

Test af EML4-ALK fusion i lungeadenokarcinom.

Anbefalingerne udarbejdede af:

Overlæge, Dr. Med. Birgit Gulddammer Skov. Bispebjerg Hospital, Patologisk Afdeling.

Professor, overlæge Mogens Vyberg. Aalborg Universitetshospital, Patologisk Institut.

Overlæge ph.d. Henrik Hager. Aarhus Universitetshospital, Patologisk Institut. Tovholder UMP.

Lagt på DPAS hjemmesiden 30.07.2013 og vil løbende blive revideret hvis der tilkommer ny viden vedr. analyserne. Protokoller til farvemaskiner uploades snarest.

Molekylær basis for behandling:

Re-arrangement af ALK (Anaplastisk Lymfom Kinase) blev først beskrevet i anaplastiske storcellede lymfomer (1). Senere er det beskrevet i andre tumorer, herunder i ikkesmåcellede lungecancer, helt overvejende adenocarcinomer (2). I lungecancer består re-arrangementet i en mindre inversion på kromosom 2 inv(2) (p21p23). Dette medfører hyppigst, at en del af ALK-genet fusionerer med EML4-genet (Echinoderm Microtubulus-associeret lignende protein 4) (3). Andre fusionspartnere er dog mulige, herunder TFG og KIF5B (3). Fusionsproteinet har transformerende egenskaber og regnes som et afgørende oncogen (driver mutation) i udviklingen af 3-6% af lungeadenokarcinomer (4). En nyligt udviklet kinase-inhibitor (PF02341066, crizotinib, Xalkori, Pfizer) har dokumenteret klinisk effekt på patienter med EML4-ALK-fusion, hvilket har ført til FDA-godkendelse i august 2011 samt godkendelse efteråret 2012 af European Medicines Agency (EMA) og dermed i Danmark som 2. linie-behandling af lungeadenokarcinomer. De hyppigste kliniske karakteristika associeret med EML4-ALK fusion er yngre patienter og lavt/intet cigaretforbrug. Disse karakteristika ses dog ikke hos alle patienter (5). EML4-ALK-fusionen er især beskrevet i adenokarcinomer med solidt vækstmønster og indhold af signetringsceller samt i adenokarcinomer med kribriformt vækstmønster og mucinproduktion, men kan ses i alle histologiske subtyper (6). Det er således vigtigt at kunne detektere fusionen ved specifikke metoder.

Hvornår skal testen udføres?

Crizotinib er i Danmark (endnu) ikke godkendt til 1. linie-behandling, og undersøgelse for ALK-status skal således *ikke nødvendigvis* laves "up-front", når diagnosen pulmonalt adenocarcinom stilles (dette i modsætning til undersøgelse for EGFR status, hvor ikke-operable patienter skal testes up-front). Af logistiske årsager og da behandlingsrespons på Crizotinib af ALK positive tumorer er meget overbevisende, er det mest hensigtsmæssigt, at analysen laves allerede på diagnosetidspunktet. Principielt bør der være kontrolsnit på hvert glas. Hvis positivt kontrolmateriale er vanskeligt at skaffe, kan det dog overvejes, at analysen ikke køres dagligt, men at der samles et antal prøver, før ALK IHC iværksættes med ét kontrolsnit. I denne sammenhæng skal det anføres, at ufarvede snit, der opbevares ved 5°C ikke mister deres ALK-antigenicitet.

Detektion af ALK-gen re-arrangement:

Denne vil oftest foregå på (sparsomt) biopsimateriale sammen med morfologisk diagnostik, incl. immunhistologiske undersøgelser til subklassifikation af ikke-småcellet lungecancer, og identifikation af andre molekulære targets (f. eks. EGFR). Metoder, der kan anvendes, er: FISH (Fluorescens In-Situ Hybridisering), der påviser brud af ALK-genet uafhængigt af fusionspartner, IHC (Immunhistokemi) der påviser ALK-delen af fusionsproteinet, og RT-PCR (Revers Transcriptase Polymerase kæde reaktion) der påviser fusions-mRNA. Såvel vævsbiopsier som cytologisk materiale i form af udstrygninger/smears og koagelmateriale kan anvendes. I det efterfølgende vil disse metoder kort gennemgås afsluttende med en anbefaling.

FISH:

De fleste kliniske studier omkring ALK-fusioner har anvendt break-apart FISH probesæt for ALK-genet. I USA er behandling med Xalkori betinget af anvendelse af Vysis Break Apart FISH Probe Kit (Abbot Molecular Inc.). Andre kits er imidlertid tilgængelige (f. eks. fra Zyto Vision, Zyto Light og TriCheck). De fleste af disse kits indeholder indlægssedler med såvel laboratiemæssige som analytiske anbefalinger. I en større sammenlignende test er to probesæt (Vysis (FISH) og Zytovision (CISH)) sammenlignet og udviste fuld konkordans (7).

