

Molekulare Diagnostik und Analyse von Tyrosinkinasen
für eine individualisierte Therapie primärer
Adenokarzinome der Lunge

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Kim Gruber
aus Heiningen

Tübingen
2016

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

03.05.2016

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Peter Ruth

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Matthias Schwab

Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	I
II.	Abkürzungsverzeichnis	IV
III.	Zusammenfassung	VII
IV.	Summary	IX
1.	Einleitung	1
1.1	Lungenkarzinome	1
1.2	Genetische Veränderungen in Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen	2
1.3	Tyrosinkinasen als molekulare Targets für eine individualisierte Therapie Nicht-Kleinzelliger Lungenkarzinome	3
1.3.1	EGFR	4
1.3.2	ALK	5
1.3.3	ROS1	10
1.3.4	LTK	13
1.3.5	Diagnostik aktivierter Tyrosinkinasen in Tumorzellen	14
1.4	Ziele der Arbeit	16
2.	Material und Methoden	17
2.1	Material	17
2.1.1	Geräte	17
2.1.2	Chemikalien, Reagenzien, Material	18
2.1.3	Puffer, Lösungen, Medien	19
2.1.4	Antikörper	20
2.1.5	FISH-Sonden	20
2.1.6	BAC-Klone	21
2.1.7	Zelllinien	21
2.1.8	Oligonukleotide	21
2.1.9	Kits	21
2.1.10	Verbrauchsmaterial	21
2.1.11	Programme	22
2.1.12	Tumormaterial	23
2.2	Methoden	24
2.2.1	Analyse der Genexpression	24
2.2.1.1	Isolation von RNA und DNA aus FFPE-Gewebe	24
2.2.1.2	Isolation von RNA und DNA aus Frischgewebe	25

2.2.1.3	Reverse Transkription der mRNA.....	25
2.2.1.4	PCR	25
2.2.1.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	26
2.2.1.6	Quantitative RT-PCR-Analyse.....	26
2.2.2	Gewebe-Microarrays	28
2.2.3	Analyse der Proteinexpression.....	28
2.2.4	Sequenzierung.....	30
2.2.5	Zellkultur	30
2.2.5.1	Kultivierung der Zellen.....	30
2.2.5.2	Herstellung von Zellpellets	31
2.2.5.3	Kryokonservierung der Zellen.....	31
2.2.6	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	31
2.2.6.1	Isolation und Verifizierung von BAC-Klonen	32
2.2.6.2	Herstellung von FISH-Sonden.....	33
2.2.6.3	Durchführung der Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung.....	33
2.2.6.4	Auswertung der Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierungen.....	33
2.2.6.5	Cut-off-Bestimmung.....	36
2.2.7	Statistik	36
3.	Ergebnisse.....	37
3.1	Aufbau einer Lungenkarzinom-Gewebe- und Datenbank.....	37
3.2	Identifizierung geeigneter Referenzgene für die qRT-PCR von Lungenkarzinomen	37
3.3	Detektion von aktiviertem ALK in Lungenkarzinomen	38
3.3.1	Etablierung eines qRT-PCR-basierten Assays zur Detektion von <i>ALK</i> -Rearrangierungen.....	38
3.3.2	Validierung des qRT-PCR-Assays und Screening nach <i>ALK</i> -Rearrangierungen.....	40
3.3.3	Einfluss des Tumorzellgehalts und der Größe des Gewebes auf die <i>ALK</i> -Expression	43
3.3.4	<i>ALK</i> -Proteinexpression in Relation zum <i>ALK</i> -Status.....	44
3.3.5	Klinisch-pathologische Charakteristika von <i>ALK</i> -positiven Lungenkarzinomen.....	46
3.3.6	Anwendung der qRT-PCR-Analyse in einer zweiten Serie	48
3.3.7	Vergleichende Analyse des neuen <i>ALK</i> -Antikörpers 1A4 und des D5F3/Ventana-Assays	51
3.3.8	Charakterisierung von Lungenkarzinomen mit Expression des <i>ALK</i> -Gesamttranskripts..	54
3.3.8.1	Mutationsanalyse der Kinasedomäne	54
3.3.8.2	Analyse der Expression der <i>ALK</i> -Liganden MDK und PTN	55
3.3.8.3	Analysen zur Autophosphorylierung von <i>ALK</i> und Aktivierung von <i>ALK</i> -Targetproteinen	56
3.4	Charakterisierung von <i>ROS1</i> im Lungenkarzinom	59

3.4.1	Etablierung eines qRT-PCR-Assays zur Detektion von <i>ROS1</i> -Rearrangierungen und Analyse der <i>ROS1</i> -Expression im NSCLC.....	59
3.4.2	Validierung des qRT-PCR-Assays und Screening nach <i>ROS1</i> -Rearrangierungen.....	60
3.4.3	Identifizierung von <i>ROS1</i> -Transkriptvarianten	64
3.4.4	Analyse der Proteinexpression von <i>ROS1</i>	69
3.4.5	Sequenzierung der Kinasedomäne von <i>ROS1</i>	72
3.4.6	Klinisch-pathologische Charakteristika <i>ROS1</i> -rearrangierter NSCLC	72
3.5	Analyse von <i>LTK</i> in Lungenkarzinomen.....	73
3.5.1	Etablierung eines qRT-PCR-Assays zur Charakterisierung der <i>LTK</i> -Expression.....	73
3.5.2	Etablierung einer break-apart FISH für die Analyse von <i>LTK</i> -Rearrangierungen.....	77
3.5.3	Identifizierung von <i>LTK</i> -Transkriptvarianten.....	78
4.	Diskussion.....	81
4.1	Referenzgene für die qRT-PCR-Analyse von Lungenkarzinomen	81
4.2	Molekulare Diagnostik einer <i>ALK</i> -Aktivierung in NSCLC.....	82
4.2.1	Etablierung und Validierung eines qRT-basierten Assays zur Detektion von <i>ALK</i> -Rearrangierungen.....	82
4.2.2	Immunfärbungen zur Identifizierung <i>ALK</i> -rearrangierter NSCLC.....	86
4.2.3	Lungenkarzinome mit <i>ALK</i> -Gesamttranskript-Expression.....	88
4.2.3.1	Mutationsanalyse der Kinasedomäne von NSCLC mit <i>ALK</i> -Gesamttranskript-Expression	88
4.2.3.2	Nachweis des aktivierten <i>ALK</i> -Proteins in FFPE-Gewebe.....	89
4.2.3.3	Nachweis der Aktivierung <i>ALK</i> -induzierter Signalwege an FFPE-Gewebe	90
4.2.3.1	Charakterisierung der Genexpression von <i>ALK</i> -Liganden.....	91
4.3	Detektion und Analyse von <i>ROS1</i> in Adenokarzinomen der Lunge	92
4.3.1	Etablierung und Validierung eines qRT-PCR-basierten Assays zur Detektion einer <i>ROS1</i> -Rearrangierung und Charakterisierung der <i>ROS1</i> -Expression.....	92
4.3.2	Immunfärbungen zur Detektion <i>ROS1</i> -rearrangierter NSCLC	94
4.3.3	Expression von <i>ROS1</i> -Transkriptvarianten	96
4.4	Charakterisierung von <i>LTK</i> in NSCLC	98
4.5	Empfehlung für die <i>ALK</i> - und <i>ROS1</i> -Diagnostik.....	102
4.6	Ausblick.....	103
V.	Literaturverzeichnis.....	105
VI.	Selbstständigkeitserklärung	129
VII.	Danksagung	130
VIII.	Anhang.....	131

II. Abkürzungsverzeichnis

<i>ACTB</i>	<i>actin, beta</i>
<i>Act</i>	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog</i>
<i>ALCL</i>	<i>anaplastic large cell lymphoma</i>
<i>ALK</i>	<i>anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase</i>
<i>APC</i>	<i>adenomatous polyposis coli</i>
<i>AS</i>	Aminosäure(n)
<i>ATM</i>	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
<i>BAC</i>	Bacterial Artificial Chromosome
<i>BRAF</i>	<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>
<i>bp</i>	Basenpaare
<i>bzw.</i>	beziehungsweise
<i>CLCT</i>	<i>clathrin heavy chain</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
<i>cDNA</i>	complementary Deoxyribonucleic acid
<i>c-KIT</i>	<i>v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i>
<i>COX4I1</i>	<i>cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1</i>
<i>CSF1R</i>	<i>colony stimulation factor 1 rezeptor</i>
<i>CT</i>	Cycle threshold
<i>DMSO</i>	Dimethylsulfoxid
<i>DNA</i>	Deoxyribonucleic acid
<i>DSMZ</i>	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>EDTA</i>	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>EGFR</i>	<i>epidermal growth factor receptor</i>
<i>EML4</i>	<i>echinoderm microtubule associated protein like 4</i>
<i>EZR</i>	<i>ezrin</i>
<i>Ex.</i>	Exon
<i>FBS</i>	Fetal bovine serum
<i>FGFR3</i>	<i>fibroblast growth factor receptor 3</i>
<i>FISH</i>	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
<i>FFPE</i>	Formalin-fixiert, paraffin-eingebettet
<i>(d)H₂O</i>	(destilliertes) Wasser
<i>GOPC</i>	<i>golgi-associated PDZ and coiled-coil motif containing</i>
<i>HCL</i>	Chlorwasserstoff
<i>HE</i>	Hämatoxilin-Eosin
<i>HEPES</i>	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
<i>IHC</i>	Immunohistochemistry
<i>IMT</i>	Inflammatorischer myofibroblastischer Tumor
<i>IRS-1</i>	<i>insulin receptor substrate 1</i>
<i>JAK2</i>	<i>janus kinase 2</i>
<i>JAK3</i>	<i>janus kinase 3</i>
<i>Jeb</i>	<i>jelly belly</i>
<i>JUN</i>	<i>jun proto-oncogene</i>
<i>KIF5B</i>	<i>kinesin family member 5B</i>
<i>KLC1</i>	kinesin light chain
<i>KPNA4</i>	karyopherin alpha 4

<i>KRAS</i>	<i>kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LB	Luria broth
<i>LDLa</i>	<i>low density lipoprotein class A</i>
<i>LMNB1</i>	<i>lamin B1</i>
<i>LRIG3</i>	<i>leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 3</i>
<i>LRP1B</i>	<i>low density lipoprotein receptor-related protein 1B</i>
LTK	<i>leukozyte receptor tyrosine kinase</i>
MAM	<i>merpin, A5 protein and receptor protein tyrosine phosphatase</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MENA	<i>Enabled homolog</i>
MET	<i>met proto-oncogene</i>
MDK	<i>midkine</i>
MYC	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
MYCN	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog</i>
<i>mTOR</i>	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NaSCN	Natriumisothiocyanat
NGS	next generation sequencing
<i>NKX2-1</i>	<i>NK2 homeobox 1</i>
<i>NPM</i>	<i>nucleophosmin</i>
<i>NRAS</i>	<i>neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog</i>
NSCLC	Non-small cell lung cancer
PBS(T)	Phosphate Buffered Saline (Tween)
PCR	Polymerase Chain Reaction
<i>PGK1</i>	<i>phosphoglycerate kinase 1</i>
<i>PI3K</i>	<i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i>
<i>PLCγ</i>	<i>phospholipase C, gamma 1</i>
<i>PTN</i>	<i>pleiotrophin</i>
<i>PTPN3</i>	<i>protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 3</i>
rek.	rekombinant
<i>RNF213</i>	<i>ring finger protein 213</i>
<i>RB1</i>	<i>retinoblastoma 1</i>
(m)RNA	(messenger) Ribonucleic acid
RACE	rapid amplification of cDNA-ends
<i>RON</i>	<i>macrophage stimulating 1 receptor</i>
<i>ROS1</i>	<i>ROS proto-oncogene 1</i>
RT	Reverse Transkription
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
s. Abb.	siehe Abbildung
SG	Spectrum Green
s. Kap.	Siehe Kapitel
<i>SLC34A2</i>	<i>solute carrier family 34 (type II sodium/phosphate cotransporter), member 2</i>
<i>SHC1</i>	<i>SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1</i>
SO	Spectrum Orange
SSC	Sodium chloride - sodium citrate buffer
<i>STAT3</i>	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>

<i>STK11</i>	<i>serine/threonine kinase 11</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBST	Tris-Buffered Saline-Tween
TE	Tris-EDTA-Puffer
<i>TFG</i>	<i>TRK-fused gene</i>
<i>tp53</i>	<i>Tumor protein p53</i>
<i>TPM3</i>	<i>tropomyosin 3</i>
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethane
u. a.	unter anderem
qRT-PCR	quantitative RT-PCR
<i>VEGF</i>	<i>vaskular endothelial growth factor</i>
<i>VEGFR</i>	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
<i>WNT</i>	<i>wingless-type MMTV integration site family</i>
<i>YWHAE</i>	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon</i>

Einheiten:

Mikroliter (μl), Milliliter (ml), Liter (l), Sekunde (s), Minute (min), Stunde (h), Nanogramm (ng), Mikrogramm (μg), Gramm (g), Mikromolar (μM), Millimolar (mM), Molar (M), Gewichtsprozent (% (w/v)), Volumenprozent (% (v/v)), Grad Celsius ($^{\circ}\text{C}$), Nanometer (nm), Volt (V), Umdrehungen pro Minute (rpm), Basenpaare (bp), Kilobasenpaare (kb)

III. Zusammenfassung

Die Entdeckung aberrant aktivierter Rezeptor-Tyrosinkinase wie EGFR, ALK und ROS1 in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) und die Entwicklung von Inhibitoren, die spezifisch die Tyrosinkinaseaktivität hemmen, ermöglichen eine zielgerichtete Therapie und stellen einen großen Fortschritt in der Behandlung von Lungenkarzinomen dar. Die Inhibitoren wirken ausschließlich in Tumoren mit aktivierter Kinase, sodass eine zuverlässige Diagnostik essentiell für eine erfolgreiche Behandlung ist. Während *EGFR*-Mutationen mittels PCR-basierter Methoden und Sequenzierungen nachgewiesen werden können, sind FISH-Analysen als Diagnostikstandard für Genrearrangierungen bei *ALK* und *ROS1* schwierig, zeit- und kostenintensiv.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden qRT-PCR-basierte Assays zur Identifizierung *ALK*- und *ROS1*-rearrangierter Tumore in der Routinediagnostik entwickelt, die für eine Verwendung an Paraffin-Gewebe konzipiert wurden, für Biopsie- und Resektatmaterial gleichermaßen geeignet sind und die aufgrund der gleichzeitigen Isolierung von RNA und DNA materialsparend mit der *EGFR*-Diagnostik kombiniert werden können. Der Nachweis basiert auf einer quantitativen Messung der exprimierten Fusionstranskripte, die Rearrangierungen anhand einer unbalancierten Amplifikation von Amplikons im 5'- und 3'-Bereich von *ALK* bzw. *ROS1* zuverlässig nachweist. Die entwickelten qRT-PCR-Assays wurden auf große NSCLC-Serien angewendet (*ALK*: 976 NSCLC, *ROS1*: 671 NSCLC) und einer vergleichenden Analyse mit FISH und Immunfärbungen unterzogen. *ALK*- und *ROS1*-Rearrangierungen konnten zuverlässig und sensitiv anhand der unbalancierten Genexpression nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden mit den qRT-PCR-basierten Analysen neue Subgruppen von NSCLC identifiziert, die eine erhöhte Gesamttranskript-Expression von *ALK* und *ROS1* ohne Genrearrangierung besaßen. Da rearrangierte Tumore unabhängig vom Fusionspartner und gleichzeitig Tumore mit einer erhöhten Expression identifiziert werden können, eignet sich der qRT-PCR-Assay auch zum Nachweis von *ALK*- und *ROS1*-Rearrangierungen in anderen Tumorentitäten, sowie zum Nachweis einer Überexpression wie z. B. einer erhöhten *ALK*-Expression in Neuroblastomen.

Da Immunfärbungen eine einfache und kostengünstige Screeningmethode darstellen, wurden in dieser Arbeit drei neu entwickelte ALK-IHC-Systeme (1A4, D5F3, D5F3/Ventana) in zwei Serien mit 250 bzw. 219 NSCLC (darunter 21 bzw. 20 *ALK*-rearrangierte NSCLC) sowie der ROS1-Antikörper D4D6 in einer Serie mit 251 NSCLC (darunter 8 *ROS1*-rearrangierte NSCLC) zum Nachweis von *ALK*- bzw. *ROS1*-Rearrangierungen getestet. Mit den ALK-Antikörpern wurden eine hohe Sensitivität von 95 – 100 % und eine Spezifität > 99 % erreicht. Auch die Sensitivität und Spezifität des ROS1-Antikörpers war mit einem falsch-positiv und einem falsch-negativ detektierten Fall sehr hoch, sodass im Ergebnis

dieser Arbeit ein Screening auf *ALK*- und *ROS1*-rearrangierte NSCLC mittels Immunfärbungen empfohlen wird. *ALK* und *ROS1* IHC-positive Tumore sollten zusätzlich mittels qRT-PCR oder FISH auf das Vorhandensein einer Rearrangierung getestet werden, da eine Unterscheidung zwischen Tumoren mit Rearrangierung und erhöhter Expression anhand der Proteinexpression nicht möglich ist. Mit diesem Vorgehen können NSCLC zuverlässig und kostengünstig sowie material- und zeitsparend auf *ALK*- und *ROS1*-Rearrangierungen untersucht werden.

Weiterführende Analysen ergaben Hinweise darauf, dass auch die in einer Subgruppe von NSCLC (1 %) detektierte Expression von *ALK*-Transkripten ohne Genrearrangierung zu einer Aktivierung von *ALK* führen kann. Die Expression von nicht-rearrangiertem *ALK* führte zu einer detektierbaren Menge an *ALK*-Protein. In einem der Fälle wurde ein potentiell aktivierender Aminosäureaustausch in der Kinasedomäne (S220Y) identifiziert. Die *ALK*-Expression der nicht-rearrangierten NSCLC war mit der Genexpression der *ALK*-Liganden *MDK* und *PTN* sowie der Aktivierung des *ALK*-Targets *STAT3* assoziiert, sodass *ALK*-exprimierende NSCLC-Zellen – in Analogie zu Neuroblastomzellen – mit *ALK*-Inhibitoren therapierbar sein könnten.

In dieser Studie wurde bei 8 % der NSCLC eine deutliche *ROS1*-Expression ohne Genrearrangierung beobachtet; in 25 % dieser Fälle waren Transkriptvarianten von *ROS1* exprimiert. Eine Sequenzanalyse von nicht-rearrangierten Fällen mit unbalancierter *ROS1*-Expression identifizierte 5 bislang nicht beschriebene Transkriptvarianten, denen eine unterschiedliche Anzahl von Exons im 5'-Bereich fehlten. Die Transkriptvarianten führen bei einer Translation zu verkürzten *ROS1*-Proteinen, die alternative Funktionen besitzen und tumorigen wirken könnten. Bei einem dieser Tumore wurde die Expression eines *ROS1*-Proteins mit Kinase-Domäne beobachtet.

Die Tyrosinkinase *LTK* ist aufgrund ihrer großen Homologie zu *ALK* ein interessanter Kandidat für eine zielgerichtete Therapie von NSCLC. In dieser Arbeit wurde erstmalig die Genexpression von *LTK* systematisch quantitativ und qualitativ in einer großen Serie von 542 NSCLC untersucht, sowie die Existenz von Genrearrangierungen in Lungenkarzinomen überprüft. Mit einer qRT-PCR-Analyse wurde in 9 % der NSCLC eine unbalancierte Expression des 3'-Bereichs identifiziert. *LTK*-Rearrangierungen wurden anhand von FISH-Analysen nicht nachgewiesen und scheinen in NSCLC keine Rolle zu spielen. Eine Untersuchung auf potentielle Transkriptvarianten identifizierte eine neue, in NSCLC-Tumorzellen exprimierte, *LTK*-Variante, bei der die Exons 2 – 7 fehlen. Das potentielle Translationsprodukt enthält die Kinasedomäne, jedoch nur einen Teil des extrazellulären Bereichs und eine veränderte Transmembrandomäne, was sich auf Lokalisation und Regulierung der Kinase auswirken sollte. Somit ist eine aberrante Aktivierung der Kinase

möglich, sodass *LTK* auch ohne Rearrangierung eine Relevanz für die Pathogenese und Therapierbarkeit von NSCLC besitzen könnte.

Die in dieser Arbeit identifizierten tumorspezifischen Expressionen von *ALK*-, *ROS1*- und *LTK*-Transkripten und Transkriptvarianten ist potentiell in der Pathogenese einer Subgruppe von NSCLC beteiligt. In weiterführenden Studien muss geklärt werden, ob die entsprechenden Tumore mit spezifischen Inhibitoren therapierbar sind.

IV. Summary

The identification of aberrantly activated receptor tyrosine kinases like EGFR, ALK and ROS1 in non-small cell lung cancer (NSCLC) and the development of specific kinase inhibitors enable a targeted therapy of patients and therefore constitute great progress in the treatment of NSCLC. Tyrosine kinase inhibitors are solely effective in tumors with activated kinases. The treatment of patients, therefore, requires a robust, predictive diagnostics in patients. While *EGFR* mutations can readily be detected by PCR-based methods and sequencing, the detection of rearrangements of *ALK* and *ROS1* by FISH, which is still the gold standard method, is laborious, time-consuming and cost-intensive.

One key aspect of this PhD thesis was the development of qRT-PCR-based screening assays for the detection of *ALK* and *ROS1* rearrangements, optimized for application in FFPE material, and suitable for both resection specimens as well as small biopsies. Especially, use in limited tissues due to small amounts of material and the possibility of simultaneous isolation of DNA for *EGFR* analyses and RNA for *ALK* and *ROS1* analyses was mandatory. The detection of rearrangements is based on the quantitative assessment of unbalanced transcription levels of fusion genes using a dual amplicon strategy targeting both the 5'- and 3'-region of *ALK* and *ROS1* genes. The qRT-PCR-assays were applied to large cohorts of NSCLC (*ALK*: 976 NSCLC, *ROS1*: 671 NSCLC), and results were compared with those from break-apart FISH and IHC. Rearrangements of *ALK* and *ROS1* were reliably identified by detection of unbalanced fusion transcript expression. Moreover, the assays identified novel subgroups of NSCLC, expressing full-length *ALK* and *ROS1* transcripts without gene rearrangements.

The qRT-PCR-based assays reliably identify *ALK* and *ROS1* rearranged tumors independent of the fusion partners and, in addition, highlight tumors with upregulated expression. They can be applied, therefore, for the detection of *ALK* and *ROS1* rearrangements in NSCLC as well as in other tumor types, and also for the detection of increased *ALK* expression levels, e. g. in neuroblastoma.

Since immunohistochemistry is an easy-to-perform and cost-effective screening method, three newly developed ALK IHC-systems (A14, D5F3, D5F3/Ventana) were applied to two cohorts of 250 and 219 NSCLC (including 21 and 20 rearranged cases), respectively. The

newly available ROS1 antibody D4D6 was tested in a cohort of 251 NSCLC (including 8 *ROS1*-rearranged NSCLC). The ALK antibodies showed both high sensitivity of 95 – 100 % and high specificity > 99 %. The ROS1 antibody also featured high sensitivity and specificity because just one false-positive and one false-negative case were detected. As a result of this study, immunohistochemistry turned out to represent a suitable screening method in order to clarify the status of both ALK and ROS1 in NSCLC. However, IHC-positive tumors should be further analysed with qRT-PCR or FISH because IHC cannot distinguish between tumors with *gene* rearrangements and tumors with upregulated expression only. Following this approach, a reliable analysis of the *ALK* and *ROS1* status in NSCLC is robust and both cost-effective as well as material and time-saving.

Further analyses provided an indication that activation of ALK may also be caused by an expression of different *ALK* transcripts in a subgroup of NSCLC (1 %). ALK protein was detected in cases expressing non-rearranged *ALK* transcripts, and sequence analyses identified a substitution of serine by tyrosine within the kinase domain (S1220Y) in one case. *ALK* expression was correlated with gene expression of the ALK ligands MDK and PTN and the activation of the ALK target STAT3, so that *ALK* expressing non-rearranged NSCLC cells might be accessible to treatment with ALK inhibitors, comparable with the situation in neuroblastoma cell lines.

In this study, 8 % of NSCLC showed *ROS1* expression without a gene rearrangement, and *ROS1* transcript variants were detected in 25 % of these cases. Sequence analysis of non-rearranged cases with unbalanced *ROS1* expression identified 5 novel transcript variants, exhibiting deletions of several exons within the 5'-region of *ROS1*. The transcript variants may result in truncated ROS1 proteins with alternative functions, which could be involved in tumor development. ROS1 protein expression including the kinase domain was detected in one tumor.

The receptor tyrosine kinase *LTK* is an interesting target for targeted therapy of NSCLC because of its strong homology to *ALK*. In this study, gene expression of *LTK* was systematically, qualitatively and quantitatively analysed in a cohort of 542 NSCLC, and the possible formation of gene rearrangements was examined.

A newly developed *LTK* qRT-PCR-assay identified an unbalanced 3'-*LTK*-expression in 9 % of tumors. FISH analyses could not detect any rearrangements of the gene, thus, *LTK* rearrangements are unlikely to occur in NSCLC. With regard to alternative transcripts, the 5'-portion of *LTK* was examined by sequence analyses, identifying a novel *LTK*-variant which exhibited a deletion of exons 2 – 7. In case of translation, the predicted protein would contain the kinase domain, a part of the extracellular domain and an altered transmembrane domain, which may result in an altered localisation and regulation of the tyrosine kinase. Therefore,

an aberrant activation of the tyrosin kinase seems possible, so that non-rearranged *LTK* might be relevant in tumor development and accessible to targeted therapy in NSCLC.

As turned out in this study, the tumor-specific expression of *ALK*, *ROS1* and *LTK* transcripts and transcript variants might be involved in the pathogenesis of a subgroup of NSCLC. Further studies will be required to examine whether such tumors might be candidates for targeted therapy approaches.

1. Einleitung

1.1 Lungenkarzinome

Lungenkarzinome sind mit 1,6 Millionen Neuerkrankungen und 1,4 Millionen Sterbefällen im Jahr 2008 weltweit eine der häufigsten malignen Erkrankungen (Jemal et al. 2011). Der größte Risikofaktor für die Entstehung ist der Tabakkonsum, Karzinogene wie Arsen, Radon, diverse Chemikalien und Umweltverschmutzung stellen weitere Risikofaktoren dar (Darby et al. 2005; Raaschou-Nielsen et al. 2013; Vineis et al. 2004). Bei Männern ist das Lungenkarzinom aufgrund des höheren Tabakkonsums weltweit die häufigste zum Tod führende maligne Erkrankung. Infolge des gestiegenen Tabakkonsums nimmt die Inzidenz bei Frauen zu (Bray und Weiderpass 2010; Jemal et al. 2011). Etwa 15 – 20 % der Karzinome entstehen bei Nichtrauchern. Diese unterscheiden sich in der Art und Häufigkeit von Mutationen sowie verschiedener prädiktiver Biomarker, wie z. B. *epidermal growth factor receptor (EGFR)*-Mutationen oder Rearrangierungen der *anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase (ALK)*, von den durch Tabakkonsum induzierten Tumoren (Govindan et al. 2012; Sun et al. 2007).

Lungenkarzinome entstehen aus entarteten Stammzellen epithelialer Zellen des Respirationstraktes und lassen sich in zwei verschiedene histologische Subtypen unterteilen. Kleinzellige Lungenkarzinome entwickeln sich aus Vorläufern neuroendokriner Zellen der Lunge und umfassen etwa 15 % der Lungenkarzinome. Nicht-kleinzellige Lungenkarzinome (NSCLC) bilden mit 85 % der Fälle die zweite Subgruppe und werden in die Subtypen Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome und großzellige Lungenkarzinome aufgeteilt. Das Adenokarzinom stellt den häufigsten Subtyp nicht-kleinzelliger Lungenkarzinome dar und ist gleichzeitig die häufigste Form bei Nichtrauchern (Travis et al. 2013). Die Prognose der Patienten ist aufgrund des fortgeschrittenen Stadiums bei der Diagnose in 85 % der Fälle sehr schlecht und liegt bei einer 5-Jahres Überlebensrate von etwa 10 – 15 % (Parkin et al. 2005; Youlden et al. 2008). Bei einer meist zufälligen Entdeckung in einem frühen Tumorstadium beträgt die 5-Jahres Überlebensrate etwa 50 % (Mountain 1997).

Die Behandlung erfolgt in den Stadien I und II generell operativ durch Resektion oder Lobektomie. Anschließend kann optional eine Chemotherapie oder Bestrahlung erfolgen, um verbliebene Tumorzellen zu zerstören (Wakelee et al. 2007). In fortgeschrittenen Stadien erfolgt eine Behandlung durch Strahlentherapie und/oder eine Cisplatin- bzw. Carboplatin-basierte und mit weiteren Agenzien wie Paclitaxel, Vinorelbin oder Gemcitabin kombinierte Chemotherapie (Azzoli et al., American Society of Clinical Oncology 2011; Ettinger et al. 2010). Zusätzlich werden Platin-basierte Kombinationen mit Bevacizumab, einem monoklonalen Antikörper, der die Interaktion des Wachstumsfaktors VEGF mit seinem

Rezeptor hemmt, verwendet (Sandler et al. 2006). Als Zweitlinientherapie werden Docetaxel, Pemetrexed und Erlotinib eingesetzt (Hanna et al. 2004; Shepherd et al. 2000; Shepherd et al. 2005). Trotz der Entwicklung von neuen Agenzien und Kombinationstherapien kann die Überlebenszeit der Patienten durch die Behandlung nur um wenige Monate verlängert werden. Die starken Nebenwirkungen der eingesetzten Chemotherapeutika führen außerdem zu einer deutlich verminderten Lebensqualität (Ettinger et al. 2010; Hoffman et al. 2000).

1.2 Genetische Veränderungen in Nicht-kleinzelligen

Lungenkarzinomen

Die Tumorguppe der NSCLC ist in Bezug auf genetische Veränderungen, die Histopathologie und Therapierbarkeit sehr heterogen. Plattenepithelkarzinome, großzellige Karzinome und Adenokarzinome besitzen jeweils eine unterschiedliche Tumormorphologie sowie verschiedene genetische Aberrationen, die bei Adenokarzinomen seit kurzem als Ansatzpunkt einer zielgerichteten Therapie dienen. Während der Pathogenese akkumulieren eine Vielzahl genetischer sowie epigenetischer Veränderungen, die in Adenokarzinomen in der Regel unabhängig vom histologischen Subtyp auftreten. Die Histologien umfassen azinäre, papilläre, bronchioloalveoläre oder solide Wachstumsmuster, teilweise mit einer Muzinproduktion der Tumorzellen. Bei etwa 80 % der Fälle tritt eine Kombination der Wachstumsmuster auf (Travis et al. 2011).

Der Erwerb genetischer und epigenetischer Veränderungen verschiedener Tumorsuppressorgene und Onkogene führt zu einer zunehmenden Dysregulation von Zellwachstum und Apoptose. Das Tumorsuppressorgen *TP53*, eines der am häufigsten in Tumoren mutierten Gene, ist in mehr als 50 % der NSCLC mutiert oder inaktiviert (Chiba et al. 1990; Takahashi et al. 1989). p53 reguliert Zellzyklus und Apoptose, Seneszenz und DNA-Stabilität (Suzuki und Matsubara 2011). Mutationen treten außerdem in den Tumorsuppressorgenen *CDKN2A*, *RB1*, *ATM*, *STK11*, *LRP1B* und *APC* auf (Ding et al. 2008; Packenham et al. 1995; Sanchez-Cespedes et al. 2002).

In NSCLC sind viele bekannte Onkogene mit Mutationen, Amplifikationen und Genfusionen von *KRAS*, *EGFR*, *NRAS*, *BRAF*, *MET*, *JAK2/3* oder *VEGFR* betroffen. Die genetischen Aberrationen der jeweiligen Onkogene betreffen kleine Subgruppen von 1 – 25 % der Tumoren und schließen sich generell gegenseitig aus (Ding et al. 2008; Pao et al. 2004; Rodenhuis et al. 1988; Sasaki et al. 2007; Herbst et al. 2008; Suda et al. 2011). Das Onkogen *KRAS* ist in etwa 25 % der Adenokarzinome der Lunge mutiert. *KRAS* ist ein GTP-bindendes Protein, welches in G-Protein gekoppelten Signalwegen involviert ist. Durch Mutationen in Exon 12 oder 13 wird die intrinsische GTPase-Aktivität inhibiert, sodass Ras nicht mehr in den inaktiven Zustand überführt werden kann. Die Folge ist eine zunehmende

Proliferation und Überleben von Zellen, da der MAPK-Signalweg unkontrolliert angeschaltet wird (Riely et al. 2008; Rodenhuis et al. 1988). *KRAS*-Mutationen sind mit einer schlechten Prognose assoziiert (Herbst et al. 2008). Zudem sind in der Tumorentstehung weitere Gene involviert, deren Genprodukte an Signalwegen beteiligt sind, wie z. B. Komponenten des MAPK-, WNT-, und des PI3K/Akt-Signalwegs (Kan et al. 2010; Lemmon und Schlessinger 2010).

Da die im Tabakrauch enthaltenen Karzinogene eine hohe Mutationsrate zur Folge haben, ist die Anzahl an somatischen Mutationen in Lungenkarzinomen von Rauchern um ein vielfaches (> 10) höher als in Lungenkarzinomen von Nichtrauchern (Govindan et al. 2012). In den Tumoren von Rauchern und Nichtrauchern sind außerdem unterschiedliche Gene mutiert. Bei Rauchern sind häufig *KRAS*, *TP53*, *JAK 2/3*, *BRAF* sowie Mismatch-Reparaturgene involviert, bei Nichtrauchern die Tyrosinkinase *ALK*, *EGFR* und *c-ros proto-oncogene 1 (ROS1)* (Ding et al. 2008; Govindan et al. 2012).

Ein weiteres Merkmal von Lungenkarzinomen stellt die genomische Instabilität dar. Diese umfasst Abweichungen des normalen Chromosomensatzes wie Polyploidien oder Aneuploidien sowie chromosomale Veränderungen wie z. B. Verluste oder Zugewinne verschiedener chromosomaler Regionen (Hanahan und Weinberg 2011; Weir et al. 2007).

1.3 Tyrosinkinase als molekulare Targets für eine individualisierte Therapie Nicht-Kleinzelliger Lungenkarzinome

In Adenokarzinomen der Lunge sind häufig Rezeptor-Tyrosinkinase an der Tumorentstehung und -progression beteiligt. Die membranassoziierten Proteine bestehen aus einer extrazellulären Domäne, die für die Ligandenbindung erforderlich ist, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne, welche die Kinasedomäne enthält. Durch Wachstumsfaktoren initiierte Signale werden durch Aktivierung und Dimerisierung des Rezeptors in das Zellinnere weiter gegeben. Dabei werden verschiedene Signalwege, wie beispielsweise der MAPK-, der PI3K/Akt- und der STAT3-Signalweg aktiviert (s. Abb. 1) (Hubbard 1999; Robinson et al. 2000). Rezeptor-Tyrosinkinase werden streng reguliert und besitzen in Bezug auf Zellwachstum, Proliferation und Überleben eine Schlüsselfunktion. In entarteten Zellen sind sie jedoch häufig aberrant aktiv, was eine erhöhte Zellteilung und ein unkontrolliertes Wachstum der Zellen zur Folge hat. Die aberrante Aktivierung kann durch verschiedene Mechanismen, wie z. B. Rearrangierungen oder Amplifikationen von Genen sowie Mutationen in der Kinasedomäne, die beispielsweise eine konstitutive Aktivierung des Proteins zur Folge haben, erfolgen. Die Entdeckung der aberrant aktivierten Tyrosinkinase und die Entwicklung spezifischer Inhibitoren hat die Therapie der Adenokarzinome der Lunge entscheidend verbessert: Tumoren mit aktiviertem EGFR, ALK oder ROS1 sind erfolgreich mit den entsprechenden Inhibitoren therapierbar. (Ettinger et al. 2010; Hojjat-Farsangi 2014).

