

Schwerpunkt: Neue Entwicklungen in der Zytologie

Pathologie 2012 · 33:301–307
 DOI 10.1007/s00292-012-1577-9
 Online publiziert: 20. Juni 2012
 © Springer-Verlag 2012

S. Savic · M.P. Bihl · L. Bubendorf
 Institut für Pathologie, Universitätsspital Basel, Schweiz

Schwerpunktherausgeber
 M. Tötsch, Graz

Nichtkleinzellige Lungenkarzinome

Subklassifikation und prädiktive molekulare Markeruntersuchungen in der Zytologie

Bis vor wenigen Jahren wurden nichtkleinzellige Lungenkarzinome (NSCLC), die 80% aller Lungenkarzinome ausmachen, aufgrund fehlender Unterschiede im Ansprechen auf Chemotherapie als eine einheitliche Erkrankung angesehen. Molekulare Untersuchungen und klinische Studien haben jedoch gezeigt, dass NSCLC eine heterogene Gruppe von Lungenkarzinomen darstellen, die sich klinisch-therapeutisch und genetisch maßgeblich voneinander unterscheiden. Die morphologische und genetische Subtypisierung von NSCLC ist heute entscheidend für die Wahl der für den individuellen Patienten am besten geeigneten Therapie [3, 4, 7, 14].

Anforderungen an zytologische Diagnostik

Bei 70% der Patienten mit einem NSCLC wird die Erkrankung in fortgeschrittenen, inoperablen Stadien mittels zytologischer Proben und kleiner Biopsien diagnostiziert. Bei bis zu 40% aller Patienten erfolgt die Diagnose ausschließlich an zytologischem Material.

Die Anforderungen an die zytologische Diagnostik sind komplexer geworden und beinhalten neben der Unterscheidung kleinzelliger Lungenkarzinome von NSCLC:

1. die möglichst exakte NSCLC-Subtypisierung,

2. die Selektion des geeigneten Tumormaterials für molekulare prädiktive Markeruntersuchungen,
3. die präanalytische Vorbereitung der zytologischen Proben für die prädiktiven Markeranalysen,
4. die Durchführung und Interpretation der molekularen prädiktiven Markeruntersuchungen mit geeigneten Testverfahren.

Subtypisierung für molekulare Markeruntersuchungen und Therapiewahl

Die NSCLC-Subtypisierung ist heute aus folgenden Gründen von entscheidender Bedeutung:

1. Der NSCLC-Subtyp ist prädiktiv für das Ansprechen auf eine zytotoxische Chemotherapie. Patienten mit

Adenokarzinomen zeigen eine signifikant bessere Ansprechrate mit dem Anti-Folat Pemetrexet als Patienten mit Plattenepithelkarzinomen. Patienten mit Plattenepithelkarzinomen sprechen hingegen besser auf Gemcitabine an [14].

2. Der NSCLC-Subtyp ist prädiktiv für das Auftreten potenziell fataler Nebenwirkungen unter Bevacizumab. Dieser monoklonale Antikörper ist bei Plattenepithelkarzinomen kontraindiziert, da sie mit dem Auftreten gefährlicher Blutungen assoziiert sind [3].
3. Der NSCLC-Subtyp entscheidet über prädiktive molekulare Markeruntersuchungen. „Epidermal-growth-factor-receptor“ (EGFR)-Mutationen und „Anaplastic lymphoma kinase“ (ALK)-Gen-Rearrangements

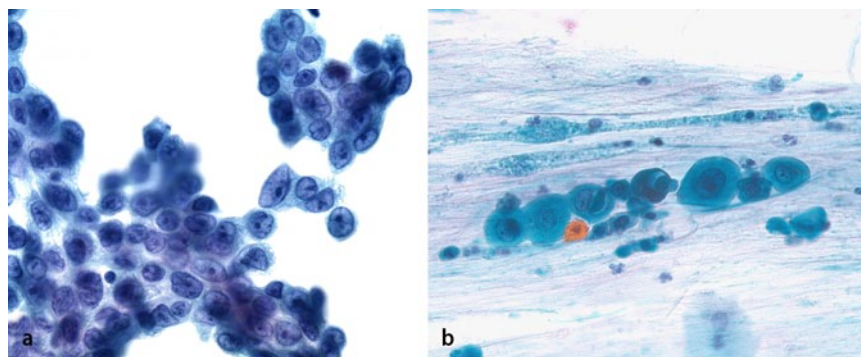


Abb. 1 ▲ Die meisten nichtkleinzelligen Lungenkarzinome lassen sich rein morphologisch subtypisieren (Papanicolaou-Färbung, Vergrößerung 400-fach). **a** Adenokarzinomzellen mit feinvakuolisierendem Zytoplasma, teilweise intrazytoplasmatischem Schleim und vesikulären Zellkernen. **b** Plattenepithelkarzinomzellen mit dichtem lamelliärem Zytoplasma und Verhornung