Såvel histologisk som cytologisk materiale, incl. koagler fra det aspirerede materiale, kan anvendes, herunder udstrygninger/smears, der oprindeligt er MGG farvet. Smears, der er PAP-farvet, kan derimod ikke anvendes. Udstrygninger har den fordel, at de indeholder intakte kerner i modsætning til parafinsnit, der kun indeholder overskårne. For histologisk materiale og nålekoaglers vedkommende bør standardfixering i 10% neutralbufferet formalin (3.6% neutralbufferet formaldehyd) anvendes. Erfaring med hurtigprocederingsmaskiner er endnu ikke beskrevet i litteraturen, hvorfor standard-vævsprocedering bør foretrækkes. 3-5 µm tykke snit bør anvendes. Det er beskrevet i enkelte publikationer, at ufarvede snit fra paraffinblokke med biopsimateriale og nålekoagler ikke bør være ældre end 1-6 mdr.

FISH-resultatet bør vurderes af en patolog. 50 intakte tumorcellekerner med tydelige signaler skal vurderes under anvendelse af fluorescencemikroskop med de rette filtre. Triple filter med DAPI samt rød og grøn fluorescence er at foretrække.

En cellekerne er ALK-positiv (1) hvis afstanden mellem et rødt og en grønt signal er mere end svarende til 2 diametre af det kraftigste signal (afstanden i z-aksens retning skal medregnes, hvis det er muligt), (2) hvis der kun ses et rødt signal, hvilket indikerer, at inversionen er kombineret med en deletion (kaldes red dot only). Tumor er ALK-negativ, hvis <10% af de maligne cellekerner er positive (<5 celler) og positiv, hvis >50% af de maligne cellers kerner er positive (>25 celler). Hvis resultatet er mellem 10% og 50% (5-25 maligne cellers kerner) bør præparatet revurderes af en anden patolog. Hvis gennemsnittet af de 2 vurderinger er $\geq 15\%$, er tumor positiv.

IHC:

Er en hurtig, billig og lettilgængelig måde at påvise ALK-delen af fusionsproteinet uafhængigt af fusionspartneren. Metoden påviser således behandlingstarget (proteinet) direkte. Metoden er baseret på, at inversionen og fusionen af ALK-genet medfører en overexpression af en del af ALK-proteinet. ALK-molekylet er under normale omstændigheder ikke udtrykt efter fødslen, og man kan således slutte, at ALK-positivitet vurderet ved IHC er markør for EML4-ALK fusion. Såvel histologiske biopsier som nålekoagler fra cytologisk materiale kan anvendes. Der er ikke data på, hvor mange tumorceller materialet skal indeholde.

Konsekvensen af forskellig fiksering og anden forbehandling med hensyn til ALK IHC er dårligt belyst, men man må antage, at såvel over- som underfixering kan give anledning til falsk negative resultater. Der er ikke litteratur omkring anvendelse af hurtigprocederingsmaskiner.

De metoder, der bliver anvendt til påvisning af ALK i lymfomer, er ikke anvendelige, idet mængden af ALK i lungeadenokarcinomer er væsentlig mindre end i lymfomer. Der findes 3 ALK-antistoffer, beskrevet i litteraturen: 5A4 (Novocastra), D5F3 (Ventana) og ALK1 (Dako). 5A4 giver de bedste farveresultater. ALK1 kan ikke anvendes til lungecancer. Detektionssystemer med stor følsomhed bør anvendes f. eks. Refine (Novocastra), Flex+ (Dako) og Optiview (Ventana). Effektiv varmeinduceret epitopdemaskering (HIER) er afgørende for et godt IHC resultat, en alkalisk kogebuffer anbefales.

