, Reu S, Kerler R, Jung A, Kirchner T, Wölfel C, Petersen I, Rodriguez R, Jochum W, Bartsch H, Fisseler-Eckhoff A, Berg E, Lenze D, Dietel M, Hummel M. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangement in non-small cell lung cancer (NSCLC): results of a multi-centre ALK-testing. *Lung Cancer* 2013; 81:200-206
86. von Laffert M, Penzel R, Schirmacher P, Warth A, Lenze D, Hummel M, Dietel M. Multicenter ALK Testing in Non-Small-Cell Lung Cancer: Results of a Round Robin Test. *J Thorac Oncol* 2014; 9:1464-1469
87. Zwaenepoel K, Merkle D, Cabillic F, Berg E, Belaud-Rotureau MA, Grazioli V, Herelle O, Hummel M, Le Calve M, Lenze D, Mende S, Pauwels P, Quilichini B, Repetti E. Automation of ALK gene rearrangement testing with fluorescence in situ hybridization (FISH): a feasibility study. *Exp Mol Pathol* 2015; 98:113-118
88. Jurmeister P, Lenze D, Berg E, Mende S, Schäper F, Kellner U, Herbst H, Sers C, Budczies J, Dietel M, Hummel M, von Laffert M. Parallel screening for ALK, MET and ROS1 alterations in non-small cell lung cancer with implications for daily routine testing. *Lung Cancer* 2015; 87:122-129
89. Schwab R, Petak I, Kollar M, Pinter F, Varkondi E, Kohanka A, Barti-Juhasz H, Schönleber J, Brauswetter D, Kopper L, Urban L. Major partial response to crizotinib, a dual MET/ALK inhibitor, in a squamous cell lung (SCC) carcinoma patient with de novo c-MET amplification in the absence of ALK rearrangement. *Lung Cancer* 2013; 83:109-111
90. Bos M, Gardizi M, Schildhaus HU, Heukamp LC, Geist T, Kaminsky B, Zander T, Nogova L, Scheffler M, Dietlein M, Kobe C, Holstein A, Maintz D, Büttner R, Wolf J. Complete metabolic response in a patient with repeatedly relapsed non-small cell lung cancer harboring ROS1 gene rearrangement after treatment with crizotinib. *Lung Cancer* 2013; 81:142-143

91. Ou S-HI, Kwak EL, Siwak-Tapp C, Dy J, Bergethon K, Clark JW, Camidge DR, Solomon BJ, Maki RG, Bang YJ, Kim DW, Christensen J, Tan W, Wilner KD, Salgia R, Iafrate AJ. Activity of crizotinib (PF02341066), a dual mesenchymal-epithelial transition (MET) and anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitor, in a non-small cell lung cancer patient with de novo MET amplification. *J Thorac Oncol* 2011; 6:942-946
92. Tsuta K, Kozu Y, Mimae T, Yoshida A, Kohno T, Sekine I, Tamura T, Asamura H, Furuta K, Tsuda H. c-MET/phospho-MET protein expression and MET gene copy number in non-small cell lung carcinomas. *J Thorac Oncol* 2012; 7:331-339
93. Park S, Choi Y-L, Sung CO, An J, Seo J, Ahn MJ, Ahn JS, Park K, Shin YK, Erkin OC, Song K, Kim J, Shim YM, Han J. High MET copy number and MET overexpression: poor outcome in non-small cell lung cancer patients. *Histol Histopathol* 2012; 27:197–207
94. Nakamura Y, Niki T, Goto A, Morikawa T, Miyazawa K, Nakajima J, Fukayama M. c-Met activation in lung adenocarcinoma tissues: an immunohistochemical analysis. *Cancer Sci* 2007; 98:1006-1013
95. von Laffert M, Warth A, Penzel R, Schirmacher P, Kerr KM, Elmberger G, Schildhaus HU, Büttner R, Lopez-Rios F, Reu S, Kirchner T, Pauwels P, Specht K, Drecoll E, Höfler H, Aust D, Baretton G, Bubendorf L, Stallmann S, Fisseler-Eckhoff A, Soltermann A, Tischler V, Moch H, Penault-Llorca F, Hager H, Schäper F, Lenze D, Hummel M, Dietel M. Multicenter immunohistochemical ALK-testing of non-small-cell lung cancer shows high concordance after harmonization of techniques and interpretation criteria. *J Thorac Oncol* 2014; 9:1685-1692
96. von Laffert M, Stenzinger A, Hummel M, Weichert W, Lenze D, Warth A, Penzel R, Herbst H, Kellner U, Jurmeister P, Schirmacher P, Dietel M, Klauschen F. ALK-FISH borderline cases in non-small cell lung cancer: Implications for diagnostics and clinical decision making. *Lung Cancer* 2015; 90:465-471
97. Camidge DR, Theodoro M, Maxson DA, Skokan M, O'Brien T, Lu X, Doebele RC, Barón AE, Varella-Garcia M. Correlations between the percentage of tumor cells showing an ALK(anaplastic lymphoma kinase) gene rearrangement, ALK signal copy number, and response to crizotinib therapy in ALK fluorescence in