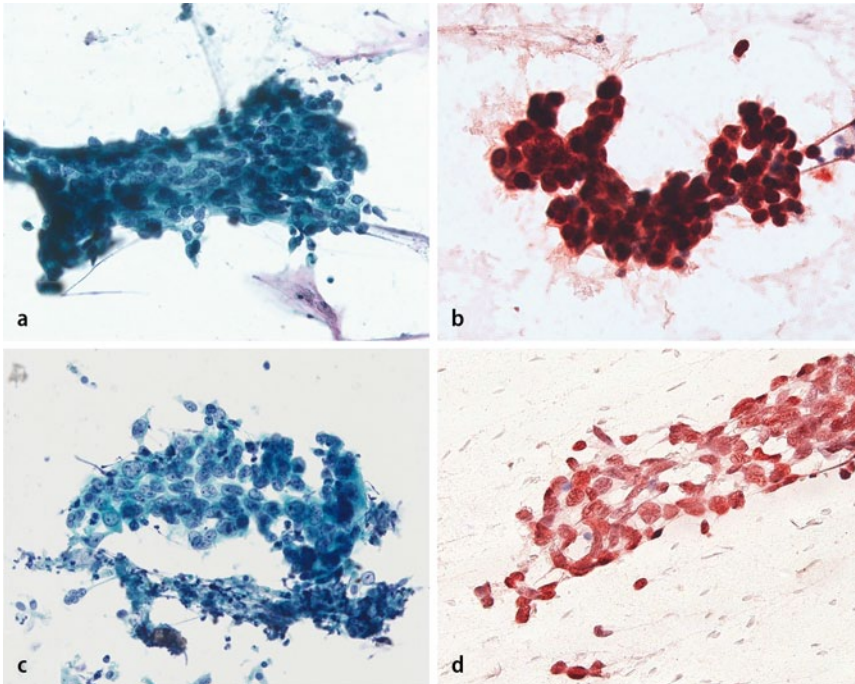


Abb. 2 ▲ Immunzytochemische Subtypisierung von nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC). **a, b** NSCLC mit Expression von TTF-1, am ehesten Adenokarzinom. **c, d** NSCLC mit Expression von p63, am ehesten Plattenepithelkarzinom (**a, c** Papanicolaou-Färbung und AEC-Immunzytochemie; **a–d** Vergrößerung 400-fach)

sind prädiktiv für das Ansprechen auf EGFR- bzw. ALK-Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) und kommen praktisch nur bei Adenokarzinomen vor [4, 7].

Erst kürzlich wurden erstmals standardisierte Kriterien für die NSCLC-Subtypisierung in kleinen Biopsien und in zytologischen Präparaten publiziert [17]. Die beiden häufigsten Subtypen, das Adenokarzinom (60%) und das Plattenepithelkarzinom (30%) lassen sich in >70% der Fälle rein zytomorphologisch anhand etablierter Kriterien diagnostizieren (■ **Abb. 1**; [19]). Vor allem bei wenig differenzierten NSCLC können charakteristische morphologische Merkmale fehlen. In diesen Fällen ist eine immunzytochemische Zelltypisierung angezeigt.

Falls sowohl zytologisches als auch biopisches Tumormaterial verfügbar ist, lohnt es sich, diese Proben miteinander zu vergleichen. Dies erleichtert die korrekte morphologische Subtypisierung und dient dazu, das für Immunphänotypisierung oder molekulare Untersuchungen am besten geeignete Material auszuwählen. Zytologie und Biopsie sind gleichwertig bzgl. NSCLC-Subtypisierung. Da die Färbung nach Papanicolaou (PAP) Keratin und Zellverhornungen hervorhebt, hat die Zytologie im Vergleich zur Biopsie eine etwas höhere Sensitivität für die Diagnose von Plattenepithelkarzinomen.

Die Anzahl zu untersuchender immunzytochemischer Marker sollte auf das Minimum beschränkt werden. Als effiziente und meist ausreichende Kombination für die Abgrenzung eines Adenokarzinoms von einem Plattenepithelkarzinom hat sich der glanduläre Marker TTF-1 mit einem der beiden plattenepithelialen Marker p63 und CK5/6 erwiesen (■ **Abb. 2**; [8, 18]). Als Chromogen sollte 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) verwendet werden, um ggf. eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) zur Untersuchung prädiktiver Marker auf den immunzytochemischen Präparaten auswerten zu können. Diaminobenzidin (DAB) führt zu einer nukleären Autofluoreszenz, welche die Auswertung der FISH-Signale beeinträchtigt.

Aus einem nicht sicher zuordenbarem Immunphänotyp ergibt sich nach wie vor die Diagnose eines nicht weiter