Positiv ALK-farvning er cytoplasmatisk og granulær. I større præparater (primært resektater) er der beskrevet variation i intensiteten, dette kan meget vel skyldes fixeringsartefakter. Der er forskellige anvisninger på gradering af farvning. H-score (histoscore), der anvender tre grader af positivitet og også tager hensyn til antal celler, har været foreslået. Gradering af farvningsintensitet kan imidlertid være subjektiv (9). En modificeret H-score i lighed med HER-2 gradering i mamma er derfor blevet foreslået. (9). Kraftig farvning (3+) kan ses i x2 eller x4 objektivet, moderat farvning (2+) behøver x10 eller x20 objektivet, mens svag farvning (1+) kun kan ses i x40 objektivet. Dette vil sandsynligvis blive modificeret/simplificeret, idet positive tumorer oftest vil ses med kraftig reaktion. Ved vurderingen skal være varsom med falsk positiv farvning især i makrofager, mucin og stroma. Positiv kontrol bør anvendes enten i form af cellelinie med verificeret ALK-translokation eller verificeret ALK translokeret pulmonalt adenocarcinom. Vi foreslår, at patologiafdelinger, der modtager operationsmateriale (tumorektomier, lobektomier og pulmonektomier) er behjælpelig med ALK positivt materiale til positiv kontrol og indkøring af metoder.

Konkordans mellem IHC og FISH:

I tre større studier er det vist, at der er 100% konkordans mellem IHC og FISH negativitet (9, 10 og 11). Disse studier viser også god konkordans mellem IHC3+ og FISH positivitet. I disse arbejder er klon 5A4 (Novocastra) anvendt. Der er desuden kasuistiske meddelelser om tumorer, der er IHC positive og FISH negative, som responderer på Crizotinib.

RT-PCR:

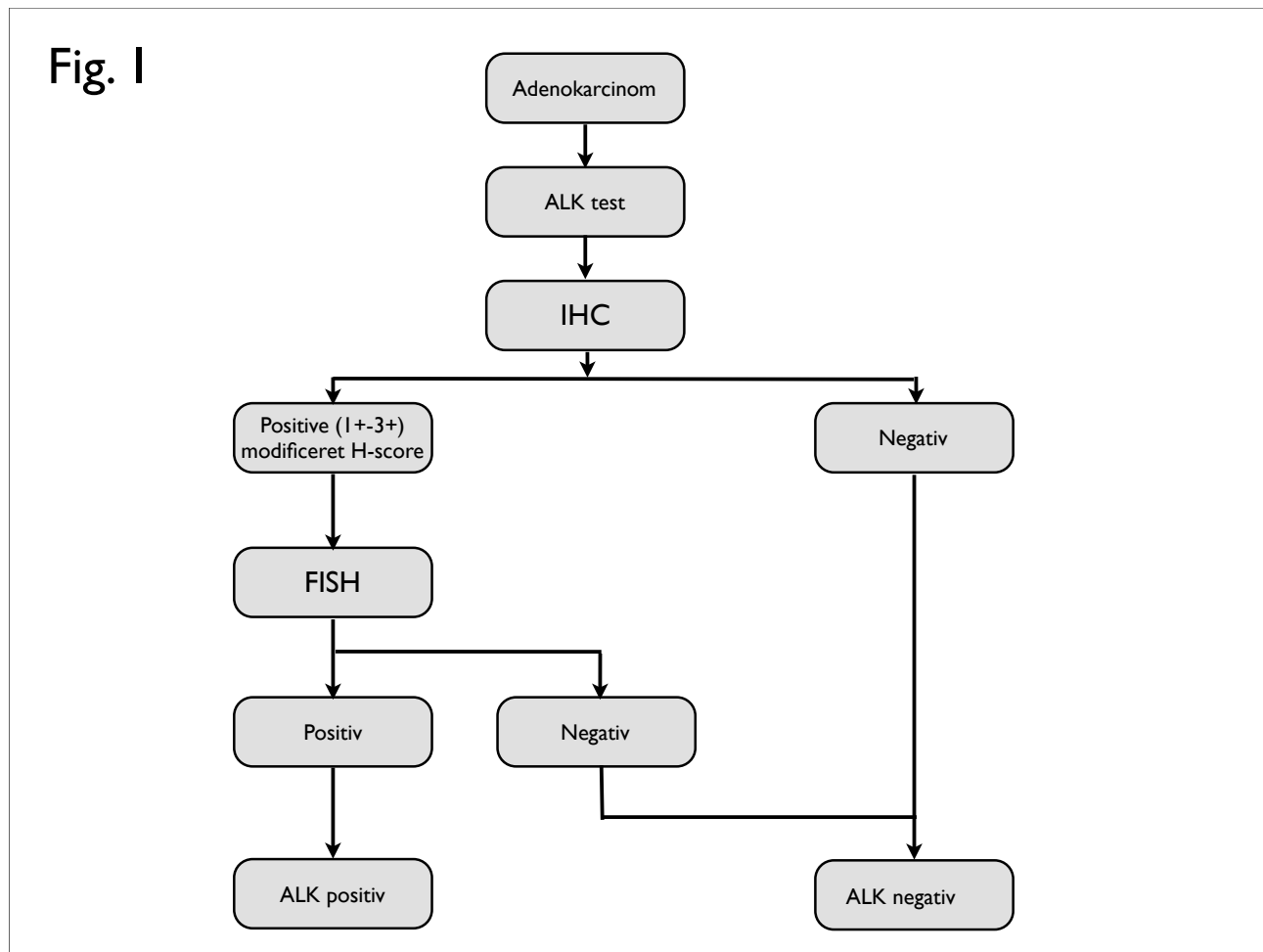
RT-PCR er en meget sensitiv metode til specifik påvisning af mRNA. I modsætning til IHC, der kun påviser tilstedeværelsen af ALK-protein, og FISH, der kun påviser split af ALK-delen, påviser RT-PCR EML4-ALK fusion. Imidlertid er der en del problemer ved anvendelsen af FFPE-væv, der gør, at metoden næppe vinder indpas i daglig diagnostik. For det første kræver metoden, for at vise alle varianter, at der findes intakt RNA på op til 1000 base-par (bp). I