- situ hybridization-positive non-small cell lung cancer. *Cancer* 2012; 118:4486-4494
98. Camidge DR, Skokan M, Kiatsimkul P, Helfrich B, Lu X, Barón AE, Schulte N, Maxson D, Aisner DL, Franklin WA, Doebele RC, Varella-Garcia M. Native and rearranged ALK copy number and rearranged cell count in non-small cell lung cancer: implications for ALK inhibitor therapy. *Cancer* 2013; 119:3968-3975
99. Abe H, Kawahara A, Azuma K, Taira T, Takase Y, Fukumitsu C, Murata K, Yamaguchi T, Akiba J, Ishii H, Okamoto I, Hoshino T, Takamori S, Kage M. Heterogeneity of anaplastic lymphoma kinase gene rearrangement in non-small-cell lung carcinomas: a comparative study between small biopsy and excision samples. *J Thorac Oncol* 2015; 10:800-805
100. Marchetti A, Barberis M, Papotti M, Rossi G, Franco R, Malatesta S, Buttitta F, Ardizzoni A, Crinò L, Gridelli C, Taddei GL, Clemente C, Scagliotti G, Normanno N, Pinto C. ALK rearrangement testing by FISH analysis in non-small-cell lung cancer patients: results of the first italian external quality assurance scheme. *J Thorac Oncol* 2014; 9:1470-1476
101. Weichert W, Schwamborn K, Scheel A, Büttner R, Schildhaus HU, Boxberg M, Schirmacher P, Lasitschka F, Kirchner T, Reu S, Petersen I, Kreipe H, Länger F, Dietel M, Jöhrens K. Ringversuch zur PD-L1 Expressionsbestimmung im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC). Mitteilung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie. *Pathologe* 2017; 4:349-350
102. Weichert W, Schwamborn K, Boxberg M, Scheel A, Büttner R, Schildhaus HU, Schirmacher P, Lasitschka F, Kirchner T, Reu S, Kreipe H, Länger F, Anagnostopoulos I, Dietel M, Jöhrens K. QuIP-Ringversuch zur PD-L1 Expressionsbestimmung in nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) Mitteilung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie. *Pathologe* 2017; 6:563-564
103. Barth TF, Floßbach L, Bernd HW, Bob R, Buck M, Cogliatti SB, Feller AC, Hansmann ML, Hartmann S, Horn H, Klapper W, Kradolfer D, Mattfeldt T, Möller P, Rosenwald A, Stein H, Thorns C, Ott G. Round robin test for detection of genomic aberrations in non-Hodgkin lymphoma by in situ hybridization. *Pathologe* 2013; 34:329-334