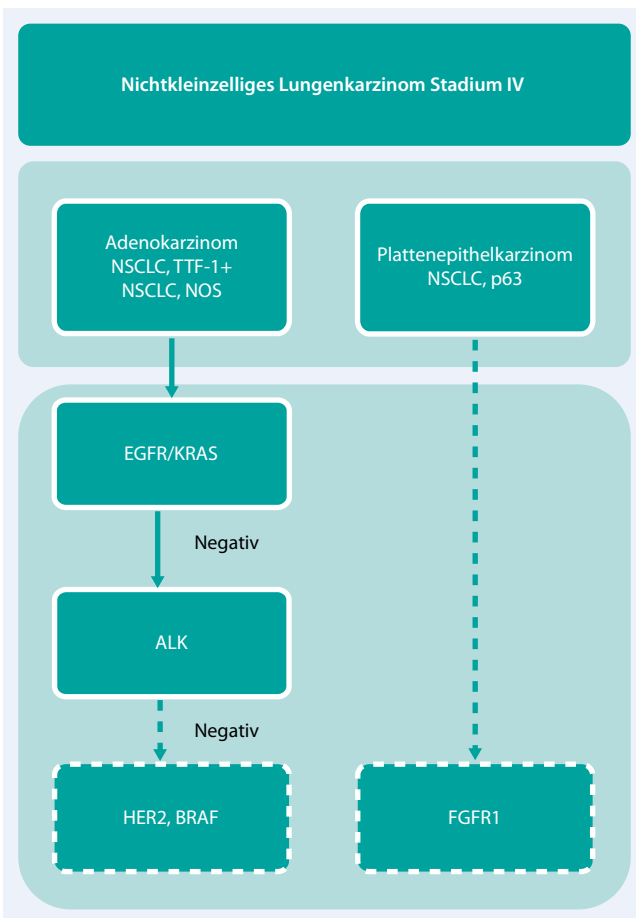


Abb. 3 ◀ Algorithmus molekularer Untersuchungen bei Stadium IV des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC) in Abhängigkeit vom morphologischen und Immunphänotyp. *HER2, BRAF* bzw. *FGFR1* sind aktuell keine etablierten prädiktiven Marker, könnten aber in Zukunft bedeutend werden. (*NOS* nicht weiter klassifizierbar; adaptiert nach den Empfehlungen der Schweizerischen Arbeitsgruppe für Lungpathologie)

Tab. 1 „Epidermal-growth-factor-receptor“ (EGFR)-Mutationsanalysen bei Zytologien und Biopsien (2010–2011): Vergleich der analytischen Erfolgsraten

	Zytologie	Biopsie	Gesamt	p-Wert
Erfolgsrate bezogen auf alle untersuchten Exone (Exone 18–21)				
Alle 4 Exone auswertbar (%)	359 (89)	434 (95)	793 (92)	
Nicht alle 4 Exone auswertbar (%)	44 (11)	25 (5)	69 (8)	
Gesamt	403	459	862	<0,01
Erfolgsrate für die am häufigsten von einer aktivierenden Mutation betroffenen Exone 19 und 21				
Exon 19 und 21 auswertbar (%)	392 (97)	455 (99)	847 (98)	
Exon 19 und/oder 21 nicht auswertbar (%)	11 (3)	4 (1)	15 (2)	
Gesamt	403	459	862	0,06

Tab. 2 Prävalenz von „Epidermal-growth-factor-receptor“ (EGFR)-Mutationen bei Zytologien und Biopsien (2010–2011)

	Zytologie	Biopsie	Gesamt	p-Wert
Prävalenz aktivierender EGFR-Mutationen				
Aktivierende Mutation nachgewiesen (%)	44 (11)	44 (10)	88 (10)	
Aktivierende Mutation nicht nachgewiesen (%)	348 (89)	411 (90)	759 (90)	
Gesamt	392	455	847	0,5
Prävalenz von Resistenzmutationen				
Resistenzmutation nachgewiesen (%)	6 (2)	5 (1)	11 (1)	
Resistenzmutation nicht nachgewiesen (%)	386 (98)	450 (99)	836 (99)	
Gesamt	392	455	847	0,6

klassifizierbaren NSCLC (NSCLC-NOS). Der Anteil an NSCLC-NOS-Diagnosen muss aufgrund der therapeutischen Relevanz möglichst gering gehalten werden und kann mithilfe der gleichzeitigen, sich ergänzenden Beurteilung von Zytologie und Biopsie und der Immuntypisierung von 20–30% auf etwa 5% reduziert werden [15]. NSCLC-NOS werden zum jetzigen Zeitpunkt ebenfalls wie Adenokarzinome behandelt.

Sollten nach Anfertigung der zytologischen Ausstrichpräparate noch Tumorzellen im eingesandten Material vorhanden sein, ist es empfehlenswert, diese zu fixieren und in einem paraffineingebetteten Zellblock für allfällige zukünftige Untersuchungen zu asservieren. Auf den nach PAP gefärbten Ausstrichpräparaten degradiert die DNA im Laufe der Zeit, sodass nach 1–2 Jahren molekulare Untersuchungen oft nicht mehr optimal beurteilbar sind. Nach eigenen Erfahrungen bleibt die DNA-Qualität auf luftgetrockneten, mit May-Grünwald-Giemsä

(MGG) gefärbten Präparaten jedoch länger erhalten.

Prädiktive molekulare Markeruntersuchungen

Die genetische NSCLC-Subtypisierung mit der entsprechenden zielgerichteten

Therapie hat erstmals zu einer relevanten Verbesserung der Lebenserwartung von Patienten mit einem fortgeschrittenen Lungenkarzinom geführt.

Diese genetischen NSCLC-Subtypen sind charakterisiert durch spezifische Genveränderungen, die zu einer konstitutiven Aktivierung des entsprechenden Proteins führen, meist nicht gleichzeitig vorkommen und sich gegenseitig ausschließen [9].

EGFR- und KRAS-Mutationsanalyse

EGFR ist eine an der Zellmembran gebundene Rezeptortyrosinkinase (RTK). Nach Ligandenbindung aktiviert die intrazelluläre Domäne des EGFR den Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K)-AKT- und den RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweg, die beide sowohl die Apoptose hemmen als auch den Zellzyklus aktivieren. Aktivierende somatische Mutationen in den Exonen 18–21 der Tyrosinkinasedomäne des EGFR-Gens führen zu einer ligandenunabhängigen Aktivierung des EGFR. Deletionen im Exon 19 und die L858R-Punktmutation im Exon 21 machen 85% all dieser Mutationen aus. In westeuropäischen Patientenkollektiven sind 8–15% der Adenokarzinome EGFR-mutiert.

