

Aus dem Institut für Pathologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

ALK, MET und ROS1 Alterationen beim nicht-kleinzelligen  
Bronchialkarzinom: Vergleich verschiedener Nachweismethoden  
und Untersuchung auf spezifische klinisch-pathologische  
Charakteristiken

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Philipp Jurmeister

aus Remchingen

Datum der Promotion: 09.09.2016

# Inhaltsverzeichnis

Abstract in englischer Sprache .....	1
Abstrakt in deutscher Sprache .....	2
Eidesstattliche Versicherung .....	3
Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation .....	4
Auszug aus der Journal Summary List.....	6
Publikationstext .....	7
Lebenslauf.....	16
Publikationsliste.....	18
Danksagung .....	19

# Abstract in englischer Sprache

## Background

ALK, MET and ROS1 are emerging important predictive and prognostic markers in non-small cell lung cancer (NSCLC). While ALK testing is already being established in routine diagnostics, reliable methods to identify MET and ROS1 alterations are still under investigation. Several drugs for NSCLC treatment are currently being evaluated in clinical trials, including the multi-targeted tyrosine kinase inhibitor crizotinib, which targets ALK, MET and ROS1. In this study we performed parallel screening for alterations in these three genes to evaluate different diagnostic methods and to identify potential specific clinical or histopathological characteristics.

## Material and Methods

Using tissue microarrays, a cohort of 473 surgically resected NSCLCs was screened for ALK and MET overexpression by immunohistochemistry (IHC) and for alterations in the ALK, MET and ROS1 gene by fluorescence in-situ hybridization (FISH).

## Results

We identified ALK and ROS1 rearrangements in 2.6% and 1.3% of all adenocarcinomas, respectively, but not in pure squamous cell carcinomas. Additionally, we observed ROS1 amplification in one ROS1 translocated tumor. 8.6% of all cases showed combined MET overexpression and MET amplification. No ALK or ROS1 rearranged tumors showed MET amplification in FISH, but we found three patients with ALK translocations and concomitant MET overexpression in IHC. Both ALK and MET positive tumors were significantly associated with lymphatic vessel invasion and lymph node metastasis. While ALK translocations predominantly occurred in younger patients, MET amplifications were more likely to occur in cases with pleural invasion or papillary growth pattern.

## Discussion

While ALK IHC could complement FISH in routine diagnostics, further research on the reliability of MET IHC in detecting MET amplifications is needed. Tumors harboring ALK or MET alterations predominantly show distinct clinical or histopathological characteristics. However, these attributes are not specific enough to limit IHC or FISH to a particular subgroup of patients. Additionally, the role of ROS1 amplifications requires further investigation.

# Abstrakt in deutscher Sprache

## Hintergrund

ALK, MET und ROS1 sind prädiktive und prognostische Marker, die beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) mehr und mehr an Bedeutung gewinnen. Während ALK zunehmend Einzug in die Routinediagnostik erhält, werden weiterhin geeignete Methoden zum Nachweis von MET und ROS1 Alterationen erforscht. Mehrere zielgerichtete Medikamente zur Therapie des NSCLCs befinden sich zur Zeit in klinischen Studien, unter anderem auch der Multi-Tyrosinkinase-Inhibitor Crizotinib, der gegen ALK, MET und ROS1 gerichtet ist. Im Rahmen dieser Studie führten wir eine parallele Untersuchung auf Alterationen in diesen drei Genen durch, um verschiedene Methoden zu evaluieren und mögliche spezifische klinische oder histopathologische Eigenschaften zu identifizieren.

## Material und Methoden

Mit Hilfe von Tissue Microarrays wurden 473 chirurgisch resezierte NSCLCs mittels IHC auf ALK und MET Expression sowie mittels FISH auf Alterationen im ALK, MET und ROS1 Gen untersucht.

## Ergebnisse

ALK und ROS1 Alterationen konnten bei 2,6% beziehungsweise 1,3% aller Adenokarzinome nachgewiesen werden, jedoch nicht bei reinen Plattenepithelkarzinomen. Bei einem Tumor mit einer ROS1 Translokation konnten wir eine zusätzliche ROS1 Amplifikation beobachten. In 8,6% aller Fälle trat eine gleichzeitige MET Überexpression und MET Amplifikation auf. Tumore mit ALK oder ROS1 Alterationen zeigten keine MET Amplifikation in der FISH, jedoch wiesen drei Patienten mit einer ALK Translokation eine zusätzliche MET Überexpression auf. Bei Tumoren mit ALK oder MET Alterationen war signifikant häufiger eine Lymphgefäßinvasion oder eine Lymphknotenmetastasierung zu beobachten. Während ALK Translokationen bevorzugt bei jüngeren Patienten auftraten, kamen MET Amplifikationen vor allem bei Fällen mit Pleurainvasion oder papillärem Wachstum vor.