104. McLeer-Florin A, Lantuéjoul S. Why technical aspects rather than biology explain cellular heterogeneity in ALK-positive non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis* 2012; 4:240-241
105. Yoshida A, Tsuta K, Nitta H, Hatanaka Y, Asamura H, Sekine I, Grogan TM, Fukayama M, Shibata T, Furuta K, Kohno T, Tsuda H. Bright-field dual-color chromogenic in situ hybridization for diagnosing echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma kinase-positive lung adenocarcinomas. *J Thorac Oncol* 2011; 6:1677-1686
106. Blackhall FH, Peters S, Bubendorf L, Dafni U, Kerr KM, Hager H, Soltermann A, O'Byrne KJ, Doms C, Sejda A, Hernández-Losa J, Marchetti A, Savic S, Tan Q, Thunnissen E, Speel EJ, Cheney R, Nonaka D, de Jong J, Martorell M, Letovanec I, Rosell R, Stahel RA. Prevalence and clinical outcomes for patients with ALK-positive resected stage I to III adenocarcinoma: results from the European Thoracic Oncology Platform Lungscape Project. *Journal of Clinical Oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2014; 32:2780-2787
107. von Laffert M, Schirmacher P, Warth A, Weichert W, Büttner R, Huber RM, Wolf J, Griesinger F, Dietel M, Grohé Ch. ALK-Diagnostics in NSCLC – Immunohistochemistry (IHC) and/or Fluorescence in-situ Hybridisierung (FISH). *Pneumologie* 2016; 70:277-281
108. Nitta H, Tsuta K, Yoshida A, Ho SN, Kelly BD, Murata LB, Kosmeder J, White K, Ehser S, Towne P, Schemp C, McElhinny A, Ranger-Moore J, Bieniarz C, Singh S, Tsuda H, Grogan TM. New methods for ALK status diagnosis in non-small-cell lung cancer: an improved ALK immunohistochemical assay and a new, Brightfield, dual ALK IHC-in situ hybridization assay. *J Thorac Oncol* 2013; 8:1019-1031
109. Wynes MW, Sholl LM, Dietel M, Schuurin E, Tsao MS, Yatabe Y, Tubbs RR, Hirsch FR. An international interpretation study using the ALK IHC antibody D5F3 and a sensitive detection kit demonstrates high concordance between ALK IHC and ALK FISH and between evaluators. *J Thorac Oncol* 2014; 9:631-638
110. <https://www.uclad.com/newsletters/ALK-LUNG-IHC-INTERPRETATION-GUIDE.pdf>  
(Zugriff am: 27.02.2018)

111. Ilie MI, Bence C, Hofman V, Long-Mira E, Butori C, Bouhlel L, Lalvée S, Mouroux J, Poudenx M, Otto J, Marquette CH, Hofman P. Discrepancies between FISH and immunohistochemistry for assessment of the ALK status are associated with ALK 'borderline'-positive rearrangements or a high copy number: a potential major issue for anti-ALK therapeutic strategies. *Ann Oncol* 2015; 26:238–244
112. Ilie M, Hofman P. Reply to the letter to the editor “ALK FISH rearranged and amplified tumor with negative immunohistochemistry: a rare and challenging case concerning ALK status screening in lung cancer” by Uguen et al. *Ann Oncol* 2015; 26:1802
113. Savic S, Diebold J, Zimmermann AK, Jochum W, Baschiera B, Grieshaber S, Tornillo L, Bisig B, Kerr K, Bubendorf L. 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
114. Sholl LM, Weremowicz S, Gray SW, Wong KK, Chirieac LR, Lindeman NI, Hornick JL. Combined Use of ALK Immunohistochemistry and FISH for Optimal Detection of ALK-Rearranged Lung Adenocarcinomas. *J Thorac Oncol* 2013; 8:322–328
115. Minca EC, Portier BP, Wang Z, Lanigan C, Farver CF, Feng Y, Ma PC, Arrossi VA, Pennell NA, Tubbs RR. ALK status testing in non-small cell lung carcinoma: correlation between ultrasensitive IHC and FISH. *J Mol Diagn* 2013; 15:341–346
116. Hutarew G, Hauser-Kronberger C, Strasser F, Llenos IC, Dietze O. Immunohistochemistry as a screening tool for ALK rearrangement in NSCLC: evaluation of five different ALK antibody clones and ALK FISH. *Histopathology* 2014; 65:398-407
117. Cutz JC, Craddock KJ, Torlakovic E, Brandao G, Carter RF, Bigras G, Deschenes J, Izevbaye I, Xu Z, Greer W, Yatabe Y, Ionescu D, Karsan A, Jung S, Fraser RS, Blumenkrantz M, Lavoie J, Fortin F, Bojarski A, Côté GB, van den Berghe JA, Rashid-Kolvear F, Trotter M, Sekhon HS, Albadine R, Tran-Thanh D, Gorska I, Knoll JH, Xu J, Blencowe B, Iafrate AJ, Hwang DM, Pintilie M, Gaspo R, Couture C, Tsao MS. Canadian anaplastic lymphoma kinase study: a model for multicenter standardization and optimization of ALK testing in lung cancer. *J Thorac Oncol* 2014; 9:1255-1263.