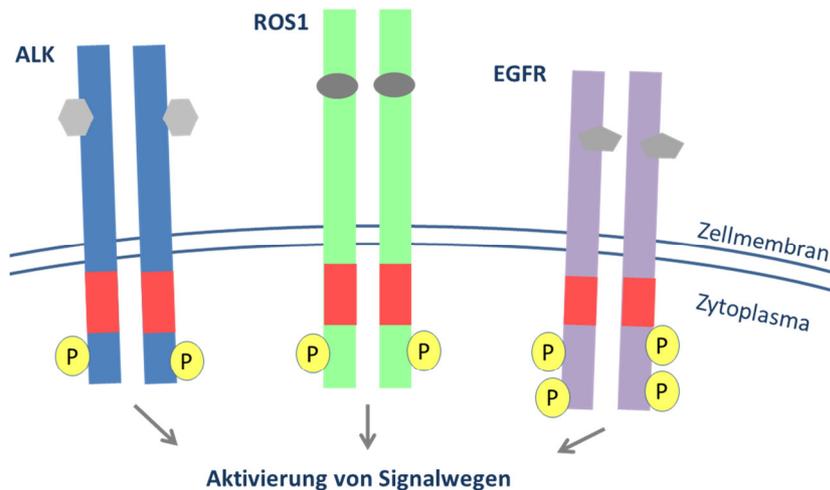


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Rezeptor-Tyrosinkinasen ALK, ROS1 und EGFR. Eine Liganden-induzierte Dimerisierung führt zu einer intrazellulären Phosphorylierung von Tyrosinresten und infolgedessen zu einer Aktivierung des Rezeptors. Spezifische Adaptorproteine können nun an den Rezeptor binden, ihrerseits weitere Zielproteine aktivieren und Signalkaskaden in Gang setzen.

1.3.1 EGFR

Die Entdeckung von somatischen Mutationen in *EGFR* im Jahr 2004 führte zu der ersten erfolgreichen, zielgerichteten Behandlung von Patienten mit Lungenkarzinomen (Lynch et al. 2004; Paez et al. 2004). Durch verschiedene Mutationen im Bereich der Kinasedomäne erfolgt eine Liganden-unabhängige, konstitutive Aktivierung der Rezeptor-Tyrosinkinase. Daraus resultiert eine unkontrollierte Aktivierung verschiedener Signalwege, wie z. B. des PI3K/Akt-, MAPK- und STAT3-Signalwegs. Die häufigsten Mutationen sind Deletionen in Exon 19 sowie die Punktmutation L858R in Exon 21. Die Inzidenz ist in asiatischen Ländern mit 20 – 30 % höher als in westlichen Ländern (10 – 15 %). Es gibt außerdem eine deutliche Korrelation zwischen *EGFR*-Mutationen und Nichtraucherstatus (Sharma et al. 2007; Shigematsu und Gazdar 2006; Marchetti et al. 2005). Die Therapie von Patienten mit *EGFR*-mutierten Tumoren mit den reversiblen EGFR-Inhibitoren Gefitinib oder Erlotinib zeigte in verschiedenen Studien Ansprechraten von über 70 % und ein deutlich verlängertes progressionsfreies Überleben im Vergleich zur Platin-basierten Chemotherapie (6 – 14 Monate, ca. 3 Monate mehr als bei der Chemotherapie). Ein längeres Überleben der Patienten konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Im Jahr 2009 wurde Gefitinib in Europa aufgrund dieser Studien zugelassen (Asahina et al. 2006; Sutani et al. 2006; Tamura et al. 2008; Mok et al. 2009).

Die Behandlung mit EGFR-Inhibitoren führt zur Apoptose der Tumorzellen, da ihr Wachstum und Überleben von dem konstitutiven EGFR-Signal abhängig ist. Nach einer gewissen Zeit entwickeln jedoch alle mit EGFR-Inhibitoren behandelten Lungenkarzinome eine Resistenz gegen die Therapie. Resistenzmechanismen beinhalten sekundäre Mutationen im Bereich der Kinasedomäne, *MET*-Amplifikationen und eine Aktivierung weiterer Rezeptor-

Tyrosinkinase (Engelman et al. 2007; Kobayashi et al. 2005; Pao et al. 2005). In etwa der Hälfte der Fälle tritt die *EGFR*-Punktmutation T790M auf, die zu einer strukturellen Änderung des Proteins führt und die Bindung der reversiblen Inhibitoren beeinflusst. Um die Patienten nach einer Resistenzbildung weiter behandeln zu können, werden daher neue EGFR- und MET-Inhibitoren getestet (Walter et al. 2013; Nelson et al. 2013; Lee, Schaefer, et al. 2013; Nanjo et al. 2013).

1.3.2 ALK

Mit der Entdeckung des Fusionsgens *echinoderm microtubule associated protein like 4 (EML4)-ALK* wurde im Jahr 2007 ein neues Onkogen in Lungenkarzinomen identifiziert. Durch die Genfusion entsteht ein chimäres Protein mit konstitutiver Tyrosinkinaseaktivität von ALK (Soda et al. 2007). In präklinischen Studien rearrangierter Tumoren zeigten Tyrosinkinase-Inhibitoren *in vitro* und *in vivo* eine Wachstumshemmung von Zellen bzw. eine Regression von Tumoren. Innerhalb kurzer Zeit folgten klinische Studien und die Zulassung des ALK-Inhibitors Crizotinib bei fortgeschrittenen Lungenkarzinomen im Jahr 2011 durch die Food and Drug Administration (FDA) (Koivunen et al. 2008; Kwak et al. 2010; McDermott et al. 2008; Shaw et al. 2009; Shaw et al. 2011; Soda et al. 2008).

Physiologie von ALK

Das auf Chromosom 2p23 lokalisierte *ALK* gehört zu der Insulinrezeptor-Superfamilie und kodiert für eine Rezeptor-Tyrosinkinase. Diese setzt sich, wie in Abbildung 2 dargestellt, aus einer intrazellulären Kinasedomäne, einer Transmembrandomäne und einer extrazellulären Liganden-Bindedomäne zusammen (Palmer et al. 2009). *ALK* wurde 1994 aufgrund der t(2;5) Translokation im Anaplastischen großzelligen T-Zell Lymphom (ALCL) entdeckt. Bestandteile des Fusionsproteins waren die Kinasedomäne von ALK und der 5'-Bereich von Nucleophosmin (NPM). NPM-ALK zeigte eine Liganden-unabhängige, konstitutive Aktivierung der Kinasedomäne von ALK (Morris et al. 1994; Morris et al. 1997). Als Liganden des ALK-Rezeptors wurden Midkin (MDK) und Pleiotrophin (PTN) beschrieben (Stoica et al. 2001; Stoica et al. 2002). MDK und PTN sind kleine Heparin-bindende Wachstumsfaktoren, die an der Entwicklung des Nervensystems, am Überleben von Zellen und an der Entstehung von Tumoren beteiligt sind (Kadomatsu und Muramatsu 2004; Muramatsu 2002). Während der Entwicklung des zentralen Nervensystems sind sowohl *ALK* als auch *PTN* und *MDK* sehr hoch exprimiert und lassen daher auf eine Rolle in der Entwicklung des Nervensystems schließen. In adultem Gewebe ist *ALK* außerhalb des zentralen Nervensystems kaum exprimiert (Iwahara et al. 1997; Kadomatsu und Muramatsu 2004; Li et al. 1990).

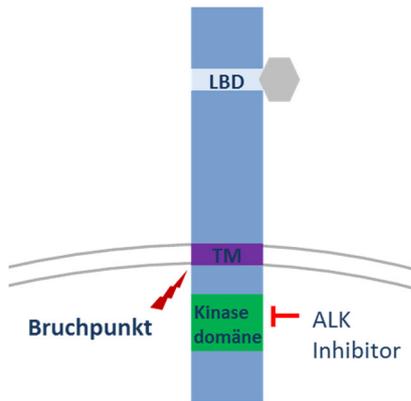


Abbildung 2: Schematische Darstellung von ALK. Die Rezeptortyrosinkinase besteht aus einer extrazellulären Domäne, die die Ligandenbindungsstelle (LBD) enthält, einer Transmembrandomäne (TM) und einer intrazellulären Domäne, welche die Kinasedomäne beinhaltet. Die Bruchpunktregion befindet sich im intrazellulären Bereich von ALK.

Die genaue Funktion von *ALK* in Vertebraten ist noch nicht bekannt. Die besser erforschte Funktion des hochkonservierten Gens in Invertebraten gibt jedoch Hinweise auf die Physiologie in Vertebraten (Morris et al. 1994). In *Drosophila melanogaster* wurde nachgewiesen, dass *Alk* an der Entstehung der Muskulatur des Darms beteiligt ist. Alk wird dabei durch den Liganden jelly belly (Jeb) aktiviert und stimuliert als Folge den MAPK-Signalweg. Dies führt zur Expression von bestimmten Transkriptionsfaktoren in Vorläuferzellen der Muskeln, welche die weitere Entwicklung determinieren (Englund et al. 2003; Lee et al. 2003). Weiterhin ist Alk an der Entstehung des visuellen Systems beteiligt und spielt eine Rolle bei neuronalen Verschaltungen während der Entwicklung des optischen Lobus (Liao et al. 2004). Alk ist außerdem an Mechanismen beteiligt, welche die Lernfähigkeit beeinflussen (Gouzi et al. 2011). Jeb-homologe Liganden wurden bisher in Vertebraten jedoch nicht gefunden. Jeb ist außerdem nicht in der Lage, den humanen Rezeptor zu aktivieren (Yang et al. 2007).

ALK- bzw. *PTN*- und *MDK*-Knockout-Mäuse zeigten keine sichtbaren Veränderungen. Allerdings konnten Veränderungen im Verhalten der Tiere sowie bei der Gedächtnisleistung beobachtet werden. Mit der Verhaltensänderung war eine Zunahme von Vorläuferzellen des Hippocampus assoziiert (Bilsland et al. 2008; Zou et al. 2006).

In Zellkulturexperimenten mit chimären *ALK*-Rezeptoren wurden nach einer Liganden-induzierten Aktivierung der Kinasedomäne von *ALK* eine transformierende Aktivität und eine Differenzierung von Zellen nachgewiesen, die auf eine Aktivierung des MAPK- und PI3K-Signalwegs zurückzuführen ist. (Souttou et al. 2001; Piccinini et al. 2002).

Aktivierung von Signalwegen durch ALK

Die meisten Informationen bezüglich der Aktivierung von Signalwegen wurden durch Untersuchungen von aberrant aktiviertem *ALK* in verschiedenen Karzinomen generiert. Die Funktion des Fusionsproteins NPM-*ALK* im ALCL ist am besten charakterisiert. Es wurde

nachgewiesen, dass aktiviertes ALK durch Phosphorylierung verschiedener Ziel- und Adaptorproteine unterschiedliche, ineinander greifende Signalwege aktiviert, z. B. den Ras/MAPK-, JAK/STAT-, PI3K/Akt- sowie PLC γ -Signalweg. Diese regulieren die Zellproliferation, beeinflussen das Überleben von Zellen und sind außerdem verantwortlich für Veränderungen des Zytoskeletts (Bai et al. 2000; Chiarle et al. 2005; Soda et al. 2008; Takezawa et al. 2011; Wellmann et al. 1997; Zamo et al. 2002).

Durch *in vitro*-Experimente wurde gezeigt, dass die Aktivierung von ALK außerdem zu einer erhöhten Zellmigration führt (Armstrong et al. 2004; Voena et al. 2007). Gleichzeitig konnten Veränderungen der Zellmorphologie beobachtet werden. Nervenzellen, Fibroblasten sowie Lymphozyten bekamen eine veränderte, variable Form, zeigten Ausstülpungen und einen Verlust der Zell-Matrix Adhäsion (Ambrogio et al. 2005; Motegi et al. 2004).

Die Intensität der Aktivierung von verschiedenen Signalwegen und damit die transformierende bzw. onkogene Wirkung der ALK-Fusionsproteine hängt von den jeweiligen Fusionspartnern ab (Armstrong et al. 2004; Lemmon und Schlessinger 2010). Bei verschiedenen Tumorentitäten sind daher Unterschiede in der Art und Aktivierung der verschiedenen Signalwege zu erwarten. Ob derartige Aktivierungsmechanismen und Signalwege in dieser Form auch für die Funktion des normalen ALK-Proteins charakteristisch sind, ist noch nicht bekannt.

ALK in verschiedenen Tumorentitäten

ALK ist in der molekularen Pathogenese verschiedener Tumorentitäten involviert. ALK-Fusionsproteine sind sowohl in soliden Tumoren als auch in malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems als Onkogene von Bedeutung. Bisher wurden mehr als 20 Gene identifiziert, die einen Translokationspartner darstellen (Ou et al. 2012). Das erste Fusionsprotein NPM-ALK wurde 1994 in ALCL entdeckt (Morris et al. 1994). ALCL sind T-Zell-Lymphome, die zu den Non-Hodgkin-Lymphomen gehören und häufiger bei Kindern sowie Jugendlichen auftreten (Falini et al. 1999; Stein et al. 2000). *ALK*-Fusionen betreffen etwa 46 – 60 % der ALCL, und für etwa 80 % der Fälle stellt *NPM* den Translokationspartner dar. Weitere Fusionspartner im ALCL sind z. B. *TFG*, *TPM3*, *CLCT* und *RNF213* (Cools et al. 2002; Hernández et al. 1999; Lamant et al. 1999; Touriol et al. 2000; Amin und Lai 2007).

Inflammatorische myofibroblastische Tumoren (IMT) sind ebenfalls häufig *ALK*-rearrangiert (Griffin et al. 1999). Diese Tumoren sind mesenchymalen Ursprungs und kommen häufig bei Kindern und Jugendlichen vor (Coffin et al. 1995; Janik et al. 2003). *ALK*-Translokationen werden in etwa 50 % der IMT nachgewiesen. Fusionspartner sind z. B. *TPM3*, *TPM4* und *CLTC* (Coffin et al. 2001; Gleason und Hornick 2008).

ALK-Translokationen wurden mit geringer Frequenz in Lungenkarzinomen sowie in verschiedenen soliden Tumoren wie Mammakarzinomen, Ovarialkarzinomen,

Kolonkarzinomen und Nierenzellkarzinomen nachgewiesen (Lin et al. 2009; Lipson et al. 2012a; Ren et al. 2012; Sukov et al. 2012).

In Tumoren sind jedoch nicht nur *ALK*-Rearrangierungen relevant, sondern auch eine erhöhte Expression des Gens sowie Mutationen im Bereich der Kinasedomäne. In Neuroblastomen führen *ALK*-Mutationen zu einer Aktivierung der Kinasedomäne. Neuroblastome entstehen aus undifferenzierten Zellen der Neuralleiste und stellen die häufigste Krebserkrankung von Kindern im ersten Lebensjahr dar (Maris et al. 2007). Es wurden mehrere Mutationen identifiziert, die die Aktivität von *ALK* beeinflussen und zu einer erhöhten Kinaseaktivität führen. In etwa 85 % der Fälle sind die Aminosäuren F1174 und R1275 betroffen (Chen et al. 2008; Janoueix-Lerosey et al. 2008; George et al. 2008). Einige Neuroblastome zeigen zusätzlich eine erhöhte Expression von *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog (MYCN)*. Patienten, die *ALK*-Mutationen oder eine Überexpression und *MYCN*-Amplifikationen besitzen haben eine sehr schlechte Prognose (De Brouwer et al. 2010; Schulte et al. 2011).

Eine *ALK*-Expression ist außerdem in Glioblastomen sowie Glioblastom-Zelllinien bekannt. In Rhabdomyosarkomen und der Rhabdomyosarkom Zelllinie RH30 ist das Gesamttranskript von *ALK* ebenfalls exprimiert (Pillay et al. 2002; Morris et al. 1997). Die Expression des *ALK*-Liganden *PTN* scheint das Wachstum *ALK*-exprimierender Glioblastome positiv zu beeinflussen (Powers et al. 2002). In Tumoren der Schilddrüse wurden in exprimierten *ALK*-Transkripten zwei bisher nicht bekannte Mutationen gefunden, die zu einer erhöhten Kinaseaktivität führen (Murugan und Xing 2011).

ALK in Lungenkarzinomen

ALK-Translokationen treten in etwa 3 – 6 % der Patienten mit NSCLC auf. Diese Frequenz entspricht einer weltweiten Neuerkrankungsrate von etwa 80 000 Patienten pro Jahr (Rodig et al. 2009; Thunnissen et al. 2012; Wong et al. 2009; Jemal et al. 2011). Auffallend bei Patienten mit *ALK*-positiven Tumoren ist das oftmals frühe Erkrankungsalter. Wie bei Adenokarzinomen mit *EGFR*-Mutationen sind viele der Patienten Nichtraucher oder nur leichte Raucher (Inamura et al. 2009; Shaw et al. 2009). *ALK*-rearrangierte NSCLC sind fast ausschließlich Adenokarzinome und zeigen zum Teil ähnliche histologische Eigenschaften. Sie weisen häufig ein solides oder azinäres Wachstumsmuster auf, sind teilweise muzinös und enthalten oft Siegelringzellen (Nishino et al. 2012; Shaw et al. 2009; Yoshida et al. 2011). *ALK*-Fusionen, *EGFR*- und *KRAS*-Mutationen schließen sich bis auf wenige Ausnahmen gegenseitig aus (Wang et al. 2014).

Die im Jahr 2007 erstmals beschriebene Fusion von *ALK* und *EML4* ist die häufigste Translokation im NSCLC. Weitere Translokationspartner stellen *KIF5B*, *TFG*, *FGFR3*, *PTPN3*, *KLC1* und *HIP1* dar. Bei allen *ALK*-Fusionsgenen ist der 3'-Bereich von *ALK* ab Exon 20 enthalten (Jung et al. 2012; Majewski et al. 2013; Takeuchi et al. 2009; Togashi et

al. 2012; Fang et al. 2014; Soda et al. 2007). Alle bekannten Fusionspartner enthalten Domänen, die zu einer Dimerisierung des Fusionsproteins und damit zu einer Autophosphorylierung und konstitutiven Aktivierung der Kinasedomäne von ALK führen. Die Lokalisation der Fusionsproteine ist von dem Fusionspartner abhängig (Bischof et al. 1997; Choi et al. 2008; Hernández et al. 2002; Soda et al. 2007; Takeuchi et al. 2009).

EML4-ALK entsteht durch eine intrachromosomale Rearrangierung auf 2p, bei der durch eine kleine Inversion *inv(2)(p21p23)* der 5'-Bereich von *EML4* und der 3'-Bereich von *ALK* (Exon 20 – 29) fusionieren. Seit dem Jahr 2007 wurden mehr als 15 verschiedene *EML4-ALK* Varianten identifiziert, die eine unterschiedliche Anzahl an Exons von *EML4* und stets Exon 20 – 29 von *ALK* enthalten (Choi et al. 2008; Takeuchi et al. 2008; Soda et al. 2007). Die amino-terminale coiled-coil Domäne von *EML4* ist in allen Fusionsvarianten enthalten und für die Dimerisierung und Aktivierung des Fusionsproteins erforderlich (Soda et al. 2007).

Die onkogene Wirkung der verschiedenen *ALK*-Fusionen wurde in Zellkultur- und Mausmodellen bestätigt. Bei Versuchen mit NIH/3T3-Zellen sowie mit Ba/F3-Zellen zeigten die *EML4-ALK*-, *KIF5B-ALK*- und *TFG-ALK*-Fusionsproteine transformierende Eigenschaften. In transgenen Mäusen entwickelten sich nach einer Expression von *EML4-ALK* in der Lunge zahlreiche Adenokarzinome, die sich durch eine Behandlung mit *ALK*-Inhibitoren zurückbildeten (Soda et al. 2007; Soda et al. 2008; Takeuchi et al. 2009; Rikova et al. 2007). Die Zelllinien H3122 und H2228, die *EML4-ALK*-Translokationen tragen, konnten ebenfalls durch eine Behandlung mit *ALK*-Inhibitoren im Wachstum gehemmt werden (Koivunen et al. 2008; McDermott et al. 2008). Die erfolgreiche Behandlung von Zelllinien sowie Tumoren der transgenen Mausmodelle zeigt die Abhängigkeit der Tumorzellen von Überlebens- und Proliferationssignalen, die durch *ALK* induziert werden.

Crizotinib ist ein niedermolekularer Inhibitor, der ursprünglich als Inhibitor für *MET* entwickelt wurde. In der präklinischen Phase hemmte dieser erfolgreich eine Phosphorylierung und damit die Aktivität von *ALK* (Koivunen et al. 2008; McDermott et al. 2008; Settleman 2009). In klinischen Studien der Phasen I, II und III zeigten die Tumoren von Patienten mit *ALK*-Rearrangierung in 60 – 65 % der Fälle ein sehr gutes Ansprechen auf die Behandlung. Besonders auffallend war die im Vergleich zu einer Chemotherapie schnelle Besserung von Symptomen, hervorgerufen durch eine schnelle und massive Reduktion der Tumoren und Metastasen. Die Behandlung steigerte damit auch die Lebensqualität der Patienten deutlich. Im Vergleich zu einer Platin-basierten Chemotherapie waren die Nebenwirkungen sehr gering (Camidge et al. 2012). Die Remissionsdauer bis zur Progression der Tumoren betrug durchschnittlich 7,7 bis 9,7 Monate (Camidge et al. 2012; Kwak et al. 2010; Shaw et al. 2013). Aufgrund der positiven Ergebnisse erfolgte die Zulassung von Crizotinib in den USA im Jahr 2011 und in Deutschland bzw. Europa im Jahr 2012.

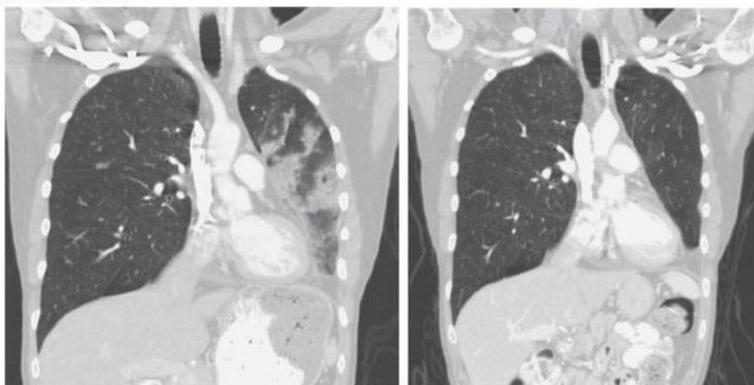


Abbildung 3: CT eines Patienten vor (links) und nach 2 Zyklen Crizotinibtherapie (rechts). Der Rückgang der Tumormasse im linken Lungenflügel ist deutlich zu erkennen. Im Vorfeld wurde eine Lobektomie des linken Lungenflügels durchgeführt. Veröffentlicht mit Genehmigung von (Kwak et al. 2010), Copyright Massachusetts Medical Society.

Die zeitlich begrenzte Wirksamkeit des ALK-Inhibitors in *ALK*-positiven Tumoren ist auf eine Resistenzentwicklung der Tumoren zurückzuführen. Vielseitige, heterogene Resistenzmechanismen führen zu einem Verlust der Wirkung von Crizotinib oder zu einem *ALK*-unabhängigen Wachstum durch Aktivierung weiterer Tyrosinkinase oder Signalwege. Als Resistenzmechanismen wurden sekundäre Mutationen im Bereich der Kinasedomäne nachgewiesen wie z. B. C1156Y, L1196M, G1269A und L11152R (Choi et al. 2010; Sasaki et al. 2011). Des Weiteren wurden *KRAS*- und *EGFR*-Mutationen identifiziert, sowie eine Zunahme der Kopienzahl des *ALK*-Lokus (Doebele et al. 2012). Infolge der Entdeckung von resistenzbildenden Mutationen wurde eine neue Generation von wirksamen *ALK*-Inhibitoren entwickelt. Der *ALK*-Inhibitor Ceritinib (LDK378) wurde im Jahr 2014 für die Behandlung von Patienten mit Crizotinib-Resistenz zugelassen. Neue *ALK*-Inhibitoren, unter anderem Alectinib (RO5424802/CH5424802), ASP3026, AP26113 und TSR-011, die ebenfalls bei Tumoren mit *ALK*-Resistenzmutationen eingesetzt werden können, zeigten bereits eine hohe Ansprechrate sowie eine gute Verträglichkeit und befinden sich derzeit in klinischen Studien. Das Ziel ist eine fortlaufende zielgerichtete Therapie der Patienten, die der Genetik des Tumors angepasst wird, um eine deutlich längere Überlebenszeit bei fortgeschrittenen Lungenkarzinomen zu erreichen (Shaw et al. 2014; Friboulet et al. 2014; Esfahani et al. 2014).

1.3.3 ROS1

ROS1-Rearrangierungen wurden in Lungenkarzinomen erstmals im Jahr 2007 beschrieben (Rikova et al. 2007). Anhand eines Proteom-Assays, mit dem phosphorylierte Tyrosinkinase in Lungenkarzinomen ermittelt wurden, erfolgte die Identifizierung der Fusionsproteine CD74-*ROS1* und SLC34A2-*ROS1*. Diese waren die ersten *ROS1*-Translokationen, die außerhalb von Glioblastomen charakterisiert wurden. Erste Behandlungen mit dem niedermolekularen Inhibitor Crizotinib zeigten aufgrund der Homologie zu *ALK* auch bei

ROS1-rearrangierten Lungenkarzinomen ein sehr gutes Ansprechen der Patienten (Chiari et al. 2014; Bos et al. 2013; Bergethon et al. 2012).

Physiologie und Funktionen von ROS1

ROS1 kodiert für eine Rezeptortyrosinkinase, die mit *ALK* und *LTK* (*leukocyte receptor tyrosine kinase*) verwandt ist, und zur Familie der *sevenless tyrosine kinase insulin receptor genes* gehört (Robinson et al. 2000). Das Protein besitzt wie *ALK* eine extrazelluläre N-terminale Domäne, eine Transmembran-Domäne und einen intrazellulär lokalisierten C-terminalen Bereich, der die Tyrosinkinasedomäne enthält (s. Abb.1). Über die Funktion von *ROS1* ist wenig bekannt (Acquaviva et al. 2009; Davies und Doebele 2013). Die Expression ist während der Embryonalentwicklung von Mäusen räumlich und zeitlich exakt reguliert und in Niere, Lunge und Darm nachzuweisen (Sonnenberg et al. 1991). Im Huhn wurde zusätzlich eine Expression in Hoden, Thymus und Schleimbeutel gezeigt. Das räumliche und zeitliche Expressionsmuster in Huhn und Maus unterscheidet sich deutlich (Chen et al. 1994). In humanem Gewebe wurde eine Genexpression von *ROS1*-Transkripten in Lunge, Cervix und Kolon beschrieben. Bei malignen Erkrankungen ist eine Expression in Tumoren, die vom zentralen Nervensystem ausgehen, sowie in 20 – 30 % der Lungentumoren nachgewiesen worden (Acquaviva et al. 2009; Bhattacharjee et al. 2001; Birchmeier et al. 1987; Garber et al. 2001). Die Proteinexpression ist in humanem Gewebe auf Niere, Cerebellum, periphere Nervenzellen, Kolon, Magen und Dünndarm limitiert. Eine sehr geringe Expression wurde in weiteren Geweben wie Nebenniere, Muskel und Kehlkopf nachgewiesen. In normalem Lungengewebe ist eine *ROS1*-Proteinexpression nicht bekannt (Rimkunas et al. 2012). Versuche mit Knockout-Mäusen zeigten eine Sterilität der Männchen, die auf Störungen im Nebenhoden zurückzuführen sind. Ansonsten wiesen die Mäuse keine phänotypischen Veränderungen auf (Sonnenberg-Riethmacher et al. 1996). *ROS1*-aktivierende Liganden sind bisher nicht bekannt. Untersuchungen, die auf chimären Rezeptoren basierten, deuten auf eine Aktivierung verschiedener Signalwege hin. Ein fusionierter Rezeptor, der die extrazelluläre Domäne von *EGFR* und die Kinasedomäne von *ROS1* enthielt, aktivierte nach Stimulation durch den Liganden *EGF* die *PI3K/AKT*-, *STAT3*- und *MAPK*-Signalwege (Nguyen et al. 2002; Xiong et al. 1996; Zong et al. 1998).

***ROS1*-Rearrangierungen in malignen Tumoren**

ROS1-Rearrangierungen treten in vielen verschiedenen malignen Tumoren auf. Glioblastome waren die erste Tumorentität, in der ein *ROS1*-Fusionsprotein nachgewiesen wurde. In der Glioblastom-Zelllinie U118MG führt keine Translokation, sondern eine kleine Deletion auf Chromosom 6 zu der Fusion des 5'-Bereichs von *GOPC* und des 3'-Bereichs von *ROS1*. Die transformierende Wirkung dieses Fusionsproteins wurde in Zellkultur- und Mausmodellen bestätigt (Charest et al. 2006; Rimkunas et al. 2012). *GOPC-ROS1*-Fusionen

wurden auch in NSCLC, Ovarialkarzinomen und Cholangiokarzinomen identifiziert (Birch et al. 2011; Gu et al. 2011; Rikova et al. 2007; Rimkunas et al. 2012).

In kolorektalen Adenokarzinomen und IMT existieren weitere Fusionspartner von *ROS1*, wie z. B. *SLC34A2*, *YWHAE* sowie *TFG*. In Lungenkarzinomen sind als Translokationspartner *SLC34A2*, *CD74*, *TPM3*, *EZR* und *LRIG3* bekannt. Die tumorigene Wirkung dieser Fusionsproteine wurde durch Zellkulturexperimente bestätigt. Eine Expression in NIH/3T3-, Rat-1- oder Ba/F3-Zellen zeigte eine transformierende Wirkung, führte zur Bildung von Foci, zu Veränderungen der Morphologie und einem kontaktunabhängigem Wachstum (Charest et al. 2006; Davies et al. 2012; Takeuchi et al. 2012). Die NSCLC Zelllinie HCC78, die eine *SLC34A2-ROS1*-Translokation trägt, konnte ebenfalls mit *ROS1*-Inhibitoren oder durch einen Knockdown von *ROS1* mittels siRNA Interferenz im Wachstum gehemmt werden (Davies et al. 2012; Lovly et al. 2011; Yasuda et al. 2012; Bergethon et al. 2012). In transgenen Mäusen wurde gezeigt, dass eine Expression von *EZR-ROS1* in der Lunge zu der Entwicklung von Adenokarzinomen und eine Expression von *GOPC-ROS1* in basalen Ganglien zu einer Entstehung von Astrozytomen führt (Arai et al. 2013; Charest et al. 2006). Alle bekannten Fusionsproteine enthalten die vollständige Kinasedomäne von *ROS1*. Die Anzahl der enthaltenen Exons von *ROS1* variiert jedoch: Fusionsgene enthalten den 3'-Bereich von *ROS1* ab Exon 32, 34, 35 oder 36 (Davies und Doebele 2013). Der Mechanismus, der zu einer Aktivierung der Kinasedomäne von *ROS1* führt, konnte noch nicht geklärt werden, da die Fusionspartner teilweise keine Dimerisierungsdomänen enthalten, die beispielsweise bei *ALK*-Fusionsproteinen zu einer Dimerisierung und Aktivierung der Kinasedomäne führen (Bischof et al. 1997; Soda et al. 2007). Die Lokalisation der *ROS1*-Fusionsproteine variiert je nach Partner und wurde im Zytoplasma, der Zellmembran sowie in der Membran des Golgi-Apparats nachgewiesen (*GOPC-ROS1*) (Rimkunas et al. 2012; Gu et al. 2011; Jun et al. 2012; Rikova et al. 2007).

***ROS1*-Rearrangierungen in Lungenkarzinomen**

ROS1-Rearrangierungen sind in circa 1 – 2 % der NSCLC zu finden (Davies et al. 2012; Takeuchi et al. 2012; Bergethon et al. 2012). Obwohl es sich damit nur um einen geringen Anteil der Lungenkarzinome handelt, entspricht dies jährlich weltweit etwa 20.000 Patienten, die mit *ROS1*-Inhibitoren behandelt werden könnten (Jemal et al. 2011). *ROS1*-Rearrangierungen betreffen generell Adenokarzinome und treten in derselben NSCLC-Subgruppe wie *ALK*-Rearrangierungen und *EGFR*-Mutationen auf. Die Patienten sind oft Nichtraucher und haben ein frühes Erkrankungsalter (Bergethon et al. 2012; Shaw und Solomon 2011; Shigematsu et al. 2005; Takeuchi et al. 2012).

Die Therapie von Patienten mit *ROS1*-rearrangierten NSCLC mit dem Inhibitor Crizotinib ist erfolgversprechend. Studienergebnisse zeigten ein Ansprechen von 72 % und damit vergleichbare Ergebnisse wie bei der Behandlung von Patienten mit *ALK*-Rearrangierungen

(Chiari et al. 2014; Shaw et al. 2014). Die Dauer der Wirksamkeit ist wie bei Behandlungen von *ALK*- und *EGFR*-positiven Tumoren mit spezifischen Inhibitoren aufgrund von Resistenzbildungen der Tumoren begrenzt (Awad et al. 2013; Davies et al. 2013; Shaw et al. 2014). Jedoch zeigen die neu entwickelten *ALK*-Inhibitoren Ceritinib (LDK378), ASP3026, Alectinib (CH5424802/RO5424802) und PF-96463922 ebenfalls Aktivität gegen *ROS1* (Esfahani et al. 2014). Ceritinib (LDK378) wird zurzeit in klinischen Studien an Patienten mit *ROS1*-Resistenzmutationen ihrer Tumoren getestet (NCT01772797).

1.3.4 LTK

LTK kodiert für eine Rezeptortyrosinkinase und gehört wie *ALK* und *ROS1* zu der Insulin Rezeptor-Superfamilie. Das Protein zeigt den für eine Rezeptor-Tyrosinkinase charakteristischen Aufbau aus einer extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne, einer intrazellulären Kinasedomäne und einem kurzen Carboxy-Terminus (Krolewski und Dalla-Favera 1991). Mit 57 % homologen Aminosäuren besitzt das Protein eine große Ähnlichkeit zu *ALK*, wobei die größte Übereinstimmung mit fast 80 % identischen Aminosäuren in der Kinasedomäne vorliegt (Morris et al. 1997; Roll und Reuther 2012). *LTK* ist mit 864 Aminosäuren deutlich kleiner als das aus 1620 Aminosäuren bestehende *ALK* (Toyoshima et al. 1993). Dies ist im Besonderen auf die Unterschiede in der extrazellulären Domäne zurückzuführen. *LTK* enthält im Gegensatz zu *ALK* keine MAM-Domäne sowie kein LDLa-Motiv (Krolewski und Dalla-Favera 1991). Die extrazellulären Glycin-reichen Domänen und NPXY-Motive sind in beiden Proteinen enthalten (Palmer et al. 2009).

Die Funktion und Liganden von *LTK* sind bisher weitgehend unbekannt. Eine Expression von *LTK* wurde erstmals im Jahr 1988 in Leukozyten nachgewiesen. In humanem Gewebe wurde eine Expression zudem in Prä-B Lymphozyten, B-Lymphozyten sowie anderen hämatopoetischen Zellen, Hirn und Plazenta detektiert (Ben-Neriah und Bauskin 1988; Kozutsumi et al. 1993). Untersuchungen in Modellorganismen weisen auf eine Beteiligung in der Entwicklung und dem Wachstum von verschiedenen Organen hin. Überexpressionen von *LTK* führten in transgenen Mausmodellen z. B. zu einer Hypertrophie des Herzens und einer Degeneration von Herzmuskelzellen. Viele der Mäuse, in denen *LTK* überexprimiert wurde, starben außerdem in den ersten Lebensmonaten (Honda et al. 1999). *Ltk*-mutierte Mäuse zeigten keine sichtbaren Beeinträchtigungen. Allerdings wurde eine Verhaltensänderung der Mäuse z. B. in der Aktivität und ihrem Angstverhalten beobachtet (Weiss et al. 2012). Im Zebrafisch ist *Ltk* an der Spezifizierung von Zellen der Neuralleiste beteiligt (Lopes et al. 2008).