EGFR-TKI sind hochwirksam bei Lungenkarzinomen mit aktivierender EGFR-Mutation [7]. Eine EGFR-Mutationsanalyse ist somit entscheidend für die Selektion der für den Patienten am besten wirksamen Therapie. Diese sollte an allen Adenokarzinomen, aber auch an NSCLC-NOS in fortgeschrittenen Tumorstadien, d. h. bei malignem Pleuraerguss oder Metastasen

Hier steht eine Anzeige.

 Springer

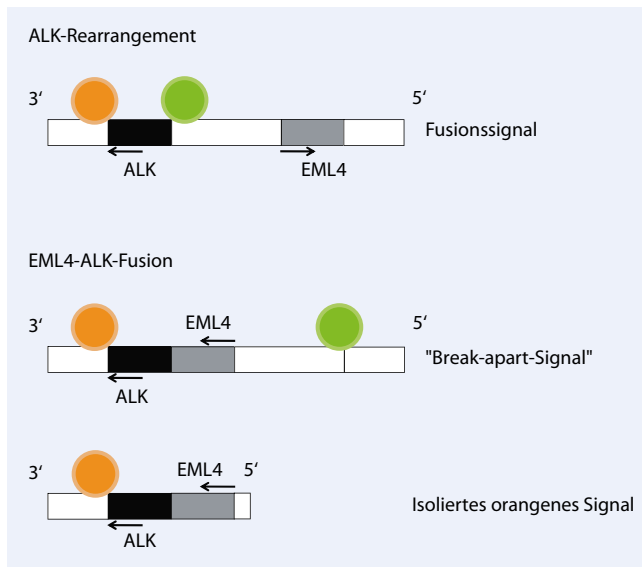


Abb. 4 ▲ ALK-„Break-apart“-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zum Nachweis einer EML4-ALK-Fusion. Bei fehlendem ALK-Rearrangement liegen die beiden Signale als sog. Fusionsignal eng beieinander (<2 Signaldurchmesser; *oben*). Bei einer EML4-ALK-Fusion durch Inversion sind die orange und grün fluoreszierenden Signale als sog. „Break-apart“-Signale deutlich voneinander entfernt (≥ 2 Signaldurchmesser; *Mitte*). Im Falle einer EML4-ALK-Genfusion durch zusätzliche Deletion fehlt das grün fluoreszierende Signal, sodass nur noch das isolierte orange fluoreszierende Signal vorhanden ist (*unten*).

(Stadium IV gemäß der aktuell geltenden 7. TNM-Version), durchgeführt werden (■ **Abb. 3**). Aufgrund der geringen Mutationsrate wird die Testung von Plattenepithelkarzinomen nicht empfohlen [10].

Obwohl KRAS-Mutationen bisher therapeutisch nicht direkt angebar sind, ist die Kenntnis des KRAS-Status für die Selektion weiterer genetischer Untersuchungen hilfreich. Lungenkarzinome mit EGFR- und KRAS-Wildtyp sollten auf ALK-Gen-Rearrangements hin untersucht werden (s. unten).

Die aktuell am weitesten verbreitete Methode zum Nachweis von Mutationen ist die direkte Gensequenzierung nach Polymerasekettenreaktion (PCR)-Amplifikation der extrahierten DNA. Zytologische Präparate sind dabei den Biopsien gleichwertig und zeichnen sich aus durch eine hohe DNA-Qualität aufgrund intakter Zellkerne und der alkoholbasierten Fixierung [11, 13].

Wenn eine Biopsie vorhanden ist, sollte, wie oben bereits diskutiert, das Material miteinander verglichen werden. Falls sowohl die Zytologie als auch die Biopsie reichlich Tumorzellen enthalten, führen wir die molekularen Untersuchungen be-

vorzugt an der Zytologie durch. Dies erlaubt es uns, das paraffineingebettete Tumormaterial der Biopsie für allfällige zukünftige Untersuchungen zu asservieren. Alle Arten von zytologischen Präparaten (konventionelle Ausstriche, Dünnschichtpräparate, alkohol- oder luftfixierte, PAP-, MGG- oder immunzytochemisch gefärbte Präparate) eignen sich für PCR-basierte DNA-Untersuchungen. Das Verhältnis zwischen malignen und benignen Zellen im zu untersuchenden Material sollte mindestens 30–50% betragen. Dies kann in den meisten Fällen mittels Tumorzellanreicherung durch manuelles Abkratzen oder Lasermikrodissektion (LMD) erreicht werden [1]. Für gewöhnlich werden mindestens 100 Tumorzellen für die Analyse benötigt. Die Anzahl der erforderlichen Zellen ist geringer als bei Biopsien (etwa 200 Tumorzellen), was durch die fehlende formalinbedingte DNA-Fragmentierung und die intakten Zellkerne zu erklären ist.

Wir führen ungefähr gleich viele EGFR-Mutationsanalysen an zytologischen Präparaten wie an Biopsien durch (■ **Tab. 1**). Die etwas geringere analytische Erfolgsrate bei Zytologien ist darauf

zurückzuführen, dass die Analyse gelegentlich retrospektiv an über 1 Jahr archiviertem Material bei Tumorprogression und damit an nicht mehr optimaler DNA-Qualität erfolgen muss. Trotz dieser Tatsache sind die Exone 19 und 21 bei 97% aller untersuchten Zytologien auswertbar. Die EGFR-Mutationsrate liegt sowohl in der Zytologie als auch in der Biopsie bei 10% (■ **Tab. 2**). Diese identische Mutationsrate zeigt, dass sich beide Probenarten gleichermaßen für die Mutationsanalyse eignen.