118. Marchetti A, Di Lorito A, Pace MV, Iezzi M, Felicioni L, D'Antuono T, Filice G, Guetti L, Mucilli F, Buttitta F. ALK Protein Analysis by IHC Staining after Recent Regulatory Changes: A Comparison of Two Widely Used Approaches, Revision of the Literature, and a New Testing Algorithm. *J Thorac Oncol* 2016; 11:487-495.
119. Conde E, Suárez-Gauthier A, Benito A, Garrido P, García-Campelo R, Biscuola M, Paz-Ares L, Hardisson D, de Castro J, Camacho MC, Rodríguez-Abreu D, Abdulkader I, Ramirez J, Reguart N, Salido M, Pijuán L, Arriola E, Sanz J, Folgueras V, Villanueva N, Gómez-Román J, Hidalgo M, López-Ríos F. Accurate identification of ALK positive lung carcinoma patients: novel FDA-cleared automated fluorescence in situ hybridization scanning system and ultrasensitive immunohistochemistry. *PLoS One* 2014; 9:e107200
120. Gruber K, Kohlhäufel M, Friedel G, Ott G, Kalla C. A novel, highly sensitive ALK antibody 1A4 facilitates effective screening for ALK rearrangements in lung adenocarcinomas by standard immunohistochemistry. *J Thorac Oncol* 2015; 10:713-716
121. Cabillic F, Gros A, Dugay F, Begueret H, Mesturoux L, Chiforeanu DC, Dufrenot L, Jauffret V, Dachary D, Corre R, Lespagnol A, Soler G, Dagher J, Catros V, Le Calve M, Merlio JP, Belaud-Rotureau MA. Parallel FISH and immunohistochemical studies of ALK status in 3244 non-small-cell lung cancers reveal major discordances. *J Thorac Oncol* 2014; 9:295-306
122. Peled N, Palmer G, Hirsch FR, Wynes MW, Ilouze M, Varella-Garcia M, Soussan-Gutman L, Otto GA, Stephens PJ, Ross JS, Cronin MT, Lipson D, Miller VA. Next-Generation Sequencing Identifies and Immunohistochemistry Confirms a Novel Crizotinib-Sensitive ALK Rearrangement in a Patient with Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2012; 7:e14–e16
123. Ren S, Hirsch FR, Varella-Garcia M, Aisner DL, Boyle T, Zhou C, Camidge DR. Atypical negative ALK breakapart FISH harboring a crizotinib-responsive ALK rearrangement in non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2014; 9:e21–e23
124. Pekar-Zlotin M, Hirsch FR, Soussan-Gutman L, Ilouze M, Dvir A, Boyle T, Wynes M, Miller VA, Lipson D, Palmer GA, Ali SM, Dekel S, Brenner R, Bunn PA Jr, Peled N. Fluorescence in situ hybridization, immunohistochemistry, and