Experimente mit chimären Rezeptoren zeigten eine Aktivierung verschiedener Signalwege, die für Wachstum, Überleben und Proliferation verantwortlich sind. Die Expression und Aktivierung des chimären Rezeptors *EGFR/LTK* führte in Prä-B Zellen durch Interaktionen

mit IRS-1 und SHC1 zu einer Aktivierung des Ras/MAPK-Signalwegs (Ueno et al. 1996). In hämatopoetischen Zellen ist eine Interaktion von LTK mit PI3K für die Generierung von Überlebenssignalen notwendig (Ueno et al. 1997). In Versuchen mit einem chimären CSF1R/LTK-Rezeptor führte die Aktivierung durch den Liganden CSF1 zu der Bildung von Ausstülpungen neuronaler Zellen. Dabei wurde gezeigt, dass der stimulierte CSF1R/LTK-Rezeptor in diesen Zellen zu einer Aktivierung der PI3K/Akt- und Ras/MAKP-Signalwege führt (Yamada et al. 2008).

LTK scheint außerdem eine Rolle in malignen Tumoren zu spielen. In Zellen von Leukämie-Patienten wurde eine erhöhte Expression von *LTK* nachgewiesen (Maru et al. 1990; Müller-Tidow et al. 2004). Auch in Lungenkarzinomen wurde eine Expression von *LTK* beschrieben. Diese ist mit einem erhöhten Risiko einer Metastasenbildung und einer Tumorprogression assoziiert, was darauf hindeutet, dass *LTK* als Onkogen in der Pathogenese des NSCLC beteiligt ist (Müller-Tidow et al. 2005). Das Gen stellt somit einen potentiellen Kandidaten für ein Therapietarget dar. Interessanterweise wurden somatische Mutationen in Adenokarzinomen der Lunge und in multiplen Myelomen identifiziert (Ding et al. 2008; Govindan et al. 2012; Huchtagowder et al. 2012). Ob die Mutationen die Genfunktion beeinflussen und damit Auswirkungen auf die Tumorentwicklung haben, wurde jedoch noch nicht untersucht.

1.3.5 Diagnostik aktivierter Tyrosinkinasen in Tumorzellen

Eine zielgerichtete Therapie von Patienten mit spezifischen Tyrosinkinase-Inhibitoren ist ausschließlich in Tumoren mit aktivierter Tyrosinkinase möglich. Eine zuverlässige prädiktive Diagnostik ist daher therapieentscheidend. Die Präselektion rearrangierter Fälle anhand von klinischen oder histologischen Charakteristika ist fraglich: Obwohl verschiedene Parameter wie junges Alter, Nichtraucherstatus und das Vorhandensein von Siegelringzellen bei Adenokarzinomen mit dem Auftreten von *ALK*- und *ROS1*-Rearrangierungen assoziiert sind, wurden Fusionsgene auch bei älteren, rauchenden Patienten gefunden. Daher ist für eine zielgerichtete Behandlung von Patienten mit NSCLC eine molekulare Diagnostik der genetisch veränderten oder aktivierten Kinasen unerlässlich (Hamburg und Collins 2010; Rodig et al. 2009). Während *EGFR*-Mutationen problemlos mittels PCR-basierter Methoden und Sequenzierungen nachgewiesen werden, ist der Nachweis von Genrearrangierungen bei *ALK* und *ROS1* schwierig (Gaughan und Costa 2011; Hantson et al. 2014; Thunnissen et al. 2012). Derzeit ist der diagnostische Nachweis von Rearrangierungen durch Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH), spezifische RT-PCR oder Immunfärbungen möglich.

Die FISH-Analyse stellt in der Molekulardiagnostik eine wichtige Methode zum Nachweis von Translokationen, Amplifikationen oder numerischen chromosomalen Veränderungen dar. Die Grundlagen der FISH werden in Kapitel 2.2.6 detailliert erläutert. Für den Nachweis von

Translokationen können break-apart- oder Fusionssonden eingesetzt werden. Die break-apart FISH ist derzeit die Standardmethode für die *ALK*- und *ROS1*-Diagnostik und wurde bei bisherigen klinischen Studien für die Identifizierung *ALK*- und *ROS1*-rearrangierter Tumoren verwendet (Kwak et al. 2010; Shaw et al. 2013; Shaw et al. 2014). Obwohl die FISH generell eine gut funktionierende und zuverlässige Nachweismethode von Translokationen darstellt, gibt es einige Nachteile. Problematisch sind der hohe Zeit- und Kostenaufwand und Schwierigkeiten bei der Auswertung. So konnten bei dem ersten deutschen QuIP-Ringversuch zur *ALK*-Diagnostik nur 60 % der Labore die Fälle korrekt mittels FISH diagnostizieren (von Laffert et al. 2014). Da keine Translokation, sondern eine intrachromosomale Rearrangierung zu der Bildung von *EML4-ALK* führt, liegen die FISH-Signale bei rearrangierten Tumoren relativ nah beieinander. Bei nicht intaktem bzw. partiell nekrotischem Gewebe können Signale leicht falsch-positiv interpretiert werden. Die Auswertung wird zusätzlich durch die in NSCLC häufig vorhandene Polyploidie erschwert und benötigt viel Erfahrung (Thunnissen et al. 2012; Camidge et al. 2010; Varella-Garcia 2010). Für das Screening einer großen Zahl von Lungenkarzinomen ist die FISH-Analyse folglich nur bedingt geeignet.

Für den diagnostischen Bereich stellen Immunfärbungen eine wichtige und sensitive Methode dar. Die Identifizierung von *ALK*-rearrangierten Lymphomen erfolgt beispielsweise nahezu ausschliesslich über den Nachweis der *ALK*-Proteinexpression. Bei Lungenkarzinomen ist die Expression der *ALK*-Fusionsgene niedriger als bei Lymphomen und kann durch den bei Lymphomen verwendeten Antikörper (*ALK1*) aufgrund seiner relativ geringen Sensitivität nicht sicher detektiert werden (Camidge et al. 2011; Yi et al. 2011). In den letzten Jahren wurden mehrere Antikörper mit erhöhter Sensitivität entwickelt und in Kombination mit sensitiven Detektionsmethoden getestet. Die ersten publizierten Daten weisen einige Unterschiede bezüglich der Spezifität von D5F3 sowie weiteren Antikörpern auf, in Summe sind die Ergebnisse mit den Antikörpern D5F3 und 5A4 jedoch vielversprechend (Paik et al. 2011; Rodig et al. 2009; Cabillic et al. 2014; Shan et al. 2014; Li, Pan, et al. 2013; V Laffert et al. 2013; Mino-Kenudson et al. 2010).

Bisherige immunhistochemische Untersuchungen von *ROS1*-rearrangierten Tumoren deuten auf einen spezifischen Nachweis der Fälle mit Hilfe des Antikörpers D4D6 hin (Rimkunas et al. 2012; Sholl et al. 2013). Es existieren jedoch widersprüchliche Daten, da eine Proteinexpression in einigen Studien auch in nicht-rearrangierten NSCLC detektiert wurde (Lee et al. 2013; Yoshida et al. 2013; Warth et al. 2014). Daher ist noch nicht klar, ob die Immunhistochemie für einen Nachweis von *ROS1*-Rearrangierungen geeignet ist.

Der Nachweis von *ALK*- oder *ROS1*-Fusionstranskripten kann auch durch die spezifische Amplifikation von Fusionstranskripten mittels RT-PCR erfolgen. Mit diesem Ansatz können verschiedene Fusionspartner sowie unterschiedliche Bruchpunkte, z. B. in *EML4*, spezifisch

nachgewiesen werden. Aufgrund der vielen Fusionsvarianten beinhalten die RT-PCR Assays meist nur die häufigeren Varianten, sodass diese Methode auf die Identifizierung bereits bekannter Fusionstranskripte limitiert ist. Nachteilig ist zudem, dass die spezifische RT-PCR meist auf der Verwendung kryokonservierten Gewebes basiert (Sanders et al. 2011; Takeuchi et al. 2008; Wu et al. 2013; Zhang et al. 2013; Arai et al. 2013; Yoshida et al. 2013).

1.4 Ziele der Arbeit

Für eine zielgerichtete Behandlung der Patienten ist eine zuverlässige Diagnostik aberrant aktivierter Tyrosinkinase essentiell. Ein wesentliches Ziel der Arbeit bestand daher darin, die prädiktive Diagnostik von Tumoren mit aktiviertem ALK oder ROS1 zu optimieren. Dazu sollten sensitive diagnostische Tests für den Nachweis von *ALK*- und *ROS1*-Rearrangierungen in Routine-FFPE-Material entwickelt werden, die auf dem quantitativen Nachweis der 3' Region von *ALK* und *ROS1*-Transkripten basieren. Nach der Etablierung an Zelllinien sollte eine große Kohorte von Lungenkarzinomen mit diesem qRT-basierten Assays untersucht werden, um die Zuverlässigkeit im Vergleich zur FISH-Analyse zu prüfen und in der Lungenkarzinom-Kohorte rearrangierte Fälle zu identifizieren. Durch die Expressionsstudien sollte gleichzeitig die Frage beantwortet werden, inwiefern Überexpressionen und Mutationen an der Pathogenese von Lungenkarzinomen beteiligt sind. Die molekularen Daten sollten zudem mit morphologischen und klinischen Parametern korreliert werden um den möglichen Wert einer Präselektion von Patienten zu untersuchen. Es sollte weiterhin die Frage geklärt werden, ob eine Identifizierung oder Präselektion *ALK*- und *ROS1*-rearrangierter Fälle auch durch Immunfärbungen mit neuen, sensitiven Antikörpern erfolgen kann. Eine vergleichende Analyse von FISH, qRT-PCR und IHC sollte einen Aufschluss geben, welche Methode am besten für die Detektion rearrangierter Tumoren geeignet ist.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Rezeptor-Tyrosinkinase *LTK* zu untersuchen, die aufgrund ihrer starken Homologie zu *ALK* einen interessanten Kandidaten für ein weiteres Targetmolekül darstellt. Da nur wenige Informationen über dieses Gen bekannt sind, sollte die Expression von *LTK* in Lungenkarzinomen analysiert, sowie eine Serie von Fällen auf potentielle Rearrangierungen untersucht werden. Dafür sollte eine qRT-PCR-Analyse nach demselben Prinzip wie bei *ALK* und *ROS1* verwendet werden. Des Weiteren sollte eine break-apart FISH etabliert werden, um potentiell rearrangierte Fälle überprüfen zu können. Im Falle einer Überexpression oder Rearrangierung sollten weitere Analysen von *LTK* erfolgen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Geräte	Hersteller
ABI 3500 DX genetic Analyzer	Applied Biosystems
Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Brutschrank New Brunswick Galaxy 170 S	Eppendorf
Bond Automated Immunohistochemistry & In-Situ Hybridisation System	Menarini Diagnostics
Cryo Freezing Container Mr. Frosty	Nalgene Nunc International
Cycler Veriti® 96-Well Thermal Cycler	Applied Biosystems
Cycler PTC 200	MJ Research
Cycler Mastercycler® gradient	Eppendorf
Cycler ABI 9700 96 well	Applied Biosystems
Dampfgarer OST 300	OK.
Dampfsterilisator Varioklav Typ 500	Varioklav
Gelkammer Wide Mini-Sub Cell GT	Biorad
Heizblock DB-2A	Techne
Heizplatte VHP-C10	VWR International
Inkubator, 37 °C T6	Heraeus
Inkubator, 56 °C T6	Heraeus
Leica DM 4000 B	Leica Microsystems
Leica DMRA	Leica Microsystems
Leica SCN400 Slide scanner	Leica Microsystems
Manual Tissue Arrayer MTA1	Estigen
Magnetrührer und Heizplatte MR2002	Heidolph
Mikrotom Leica RM2255	Leica Microsystems
NanoDrop 2000 Spektrophotometer	Thermo Scientific
PeqPower 300	Peqlab
Pipetten (L-2XLS, L-10XLS, L-20XLS, L-100XLS, L-200XLS, L-1000XLS)	Rainin
pH-meter Seven easy S20	Mettler Toledo
Scanner Epson Perfection 3200 Photo	Epson
Schüttler Titramax 100	Heidolph
Schüttelwasserbad 1083	GFL
Stickstofftank	Messer
Thermomixer compact	Eppendorf

Vortexer Reax top	Heidolph
Waage: XS4002S Delta Range	Mettler Toledo
Waage: AC 100	Mettler Toledo
Zentrifuge: Multifuge 3SR+	Heraeus
Zentrifuge Rotina 380R	Hettich
Zentrifuge Sorvall Superspeed RC2-13	Hormuth-Vetter
Zentrifuge 5417C	Eppendorf
Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge 5415R	Eppendorf

2.1.2 Chemikalien, Reagenzien, Material

Chemikalien, Reagenzien, Material	Hersteller/Lieferant
Agarose	Applichem
Ampicillin	Sigma-Aldrich
BAC-Klone	Imagenes
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich
CGH Metaphase Target Slides	Abbott Molecular
Cot-DNA	Roche
Dextransulfat	Roth
DMSO	Sigma-Aldrich
DNA Ladder 100 bp	Invitrogen
DNA Ladder Complete 100 bp	NORGEN
dNTPs	Promega
dNTP Set (100mM Sol.4 x 0,25 ml)	Norgen
Eindeckmedium: DePeX GurrR	VWR International
Einfrrierbox MR. FROSTY	Nalgene
Endogene Peroxidase Blocking-Solution (S2023)	Dako
Ethanol	Merck
FBS (Fetal Bovine Serum)	Gibco
Glycerin	Merck
Goat Serum	New England Biolabs
Green dUTP	Abbott Molecular
Hämatoxylin	Merck
HEPES	Merck
HotStarTaq DNA Polymerase	Qiagen
Human Fetal Normal Tissue Total RNA- Lung	BioCat
Isopropanol	Roth
Kanamycin	Roth
Ladepuffer	Invitrogen
L-Asparagin	Serva
L-Glutamin	Biochrom AG

Luria Agar	Sigma-Aldrich
Luria Broth	Sigma-Aldrich
2-Mercaptoethanol	Merck
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Natriumpyruvat	Gibco
NaSCN	Sigma-Aldrich
Nicht essentielle Aminosäuren	Biochrom AG
Nonidet P40	Roche
Orange dUTP	Abbott Molecular
Penicillin/Streptomycin, 5 x	Gibco/Invitrogen
Pepsin	Sigma-Aldrich
Rabbit Monoclonal Negative Control Ig	Roche
Reverse Transkriptase	Applied Biosystems
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Sephadex G-50	Sigma-Aldrich
SYBR Green	Abgene/Life Technologies
Tris	Roth
Triton X-100	Serva Electrophoresis
Tween 20	Fluka Analytik
Tween 80	Merck
Vectashield mit DAPI	Axxora
Ventana ALK 2 in 1 Control Slides	Roche

2.1.3 Puffer, Lösungen, Medien

Chemikalien, Reagenzien, Material	Hersteller/Lieferant
DMEM Flüssigmedium	Biochrom AG
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	AppliChem
Ethidiumbromidlösung (0,025 %)	Roth
L-Glutamine (200 mM)	Biochrom AG
LSI/WCP Hybridisierungspuffer	Abbott Molecular
Neoclear	Merck
Nuclease-Free Water	Ambion
PCR-Puffer, 10 x	Qiagen
PBS, 10 x	Biochrom AG
Peroxidase-Blocking Solution	DAKO
RPMI Flüssigmedium	Biochrom AG
Salzsäure (HCl) 1,0 mol/l	Th. Geyer GmbH
Signal Stain Antibody Diluent	New England Biolabs
Sodiumpyruvat (100 mM)	Gibco/Invitrogen

SSC Buffer 20 x Concentrate	Sigma-Aldrich
Target Retrieval Solution pH 6 (10 x)	Dako
Target Retrieval Solution pH 9 (10 x)	Dako
Tris-HCl	Roth
Trypanblau	Biochrom AG
Trypsin-EDTA (0,05 %)	Invitrogen

2.1.4 Antikörper

Primäre Antikörper	Spezies	Hersteller	Vorbehandlung	Verdünnung
ALK (D5F3)	rabbit	Cell Signaling	EDTA-Puffer (pH 9)	1:100
ALK (D5F3), Ventana	rabbit	Roche	Cell Conditioning 1	Ready to use
ALK (1A4)	mouse	Origene	Citratpuffer (pH 6)	1:50
Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP®	rabbit	Cell Signaling	Citratpuffer (pH 6)	1:50
Phospho-p44/42 MAPK (D13.14.4E) XP®	rabbit	Cell Signaling	Citratpuffer (pH 6)	1:400
Phospho-STAT3 (D3A7) XP®	rabbit	Cell Signaling	EDTA-Puffer (pH 9)	1:40
ALK pTyr1507	rabbit	Acris Antibodies GmbH	Citratpuffer (pH 6) EDTA-Puffer (pH 9)	1:100
Alk Phospho (pY1604) RabMAb®	rabbit	Epitomics	Citratpuffer (pH 6)	1:1000
ROS1 (D4D6)	rabbit	Cell Signaling	EDTA-Puffer (pH 9)	1:250
TTF-1 (8G7G3/1)	mouse	Dako	Citratpuffer (pH 6)	1:50

Sekundäre Antikörper, Amplifikation/Detektion	Hersteller	Verdünnung
EnVision™ FLEX+ Rabbit (LINKER)	Dako	Ready to use
EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse	Dako	Ready to use
Optiview Amplification Kit	Roche	Ready to use
Optiview Detection Kit	Roche	Ready to use
SignalStain® Boost IHC Detection Reagent (HRP, Rabbit)	Cell Signaling	Ready to use

2.1.5 FISH-Sonden

FISH-Sonden	Hersteller
ALK/EML4TriCheck™ Probe	Zytomed Systems
ALK Dual Color Break Apart Probe	Zytomed Systems
ROS1 Dual Color Break Apart Probe	Zytomed Systems

2.1.6 BAC-Klone

BAC-Klon	Hersteller
RP11-268D21	Imagenes
RP11-107F6	Imagenes
RP11-328J12	Imagenes
RP11-16O9	Imagenes

2.1.7 Zelllinien

Zelllinie	Hersteller
NCI-H2228 (CRL-5935)	ATCC
RH30	DSMZ
U118 MG	CLS
U343 MGa	CLS

2.1.8 Oligonukleotide

Alle verwendeten Primer wurden bei Eurofins MWG Operon bestellt und sind im Anhang aufgeführt.

2.1.9 Kits

Kits	Hersteller/Lieferant
AllPrep DNA/RNA FFPE Kit	Qiagen
AllPrep DNA/RNA Mini Kit	Qiagen
Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
BioPrime DNA Labeling System	Invitrogen
Express Gel Extraction Kit	Marligen
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Invitrogen
Rneasy FFPE Kit	Qiagen
SuperScript-First Strand Synthesis System for RT-PCR	Life Technologies
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen

2.1.10 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller/Lieferant
CryoTubes 1,8 ml SI	VWR
Deckgläser 24 x 50, 24 x 60, 24 x 24, 18 x 18 mm	VWR
Eppendorfgefäße 0,5; 1,5 und 2 ml	Eppendorf

Feather Microtome Blade A35	PFM medical
Filterspitzen 5 – 30 µl	Hartenstein
Filterpapier (folded qualitative filter paper 303) 150 mm	VWR
Fixogum	Marabu
Impfeschlingen	Sarstedt
MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied Biosystems
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode	Applied Biosystems
MicroAmp® Optical 384-Well Reaction Plate with Barcode	Applied Biosystems
Objektträger Super Frost 76 x 26 mm	VWR
Objektträger Superfrost Plus 76 x 26 mm	Thermo Scientific
PCR Tubes 8er Streifen 5 x 120 strips	Eppendorf
Petrischalen	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen	Rainin
Reaktionsröhrchen 50 ml (Centrifuge Tube)	Corning Incorporated
Reagenz-/Zentrifugenröhre 15 ml, 50 ml	Sarstedt
Schraub-Reaktionsgefäße 1,5 ml	Hartenstein
Schraub-Verschlüsse mit O-Ring	Hartenstein
Spritze 5 ml	B. Braun
Tissue Culture Flask T75CN Vent Cap Red	Sarstedt
96-well PCR plate, non skirted	Thermo Scientific

2.1.11 Programme

Programm	Hersteller/Lieferant
Analyse-it for Microsoft Excel	Analyse-it Software, Ltd
Chromas Lite Version 2.01	Technelysium Pty Ltd
3500 DX Data Collection Software	Applied Biosystems
GraphPad Prism 5.0	Graphpad Software
Isis Workstation Version 5.4	Metasystems
Leica Application Suite V4	Leica Microsystems
Leica SCN400 Client	Leica Microsystems
Sequence Detection Software 1.2.3	Applied Biosystems
Sequence Detection Software 2.3	Applied Biosystems

2.1.12 Tumormaterial

Verwendet wurde aus Resektionen oder Biopsien stammendes Formalin-fixiertes, paraffin-
eingebettetes (FFPE) Gewebe von 963 NSCLC-Patienten des Robert-Bosch-Krankenhauses
in Stuttgart. Die Diagnose erfolgte durch histologische Untersuchungen auf der Basis der
WHO-Klassifikation für Lungenkarzinome (Brambilla et al. 2001; Beasley et al. 2005; Travis
et al. 2011). Klinische Daten wie Alter, Geschlecht und Raucherstatus wurden erfasst. Ein
positives Votum der Ethikkommission der Eberhard-Karls-Universität Tübingen für die
Durchführung dieser Studie lag vor. Als Kontrollen wurde außerdem FFPE-Gewebe von
normalen Lungen, Lymphknoten und Magen verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Analyse der Genexpression

2.2.1.1 Isolation von RNA und DNA aus FFPE-Gewebe

Für die Isolation von RNA und DNA aus FFPE-Gewebe wurde das AllPrep DNA/RNA FFPE Kit von Qiagen verwendet. Dieses ermöglicht eine effiziente Isolation von RNA und DNA aus denselben Zellen und eignet sich besonders für Proben, bei denen sehr wenig Material vorhanden ist, wie zum Beispiel Biopsien. Wenn nur RNA oder DNA isoliert werden sollte wurde das RNeasy FFPE Kit bzw. das QIAamp DNA FFPE Tissue Kit von Qiagen verwendet. Diese Kits sind für die Isolation von RNA bzw. DNA aus FFPE-Gewebe mit bestmöglicher Qualität optimiert. Es werden Nukleinsäure-Modifikationen, welche durch die Fixierung mit Formalin entstehen und enzymatische Reaktionen beeinflussen können, entfernt.

Für die Isolation von RNA bzw. DNA wurden Gewebeschnitte mit 10 µm Dicke angefertigt. Um gezielt den Bereich mit dem höchsten Tumorgehalt zu isolieren und mögliche nekrotische Bereiche auszuschließen, wurde bei Resektaten eine Makrodissektion durchgeführt. Die Schnitte wurden dafür auf Objektträger gezogen. Schnitte von Biopsien wurden direkt in Eppendorf-Gefäße überführt. Die Anzahl der verwendeten Schnitte reichte von 2 bis 10 und war abhängig von der Größe des verwendeten Materials.

Die Entparaffinierung erfolgte bei den Objektträgern durch eine 15-minütige Inkubation in Neoclear, jeweils 5 min Inkubation in einer absteigenden Alkoholreihe mit 100 % (v/v), 95 % (v/v) und 70 % (v/v) Ethanol sowie 5 min Wässern in dH₂O. Das Tumorgewebe wurde jeweils mit einer neuen Pipettenspitze abgeschabt und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Zur Identifizierung des Tumorbereichs wurden Hämatoxylin-Eosin- (HE) gefärbte Schnitte, bei denen der Tumorbereich durch einen Pathologen markiert wurde, als Vorlage verwendet. Es folgte die RNA- und DNA-Isolation nach Anleitung des entsprechenden Kits von Qiagen.

Die Entparaffinierung der Schnitte in Eppendorfgefäßen erfolgte durch Zugabe von 1 ml Microclear. Nach 10 min Inkubation auf dem Schüttler wurde für 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser Schritt wurde mit 1 ml Microclear und 5 min Inkubation wiederholt. Nach erneutem Abzentrifugieren und Entfernen des Überstands wurde 1 ml 100 % (v/v) Ethanol zugegeben und gevortext. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt von 3 min bei 13000 rpm. Der Überstand wurde abpipettiert und die Zugabe von Ethanol wiederholt. Nach erneutem vortexen und zentrifugieren wurde der Überstand wieder abgenommen und das Pellet bei 37 °C für eine Stunde im Wärmeschrank getrocknet, um den restlichen Ethanol zu entfernen. Anschließend erfolgte die RNA- und DNA-Isolation nach Anleitung des entsprechenden Kits.

2.2.1.2 Isolation von RNA und DNA aus Frischgewebe

Die Isolation von RNA aus Frischgewebe wurde nach Anleitung des AllPrep DNA/RNA Mini Kits von Qiagen durchgeführt.

2.2.1.3 Reverse Transkription der mRNA

Die Umschreibung der mRNA in cDNA erfolgte mit Hilfe des High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits. Nach der mRNA-Isolation wurde deren Konzentration an einem Nanodrop Spektrophotometer gemessen und jeweils 1 µg RNA oder, bei zu geringer Konzentration, ein maximales Volumen von 10 µl RNA eingesetzt. Das Volumen der Proben wurde mit dH₂O auf 10 µl aufgefüllt. Der Mastermix wurde wie folgt angesetzt:

1 x Mastermix	Menge
Random Primer	2 µl
RT-Puffer	2 µl
dNTPs	0,8 µl
Reverse Transkriptase	1 µl
dH ₂ O	4,2 µl

Nach der Vorlage von 10 µl Mastermix in 0,2 ml Eppendorfgefäße wurden 10 µl RNA, 1 µg mRNA entsprechend, dazu gegeben. Es wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

Temperatur	Zeit
95 °C	10 min
37 °C	120 min
85 °C	5 s
4 °C	15 min

Anschließend erfolgte, je nach Bedarf, eine Verdünnung der cDNA auf 4 ng/µl bzw. 10 ng/µl.

2.2.1.4 PCR

Die verwendeten Primer wurden vor der Verwendung mit Hilfe einer Gradienten-PCR etabliert. Die Primer-Sequenzen sind im Anhang aufgeführt. Alle durchgeführten PCRs wurden, wenn nicht anders vermerkt, nach folgendem Schema durchgeführt:

1 x Mastermix	Menge
PCR-Puffer	2,5 µl
Primer Forward (10 pmol/µl)	2,5 µl
Primer Reverse (10 pmol/µl)	2,5 µl
dNTPs	1 µl
Taq-Polymerase	0,1 µl
dH ₂ O	15,4 µl

Zu 24 µl Mastermix wurden jeweils 1 – 2 µl cDNA oder DNA gegeben (2 – 20 ng).

PCR-Bedingungen:

95 °C	10 min	} 35/40 Zyklen
95 °C	30 s	
57 – 60 °C	30 s	
72 °C	60 – 90 s	
72 °C	10 min	
4 °C	15 min	

2.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Um PCR-Produkte zu verifizieren, wurden diese durch eine Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und die Fragmente mit einem Standard verglichen. Dazu wurde 5 µl PCR-Produkt mit 1 µl Ladepuffer versehen und ein 100 Basenpaar- (bp) DNA-Marker sowie ein Gel mit 2 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer und 3 Tropfen 0,025 % (w/v) Ethidiumbromid verwendet. Die Auftrennung erfolgte 30 min bei 100 V in 1 x TAE-Puffer in einer Gelelektrophoresekammer.

50 x TAE Puffer	Menge
Tris Base	242 g
Eisessig	57,1 ml
0,5 M EDTA Puffer (pH 8,0)	100 ml
dH ₂ O	auf 1 l auffüllen

EDTA-Puffer pH 8 (0,5 M)	Menge
EDTA	93,05 g
dH ₂ O	auf 0,5 l auffüllen

pH 8 mit NaOH-Plätzchen einstellen

2.2.1.6 Quantitative RT-PCR-Analyse

Quantitative (q)RT-PCR-Analysen wurden mit einem 7500 Real-time PCR System bzw. 7900HT Fast Real-Time PCR System von Applied Biosystems unter Verwendung des DNA-bindenden Fluorochroms SYBR green I durchgeführt. Da sich SYBR green nur an doppelsträngige DNA anlagern kann, korrelieren die detektierten Fluoreszenzsignale mit der Menge des entstehenden PCR-Produkts. Die Fluoreszenz wird nach jedem PCR-Zyklus detektiert und ermöglicht eine genaue Erfassung der Zunahme der PCR-Produktmenge (Ponchel et al. 2003). Die Spezifität der PCR wurde für jedes neue Primerpaar durch eine Schmelzkurvenanalyse überprüft.

Die Auswertung der qRT-PCR erfolgte durch eine relative Quantifizierung mit Hilfe der vergleichenden $\Delta\Delta CT$ - (cycle threshold) Methode. Dabei wird die Expression des Gens von Interesse mittels Referenzgen normalisiert und der erhaltene Expressionswert auf eine

Positivkontrolle normiert (Scheffe et al. 2006; Livak und Schmittgen 2001). Für die *ROS1*- und *LTK*-Analysen standen nur mäßig exprimierende Positivkontrollen zur Verfügung, weshalb diese Analysen mit Hilfe der Δ CT-Methode ausgewertet wurden: Die Expressionswerte für *ROS1* und *LTK* wurden mittels PGK normalisiert.

Eine Voraussetzung für ein aussagekräftiges Ergebnis ist bei allen Auswertungen eine möglichst konstante Expression des Referenzgens bei allen Proben. Im Vorfeld wurde die Expression von verschiedenen potentiellen Referenzgenen an einer Serie von Lungenkarzinomen, normaler Lunge und weiteren Geweben untersucht. Dabei konnte die *Phosphoglycerat-Kinase 1 (PGK1)* als sehr konstant exprimiertes Referenzgen identifiziert werden. Außerdem sollte die Effizienz der Amplikons von Referenz- und Zielsequenz möglichst identisch sein. Diese wurde durch einen Vergleich der Δ CT-Werte von Verdünnungsreihen der Matrizen bestimmt. Die Amplifikatgrößen bei qRT-PCR-Analysen lagen zwischen 64 und 86 Basenpaaren (bp). Alle Proben wurden als Duplikate gemessen und die CT-Werte gemittelt. Betrug die Differenz der CT-Werte einer Probe mehr als ein CT-Wert wurde die Messung wiederholt.

Der Mastermix der qRT-PCR setzte sich wie folgt zusammen:

Reagenzien	Menge 96 well	Menge 384 well
SYBR green I	12,5 μ l	6,25 μ l
Primer Forward (3 pmol/ μ l)	2,5 μ l	1,25 μ l
Primer Reverse (3 pmol/ μ l)	2,5 μ l	1,25 μ l
dH ₂ O	2,5 μ l	1,25 μ l
cDNA	5 μ l (4 – 10 ng/ μ l)	2,5 μ l (10 ng/ μ l)

Bedingungen der Real-time PCR (7500 Real-time PCR system):

Denaturierung	96 °C	5 min	
Amplifikation	96 °C	10 s	} 40 Zyklen
	60 °C	5 s	
	72 °C	30 s	
Schmelzkurve	95 °C	1 s	
	56 °C	15 s	
	95 °C	∞	

Bedingungen der Real-time PCR (7900HT Fast Real-Time PCR System):

Denaturierung	96 °C	5 min	
Amplifikation	96 °C	10 s	} 40 Zyklen
	60 °C	5 s	
	72 °C	15 s	
Schmelzkurve	95 °C	1 s	
	56 °C	15 s	
	95 °C	∞	

2.2.2 Gewebe-Microarrays

Gewebe-Microarrays wurden mit Hilfe des Manual Tissue Arrayer MTA1 von Estigen gefertigt. Dazu wurden jeweils Gewebe-Stanzen mit 0,6 mm Durchmesser aus einem Paraffinblock entnommen und in einen leeren Paraffinblock eingestanz. Der zu stanzende Tumor-Bereich wurde im Vorfeld von einem Pathologen definiert. Ein Tissue Array bestand aus Triplikaten von 30 – 55 Gewebeblöcken.

2.2.3 Analyse der Proteinexpression

Für die Analyse der Proteinexpression wurden 3 µm-Schnitte von FFPE-Gewebe geschnitten, auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 56 °C inkubiert, um eine gute Anhaftung des Gewebes zu gewährleisten. Dieser Schritt wurde von einer technischen Angestellten durchgeführt. Für die Immunhistochemischen Färbungen wurden 3 verschiedene Systeme eingesetzt:

- 1) Verwendung des Bond Automated Immunohistochemistry & In-Situ Hybridisation Systems von Menarini Diagnostics. Dabei erfolgte eine Hitze-induzierte Epitopfreisetzung mit 1 mmol/L EDTA- (pH 9) bzw. Citratpuffer (pH 6), eine Inkubation über 30 min mit dem jeweiligen Antikörper und Waschen sowie Detektion nach Herstellerangaben. Die Färbungen wurden von einer technischen Angestellten durchgeführt.
- 2) Die Färbungen mit Hilfe eines Ventana BenchmarkXT Instruments erfolgte vollautomatisch nach Protokoll des Herstellers mit Hilfe des Ventana anti-ALK-Antikörpers (D5F3), des Optiview Amplification Kits sowie des Optiview DAB IHC Detections Kits.
- 3) Weitere Immunhistochemische Färbungen (Phospho-p44/42 MAPK (D13.14.4E), Phospho-STAT3 (D3A7) und Phospho-ALK (pY1604)) wurden nach dem Protokoll des SignalStain Boost Detection Reagent von Cell Signaling durchgeführt. Das Entparaffinieren der Schnitte und die Überführung in wässriges Milieu erfolgte durch

eine Inkubation über 20 min in Neoclear, 2 Mal 10 min in 100 % (v/v) Ethanol, jeweils 5 min in 95 % (v/v) und 70 % (v/v) Ethanol und 2 Mal 10 min in dH₂O. Währenddessen wurde im Dampfgarer eine Küvette mit 10 mM Citrat- (pH 6) bzw. 1 mM EDTA-Puffer (pH 9) erhitzt. Anschließend wurden die Schnitte in den erhitzten Puffer überführt, für 30 min bei Sub-Koch-Temperatur inkubiert und danach für 30 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Alle weiteren Schritte erfolgten nach Hersteller-Protokoll. Die Färbungen wurden teilweise von einer technischen Angestellten durchgeführt.

Die Auswertungen erfolgten nach folgenden Kriterien: Mit der Intensität von 1+ wurden Schnitte bewertet, die eine schwache Färbung, die mit dem 10 x Objektiv gerade noch sichtbar war, in mindestens 10 % der Tumorzellen aufwies. Die mit einer Intensität von 2+ und 3+ bewerteten Schnitte wiesen eine mäßig bzw. stark positive Färbung in mindestens 10 % der Tumorzellen auf. Die D5F3/Ventana-Färbungen wurden als positiv klassifiziert, wenn eine starke, granuläre, zytoplasmatische Färbung vorlag. Eine schwache zytoplasmatische Färbung wurde nach Herstellerangaben als negativ eingestuft. Alle immunhistochemischen Färbungen wurden zusätzlich von einem Pathologen begutachtet.

TBST (10 x)	Menge
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	24,8 g
NaCl	80 g
KCl	2 g
Tween 20	1 ml
dH ₂ O	auf 1 l auffüllen

Hämalaun	Menge
Hämatoxylin	1 g
dH ₂ O	1 l
Natriumjodat	0,2 g
Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat	50 g
Chloralhydrat	50 g
Zitronensäure	1g

14 Tage offen stehen lassen, mehrmals umrühren

Citrat-Puffer pH 6 (100 mM)	Menge
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	29,4 g
dH ₂ O	auf 1 l auffüllen

pH 6 mit HCl einstellen

Blocking-Lösung (5 % NGS)	Menge
TBST (1 x)	5 ml
Normal goat serum	250 µl

2.2.4 Sequenzierung

Die Sequenzierungen nach der Kettenabbruch-Methode von Sanger wurden mit dem ABI 3500DX Genetic Analyzer von Applied Biosystems und dem Big Dye Terminator V.1.1 Cycle Sequencing Kit durchgeführt.