ALK-Gen-Rearrangements

ALK ist eine Rezeptortyrosinkinase, die in normalem Lungengewebe nicht exprimiert wird. Das EML4-ALK-Fusionsgen wurde erst 2007 entdeckt und führt zu einer konstitutiven Aktivierung der ALK-Kinase [16]. Die Prävalenz der EML4-ALK-Genfusion liegt in unselektionierten NSCLC bei 3–5% und bei Adenokarzinomen mit EGFR- und KRAS-Wildtyp bei bis zu 20% [2].

Nur 4 Jahre nach der Entdeckung von EML4-ALK wurde im Sommer 2011 aufgrund vielversprechender klinischer Studienergebnisse der duale ALK/MET-Inhibitor Crizotinib für die Therapie von fortgeschrittenen NSCLC mit einem ALK-Gen-Rearrangement in den USA von der Food and Drug Administration (FDA) zugelassen [4]. Parallel dazu erfolgte erstmals in der Geschichte zielgerichteter Medikamente auch die Zulassung des entsprechenden prädiktiven Tests, des Vysis-ALK-FISH-Proben-Kits (Abbott Mol. Inc., Des Plaines, IL/USA). Eine Untersuchung auf ein ALK-Rearrangement ist bei *nichtplatteneithelialen* NSCLC mit EGFR- und KRAS-Wildtyp empfohlen (■ **Abb. 3**).

Sowohl das EML4- als auch das ALK-Gen sind auf dem kurzen Arm des Chromosoms 2 lokalisiert. Das EML4-ALK-Fusionsgen entsteht durch kleine Inversionen mit oder ohne Deletionen des dazwischenliegenden Chromosomenabschnitts. Die Bruchstelle im ALK-Gen liegt im Exon 20, während mindestens 8 verschiedene Bruchstellen im EML4-Gen bekannt sind, die zu den verschiedenen EML4-ALK-Varianten führen [12]. Selten können auch andere Fusionspart-

ner wie TGF und KIF5B mit ALK fusionieren und die ALK-Kinase aktivieren. Ein molekularer Test sollte alle diese ALK-Rearrangements erfassen. Der Goldstandard ist zum jetzigen Zeitpunkt der indirekte Nachweis mittels FISH mit sog. „Break-apart“ (BAP)-Sonden.

Zytologische Präparate eignen sich hervorragend für FISH-Untersuchungen und sind unserer Erfahrung nach in nahezu 100% der Fälle auswertbar. Die FISH-Auswertung ist deutlich einfacher als bei Biopsien, da intakte Zellkerne beurteilt werden. Signalverluste infolge Zellkern-durchtrennungen wie an histologischen Präparaten fehlen. Wie bei PCR-basierten DNA-Untersuchungen eignen sich auch für die FISH alle Arten von zytologischen Präparaten (AEC als Chromogen bei ICC, s. auch oben). Ein geeignetes Areal mit einer adäquaten Anzahl an Karzinomzellen wird auf dem konventionell oder ICC-gefärbten Präparat für die Hybridisierung markiert. In vielen Fällen empfiehlt es sich, die Koordinaten der Karzinomzellen mithilfe eines automatischen Kreuztischs und einer Relokalisationssoftware zu speichern. Dadurch lassen sich die Karzinomzellen, die oft über das Präparat verteilt und mit benignen Zellen vermischt sind, nach der FISH schnell und zuverlässig identifizieren und gezielt untersuchen.

Der Vysis-ALK-FISH-Proben-Kit markiert das 3'-Ende des ALK-Gens mit einer orange fluoreszierenden Sonde und das 5'-Ende mit einer grün fluoreszierenden Sonde (■ **Abb. 4**). In benignen Zellen und Karzinomen ohne ALK-Rearrangement liegen die beiden Signale eng beieinander oder übereinander (■ **Abb. 4, 5a**). Bei einer EML4-ALK-Fusion durch Inversion (in 60–70% der Fälle) bricht das 3'-Ende des Chromosomenabschnitts, an dem die grün fluoreszierende Sonde hybridisiert. Durch eine Inversion des zwischen dem ALK und EML4 gelegenen Chromosomenabschnitts entfernen sich die orange und grün fluoreszierenden FISH-Signale erkennbar voneinander (sog. BAP-Signal; ■ **Abb. 4, 5b**). Im Falle einer EML4-ALK-Genfusion mit einer zusätzlichen Deletion (in 30–40% der Fälle) kommt es nach dem initialen Bruch des Chromosoms zum Verlust eines Chromosomenabschnitts. Bei der

Pathologie 2012 · 33:301–307 DOI 10.1007/s00292-012-1577-9
© Springer-Verlag 2012

S. Savic · M.P. Bihl · L. Bubendorf

Nichtkleinzellige Lungenkarzinome. Subklassifikation und prädiktive molekulare Markeruntersuchungen in der Zytologie

Zusammenfassung

In der Lungenkarzinomdiagnostik haben sich die Anforderungen an die Zytologie in den letzten Jahren deutlich verändert. Eine exakte Subtypisierung nichtkleinzelliger Lungenkarzinome (NSCLC) in Adeno- und Plattenepithelkarzinome entscheidet sowohl über die Wahl der Chemotherapie als auch über prädiktive Markeruntersuchungen für eine eventuelle zielgerichtete Therapie. In den meisten Fällen gelingt die Subtypisierung rein morphologisch aufgrund etablierter Kriterien und kann durch immunzytochemische Untersuchungen unterstützt werden. Zytologische Präparate müssen auch danach beurteilt werden, ob das Material für notwendige molekulare Markeranalysen ausreicht.

