

# ROS1-Translokationen im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom

## ROS1-Translocations in Non-Small Cell Lung Cancer

### Autoren

A. Warth<sup>1,3</sup>, W. Weichert<sup>1</sup>, M. Reck<sup>2,4</sup>, N. Reinmuth<sup>2,4</sup>

### Institute

<sup>1</sup> Institut für Pathologie, Universität Heidelberg

<sup>2</sup> LungenClinic Großhansdorf, Abteilung für Thoraxonkologie

<sup>3</sup> Translational Lung Research Center Heidelberg, Mitglied des Deutschen Zentrums für Lungenforschung (DZL)

<sup>4</sup> Airway Research Center North, Mitglied des Deutschen Zentrums für Lungenforschung (DZL)

eingereicht 22.4.2015  
akzeptiert nach Revision  
19.5.2015

### Bibliografie

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0034-1392446>  
Pneumologie 2015; 69: 477–482  
© Georg Thieme Verlag KG  
Stuttgart · New York  
ISSN 0934-8387

### Korrespondenzadresse

**PD Dr. med. Niels Reinmuth**  
Abteilung für Thorakale  
Onkologie  
LungenClinic Großhansdorf  
Wöhrendamm 80  
22927 Großhansdorf  
[n.reinmuth@lungenclinic.de](mailto:n.reinmuth@lungenclinic.de)

### Zusammenfassung



**Ziel:** Zusammenfassung von Prävalenz, Testung und möglichen Behandlungsansätzen bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) und Aktivierung von ROS1.

**Methodik:** Internet-Recherche bezüglich klinischer und präklinischer Studien sowie Suche nach aktuellen Studien in amerikanischen Datenbanken.

**Ergebnisse:** Translokationen von ROS1 können zu einer Überexpression des Rezeptors führen und werden bei ungefähr 1–2% aller NSCLC mit ganz überwiegender Prävalenz bei Adenokarzinomen gefunden. Standard des Nachweises sind derzeit Hybridisierungstechniken. Erste Ergebnisse aus Phase-I-Studien mit ROS1-Inhibitoren zeigen ein Ansprechen um 70–80% und eine mediane progressionsfreie Überlebenszeit über 19 Monate bei insgesamt guter Verträglichkeit.

**Schlussfolgerung:** ROS1-Translokationen können gezielt und mit guten Ansprech- und Verlaufsdaten behandelt werden und sollten daher bei pulmonalen Adenokarzinomen im Stadium IV routinemäßig analysiert werden.

### Einleitung



Die Therapieverfahren bei Lungenkarzinomen haben sich nicht zuletzt durch einen enormen Wissenszuwachs auf dem Gebiet molekularer Veränderungen in Tumorzellen und ihrer Bedeutung für die Karzinogenese in den letzten Jahren erheblich erweitert. Zahlreiche dieser zentralen molekularen Alterationen scheinen überwiegend exklusiv zueinander aufzutreten, sodass diese Veränderungen als für den jeweiligen Tumor wesentliche Treiberereignisse angesehen werden. Durch die Entwicklung sogenannter zielgerichteter Behandlungen können metastasierte Lungenkarzinome bei Nachweis solcher Alterationen heute deutlich besser behandelt werden, als dies

### Abstract



**Aim:** Summary of prevalence, testing and treatment approaches in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) and ROS1 activation.

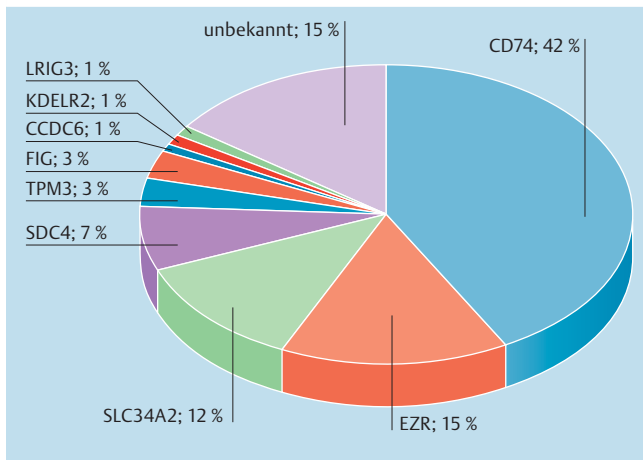
**Methods:** Internet-based search for clinical and preclinical studies as well as search for ongoing studies in web-based databases.

**Results:** ROS1 translocations lead to tyrosine kinase activation and can be detected in 1–2% of all NSCLC and in 3–6% of pulmonary adenocarcinoma patients, respectively, using *in situ* hybridization techniques. Results from phase I clinical studies using the ROS1 inhibitor crizotinib indicate response rates of 70–80% and a median progression-free survival of about 19 months. The therapy was generally well tolerated.

