

University of Groningen

## De rol van moleculaire diagnostiek in het identificeren van patiënten die baat hebben bij TRK-remmer-therapie

van Kempen, L.; van Wezel, T.; Morreau, H.; Cohen, D; Timens, Wim; Willems, Stefan M.; Schuurung, Ed

*Published in:*  
Nederlands Tijdschrift voor Oncologie

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*  
Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*  
2020

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

### *Citation for published version (APA):*

van Kempen, L., van Wezel, T., Morreau, H., Cohen, D., Timens, W., Willems, S. M., & Schuurung, E. (2020). De rol van moleculaire diagnostiek in het identificeren van patiënten die baat hebben bij TRK-remmer-therapie. *Nederlands Tijdschrift voor Oncologie*, 17, 266-273.

### **Copyright**

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### **Take-down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

# De rol van moleculaire diagnostiek in het identificeren van patiënten die baat hebben bij TRK-remmer-therapie

Molecular diagnostics to track patients who are likely to benefit from TRK inhibitor therapy

dr. L.C. van Kempen<sup>1</sup>, dr. T. van Wezel<sup>2</sup>, prof. dr. H. Morreau<sup>3</sup>, dr. D. Cohen<sup>3</sup>, prof. dr. W. Timens<sup>4</sup>, prof. dr. S.M. Willems<sup>4</sup>, prof. dr. E. Schuurin<sup>5</sup>

## SAMENVATTING

Remmers van neurotrofe receptortyrosinekinase (TRK) fusie-eiwitten hebben een hoge therapeutische activiteit in verschillende solide tumortypen zoals papilair schildkliercarcinoom, longadenocarcinoom, gastro-intestinale stromatumoren, astrocytoom, en colorectaal carcinoom. Alleen patiënten met een bewezen genfusieproduct van een *NTRK*-gen komen in aanmerking voor behandeling met specifieke remmers. Daarmee is de therapie de facto tumortype-agnostisch. De lage frequentie van verschillende fusies van één van de drie *NTRK*-genen in veelvoorkomende tumoren,

maar hoge frequentie in zeldzame tumoren vraagt om een specifieke aanpak voor de routinematige analyse in de moleculaire diagnostiek. Hiervoor zijn verschillende methoden beschikbaar en staat de moleculaire diagnostiek voor een uitdaging om de detectie van *NTRK*-fusiegenen op een tijd- en kosteneffectieve manier in te voeren. De voor- en nadelen van de verschillende moleculaire technieken worden in dit artikel besproken en een strategie voor *NTRK*-fusiegenanalyse in de routine moleculaire diagnostiek wordt gepresenteerd.

(NED TIJDSCHR ONCOL 2020;17:266-73)

<sup>1</sup>klinisch moleculair bioloog in de pathologie, afdeling Pathologie en Moleculaire Biologie, Laboratorium voor Moleculaire Pathologie, Universitair Medisch Centrum Groningen, <sup>2</sup>klinisch moleculair bioloog in de pathologie, afdeling Pathologie, Leids Universitair Medisch Centrum, en afdeling Pathologie Nederlands Kanker Instituut/Antoni van Leeuwenhoek, <sup>3</sup>patholoog, afdeling Pathologie, Leids Universitair Medisch Centrum, <sup>4</sup>patholoog, afdeling Pathologie en Moleculaire Biologie, Universitair Medisch Centrum Groningen, <sup>5</sup>senior klinisch moleculair bioloog in de pathologie, afdeling Pathologie en Moleculaire Biologie, Laboratorium voor Moleculaire Pathologie, Universitair Medisch Centrum Groningen.

Correspondentie graag richten aan: dhr. dr. L.C. van Kempen, klinisch moleculair bioloog in de pathologie, afdeling Pathologie en Moleculaire Biologie, Laboratorium voor Moleculaire Pathologie, Universitair Medisch Centrum Groningen, Hanzeplein 1, 9713 GZ Groningen, tel.: 050 361 51 29, e-mailadres: l.van.kempen@umcg.nl

Belangenconflict/financiële ondersteuning: LCVK ontvangt financiële ondersteuning (betaald aan UMCG) voor adviesraad/spreker van Bayer, Amgen, nanoString Technologies, Merck, AstraZeneca, Pfizer, en onderzoek van Roche en nanoString Technologies. Voor de huidige bijdrage geen financiële ondersteuning ontvangen. TVW is lid van de adviesraad van Bayer. HM is adviseur voor GenomeScan Leiden. WT ontvangt financiële ondersteuning (betaald aan UMCG) voor adviesraad/spreker van Roche-Ventana, Pfizer, MSD/Merck en BMS. Voor de huidige bijdrage geen financiële ondersteuning ontvangen. SMW ontvangt financiële ondersteuning van Roche, MSD, Pfizer, AstraZeneca, Bayer, Amgen en Nextcure. ES ontvangt financiële ondersteuning (betaald aan UMCG) voor adviesraden/consulting van AstraZeneca, Amgen, Roche, Pfizer, Novartis, MSD/Merck, Bayer, BMS, BioCartis, Illumina, Agena Bioscience, Janssen Cilag (Johnson & Johnson) en Diaceutics; sprekershonoraria van Bio-Rad, Novartis, Roche, Biocartis, Agena Bioscience, Illumina, Pfizer en AstraZeneca; en 'unrestricted research grants' van Abbott, Pfizer, Biocartis, BMS, Bio-Rad, Roche, Agena Bioscience, CC Diagnostics en Boehringer Ingelheim. Voor de huidige bijdrage geen financiële ondersteuning ontvangen.