Die Zytologie ist für prädiktive Markeranalysen genau so gut geeignet wie bioptisches Material. Gleichzeitig vorhandene Zytologien und Biopsien sollten sowohl für die Angabe des NSCLC-Subtyps als auch für die Entscheidung, welches Material für prädiktive Markeranalysen besser geeignet ist, miteinander verglichen werden. In diesem Übersichtsartikel diskutieren wir spezifische Aspekte der NSCLC-Subtypisierung und derzeit empfohlene prädiktive Markeranalysen.

Schlüsselwörter

Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom · Prädiktive Marker · EGFR · EML4-ALK

Non-small cell lung cancer. Subtyping and predictive molecular marker investigations in cytology

Abstract

The diagnosis and treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC) have been revolutionized over the last few years. Requirements for cytopathologists in lung cancer diagnosis have therefore changed. The general diagnostic category of NSCLC is no longer sufficient. In addition cytological specimens need to be evaluated for adequacy regarding predictive marker analyses. Accurate NSCLC subtyping with a distinction of adenocarcinoma from squamous cell carcinoma is crucial for treatment decisions as the subtype will decide on the chemotherapy regimen and the choice of predictive marker analyses for targeted treatment. In the majority of cases,

the subtype can be diagnosed by morphology alone. Cytology is equally well suited as biopsy specimens for the assessment of molecular predictive markers. The best results are achieved when both cytology and biopsy specimens are compared to choose the most appropriate specimen for morphological subtyping and molecular testing. In this paper, we discuss special issues of NSCLC subtyping and currently recommended predictive molecular marker analyses.

Keywords

Non-small-cell lung cancer · Predictive markers · EGFR · EML4-ALK

FISH fehlt somit das grün fluoreszierende Signal und es ist nur noch das orange fluoreszierende Signal sichtbar (■ **Abb. 4, 6b**).

Fünfzig Karzinomzellen müssen ausgewertet werden. Eine Zelle gilt als positiv für ein ALK-Rearrangement, wenn

- das orange und das grün fluoreszierende Signal mindestens zwei Signaldurchmesser voneinander entfernt sind (BAP-Signal bei EML4-ALK-Fusion durch Inversion) oder
- ein isoliertes orange fluoreszierendes Signal vorliegt (bei EML4-ALK-Fusion durch Inversion und Deletion).

Ein isoliertes Grünsignal bei Fehlen des entsprechenden orange fluoreszierenden Signals gilt hingegen als negatives Resultat, da bei dieser Situation das ALK-Gen selbst verloren gegangen ist. Ein Lungenkarzinom gilt als negativ für ein ALK-Rearrangement wenn <5/50 positive Zellen (<10%) und als positiv für ein ALK-Rearrangement wenn >25/50 positive Zellen (>50%) vorliegen. Als Grenzbefund gelten 5–25 positive Zellen (10–50%). Ein solcher Fall sollte von einer zweiten unabhängigen Person ausgewertet werden. Bei einem Mittelwert beider Auswertungen von mindestens 15% posi-

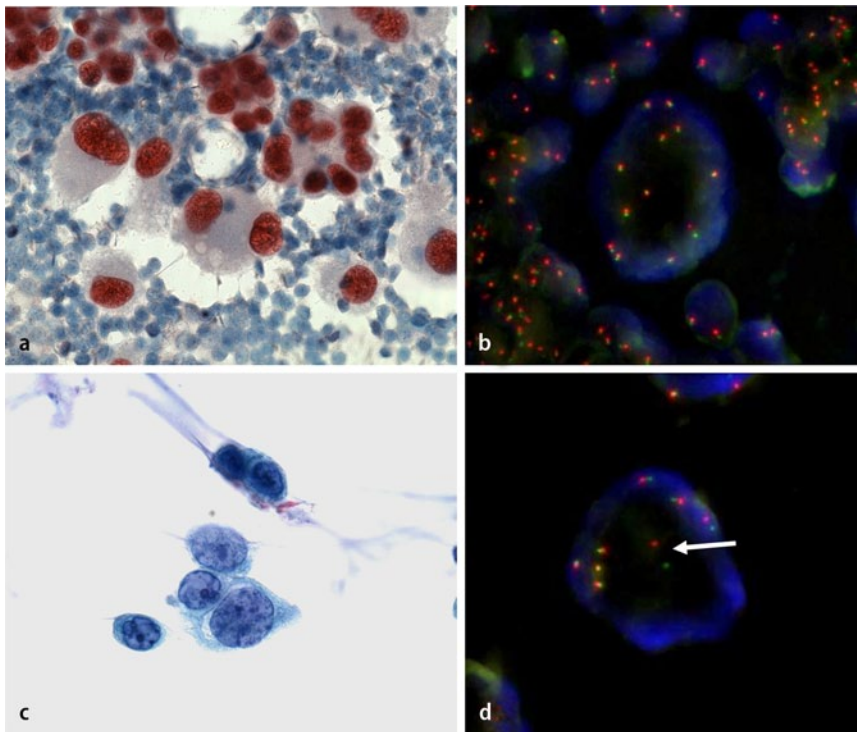


Abb. 5 ▲ Resultate der ALK-„Break-apart“-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). **a** Pleuraerguss mit TTF-1-exprimierenden Adenokarzinomzellen (Immunzytochemie, Vergrößerung 400-fach) mit negativem FISH-Test (**b**) bei zahlreichen Fusionssignalen aufgrund einer Polysomie des Chromosoms 2. **c** Bronchialsekret mit Adenokarzinomzellen und positivem FISH-Test (**d**) bei Nachweis von „Break-apart“-Signalen (Pfeil)