## Diskussion

Während die IHC in der Routinediagnostik von ALK Translokationen zukünftig eine ergänzende Rolle einnehmen könnte, sind weitere Untersuchungen nötig um die Aussagekraft der MET IHC einschätzen zu können. Tumore mit ALK oder MET Alterationen sind gehäuft mit bestimmten epidemiologischen oder histopathologischen Eigenschaften verknüpft. Jedoch sind diese nicht ausreichend spezifisch genug um die Durchführung der IHC oder FISH auf bestimmte Patientengruppen zu beschränken. Darüber hinaus sind weitere Untersuchungen nötig um die Relevanz von ROS1 Amplifikationen genauer einschätzen zu können.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Philipp Jurmeister, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **ALK, MET und ROS1 Alterationen beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom: Vergleich verschiedener Nachweismethoden und Untersuchung auf spezifische klinisch-pathologische Charakteristiken** selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet. Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben ist.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

---

Datum

---

Unterschrift

## Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Publikation:

Philipp Jurmeister, Dido Lenze, Stefanie Mende, Erika Berg, Frank Schäper, Udo Kellner, Hermann Herbst, Christine Sers, Jan Budczies, Manfred Dietel, Michael Hummel and 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

Beitrag im Einzelnen:

Herr Jurmeister stellte auf Basis der Patientenakten und histologischen Untersuchungsbefunde die klinischen und histopathologischen Daten der untersuchten Fälle zusammen. Fehlende histopathologische Untersuchungen (zum Beispiel Beurteilung des prädominanten Wachstumsmusters) wurden durch den Doktoranden selbstständig durchgeführt, mit Herrn Dr. von Laffert diskutiert und entsprechend ergänzt. Darüber hinaus war Herr Jurmeister bei der Auswahl geeigneter Fälle und der Identifizierung repräsentativer Tumorbereiche als Grundlage für die Erstellung der im Projekt verwendeten Tissue Microarrays beteiligt. Insgesamt umfasste das zusammengestellte Kollektiv etwa 650 Tumore. Diese Proben wurden zwar soweit möglich vollständig analysiert, jedoch wurden nicht alle Fälle in die Publikationen aufgenommen, da zum Beispiel klinische Patientendaten wie Alter oder Geschlecht unvollständig waren und nicht nachträglich erhoben werden konnten.

Im Rahmen seiner selbstständigen Literaturrecherche erarbeitete der Doktorand die benötigten Vorgehensweisen und legte beispielsweise die Auswertungsalgorithmen für die FISH und IHC fest.

Unter der Anleitung und Federführung von Frau Mende und Frau Berg war Herr Jurmeister an der Anfertigung der FISH beteiligt.

Im Zuge der fluoreszenzmikroskopischen Begutachtung der ALK FISH wurde Herr Jurmeister durch Herrn Dr. von Laffert und Frau Dr. Dido Lenze in die zu erlernenden Arbeitstechniken eingeführt. Die Auswertung der MET und ROS1 FISH führte er selbstständig durch. Darüber hinaus analysierte der Doktorand das Kollektiv auch hinsichtlich RET Translokationen. Hierbei wurde jedoch nur ein positiver Fall gefunden, weshalb diese Ergebnisse nicht wie ursprünglich geplant in den Publikationstext aufgenommen wurden. Im Rahmen der Auswertung der ROS1 FISH entwickelte Herr Jurmeister weitere, über das Ausgangsthema hinausgehende Fragestellungen (Frage ob die erhöhte Anzahl an ROS1 Kopien in zwei Fällen auf eine Polysomie oder eine Amplifikation zurückzuführen ist). Mit Unterstützung von Frau Mende, Frau Berg, Frau Dr. Lenze, Herrn Dr. von Laffert und Herrn Prof. Dr. Hummel konzipierte er das weitere Vorgehen und führte die notwendigen Analysen durch.

Die Auswertung der IHC nahm Herr Jurmeister selbstständig vor. Gemäß dem Vier-Augen-Prinzip erfolgte eine weitere Begutachtung in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. von Laffert. Diskordante Fälle wurden gemeinsam reevaluiert, diskutiert und im Konsens bewertet.