Nach der Amplifikation des zu sequenzierenden Bereichs wurde das PCR-Produkt mit Hilfe des PCR Purification Kits von Qiagen nach Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Alternativ erfolgte das Ausschneiden des PCR-Produkts aus einem Agarosegel und eine Aufreinigung mit Hilfe des Marligen Express DNA Extraction Kits nach Anleitung des Herstellers. Danach folgte die Durchführung der Sequenzier-PCR nach folgendem Schema:

Reagenzien	Menge
BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	2 µl
Primer (1 pmol)	1,6 µl
Aufgereinigtes PCR-Produkt	1 – 5,4 µl
H ₂ O (Nuklease-frei)	auf 10 µl auffüllen

Bedingungen der Sequenzier-PCR

96 °C	1 min	} 24 Zyklen
96 °C	10 s	
50 °C	5 s	
60 °C	4 min	
12 °C	10 min	

Um Primer und Oligonukleotide zu entfernen, wurden die Produkte der Sequenzier-PCR anschließend mit einer Sephadex G50-Säule aufgereinigt. Nach der Elektrophorese erfolgte die Auswertung der Proben mit Hilfe der 3500 DX Data Collection Software bzw. der Chromas Lite Software und der jeweiligen Referenzsequenz.

2.2.5 Zellkultur

2.2.5.1 Kultivierung der Zellen

Für die Etablierung der qRT-PCR-Assays und zur Kontrolle der Detektion von *ROS1* und *ALK* wurden geeignete Zelllinien bestellt, nach Herstellerangaben in Kultur genommen und bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Das Passagieren bei Erreichen der Konfluenz erfolgte mit Hilfe von Trypsin-EDTA (0,05 %). Zellzahlbestimmungen und eine gleichzeitige Kontrolle der

Viabilität wurden mit einer Neubauer-Zählkammer und der Verwendung von Trypanblau, einem Marker für tote Zellen, durchgeführt.

Zellen	Herkunft	Gen von Interesse	Medium	Hersteller
NCI H2228	Lungenkarzinom	EML4-ALK Fusion	RPMI 1640	ATCC
RH-30	Rhabdomyosarkom	ALK full length	RPMI 1640	DSMZ
U118 Mg	Glioblastom	FIG-ROS1 Fusion	DMEM	CLS
U343 Mga	Glioblastom	ROS1 full length	DMEM	CLS

Zusätze/500 ml Medium	Menge
FBS	10 % (v/v)
Penicillin / Streptomycin	0,1 g/l
HEPES pH 7,4	10 mM
L-Glutamin	2 mM
2Mercaptoethanol	0,05 mM
Natriumpyruvat	1 mM
Nicht essentielle Aminosäuren (100x)	3 ml
L-Asparagin (10 mg/ml)	0,13 mM

2.2.5.2 Herstellung von Zellpellets

Für eine Isolation von DNA und RNA wurden Zellpellets hergestellt. Dazu wurden die konfluenten Zellen trypsinisiert, 5 min bei 1400 rpm (4 °C) zentrifugiert und das Pellet mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach erneutem Pelletieren der Zellen wurden diese in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.5.3 Kryokonservierung der Zellen

Zur Kryokonservierung der Zellen wurden diese nach der Trypsinierung abzentrifugiert, in Einfriermedium aufgenommen, in Cryotubes überführt und mit Hilfe einer Einfrierbox graduell auf -80 °C abgekühlt. Die Lagerung erfolgt bei -196 °C in flüssigem Stickstoff.

Einfriermedium 5 %/10 % DMSO	Menge
Medium (RPMI1640 bzw. DMEM)	50 ml
DMSO 5 %/10 %	2,5 ml/5 ml

2.2.6 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Mit Hilfe einer FISH können strukturelle und numerische chromosomale Veränderungen, wie z. B. Amplifikationen, Deletionen oder Translokationen detektiert werden. Die Methode beruht auf der Hybridisierung fluoreszenz-markierter Sonden an komplementäre Zielsequenzen der DNA. Die numerischen Veränderungen oder Rearrangierungen können durch die Anzahl der Fluoreszenzsignale oder die Signalkonstellation unterschiedlich

markierter Sonden nachgewiesen werden. Die FISH wird beispielsweise in der Tumor- und Pränataldiagnostik verwendet (Hyytinen et al. 1994; Jehan et al. 2012; Joos et al. 1994; Szeles 2002; Trask 1991; Tsuchiya 2011).

2.2.6.1 Isolation und Verifizierung von BAC-Klonen

In dieser Arbeit wurden BAC-Klone (Imagenes) als DNA-Sonden für die FISH verwendet, die aufgrund ihrer relativen Lokalisation zum Gen *LTK* ausgewählt wurden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>). Für die Isolation wurde die Original-Bakteriensuspension auf einer LB-Platte mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Vor der Verwendung der BAC-Klone wurden Einzelkolonien durch eine Test-PCR mittels passender sequence tagged site- (STS) Marker verifiziert (www.ncbi.nlm.nih.gov/dbSTS/). STS-Marker sind definierte kurze DNA Sequenzen (200 – 500 bp) mit bekannter Lokalisation im Genom, die mittels PCR amplifiziert werden können und die korrekte Lokalisation des BAC-Klons im Genom bestätigen (Olson et al. 1989). Dazu wurden Einzelkolonien mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in vorbereitete Eppendorfgefäße direkt in den Mastermix gegeben. PCR und Gelelektrophorese wurden nach Standardbedingungen durchgeführt. Nachdem die Klone verifiziert waren, folgte die Isolation der DNA. Dazu wurden in 5 ml sterilem LB-Medium mit 12,5 µg/µl Antibiotikum aus den getesteten Einzelkolonien Vorkulturen angesetzt und über Nacht bei 37 °C im Rotationsschüttler inkubiert. Am nächsten Abend wurden 100 – 500 µl der Vorkultur in 100 ml LB-Medium mit 12,5 µg/µl Antibiotikum überimpft und über Nacht im Schüttelwasserbad bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag erfolgte die Isolierung der DNA unter Verwendung des Plasmid Midi Kits von Qiagen. Die Bakterienkultur wurde 15 min bei 4 °C und 5000 rpm abzentrifugiert, das Pellet mit 10 ml P1-Puffer mit 100 µg/µl RNase A resuspendiert, nach Zugabe von 10 ml gekühltem Puffer P3 mehrere Male über Kopf geschwenkt und 15 min auf Eis inkubiert. Die weitere Isolation erfolgte nach Protokoll des Herstellers.

LB-Medium	Menge
Luria Broth	25 g
dH ₂ O	1 l
Autoklavieren, anschließend Antibiotika zugeben (12,5 µg/µl)	

LB-Platten	Menge
Luria Broth	25 g
Agar	15 g
dH ₂ O	1 l
Autoklavieren, anschließend Antibiotika zugeben (12,5 µg/µl)	

2.2.6.2 Herstellung von FISH-Sonden

Die Markierung der FISH-Sonden mit Fluoreszenzfarbstoffen erfolgte durch die Random Priming Methode mit Hilfe des BioPrime DNA Labeling Systems von Invitrogen. 500 ng BAC-DNA in 24 µl dH₂O wurden nach Zugabe von 20 µl Random Primer 5 min bei 99 °C inkubiert und sofort auf Eis gekühlt. Zur denaturierten Probe wurden 5 µl dNTP-Mix und 1 µl Klenow-Fragment gegeben. Anschließend wurde der Ansatz 48 h bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Zur Kontrolle des erfolgreichen Einbaus der fluoreszenz-markierten Nukleotide (Green-dUTP oder Orange-dUTP) erfolgte eine Gelanalyse.

dNTP-Mix	Menge
dATP	0,5 µl
dCTP	0,5 µl
dGTP	0,5 µl
dTTP	0,5 µl
Green dUTP/Orange dUTP	2,5 µl

2.2.6.3 Durchführung der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Für die FISH wurden 4 µm-FPPE-Gewebeschnitte entweder über Nacht bei 56 °C oder für eine Stunde auf der Heizplatte bei 80 °C inkubiert, um eine ausreichende Anhaftung des Schnittes an den Objektträger zu gewährleisten. Zur Entparaffinierung wurden die Schnitte für 20 min in Neoclear und 2 min in 100 % EtOH inkubiert. Danach folgte die Vorbehandlung des Gewebes durch eine Inkubation über 20 min in HCl (0,2 N), 10 min in dH₂O, 3 min in 2 x SSC, 10 min in NaSCN (1 M) bei 80 °C und 3-minütigem Spülen in dH₂O. Anschließend wurde das Gewebe, je nach Dichte und Größe, für 30 s – 6 min mit 1 mg/ml Pepsin/0.2 N HCL bei 37 °C verdaut, 3 min in dH₂O gespült und 2 min in 100 % EtOH entwässert. Nach dem Lufttrocknen der Schnitte wurden 5 – 10 µl Sonde in Hybridisierungspuffer aufgebracht, luftblasenfrei mit einem Deckglas abgedeckt und mit Fixogum abgedichtet. Die Denaturierung der DNA erfolgte für 5 min bei 80 °C auf der Heizplatte, die anschließende Hybridisierung der Sonde bei 37 °C in einer feuchten Kammer über Nacht.

Am nächsten Morgen wurden die Schnitte in 2 x SSC/0,3 % (v/v) NP40 für 4 min bei 73 °C gewaschen, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (je 3 min in 70 % (v/v), 95 % (v/v) und 100 % (v/v) Ethanol), luftgetrocknet und mit Vectashield mit DAPI eingedeckelt.

2.2.6.4 Auswertung der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen

Die Analyse der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMRA) unter Verwendung eines 60 x Immersionsobjektivs und Filter für DAPI, Spektrum Orange, Spektrum Green bzw. eines Spektrum Orange/Spektrum Green Doppelfilters. Aufnahmen erfolgten mit Hilfe einer Isis workstation (Metasystems). Die Anzahl der Signale bzw. die Signalkonstellationen wurden in Interphasekernen von jeweils

100 Tumorzellen ausgezählt. In Vollschnitten erfolgte die Auswertung der Zellen in mehreren Gewebearealen. Bei TMAs wurden jeweils 50 Zellkerne in zwei der drei Stenzen ausgewertet. Dabei war zu beachten, dass überlappende Zellkerne und nekrotisches Tumorgewebe sowie andere Zelltypen anhand der Kernmorphologie von der Auswertung ausgeschlossen werden. Da das Auszählen von Fluoreszenzsignalen bzw. von Konstellationen dieser Signale eine subjektive Methode darstellt, wurden alle FISH-Analysen außerdem von einer weiteren Person unabhängig ausgewertet und damit die Ergebnisse verifiziert.

Für die Analyse von *ALK*-Translokationen wurde die ZytoLight SPEC *ALK* Dual Color Break Apart Sonde sowie die *ALK/EML4*TriCheck™ Sonde von Zytomed verwendet. Bei diesen Sonden wird der 5'-Bereich des *ALK*-Gens durch eine grün-markierte Sonde und der Bereich 3' von *ALK* durch eine orange-markierte Sonde abgebildet. Im Normalzustand entsteht durch die Kolo-kalisation der beiden Sonden ein orange-grünes Fusionssignal.

Ein *ALK*-Fusionsgen kann entweder durch eine Inversion auf dem zweiten Chromosom, wie z. B. *EML4-ALK* *Inv*(2)(p21p23), oder durch eine Translokation (z. B. *TFG-ALK* *t*(2;3)(p23;q21), *NPM-ALK* *t*(2;5)(p23;q35)) entstehen. Durch den Bruch im Intron 19 des *ALK*-Gens wird das Fusionssignal in getrennte Signale separiert. Alle Signalkonstellationen, bei denen der Abstand zwischen orangen und grünen Signalen größer als der Durchmesser eines Signals ist, sind nach Angabe des Herstellers positiv zu werten. Da durch die Inversion nur etwa 13 Megabasen zwischen den Signalen liegen, beträgt der Abstand bei einer *EML4-ALK*-Fusion häufig nur das Zwei- bis Dreifache eines Signaldurchmessers (s. Abb. 4 A). Bei einer Translokation ist der Signalabstand deutlich größer (s. Abb. 4 C). Auch Signalkonstellationen, die ein zusätzliches oranges Signal aufweisen sind positiv zu werten, da der 5'-Bereich des *ALK*-Gens bei Rearrangierungen häufig deletiert wird (s. Abb. 4 B).

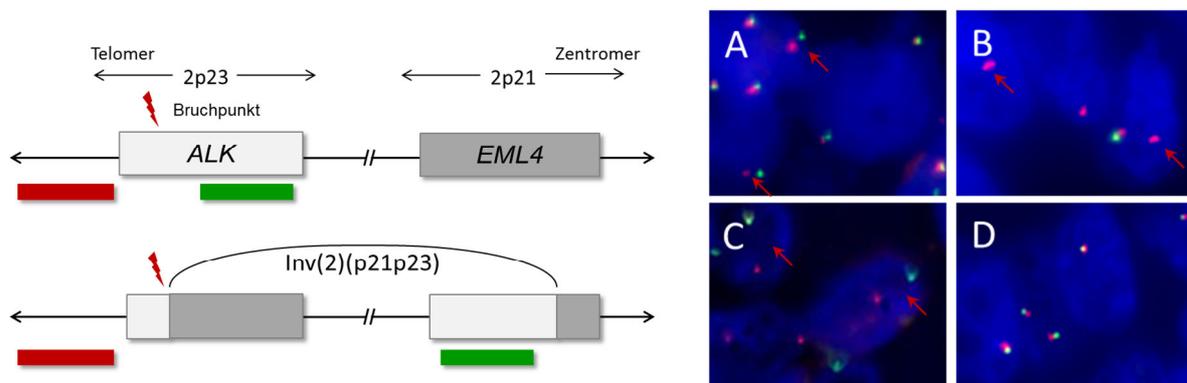


Abbildung 4: Schematische Darstellung und Beispiele für FISH mit der *ALK* break-apart Sonde
 Die break-apart Sonde für den Nachweis einer *ALK*-Translokation markiert den Bereich 5' des Bruchpunktes mit einer grün-markierten Sonde und den Bereich 3' des Gens mit einer orange-markierten Sonde. Fusionssignale entsprechen dem nicht-rearrangierten *ALK* (D), voneinander separierte Signale, die mehr als einen Signaldurchmesser Abstand aufweisen, dem rearrangierten *ALK* (A, C). Signalkonstellationen mit zusätzlichen orangenen Signalen entsprechen einer Rearrangierung des Gens mit Deletion der 5' Region (B).

Die Analyse von *ROS1*-Translokationen erfolgte mit der ZytoLight SPEC ROS1 Dual Color Break Apart Probe von Zytomed. Die Sonde bildet den Bereich 5' des *ROS1* Gens mit einer orange-markierten Sonde und den Bereich 3' des *ROS1* Gens mit einer grün-markierten Sonde ab. Bei einer Translokation wird das orange-grüne Fusionssignal in zwei deutlich voneinander separierte orange und grüne Signale getrennt. Positiv gewertet wurden alle Signalkonstellationen, bei denen der Signalabstand größer als der Durchmesser von 2 Signalen war. Bei Rearrangierungen von *ROS1* können außerdem Teile des Gens im 5'-Bereich deletiert werden. Daher sind Konstellationen, die einen Zugewinn von grünen Signalen aufweisen, positiv zu werten.

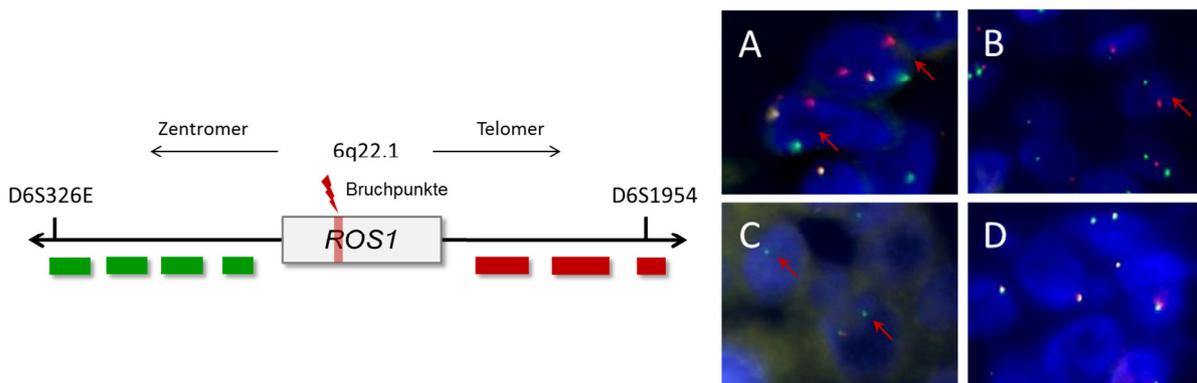


Abbildung 5: Schematische Darstellung und Beispiele der *ROS1* break-apart Sonde

Die break-apart Sonde für den Nachweis einer *ROS1*-Translokation markiert den Bereich 5' des Gens mit einem orangen und den Bereich 3' des Gens mit einem grünen Signal. Fusionssignale stellen den nicht-rearrangierten Zustand von *ROS1* dar (D), separierte Signale eine Translokation (A, B). Zusätzliche grüne Signale deuten auf eine Translokation hin, die einen Verlust des 5'-Bereichs zur Folge hatte (C).

Für die Analyse von möglichen *LTK*-Rearrangierungen wurden die Sonden für eine break-apart FISH selbst hergestellt. Wie in 3.5.2 beschrieben, wurden passende BAC-Klone ausgewählt und verifiziert, anschließend die FISH-Sonden etabliert sowie an Metaphase-Chromosomen getestet. Der Bereich 3' von *LTK* wurde mit einer grün-markierten Sonde detektiert, der Bereich 5' von *LTK* mit einer orange-markierten Sonde. Im nicht-rearrangierten Zustand von *LTK* entsteht ein Fusionsignal, bei einer Rearrangierung des Gens werden die Signale voneinander separiert.

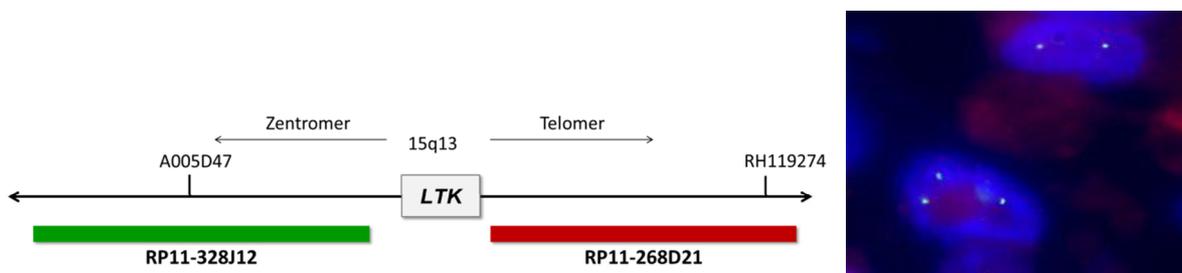


Abbildung 6: Schematische Darstellung der *LTK* break-apart Sonde

Um eine break-apart Sonde zu erhalten, wurden zwei BAC-Klone 5' und 3' von *LTK* ausgewählt und die DNA zur Herstellung der fluoreszenz-markierten Sonden verwendet. Fusionssignale stellen den nicht-rearrangierten Zustand dar.

Die Dokumentation der FISH-Analysen erfolgte mit Hilfe der Isis Workstation Version 5.4 von Metasystems.

2.2.6.5 Cut-off-Bestimmung

Bei der Etablierung von FISH-Sonden erfolgte die Bestimmung eines Cut-off-Wertes. Abhängig von den Schnittpräparaten, verwendeten Geweben und den jeweiligen Sonden können falsch-positive Signale entstehen. Durch Verwendung eines Cut-off-Wertes, der einen Schwellenwert für ein positives bzw. negatives Ergebnis darstellt, werden die Ergebnisse nicht durch falsch-positive Signale bzw. Schnittartefakte beeinflusst. Dieser Wert wurde anhand von Hybridisierungen der entsprechenden Sonden an Nicht-Tumorgewebe bestimmt. Von sechs Normalgewebe-Schnitten wurden jeweils 100 Zellkerne ausgewertet und der Mittelwert der vom Normalzustand abweichenden Signale plus der dreifachen Standardabweichung berechnet. Für eine break-apart Sonde wurde der Cut-off-Wert aus der Anzahl von falsch-positiven break-apart Signalen gebildet, bei Sonden für eine Bestimmung von Deletionen oder Amplifikationen aus den jeweiligen Abweichungen von dem Normalzustand von 2 Kopien einer diploiden Zelle.

2.2.7 Statistik

Statistische Analysen wurden mit der GraphPad Prism 5.0 Software und mit Analyse-it durchgeführt. Lineare Zusammenhänge wurden mit dem Korrelationskoeffizienten nach Pearson bestimmt. Für die Identifizierung von diagnostischen Schwellenwerten der qRT-PCR-Assays wurden außer der Cut-off-Bestimmung Receiver Operating Characteristics-(ROC) Kurven verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Aufbau einer Lungenkarzinom-Gewebe- und Datenbank

Als Basis dieser Arbeit wurde eine Lungenkarzinom-Gewebe- und Datenbank aufgebaut, die Probenmaterial von 963 Patienten des Robert-Bosch-Krankenhauses/Klinikum Schillerhöhe Stuttgart umfasst. Für die geplanten Analysen erfolgte die Isolation von DNA und RNA aus FFPE-Gewebeschnitten und deren Archivierung bei -20 °C. Gewebe-Microarrays wurden von 258 NSCLC angefertigt.

3.2 Identifizierung geeigneter Referenzgene für die qRT-PCR von Lungenkarzinomen

Für eine zuverlässige, quantitative Messung von mRNA-Transkripten ist eine Minimierung des Einflusses aller Variablen wichtig, welche die Messung der Transkriptmenge beeinflussen, wie zum Beispiel Unterschiede der RNA-Qualität, verschiedene Effizienzen der PCR-Reaktionen und der Reversen Transkription sowie Variationen der Gesamt-RNA-Expression in unterschiedlichen Geweben. Eine korrekte Normalisierung ist für die Analysen entscheidend. Die eingesetzten Referenzgene sollten in den zu analysierenden Gewebeproben und bei Tumor- und Normalgewebe möglichst konstant exprimiert werden, da ansonsten die Ergebnisse verfälscht werden können. Um geeignete Kontrollen für Expressionsanalysen der Lungenkarzinome zu identifizieren, erfolgte vor Beginn der Versuche eine Analyse potentieller Referenzgene.

Analysiert wurde die Expression der Gene *phosphoglyceratkinase 1 (PGK1)*, *lamin B1 (LMNB1)*, *beta-actin (ACTB)*, *cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1 (COX4I1)* und *karyopherin alpha 4 (KPNA4)*, die laut Expressionsdatenbanken in Lungenkarzinomen und normalem Lungengewebe signifikant exprimiert sind (www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/, www.medicalgenome.kribb.re.kr/GENT/). In einer Serie von 22 NSCLC und 4 normalen Lungen wurde die Expression von *NKX2-1*, einem molekularen Marker für Lungenkarzinome, der in etwa 75 % der Lungenkarzinome exprimiert wird, untersucht und jeweils auf die potentiellen Referenzgene normiert (Stenhouse et al. 2004; Yatabe et al. 2002). Die mittels qRT-PCR ermittelten RNA-Expressionswerte wurden mit der anhand von Immunfärbungen bestimmten Proteinexpression von *NKX2-1* verglichen. *LMNB1* und *KPNA4* waren aufgrund einer zu geringen und variierenden Expression für die Analyse von Lungenkarzinomen nicht geeignet. *PGK1*, *ACTB* und *COX4I1* zeigten eine vergleichbare und bei NSCLC- und Normalgewebe relativ konstante Expression. Die *NKX2-1*-Expressionswerte, die auf *PGK1*, *ACTB* und *COX4I1* normalisiert wurden, korrelierten mit dem Vorhandensein einer *NKX2-1* Proteinexpression. Jedoch korrelierte die Höhe der Proteinexpression nicht exakt mit der Höhe der Genexpression, was auf eine spezifische Regulation der Proteinexpression

schließen lässt. Aufgrund der konstanten Expression können *PGK1*, *ACTB* und *COX4I1* als Referenz für qRT-PCR-Analysen von NSCLC verwendet werden.

3.3 Detektion von aktiviertem ALK in Lungenkarzinomen

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit bestand darin, eine Methode zu etablieren, mit der in der Routine-Diagnostik ein schneller und zuverlässiger Nachweis des *ALK*-Status möglich ist. Dazu wurde ein sensitiver qRT-PCR-Assay entwickelt und im Vergleich mit FISH und Immunfärbungen an einer Serie NSCLC getestet. Mit Hilfe dieses Assays wurde zudem die Genexpression von *ALK* in NSCLC charakterisiert.

3.3.1 Etablierung eines qRT-PCR-basierten Assays zur Detektion von *ALK*-Rearrangierungen

In adultem Gewebe ist *ALK* bis auf eine geringe Expression im Zentralen Nervensystem kaum exprimiert (Hurley et al. 2006; Iwahara et al. 1997; Vernersson et al. 2006). In NSCLC wird *ALK* infolge von Translokationsereignissen und der Fusionierung mit verschiedenen Genen exprimiert. Da bei einer Rearrangierung der Bruchpunkt stets im Intron 19 von *ALK* liegt, enthalten alle bekannten Fusionsgene die vollständige Kinasedomäne. Wie in Abbildung 7 dargestellt, führt eine Rearrangierung von *ALK* zur Expression der Exons 20 – 29. Der 5'-Bereich von *ALK* (Exons 1 – 19) ist davon nicht betroffen und wird, wie im gesunden adulten Lungengewebe, nicht exprimiert.

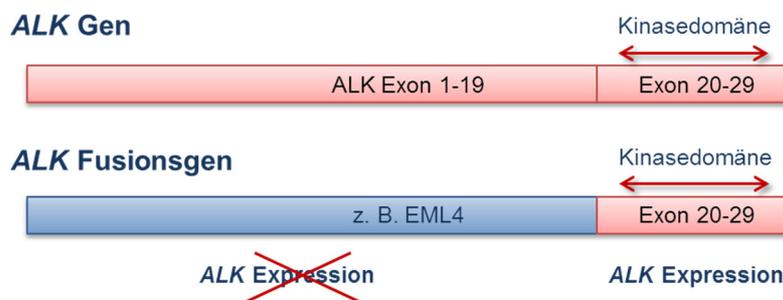


Abbildung 7: Schematische Darstellung des *ALK*-Gens bzw. des *ALK*-Fusionsgens. Im nicht-rearrangierten Zustand wird *ALK* in Lungengewebe nicht exprimiert. Durch eine Fusion im Bereich von Intron 19 mit dem 5'-Bereich von einem anderen Gen wird die Kinasedomäne von *ALK* exprimiert.

Daher war es möglich, einen qRT-PCR-Assay zu etablieren, welcher die erhöhte, unbalancierte Expression des 3'-Bereichs von *ALK* im Falle einer Rearrangierung des Gens nachweist. Dazu wurden je ein Amplikon für den 3'-Bereich und den 5'-Bereich des Gens konzipiert (s. Abb. 8). Eine Amplifikation genomischer DNA ist durch die Lage der Primer in jeweils zwei angrenzenden Exons und einer Größe der dazwischen liegenden Introns von 4105 bzw. 148055 bp ausgeschlossen.

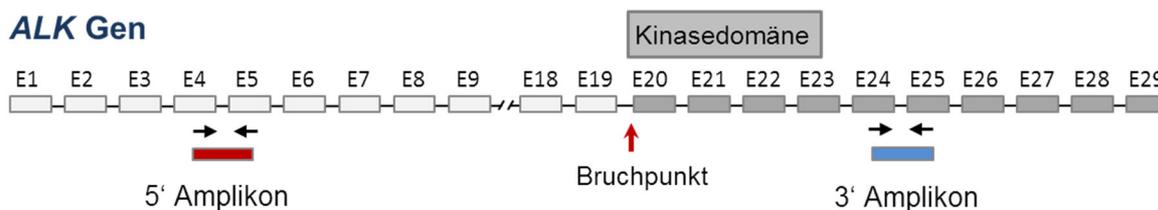


Abbildung 8: Schematische Darstellung von ALK und den verwendeten Amplicons. Darstellung der genomischen Struktur nach NM_004304. Die Primer des Amplicons im 5'-Bereich des Gens liegen in Exon 4 und 5 (rote Box), die Primer für das Amplicon im 3'-Bereich innerhalb der Kinasedomäne in Exon 24 und 25 (blaue Box). Der Bruchpunkt befindet sich in Intron 19.

Für eine effiziente Amplifikation und um den Assay für cDNA aus FFPE-Gewebe in der Routine-Diagnostik anwenden zu können, wurden mit 66 – 83 bp sehr kleine Amplicons gewählt. Zur Etablierung der Primer und als Positiv-Kontrollen wurden die Zelllinien RH30, die eine Expression des Gesamttranskripts von *ALK* zeigt, sowie NCI H2228, die eine *EML4-ALK* Fusion besitzt, verwendet. Die Effizienz der qRT-PCR wurde mit der Messung einer Verdünnungsreihe von RH30 überprüft. Die detektierten CT-Werte beider *ALK*-Amplicons korrelierten mit der eingesetzten Menge der cDNA (s. Abb. 9).

Die Zuverlässigkeit des Assays wurde durch die Messung einer Testgruppe mit bekanntem *ALK*-Status untersucht. Ein Lymphom und 2 Lungenkarzinome mit *ALK*-Translokation sowie 10 Fälle ohne Translokation konnten eindeutig anhand ihrer Expression identifiziert werden. Alle Fälle mit Translokation zeigten ausschließlich eine Expression des 3'-Bereichs von *ALK*. Die Fälle ohne Translokation wiesen keine Expression auf. Außerdem wurde in den Testversuchen die optimale Konzentration der einzusetzenden cDNA ermittelt. Bei der Verwendung des 7500 Real-time PCR Systems lag diese bei einer Gesamtmenge von 50 ng.

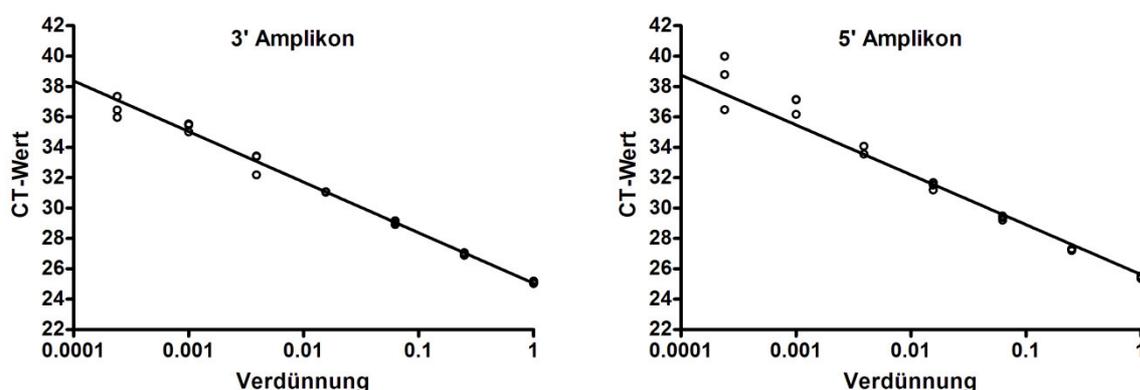


Abbildung 9: Standardkurven des ALK qRT-PCR-Assays. Die Standardkurven der 3'- und 5'-Amplicons von *ALK* wurden durch eine Verdünnungsreihe von RH30 cDNA in dH₂O bestimmt. Beide Amplicons zeigen eine optimale Amplifikation der PCR-Produkte.

3.3.2 Validierung des qRT-PCR-Assays und Screening nach *ALK*-Rearrangierungen

Um den qRT-PCR-Assay zu validieren, wurde eine Serie von 652 NSCLC mit diesem Assay untersucht. Das verwendete FFPE-Material stammte aus Lungenresektaten oder Biopsien von Patienten mit NSCLC. Der Tumorzellgehalt wurde von einem Pathologen ermittelt und betrug mindestens 10 %. Eine zuverlässige Auswertung war bei 80 % (523/652) der Fälle möglich. Die restlichen 20 % der Fälle zeigten aufgrund einer zu schlechten RNA-Qualität eine unzureichende Expression des Referenzgens *PGK1* und wurden deshalb als nicht auswertbar eingestuft.

Um überprüfen zu können, ob eine erhöhte Expression der Kinasedomäne mit *ALK*-Rearrangierungen assoziiert ist, wurden 198 der 652 analysierten NSCLC zusätzlich mit der *ALK* break-apart FISH untersucht. Es wurden alle Fälle in die FISH-Untersuchung eingeschlossen, die im Vergleich zu NSCLC ohne *ALK*-Rearrangierung eine signifikante Expression des 3'-Bereichs $> 0,3$ zeigten. Dieser Cut-off-Wert wurde aus dem Mittelwert der Expressionswerte von 50 Fällen ohne Rearrangierung plus dreifacher Standardabweichung gebildet. Die Auswahl der restlichen Fälle erfolgte randomisiert. Die *ALK* break-apart FISH war in 92 % der Fälle (182/198) auswertbar. Als rearrangiert gewertet wurden Fälle mit mindestens 15 % break-apart Signalen oder zusätzlichen orangen Signalen in der FISH.

24 (4,6 %) der 523 mittels qRT-PCR analysierten, auswertbaren Lungenkarzinome wiesen mit einem Expressionswert des 3'-Bereichs $> 0,3$ eine deutliche, unbalancierte Expression der Kinasedomäne auf. Im Durchschnitt lag die Expression dieser Fälle bei 1,76 und reichte von 0,32 bis 7,1, während der 5'-Bereich keine Expression zeigte. In der FISH-Analyse konnten 22 der 24 Fälle ausgewertet werden. Beispiele sind in Abbildung 11 dargestellt. Wie in Abbildung 10 zu sehen ist, wurden alle 19 auswertbaren Fälle, die eine 3'-Expression größer als 0,4 besaßen, mit der FISH als rearrangiert bestätigt (s. Tab. 1). Bei den beiden Fällen mit nicht auswertbarer FISH (#61, #62) ist aufgrund der hohen 3'-Expressionswerte und einer fehlenden 5'-Expression von einer Rearrangierung auszugehen. Von besonderem Interesse war ein Fall (s. Abb. 10 #17), dessen FISH-Analyse aufgrund von separierten grünen und sehr kleinen orangen Signalen auf eine partielle Deletion in der 3'-Region von *ALK* deutete. Es war nicht klar, ob die Kinasedomäne und damit das Therapietarget während der Rearrangierung deletiert wurden. Durch die qRT-PCR konnte nachgewiesen werden, dass mit einem Wert von 0,55 eine deutliche Expression des 3'-Bereichs von *ALK* vorlag, und daher von einer Fusionierung mit Erhalt der Kinasedomäne auszugehen war. Drei Lungenkarzinome mit einer Expression zwischen 0,3 und 0,4 waren nicht rearrangiert (s. Tab. 1).

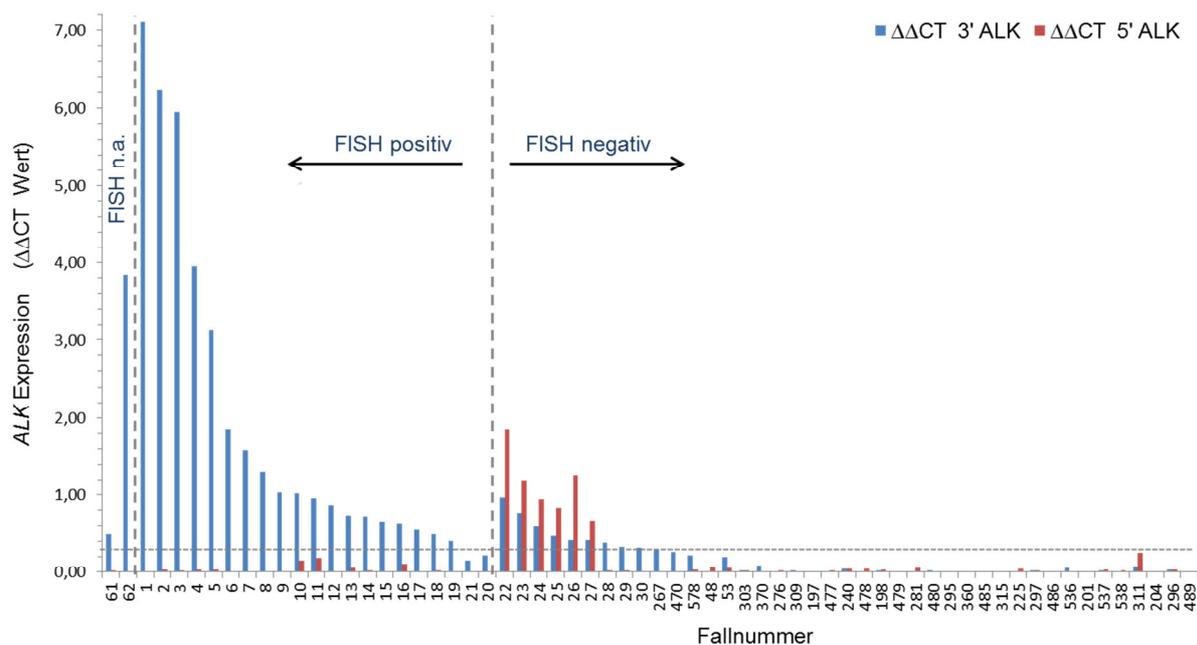


Abbildung 10: quantitative RT-PCR-Analyse von ALK. Die Expressionswerte sind relativ zum Referenzgen *PGK1* und der Kontrolle RH30 dargestellt, deren *ALK*-Expression = 1 definiert wurde. Die horizontale Linie zeigt den berechneten Cut-off-Wert von 0,3 an, die vertikale Linie separiert FISH-positive und FISH-negative Fälle. Expressionswerte des 3'-Bereichs (Kinasedomäne) sind als blaue Balken, Werte des 5'-Bereichs als rote Balken dargestellt. Die Fälle 22 – 27 zeigen eine Expression des Gesamttranskripts von *ALK*.