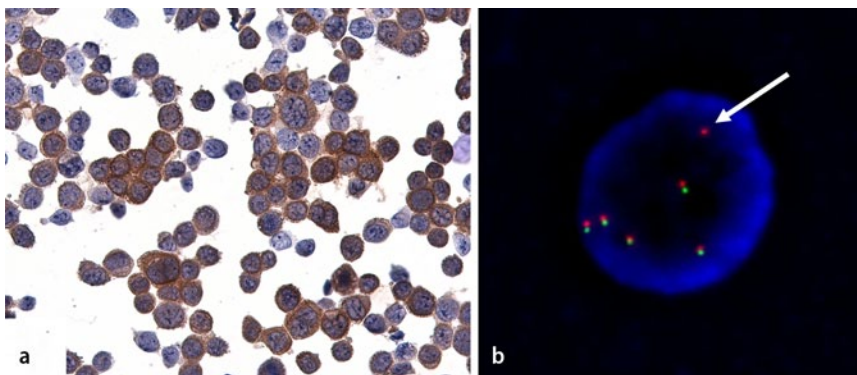


Abb. 6 ▲ Lungenkarzinomzelllinie H3122 mit EML4-ALK-Fusion. **a** Immunzytochemischer Nachweis der Expression des EML4-ALK-Fusionsproteins (monoklonaler Antikörper 5A4, Novocastra, Vergrößerung 400-fach). **b** ALK-„Break-apart“-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit isoliertem orange fluoreszierendem Signal (Pfeil)

tiven Zellen gilt das Lungenkarzinom als positiv für ein ALK-Rearrangement. Karzinomzellen sind oft polysom und die dadurch oft resultierenden zahlreichen FISH-Signale pro Zellkern deutlich zuverlässiger auf einer „z-stack“-komprimierten, zweidimensionalen Aufnahme zu beurteilen, die auch eine Dokumentation des Befundes erlaubt (■ Abb. 5a).

Die Interpretation des ALK-BAP-FISH-Tests ist komplex und bedarf ei-

niger Erfahrung [2]. Erste Resultate mit einem kommerziell erhältlichen monoklonalen Antikörper (5A4) zeigen, dass eine immunhistochemische Präselektion von Patienten vor einer ALK-FISH-Testung kostengünstig und zuverlässig ist [5]. Ein standardisiertes ICC-Protokoll wird auch an zytologischem Material etabliert (■ Abb. 6).

Potenzielle prädiktive Marker

Zahlreiche weitere potenziell prädiktive Genveränderungen sind nicht nur in Adenokarzinomen (wie z. B. *HER-2*, *BRAF*, *MET*, *ROS1*), sondern seit Kurzem auch in Plattenepithelkarzinomen (wie z. B. *FGFR1*) identifiziert worden und in klinischer Erprobung. Sensitivere molekulare Techniken, die rasch zahlreiche Gene kostengünstig an wenigen Tumorzellen untersuchen können, dürften in naher Zukunft verfügbar werden [6].

Schlussfolgerungen

Zytologisches Material ist ausgezeichnet geeignet für prädiktive Markeruntersuchungen. Ein einziges zellreiches Präparat kann für die NSCLC-Subtypisierung und alle erforderlichen prädiktiven Markeruntersuchungen verwendet werden. TTF-1-positive Karzinomzellen lassen sich präzise mittels Lasermikrodissektion anreichern. Da meist noch reichlich Tumorzellen vorhanden sind, kann nach der Lasermikrodissektion auf dem gleichen Präparat die FISH zum Nachweis eines möglichen ALK-Rearrangement durchgeführt werden.

Zytopathologinnen und Zytopathologen sind heute ein wichtiger Bestandteil des multidisziplinären Teams, das die optimale Behandlung der Lungenkrebskrankung ermöglicht.

Fazit für die Praxis

- Die korrekte Subtypisierung des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC) ist entscheidend für die Wahl der Therapie und der prädiktiven molekularen Markeruntersuchungen.
- In den meisten Fällen lässt sich der NSCLC-Subtyp rein morphologisch diagnostizieren.
- Ist sowohl zytologisches als auch bioptisches Tumormaterial vorhanden, sollten die Proben für die korrekte Subtypisierung und die allfälligen molekularen Untersuchungen konsequent miteinander verglichen werden.
- Die Immuntypisierung reduziert die Anzahl der nicht klassifizierbaren

Fälle (NSCLC-NOS), ist aber nur dann indiziert, wenn morphologische Merkmale für eine Subtypisierung des NSCLC fehlen.