- next-generation sequencing for detection of EML4-ALK rearrangement in lung cancer. *Oncologist* 2015; 20:316–322
125. Rosoux A, Pauwels P, Duplaquet F, D'Haene N, Weynand B, Delos M, Menon R, Heukamp LC, Thunnissen E, Ocak S. Effectiveness of crizotinib in a patient with ALK IHC-positive/FISH-negative metastatic lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* 2016; 98:118-121
126. Ali SM, Hensing T, Schrock AB, Allen J, Sanford E, Gowen K, Kulkarni A, He J, Suh JH, Lipson D, Elvin JA, Yelensky R, Chalmers Z, Chmielecki J, Peled N, Klemperer SJ, Firozvi K, Frampton GM, Molina JR, Menon S, Brahmer JR, MacMahon H, Nowak J, Ou SH, Zauderer M, Ladanyi M, Zakowski M, Fischbach N, Ross JS, Stephens PJ, Miller VA, Wakelee H, Ganesan S, Salgia R. Comprehensive Genomic Profiling Identifies a Subset of Crizotinib-Responsive ALK-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer Not Detected by Fluorescence In Situ Hybridization. *Oncologist* 2016; 21:762-770
127. Ali G, Proietti A, Pelliccioni S, Niccoli C, Lupi C, Sensi E, Giannini R, Borrelli N, Menghi M, Chella A, Ribechini A, Cappuzzo F, Melfi F, Lucchi M, Mussi A, Fontanini G. ALK rearrangement in a large series of consecutive non-small cell lung cancers: comparison between a new immunohistochemical approach and fluorescence in situ hybridization for the screening of patients eligible for crizotinib treatment. *Arch Pathol Lab Med* 2014; 138:1449–1458
128. Volckmar AL, Endris V, Bozorgmehr F, Lier C, Porcel C, Kirchner M, Leichsenring J, Penzel R, Thomas M, Schirmacher P, Warth A, Stenzinger A. Next-generation sequencing facilitates detection of the classic E13-A20 EML4-ALK fusion in an ALK-FISH/IHC inconclusive biopsy of a stage IV lung cancer patient: a case report. *Diagn Pathol* 2016; 11:133
129. Savic S, Bubendorf L. Role of fluorescence in situ hybridization in lung cancer cytology. *Acta Cytol* 2012; 56:611-621
130. Gao X, Sholl LM, Nishino M, Heng JC, Jänne PA, Oxnard GR. Clinical Implications of Variant ALK FISH Rearrangement Patterns. *J Thorac Oncol* 2015; 10:1648-1652
131. Jung Y, Kim P, Jung Y, Keum J, Kim SN, Choi YS, Do IG, Lee J, Choi SJ, Kim S, Lee JE, Kim J, Lee S, Kim J. Discovery of ALK-PTPN3 gene fusion from human non-small cell lung carcinoma cell line using next generation RNA sequencing. *Genes Chromosomes Cancer* 2012; 51:590–597

132. Rosenbaum JN, Bloom R, Forys JT, Hiken J, Armstrong JR, Branson J, McNulty S, Velu PD, Pepin K, Abel H, Cottrell CE, Pfeifer JD, Kulkarni S, Govindan R, Konnick EQ, Lockwood CM, Duncavage EJ. Genomic heterogeneity of ALK fusion breakpoints in non-small-cell lung cancer. *Mod Pathol* 2018; doi: 10.1038/modpathol.2017.181
133. Vollbrecht C, Lenze D, Hummel M, Lehmann A, Moebis M, Frost N, Jurmeister P, Schweizer L, Kellner U, Dietel M, von Laffert M. RNA-Based Analysis of ALK Fusions in NSCLC Cases Showing IHC/FISH Discordance. (submitted)
134. Chihara D, Suzuki R. More on crizotinib. *N Engl J Med* 2011; 364:776-777
135. Nenadić I, Staber J, Dreier S, Simons G, Schildgen V, Brockmann M, Schildgen O. Cost Saving Opportunities in NSCLC Therapy by Optimized Diagnostics. *Cancers* 2017; 9:pil:E88
136. Gruber K, Horn H, Kalla J, Fritz P, Rosenwald A, Kohlhäufel M, Friedel G, Schwab M, Ott G, Kalla C. Detection of rearrangements and transcriptional up-regulation of ALK in FFPE lung cancer specimens using a novel, sensitive, quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assay. *J Thorac Oncol* 2014; 9:307-315
137. Roth A, Streubel A, Grah C, Stephan-Falkenau S, Mairinger T, Wagner F. A rare case of an EML4-ALK-rearranged lung adenocarcinoma missed by in situ-hybridization but detected by RT-PCR. *J Clin Pathol* 2014; 67:839-840
138. Demidova I, Barinov A, Savelov N, Gagarin I, Grinevitch V, Stroiakovski D, Popov M, Laktionov K, Gutorov S, Smolin A, Olshanskaya Y, Obukhova T. Immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization, and reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of anaplastic lymphoma kinase gene rearrangements in patients with non-small cell lung cancer: potential advantages and methodologic pitfalls. *Arch Pathol Lab Med* 2014; 138:794-802
139. Christopoulos P, Endris V, Bozorgmehr F, Elsayed M, Kirchner M, Ristau J, Buchhalter I, Penzel R, Herth FJ, Heussel CP, Eichhorn M, Muley T, Meister M, Fischer JR, Rieken S, Warth A, Bischoff H, Schirmacher P, Stenzinger A, Thomas M. EML4-ALK fusion variant V3 is a high-risk feature conferring

accelerated metastatic spread, early treatment failure and worse overall survival in ALK+ non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 2018; 142:2589-2598