In 493 Fällen (94,3 %) war *ALK* nicht bzw. nur sehr gering exprimiert. Die durchschnittliche Expression betrug 0,05 und reichte von 0,0001 bis 0,29. 152 von 154 Tumoren, die bei der qRT-PCR-Analyse aufgrund sehr geringer Expressionswerte als negativ eingestuft wurden, konnten mit Hilfe der FISH als nicht rearrangiert bestätigt werden. Zwei der 154 Lungenkarzinome (#20; #21) zeigten bei einer unbalancierten, aber niedrigen Expression von 0,22 und 0,15 eine Rearrangierung des *ALK* Gens. Bei 3 weiteren Lungenkarzinomen (#267, #470, #578) mit unbalancierten Expressionswerten zwischen 0,2 und 0,3 konnte keine Rearrangierung festgestellt werden (s. Abb. 10).

Zusätzlich wurde in 6 Fällen (1,1 %) eine erhöhte Expression im 3'-Bereich *und* im 5'-Bereich detektiert. Eine Gesamttranskript-Expression von *ALK* im Lungenkarzinom war bisher nicht bekannt. Die Expression des 3'-Bereichs lag durchschnittlich bei 0,61 und reichte von 0,42 bis 0,96, die durchschnittliche Expression des 5'-Bereichs lag bei 1,12 und reichte von 0,66 bis 1,85 (s. Tab. 1). Mit Hilfe der FISH wurde gezeigt, dass bei diesen 6 Tumoren eine Rearrangierung des Gens nicht vorlag (s. Abb. 10 und 11). In 4 der 6 Fälle konnten in mehr als 25 % der Zellen jeweils drei bis vier Genkopien bzw. polysome Nuklei detektiert werden. Allerdings wurde diese Konstellation auch in etwa einem Drittel der 152 FISH-negativen Fälle nachgewiesen, die keine Expression von *ALK* zeigten. Diese *ALK*-exprimierenden Fälle stellen möglicherweise eine neue Subgruppe *ALK*-positiver Lungenkarzinome dar und können durch eine FISH-Analyse nicht detektiert werden.

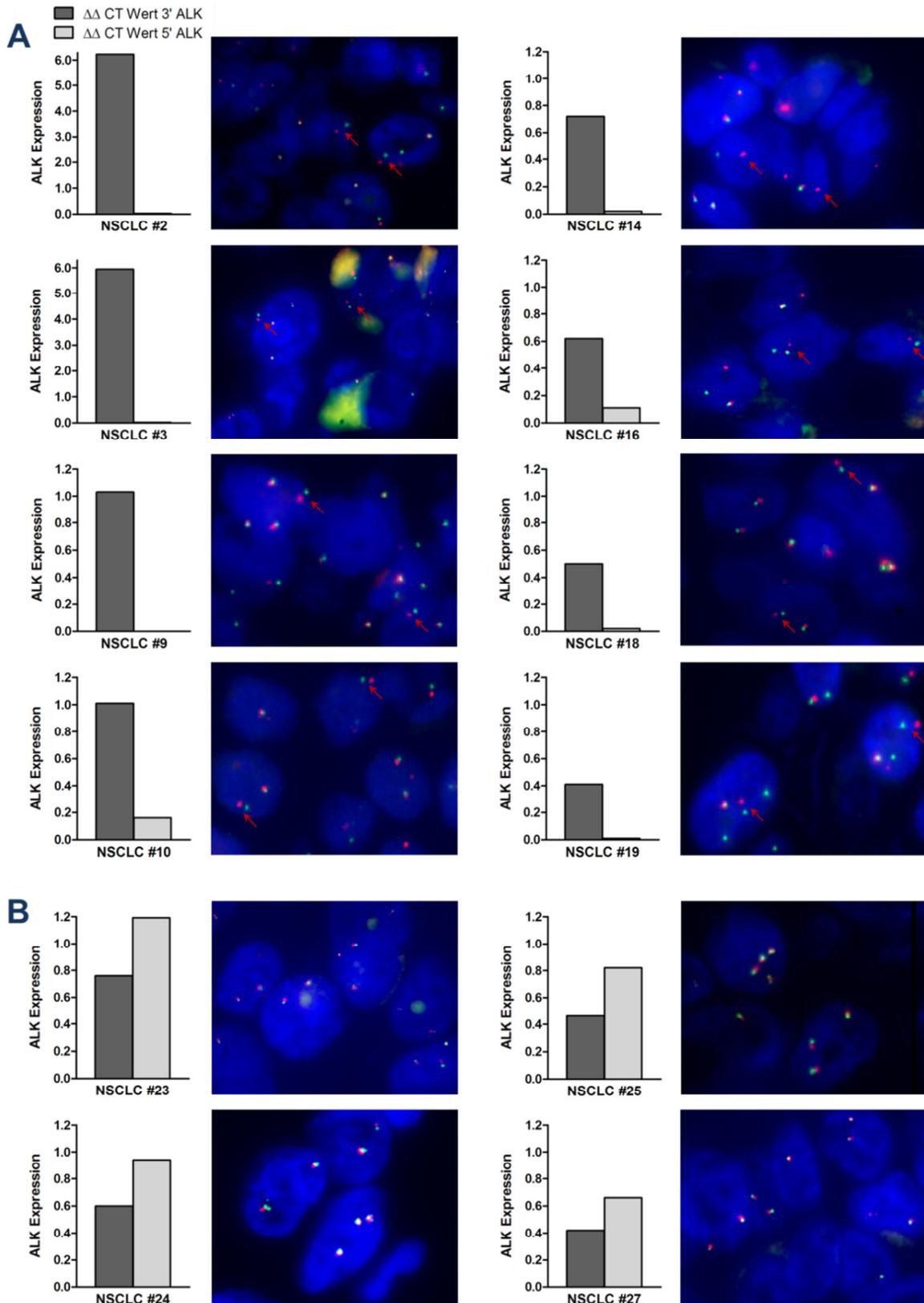


Abbildung 11: ALK-Expression und FISH-Signalkonstellationen bei ALK-positiven NSCLC.
A) Fälle mit Translokation und unbalancierter Expression des 3'-Bereichs. Die im Normalzustand fusionierten Fusionssignale der ALK break-apart Sonde wurden bei einer Translokation voneinander getrennt. Rote Pfeile markieren ALK-Translokationen in den Tumorzellkernen. Bei NSCLC #14 zeigte die FISH kein break-apart, sondern zusätzliche orangene Signale, da der 5'-Bereich von ALK bei einer Translokation deletiert wurde. Die Kinasedomäne wurde exprimiert. **B)** Fälle mit ALK-Expression ohne Genrearrangierung. Dunkelgraue Balken entsprechen der Expression des 3'-Bereichs, hellgraue Balken der Expression des 5'-Bereichs.

Anhand der Daten aus der vergleichenden Untersuchung mittels qRT-PCR und FISH konnte eine ROC-Analyse durchgeführt werden, um geeignete Grenzwerte für den qRT-PCR-Assay bei höchstmöglicher Sensitivität und Spezifität zu definieren. Mit einer Kombination aus einem Grenzwert für die 3'-Expression $> 0,2$ und für den Quotienten aus 3'- und 5'-Expression von $> 5,0$, konnten 96,2 % der Fälle korrekt identifiziert werden. Diese Grenzwerte ergaben für diese Serie eine hohe Sensitivität (95,2 %) bei bestmöglicher Spezifität (6 Fälle mit Expression 0,2 – 0,4 falsch-positiv, 1 Fall falsch-negativ). Ob der falsch-negativ detektierte Fall (#21) mit einer niedrigen *ALK*-Expression von 0,15 therapierbar ist, ist unwahrscheinlich. Aufgrund der Daten dieser Serie kann empfohlen werden, alle Fälle mit einer Expression ab 0,2 als potentiell positiv einzustufen und die Fälle im Grenzbereich von 0,2 bis 0,4 mit einer zweiten Methode zu analysieren, um falsch-positive Fälle auszuschließen.

Mit dem neu etablierten qRT-PCR-Assay konnten *ALK*-Rearrangierungen in einer großen Serie NSCLC sensitiv und zuverlässig nachgewiesen werden. Es konnten außerdem zwei *ALK*-positive Fälle identifiziert werden, die in der FISH nicht auswertbar waren. Darüber hinaus wurde mit dem Assay eine neue Subgruppe von Lungenkarzinomen identifiziert, die das Gesamttranskript von *ALK* exprimieren.

3.3.3 Einfluss des Tumorzellgehalts und der Größe des Gewebes auf die *ALK*-Expression

Die Höhe der Expression des 3'-Bereichs von *ALK* war bei den durchgeführten Messungen von der Größe des verwendeten Materials unabhängig. *ALK*-rearrangierte Fälle wurden sowohl in Resektaten als auch in kleinen Biopsien (0,1 cm²) identifiziert. Bei den Lungenkarzinomen, die eine signifikante Expression aufwiesen, variierte der Tumorzellgehalt zwischen 10 – 90 %. Obwohl alle Fälle, die eine deutliche Expression größer als 1,0 besaßen, einen Tumorzellgehalt von über 50 % aufwiesen, korrelierte die Höhe der *ALK*-Expression nicht strikt mit dem Tumorzellgehalt (Pearson Korrelation 0,21). Anhand der *ALK*-Expression konnten Rearrangierungen auch in vier Fällen mit sehr wenig Gewebe und einem Tumorzellgehalt von 10 – 30 %, detektiert werden (Expression 0,49 – 0,86). Damit wurde gezeigt, dass der qRT-PCR-Assay zuverlässig auch bei limitiertem FFPE-Material, wie zum Beispiel bei Biopsien mit geringem Tumorzellgehalt, eingesetzt werden kann.

3.3.4 ALK-Proteinexpression in Relation zum ALK-Status

Der Nachweis einer *ALK*-Rearrangierung in Lungenkarzinomen ist prinzipiell auch durch Immunfärbungen von FFPE-Gewebe möglich. Die Eignung dieser Methode zur Identifizierung *ALK*-positiver Lungenkarzinome im diagnostischen Bereich war zu Beginn dieser Studie aufgrund sehr unterschiedlicher Ergebnisse erster Studien nicht hinreichend untersucht (Paik et al. 2011; Mino-Kenudson et al. 2010). Daher sollten die Eignung des seit kurzem verfügbaren *ALK*-spezifischen Antikörpers D5F3 (Cell Signaling) zur Identifizierung von *ALK*-rearrangierten Lungenkarzinomen sowie eine Korrelation mit der Gen- und Proteinexpression untersucht werden. Außerdem sollte überprüft werden, ob auch bei nicht-rearrangierten Lungenkarzinomen mit Expression des vollständigen *ALK*-Transkriptes das Protein nachzuweisen ist.

Die Proteinexpression wurde in 250 Lungenkarzinomen anhand von Immunfärbungen mit dem Antikörper D5F3 analysiert. Positiv gewertet wurden Fälle, die eine Immunfärbung (1+, 2+, 3+) in mindestens 10 % der Tumorzellen aufwiesen. Der Antikörper D5F3 detektierte bei allen 21 untersuchten *ALK*-rearrangierten Fällen (FISH- und/oder qRT-PCR-positiv) eine Proteinexpression (s. Tab. 1). Da bei den Fällen #13 und #61 kein Tumormaterial mehr vorhanden war, konnten diese nicht weiter analysiert werden. Die Abbildung 12 zeigt beispielhaft die Intensität der Proteinexpression im Vergleich zu der Höhe der Genexpression. Vier der 21 rearrangierten Lungenkarzinome zeigten eine sehr starke Expression (z. B. #14), 10 Fälle eine moderate Expression (z. B. #2) und 7 Fälle eine schwache Expression (z. B. #12). Zwischen der Höhe der 3'-Expression und der Höhe der Proteinexpression gab es bei den translozierten Fällen keine signifikante Korrelation (Pearson Korrelation 0,20). In den Gesamttranskript-exprimierenden Lungenkarzinomen zeigten 4 der 5 untersuchten Fälle eine schwache Proteinexpression (s. Abb. 12). In einem Fall konnte kein Protein nachgewiesen werden (#24, s. Tab. 1). Aufgrund des geringen Probenmaterials konnte ein Fall mit Gesamttranskript-Expression nicht mehr analysiert werden. In den restlichen 224 untersuchten, nicht-rearrangierten Lungenkarzinomen war keine Proteinexpression nachzuweisen. *ALK*-positive und -negative Lungenkarzinome konnten in dieser Serie mit Hilfe des Antikörpers D5F3 zuverlässig identifiziert werden. Eine Unterscheidung der rearrangierten Fälle von Tumoren mit Gesamttranskript-Expression war mit Hilfe der Immunfärbung jedoch nicht möglich (Gruber et al. 2014).

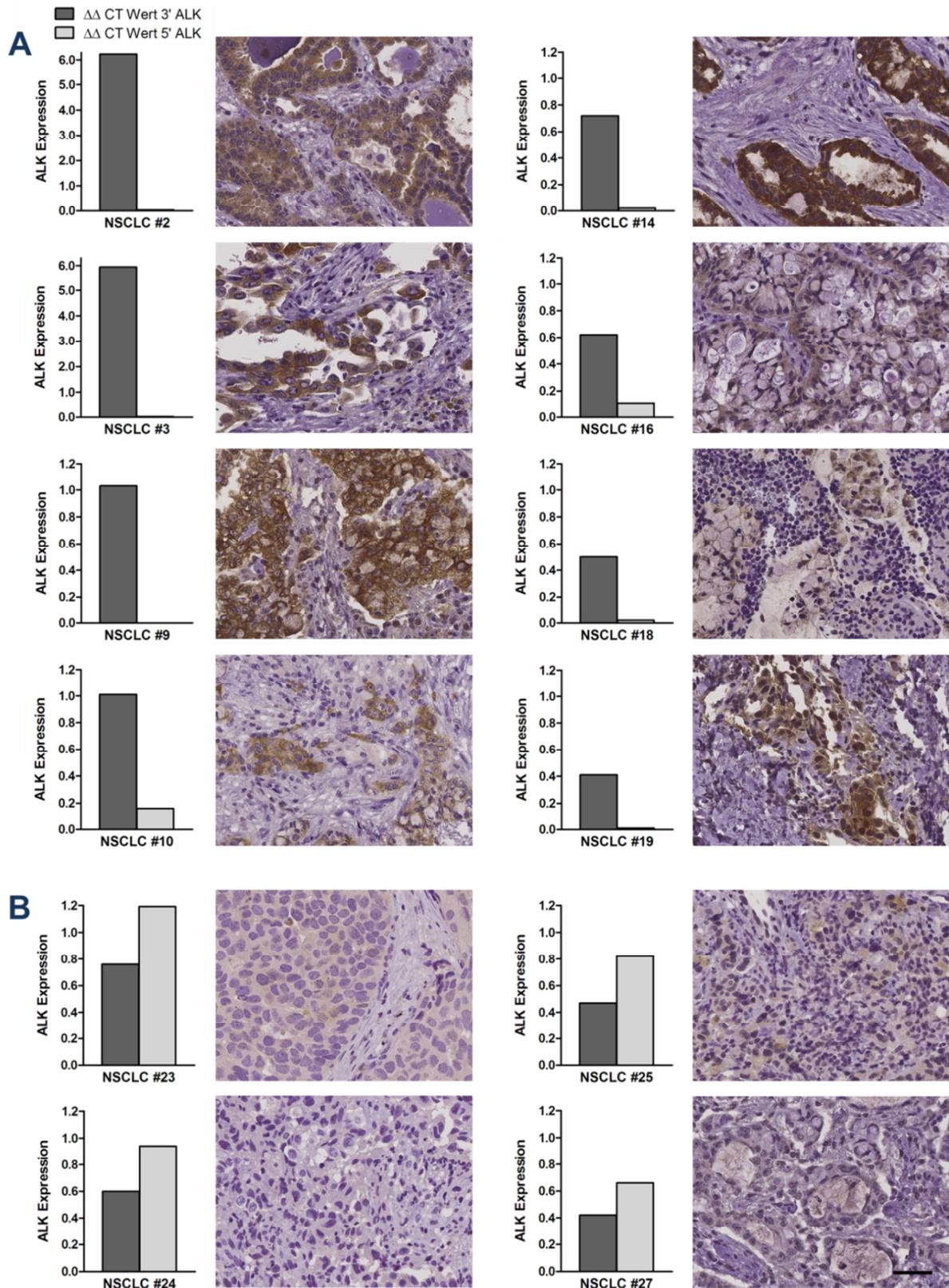


Abbildung 12: Vergleich der ALK-Transkript-Expression der ALK-positiven NSCLC mit der Intensität der Immunfärbung. A) Fälle mit Rearrangierung und unbalancierter Expression des 3'-Bereichs. Die Immunfärbung korrelierte nicht strikt mit der Expression. NSCLC #9 und #14 zeigten eine starke Proteinexpression, NSCLC #2, #3, #10 und #19 eine mäßige Expression, #16 und #18 eine schwache Proteinexpression. B) Fälle mit Gesamttranskript-Expression ohne Genrearrangierung. NSCLC #23, #25 und #27 zeigten eine schwache Proteinexpression, #24 besaß keine Proteinexpression. Dunkelgraue Balken zeigen die Expression des 3'-Bereichs, hellgraue Balken die Expression des 5'-Bereichs. Der Maßstab entspricht 50 μ m.

3.3.5 Klinisch-pathologische Charakteristika von *ALK*-positiven Lungenkarzinomen

Das Alter von Patienten mit *ALK*-rearrangierten Lungenkarzinomen lag mit durchschnittlich 59 Jahren (41 – 78 Jahre) unter dem Durchschnitt des Erkrankungsalters von knapp 70 Jahren bei Lungenkarzinomen (s.Tab. 1). Die Hälfte der Patienten (48 %) war ≤ 60 Jahre, 4 Patienten waren ≥ 70 Jahre alt. 74 % der Patienten mit *ALK*-Rearrangierung waren weiblich und wiesen mit 8 nichtrauchenden und 7 rauchenden Personen keinen Unterschied bezüglich des Raucherstatus auf. Von den 5 männlichen Patienten mit *ALK*-Rearrangierung waren 4 Nichtraucher. Das durchschnittliche Alter der Patienten mit Expression des nicht-rearrangierten *ALK*-Gens betrug 59 Jahre (42 – 82 Jahre).

Nahezu alle Fälle mit einer Rearrangierung oder Gesamttranskript-Expression von *ALK* wurden als Adenokarzinom klassifiziert, mit Ausnahme eines rearrangierten großzelligen Lungenkarzinoms (#62). Wie in Tabelle 1 dargestellt, gab es keine Prävalenz eines spezifischen histologischen Subtyps bei *ALK*-rearrangierten Lungenkarzinomen. Diese wurden in 34 % als vorwiegend solide und in 31 % als glanduläre Adenokarzinome diagnostiziert; 24 % hatten eine muzinöse Differenzierung. Siegelringzellhaltige Areale wurden in 39 % der translozierten und in 33 % der Gesamttranskript-exprimierenden Fälle identifiziert. Obwohl *ALK*-positive Lungenkarzinome auffallend häufig Siegelringzellen enthalten, ist eine Unterscheidung von *ALK*-positiven und -negativen Lungenkarzinomen anhand der Histologie der Tumore nicht möglich.

Zwischen *ALK*-Translokation, TNM-Status und Tumor-Grading konnte kein Zusammenhang festgestellt werden. Kein *ALK*-positives Lungenkarzinom trug eine EGFR-Mutation (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 1: Klinisch-pathologische Charakteristika und molekulare Daten der ALK-positiven Lungenkarzinome

Fall #	Geschlecht	Raucher	Alter bei Diagnose [Jahre]	Histologie	TNM	Größe des Gewebes [cm ²]	Tumor-zellen [%]	ALK qRT-PCR		FISH	IHC
								ALK 3' Expression	ALK 5' Expression	ALK break-apart Sonde	ALK
1	w	ja	45	glandulär, Siegelringzellen	pT1pN2Mx	B (0.25)	50	7,10	0,01	Translokation	2+
2	m	nein	67	glandulär, klarzellig	pN0	R	80	6,23	0,03	Translokation	2+
3	w	ja	68	muzinös	pT2pN2	R	60	5,94	0,02	Translokation	2+
4	w	n. b.	63	solide	n. b.	B (0.60)	60	3,96	0,03	Translokation mit Deletion	3+
5	w	nein	63	glandulär, Siegelringzellen	n. b.	B (0.50)	70	3,12	0,03	Translokation	2+
6	m	nein	74	solide	n. b.	B (0.80)	90	1,84	0,00	Translokation mit Deletion	3+
7	w	nein	75	glandulär, Siegelringzellen	n. b.	R	60	1,58	0,01	Translokation mit Deletion	2+
8	w	nein	64	muzinös	pT1pN1Mx	R	70	1,30	0,01	Translokation	1+
9	w	ja	49	glandulär, klarzellig	pT1pN0M0	R	70	1,03	0,00	Translokation	3+
10	w	nein	61	solide, Siegelringzellen	pT2pN2M0	R	70	1,01	0,16	Translokation	2+
11	w	nein	60	glandulär	pT2pN0M0	R	90	0,95	0,19	Translokation mit Deletion	1+
12	w	nein	54	solide, Siegelringzellen	cT4cN2M1a	B (0.30)	30	0,86	0,01	Translokation	1+
13	m	nein	48	solide	cT4cN3M1	B (0.35)	20	0,73	0,05	Translokation	n. u.
14	m	n.b.	41	muzinös	n. b.	B (0.80)	60	0,72	0,02	Translokation mit Deletion	3+
15	w	ja	59	solide	cT2acN2M1a	B (0.50)	25	0,65	0,00	Translokation mit Deletion	2+
16	w	ja	72	muzinös, Siegelringzellen	pT2pN0M0	R	80	0,62	0,11	Translokation	1+
17	w	nein	48	solide, Siegelringzellen	n. b.	R	70	0,55	0,00	Translokation mit Deletion	2+
18	m	nein	48	muzinös, Siegelringzellen	ypT2pN2M0	B (0.40)	40	0,50	0,02	Translokation	1+
19	w	n. b.	65	glandulär	n. b.	B (0.50)	50	0,41	0,01	Translocation	2+
21	w	nein	64	muzinös, Siegelringzellen	pT4pN2M0	R	50	0,15	0,01	Translokation	1+
20	m	ja	49	glandulär, Siegelringzellen	cT4cN3M1b	B (0.25)	40	0,22	0,01	Translokation	1+
61	w	ja	78	glandulär	n. b.	B (0.10)	10	0,49	0,02	n. a.	n. a.
62	w	ja	44	solide	pT2pN3	R	90	3,84	0,01	n. a.	2+
28	w	nein	76	glandulär	pT2apN0M0	B (0.25)	15	0,38	0,02	normal	0
29	m	ja	38	muzinös	pT2apN0M0	R	40	0,33	0,02	normal	0
30	m	nein	79	muzinös	pT1pN0	R	60	0,32	0,01	normal	0
267	w	nein	84	solide	n. b.	B (0,25)	10	0,29	0,01	normal	n. u.
470	w	nein	70	solide, cibriform, muzinös	n. b.	R	40	0,26	0,00	normal	0
578	m	n. b.	56	azinär	n. b.	B (0,4)	50	0,22	0,03	normal	n. u.
22	m	nein	82	Siegelringzellen	cT4cN3M1b	B (0.30)	35	0,96	1,85	normal	1+
23	w	nein	42	solide	n. b.	R	90	0,76	1,19	normal	1+
24	m	ja	51	glandulär, Siegelringzellen	ypT2pN0M0	B (0.25)	60	0,60	0,94	normal	0
25	m	ja	63	solide + klarzellig	cT4cN2M1b	B (0.30)	70	0,47	0,82	normal	1+
26	m	ja	48	solide	cT2cN2M1b	B (0.10)	50	0,42	1,26	normal	n. u.
27	w	nein	73	muzinös	pT1pN2M0	R	60	0,42	0,66	normal	1+

Raucher: nein = 0, ja= > 0 Packungen/Jahr, R = Resektat, B = Biopsie, n. a. = nicht auswertbar, n. b. = nicht bekannt, n. u. = nicht untersucht (zu wenig Material)

3.3.6 Anwendung der qRT-PCR-Analyse in einer zweiten Serie

Für eine zuverlässige Anwendung des qRT-PCR-Assays in der molekularpathologischen Diagnostik, die zunehmend an Biopsien durchgeführt wird, sollte eine zweite Serie aus 324 Lungenkarzinomen, die fast ausschließlich aus Biopsien bestand, untersucht werden. Zudem war die molekulargenetische Charakterisierung dieser Serie Teil einer Studie, welche die Frage klären sollte, ob das Therapieansprechen mit der Höhe der *ALK*-Expression korreliert. Die experimentellen Arbeiten wurden im Rahmen der Routinediagnostik partiell von einer Technischen Assistentin durchgeführt. Der Tumorzellgehalt wurde morphologisch-histologisch bestimmt und betrug mindestens 10 %. Aufgrund der Ergebnisse der ersten Serie und der ermittelten Grenzwerte einer 3'-Expression > 0,2 sowie einem 3'/5'-Quotienten > 5,0 wurden alle 19 Fälle der zweiten Serie, die diese Kriterien erfüllten, sowie 54 Fälle ohne *ALK*-Expression (< 0,2) einer FISH-Analyse unterzogen. In der qRT-PCR-Analyse waren 256 der 324 analysierten Lungenkarzinome auswertbar (79 %). Zehn Fälle (3,9 %) zeigten eine deutliche, unbalancierte 3'-Expression > 0,5 (0,5 – 6,84) und einen Quotienten der 3'- und 5'-Expressionswerte > 5,0. Wie in Abbildung 13 dargestellt, konnten 9 der 10 Fälle mit der FISH-Analyse als *ALK*-rearrangiert bestätigt werden, Fall #948 war nicht auswertbar (s. Tab. 2).

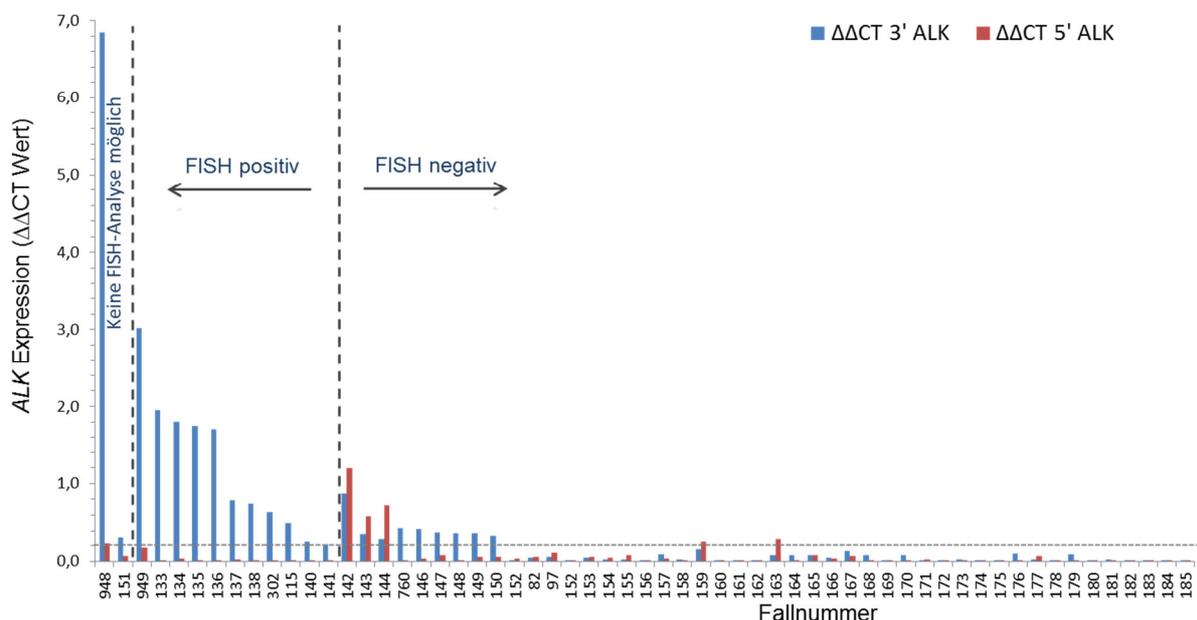


Abbildung 13: qRT-PCR-Analyse von *ALK*. Die Expressionswerte sind relativ zu dem Referenzgen *PGK1* und der Kontrolle RH30 dargestellt, deren *ALK*-Expression = 1 definiert wurde. Die horizontale Linie zeigt den Cut-off-Wert von 0,2 an, die vertikale Linie separiert rearrangierte und nicht-rearrangierte Fälle. Expressionswerte des 3'-Bereichs (Kinasedomäne) sind als blaue Balken, Werte des 5'-Bereichs als rote Balken dargestellt. Bei #948 zeigte die qRT-PCR eine Rearrangierung, die FISH war nicht auswertbar. Die Expression von NSCLC #151 liegt im Grenzbereich, eine FISH-Analyse liegt nicht vor. #142 – #144 = Gesamttranskript-exprimierende Fälle, Fall #135 war in der FISH-Analyse mit 10 % Rearrangierungen und 59 % zusätzlichen grünen Signalen formal negativ zu werten. Die qRT-PCR zeigte eine Rearrangierung des Falles mit Expression der Kinasedomäne.

Ein Lungenkarzinom mit einer Expression von 1,75 zeigte in der FISH 10 % translozierte Zellen und ein zusätzliches grünes Signal in 59 % der Zellkerne (s. Abb. 14 und Tab. 2, NSCLC #135). Dieses FISH-Ergebnis war formal negativ zu werten, da die Zahl der translozierten Zellen unterhalb des Cut-off-Werts von 15 % lag, und eine Signalkonstellation mit zusätzlichen grünen Signalen auf eine Rearrangierung mit Deletion der Kinasedomäne hinwies. Da bei diesem Fall jedoch eine starke Expression der Kinasedomäne vorlag war davon auszugehen, dass diese Rearrangierung zu einem funktionellen Fusionsprotein geführt hatte, und der Patient mit Crizotinib behandelt werden könnte.

Für 9 Lungenkarzinome wurde eine geringe, unbalancierte Expression mit 3'-Werten zwischen 0,2 und 0,5 und einem Quotienten > 5 nachgewiesen (s. Tab. 2). Bei 2 Fällen mit einer Expression von 0,25 (#140) und 0,22 (#141) wurde mittels FISH eine *ALK*-Translokation nachgewiesen, ein Fall war nicht analysierbar (#151). Die übrigen 6 Lungenkarzinome waren nicht transloziert. Zusätzlich wurden 3 Fälle identifiziert (#142, #143, #144), die eine Expression des Gesamttranskripts von *ALK* besaßen (3'-Expression 0,29 – 0,88, 5'-Expression 0,59 – 1,2; Quotient 0,4 – 0,73).

Tabelle 2: Molekulare Daten der qRT-PCR-Analyse und Vergleich mit der FISH-Analyse

Fall #	ALK qRT-PCR			FISH
	ALK 3' Expression	ALK 5' Expression	Quotient 3'/5'	ALK break-apart Sonde
948	6,84	0,22	30,70	n. a.
85	3,02	0,18	17,21	Translokation*
133	1,96	0,00	947,60	Translokation
134	1,80	0,04	50,74	Translokation
135	1,75	0,00	420,53	Translokation**
136	1,70	0,01	308,27	Translokation
137	0,79	0,02	40,74	Translokation
138	0,75	0,01	74,84	Translokation
139	0,64	0,00	167,24	Translokation
115	0,50	0,00	889,36	Translokation mit Deletion
140	0,25	0,00	941,05	Translokation
141	0,22	0,01	26,23	Translokation mit Deletion
142	0,88	1,20	0,73	negativ
143	0,36	0,59	0,61	negativ
144	0,29	0,72	0,40	n. a. (einzelne Zellkerne negativ)
145	0,43	0,01	34,03	negativ
146	0,42	0,03	13,97	negativ
148	0,36	0,01	29,17	negativ
149	0,36	0,05	7,19	negativ
150	0,33	0,05	6,49	negativ
151	0,32	0,06	5,06	n. a.
949	0,22	0,00	77,32	negativ

Dargestellt sind alle NSCLC mit 3'-Expressionswerten > 0,2. *= *EML4* war aufgrund des großen Signalabstands nicht der Translokationspartner, **=Translokation in 10 % der Tumorzellen, 59 % zusätzliche Grün-Signale (formal negativ), n. a. = nicht auswertbar

Alle 50 in der FISH auswertbaren Fälle ohne signifikante *ALK*-Expression (0,00 – 0,19) waren nicht rearrangiert. Vier der 54 untersuchten Fälle waren in der FISH-Analyse nicht auswertbar (7,4 %).

Mit der Untersuchung der zweiten Gruppe wurde bestätigt, dass die Bestimmung des *ALK*-Status von Lungenkarzinomen mit Hilfe des qRT-PCR-Assays zuverlässig möglich und für die Verwendung von Biopsiematerial geeignet ist. Wie in der ersten Serie waren alle Fälle mit mäßiger und hoher unbalancierter Expression von *ALK* nachweislich *ALK*-rearrangiert. In einem Grenzbereich einer geringen, unbalancierten 3'-Expression von 0,22 bis 0,43 traten sowohl rearrangierte als auch nicht-rearrangierte Fälle auf. Ein rearrangierter Fall (NSCLC #328) trug zusätzlich eine Deletion in Exon 19 des *EGFR*-Gens und war damit sowohl *ALK*-rearrangiert als auch *EGFR*-mutiert (Daten nicht gezeigt). Da nur 18 % der Zellen in der FISH *ALK*-positiv waren, ist es wahrscheinlich, dass 2 verschiedene Klone des Tumors existierten.