**Conclusions:** NSCLC harbouring ROS1-translocations can be treated with targeted therapy leading to promising response and survival in patients. Hence, these alterations should be included into current molecular testing panels in stage IV pulmonary adenocarcinomas.

mit der bisherigen Standard-Chemotherapie möglich war [1]. Damit Patienten von solchen zielgerichteten Therapieansätzen profitieren können, ist es vorher entscheidend, die relevanten Treibereränderungen im Rahmen der Routinediagnostik verlässlich, jedoch mit möglichst einfach durchführbaren und kostengünstigen Methoden bzw. diagnostischen Algorithmen und mit möglichst geringem Tumorgewebeverbrauch nachzuweisen.

ROS1 (c-ros oncogene 1, receptor tyrosine kinase) ist ein Tyrosinkinaserzeptor aus der Untergruppe der Insulinrezeptorproteine und aktiviert nach bisherigem Kenntnisstand verschiedene Signalwege, welche die zelluläre Differenzierung, die Proliferation, das zelluläre Wachstum und



**Abb. 1** Ausgewählte, verschiedene ROS1-Fusionen und beobachtete Häufigkeiten beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom. Angelehnt an [20].

das Zellüberleben regulieren. Die wichtigsten Signalwege umfassen hierbei die PI3-Kinase-mTOR-Achse sowie den MEK/ERK-Signalweg. Aktivierende ROS1-Translokationen wurden initial in Glioblastomen entdeckt [2]. Nachfolgend wurden solche Translokationen auch in Lungenkarzinomen, Cholangiokarzinomen, Magenkarzinomen, kolorektalen Karzinomen, Ovarialkarzinomen, Angiosarkomen und weiteren Tumoren beschrieben [3–7]. Analog zu ALK- (anaplastische Lymphomkinase) oder RET- (rearranged during transfection) Translokationen kommt es hierbei nach einem chromosomalen Bruch zu einer Translokation eines ROS1-Chromosomenabschnitts, wobei hier stets die 3' Region die kodierende Sequenz für ROS1 und die 5' Region unterschiedliche Sequenzen anderer Gene enthält. Das ROS1-Gen fusioniert mit zahlreichen Partnern, u. a. CD74, FIG, SDC4, EZR und SLC34A2 [8,9]. Diese Partner haben für das onkogene Ereignis zwei entscheidende Eigenschaften: Einerseits besitzen sie einen Promotor, welcher eine signifikante Transkription des neuen Genpartners (in diesem Fall ROS1) ermöglicht, und zusätzlich kodieren sie meist Sequenzen, welche für die Oligomerisation spezifischer Domänen des Proteins relevant sind [8].

### Diagnostik von ROS1-Translokationen

Bei den oben erwähnten Tumoren können ROS1-Translokationen – ähnlich wie ALK-Translokationen – nur in sehr niedriger Prävalenz nachgewiesen werden [3,10]. Zudem treten ROS1-Fusionen mit zahlreichen unterschiedlichen und wahrscheinlich auch noch nicht vollständig erfassten möglichen Translokationspartnern auf. Die Veränderung wird zumeist mittels einer Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH) unter Verwendung von zwei Split-Proben im ROS1-Genlokus nachgewiesen. Hierfür stehen bereits sehr zuverlässig anwendbare Sondenkombinationen kommerziell zur Verfügung. FISH-Analysen erfordern jedoch eine hohe Expertise bei der Auswertung und Interpretation schwieriger Konstellationen, wie sie aufgrund der fast regelhaft anzutreffenden Aneuploidie nicht-kleinzelliger Lungenkarzinome (NSCLC) häufig zu finden sind. Zudem ist die Methode sehr zeitaufwendig und auch eher kostenintensiv. Mittels RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion) und Sequenzierung ist ein Nachweis von ROS1-Fusionen ebenfalls möglich, erfordert jedoch aufgrund der zahlreichen Fusionspartner viele Primer-Kombinationen und birgt die Gefahr, dass bislang nicht

beschriebene Translokationen nicht nachgewiesen werden können (da hierfür ja keine Primer eingesetzt wurden). Möglicherweise kann in Zukunft ein weiteres, hoch sensitives Diagnostik-Verfahren, das Next Generation Sequenzierverfahren (NGS), die bisherige FISH-Diagnostik ablösen. Erste Erfahrungen mit NGS-Systemen deuten an, dass nahezu alle Varianten einer ROS1-Translokation sehr zuverlässig detektierbar sind [11].