**Trefwoorden:** moleculair diagnostische methoden, *NTRK*/TRK, tumortype-agnostische doelgerichte therapie

**Keywords:** molecular diagnostic methods, *NTRK*/TRK, tumor type agnostic targeted therapy

ONTVANGEN 17 JUNI 2020, GEACCEPTEERD 10 SEPTEMBER 2020.

## SUMMARY

Inhibitors of fusion proteins involving the kinase domain of the neurotrophic receptor tyrosine kinase (TRK) have a high therapeutic value in different solid cancer types, such as papillary thyroid carcinoma, gastrointestinal stromal tumors, astrocytoma and colorectal carcinoma. Patients are eligible for TRK-targeted therapies only when a fusion of one of the three *NTRK* genes can be demonstrated. As such, treatment is de-

facto tumor type agnostic. The low frequency of a *NTRK* fusion event in common cancers and high frequency in certain rare cancers creates a challenge for molecular pathology laboratories to implement *NTRK* testing in a time- and cost-efficient manner. The pros and cons of the different methodologies to demonstrate a *NTRK* fusion will be discussed and a strategy for *NTRK* testing in a routine diagnostic setting presented.

## INLEIDING

Fase 1/2-studies met larotrectinib (Vitrakvi®, Array BioPharma/Loxo Oncology) laten veelbelovende resultaten zien voor doelgerichte therapie voor volwassenen en kinderen met lokaal gevorderde of gemetastaseerde solide tumoren met een neurotrofe receptortyrosinekinase (*NTRK*)-fusiegen na eerdere standaardtherapie of indien geen andere adequate therapie beschikbaar is.<sup>1,2</sup> Veelbelovende resultaten zijn ook gezien in onderzoeken met entrectinib (Rozlytrek®, Roche) in dezelfde patiëntenpopulatie.<sup>3</sup> De doelgerichte TRK-remmers geven een consistent beeld van effectieve antitumoractiviteit ongeacht tumorhistologie (o.a. papillair schildklier-carcinoom, longadenocarcinoom, gastro-intestinale stromatumoren, astrocytoma, colorectaal carcinoom), leeftijd en het type *NTRK*-fusie. De behandeling met tyrosinereceptor-kinase (TRK)-remmers is dus tumortype agnostisch, maar waarbij de aanwezigheid van een *NTRK*-fusiegen leidend is.<sup>4</sup> In Nederland zijn deze doelgerichte middelen vooralsnog alleen beschikbaar in een klinische trial, maar wordt binnenkort een uitspraak verwacht over hun toepassing in de reguliere zorg.

In dit artikel wordt besproken welke testen beschikbaar zijn om patiënten te kunnen selecteren die in aanmerking komen voor behandeling met doelgerichte middelen tegen een TRK-fusie-eiwit en wat dit betekent voor de moleculaire diagnostiek van solide tumoren in Nederland.

## *NTRK*

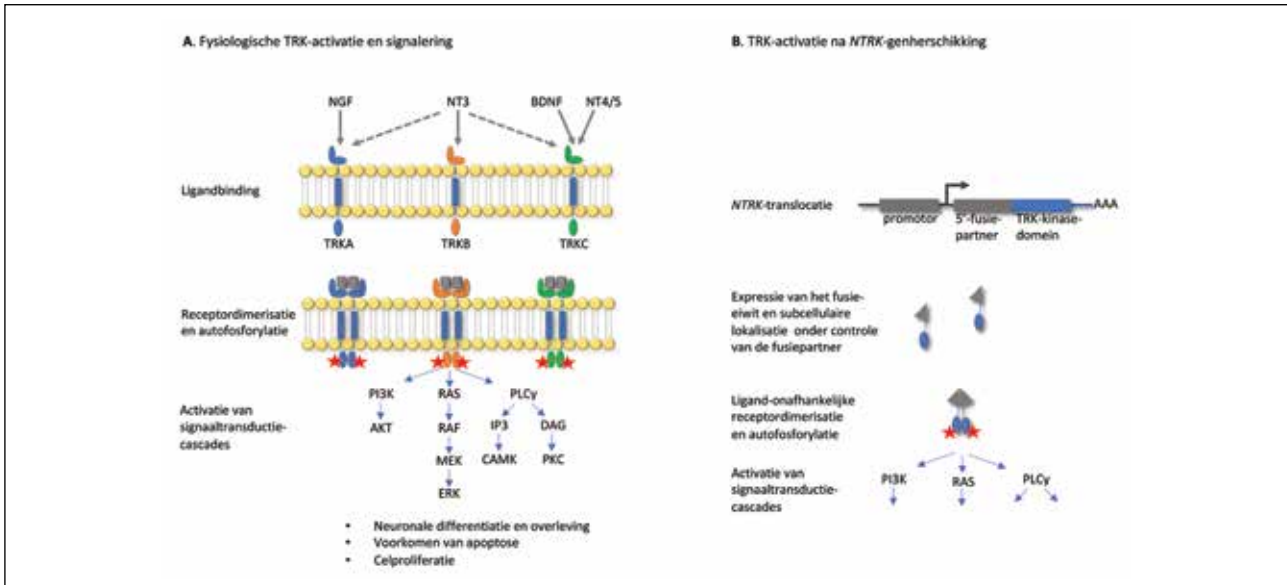
*NTRK* is niet één gen, maar een verzamelnaam voor drie verschillende genen, te weten *NTRK1* (chromosoom (chr) 1q23.1), *NTRK2* (chr 9q21.33) en *NTRK3* (chr 15q25.3) die coderen voor homologe kinases, respectievelijk TRKA, TRKB en TRKC.<sup>5</sup> In normaal weefsel komen deze receptoren sterk tot expressie op het celmembraan van neuronen, gliale cellen en vasculair endotheel. De receptoren hebben een hoge affiniteit voor de liganden BDNF, NGF, NT3, NT4 en NT5.<sup>6,7</sup> Ligandbinding resulteert in receptoractivatie en het aanschakelen van de onderliggende signaaltransductie (zie *Figuur 1A*).