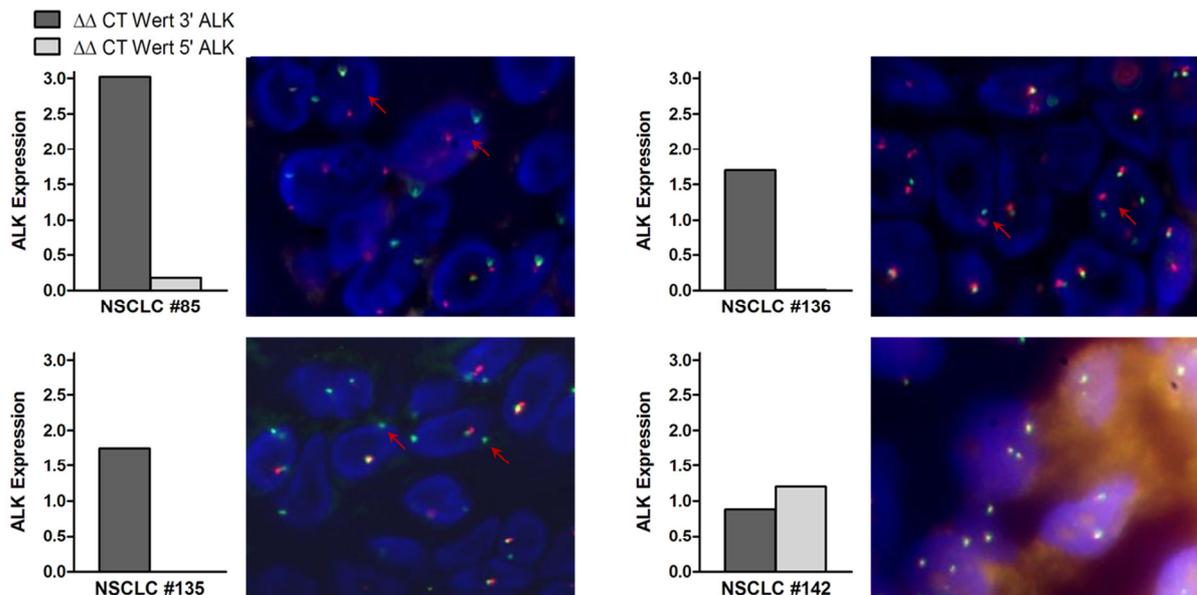


Abbildung 14: Vergleich der qRT-PCR- und FISH-Analyse. NSCLC #85, #135 und #136 besaßen eine unbalancierte 3'-Expression und waren rearrangiert, NSCLC #142 zeigte eine Gesamttranskript-Expression. Die weit voneinander entfernten break-apart Signale bei #85 deuten auf einen anderen Translokationspartner als *EML4* hin. #135 wies zusätzliche grüne Signale auf, die auf eine Rearrangierung mit Verlust der Kinasedomäne deuten. Anhand der 3'-Expression wurde eine Rearrangierung mit Erhalt der Kinasedomäne nachgewiesen. NSCLC #142 war nicht rearrangiert (Fusionssignale). Dunkelgraue Balken entsprechen der Expression des 3'-Bereichs, hellgraue Balken der Expression des 5'-Bereichs. Rote Pfeile markieren *ALK*-Translokationen in den Tumorzellkernen.

3.3.7 Vergleichende Analyse des neuen ALK-Antikörpers 1A4 und des D5F3/Ventana-Assays

Die Immunhistochemie stellt prinzipiell eine einfach anzuwendende, schnell durchführbare und relativ kostengünstige Diagnostik-Methode dar und sollte deshalb im Rahmen dieser Arbeit als Screening-Assay getestet werden. In der ersten Serie konnte mit dem ALK-Antikörper D5F3 (Cell Signaling) eine ALK-Proteinexpression sensitiv und spezifisch mittels Immunfärbungen an FFPE-Gewebeschnitten detektiert werden. Eine weitere Verwendung dieses Antikörpers war jedoch nicht möglich, da im Zuge eines Chargenwechsels Probleme mit der Spezifität auftraten, die auch nach Rücksprache mit dem Hersteller nicht gelöst werden konnten. Deshalb wurden im Folgenden der neue Antikörper ALK 1A4 sowie ein kommerziell erhältliches Kit, das auf dem Antikörper D5F3 basiert, jedoch zusätzlich einen Amplifikationsschritt beinhaltet (ALK D5F3/Ventana), getestet. Der Vergleich der Antikörper erfolgte an einer Serie von 218 Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen auf der Basis von Gewebe-Microarrays. Der ALK-Status der Fälle war durch vorherige qRT-PCR- und FISH-Analysen bekannt: 20 NSCLC waren ALK-rearrangiert, 198 NSCLC waren ALK-negativ.

Mit dem D5F3/Ventana-System wurden generell intensive zytoplasmatische Signale erzielt, die in Einzelfällen mit einer höheren Hintergrundfärbung verbunden waren. Die IHC mit dem 1A4-Antikörper wurde mit einer konventionellen Färbeprozedur durchgeführt und zeigte im Vergleich etwas schwächere zytoplasmatische Färbungen und eine geringere Hintergrundfärbung.

Der 1A4-Antikörper detektierte bei allen 20 ALK-rearrangierten Tumoren eine Proteinexpression und besaß damit eine Sensitivität von 100 %. In 17 Tumoren wurde eine mäßige bis starke Färbung, in weiteren 5 Tumoren eine schwache Färbung nachgewiesen. Alle Tumore mit mäßiger oder starker Proteinfärbung waren rearrangiert, außerdem 3 der 5 Tumore mit schwacher Färbung. Die Intensität der Immunfärbung korrelierte nicht mit der Höhe der Expression des Fusionstranskripts (s. Tab. 3). Bei den 2 Fällen mit schwacher Proteinexpression (#118; #119) konnte mittels FISH und qRT-PCR weder eine Rearrangierung noch eine ALK-Expression nachgewiesen werden, sodass beide Tumore als falsch-positiv aufgefasst wurden. Bei allen weiteren 196 ALK-negativen Fällen wurde kein Protein nachgewiesen. Damit betrug die Spezifität des 1A4-Assays 99,1 %.

Mit Hilfe des D5F3/Ventana-Assays konnten 19 von 20 ALK-rearrangierte Tumoren identifiziert und 217 der 218 Tumore korrekt identifiziert werden. Der Assay besaß somit eine Sensitivität von 95 % und eine Spezifität von 99,5 %. Bei den 19 IHC-positiven Fällen wurde eine starke, granuläre zytoplasmatische Färbung nachgewiesen. Drei weitere Tumore wiesen eine schwache Färbung mit atypischem fokalem Muster (Punkte) in kleinen Bereichen des Zytoplasmas (#21; #366) oder membranständiger sowie zytoplasmatischer Färbung (#330) auf (s. Abb. 15). Diese Fälle wurden nach Vorgaben des Herstellers als

negativ eingestuft. Zwei der 3 Fälle konnten als nicht-rearrangiert bestätigt werden (#330, #366). Fall #21 wies jedoch eine Translokation auf, die mittels FISH-Analyse detektiert wurde. Die qRT-PCR-Analyse zeigte eine unbalancierte, aber mit einer Expressionshöhe von 0,15 sehr niedrige Expression des Fusionstranskripts. Bei der Verwendung des Antikörpers 1A4 wurde bei diesem Fall eine geringe Proteinexpression nachgewiesen (1+) (s. Abb. 15/Tab. 3).

Beide IHC-Assays unterschieden mit hoher Sensitivität und Spezifität zwischen *ALK*-rearrangierten und nicht-rearrangierten Lungenkarzinomen (Gruber et al. 2015).

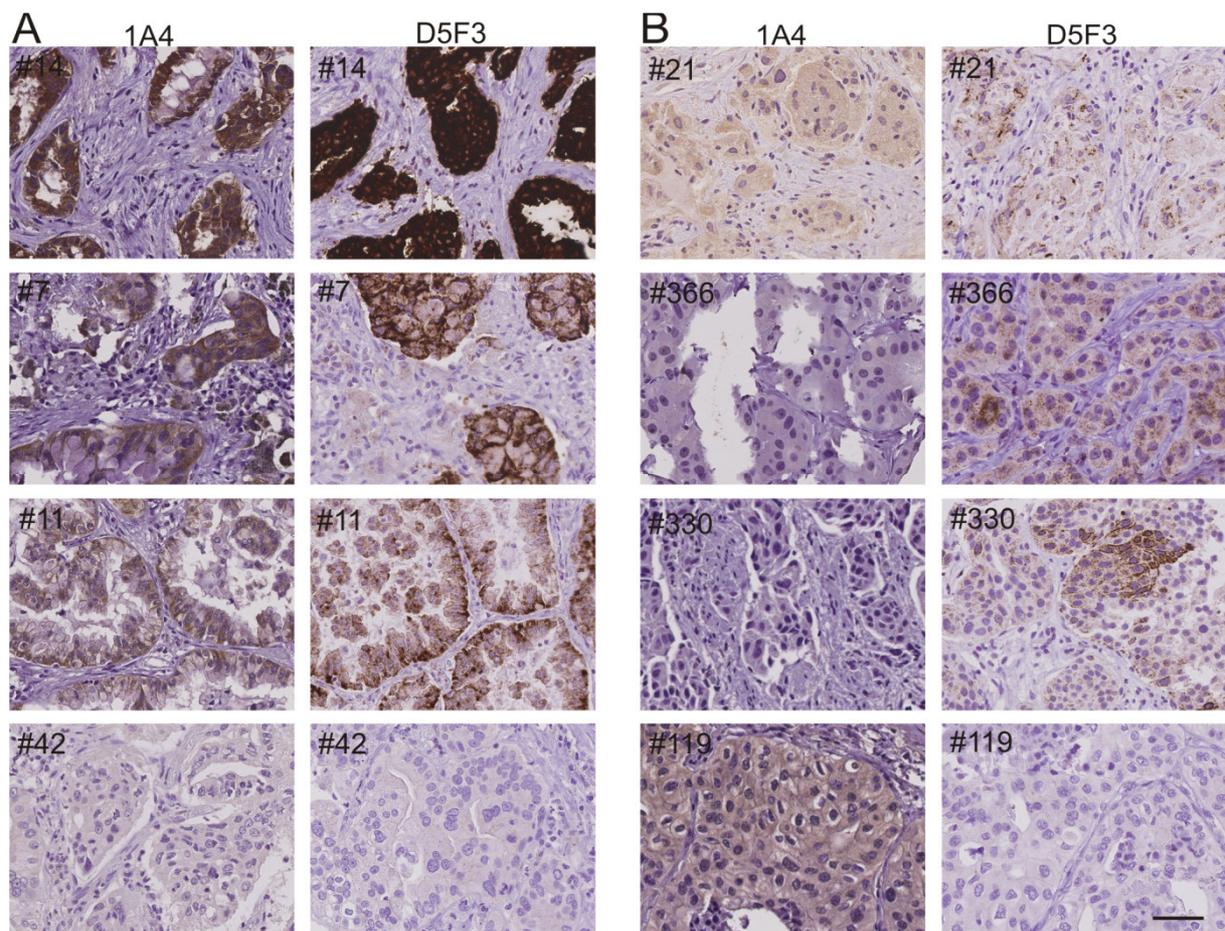


Abbildung 15: Beispiele der vergleichenden Immunfärbungen mit den Antikörpern 1A4 und D5F3/Ventana. **A)** zeigt die Färbung von *ALK*-positiven und -negativen Fällen, die bei beiden Antikörpern übereinstimmen. **B)** zeigt Fälle, bei denen unterschiedliche Färbungen aufgetreten sind. #21 war mit dem 1A4-Antikörper positiv und mit dem D5F3-Antikörper negativ zu werten. #366 und #330 zeigten mit dem D5F3-Antikörpern eine schwache Färbung, waren aber negativ zu werten. Bei #119 trat mit dem 1A4-Antikörper eine schwache, falsch-positive Färbung auf. Positiv gewertet wurden bei 1A4 Fälle mit einer Färbung (1+, 2+, 3+) in mindestens 10 % der Tumorzellen, bei D5F3 mit einer starken, granulären, zytoplasmatischen Färbung. (Gruber et al. 2015) Journal of Thoracic Oncology – April 2015 – Volume 4 – Issue 10 – p706-713, Wolters Kluwer Health Lippincott Williams & Wilkins©

Tabelle 3: Die Übersicht zeigt die Ergebnisse der Immunhistochemie aller positiven und kritischen Fälle sowie die Ergebnisse der qRT-PCR- und der FISH-Analyse

Fall #	Immunohistochemie ^a		qRT-PCR-Analyse ^b		FISH-Analyse ^c
	ALK 1A4 Antikörper	ALK D5F3 Antikörper	ALK 3' Bereich	ALK 5' Bereich	ALK break-apart Sonde
62	3+	positiv	3,84	0,01	Translokation mit Deletion
9	3+	positiv	1,03	0,00	Translokation
14	3+	positiv	0,72	0,02	Translokation mit Deletion
2	2+	positiv	6,23	0,03	Translokation
3	2+	positiv	5,94	0,02	Translokation
133	2+	positiv	1,96	0,00	Translokation
6	2+	positiv	1,84	0,00	Translokation mit Deletion
967	2+	positiv	1,61	0,02	Translokation
7	2+	positiv	1,58	0,01	Translokation mit Deletion
8	2+	positiv	1,30	0,01	Translokation
10	2+	positiv	1,01	0,16	Translokation
964	2+	positiv	0,93	0,00	Translokation
137	2+	positiv	0,79	0,02	Translokation
965	2+	positiv	0,57	0,01	Translokation
17	2+	positiv	0,55	0,00	Translokation mit Deletion
19	2+	positiv	0,41	0,01	Translokation
11	1+	positiv	0,95	0,19	Translokation mit Deletion
16	1+	positiv	0,62	0,11	Translokation
140	2+	positiv	0,25	0,00	Translokation
21	1+	fokal	0,15	0,01	Translokation
118	1+	negativ	0,04	0,01	normal
119	1+	negativ	0,01	0,02	normal
330	negativ	fokal	0,03	0,04	normal
366	negativ	fokal	0,01	0,00	normal

^aPositiv gewertet wurde bei 1A4 eine Färbung (1+, 2+, 3+) in mindestens 10 % der Tumorzellen, bei D5F3 eine starke, granuläre, zytoplasmatische Färbung. ^bqRT-PCR-Analyse: als rearrangiert wurden Fälle mit einem 3'-Wert $\geq 0,2$ und einem 3'/5'-Wert ≥ 5 (nicht gezeigt) definiert. ^cALK-rearrangiert mit ≥ 15 % break-apart Signalen oder zusätzlichen orangen Signalen.

Tabelle 4: Übersicht der Ergebnisse der IHC-Analyse mit dem Antikörper 1A4 bzw. D5F3/Ventana

ALK Status	n	IHC ALK-Antikörper 1A4			IHC ALK-Antikörper D5F3/Ventana		
		Positiv ^b	Kritisch ^c	Negativ	Positiv ^b	Kritisch ^d	Negativ
qRT-PCR/ FISH							
Positiv ^a	20	17	3	0	19	1	0
Negativ	198	0	2	196	0	2	196
Summe	218	17	5	196	19	3	196

^aPositiv bezieht sich auf eine qRT-PCR mit einem 3'-Wert $> 0,2$ und einem 3'/5'-Wert > 5 oder einer FISH mit mindestens 15 % break-apart Signalen oder zusätzlichen orangen Signalen. ^bPositiv gewertet wurde bei 1A4 eine Färbung (1+, 2+, 3+) in mindestens 10 % der Tumorzellen, bei D5F3 eine starke granuläre, zytoplasmatische Färbung. ^cKritisch bezeichnet Fälle mit schwacher Immunfärbung, die in 3 Fällen rearrangiert und in 2 Fällen nicht-rearrangiert waren. ^dKritisch bezeichnet Fälle mit atypischer Färbung, die nach Herstellerangaben negativ zu werten sind. Einer der 3 kritischen Fälle war rearrangiert.

3.3.8 Charakterisierung von Lungenkarzinomen mit Expression des *ALK*-Gesamttranskripts

In dieser Arbeit wurde durch die qRT-PCR-Analyse eine neue Subgruppe von NSCLC identifiziert, die eine Expression von *ALK* ohne Genrearrangierung aufwies. Um die Frage zu beantworten, ob *ALK* in diesen Tumoren aktiviert ist, wurden verschiedene Analysen durchgeführt: Eine Mutationsanalyse der Kinasedomäne von *ALK* sollte klären, ob aktivierende Mutationen vorliegen. Außerdem sollten Untersuchungen in Bezug auf eine Aktivierung von *ALK* bzw. von *ALK*-Targetproteinen durch Phosphorylierung sowie eine Analyse zur Expression von *ALK*-Liganden durchgeführt werden.

3.3.8.1 Mutationsanalyse der Kinasedomäne

In Neuroblastomen ist im Gegensatz zu Lungenkarzinomen die Expression von *ALK*-Gesamttranskripten bereits beschrieben worden. Bei diesen Fällen führen oft Mutationen im Bereich der Kinasedomäne zu einer Aktivierung von *ALK* (Chen et al. 2008; Janoueix-Lerosey et al. 2008). Um zu klären, ob in den NSCLC mit *ALK*-Expression, die im Rahmen dieser Arbeit identifiziert wurden, aktivierende Mutationen vorliegen, wurde die Kinasedomäne (Exone 20 – 29) von 6 Fällen sequenziert (#22 – #27).

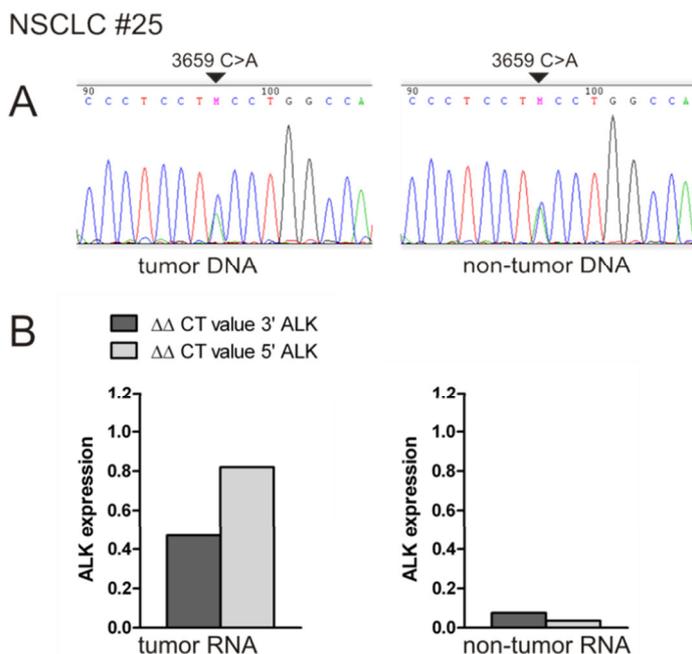


Abbildung 16: *ALK*-Mutation und Expression des Gesamttranskripts in NSCLC #25. **A)** Sowohl Tumor- als auch Lungengewebe trugen die heterozygote Substitution 3659 C>A in der Kinasedomäne. Diese führt zum Austausch der Aminosäure Serin zu Tyrosin (S1220Y). **B)** Die Expression des Gesamttranskripts von *ALK* war nur im Tumorgewebe nachzuweisen (Gruber et al. 2014). Journal of Thoracic Oncology – March 2014 – Volume 9 – Issue 3 – p307-315, Wolters Kluwer Health Lippincott Williams & Wilkins©

Bei einem Lungenkarzinom (#25) wurde eine Mutation identifiziert. Ein heterozygoter Nukleotidaustausch (3659 C>A) führte zu einem Austausch einer Aminosäure im zentralen Bereich der Tyrosinkinasedomäne (S1220Y, s. Abb. 16). Bei der Sequenzierung von tumorfreiem Lungengewebe dieses Patienten konnte dieselbe Mutation in heterozygotem Zustand nachgewiesen werden, weshalb es sich bei diesem Nukleotidaustausch um eine Keimbahnveränderung handelt. Die Expression des *ALK*-Transkripts war jedoch tumorspezifisch und im Lungengewebe nicht nachzuweisen.

3.3.8.2 Analyse der Expression der ALK-Liganden MDK und PTN

Die Wachstumsfaktoren Midkin (MDK) und Pleiotrophin (PTN) wurden als spezifische Liganden der ALK-Rezeptor-Tyrosinkinase identifiziert. Die Bindung führt zur Autophosphorylierung von ALK und der Aktivierung des MAPK- und PI3K-Signalwegs (Lorente et al. 2011; Ma et al. 2013; Stoica et al. 2002). Obwohl die Expression der ALK-Liganden im adulten Organismus nur in sehr geringen Mengen nachzuweisen ist, besitzen viele Tumore wie z. B. Lungenkarzinome, Neuroblastome oder Astrozytome eine hohe Expression, die generell mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (Ikematsu et al., 2000; Mishima et al., 1997; O'Brien et al., 1996; Tsutsui et al., 1993).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Genexpression der ALK-Liganden MDK und PTN in einer Serie von Lungenkarzinomen analysiert, um im Besonderen die Frage zu klären, ob bei den Tumoren mit Gesamttranskript-Expression die Liganden, welche für eine ALK-Aktivierung erforderlich sind, exprimiert werden. Für die Etablierung der Primer sowie die Normierung der Expressionswerte wurde cDNA aus Lymphknotengewebe verwendet. Die Auswertung erfolgte, wie bei der Messung der *ALK*-Expression, mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode und der Verwendung von *PGK1* als Referenzgen.

Die Expression von *MDK* und *PTN* wurde in 91 bzw. 106 Lungenkarzinomen, darunter jeweils 12 rearrangierte und 6 *ALK*-Gesamttranskript-exprimierende Fälle sowie in 5 normalen Lungen untersucht. Wie in Abb. 17 dargestellt, zeigte *MDK* im Vergleich zu normaler Lunge in NSCLC tendenziell eine stärkere Expression, welche in 41 % der Tumore signifikant erhöht war. Die Expression von *PTN* war meist geringer als in normaler Lunge und nur in 5 % der NSCLC signifikant erhöht. In den 12 rearrangierten Fällen sowie den 6 Fällen mit *ALK*-Gesamttranskript-Expression war *MDK* deutlich und *PTN* generell schwach exprimiert.

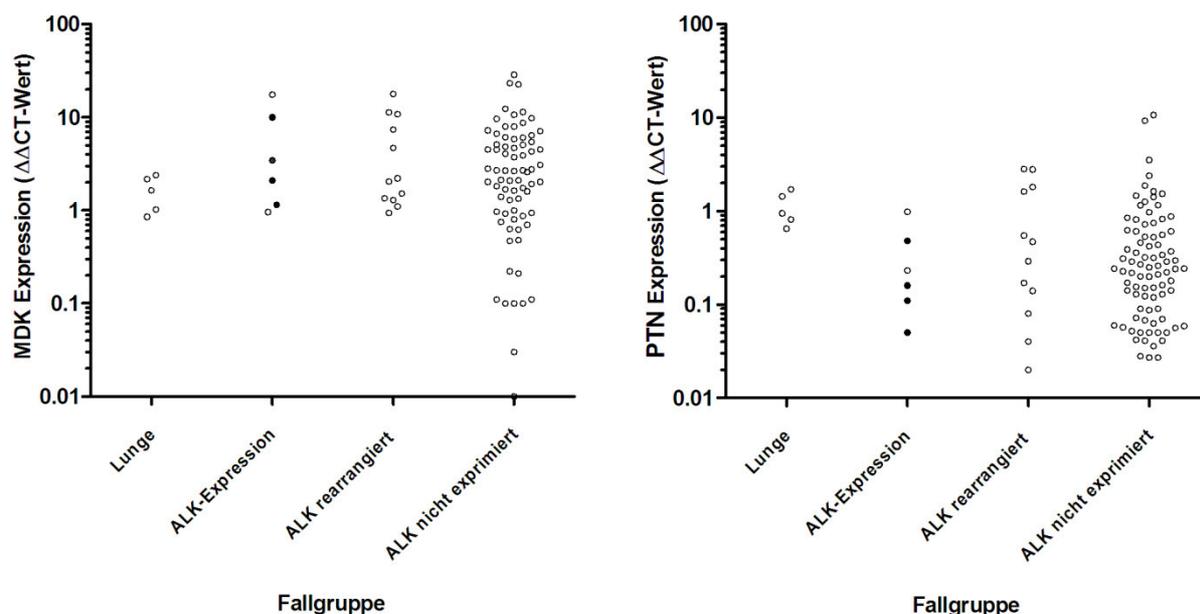


Abbildung 17: Expression von MDK und PTN in NSCLC und normalem Lungengewebe. In Normalgewebe wurden MDK und PTN exprimiert. In Lungenkarzinomen zeigte MDK tendenziell eine hohe Expression, bei PTN war diese in den meisten Fällen deutlich niedriger. In allen NSCLC mit einer Gesamttranskript-Expression von ALK wurde gleichzeitig MDK exprimiert. Die Tumore mit ALK-Gesamttranskript-Expression, bei denen ALK-Protein detektiert wurde, sind schwarz markiert.

3.3.8.3 Analysen zur Autophosphorylierung von ALK und Aktivierung von ALK-Targetproteinen

Wird ALK durch Ligandenbindung und Dimerisierung aktiviert, erfolgt zunächst eine Autophosphorylierung des Proteins. Diese führt durch eine Übertragung von Phosphatgruppen von ALK zu einer Aktivierung von Targetproteinen. Bei ALK-rearrangierten Lungenkarzinomen und Zelllinien wurde der aktivierte, autophosphorylierte Zustand von ALK-Fusionsproteinen mit Hilfe von Western Blots nachgewiesen (Li et al. 2011). Da von den in dieser Arbeit verwendeten Lungenkarzinomen kein kryokonserviertes Gewebe existierte, sollte ein Nachweis der Autophosphorylierung von ALK durch eine Immunfärbung mit Hilfe eines phospho-ALK (Tyr1604) Antikörpers erfolgen. Der Antikörper erkennt die Phosphorylierung von Tyrosin 1604 im 3'-Bereich von ALK und wurde bereits zur Detektion von Phospho-ALK mittels IHC an FFPE-Gewebe von NSCLC verwendet (Wang et al. 2011). Ein Nachweis der ALK-Phosphorylierung bei Lungenkarzinomen mit Expression des Gesamttranskripts könnte Rückschlüsse auf die Aktivität von ALK und die Relevanz bei der Tumorentstehung zulassen und sollte deshalb im Vergleich mit ALK-rearrangierten Lungenkarzinomen untersucht werden.

In Vorversuchen wurde bereits gezeigt, dass der Antikörper für immunhistochemische Färbungen von FFPE-Gewebe nicht geeignet ist. Der Antikörper war spezifisch für Tumorgewebe, färbte jedoch unabhängig vom ALK-Status alle Lungenkarzinome mit derselben Intensität. Dies wurde vermutlich durch Kreuz-Hybridisierungen mit anderen phosphorylierten Tyrosinkinase verursacht (s. Abb. 18). Ein weiterer phospho-ALK

Antikörper (Tyr1507) zeigte dieselben Ergebnisse. Ein Nachweis von ALK-Autophosphorylierung mittels IHC war daher in dieser Arbeit nicht möglich.

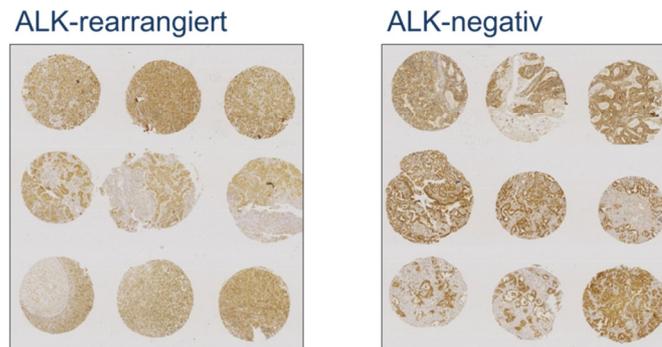


Abbildung 18: Phospho-ALK (Tyr1604) Immunfärbung von ALK-rearrangierten und -negativen Lungenkarzinomen. Der Antikörper war nicht spezifisch für phosphoryliertes ALK.

ALK-Rearrangierungen führen zu einer zunehmenden Zellproliferation, Veränderungen der Struktur des Zytoskeletts, sowie zu einem verlängerten Überleben der Zellen durch eine Aktivierung intrazellulärer Signalwege. Es wurde nachgewiesen, dass ALK-Fusionsproteine, die JAK3-STAT3-, Ras-MAPK- und PI3K-Akt-Signalwege durch Phosphorylierungen von STAT3, MAPK und Akt aktivieren (Chiarle et al. 2008). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung der ALK-positiven Zelllinie H2228 mit ALK-Inhibitoren zu einer deutlichen Abnahme der Phosphorylierung von STAT3, MAPK und Akt führt (Li et al. 2011). Die Aktivierung der Signalwege sollte bei den ALK-rearrangierten NSCLC dieser Serie durch Immunfärbungen mit Antikörpern, die den phosphorylierten Zustand von STAT3 (p-STAT3), 44/42 MAPK (p44/42 MAPK) und Akt (p-Akt) erkennen, geprüft werden. Außerdem sollte bei den Lungenkarzinomen, die eine Expression des Gesamttranskripts aufweisen, geklärt werden, ob eine Aktivierung der ALK-Signalwege nachzuweisen ist. Bei der Etablierung und in Vorversuchen mit den Antikörpern stellte sich heraus, dass mit dem pAkt-Antikörper auch bei geringer Verdünnung keine Färbungen mit hinreichender Signalintensität erreicht werden konnten. Daher waren zuverlässige Untersuchungen mit diesem Antikörper nicht möglich. Die Analysen wurden deshalb ausschließlich mit dem pSTAT3- und dem p44/42 MAPK-Antikörper durchgeführt. Untersucht wurden 18 (p44/42MAPK) bzw. 17 (pSTAT3) ALK-rearrangierte, 2 ALK-exprimierende und 212 (p44/42MAPK) bzw. 213 (pSTAT3) ALK-negative NSCLC. Aufgrund des limitierten Probenmaterials konnten nicht alle ALK-exprimierende und -rearrangierte NSCLC untersucht werden. Positive Immunfärbungen von pSTAT3 wurden in 71 % der ALK-rearrangierten, bei beiden ALK-exprimierenden sowie 68 % der ALK-negativen NSCLC gesehen. p44/42 MAPK wurde in 39 % der ALK-rearrangierten, keinem der ALK-exprimierenden, aber 37 % der ALK-negativen NSCLC nachgewiesen.

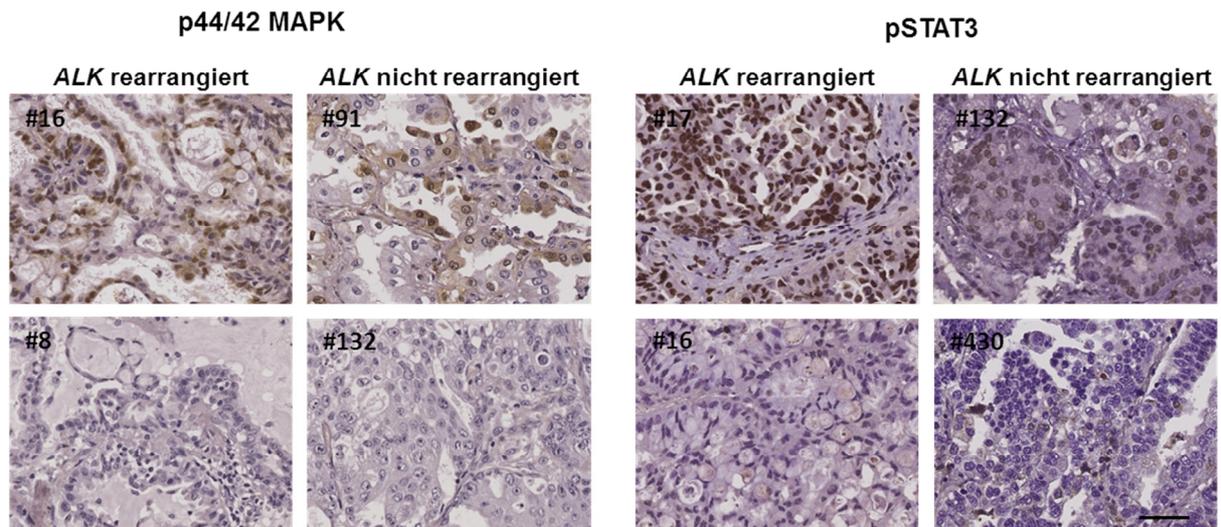


Abbildung 19: IHC bei ALK-rearrangierten und nicht-rearrangierten NSCLC mit p44/42 MAPK- und pSTAT3-spezifischen Antikörpern. Eine Phosphorylierung von MAPK und STAT3 konnte in rearrangierten und nicht-rearrangierten NSCLC nachgewiesen werden, 29 % der pSTAT3- und 61 % der p44/42 MAPK-Färbungen zeigten bei den rearrangierten NSCLC keine Phosphorylierung.

Demnach war eine Aktivierung von STAT3 und 44/42 MAPK sowohl in Tumoren mit Rearrangierung als auch in ALK-negativen NSCLC nachzuweisen (s. Abb. 19). Die in ALK-negativen Fällen beobachtete Phosphorylierung von STAT3 und 44/42 MAPK kann in diesen Tumoren durch die Aktivierung anderer Tyrosinkinasen entstehen. Bei 4 ALK-rearrangierten NSCLC wurden weder pSTAT3 noch p44/42 MAPK detektiert, was auf Fixierungsartefakte hindeutet. Die ALK-exprimierenden Tumore wiesen ausschließlich eine Phosphorylierung von pSTAT3 auf (s. Tab. 5).

Tabelle 5: Übersicht der Untersuchungen der NSCLC mit ALK-Expression

Fall #	ALK qRT-PCR		qRT-PCR ALK-Liganden		FISH	IHC		
	ALK 3' Expression	ALK 5' Expression	MDK Expression	PTN Expression	ALK break-apart Sonde	ALK	pMAPK	pSTAT3
22	0,96	1,85	2,09	0,48	normal	1+	n. u.	n. u.
23	0,76	1,19	1,15	0,05	normal	1+	0	2+
24	0,60	0,94	0,96	0,23	normal	0	n. u.	n. u.
25*	0,47	0,82	3,43	0,16	normal	1+	n. u.	n. u.
26	0,42	1,26	n. u.	n. u.	normal	n. a.	n. u.	n. u.
27	0,42	0,66	10,00	0,11	normal	1+	0	1+
143	0,36	0,59	17,44	0,98	normal	0	n. u.	n. u.

Alle Fälle mit ALK-Expression zeigten eine Genexpression des Liganden MDK. ALK-Protein war in 4 der 6 NSCLC nachweisbar. Die Analyse von p44/42 MAPK und pSTAT3 zeigte eine Expression von pSTAT3 in den 2 analysierten Tumoren, wegen des limitierten Biopsiematerials konnten keine weiteren Fälle analysiert werden. 25*: Nachweis einer Mutation (3659 C>A) im Bereich der Kinasedomäne. n. u. = nicht untersucht wegen Materialmangels; n. a. = nicht auswertbar.

3.4 Charakterisierung von *ROS1* im Lungenkarzinom

Das für eine Rezeptor-Tyrosinkinase kodierende Gen *ROS1* kann wie *ALK* in Lungenkarzinomen und weiteren Tumorentitäten rearrangiert vorliegen. Durch die Entstehung eines chimären Proteins erfolgt eine konstitutive Aktivierung der Kinasedomäne von *ROS1*, welche in allen Fusionsproteinen enthalten ist und durch spezifische Tyrosinkinaseinhibitoren, wie Crizotinib, gehemmt werden kann. Ein Nachweis der Rearrangierungen mittels break-apart FISH ist aufgrund der sehr geringen Rearrangierungsrate von 1 – 2 % in NSCLC sehr aufwändig und stellt daher keine geeignete Screeningmethode für die Routinediagnostik dar. Für den Nachweis von *ROS1*-Translokationen sollte daher ein qRT-PCR-basierter Assay nach demselben Prinzip wie des *ALK* qRT-PCR-Assays etabliert und die Eignung für den Einsatz im diagnostischen Bereich geprüft werden. Bei dieser Fragestellung sollten auch Informationen über die Genexpression im Lungenkarzinom gewonnen werden, über die bislang nur sehr wenige und diskrepante Daten publiziert wurden.

3.4.1 Etablierung eines qRT-PCR-Assays zur Detektion von *ROS1*-Rearrangierungen und Analyse der *ROS1*-Expression im NSCLC

Die Kinasedomäne wird in Tumoren mit *ROS1*-Rearrangierung ebenso wie bei *ALK* durch eine Genfusion exprimiert und aktiviert, während der 5'-Bereich von *ROS1* in diesen Tumoren nicht exprimiert wird. Rearrangierte Tumore sollten daher durch eine erhöhte, unbalancierte Expression des 3'-Bereichs von *ROS1*-Transkripten identifiziert und von Fällen ohne Genrearrangierung unterschieden werden können. Die Bruchpunkte liegen bei *ROS1* in Intron 31, 33, 34 und 35. Die Primer für das Amplikon im 5'-Bereich wurden in den Exons 15 und 16 gewählt (5' Amplikon (1) = 5'-A1), die Primer für das Amplikon im 3'-Bereich innerhalb der Kinasedomäne in den Exons 40 und 41 (s. Abb. 20). Aufgrund der Größe der dazwischen liegenden Introns (2174 bp und 1152 bp) konnte eine Amplifikation genomischer DNA ausgeschlossen werden. Für eine effiziente Amplifikation und für die Anwendung von cDNA aus FFPE-Gewebe wurden Amplikons mit geringer Größe (71 und 81 bp) konzipiert.