140. Pfarr N, Stenzinger A, Penzel R, Warth A, Dienemann H, Schirmacher P, Weichert W, Endris V. High-throughput diagnostic profiling of clinically actionable gene fusions in lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2016; 55:30-44
141. Jamal-Hanjani M, Wilson GA, McGranahan N, Birkbak NJ, Watkins TBK, Veeriah S, Shafi S, Johnson DH, Mitter R, Rosenthal R, Salm M, Horswell S, Escudero M, Matthews N, Rowan A, Chambers T, Moore DA, Turajlic S, Xu H, Lee SM, Forster MD, Ahmad T, Hiley CT, Abbosh C, Falzon M, Borg E, Marafioti T, Lawrence D, Hayward M, Kolvekar S, Panagiotopoulos N, Janes SM, Thakrar R, Ahmed A, Blackhall F, Summers Y, Shah R, Joseph L, Quinn AM, Crosbie PA, Naidu B, Middleton G, Langman G, Trotter S, Nicolson M, Remmen H, Kerr K, Chetty M, Gomersall L, Fennell DA, Nakas A, Rathinam S, Anand G, Khan S, Russell P, Ezhil V, Ismail B, Irvin-Sellers M, Prakash V, Lester JF, Kornaszewska M, Attanoos R, Adams H, Davies H, Dentre S, Taniere P, O'Sullivan B, Lowe HL, Hartley JA, Iles N, Bell H, Ngai Y, Shaw JA, Herrero J, Szallasi Z, Schwarz RF, Stewart A, Quezada SA, Le Quesne J, Van Loo P, Dive C, Hackshaw A, Swanton C; TRACERx Consortium. Tracking the Evolution of Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2017; 376:2109-2121

## **Danksagung**

Mein besonders herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Manfred Dietel für die Betreuung und Unterstützung meiner Habilitation, die berufliche Ausbildung und das Einrichten von Freiräumen, auch für anderweitig orientierte Forschungsideen.

Herzlich danken möchte ich auch meinem früheren Chef Herrn Prof. Dr. Wolfgang Marsch, der mich bereits im Studium für wissenschaftliche Fragestellungen begeistert hat und durch dessen Passion zur Dermatohistopathologie ich letzten Endes den Weg in die Pathologie gefunden habe.

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Michael Hummel und Frau Dr. Dido Lenze, die mich nicht nur in die Methodik der FISH-Untersuchung eingearbeitet, sondern auch für diese begeistert haben und die resultierenden Arbeiten stets unterstützend begleitet haben.

Danken möchte ich ebenso Herrn Prof. Dr. Dipl.-Phys. Frederick Klauschen für viele lehrreiche Diskussionen und die Möglichkeit aktuell in seiner Arbeitsgruppe bzw. in seinem Labor die sich teilweise aus dieser Habilitationsschrift ergebenden Fragestellungen vertiefend bearbeiten zu können.

Bezugnehmend auf den letzten Punkt gilt ein besonderer Dank dem Berlin Institute of Health (BIH) für die Möglichkeit der Förderung im Rahmen des Clinician Scientist Programmes. Hierbei ist insbesondere Frau Prof. Dr. Duska Dragun hervorheben, die dieses Programm mit sehr viel Herzblut leitet und begleitet. Es resultiert eine wunderbare Verzahnung von Forschung und Ausbildung, diese hat mir im Rahmen meiner fachlichen und wissenschaftlichen Ausbildung sehr geholfen.

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Hendrik Bläker und Herrn Prof. Dr. Wolfgang Schneider für einen großen Anteil an meiner morphologischen Ausbildung.

Herrn Prof. Dr. Ioannis Anagnostopoulos danke ich dafür, dass er mich gerade in der Übergangszeit des Institutes als kommissarischer Leiter stets wohlwollend unterstützt hat.

Herrn Dr. Philipp Jurmeister, meinem ersten Doktoranden, danke ich für zahlreiche Diskussionen bei denen die Freude am wissenschaftlichen Denken über den Dingen stand und steht.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Freundin Dr. Alice Müller und meiner Mutter für Ihre Unterstützung und Feinjustierung im Privaten.

## Erklärung

### § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,

- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,

- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....  
Datum Unterschrift