Activatie van fosfoinositide 3-kinase/proteïne-kinase B (PI3K/AKT), RAS/'mitogen-activated protein kinase' (MAPK), en fosfolipase C-gamma (PLC $\gamma$ )-signalering is belangrijk voor de differentiatie en maturatie van het centrale en perifere zenuwstelsel. Als zodanig komen deze drie signaleringsroutes in vele lichaamcellen (en vele tumoren) voor en spelen een rol bij regulering van de celdeling en bij vele activatieprocessen. Dit maakt TRK een aantrekkelijk eiwit voor doelgerichte therapie.

## *NTRK*-FUSIEGENEN

Door structurele verandering in het genoom van een tumor kan het gebeuren dat het gedeelte van een *NTRK*-gen dat codeert voor het kinasedomein fuseert met een ander gen (de fusiepartner). Wanneer de fusiepartner voor een eiwit met een dimerisatie/oligomerisatiedomein codeert, dan kan dit resulteren in kinaseactiviteit van TRK (zie *Figuur 1B*). TRK-activatie is dan ligand-onafhankelijk geworden, omdat dimerisatie nu spontaan ontstaat via het dimerisatiedomein van de fusiepartner. Daarnaast komt het fusiegen onder controle van de promotor van de fusiepartner te staan. Hierdoor komt het kinasedomein van TRK tot expressie in cellen waarin het normaliter niet tot expressie komt. Deze constitutieve expressie en activatie van het TRK-fusie-eiwit is geassocieerd met tumorgroei.

Er zijn meer dan 80 verschillende *NTRK*-fusiepartners geïdentificeerd in meer dan 20 verschillende kankertypen.<sup>8</sup> In een aantal laagfrequent voorkomende tumoren komt een *NTRK*-fusie vaak voor (zie *Tabel 1*, pagina 269). In veelvoorkomende tumoren zoals het niet-kleincellig longcarcinoom (NSCLC) zijn *NTRK*-fusies echter zeldzaam, maar blijkt de doelgerichte therapie effectief.<sup>1,3</sup> Ondanks het ontbreken van gerandomiseerde klinische studies is op basis hiervan recentelijk de Nederlandse richtlijn voor de behandeling van stadium IIIb/IV NSCLC aangepast en omvat nu de analyse voor *NTRK*-fusiegenanalyse ten behoeve van therapiekeuze.<sup>9</sup> Er zijn verschillende technieken beschreven, met elk hun voor- en nadelen, om *NTRK*-fusiegenen te detecteren.



**FIGUUR 1.** TRK-activatie en signalering.

**A.** Onder fysiologische omstandigheden komt TRKA, TRKB of TRKC tot expressie op het oppervlak van een cel waar ligand-geïnduceerde receptordimerisatie en signaaltransductie plaatsvindt. **B.** Indien sprake is van een pathogene *NTRK*-translocatie, dan is het TRK-kinasedomein gefuseerd met (deel van) een eiwit dat ligand-onafhankelijk kan dimeriseren. De expressie van het niet-membraan-gebonden fusie-eiwit staat onder controle van de promotor van de fusiepartner.

**TRK-IMMUUNHISTOCHEMIE**

Een *NTRK*-genfusie zorgt voor hoge expressie van het TRK-fusie-eiwit. Dit eiwit kan worden aangetoond door middel van immunohistochemie. Omdat onder normale omstandigheden in de meeste (tumor)cellen geen TRK-eiwit tot expressie komt, kan TRK-expressie een aanwijzing zijn voor de aanwezigheid van een *NTRK*-fusie. Helaas blijkt dit in de praktijk niet zo eenvoudig en zitten er belangrijke haken en ogen aan de TRK-immunohistochemische test:

- Ventana’s pan-TRK-antilichaam (Roche, EPR17341) is momenteel de enige immunohistochemische test met een CE-IVD-label voor TRK-expressieanalyse.<sup>10</sup> De algehele sensitiviteit van deze TRK-detectie is 88%, maar met verschillen in de detectie voor *NTRK1*-, *NTRK2*- en *NTRK3*-fusies: 96% (26/27), 100% (5/5) en 79% (27/34).<sup>11</sup> In een tweede grote studie met hetzelfde antilichaam is de gerapporteerde algehele sensitiviteit lager (75%) met slechts 45% sensitiviteit voor de immunohistochemische detectie van *NTRK3*-fusies.<sup>12</sup> Inclusie van een interne controle voor de beoordeling van TRK-expressie (bijv. endotheliale cellen) is belangrijk om vals-negatieve TRK-aankleuring uit te sluiten als gevolg van bijvoorbeeld artefacten in de monstervoorbereiding. Daarnaast wordt kleuring van cerebellum of appendix aanbevolen ter controle op een goede uitvoering van de test.
- Naast het mogelijk missen van *NTRK*-fusies via de detectie van eiwitexpressie kan de immunohistochemie geen

onderscheid maken tussen wildtype TRK en een TRK-fusie-eiwit. Het antilichaam is gericht tegen een geconserveerd domein van wildtype TRKA, TRKB en TRKC dat ook deel is van het fusie-eiwit. Daarnaast hebben tumoren van neuro-endocriene origine vaak een hoge fysiologische expressie van wildtype TRK in de afwezigheid van een *NTRK*-fusie.