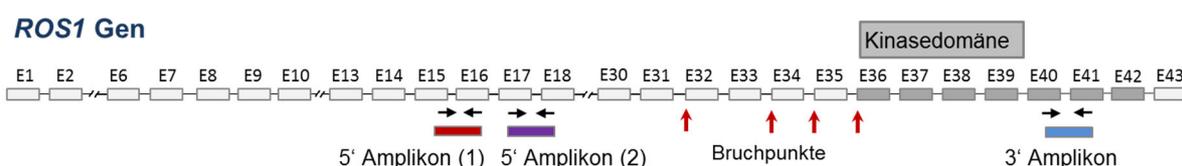


Abbildung 20: Lage der Amplikons der *ROS1* qRT-PCR. Die Amplikons des 5'-Bereichs sind mit einer roten Box markiert, das Amplikon für den 3'-Bereich mit einer blauen Box. Für die qRT-PCR-Analyse wurde zunächst das 5'-Amplikon (1) verwendet, die Analyse mit 5'-Amplikon (2) erfolgte ergänzend. Die Bruchpunkte sind durch rote Pfeile markiert. Darstellung von *ROS1* nach NM_002944.2.

Für die Etablierung der Primer und als Positiv-Kontrollen wurden die Glioblastom-Zelllinien U118 MG, die eine *FIG-ROS1* Fusion besitzt, sowie U343 MGa, welche *ROS1* exprimiert, verwendet. Mit Hilfe von Verdünnungsreihen mit U343 MGa-cDNA konnte gezeigt werden, dass beide *ROS1*-Amplikons eine sehr gute, vergleichbare Effizienz besitzen und für die qRT-PCR-Analyse geeignet sind. Die CT-Werte beider Amplikons korrelierten mit der eingesetzten Menge der cDNA (s. Abb. 21). Aufgrund der geringen Expression von *ROS1* konnte die Zelllinie U343 MGa allerdings nicht wie vorgesehen zur Normierung der *ROS1*-Expressionswerte verwendet werden. Da keine weitere Kontrolle mit einer gesicherten Gesamttranskript-Expression zur Verfügung stand, war eine Normierung der Messungen mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode nicht möglich. Die Expressionswerte wurden deshalb für jeden Fall auf die Expression des Referenzgens *PGK1* normalisiert (ΔCT -Analyse).

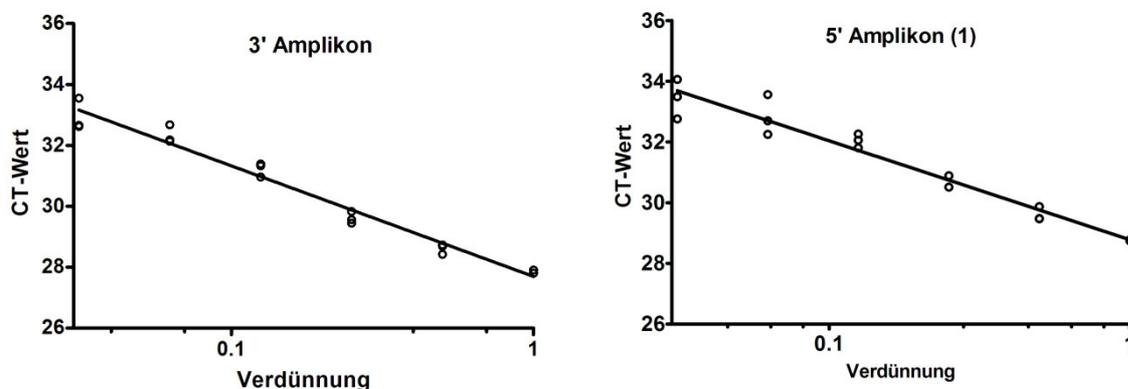


Abbildung 21: Standardkurven der *ROS1*-Amplikons. Die Standardkurven des 3'- und des 5'-Amplikons (1) von *ROS1* wurden durch eine Verdünnungsreihe mit U343 MGa cDNA in ddH₂O bestimmt. Obwohl die Expression von *ROS1* in der Zelllinie gering war, korrelierten die CT-Werte beider Amplikons über einen weiten Bereich mit der eingesetzten cDNA-Menge ($p = 0,0001$).

3.4.2 Validierung des qRT-PCR-Assays und Screening nach *ROS1*-Rearrangierungen

Nach der Etablierung der Primer wurde die Expression von *ROS1* in einer Serie von 686 Lungenkarzinomen analysiert. 97,8 % (671) der Fälle konnten ausgewertet werden. Fälle, bei denen in vorherigen Analysen bereits eine mangelhafte RNA-Qualität festgestellt wurde, wurden nicht in diese Serie einbezogen. In den 9 untersuchten Proben von normalem Lungengewebe wurde eine geringe *ROS1*-Expression nachgewiesen (Mittelwert 0,25; 0,06 – 0,44). Wie bei der Analyse der *ALK*-Expression wurde in dem Großteil der Lungenkarzinom-Kohorte (ca. 90 %) keine oder eine sehr geringe Expression von *ROS1* detektiert. In wenigen Fällen wurde eine unbalancierte (3 %) oder balancierte (6 %) Expression des 3'-Bereichs gemessen (s. Abb. 22). Um die Ergebnisse der qRT-PCR zu validieren und Kriterien für rearrangierte Tumore zu definieren, erfolgten FISH-Analysen mit Hilfe einer *ROS1* break-apart Sonde. Insgesamt wurden 154 Lungenkarzinome ausgewertet. In diese Analyse wurden 17 der 20 Fälle mit einer deutlichen unbalancierten 3'-Expression $> 0,3$ (Quotient

3'/5'-A1 > 3,5) eingeschlossen, von 3 Fällen (#67, #964, #80) war kein Material mehr vorhanden. Außerdem wurden 9 NSCLC mit einer leichten unbalancierten 3'-Expression > 0,3 (3'/5'-A1 zwischen 2,0 und 3,5), 6 NSCLC mit einer balancierten *ROS1*-Expression > 0,3 (3'/5'-A1 zwischen 0,5 und 2,0) sowie 78 NSCLC mit sehr geringer bzw. ohne *ROS1*-Expression untersucht.

Eine Rearrangierung konnte in 5 der 17 potentiell rearrangierten Fälle mit einer deutlichen unbalancierten Expression nachgewiesen werden. Vier der 5 rearrangierten Tumore zeigten fast keine Expression des 5' Amplikons (1), während Fall #65 eine geringe Expression des 5'-Amplikons aufwies (3'/5'-A1 3,55; s. Abb. 22 und 23). Die übrigen 12 Fälle dieser Gruppe zeigten trotz unbalancierter Expression der Amplikons ausschließlich Fusionssignale. Alle weiteren analysierten Lungenkarzinome, die entweder eine leichte unbalancierte, eine balancierte oder keine Expression aufwiesen, waren nicht rearrangiert (s. Abb. 22). Zusätzlich konnte mittels FISH bei den NSCLC #873 und #374, die in der qRT-PCR-Analyse aufgrund einer schlechten RNA-Qualität nicht auswertbar waren, eine Translokation identifiziert werden (s. Tab. 6).

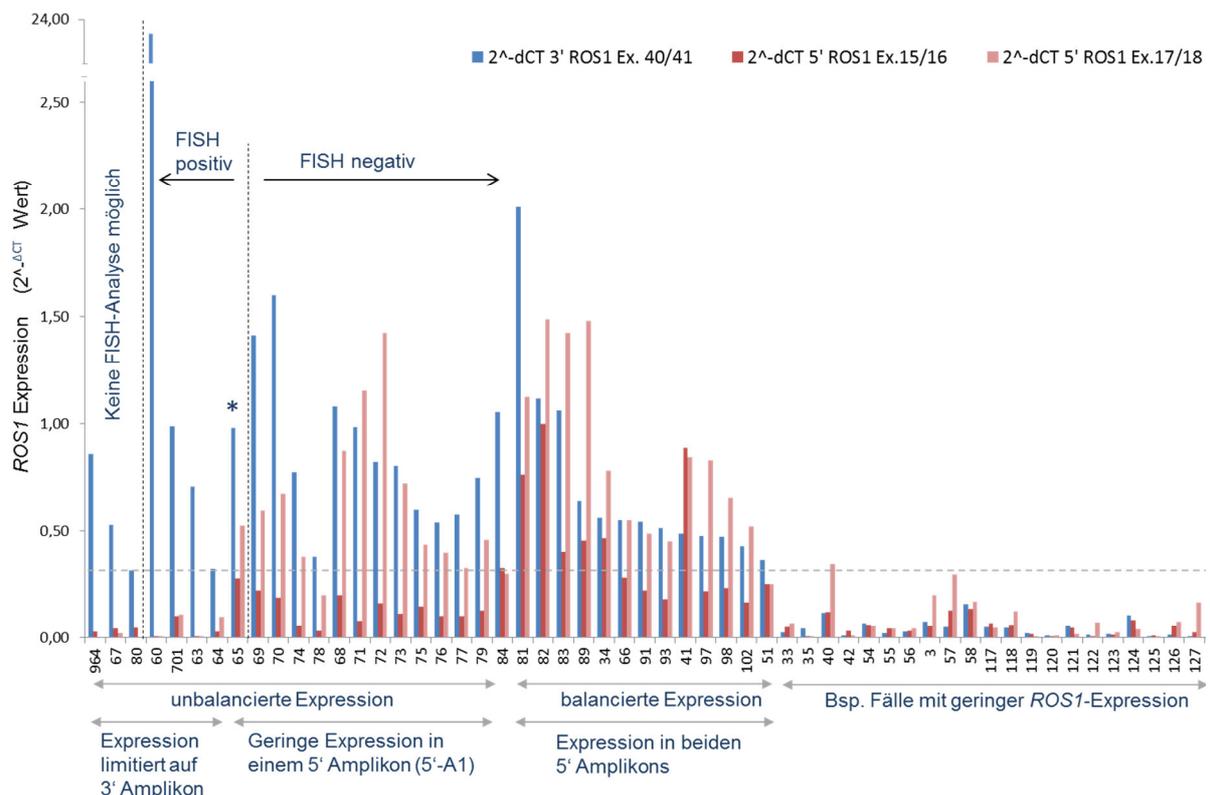


Abbildung 22: Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse von *ROS1*. Dargestellt sind die Expressionswerte von allen rearrangierten Fällen und Fällen mit *ROS1*-Expression im Vergleich zur FISH-Analyse sowie beispielhaft 21 Tumore mit geringer oder nicht vorhandener *ROS1*-Expression. Die horizontale Linie zeigt den berechneten Grenzwert einer 3'-Expression von 0,32 an (ROC-Analyse), die vertikalen Linien separieren NSCLC ohne FISH sowie FISH-positive und FISH-negative Fälle. Expressionswerte des 3'-Bereichs (Kinasedomäne) sind als blaue Balken, Werte der 5'-Messungen als rote (5'-A1) bzw. hellrote (5'-A2) Balken dargestellt. FISH-positive Fälle besaßen bis auf #65 (=*) eine exklusive Expression der Kinasedomäne. Die Fälle #69 bis #84 zeigten eine geringe Expression des 5'-Amplikons in Exon 15/16. Die Messung eines zweiten 5'-Amplikons in Exon 17/18 detektierte eine

deutliche Expression (Ausnahme #84), die diese Fälle von den rearrangierten Tumoren differenziert. Wegen des limitierten Materials konnte 5'-A2 bei #80 und #964 nicht gemessen werden.

Um die Qualität des diagnostischen Tests beurteilen zu können und um geeignete Schwellenwerte zu definieren, anhand derer rearrangierte Fälle eindeutig identifiziert werden können, erfolgte eine ROC-Analyse. Dieser Test ermöglicht durch den Vergleich der qRT-PCR- mit den FISH-Daten die Identifizierung der bestmöglichen Grenzwerte für den qRT-PCR-Assay. Eine hohe Sensitivität des Assays wurde mit Schwellenwerten von 0,32 für die 3'-Expression und einem Quotienten $3'/5'-A1 > 3,5$ erreicht. Diese Grenzwerte führen zu einer Sensitivität von 100 %, haben jedoch eine geringe Spezifität von 53,8 % (12 Tumore falsch-positiv) zur Folge.

Im Folgenden wurde geprüft, ob mit einem zweiten 5'-Amplikon die Spezifität verbessert werden kann. Dazu wurde ein zweites Primerpaar für den 5'-Bereich etabliert, welches in Exon 17 sowie im Übergang der Exons 17/18 lag und ein Produkt von 79 bp amplifiziert (5' Amplikon (2) = A2). Nach der Etablierung an mRNA aus fetaler Lunge sollten alle Fälle mit einer 3'-Expression $> 0,3$ sowie eine Serie von Tumoren, die keine Expression zeigten, nochmals mit dem zweiten 5'-Amplikon gemessen werden. Aufgrund des limitierten Materials konnten nur 53 der 65 Fälle mit einer Expression $> 0,3$ analysiert werden, von 31 dieser Tumoren lagen zusätzlich FISH-Daten vor. Insgesamt wurden bei dieser Serie 108 NSCLC untersucht.

Für alle 90 untersuchten Fälle mit balancierter oder ohne *ROS1*-Expression wurden mit beiden 5'-Amplikons vergleichbare Ergebnisse erzielt. Bei allen 5 FISH-positiven NSCLC wurde mit Ausnahme eines Falles (#65) eine 3'-Expression, aber keine 5'-Expression von *ROS1* nachgewiesen. Der rearrangierte Fall #65 zeigte als einziger rearrangierter Fall auch mit dem zweiten Amplikon eine deutliche 5'-Expression und unterschied sich damit von allen anderen rearrangierten Tumoren (s. Abb. 23).

Bei allen nicht-rearrangierten Lungenkarzinomen, die den 3'-Bereich, aber nur wenig Exon 15/16 (5'-A1) exprimierten (#69 – #79), wurde mit dem zusätzlichen 5'-Amplikon eine Expression des Gesamttranskripts nachgewiesen. Diese Daten deuteten auf Transkriptvarianten von *ROS1* in den Lungenkarzinomen hin, die Exon 15/16 nicht enthielten. NSCLC #84 war FISH-negativ, zeigte aber mit beiden 5'-Amplikons eine leicht unbalancierte Expression ($3'/5'-A1$ 3,3; $3'/5'-A2$ 3,5), was auf die Expression von Transkripten ohne Exon 15/16 und Exon 17/18 schließen lässt. Von 3 Fällen mit deutlich unbalancierter Expression stand kein Material für die FISH-Analyse zur Verfügung (#964, #67, #80, das zweite Amplikon 5'-A2 konnte nur noch bei #67 gemessen werden. Bei 2 der 3 Tumore war eine vorliegende Translokation aufgrund der deutlichen 3'-Expression und der hohen Quotienten sehr wahrscheinlich (#964: $3'/5'-A1$ 33,2; #67: $3'/5'-A1$ 12,9; $3'/5'-A2$ 25,5). Der dritte Fall (#80) war mit einer 3'-Expression von 0,31 und einem $3'/5'-A1$ -Quotienten von

6,7 eventuell rearrangiert, da die Werte jedoch in einem Grenzbereich lagen war keine definitive Aussage möglich.

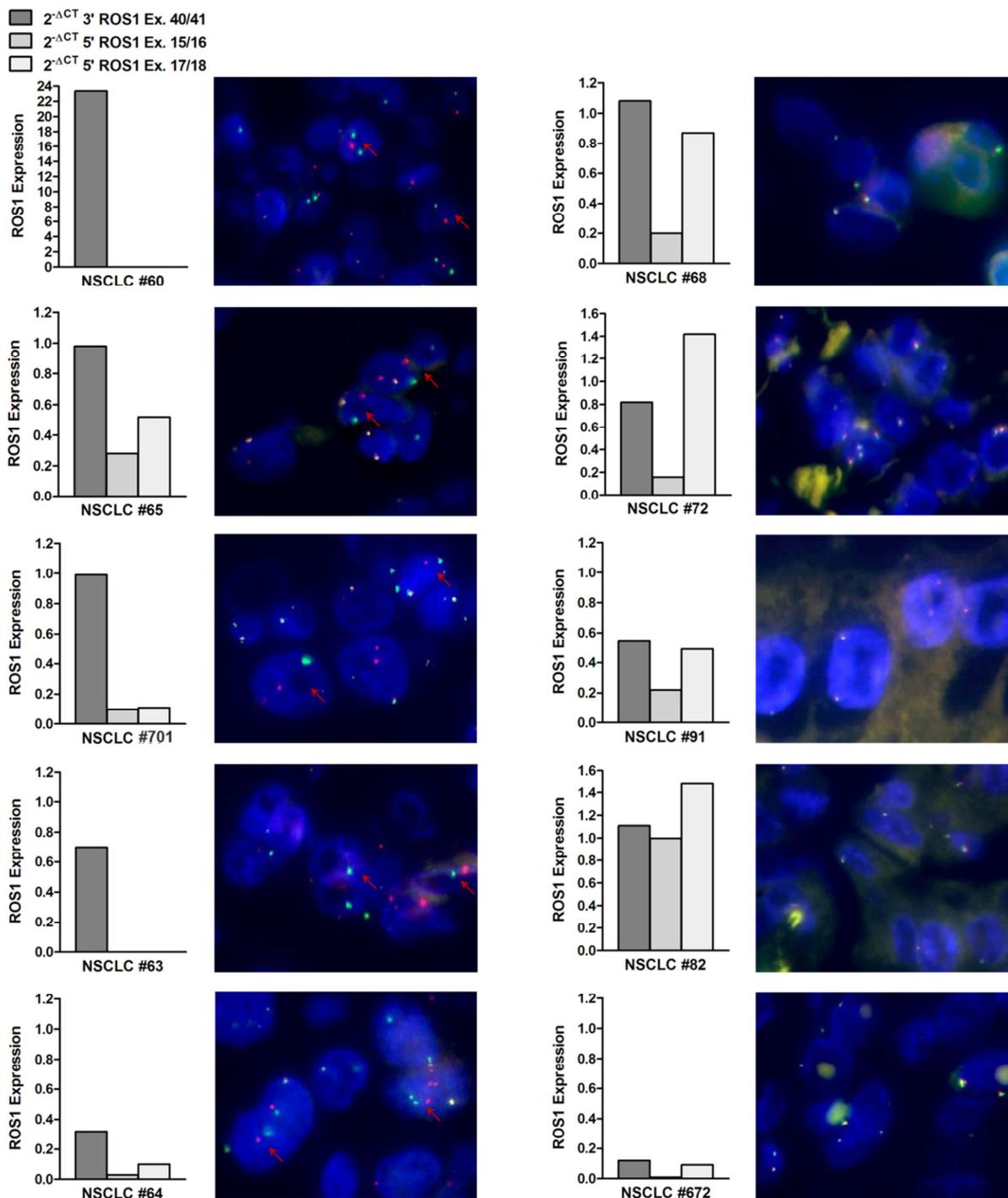


Abbildung 23: Expression von *ROS1* bei rearrangierten (links) und nicht-rearrangierten NSCLC (rechts). Dunkelgraue Balken stellen die Expression des 3'-Bereichs, hellgraue Balken die Expression der Amplikons des 5'-Bereichs dar (mittelgrau = 5'-A1; hellgrau = 5'-A2. Break-apart Signale in rearrangierten Zellen sind mit roten Pfeilen markiert. Rearrangierte Fälle zeigen bis auf #65 eine exklusive Expression der Kinasedomäne. Dieser Fall kann kaum von nicht-rearrangierten Tumoren mit *ROS1*-Expression unterschieden werden. Die beispielhaft abgebildeten nicht-rearrangierten NSCLC mit unbalancierter Expression (#68, #72, #91) weisen eine sehr geringe Expression des ersten 5'-Amplikons auf (Exon 15/16). Mit Hilfe eines zweiten Amplikons (Exon 17/18) konnten diese Fälle jedoch von translozierten Tumoren unterschieden werden. NSCLC #82 und #672 sind charakteristische Beispiele für nicht-rearrangierte Tumore mit balancierter Expression und ohne Expression.

Eine ROC-Analyse bestätigte, dass die Spezifität des Assays bei einer Verwendung von beiden 5'-Amplikons deutlich gesteigert werden kann. Mit Grenzwerten für die 3'-Expression von 0,32 und für den 3'/5'-Quotienten des ersten 5'-Amplikons von 3,5 und des zweiten 5'-Amplikons von 1,9 wurde eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 84,6 % erreicht. Vier falsch-positiv detektierte Fälle (#69, #70, #74 #78, s. Tab. 6) sind auf den niedrigen Quotienten für das zweite 5'-Amplikon zurückzuführen. Mit einem Quotienten von 3,3 anstatt 1,9 könnte die Spezifität auf 96,2 % erhöht werden, dafür würde die Sensitivität auf 80 % sinken, da ein positiver Tumor (#65) dann nicht mehr detektiert würde.

Insgesamt wurden durch die quantitative Messung der exprimierten *ROS1*-Transkripte 7 *ROS1*-rearrangierte Tumore (1 %) sowie eine Subgruppe mit *ROS1*-Expression ohne Rearrangierung (8 %) identifiziert. Die Verwendung von 2 verschiedenen 5'-Amplikons ermöglichte eine eindeutige Diagnostik von *ROS1*-Translokationen in 99,3 % der Fälle. Wegen der geringen Anzahl an translozierten Fällen sollten diese Analyse und die festgelegten Grenzwerte verifiziert werden. Daher sollten Fälle mit einer *ROS1*-Expression > 0,3 und leicht unbalancierter Expression eines oder beider Amplikons (Quotient < 5) mit einer weiteren Methode analysiert werden.

3.4.3 Identifizierung von *ROS1*-Transkriptvarianten

Die in der Expressionsstudie nachgewiesene, unterschiedliche Expression der 5'-Amplikons in nicht-rearrangierten Fällen war ein Hinweis auf die Expression von *ROS1*-Transkriptvarianten. Da bekannt ist, dass in Tumoren Spleißvarianten auftreten können, die in der Pathogenese beteiligt sind, sollte die Frage beantwortet werden, ob *ROS1*-Transkriptvarianten in der Entstehung von NSCLC involviert sind. Die in Tumoren nachweisbaren Transkriptvarianten werden häufig während der Embryonalentwicklung exprimiert, es können aber auch neue Varianten auftreten (Bonomi et al. 2013). Aus diesem Grund und wegen des limitierten Biopsiematerials wurden zunächst alle Untersuchungen auf potentielle Transkriptvarianten mit mRNA aus fetaler Lunge durchgeführt, die kommerziell verfügbar war. Die RNA stammte aus Frischgewebe, war daher von guter Qualität und zeigte eine *ROS1*-Expression.

Um mögliche Spleißvarianten im 5'-Bereich (Exon 1 – 20) von *ROS1* zu identifizieren, erfolgten spezifische RT-PCR-Amplifikationen von Teilbereichen (Ex. 1 – 17/18; Ex. 7 – 17/18; Ex. 12 – 17/18; Ex. 14 – 17/18; Ex. 16 – 17/18; Ex. 16 – 19/20; Ex. 17 – 19/20, s. Abb. 24). Neben der cDNA aus fetaler Lunge wurden 8 nicht-rearrangierte NSCLC, davon 6 Fälle mit unbalancierter Expression der Exons 15/16 bzw. Exon 15/16 und Exon 17/18 (#84) sowie 2 Fälle mit balancierter Expression (#91, #88) untersucht. Die verwendeten Primer, Primerkombinationen sowie die Annealing-Temperaturen sind im Anhang aufgeführt. Die PCR-Produkte, die im Agarosegel sichtbar waren, wurden im Anschluss sequenziert. Wenn

bei einer PCR-Amplifikation mehrere Produkte entstanden, erfolgte vor der Sequenz-Analyse die Isolation und Aufreinigung der einzelnen Produkte aus dem Agarosegel.

In fetaler Lunge und in Tumorproben konnten durch diese Analyse 5 neue Transkriptvarianten von *ROS1* identifiziert werden (s. Tab. 6/Abb. 24 A): *ROS1*-(1): Del. Ex. 8 – 16, *ROS1*-(2): Del. Ex. 13 – 17 (inklusive einer Deletion der letzten 3 bp von Exon 12), *ROS1*-(3): Del. Ex. 15 – 16, *ROS1*-(4): Del. Ex. 18, *ROS1*-(5): Insertion von 3 bp am Übergang Ex. 17/18 (r.2597-2598insCAG). Bei den Varianten (1) – (4) entstehen verkürzte Transkripte, denen 1 bis 9 Exons im 5'-Bereich fehlen. In fetaler Lunge konnten 4 der 5 Varianten nachgewiesen werden (Varianten (1), (2), (4), (5)). Diese Varianten wurden auch in den Tumoren nachgewiesen. Die Expression der fetalen Transkriptvarianten erfolgt somit auch in Tumorgewebe. Die Variante (3) wurde ausschließlich in Tumorgewebe nachgewiesen (#68).

Die Transkriptvarianten (1) – (3) enthalten keine Bindungsstellen für das Amplikon 5' (1), weshalb die 5'-A1- und 3'-Bereiche unbalanciert amplifiziert werden. In dieser Serie war bei allen 5 untersuchten NSCLC mit deutlich unbalancierter 3'/5'-A1-Expression und in einem Fall mit schwach unbalancierter 3'/5'-A1-Expression die Variante (1) nachweisbar.

Die Variante (4) wurde in 2 NSCLC mit gering unbalancierter 3'/5'-A2-Expression nachgewiesen (#68, #79), bei Fall #79 wurde zusätzlich die Variante (2) identifiziert. Die Varianten (2) und (4) enthalten keine Bindungsstellen für 5'-A2. Aufgrund der 3 bp-Insertion bei Variante (5) wird die Bindung des 5'-A2-Primers verhindert. Diese Variante war bei allen untersuchten NSCLC nachzuweisen, der Anteil der Transkriptmenge war jedoch bei allen Tumoren gering (etwa 15 – 40 %), sodass von einem begrenzten Einfluss auf die qRT-PCR-Ergebnisse auszugehen ist. Bei Fall #84, der eine leicht unbalancierte Expression beider Amplikons aufwies, wurde ausschließlich die Variante (5) nachgewiesen.

Obwohl eine detaillierte Untersuchung aller Fälle mit unbalancierter Expression aufgrund des limitierten Materials nicht möglich war, konnte durch die Analyse von fetaler Lunge und 8 NSCLC gezeigt werden, dass die unterschiedlichen Ergebnisse der Amplifikation der 5'-Amplikons vermutlich das Resultat unterschiedlich gespleißter *ROS1*-Varianten sind.

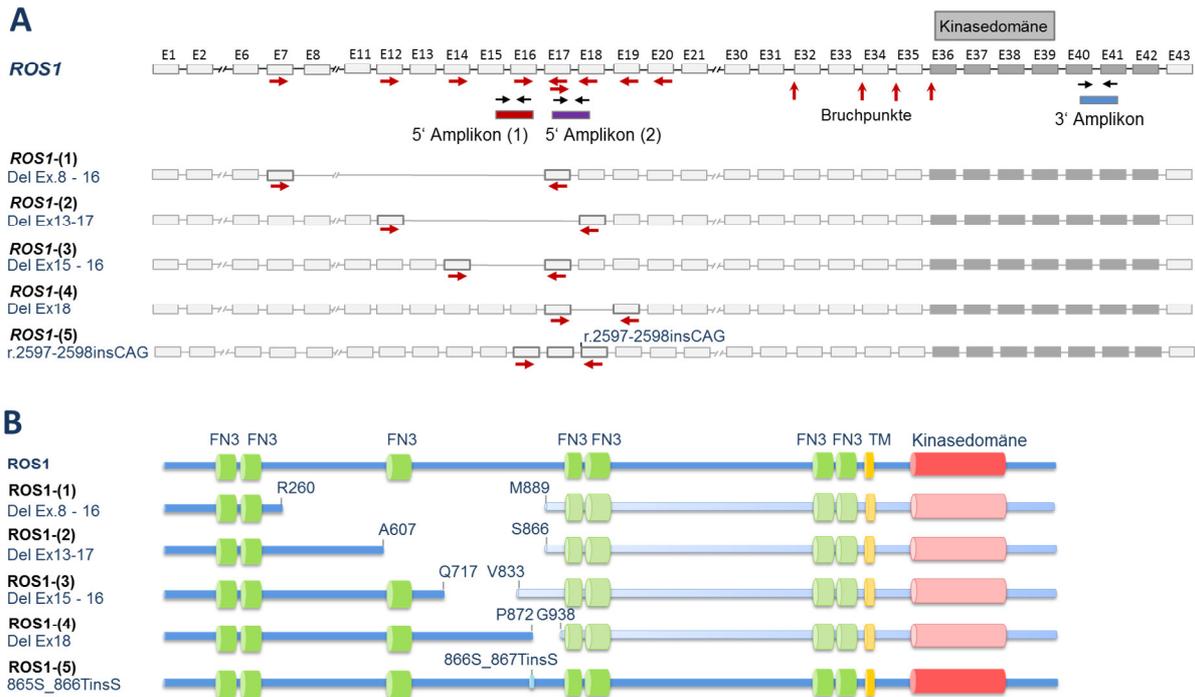


Abbildung 24: Identifizierung von *ROS1*-Transkriptvarianten. **A)** Darstellung von *ROS1* (NM_002944.2), den verwendeten Primerkombinationen im 5'-Bereich von *ROS1* und den Transkriptvarianten. Die bei der detektierten Transkriptvariante verwendeten Primerkombinationen sind jeweils gekennzeichnet. **B)** Schematische Darstellung des *ROS1*-Proteins (NP_002935.2) und mögliche Translationsprodukte der Transkriptvarianten. Bei allen Transkriptvarianten mit einer Deletion (Varianten (1) – (4)) kommt es zu einem frühzeitigem Abbruch der Translation. Mithilfe downstream gelegener Start-Codons könnte jeweils ein verkürztes Protein gebildet werden, das einen Teil der extrazellulären Domäne, die Transmembrandomäne sowie die Kinasedomäne enthält. Bei der Insertion eines CAG Basentriplets (Variante (5)) würde zusätzlich die Aminosäure Serin an Position 867 eingebaut.

Die Translation der Transkriptvarianten könnte zur Bildung verschiedener Proteine führen. In Abbildung 24 B sind die potentiellen Translationsprodukte dargestellt. Die Deletionen bei den Varianten (1) – (4) führen in allen Fällen zu einer Verschiebung des Leserahmens, sodass es zu einem frühzeitigem Abbruch der Translation kommt. Die verkürzten Proteine bestehen aus dem N-terminalen Bereich von *ROS1* und enthalten einen Teil der extrazellulären Domäne. Bei der Verwendung eines alternativen Startcodons könnten von den Varianten (1) – (4) weitere Proteine gebildet werden, die in allen Fällen einen Teil der extrazellulären Domäne, der Transmembran- und Kinasedomäne, enthalten. Aufgrund der Insertion der Basen CAG wird an Position 867 zusätzlich die Aminosäure Serin eingebaut. Eine Verschiebung des Leserasters findet nicht statt.

Um zu klären, ob in den Fällen, die Transkriptvarianten exprimieren, auch eine Proteinexpression nachzuweisen ist, wurde eine IHC-Analyse an einer Serie von Lungenkarzinomen durchgeführt, die rearrangierte Fälle und NSCLC mit Transkriptvarianten beinhaltete (s. Kap. 3.4.4).



Abbildung 25: Transkriptvarianten von *ROS1*. **A)** Transkriptvariante *ROS1*(-1), die die Exons 8 – 16 nicht enthält. **B)** Transkriptvariante *ROS1*(-3) mit einer Deletion der Exons 15 – 16. **C)** Transkriptvariante *ROS1*(-4), bei der Exon 18 nicht enthalten ist. **D)** Transkriptvariante *ROS1*(-5) mit einer Insertion von 3 Basenpaaren in Exon 18 (2587insCAG). Bei *ROS1*(-1) und *ROS1*(-3) können die Primer des 5'-Amplikon (1), die in Exon 15 und 16 liegen, nicht binden, bei *ROS1*(-4) und *ROS1*(-5) ist keine Amplifikation mit 5'-Amplikon (2), das in Exon 17 und 18 liegt.

Tabelle 6: Ergebnisse der *ROS1*-Analyse für NSCLC mit Expression der *ROS1*-Kinasedomäne

Fall #	<i>ROS1</i> qRT-PCR			Quotient		FISH	IHC	Transkriptvarianten
	<i>ROS1</i> 3' Ex. 40/41	<i>ROS1</i> 5'-A1 Ex 15/16	<i>ROS1</i> 5'-A2 Ex 17/18	3'/5'-A1 ^a	3'/5'-A2 ^b	<i>ROS1</i> break-apart Sonde ^c	<i>ROS1</i> D4D6 ^d	Del. Ex. 8 –16 (1) Del. Ex. 13 – 17 (2) Del. Ex. 15 –16 (3) Del. Ex. 18 (4) <i>r.2597-2598insCAG</i> (5)
374	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	Translokation	2+	
873	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	Translokation	3+	
964	0,86	0,03	n. u.	33,2	n. u.	n. u.	n. u.	
67	0,53	0,04	0,02	12,9	25,5	n. u.	1+	
60	23,38	0,00	0,00	36040,1	8641,9	Translokation	0	
701	0,99	0,10	0,11	9,8	9,2	Translokation	3+	
63	0,70	0,00	0,00	2190,9	533,9	Translokation	2+	
64	0,32	0,03	0,10	11,6	3,3	Translokation	1+	
65	0,98	0,28	0,52	3,5	1,9	Translokation	2+	
70*	1,60	0,19	0,67	8,6	2,4	negativ	0	
69	1,41	0,22	0,59	6,5	2,4	negativ	0	1, 5
74	0,77	0,06	0,37	13,5	2,1	negativ	0	
78	0,37	0,03	0,20	12,4	1,9	negativ	0	
68	1,08	0,20	0,87	5,5	1,2	negativ	0	1, 3, 4, 5
71	0,98	0,08	1,15	12,4	0,9	negativ	0	1, 5
72*	0,82	0,16	1,42	5,1	0,6	negativ	0	
73*	0,80	0,11	0,72	7,1	1,1	negativ	0	
75	0,60	0,15	0,43	4,1	1,4	negativ	0	
76	0,54	0,10	0,39	5,4	1,4	negativ	0	
77	0,57	0,10	0,32	5,7	1,8	negativ	0	1, 5
79	0,74	0,13	0,45	5,8	1,6	negativ	0	1, 2, 4, 5
80	0,31	0,05	n. u.	6,7	n. u.	n. u.	n. u.	
84*	1,05	0,32	0,30	3,3	3,5	negativ	0	5
81*	2,01	0,76	1,12	2,7	1,8	negativ	0	
82*	1,12	1,00	1,48	1,1	0,8	negativ	0	
83*	1,06	0,40	1,42	2,7	0,7	negativ	0	
85	1,00	0,52	0,97	1,9	1,0	n. u.	n. u.	
86*	0,80	0,59	n. u.	1,3	n. u.	negativ	0	
87	0,71	0,42	1,15	1,7	0,6	n. u.	n. u.	
12	0,67	0,25	n. u.	2,7	n. u.	n. u.	n. u.	
89	0,64	0,45	1,48	1,4	0,4	negativ	0	
34	0,56	0,46	0,78	1,2	0,7	negativ	0	
66	0,55	0,28	0,55	2,0	1,0	negativ	0	
90	0,55	0,31	0,51	1,8	1,1	n. u.	n. u.	
91*	0,54	0,22	0,49	2,4	1,1	negativ	1+	1,5
92	0,52	0,36	0,36	1,4	1,4	n. u.	n. u.	
88	0,51	0,19	0,36	2,6	1,4	n. u.	n. u.	5
93*	0,51	0,18	0,45	2,8	1,1	negativ	0	
94	0,51	0,22	0,44	2,3	1,1	n. u.	n. u.	
95	0,50	0,15	0,35	3,3	1,4	n. u.	n. u.	
96	0,49	0,22	0,30	2,2	1,6	n. u.	n. u.	
41*	0,49	0,89	0,84	0,5	0,6	negativ	0	
97	0,47	0,22	0,82	2,2	0,6	negativ	0	
98	0,47	0,23	0,65	2,1	0,7	negativ	0	
542	0,46	0,21	0,60	2,2	0,8	n. u.	n. u.	
100	0,44	0,22	n. u.	2,0	n. u.	n. u.	0	
101	0,43	0,22	0,83	2,0	0,5	n. u.	n. u.	
4	0,43	0,25	0,89	1,7	0,5	n. u.	n. u.	
102	0,42	0,16	0,52	2,6	0,8	negativ	0	
103	0,42	0,20	0,46	2,1	0,9	n. u.	n. u.	
104	0,42	0,15	n.a.	2,8	n. u.	n. u.	n. u.	
105	0,41	0,17	0,65	2,4	0,6	n. u.	0	
106	0,41	0,16	0,53	2,6	0,8	n. u.	n. u.	
107	0,41	0,16	n. u.	2,5	n. u.	n. u.	n. u.	
108	0,38	0,14	0,41	2,7	n. u.	n. u.	n. u.	
31	0,36	0,52	0,53	0,7	0,7	n. u.	0	
51	0,36	0,25	0,25	1,4	1,4	negativ	0	
109	0,35	0,14	0,15	2,5	2,3	n. u.	n. u.	