Eine weitere, relativ günstige Nachweismöglichkeit ist die immunhistochemische Anfärbung von ROS1-Protein. Bisherige Daten zeigen, dass NSCLC-Tumoren mit ROS1-Translokation eine moderate bis starke Expression von ROS1-Proteinen haben [12–15]. Im normalen Lungengewebe ist dagegen ROS1 nicht oder nur schwach exprimiert [13,16]. Problematisch ist jedoch die Tatsache, dass es auch nicht translokationsbedingt zu einer Überexpression von ROS1 kommen kann (wie beispielsweise bei reaktiv veränderten Pneumozyten), sodass die Übereinstimmung von ROS1-Expression und ROS1-Translokation im Vergleich zur ALK-Diagnostik deutlich unsicherer ist [12].

### Prävalenz von ROS1-Translokationen in Lungenkarzinomen

ROS1-Translokationen sind etwa in 1–2% aller NSCLC-Tumoren und hierbei nahezu ausschließlich in Adenokarzinomen nachweisbar [17–19] (Abb. 1). In Einzelfällen wurden ROS1-Translokationen jedoch auch in Plattenepithelkarzinomen beschrieben [9,20]. In einer Untersuchung von 1529 chirurgisch entfernten Lungenkarzinomen (überwiegend Adenokarzinome, davon 100 Patienten mit nachgewiesener EGFR-Mutation) wurden neben 44 ALK-Fusions-positiven auch 13 ROS1-Fusions-positiven Adenokarzinome (1,2%) detektiert [8]. Eine weitere Studie detektierte 18 Patienten (1,7%) mit ROS1-Rearrangements bei insgesamt 1073 Patienten mit NSCLC, wobei alle Histologie-Subtypen und Tumorstadien eingeschlossen waren [17]. Auch in dieser Untersuchung wurden alle ROS1-Fusionen ausschließlich bei Adenokarzinomen (Prävalenz 2,6%) gefunden. Die Vergleichbarkeit beider Studien ist erschwert durch unterschiedliche Patientenkollektive und Untersuchungstechniken bezüglich der Detektion von ROS1. Die klinischen Charakteristika der ROS1-positiven Patienten waren jedoch ähnlich und denen von Patienten mit nachgewiesener ALK-Translokation vergleichbar: Patienten mit ROS1-Fusion zeigten einen Trend zu jüngeren Alter bei Diagnose (Median 49,8 Jahre), waren zumeist Nieraucher und häufiger asiatischer Herkunft [17]. Zudem zeigte sich eine leicht höhere Prävalenz bei weiblichen Patienten (61% der Patienten mit ROS1-Fusion waren weiblich bei einem Frauenanteil von insgesamt 51%) [17]. Die Frequenz ist jedoch deutlich vom ethnischen Hintergrund und der Präselektion der jeweiligen Studienpopulation abhängig. In einer Studie mit koreanischen Nichtraucherern, die an einem pulmonalen Adenokarzinom erkrankt waren, konnten ROS1-Translokationen mit einer Frequenz von 5,7% nachgewiesen werden [21]. In einer selektierten kaukasischen Studienpopulation mit pulmonalem, „triple negativem“ (wild-type EGFR, KRAS und ALK) Adenokarzinom konnte sogar eine Frequenz von 7,4% belegt werden [22]. Dagegen konnten wir in einer eigenen, unselektierten, chirurgischen Kohorte von 1478 Fällen eine Frequenz von 0,6% ROS1-Translokationen nachweisen [12]. Dies belegt, dass klinische und pathologische Parameter zur Präselektion und zur Anreicherung positiver Fälle im Studienkontext hilfreich sein könnten. Bei den pathologischen Parametern sind ein niedriges Tumorstadium, die Expression von TTF-1

und Napsin sowie ein lepidisches, azinäres oder solides Wachstumsmuster der Adenokarzinome möglicherweise diesbezüglich hilfreiche Parameter [9, 12, 16, 21].

### Klinische Bedeutung von ROS1-Translokationen

Die Expression von ROS1 ist nach aktueller Datenlage mit einem möglicherweise leicht besseren Gesamtüberleben in chirurgischen Kohorten assoziiert [12], wobei für das Stadium I auch gezielte Ergebnisse publiziert sind [15]. Ein prognostischer Wert eines Nachweises einer ROS1-Translokation konnte bisher nicht erbracht werden [17]. Allerdings sind klare Aussagen durch die niedrige Prävalenz von ROS1-Translokationen und heterogene Studienkollektive erschwert.