- Immunohistochemische aankleuringspatronen van wildtype TRK en TRK-fusie-eiwitten met membraneuze, cytoplasmatische en kernaankleuring of een combinatie daarvan zijn op dit moment nog niet goed in kaart gebracht. Verschillen in aankleuringsintensiteit en subcellulaire lokalisatie van TRK zouden een aanwijzing kunnen zijn voor het type *NTRK*-fusie, hoewel het aantal onderzoeken hiernaar beperkt is.<sup>13,14</sup>

Omdat alleen tumoren met een *NTRK*-fusie responderen op doelgerichte behandeling met TRK-remmers, geeft de ‘European Society for Medical Oncology’ (ESMO)-richtlijn aan dat aanvullend moleculair onderzoek noodzakelijk is om een mogelijke *NTRK*-fusie op basis van de eiwitexpressie te bevestigen.<sup>15</sup>

**VERSCHILLENDE MOLECULAIRE METHODEN VOOR HET AANTONEN VAN EEN *NTRK*-FUSIE**

Een *NTRK*-fusie kan op verschillende manieren worden aangetoond in formaline-gefixeerd en paraffine-ingebied weefsel,

**TABEL 1.** Voorbeelden van de prevalentie van NTRK-fusiegenen in verschillende maligniteiten.

Tumortype	NTRK	Frequentie NTRK-fusie (%)	Meest voorkomende fusiepartner
'Mammary analogue secretory cancers' (MASC) van de speekselklier	<i>NTRK3</i>	75-100	<i>ETV6</i>
Secretair mammacarcinoom	<i>NTRK3</i>	67-100	<i>ETV6</i>
Congenitaal infantiel fibrosarcoom	<i>NTRK3</i>	50-96	<i>ETV6, TMP3, LMNA, EML4</i>
Congenitaal mesoblastische nefroom	<i>NTRK3</i>	20-92	<i>ETV6</i>
Papillair thyroïdcarcinoom	<i>NTRK1</i>	2-26	<i>TGF</i>
Spitzoïd neoplasme	<i>NTRK1</i> <i>NTRK3</i>	15 2	<i>LMNA, TP53</i> <i>ETV6</i>
Cholangiocarcinoom (intrahepatisch)	<i>NTRK1</i>	4	<i>RABGAP1L</i>
GIST	<i>NTRK3</i>	3	<i>ETV6</i>
Astrocytoom	<i>NTRK2</i>	3	<i>NACC2, QKI</i>
CRC	<i>NTRK1</i>	0,2-3	<i>TPM3</i>
NSCLC	<i>NTRK1</i>	0,1-3	<i>CD74, TPM3, TRIM24, MPRIP</i>
Glioblastoom	<i>NTRK1</i>	0,6-1,5	<i>BCAN</i>
Hoofd-hals-plaveiselcelcarcinoom	<i>NTRK2</i>	0,5	<i>PAN2</i>

zoals DNA-in-situ-hybridisatie, RT-PCR, NGS zowel op DNA als RNA, alsook RNA-'capture'.<sup>8,11,16,17</sup>