FFPE-materiale vil der ofte være degradering af RNA, og 300 bp er det maximale, man kan oprense fra disse prøver. For det andet kræves multiplexing, idet der som beskrevet kan ses mange varianter, og for det tredje vil det ikke kunne påvises, hvis der opstår nye varianter for brudstedet. Der findes enkelte kommercielle kits, men der er ikke referencer på, at de virker i kliniske materialer.

Algoritme for testning:

Som ved andre tests anbefales det, at alle faser af testningen (pre-analytisk, analytisk og postanalytisk fase) varetages/kontrolleres af en patolog (i samarbejde med bioanalytiker og evt. molekylærpatologisk uddannet medarbejder) og at testen udføres på et så rigeligt materiale som muligt.

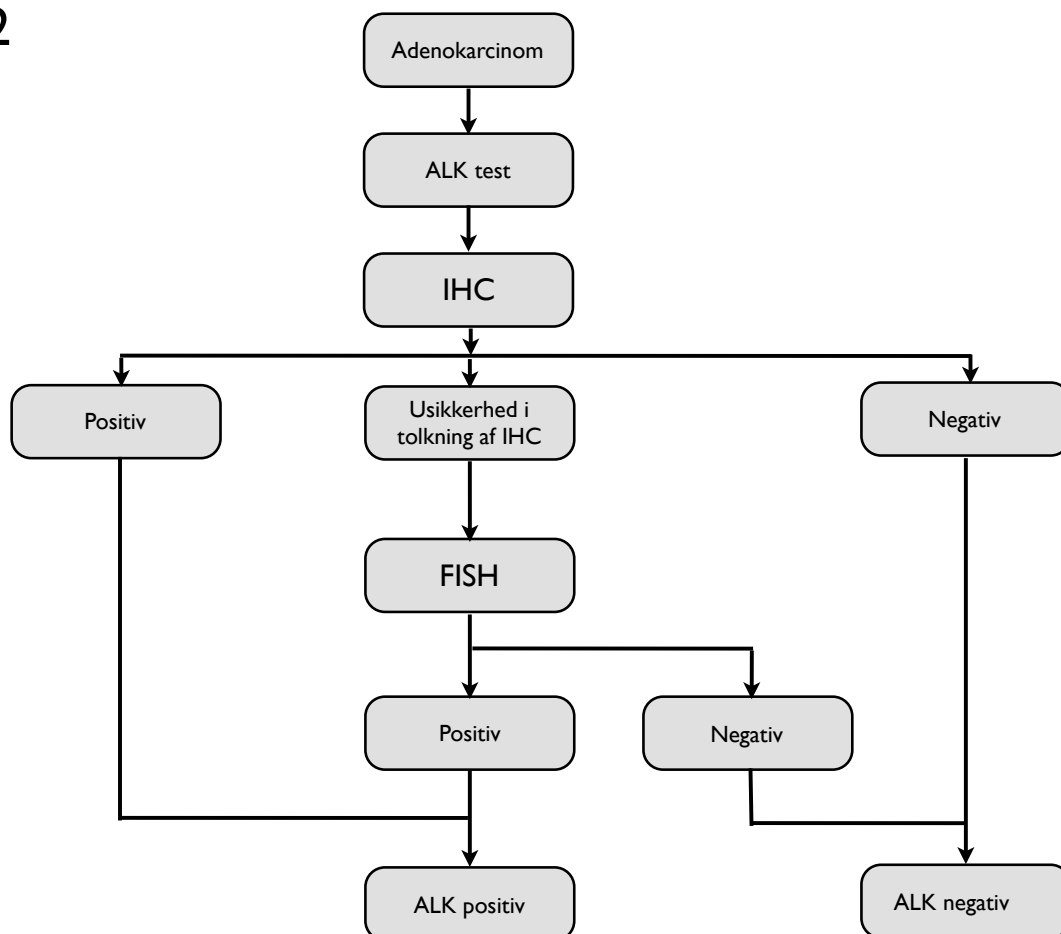
Følgende diagnostisk algoritme er traditionelt anvendt (Fig 1):