Aufgrund der 77%igen Ähnlichkeit der ATB-Bindungsstellen der Kinase-Domänen von ALK und ROS1 ist eine mögliche Therapie einer ROS1-Fusion mit einem auch die ALK-Kinase erfassenden Inhibitor naheliegend. Verschiedene präklinische Modelle zeigten vielversprechende Therapieansätze von ROS1-aktivierten Tumorzellen mit Crizotinib [20]. Crizotinib ist ein kleinmolekularer Tyrosinkinaseinhibitor (TKI) verschiedener Rezeptoren einschließlich ALK, ROS1 und MET (Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor; HGFR) [23].

In einer Phase-1-Studie wurden 50 Patienten mit fortgeschrittenem und zumeist vorbehandeltem (86%) NSCLC und nachgewiesenem ROS1-Rearrangement mit 250 mg Crizotinib zweimal/Tag per os behandelt. Als Nachweismethode wurde ein break-apart-FISH-Assay verwendet sowie bei 27 Patienten zusätzlich eine nähere molekulare Charakterisierung der Fusionspartner mittels PCR und NGS durchgeführt [24]. Eine Korrelation zwischen jeweiligem ROS1-Fusionspartner und klinischem Ansprechen auf Crizotinib konnte nicht beobachtet werden. Die Ansprechrate lag insgesamt bei 72% (95% Konfidenzintervall [KI] 58%–84%) mit einer medianen Dauer von 17,6 Monaten (95% KI, 14,5 Monate – nicht erreicht). Drei Patienten zeigten nach RECIST-Kriterien eine komplette Remission und weitere 33 Patienten ein partielles Ansprechen. Die mediane progressionsfreie Überlebenszeit betrug 19,2 Monate (95% KI, 14,4 Monate – nicht erreicht) bei einer Überlebensrate nach 12 Monaten von 85% (95% KI: 72%–93%). Zum Zeitpunkt der letzten Datenanalyse waren 9 Patienten (18%) verstorben; 30 Patienten (60%) erhielten weiterhin Crizotinib. Als Nebenwirkungen wurden – übereinstimmend mit Therapiedaten von ALK-positiven Patienten – zumeist visuelle Beeinträchtigungen (82%, alle Grad 1), Diarrhoe (44%), Nausea (40%), periphere Ödeme (40%), Konstipation (34%), Erbrechen (34%), erhöhte Aspartat-Aminotransferase-Werte im Serum (22%) sowie Fatigue (20%) beobachtet. Diese Nebenwirkungen waren zumeist mild ausgeprägt (Grad 1/2 bei 94% aller berichteten Nebenwirkungen). Grad-3-Toxizitäten waren Hypophosphatämie (10%), Neutropenie (10%) und erhöhte Alanin-Aminotransferase-Werte im Serum (4%). Grad-4- oder Grad-5-Toxizität wurde nicht beobachtet [24]. In einer anderen, europäischen Kohorte und retrospektiven Analyse von 28 Patienten (davon 19 Nierraucher) mit ROS1-positivem, metastasiertem NSCLC führte eine Therapie mit Crizotinib zu einer Ansprechrate von 77% einschließlich 4 kompletten Remissionen [25]. Bei allen Tumoren handelte es sich um Adenokarzinome einschließlich 4 Tumoren mit lepidischem Wachstumsmuster.

Aufgrund dieser Daten stellt Crizotinib eine vielversprechende Therapieoption für NSCLC-Patienten mit nachgewiesenem ROS1-Rearrangement dar. Crizotinib ist aktuell aber nicht für

diese Indikation zugelassen, sodass eine Kostenerstattung bei der Krankenkasse im Einzelfall beantragt werden muss (off label use). Eine Alternative für Crizotinib könnte die Inhibition von Hitzeschockprotein 90 (Hsp90) sein. Präklinische Daten von NSCLC-Zellen mit ROS1-Kinasefusionen zeigten ein gutes Ansprechen auf den HSP90-Inhibitor Ganetespib [26].

Verschiedene weitere ROS1-Inhibitoren werden derzeit in klinischen Studien untersucht (► Tab. 1). In Deutschland können derzeit ROS1-positive Patienten in die EUCROSS (NCT02183870) eingeschlossen werden. Hierbei handelt es sich um eine einarmige Phase-II-Studie, die die Wirkung einer Crizotinib-Monotherapie bei Patienten mit fortgeschrittenem oder metastasiertem Adenokarzinom und nachgewiesener ROS1-Translokation untersucht. Primäres Studienziel ist die objektive Ansprechrate nach RECIST-Kriterien; sekundäre Ziele schließen Überleben, progressionsfreies Überleben und Toxizität ein. Es ist geplant, 30 Patienten einzuschließen.