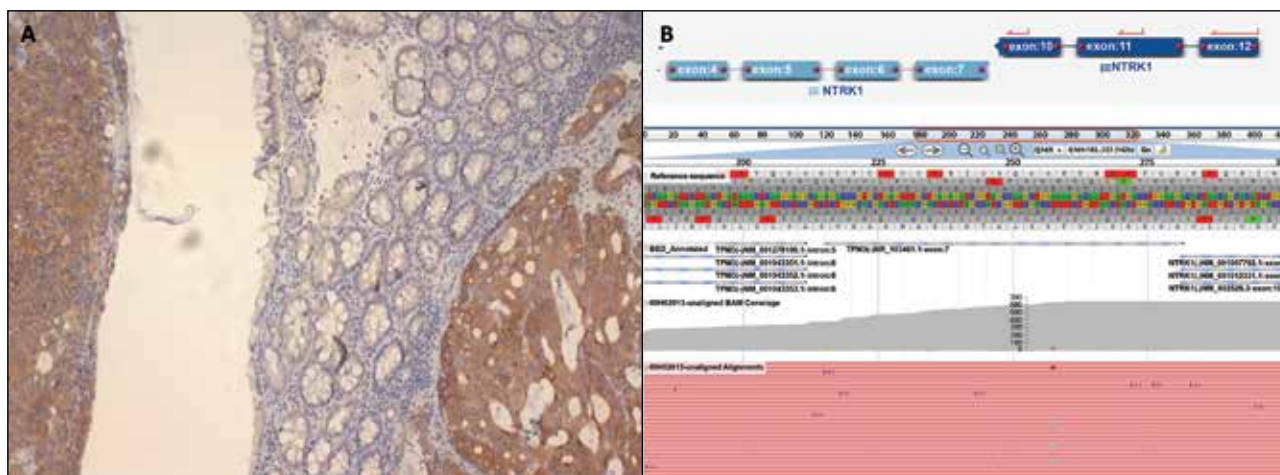
### NTRK-DNA-IN-SITU-HYBRIDISATIE

DNA-in-situ-hybridisatie met fluorescente probes (FISH) is een klassieke manier om genherschikking op DNA-niveau in celkernen aan te tonen. Deze herrangschikkingen kunnen worden aangetoond met zogenoemde 'break-apart FISH probes'. Om een breuk in de drie *NTRK*-genen aan te tonen, moeten drie verschillende FISH-experimenten worden uitgevoerd met commercieel verkrijgbare of in-huis ontworpen FISH-probes die de breukpunten flankeren. Deze FISH-experimenten kunnen worden uitgevoerd na een positieve TRK-immunohistochemie.<sup>18</sup> Segregerende FISH-patronen zijn karakteristiek voor een breuk in een *NTRK*-gen, maar deze onthullen niet met welk partner-gen het *NTRK*-kinasedomein gefuseerd is, en ook niet of dit resulteert in de expressie van een TRK-fusie-eiwit indien ook wildtype TRK kan worden aangetoond in de immunohistochemie. Om een specifiek fusiegen aan te tonen zal een specifieke FISH voor het fusieproduct moeten worden

uitgevoerd. Met de meer dan 80 bekende *NTRK*-fusies is validatie van al deze FISH-probes in een diagnostische setting onhaalbaar.<sup>8</sup> Daarnaast is deze methode relatief duur, vergt veel tijd en expertise, en is vaak door de beperkte beschikbaarheid van weefsel onmogelijk. Indien meerdere FISH-analyses moeten worden uitgevoerd, dan heeft dit daarnaast een groot negatief effect op de doorlooptijd.

### NTRK-FUSIESPECIFIEKE RT-PCR (RNA)

Met behulp van een reverse transcriptase-PCR (RT-PCR)-reactie kunnen specifieke mRNA-transcripten worden aangetoond. Dit vereist kennis van de mogelijke fusies van *NTRK* en hun partner-genen, omdat voor dit type experimenten het specifieke fusietranscript wordt geamplificeerd. De complexiteit van dit soort experimenten is vergelijkbaar met het ontwerpen en valideren van FISH-probes voor alle bekende fusies. In tegenstelling tot FISH kan met de RT-PCR wel de expressie van het *NTRK*-fusiegen op transcriptniveau worden aangetoond. Door de hoge complexiteit van alle mogelijke fusietranscripten is *NTRK*-RT-PCR niet geschikt voor routinediagnostiek.



**FIGUUR 2.** TRK-immuun-positief colorectaal carcinoom met een *TPM3:NTRK1*.

**A.** Sterke cytoplasmatische TRK-expressie in een colorectaal carcinoom (EPR17341-antilichaam). **B.** RNA-analyse met behulp van Archer's FusionPlex-test toont een fusie aan tussen *TPM3*-exon en *NTRK1*-exon 10.

### 'NEXT-GENERATION SEQUENCING' (DNA EN RNA)

Op DNA gebaseerde op fusieproduct-gerichte 'next generation sequencing'-methoden met 'targeted panels' kunnen worden gebruikt om fusies tussen *NTRK* en hun partners aan te tonen zonder het exacte breukpunt vooraf te weten.<sup>19</sup> De huidige commercieel verkrijgbare testen zijn met name gericht op de meest voorkomende *NTRK1*-fusiegenen. Omdat de breuken in de intronen over grote afstanden verspreid liggen, is de kans op een vals-negatief *NTRK*-resultaat reëel. Ook met WGS kunnen deze intron-breuken worden gedetecteerd.<sup>20</sup> Een WGS-analyse vereist echter een grote hoeveelheid, hoog kwalitatief genomisch DNA dat niet uit het beschikbare formaline-gefixeerde weefsel kan worden geïsoleerd en waarvoor dus vriesmateriaal nodig is. In plaats van de analyse van genherschikkingen in het genomisch DNA kan ook een fusieproduct-doelgerichte sequentieanalyse van het tot expressie komende RNA, inclusief *NTRK*-fusiegentranscripten worden uitgevoerd. Deze techniek heeft als voordeel dat fusiegenen die daadwerkelijk tot expressie komen worden geanalyseerd. Verschillende commerciële panels zijn verkrijgbaar gebaseerd op verschillende methoden, onder andere LifeTechnology's OncoPrint-panel, Illumina's TSO170/500 and Archer's FusionPlex.<sup>21</sup> Een dergelijke test vereist geen kennis van de fusiepartner en veronderstelt alle mogelijke fusies te kunnen detecteren, hoewel een recente analyse aanzienlijke verschillen in de 'performance'-karakteristieken aantoonde.<sup>22</sup> Ook deze analyses vereisen een relatief grote hoeveelheid RNA. Analyse-'tools' die door de leveranciers van de test beschikbaar zijn gemaakt, zijn in het algemeen gebruiksvriendelijk, maar weinig flexibel. Het laboratorium moet