Der Publikationstext wurde von Herrn Jurmeister in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. von Laffert erstellt. Alle Tabellen, Abbildungen und Grafiken wurden durch den Doktoranden eigenständig entwickelt und angefertigt. Herr Jurmeister führte die benötigten

statistischen Berechnungen mit Hilfe der Statistikprogramme SPSS und R selbstständig durch. Diese wurden durch Herrn Dr. Budczies überprüft und erweitert.

Teile dieser Dissertation wurden bei der 98. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie vom 12. bis 15. Juni 2014 im Rahmen einer Posterpräsentation vorgestellt (P. Jurmeister, D. Lenze, E. Berg, S. Mende, F. Schäper, U. Kellner, H. Herbst, M. Dietel, M. Hummel, M. von Laffert; *MET detection in non-small cell lung cancer (NSCLC): a comparison of two diagnostic methods and correlation with clinical data*. *Der Pathologe*, 2014; Suppl 1, 35:114-115). Herr Jurmeister fertigte das benötigte Abstrakt in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. von Laffert an. Der Doktorand war für die Erstellung des Posters inklusive aller Abbildungen und Tabellen verantwortlich und präsentierte die Arbeit am 13. Juni 2014 dem Fachpublikum.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

---

Unterschrift des Doktoranden

---

# Auszug aus der Journal Summary List

ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>

Journal Citation Reports<sup>®</sup>



2013 JCR Science Edition

## Journal Summary List

[Journal Title Changes](#)

Journals from: **subject categories RESPIRATORY SYSTEM** [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)

Sorted by:  [SORT AGAIN](#)

Journals 1 - 20 (of 54)



Page 1 of 3

[MARK ALL](#) [UPDATE MARKED LIST](#)

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title <i>(linked to journal information)</i>	ISSN	JCR Data <sup>i</sup>						Eigenfactor <sup>®</sup> Metrics <sup>i</sup>	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor <sup>®</sup> Score	Article Influence <sup>®</sup> Score
<input type="checkbox"/>	1	<a href="#">AM J RESP CRIT CARE</a>	1073-449X	51564	11.986	11.284	3.295	275	8.8	0.09482	3.880
<input type="checkbox"/>	2	<a href="#">THORAX</a>	0040-6376	18780	8.562	8.271	2.053	169	8.3	0.03763	2.837
<input type="checkbox"/>	3	<a href="#">CHEST</a>	0012-3692	45651	7.132	6.916	1.775	435	8.9	0.07759	2.426
<input type="checkbox"/>	4	<a href="#">EUR RESPIR J</a>	0903-1936	27463	7.125	6.680	1.990	299	7.6	0.05595	2.108
<input type="checkbox"/>	5	<a href="#">J THORAC ONCOL</a>	1556-0864	8282	5.800	4.948	1.259	239	3.3	0.03949	1.728
<input type="checkbox"/>	6	<a href="#">J HEART LUNG TRANSPL</a>	1053-2498	8078	5.611	4.209	1.504	141	5.7	0.02241	1.414
<input type="checkbox"/>	7	<a href="#">AM J RESP CELL MOL</a>	1044-1549	11181	4.109	4.333	0.880	216	7.8	0.02218	1.407
<input type="checkbox"/>	8	<a href="#">AM J PHYSIOL-LUNG C</a>	1040-0605	13603	4.041	4.338	0.654	182	7.7	0.02115	1.167
<input type="checkbox"/>	9	<a href="#">J THORAC CARDIOV SUR</a>	0022-5223	22350	3.991	3.937	0.827	467	8.3	0.04942	1.453
<input type="checkbox"/>	10	<a href="#">J CYST FIBROS</a>	1569-1993	1956	3.820	3.221	0.756	119	4.0	0.00642	0.937
<input type="checkbox"/>	11	<a href="#">LUNG CANCER</a>	0169-5002	8621	3.737	3.599	0.592	267	5.4	0.02332	1.109
<input type="checkbox"/>	12	<a href="#">ANN THORAC SURG</a>	0003-4975	30335	3.631	3.973	0.794	540	8.4	0.05927	1.398
<input type="checkbox"/>	13	<a href="#">J BREATH RES</a>	1752-7155	792	3.590	3.414	0.677	62	3.8	0.00182	0.553
<input type="checkbox"/>	14	<a href="#">TUBERCULOSIS</a>	1472-9792	2315	3.503	3.599	0.495	93	4.8	0.00703	1.104
<input type="checkbox"/>	15	<a href="#">RESPIROLOGY</a>	1323-7799	3479	3.495	2.563	0.780	164	4.4	0.00966	0.697
<input type="checkbox"/>	16	<a href="#">RESP RES</a>	1465-993X	4450	3.382	3.777	0.462	145	4.8	0.01235	1.123
<input type="checkbox"/>	17	<a href="#">EUR J CARDIO-THORAC</a>	1010-7940	12318	3.048	2.809	1.090	399	6.4	0.02953	0.922
<input type="checkbox"/>	18	<a href="#">SEMIN RESP CRIT CARE</a>	1069-3424	1518	3.022	2.650	0.390	77	4.7	0.00480	0.847
<input type="checkbox"/>	19	<a href="#">CURR OPIN PULM MED</a>	1070-5287	2069	2.957	2.674	0.478	90	5.2	0.00598	0.866
<input type="checkbox"/>	20	<a href="#">RESPIRATION</a>	0025-7931	3189	2.924	2.648	0.840	119	5.8	0.00675	0.685