Auch erste Daten zu möglichen Resistenzmechanismen bei Progress unter einer Crizotinib-Therapie wurden berichtet: In einem Fallbericht konnte bei einem Patienten mit metastasiertem Adenokarzinom und CD74-ROS1-Rearrangement nach initialem sehr guten Ansprechen auf Crizotinib bei Krankheitsprogression in einer erneuten Biopsie des Primärtumors eine Mutation im ROS1-Gen detektiert werden, die zu einer Glycin-zu-Arginin-Substitution (Codon 2032) in der ROS1-Kinasedomäne führte und mit einer Resistenz *in vitro* gegenüber verschiedenen ROS1-Inhibitoren vergesellschaftet war [27]. Diese Mutation wurde posthum auch an verschiedenen Metastasenlokalisationen des gleichen Patienten nachgewiesen. Zudem zeigte sich in den untersuchten Biopsien auch eine Persistenz des initial nachgewiesenen ROS1-Rearrangements. Diese Daten verdeutlichen – in Analogie zu anderen gezielten Kinaseinhibitoren – die Notwendigkeit von erneuten Biopsien bei progredienter Erkrankung unter zielgerichteten Therapien mit konsekutiver Identifikation von Resistenzmechanismen auf molekularer Ebene.

### ROS1, EGFR, ALK: Wie soll die Biomarker-Testung der Zukunft aussehen?

Die aktuellen Daten unterstützen eine breite Untersuchung nach ROS1-Veränderungen zumindest bei pulmonalen Adenokarzinomen im Stadium IV oder ohne lokale Therapiemöglichkeit. Damit ist auch eine weitere Untergruppe mit spezifischen Therapiemöglichkeiten identifiziert – neben Patienten mit nachgewiesenen Veränderungen von EGFR und ALK, bei denen bereits heute zugelassene TKIs zur Verfügung stehen. Zahlreiche weitere Therapieansätze von weiteren definierten molekularen Veränderungen wie BRAF, RET, MET-Amplifikation und KRAS befinden sich in klinischer Testung. Zudem ging man bisher von der Annahme aus, dass beim NSCLC solche Treibermutationen exklusive Ereignisse darstellen und nicht (parallel) innerhalb eines Tumors auftreten. In Analysen großer Kohorten zeigt sich jedoch, dass überlappende molekulare Treiberalterationen, wenn auch in geringer Frequenz, in der Realität durchaus vorkommen [28]. Auch für ROS1-Translokationen wurde ein Vorkommen gemeinsam mit anderen Treibermutationen wie z. B. BRAF beschrieben [11, 12]. Bisher werden molekulare Analysen bei NSCLC-Tumoren in der Regel sequentiell durchgeführt, d. h. erst wenn ein Tumor keine nachweisbare Mutation im KRAS- oder EGFR-Gen hat, wird eine Testung auf ALK-Translokationen eingeleitet. Bei den derzeit zugelassenen Therapiemöglichkeiten ist dies gegebenenfalls ver-

**Tab. 1** Aktuelle klinische Studien mit ROS1-Inhibitoren beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom [34]. „+“: positiver Nachweis eines Rearrangements.

NCT-Nummer	Phase	Substanz	geplante Patienten	Kollektiv	Land
NCT02183870	II	Crizotinib	30	Adenokarzinom ROS1 +	BRD
NCT01639508	II	Cabozantinib	50	NSCLC RET negativ ROS1 + NTRK + erhöhte MET- oder AXL-Aktivität	USA
NCT01970865	I	PF-06463922	250	NSCLC ROS1 + RET +	Global (ohne BRD)
NCT01964157	II	LDK378	32	NSCLC ROS1 +	Korea
NCT02186821	II	Ceritinib (LDK378)	90	NSCLC ROS1 + ALK +	USA
NCT01945021	II	Crizotinib	110	Adenokarzinom ROS1 +	Ostasien
NCT02097810	I/II	RXDX-101	125	versch. Tumoren positiv für ALK, ROS1 oder TRKA/B/C (STARTRK-1)	USA

retbar und spart Kosten. Unter den Annahmen, dass sich die therapeutischen Möglichkeiten in Zukunft deutlich verbreitern werden und die molekulare Testung eine zunehmende Zahl genetischer Veränderungen (die teilweise ja auch parallel nachweisbar sein können) umfassen sollte, wird ein sequentieller Ansatz diesen Anforderungen jedoch kaum noch gerecht. Zudem wird bei sequentiellen Testen der Bedarf an größeren und repräsentativen Gewebebiopsien immer größer.