- **Zytologische Präparate sind für molekulare prädiktive Markeranalysen genau so gut geeignet wie Biopsien.**

Korrespondenzadresse

Dr. S. Savic

Institut für Pathologie, Universitätsspital Basel
Schönbeinstr. 40, 4031 Basel
Schweiz
ssavic@uhbs.ch

Interessenkonflikt. Dr. S. Savic hat Vortragshonorare von Abbott Mol. erhalten und ist involviert in einem von Abbott Mol. finanzierten Forschungsprojekt. Prof. L. Bubendorf hat an „Advisory-Board“-Meetings von Abbott Mol., Pfizer, AstraZeneca, Roche und Eli Lilly teilgenommen, Vortragshonorare von Abbott Mol., Pfizer, AstraZeneca und Eli Lilly sowie finanzielle Forschungsunterstützung durch Abbott Mol. erhalten.

Literatur

- Bubendorf L, Savic S (2009) Predictive EGFR gene analyses in cytology. *Pathologie* 30(Suppl 2):136–139
- Camidge DR, Kono SA, Flacco A et al (2010) Optimizing the detection of lung cancer patients harboring anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangements potentially suitable for ALK inhibitor treatment. *Clin Cancer Res* 16:5581–5590
- Johnson DH, Fehrenbacher L, Novotny WF et al (2004) Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 22:2184–2191
- Kwak EL, Bang YH, Camidge DR et al (2010) Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 363:1693–1703
- Mcleer-Florin A, Moro-Sibilot D, Melis A et al (2012) Dual IHC and FISH testing for ALK gene rearrangement in lung adenocarcinomas in a routine practice: a French study. *J Thorac Oncol* 7:348–354
- Meyerson M, Gabriel S, Getz G (2010) Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. *Nat Rev Genet* 11:685–696
- Mok TS, Wu YL, Thongprasert S et al (2009) Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 361:947–957
- Nicholson AG, Gonzalez D, Shah P et al (2010) Refining the diagnosis and EGFR status of non-small cell lung carcinoma in biopsy and cytologic material, using a panel of mucin staining, TTF-1, cytokeratin 5/6, and P63, and EGFR mutation analysis. *J Thorac Oncol* 5:436–441
- Pao W, Girard N (2011) New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* 12:175–180
- Pirker R, Herth FJ, Kerr KM et al (2010) Consensus for EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer: results from a European workshop. *J Thorac Oncol* 5:1706–1713
- Rekhtman N, Brandt SM, Sigel CS et al (2011) Suitability of thoracic cytology for new therapeutic paradigms in non-small cell lung carcinoma: high accuracy of tumor subtyping and feasibility of EGFR and KRAS molecular testing. *J Thorac Oncol* 6:451–458
- Sasaki T, Rodig SJ, Chirieac LR et al (2010) The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 46:1773–1780
- Savic S, Tapia C, Grilli B et al (2008) Comprehensive epidermal growth factor receptor gene analysis from cytological specimens of non-small-cell lung cancers. *Br J Cancer* 98:154–160
- Scagliotti G, Brodowicz T, Shepherd FA et al (2011) Treatment-by-histology interaction analyses in three phase III trials show superiority of pemetrexed in nonsquamous non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 6:64–70
- Sigel CS, Moreira AL, Travis WD et al (2011) Subtyping of non-small cell lung carcinoma: a comparison of small biopsy and cytology specimens. *J Thorac Oncol* 6:1849–1856
- Soda M, Choi YL, Enomoto M et al (2007) Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 448:561–566
- Travis WD, Brambilla E, Noguchi M et al (2011) International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 6:244–285
- Wu M, Szporn AH, Zhang D et al (2005) Cytology applications of p63 and TTF-1 immunostaining in differential diagnosis of lung cancers. *Diagn Cytopathol* 33:223–227
- Zusman-Harach SB, Harach HR, Gibbs AR (1991) Cytological features of non-small cell carcinomas of the lung in fine needle aspirates. *J Clin Pathol* 44:997–1002

Aktuelle Video-Expertenrunden vom ASCO 2012 auf dem DKG-Internetportal

Die Jahrestagung der American Society for Clinical Oncology (ASCO) stand in diesem Jahr unter dem Motto „Collaborating to Conquer Cancer“. Mehr als 30.000 Krebspezialisten diskutierten in Chicago die neuesten Erkenntnisse aus der onkologischen Forschung und stellten somit die Weichen für den Einsatz neuer Krebstherapien. Für eine fachlich fundierte Bewertung der vorgestellten Daten trifft das Team des Internetportals der Deutschen Krebsgesellschaft e.V. (DKG) alljährlich mit namhaften Experten vor Ort zusammen. In Interviews, Expertenrunden und Berichten zu den wichtigsten Krebsarten gibt die Redaktion einen exzellenten und zeitnahen Überblick über den aktuellen Stand der Forschung und ihre Bedeutung für die klinische Praxis. Schwerpunktthemen bei den Video-Expertenrunden sind in diesem Jahr Lungenkarzinom, gastrointestinale Tumoren, gynäkologische Tumoren, Kopf-Hals-Tumoren, Nierenzellkarzinom und urologische Tumoren.

Ab sofort abrufbar unter www.krebsgesellschaft.de/asco_2012 sind darüber hinaus weitere Video-Interviews mit Experten sowie aktuelle Kongressberichte zu den Tumorentitäten Mammakarzinom (PD Dr. Diana Lüftner), Lungenkarzinom (PD Dr. Martin Reck), gastrointestinale Tumoren (Prof. Dirk Arnold, Prof. Florian Lordick), urologische Tumoren (Prof. Kurt Miller) und Hautkrebs (Prof. Jürgen Becker).

Quelle: Deutsche Krebsgesellschaft e.V., www.krebsgesellschaft.de