## **Publikationstext**

Philipp Jurmeister, Dido Lenze, Stefanie Mende et al. *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

<http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2014.11.018>

















## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## Publikationsliste

1. **P. Jurmeister**, D. Lenze, S. Mende, E. Berg, F. Schäper, U. Kellner, H. Hebst, M. Dietel, C. Sers, J. Budczies, M. Hummel, M. 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

Impact Factor: 3.737

2. M. von Laffert, A. Stenzinger, M. Hummel, W. Weichert, D. Lenze, A. Warth, R. Penzel, H. Herbst, U. Kellner, **P. Jurmeister**, P. Schirmacher, M. Dietel, F. Klauschen, *ALK-FISH borderline cases in non-small cell lung cancer: Implications for diagnostics and clinical decision making*. Lung Cancer 2015; 90:465–471.

Impact Factor: 3.737

3. **P. Jurmeister**, D. Lenze, E. Berg, S. Mende, F. Schäper, U. Kellner, H. Herbst, M. Dietel, M. Hummel, M. von Laffert; *MET detection in non-small cell lung cancer (NSCLC): a comparison of two diagnostic methods and correlation with clinical data*. Der Pathologe, 2014; Suppl 1, 35:114-115

Impact Factor: 0.635

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Michael Hummel möchte ich für die Überlassung des Promotionsthemas sowie die Bereitstellung aller logistischen Rahmenbedingungen, die zur Durchführung dieses Projekts nötig waren, recht herzlich danken. Sein professionelles Feedback war stets eine wertvolle Bereicherung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Maximilian von Laffert für seine umfassende und herzliche Betreuung bei der Anfertigung meiner Promotionsarbeit. In allen Phasen des Projektes stand mir seine Tür jederzeit offen um alle Fragen und Unklarheiten ausführlich zu diskutieren. Ich danke ihm für die zahllosen Stunden, die er vor allem in der Hochphase direkt vor Veröffentlichung der Publikation mit mir zusammen in diese Arbeit investierte.

Frau Erika Berg, Frau Stefanie Mende und Frau Dr. Dido Lenze danke ich für die ausgezeichnete Einarbeitung in Labor und Mikroskop sowie die anhaltende, fachlich hervorragende Unterstützung bei allen technischen und theoretischen Fragen. Die mir gegenüber gezeigte Herzlichkeit und Geduld sowie die Tatsache, dass ich hier immer ein offenes Ohr bei allen Problemen finden konnte, haben grundlegend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Dr. Frank Schäper, Herrn PD Dr. Udo Kellner sowie Herrn Prof. Dr. Hermann Herbst danke ich für die freundliche Überlassung zahlreicher Fälle sowie ihr hilfreiches Feedback bei der Anfertigung des Publikationstextes.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Herrn Dr. Jan Budczies für seine professionelle Unterstützung bei der statistischen Auswertung der gewonnenen Daten.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir nicht nur mein Studium ermöglicht haben, sondern mir auch allzeit eine große moralische Stütze bildeten und mir liebevoll zur Seite standen. Herzlichst danken möchte ich auch meiner Schwester, die mir in zahlreichen Diskussionen wertvolle Denkanstöße und Hilfestellungen geben konnte und mir mit ihren hervorragenden Englischkenntnissen jederzeit weiterhalf. Fabian Wolf danke ich für seine andauernde moralische Unterstützung, sei es in Form von aufmunternden Worten oder grandiosem Gebäck.