Eine Gewebebiopsie wird im klinischen Alltag zunächst für die Primärdiagnostik verwendet werden (beispielsweise mittels HE-Schnitt und PAS-Färbung) [29]. Es ist empfehlenswert, eine Paraffinprobe bereits beim initialen Anschnitt im vollen Durchmesser darzustellen, um falsch-negative Befunde aufgrund unvollständig angeschnittenen Materials zu vermeiden. Bei etwa einem Drittel der Fälle ist nach morphologischer Diagnose eines NSCLC eine zusätzliche Immunphänotypisierung erforderlich [30]. Ergibt sich morphologisch der Verdacht auf eine neuroendokrine Differenzierung oder muss der Tumor von einer Metastase unterschieden werden, müssen häufig weitere Analysen durchgeführt werden. Das jeweils notwendige Anschneiden des Paraffinblockes führt zu weiterem Gewebeerlust. Da zumeist bei initialer Diagnosestellung nicht abzusehen ist, ob eine molekulare Diagnostik nötig wird, findet die Aufarbeitung für die Molekularpathologie regelhaft erst nach Abschluss der Primärdiagnostik statt. In Abhängigkeit der zu bestimmenden Biomarker bzw. der diagnostischen Methoden sind unterschiedliche Schnittdicken und Objektträgerbeschichtungen erforderlich. Für die Mutationsanalytik an Biopsiematerial sind etwa zehn Schnitte auf unbeschichteten Objektträgern für die Mikrodisektion anzufertigen. Im Gegensatz dazu werden für die FISH/CISH-Diagnostik jeweils beschichtete Objektträger verwendet. Erfolgen die prädiagnostischen Analysen sequentiell in der Annahme, dass sich sogenannte Treibermutationen gegenseitig ausschließen, kann schnell bei jeweils notwendigem, erneutem Anschneiden des Blockes nicht genug Tumormaterial für alle notwendigen Analysen vorhanden sein. Insgesamt ist daher ein Nachdenken über schnellere, gewebe-sparende und kostengünstige Teststrategien zwingend notwendig. Wie könnte aber eine zukünftige breite molekulare Testung aussehen?

Eine Lösung könnte die Etablierung paralleler statt sequentieller Analyseverfahren sein. Durch die breite Verfügbarkeit und die sinkenden Kosten paralleler Sequenzierverfahren (next generation sequencing; NGS) ergeben sich interessante Perspektiven für die simultane Detektion von Mutationen, Translokationen und Amplifikationen/Deletionen in der Routinediagnostik. Parallele Sequenzierverfahren können Formalin-fixierte und Paraffineingebettete Biopsiematerialien sehr sensitiv untersuchen. Zudem kann durch die parallele Durchführung aller relevanten molekularpathologischen Untersuchungen die Analysedauer deutlich reduziert werden [31]. Im diagnostischen Kontext ist hierbei momentan nicht die Sequenzierung ganzer Exome oder gar Genome sinnvoll, der Schwerpunkt liegt vielmehr auf fokussierten Strategien (sog. Panel-Sequenzierung), bei denen jeweils nur die klinisch relevanten genomischen Veränderungen detektiert werden. Zudem ist eine fokussierte NGS-Analytik sehr flexibel, da neue Zielregionen (Mutationen) innerhalb weniger Tage in die Sequenzierpanel integriert werden können. Auch die Implementierung der Translokationsanalytik mittels NGS (z.B. parallele RNA-Sequenzierstrategien) steht hier unmittelbar bevor und wird zurzeit in einigen Zentren prospektiv parallel zur konventionellen FISH-Diagnostik auf ihre Zuverlässigkeit hin überprüft. Gleiches gilt für den Nachweis von Amplifikationen/Deletionen einzelner Gene. Diese neuen Entwicklungen bieten interessante Möglichkeiten, mittelfristig die personal-, zeit- und kostenintensive Translokationsdiagnostik mittels FISH/CISH abzulösen [11]. Allerdings müssen wichtige Fragen bezüglich Standardisierung, Qualitätssicherung und Auswertung noch bearbeitet werden.