mandag den 13. maj 13

Som beskrevet ovenfor er der i litteraturen set god konkordans mellem IHC og FISH. Da det må forudsættes, at IHC er sat korrekt op, og der anvendes positiv kontrol, anbefales algoritmen i Fig. 2. Algoritmerne forudsætter at der anvendes histologisk materiale eller koagelmateriale fra finnål. Anvendes cytologi (udstrygninger) bør FISH anvendes primært.:

Fig. 2



mandag den 13. maj 13

Hvordan skal resultatet af testen rapporteres:

Mest hensigtsmæssigt skal svaret anføres som supplement til det rekvisitionsnummer, som analysen er lavet på.

Analysen skal kodes i SNOMED som følger:

F29211 ALK positiv

F29215 ALK negativ

Med anførelse af kode for IHC og/eller FISH:

P38003 immunhistokemisk undersøgelse, paraffinsnit

P33765 fluorescens in situ hybridisering (FISH)

Referencer:

1. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, Look AT (1994) Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-

- Hodgkin's lymphoma. *Sci- ence* 263:1281–1284.
2. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, Fujiwara S, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Bando M, Ohno S, Ishikawa Y, Aburatani H, Niki T, Sohara Y, Sugiyama Y, Mano H (2007) Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 448:561–566.
 3. Sasaki T, Rodig SJ, Chirieac LR, Janne PA (2010) The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 46:1773–1780.
 4. Takeuchi K, Choi YL, Soda M, Inamura K, Togashi Y, Hatano S, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Ishikawa Y, Mano H (2008) Multiplex reverse transcription-PCR screening for EML4-ALK fusion transcripts. *Clin Cancer Res* 14:6618–6624.
 5. Rodig SJ, Mino-Kenudson M, Dacic S, Yeap BY, Shaw A, Barletta JA, Stubbs H, Law K, Lindeman N, Mark E, Janne PA, Lynch T, Johnson BE, Iafrate AJ, Chirieac LR (2009) Unique clinicopathologic features characterize ALK-rearranged lung adenocarcinoma in the western population. *Clin Cancer Res* 15:5216–5223.
 6. Yoshida A, Tsuta K, Nakamura H, Kohno T, Takahashi F, Asamura H, Sekine I, Fukayama M, Shibata T, Furuta K, Tsuda H (2011) Comprehensive histologic analysis of ALK-rearranged lung carcinomas. *Am J Surg Pathol* 35:1226–1234.
 7. Schildhaus HU, Deml KF, Schmitz K, Meiboom M, Binot E, Hauke S, Merkelbach-Bruse S, Büttner R. Chromogenic in situ hybridization is a reliable assay for detection of ALK rearrangements in adenocarcinomas of the lung. *Mod Pathol*. 2013 Jun 7. doi: 10.1038/modpathol.2013.95. [Epub ahead of print]
 8. Ruschoff J, Dietel M, Baretton G, Arbogast S, Walch A, Monges G, Chenard MP, Penault-Llorca F, Nagelmeier I, Schlake W, Hofler H, Kreipe HH (2010) HER2 diagnostics in gastric cancer- guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. *Virchows Arch* 457:299–307.
 9. Yi ES, Boland JM, Maleszewski JJ, Roden AC, Oliveira AM, Aubry MC, Erickson-Johnson MR, Caron BL, Li Y, Tang H, Stoddard S, Wampfler J, Kulig K, Yang P (2011) Correlation of IHC and FISH for ALK gene rearrangement in non-small cell lung carcinoma: IHC score algorithm for FISH. *J Thorac Oncol* 6:459–465.
 10. Paik JH, Choe G, Kim H, Choe JY, Lee HJ, Lee CT, Lee JS, Jheon S, Chung JH (2011) Screening of anaplastic lymphoma kinase rearrangement by immunohistochemistry in non-small cell lung cancer: correlation with fluorescence in situ hybridization. *J Thorac Oncol* 6:466–472.
 11. Yang P (2011) Anaplastic lymphoma kinase (ALK) status and clinical outcomes by IHC and FISH: a retrospective study of never-smoker, adenocarcinoma lung cancer cases. *Lung Cancer* 71:S26–S28.