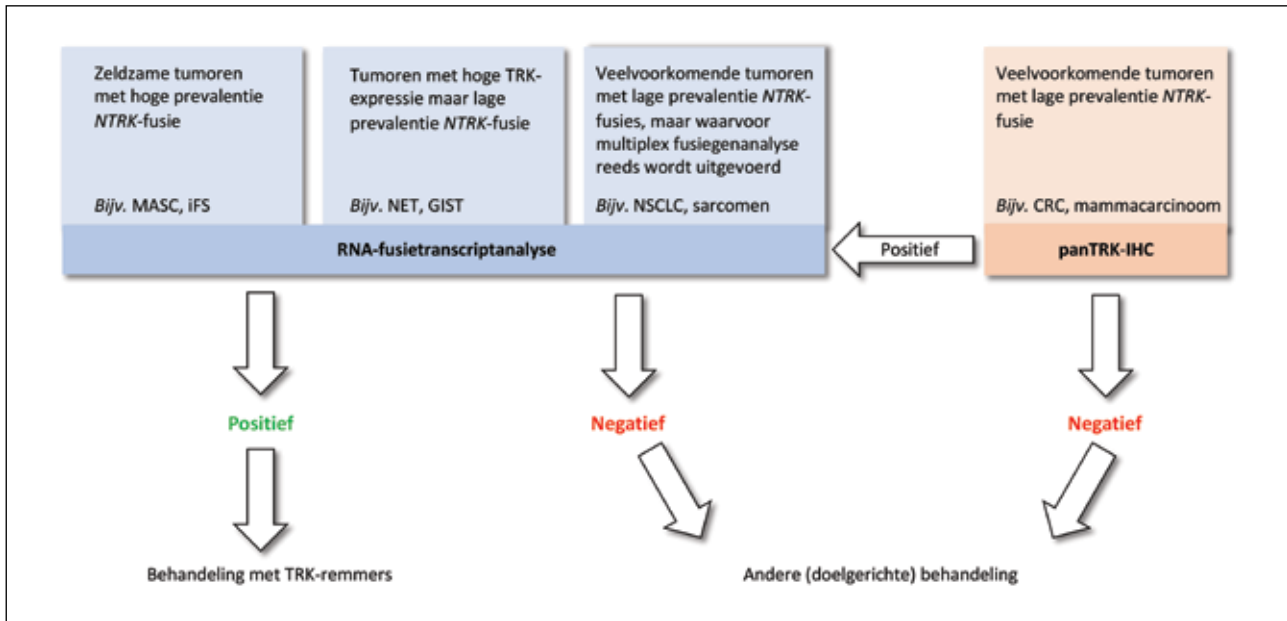
over de specifieke expertise beschikken voor uitvoering en interpretatie van de RNA-analyses om de onderliggende data te begrijpen.

### 'HYBRID CAPTURE' (RNA)

De 'hybrid capture'-technologie van nanoString is een PCR- en NGS-onafhankelijke methode die gebruikmaakt van gelabelde probes die kunnen hybridiseren met een specifiek *NTRK*-transcript.<sup>22-24</sup> In één reactie kunnen tot 800 verschillende transcripten, inclusief specifieke fusietranscripten worden aangetoond. Dit vereist wel kennis van alle mogelijke fusietranscripten die tot expressie zouden komen. Behalve deze specifieke fusietranscripten kunnen met behulp van probes die de bekende breukpunten in de *NTRK*-genen flankeren, aanwijzingen worden verkregen voor de expressie van het 3'-deel van *NTRK* zonder expressie van het 5'-deel. Een dergelijke onbalans is indicatief voor de expressie van een *NTRK*-fusietranscript ook al is de fusiepartner niet te identificeren. In tegenstelling tot de op NGS gebaseerde methode is voor een nanoString-analyse geen cDNA-synthese, geen 'library prep' en geen amplificatie noodzakelijk. Dit resulteert in een snellere doorlooptijd en relatief lagere kosten, maar de fusiepartner kan dan niet altijd worden geïdentificeerd.

### STRATEGIE VOOR HET AANTONEN VAN *NTRK*-FUSIES

De huidige richtlijnen in Nederland geven niet aan op welke manier een *NTRK*-fusie moet worden aangetoond en welke methode het meest optimaal en kosteneffectief is. De implementatie van *NTRK*-fusiegedetectie is een uitdaging vanwege de lage prevalentie van deze fusiegenen in hoogvolu-



**FIGUUR 3.** Strategie voor het aantonen van *NTRK*-fusies.

Immuunhistochemische voorselectie van TRK-positieve monsters is alleen kosteneffectief voor die tumortypen waarin de frequentie van *NTRK*-fusies laag is en waarvoor momenteel geen op RNA gebaseerde test routinematig wordt uitgevoerd.

metumoren zoals NSCLC (0,02-0,3% *NTRK1*-fusiepositief) of juist een hoge prevalentie van *NTRK*-fusies in relatief zeldzame tumoren zoals bijvoorbeeld in een subgroep van speekselkliertumoren (zoals MASC, 60-75% *NTRK3*-fusiepositief) (zie Tabel 1).

Verschillende, maar grotendeels overlappende strategieën voor het bepalen van een *NTRK*-fusie in diverse tumortypen zijn recentelijk voorgesteld.<sup>8,15,21,25-27</sup> De inbedding van *NTRK*-analyse in een laboratorium voor moleculaire diagnostiek wordt bepaald door meerdere factoren. Bijvoorbeeld: kan de detectie van *NTRK*-fusies relatief eenvoudig worden toegevoegd aan het testpanel als onderdeel van een reeds bestaande test om het effect op doorlooptijd te minimaliseren, is de expertise en nodige infrastructuur aanwezig, en is het aantal te analyseren 'samples' groot genoeg voor een kosten- en tijd-effectieve analyse? Hoewel immuunhistochemie met behulp van het EPR17341 pan-TRK-antilichaam een attractieve manier is om als eerste stap alle 'samples' te screenen, resulteert dit voor de meeste cases in een negatieve uitslag (bijv. in NSCLC). Als oplossing zou de detectie van *NTRK*-fusies kunnen worden opgenomen in hetzelfde testpanel waarmee andere RNA-gebaseerde predictieve markers voor NSCLC zoals *ALK*-, *ROS1*- en *RET*-fusietranscripten en *MET*-exon 14-skippen reeds standaard worden bepaald.