Das zunehmende Verständnis über Resistenzentwicklungen bei TKIs sowie die Entwicklung therapeutischer Ansätze auch für diese Situation führt zur Diskussion einer Re-Biopsie bei Tumorprogress. Hier gilt es einerseits, Resistenzmechanismen zu identifizieren, die einem Therapieversagen zugrunde liegen, andererseits aber auch neue molekulare Veränderungen nachzuweisen, die die Anwendung neuer, zielgerichteter Substanzen ermöglichen. Auch in einem solchen Kontext ist die zeitgleiche Analyse mehrerer Marker wichtig. Das Konzept sequentieller Biopsien mit umfassendem molekularem Profiling der aktuellen Tumor-

zellpopulationen unter Therapie wird momentan im Studienkontext untersucht [32]. Zudem werden Verfahren entwickelt, zirkulierende Tumor-DNA oder zirkulierende Tumorzellen aus dem peripheren Blut zu extrahieren und analysieren. Ob dies mittels eines NGS-Verfahrens oder anderer Methoden am besten geeignet ist, wird die weitere Entwicklung zeigen. Auch hier wird es eine Fülle neuer Fragen zu beantworten geben, wie: Was ist der geeignete Zeitpunkt einer Re-Biopsie oder Analyse aus dem peripheren Blut, wie repräsentativ sind diese Ergebnisse, welche Untersuchungsrisiken wären bei einer Re-Biopsie vertretbar, ab wann muss bei Progression wirklich eine Therapieumstellung erfolgen? Einige dieser Fragen werden derzeit in klinischen Studien bereits adressiert.

## Diskussion und Ausblick

Die Testung auf ROS1 stellt eine sinnvolle Ergänzung zur aktuellen molekularen Testung von NSCLC-Tumoren dar. Aufgrund der höheren Prävalenz sollte diese Empfehlung zumindest für Adenokarzinome ausgesprochen werden. Aktuell wird jedoch nur ein geringerer Patientenanteil routinemäßig auf ROS1-Veränderungen untersucht. In einer Umfrage unter Pathologen und Klinikern in den USA, Frankreich, Deutschland, Italien und Japan im zweiten Halbjahr 2013 gaben diese an, 35%, 19%, 18%, 12% (Deutschland) und 3% ihrer Patienten auf ROS1 zu testen [33]. Es ist zu fordern, dass dieser Anteil deutlich gesteigert wird. Als sinnvolles diagnostisches Vorgehen zum Nachweis von ROS1-Translokationen werden sich perspektivisch wohl NGS-Verfahren durchsetzen, aktuell scheinen jedoch in der Fläche noch FISH-Analysen am geeignetsten, da die Immunhistochemie keine hohe Konkordanz zu Translokationsereignissen aufweist, wie dies z.B. bei ALK-Translokationen der Fall ist. Weiter bleibt zu untersuchen, ob ggf. Patienten mit nicht translokationsbedingter (z.B. epigenetisch bedingter) erhöhter Expression von ROS1 in ihren Tumoren möglicherweise auch von ROS1-TKIs profitieren.

## Interessenkonflikt

N. Reinmuth erhielt Honoraria für Vorträge und Beratungen von Roche, Lilly, Amgen, Novartis, Boehringer-Ingelheim, TEVA, Otsuka, MSD und Bristol-Myers Squibb.

M. Reck erhielt Honoraria für Vorträge und Beratungen von Roche, Lilly, Novartis, Boehringer-Ingelheim, Pfizer, MSD, BMS und AstraZeneca.

M. Warth: Advisory Boards und Vortragstätigkeit: Zytovision, Novartis, Roche, proMedicis, AstraZeneca; Verfassung wissenschaftlicher Literatur: AstraZeneca; Unterstützung wissenschaftlicher Projekte: Novartis.

W. Weichert: Berater-/Vortragstätigkeit: Pfizer, Roche, Novartis, MSD, BMS, AstraZeneca, Boehringer; Forschungsmittel: Roche, Novartis, AstraZeneca.