Anderzijds wordt voor colorectale tumoren geen standaard op RNA-gebaseerde fusieanalyse uitgevoerd en kan hier wel screening via immuunhistochemie een mogelijkheid zijn, temeer omdat in de meeste aanvragen voor de molecu-

laire analyse van colorectale tumoren de hoeveelheid beschikbaar weefsel geen probleem is. De immuunhistochemisch verkregen aanwijzing voor een *NTRK*-fusie dient dan wel te worden bevestigd met een aanvullende moleculaire analyse (zie Figuur 2, pagina 270). Immuunhistochemische testen zijn echter nooit 100% sensitief en kunnen derhalve resulteren in een fout-negatieve uitslag. Op basis van beperkt beschikbare gegevens betekent dit bijvoorbeeld voor colorectale carcinomen waarin een *NTRK1*-fusie voorkomt in 0,3-3% van de cases (zie Tabel 1), en met een 96% sensitiviteit van het antilichaam om het TRK-A-eiwit aan te tonen, dat in de voorscreening naar schatting 0,01-0,1% van alle cases onterecht als TRK-negatief wordt afgegeven. In het algemeen wordt een dergelijk laag percentage gemiste diagnoses geaccepteerd in de context van de vaak beperkt beschikbare financiële ruimte in de pathologie. Voorscreening lijkt hiermee verantwoord bij de diagnose colonkanker. Verder onderzoek zal de daadwerkelijke prevalentie van *NTRK*-fusies en sensitiviteit van het antilichaam per tumortype moeten aantonen. Wanneer geen IHC wordt gebruikt voor de voorselectie zouden CRC-cases voor *NTRK*-analyse kunnen worden beperkt tot die cases zonder oncogene mutatie in bijvoorbeeld *KRAS* of *BRAF*.<sup>28</sup> Daarnaast zijn er aanwijzingen dat de te testen groep mogelijk verder kan worden beperkt tot de microsatelliet-instabiele tumoren met *MLH1*-promotor-hypermethylatie.<sup>29</sup>

Voor zeldzame tumoren met hoge prevalentie van *NTRK*-fusies (bijv. congenitaal infantiel fibrosaroom) heeft de di-

## AANWIJZINGEN VOOR DE PRAKTIJK

- 1** Het *NTRK*-fusiegen moet zijn aangetoond voordat een patiënt met kanker kan worden behandeld met TRK-remmers.
- 2** Detectie van TRK-expressie met behulp van immunohistochemie is geen alternatief voor een moleculaire analyse.
- 3** Optimaal en kosteneffectief testen van *NTRK*-fusies is tumortype-afhankelijk als gevolg van de grote verschillen in het voorkomen van *NTRK*-fusies én de prevalenties van verschillende tumortypen.
- 4** De dure hoogcomplexere moleculaire testen voor *NTRK*-fusiedetectie dienen te worden beperkt tot enkele expertisecentra.

recte moleculaire analyse op alle cases de voorkeur, met name vanwege de lage sensitiviteit van het antilichaam om TRK-C aan te tonen (45-79%).

Een vierde categorie zijn tumoren zoals neuro-endocriene tumoren (NET) en gastro-intestinale stromatumoren (GIST) die in het algemeen ook zonder *NTRK*-fusiegen al een hoge expressie van TRK laten zien, waardoor het TRK-fusie-eiwit niet te onderscheiden is van endogene expressie. Voor die tumoren wordt detectie van *NTRK*-fusietranscripten zonder voorafgaande immunohistochemie aanbevolen (zie *Figuur 3*).

### TRK/NTRK-TESTEN IN NEDERLAND

De aankleuring en interpretatie van TRK-expressie in verschillende tumortypen is momenteel nog niet eenduidig en vereist een gedegen validatie.<sup>11-13</sup> Evaluatie van immunohistochemische aankleuringen is het domein van de patholoog. Omdat de interpretatie van een TRK-aankleuring nog geen onderdeel van de routinediagnostiek is, is vergelijkbaar met de introductie van de PD-L1-immunohistochemie training in het herkennen van specifieke TRK-aankleuring gewenst. Doordat het aantal TRK-positieve cases heel erg laag is, is het raadzaam om in eerste instantie regionale afspraken te maken over waar de immunohistochemische analyse wordt gevalideerd en uitgevoerd, waarna een gestandaardiseerd protocol in een volgend stadium zou kunnen worden uitgebreid naar andere regionale laboratoria.

De analyse van *NTRK*-fusiegenen vereist een grotere expertise, infrastructuur en aanschaf van apparatuur en reagentia die gepaard gaan met hoge kosten voor een relatief klein aantal immunohistochemisch-positieve cases. Een kosteneffectieve moleculaire analyse kan daarom alleen plaatsvinden wanneer goede regionale afspraken worden gemaakt over waar deze analyses worden uitgevoerd. In tegenstelling tot immunohistochemie die heel goed uitvoerbaar is in de meeste pathologielaboratoria, zal de moleculaire *NTRK*-genfusie-

analyse wel beperkt blijven tot enkele pathologielaboratoria met uitgebreide expertise in NEN-EN-ISO-15189-gecertificeerde RNA-testen in Nederland. Juist door regionale samenwerking kunnen goede afspraken worden gemaakt voor het uitvoeren van een optimale TRK/*NTRK*-analyse. Voor vergoeding van deze testen moeten echter nog wel afspraken worden gemaakt met de Nederlandse Zorgautoriteit en zorgverzekeraars. Hoewel de kosten voor een *NTRK*-analyse relatief laag zijn in verhouding tot de absoluut hoge kosten van de behandeling van een patiënt met een TRK-remmer, leidt het testen van grote aantallen patiënten om die zeldzame *NTRK*-fusiegen-positieve patiënt op te sporen juist tot hele hoge kosten voor de (moleculaire) pathologie. Vergoeding van een regionaal georganiseerde diagnostische test zou een 'sine qua non' moeten zijn.

### CONCLUSIE

Op basis van de huidige resultaten beveelt de ESMO-richtlijn aan *NTRK*-fusiegenanalyse op te nemen in het moleculaire diagnostiekportfolio van solidetumortesten.<sup>15</sup> Afhankelijk van het tumortype kan voorselectie door middel van een immunohistochemische analyse met het CE-IVD-goedgekeurde pan-TRK-antilichaam plaatsvinden. Indien TRK-positief, dan moet de *NTRK*-fusie op moleculair niveau worden bevestigd, bij voorkeur met een RNA-gebaseerde detectiemethode. Geen van de hier beschreven moleculaire analyses heeft momenteel een CE-IVD-label. Op dit moment is een NEN-EN-ISO-15189-gecertificeerd laboratorium vrij om een lokaal gevalideerde moleculaire test te implementeren. Gezien de complexiteit en de hoge kosten van de test en het relatief lage aantal *NTRK*-fusiegentesten heeft het de voorkeur om de RNA-gebaseerde *NTRK*-fusiegenanalyse te beperken tot enkele centra. Een uitzondering is het testen van longkanker, omdat de detectie van *NTRK*-fusies kan worden meegenomen in de multiplex RNA-analyse van andere pre-



dictieve markers (zoals *RET*, *ROSI*, *ALK* en *MET*-exon 14-skipping). Er is nog geen vergoeding voor *TRK/NTRK*-testen en deze moet met de introductie van de doelgerichte *TRK*-remmers snel worden geregeld.

## REFERENTIES

1. Drlon A, et al. *N Engl J Med* 2018;22:378:731-9.
2. Laetsch TW, et al. *Lancet Oncol* 2018;19:705-14.
3. Doebele RC, et al. *Lancet Oncol* 2020;21:271-82.
4. [https://www.global-expertsfoundation.com/files/Publications/Consensus\\_Rapport\\_Diagnostiek\\_en\\_Behandeling\\_van\\_NTRK-Genfusie\\_Gerelateerde\\_Solide\\_Tumoren\\_14022020.pdf](https://www.global-expertsfoundation.com/files/Publications/Consensus_Rapport_Diagnostiek_en_Behandeling_van_NTRK-Genfusie_Gerelateerde_Solide_Tumoren_14022020.pdf), bezocht op 19 augustus 2020.
5. Amatu A, et al. *ESMO Open* 2016;1:1-9.
6. Nakagawara A. *Cancer Letters* 2001;169:107-14.
7. Vaishnavi A, et al. *Cancer Discov* 2015;5:25-34.
8. Hsiao SJ, et al. *J Mol Diagn* 2019;21:553-71.
9. [https://richtlijnendatabase.nl/richtlijn/niet\\_kleincellig\\_longcarcinoom/startpagina\\_-\\_niet\\_kleincellig\\_longcarcinoom.html](https://richtlijnendatabase.nl/richtlijn/niet_kleincellig_longcarcinoom/startpagina_-_niet_kleincellig_longcarcinoom.html), bezocht op 19 augustus 2020.
10. Hechtman JF, et al. *Am J Surg Pathol* 2017;41:1547-51.
11. Solomon JP, et al. *Cancer Res* 2019;79:3163-8.
12. Gatalica Z, et al. *Mod Pathol* 2019;32:147-53.
13. Solomon JP, et al. *Mod Pathol* 2020;33:38-46.
14. Wong D, et al. *Pathology* 2020;52:401-9.
15. Marchiò C, et al. *Ann Oncol* 2019;30:1417-7.
16. Wong D, et al. *Pathol Oncol Res* 2020;26:1385-99.
17. Kirchner M, et al. *Genes Chromosomes Cancer* 2020;59:445-53.
18. Suurmeijer AJ, et al. *Genes Chromosomes Cancer* 2019;58:739-46.
19. Hyman DM, et al. *Drug Discov Today* 2015;20:1422-8.
20. Haller F, et al. *J Pathol* 2016;238:700-10.
21. Pfarr N, et al. *Genes Chromosomes Cancer* 2020;3:178-88.
22. Chang KTE, et al. *J Mol Diagn* 2018;20:63-77.
23. Guerreiro Stucklin AS, et al. *Nat Commun* 2019;10:4343.
24. Song W, et al. *Genes Chromosomes Cancer* 2020;59:318-24.
25. Albert CM, et al. *J Clin Oncol* 2019;37:513-24.
26. Penault-Llorca F, et al. *J Clin Pathol* 2019;72:460-7.
27. Mateo J, et al. *Ann Oncol* 2018;29:1895-902.
28. Yoshino T, et al. *Ann Oncol* 2020;31:861-72.
29. Cocco E, et al. *Cancer Res* 2019;79:1047-53.