## Literatur

- 1 Reck M, Popat S, Reinmuth N et al. Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2014; 25 (Suppl. 03): iii27–39
- 2 Birchmeier C, Sharma S, Wigler M. Expression and rearrangement of the ROS1 gene in human glioblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 9270–9274
- 3 Rikova K, Guo A, Zeng Q et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* 2007; 131: 1190–1203
- 4 Gu TL, Deng X, Huang F et al. Survey of tyrosine kinase signaling reveals ROS kinase fusions in human cholangiocarcinoma. *PLoS One* 2011; 6: e15640
- 5 Lee J, Lee SE, Kang SY et al. Identification of ROS1 rearrangement in gastric adenocarcinoma. *Cancer* 2013; 119: 1627–1635
- 6 Aisner DL, Nguyen TT, Paskulin DD et al. ROS1 and ALK fusions in colorectal cancer, with evidence of intratumoral heterogeneity for molecular drivers. *Mol Cancer Res* 2014; 12: 111–118
- 7 Birch AH, Arcand SL, Oros KK et al. Chromosome 3 anomalies investigated by genome wide SNP analysis of benign, low malignant potential and low grade ovarian serous tumours. *PLoS One* 2011; 6: e28250
- 8 Takeuchi K, Soda M, Togashi Y et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med* 2012; 18: 378–381
- 9 Yoshida A, Kohno T, Tsuta K et al. ROS1-rearranged lung cancer: a clinicopathologic and molecular study of 15 surgical cases. *Am J Surg Pathol* 2013; 37: 554–562
- 10 von Laffert M, Warth A, Penzel R et al. 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
- 11 Warth A, Endris V, Kriegsmann M et al. [Molecular diagnostics of non-small cell lung cancer: New markers and technologies]. *Pathologe* 2015; 36: 154–163
- 12 Warth A, Muley T, Dienemann H et al. ROS1 expression and translocations in non-small-cell lung cancer: clinicopathological analysis of 1478 cases. *Histopathology* 2014; 65: 187–194
- 13 Sholl LM, Sun H, Butaney M et al. ROS1 immunohistochemistry for detection of ROS1-rearranged lung adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol* 2013; 37: 1441–1449
- 14 Yoshida A, Tsuta K, Wakai S et al. Immunohistochemical detection of ROS1 is useful for identifying ROS1 rearrangements in lung cancers. *Mod Pathol* 2013; 27: 711–720
- 15 Lee HJ, Seol HS, Kim JY et al. ROS1 receptor tyrosine kinase, a druggable target, is frequently overexpressed in non-small cell lung carcinomas via genetic and epigenetic mechanisms. *Ann Surg Oncol* 2013; 20: 200–208
- 16 Go H, Kim DW, Kim D et al. Clinicopathologic analysis of ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer and proposal of a diagnostic algorithm. *J Thorac Oncol* 2013; 8: 1445–1450
- 17 Bergethon K, Shaw AT, Ou SH et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol* 2012; 30: 863–870
- 18 Davies KD, Le AT, Theodoro MF et al. Identifying and targeting ROS1 gene fusions in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 4570–4579
- 19 Davies KD, Doebele RC. Molecular pathways: ROS1 fusion proteins in cancer. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 4040–4045
- 20 Gainor JF, Shaw AT. Novel targets in non-small cell lung cancer: ROS1 and RET fusions. *Oncologist* 2013; 18: 865–875
- 21 Kim HR, Lim SM, Kim HJ et al. The frequency and impact of ROS1 rearrangement on clinical outcomes in never smokers with lung adenocarcinoma. *Ann Oncol* 2013; 24: 2364–2370
- 22 Mescam-Mancini L, Lantuejoul S, Moro-Sibilot D et al. On the relevance of a testing algorithm for the detection of ROS1-rearranged lung adenocarcinomas. *Lung Cancer* 2014; 83: 168–173
- 23 Groschel A, Warth A, Reinmuth N. [Crizotinib – molecular therapy for lung cancer]. *Pneumologie* 2013; 67: 205–208
- 24 Shaw AT, Ou SH, Bang YJ et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2014; 371: 1963–1971
- 25 Mazieres J, Zalcman G, Crino L et al. Efficacy of crizotinib in ROS1-rearranged lung cancer: The European experience. *J Clin Oncol* 2014; 32: abstr 11035
- 26 Proia DA, Acquaviva J, Jiang Q et al. Preclinical activity of the Hsp90 inhibitor, ganetespib, in ALK- and ROS1-driven cancers. *J Clin Oncol* 2012; 30: abstr 3090

- 27 *Awad MM, Katayama R, McTigue M* et al. Acquired resistance to crizotinib from a mutation in CD74-ROS1. *N Engl J Med* 2013; 368: 2395–2401
- 28 *Kris MG, Johnson BE, Berry LD* et al. Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs. *JAMA* 2014; 311: 1998–2006
- 29 *Travis WD, Brambilla E, Noguchi M* et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2011; 6: 244–285
- 30 *Warth A, Muley T, Herpel E* et al. Large-scale comparative analyses of immunomarkers for diagnostic subtyping of non-small-cell lung cancer biopsies. *Histopathology* 2012; 61: 1017–1025
- 31 *Endris V, Penzel R, Warth A* et al. Molecular diagnostic profiling of lung cancer specimens with a semiconductor-based massive parallel sequencing approach: feasibility, costs, and performance compared with conventional sequencing. *J Mol Diagn* 2013; 15: 765–775
- 32 *Jamal-Hanjani M, Hackshaw A, Ngai Y* et al. Tracking genomic cancer evolution for precision medicine: the lung TRACERx study. *PLoS Biol* 2014; 12: e1001906
- 33 *De Richter P*. Current use of ROS1 testing in clinical practice in the United States, France, Germany, Italy, and Japan. *J Clin Oncol* 2014; 32: e22108
- 34 <https://clinicaltrials.gov> [last assessed March 1rst 2015]