110	0,34	0,18	n. u.	1,9	n. u.	n. u.	n. u.
111	0,34	0,18	n. u.	1,9	n. u.	n. u.	n. u.
112	0,33	0,14	0,41	2,4	0,8	n. u.	n. u.
113	0,33	0,19	n. u.	1,7	n. u.	n. u.	n. u.
114	0,33	0,19	n. u.	1,7	n. u.	n. u.	0
115	0,31	0,24	0,33	1,3	0,9	n. u.	n. u.
116	0,31	0,43	n. u.	0,7	n. u.	n. u.	n. u.
1	0,31	0,12	0,31	2,6	1,0	n. u.	n. u.
20	0,30	0,11	0,26	2,8	1,1	n. u.	n. u.

Gezeigt sind alle Expressions-, FISH- und IHC-Daten der NSCLC mit einer *ROS1*-Rearrangierung sowie der NSCLC mit einer 3'-Expression > 0,3. Zusätzlich sind die identifizierten Transkriptvarianten vermerkt. *Die Kinasedomäne (Exon 36 – 41) der markierten Fälle wurde sequenziert, Mutationen wurden nicht identifiziert. ^aUnbalancierte Expression des 5'-A1-Amplikons: 3'/5'-A1-Quotienten $\geq 3,5$. ^bUnbalancierte Expression des 5'-A2-Amplikons: 3'/5'-A2-Quotienten $\geq 3,3$. ^cEine Rearrangierung bezieht sich auf break-apart oder zusätzliche grüne Signale in mindestens 15 % der Tumorzellen. ^dPositiv bezieht sich auf eine schwache, mäßige oder starke Proteinexpression in mindestens 10 % der Tumorzellen.

3.4.4 Analyse der Proteinexpression von ROS1

Im Rahmen dieser Studie sollte geklärt werden, ob *ROS1*-rearrangierte NSCLC anhand ihrer Expression des ROS1-Proteins detektiert werden können, und ob damit ein Screening nach *ROS1*-Rearrangierungen in Lungenkarzinomen mit Hilfe der Immunhistochemie möglich ist. In der qRT-PCR-Analyse war eine Subgruppe von NSCLC identifiziert worden, bei denen *ROS1* nicht rearrangiert, sondern die Expression von *ROS1*-Transkripten und Transkriptvarianten aktiviert war (s. Kap. 3.4.2 und 3.4.3). Es sollte deshalb auch untersucht werden, ob Lungenkarzinome, die das Gesamttranskript von *ROS1* bzw. Transkriptvarianten exprimieren, auch Protein exprimieren. Zur Beantwortung dieser Fragen wurden immunhistochemische Färbungen mit dem Antikörper D4D6 durchgeführt, der den C-terminalen Bereich des humanen ROS1-Proteins erkennt.

Die Analyse umfasste 251 NSCLC, darunter die 7 rearrangierten Fälle, einen potentiell rearrangierten Tumor mit deutlich unbalancierter Expression (#67) und 31 Tumore, die eine *ROS1*-Expression aufwiesen (1 Fall mit leicht unbalancierter Expression beider 5'-Amplikons (#84), 12 Fälle mit unbalancierter Expression (3'/5'-A1), 18 Fälle mit balancierter Expression, s. Tab. 6). Zudem wurden 212 Fälle ohne *ROS1*-Expression untersucht, davon wurden 86 Fälle mittels FISH als *ROS1*-negativ bestätigt. Für 249 der 251 Fälle lagen qRT-PCR-Daten vor, 2 rearrangierte, FISH-positive Fälle waren in der qRT-PCR-Analyse nicht auswertbar. Die Qualität der IHC und die Auswertungen wurden von einem Pathologen überprüft. Der aufgrund der stark unbalancierten Expression potentiell rearrangierte Fall #67 zeigte eine schwache Färbung (1+), welche eine Rearrangierung bestätigte. Von den 7 rearrangierten Fällen wiesen 6 Tumore eine zytoplasmatische Immunfärbung auf. Bei 5 Fällen wurde eine mäßige (2+) bis starke (3+) Färbung beobachtet, 1 Fall zeigte eine schwache Färbeintensität (1+). Bei einem rearrangierten Tumor (#60) konnte trotz Wiederholung mit einer höheren Konzentration des Antikörpers (1:50 anstatt 1:250) keine Proteinexpression detektiert werden, obwohl der Fall mit einem Wert von 23,38 die höchste Expression des 3'-Bereichs

aufwies (s. Abb. 26). Die 6 rearrangierten Tumore mit positiver Immunfärbung, für die qRT-PCR-Daten vorlagen, besaßen 3'-Expressionswerte zwischen 0,32 und 0,99. Wie in Abbildung 26 zu sehen ist, zeigte ein *ROS1*-exprimierender, aber nicht-rearrangierter Fall eine deutliche zytoplasmatische Proteinexpression (#91). Dieser Tumor wies eine vergleichsweise geringe Genexpression auf (3' 0,54; 5'-A1 0,22; 5'-A2 0,49), wobei einem Teil der Transkripte die Exons 8 – 16 fehlten (Variante *ROS1*-(1), s. Kap. 3.4.3). Mit dem im C-terminalen Bereich von *ROS1* bindenden Antikörper konnte nicht festgestellt werden, ob Translationsprodukte der Variante 1 oder der vollständigen Transkripte gebildet werden. Alle weiteren analysierten, nicht-rearrangierten Lungenkarzinome mit oder ohne *ROS1*-Expression zeigten keine Proteinexpression (s. Tab. 6). Somit wurden mittels Immunfärbungen 7 von 8 *ROS1*-rearrangierten Tumoren identifiziert (87,5 % Sensitivität) und 247 von 249 NSCLC hinsichtlich einer *ROS1*-Rearrangierungen korrekt typisiert (99,2 % Spezifität). Bei einem der 8 Tumore mit *ROS1*-Proteinexpression war keine Genrearrangierung vorhanden.

Tabelle 7: Übersicht der Ergebnisse der Immunhistochemischen Färbungen der 249 NSCLC mit *ROS1*-Expressionsdaten und 2 rearrangierten NSCLC ohne Expressionsdaten

<i>ROS1</i> -Status ^a	<i>ROS1</i> -Transkript-Expression ^b	<i>n</i>	IHC D4D6	
			positiv ^c	negativ
Rearrangiert	Unbalancierte Expression beider 5'-Amplikons	5	4	1
Rearrangiert	Unbalancierte Expression eines 5'-Amplikons	1	1	0
Rearrangiert	n.a.	2	2	0
Nicht-rearrangiert	Unbalancierte Expression eines 5'-Amplikons	13	0	13
Nicht-rearrangiert	Balancierte Expression	18	1	17
Nicht-rearrangiert	Keine Expression	212	0	212
Summe		251	8	243

^arearrangiert bezieht sich auf eine unbalancierte *ROS1*-Transkriptexpression beider 5'-Amplikons und/oder break-apart Signalen der FISH-Analyse in mindestens 15 % der Tumorzellen. Für einen Fall (#67) mit unbalancierter Expression beider 5'-Amplikons waren keine FISH-Daten verfügbar.

^bDie *ROS1*-Transkript-Expression wurde durch eine qRT-PCR des 5'-A1-, 5'-A2- und 3'-Amplikons bestimmt. Die unbalancierte Expression beider 5'-Amplikons wurde mit einem 3'/5'-A1-Quotienten $\geq 3,5$ und einem 3'/5'-A2-Quotienten $\geq 3,3$ definiert, die balancierte Expression eines Amplikons mit einem 3'/5'-A1-Quotienten $< 3,5$ oder einem 3'/5'-A2-Quotienten $< 3,3$. ^cbezieht sich auf eine schwache, mäßige oder starke Proteinexpression in mindestens 10 % der Tumorzellen.

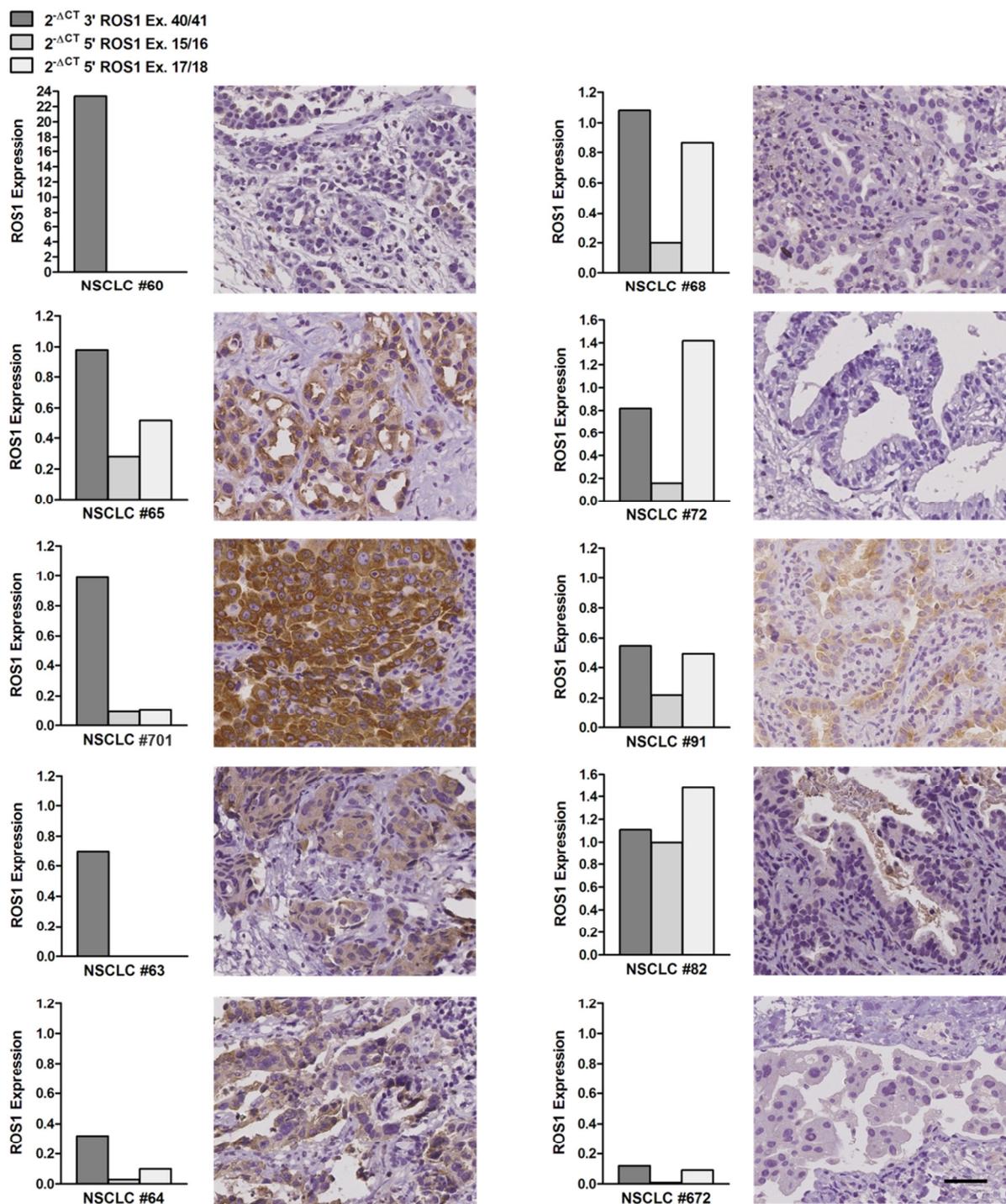


Abbildung 26: Vergleich der Genexpression von *ROS1* mit der Intensität der Immunfärbung bei rearrangierten Fällen (links) und nicht-rearrangierten Fällen (rechts). Das rearrangierte Lungenkarzinomen #60 zeigte trotz hoher Genexpression keine Proteinexpression von ROS1. Fall #701 zeigte eine starke Proteinexpression, #65 und #63 eine mäßige und #64 eine schwache Expression. Außer Fall #91 war für keinen nicht-rearrangierten Fall eine Proteinexpression nachweisbar. Der Maßstab entspricht 50 μ m.

3.4.5 Sequenzierung der Kinasedomäne von *ROS1*

Wie in 3.4.4 beschrieben, zeigte das nicht-rearrangierte NSCLC #91 eine Expression des *ROS1*-Proteins. Um die Frage zu klären, ob bei NSCLC #91 eine aktivierende Mutation in der Kinasedomäne vorliegt, wurde von diesem Fall die Kinasedomäne (Ex. 36 – 42) sequenziert. Die Mutationsanalysen wurden außerdem bei 11 weiteren nicht-rearrangierten Fällen (5 mit unbalancierter Expression, 6 mit balancierter Expression, s. Tab. 6) durchgeführt. Bei diesen Tumoren konnte eine Expression von *ROS1*-Transkripten und -Transkriptvarianten detektiert werden, aber kein Protein. In Analogie zu *EGFR*-mutierten NSCLC könnten bei einer durch Mutationen ausgelösten, konstitutiven Aktivierung der Kinasedomäne auch geringe Proteinmengen unterhalb der Nachweisgrenze in diesen Fällen tumorigen wirken. Die verwendeten Primer sind im Anhang aufgeführt.

Punktmutationen im Bereich der Kinasedomäne konnten in keinem der untersuchten Fälle detektiert werden. Da die Liganden von *ROS1* noch nicht identifiziert wurden und verfügbare phospho-*ROS1*-Antikörper (z. Bsp. p-Y2274, Cell Signaling) nach Herstellerangaben mit anderen Tyrosinkinasen Kreuzreaktionen eingehen können und somit für einen spezifischen Nachweis der *ROS1*-Autophosphorylierung ungeeignet sind, konnte eine potentielle Aktivierung von *ROS1* in Fall #91 nicht weiter untersucht werden.

3.4.6 Klinisch-pathologische Charakteristika *ROS1*-rearrangierter NSCLC

Das Alter der Patienten mit *ROS1*-rearrangierten Tumoren betrug zum Zeitpunkt der Diagnose durchschnittlich 62 Jahre (42 – 85 Jahre), 5 der 9 Patienten waren unter 60 Jahre alt. Zwischen *ROS1*-Rearrangierungen und dem Geschlecht war mit 5 männlichen und 4 weiblichen Patienten kein Zusammenhang zu erkennen.

Tabelle 8: Klinisch-pathologische Daten zu den *ROS1*-rearrangierten NSCLC^a.

Fall	Geschlecht	Raucher	Alter ^b	Histologie	<i>ALK</i> -Status ^c	<i>EGFR</i> -Status ^d	Tumorzellgehalt [%]
374	w	nein	54	n. b.	n. b.	n. b.	70
873	m	n. b.	63	n. b.	negativ	negativ	90
60	m	n. b.	47	mikropapillär	negativ	negativ	50
701	m	nein	56	cibriform	negativ	n. b.	70
63	w	n. b.	85	solide, siegelringzellhaltig	negativ	negativ	60
64	w	nein	57	azinär	negativ	negativ	15
65	m	ja	83	n. b.	n. b.	negativ	30
964	w	n. b.	70	solide	negativ	negativ	n. b.
67	m	n. b.	42	solide, azinär, siegelringzellhaltig	negativ	negativ	40

n. b. = nicht bekannt, Raucherstatus nein = 0 Packungen/Jahr, ja = > 0 Packungen/Jahr, ^bAlter zum Zeitpunkt der Diagnose, ^c*ALK*-Status ermittelt durch qRT-PCR-Analyse, positiv mit 3'-Expression > 0,3 und 3'/5'-Wert > 5, oder durch break-apart FISH, positiv mit mindestens 15 % break-apart oder zusätzlichen grünen Signalen in den Tumorzellen. ^d*EGFR*-Status (Exons 18, 19, 21) ermittelt durch Sanger-Sequenzierung (Daten nicht gezeigt).

Bezüglich des Raucherstatus lagen nur in 4 Fällen Informationen vor: 3 der Patienten mit einem Erkrankungsalter unter 60 Jahren waren Nichtraucher, 1 Patient mit einem Alter von 83 Jahren war Raucher. Ein Zusammenhang zwischen *ROS1*-Translokation und Morphologie der Tumore war nicht eindeutig zu erkennen; es dominierten allerdings Histologien, die in retrospektiven Untersuchungen als eher ungünstig erkannt worden waren (solide, mikropapillär, kribriform). Zwei Tumore enthielten - wie häufiger bei *ALK*-rearrangierten NSCLC gefunden - Siegelringzellen. Der Tumorzellgehalt der Tumore betrug 15 – 90 %, eine Identifizierung von rearrangierten Tumoren war auch bei kleinen Biopsien und geringem Tumorzellgehalt möglich. Die *ROS1*-rearrangierten NSCLC wiesen keine *ALK*-Rearrangierungen oder *EGFR*-Mutationen auf; für jeweils 2 Fälle waren allerdings keine Informationen über den *ALK*- und *EGFR*-Status verfügbar.

3.5 Analyse von *LTK* in Lungenkarzinomen

LTK gehört wie *ALK* zur Familie der Insulinrezeptor-Tyrosinkinasen und zeigt eine große Homologie zu *ALK*, insbesondere im Bereich der Kinasedomäne. Eine Überexpression des Gens wurde in Lungenkarzinomen im Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für Metastasenbildung nachgewiesen (Müller-Tidow et al. 2005; Müller-Tidow et al. 2004). Außerdem wurde gezeigt, dass *LTK*-Mutationen, die mittels *in vitro*-Mutagenese eingeführt wurden und homolog zu den aktivierenden *ALK*-Mutationen F1174L und R1275Q sind, bei einer Überexpression der mutierten *LTK*-Transkripte in verschiedenen Zelllinien eine Aktivierung der Rezeptor-Tyrosinkinase und eine transformierende Wirkung zur Folge haben (Roll und Reuther 2012). Aufgrund dieser Daten und der potentiellen Behandlungsmöglichkeit mit Crizotinib im Falle einer Rearrangierung oder einer Überexpression war es von großem Interesse, die Struktur und Expression von *LTK* in einer Serie von Lungenkarzinomen zu analysieren.

3.5.1 Etablierung eines qRT-PCR-Assays zur Charakterisierung der *LTK*-Expression

Um die Expression von *LTK* untersuchen und gleichzeitig mögliche Rearrangierungen des Gens identifizieren zu können, wurde – wie bei *ALK* und *ROS1* – ein für FFPE-Gewebe optimierter, qRT-PCR-basierter Assay etabliert und die Expressionsanalyse mit Hilfe von zwei Amplikons (64 – 86 bp) im 3'- und 5'-Bereich des Gens durchgeführt (s. Abb. 27). Durch die Lage der Primer in Exon/Exon-Übergängen (Exon 3/4 und 18/19) wurde eine Amplifikation genomischer DNA ausgeschlossen. Aufgrund der Homologien der Kinasedomäne von *ALK* und *LTK* war eine *LTK*-spezifische Amplifikation im 3'-Bereich kritisch und wurde durch eine Sequenzierung der PCR-Produkte verifiziert (Daten nicht gezeigt). Da in Vorversuchen nachgewiesen wurde, dass *LTK* in der Rhabdomyosarkom-

Zelllinie RH30 exprimiert wird, erfolgte die Etablierung und Optimierung des qRT-PCR-Assays mit Hilfe einer Gradienten-PCR mit cDNA von RH30.

LTK Gen

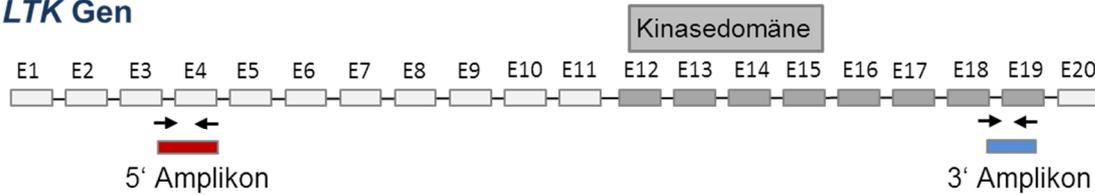


Abbildung 27: Schematische Darstellung von LTK und den verwendeten qRT-PCR-Amplikons. Darstellung der genomischen Struktur von LTK nach NM_002344.5. Das Amplikon für den 5'-Bereich liegt in Exon 3/4 und 4 (rote Box), das Amplikon für den 3'-Bereich liegt innerhalb der Kinasedomäne in Exon 18/19 und 19 (blaue Box).

RH30 wurde als Positiv-Kontrolle bei der PCR-Amplifikation eingesetzt, jedoch nicht zur Normierung der Daten verwendet, weil die LTK-Expression dafür zu gering war und zudem eine leicht unbalancierte Amplifikation festgestellt wurde ($3'/5' = 3,0$), die mit der Expression einer Transkriptvariante assoziiert ist (s. Kap. 3.5.3). Die Auswertung erfolgte durch eine Normalisierung auf die Expression des Referenzgens *PGK1* (Δ CT-Analyse). Die Expression von LTK wurde in einer Serie von 542 NSCLC und 9 Proben von normalem Lungengewebe untersucht. 89,5 % (485/542) der NSCLC-Fälle konnten ausgewertet werden. In normalem Lungengewebe wurde eine geringe Expression von LTK detektiert, welche sich auf den 3'-Bereich konzentrierte (durchschnittliche Expression 0,02; 0,004 – 0,033). Nur bei einer dieser Proben war eine Expression des 5'-Bereichs nachweisbar (s. Abb. 28, L8).

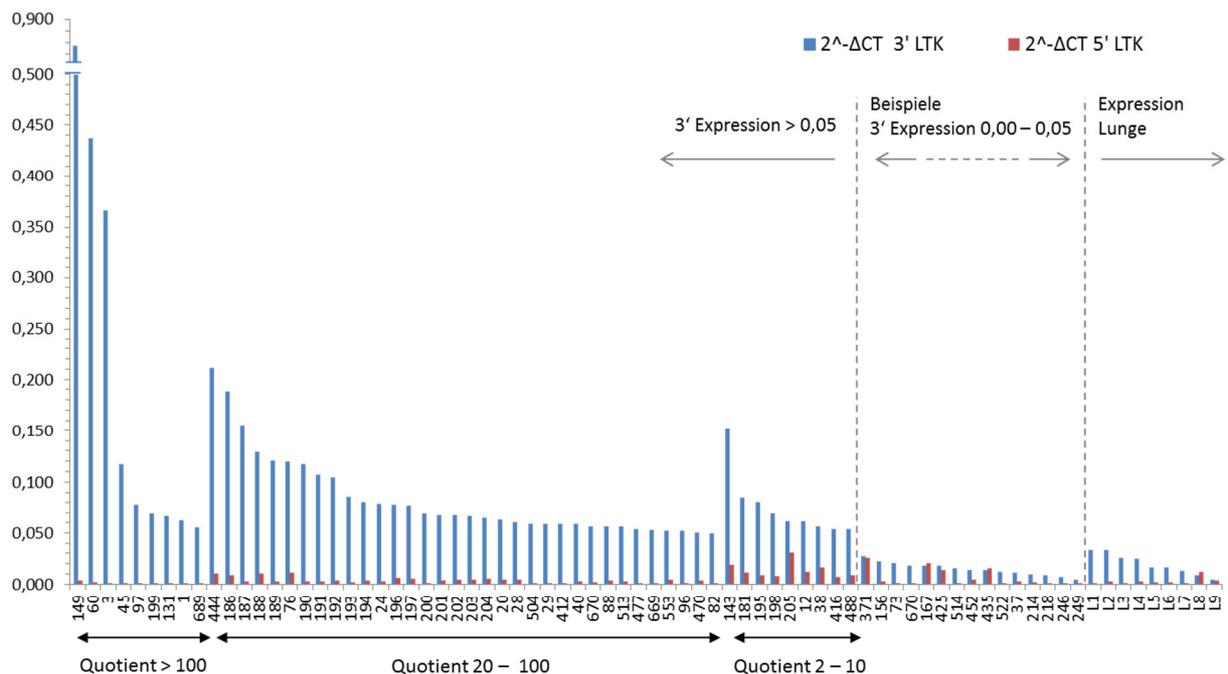


Abbildung 28: Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse von LTK. Eine Expression wurde nur im 3'-Bereich detektiert. In normalem Lungengewebe (L1 – L9) ist der 3'-Bereich von LTK schwach exprimiert. Dargestellt sind alle Fälle, die eine signifikant höhere Expression als normales Lungengewebe aufweisen ($3'$ -Wert $> 0,05$).

In der Lungenkarzinom-Kohorte zeigte sich ein ähnliches Expressionsmuster. Im Vergleich zu Normalgewebe wiesen 52 Lungenkarzinome (11 %) eine signifikant höhere Expression des 3'-Amplikons ($> 0,05$) auf. Der Wert von 0,05 entspricht dem Mittelwert der in normalem Lungengewebe gemessenen durchschnittlichen *LTK*-Expression plus dreifacher Standardabweichung. Auffällig war, dass bei der Mehrzahl dieser Fälle zwar eine deutliche Expression der 3'-Region, jedoch nicht der 5'-Region messbar war: Wie in Abb. 28 dargestellt, besaßen 9 der 52 Fälle einen Quotienten des 3' und 5' Amplikons > 100 und 34 Fälle einen Quotienten > 10 . Bei 8 Fällen war die *LTK*-Expression schwach unbalanciert (Quotienten zwischen 2 und 10), in einem Fall (#205) war die Expression beider Amplikons fast gleich stark. Im Vergleich zur *ROS1*-Transkriptmenge in *ROS1*-rearrangierten Tumoren zeigten 3 Fälle eine vergleichbare Expression $> 0,3$. Insgesamt wurde in 9 % der untersuchten NSCLC (43/486) eine signifikant erhöhte, deutlich unbalancierte *LTK*-Expression detektiert.

Tabelle 9: Ergebnisse der qRT-PCR- und FISH-Analyse von *LTK*

Fallnummer #	<i>LTK</i> qRT-PCR			FISH
	<i>LTK</i> 3' Exon 3/4	<i>LTK</i> 5' Exon 18/19	Quotient 3'/5'	<i>LTK</i> break-apart FISH 328J12-SG/268D21-SO
149	0,854	0,004	236,3	negativ
60	0,438	0,002	220,4	negativ
3	0,366	0,001	706,0	negativ
45	0,118	0,000	1099,3	negativ
97	0,078	0,001	126,4	kein Material
199	0,070	0,001	102,3	kein Material
131	0,066	0,000	210,8	negativ
1	0,062	0,000	175,2	negativ
689	0,055	0,001	102,4	negativ
444	0,211	0,010	20,3	-
186	0,189	0,009	21,0	negativ
187	0,155	0,003	51,5	negativ
188	0,129	0,010	12,7	n. a. (kaum Tumor)
189	0,120	0,003	39,7	negativ
76	0,120	0,011	10,7	negativ
190	0,117	0,002	47,1	negativ
191	0,107	0,003	38,1	negativ
192	0,105	0,003	30,8	kein Material
193	0,086	0,002	36,6	negativ
194	0,081	0,004	19,9	negativ
24	0,079	0,003	25,6	negativ
196	0,078	0,006	13,2	negativ
197	0,077	0,006	13,7	negativ
200	0,069	0,001	54,7	negativ
201	0,067	0,004	18,5	negativ
202	0,067	0,005	13,5	n. a.
203	0,066	0,005	14,1	negativ
204	0,065	0,005	12,7	negativ

Ergebnisse

20	0,063	0,005	13,7	negativ
28	0,060	0,005	13,0	negativ
504	0,059	0,001	46,6	negativ
29	0,059	0,001	53,4	negativ
412	0,059	0,002	37,1	negativ
40	0,059	0,003	19,1	negativ
670	0,056	0,002	23,1	kein Material
88	0,056	0,004	14,5	negativ
513	0,056	0,003	20,0	negativ
477	0,054	0,002	35,1	negativ
669	0,053	0,002	34,9	negativ
553	0,052	0,004	12,0	kein Material
96	0,052	0,001	43,4	negativ
470	0,050	0,004	12,6	negativ
82	0,050	0,001	50,6	negativ
143	0,152	0,019	7,9	negativ
181	0,085	0,011	7,5	-
195	0,081	0,009	9,3	n. a.
198	0,070	0,008	8,5	negativ
205	0,061	0,031	2,0	-
12	0,061	0,013	4,9	-
38	0,056	0,017	3,4	n. a.
416	0,054	0,007	7,8	negativ
488	0,054	0,009	5,8	n. a. (kein Tumor)
371	0,028	0,026	1,1	-
156	0,022	0,003	8,8	-
73	0,021	0,001	29,0	-
670	0,018	0,001	21,0	-
167	0,018	0,021	0,9	-
425	0,018	0,014	1,3	-
514	0,015	0,001	13,8	-
452	0,014	0,005	2,8	-
435	0,013	0,016	0,9	-
522	0,012	0,000	106,8	-
37	0,011	0,003	4,1	-
214	0,010	0,002	5,2	-
218	0,009	0,001	9,4	-
246	0,007	0,000	44,8	-
249	0,005	0,000	13,3	-
L1	0,009	0,012	0,7	-
L2	0,004	0,003	1,3	-
L3	0,016	0,002	7,9	-
L4	0,013	0,001	13,0	-
L5	0,016	0,002	9,6	-
L6	0,025	0,001	29,7	-
L7	0,033	0,001	22,8	-

Dargestellt sind alle NSCLC mit im Vergleich zum normalen Lungengewebe signifikant erhöhter *LTK*-Expression > 0,05, Beispiele von NSCLC mit geringer *LTK*-Expression sowie die Expressionswerte der normalen Lungen. Negativ = Fälle mit break-apart Signalen in weniger als 15 % der Tumorzellen, n. a. = nicht auswertbar, - = keine FISH-Analyse durchgeführt, da bei einigen Fällen kein Material verfügbar war.

3.5.2 Etablierung einer break-apart FISH für die Analyse von *LTK*-Rearrangierungen

Die in dieser Studie bei NSCLC detektierte, unbalancierte Expression von *LTK* kann sowohl durch Translokationsereignisse und die Entstehung von Fusionstranskripten als auch durch Transkriptvarianten des Gens – ähnlich wie bei *ROS1* – verursacht werden. Zunächst wurde eine potentielle Rearrangierung des Gens mit Hilfe einer break-apart FISH untersucht. Da keine kommerziell verfügbaren FISH-Sonden für den Nachweis einer genomischen Rearrangierung von *LTK* existieren, wurden diese selbst hergestellt und etabliert. Zunächst erfolgte durch Datenbankanalysen eine Auswahl von geeigneten BAC-Klonen im Bereich des *LTK*-Gens (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/>). Für einen optimalen break-apart FISH-Assay sollten die Sonden, die den 3'- und 5'-Bereich des Gens erkennen, nicht zu weit auseinander liegen, um bei nicht-rearrangierten Fällen ein eindeutiges Fusionssignal zu erhalten. Für deutlich sichtbare Fluoreszenzsignale sollte die Größe der in den BAC-Klonen enthaltenen genomischen DNA mindestens 150 kb betragen. Wie in Abbildung 29 dargestellt, wurden jeweils zwei 3' und 5' von *LTK* gelegene BAC-Klone getestet. Zunächst wurde mittels STS-PCR verifiziert, dass die BACs RP11-328J12 und RP11-1609 genomische DNA aus dem 3'-Bereich (repräsentiert durch STS A005D46) sowie RP11-268D21 und RP11-107F6 genomische DNA aus dem 5'-Bereich (repräsentiert durch STS RH119274) enthalten.

Die 5'-Sonden wurden für die FISH-Analysen mit Orange-dUTP, die 3'-Sonden mit Green-dUTP markiert (s. Abb. 29). Die Spezifität der hergestellten FISH-Sonden wurden anhand einer Test-FISH an Metaphase-Chromosomen überprüft, da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass neben dem BAC-Klon von Interesse noch weitere Klone in den Bakterien enthalten waren. Alle markierten Sonden zeigten 2 spezifische Signale auf dem Chromosom 15q (s. Abb. 29 B).

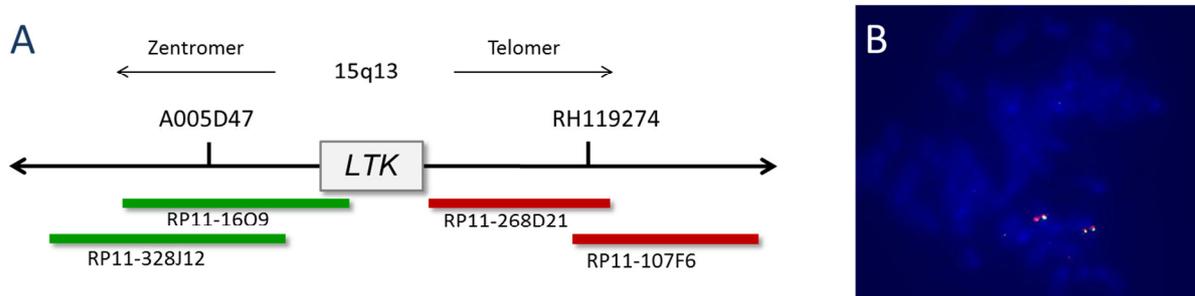


Abbildung 29: A) Schematische Darstellung von *LTK*, den ausgewählten BAC-Klonen und den verwendeten STS-Markern. Die DNA der 3' des Gens gelegenen BAC-Klone RP11-1609 und RP11-328J12 wurde mit Spectrum Green, die der 5' des Gens gelegenen BAC-Klone RP11-268D21 und RP11-107F6 mit Spectrum Orange markiert. **B) Metaphasen-FISH der Sonden-Kombination RP11-328J12 (grün markiert) und RP11-268D21 (orange markiert).** Die Sonden zeigten spezifisch auf beiden Chromosomen 15 jeweils 2 Signale.

Für die Etablierung der break-apart FISH an FFPE-Gewebe wurde Kontrollgewebe (Lymphknoten) verwendet, bei dem keine Rearrangierungen von *LTK* zu erwarten waren. Sowohl die Kombination von RP11-328J12 und RP11-268D21 als auch die Kombination von RP11-16O9 und RP11-107F6 ergaben in FFPE-Gewebe jeweils 2 gut zu erkennende, übereinander liegende, orange-grüne Fusionssignale, die der Signalkonstellation eines nicht-rearrangierten Lokus in einer diploiden Zelle entsprachen. Alle weiteren FISH-Analysen erfolgten mit der Sondenkombination RP11-328J12 und RP11-268D21. Insgesamt wurden 71 Lungenkarzinome mit der *LTK* break-apart FISH untersucht, einschließlich 37 der 43 Fälle mit signifikant erhöhter, deutlich unbalancierter *LTK*-Expression. Aufgrund einer zu geringen Signalintensität oder zu wenigen Tumorzellen waren 10 Fälle nicht auswertbar. Bei den 61 auswertbaren Tumoren wurden keine Rearrangierungen oder numerische Veränderungen (Deletionen/Amplifikationen) oranger oder grüner Signale nachgewiesen. Wie in Abb. 30 beispielhaft gezeigt, wiesen die Tumorzellkerne ausschließlich Fusionssignale der *LTK*-Sonden auf. Somit konnte in keinem der untersuchten NSCLC eine genomische Rearrangierung des Gens nachgewiesen werden.

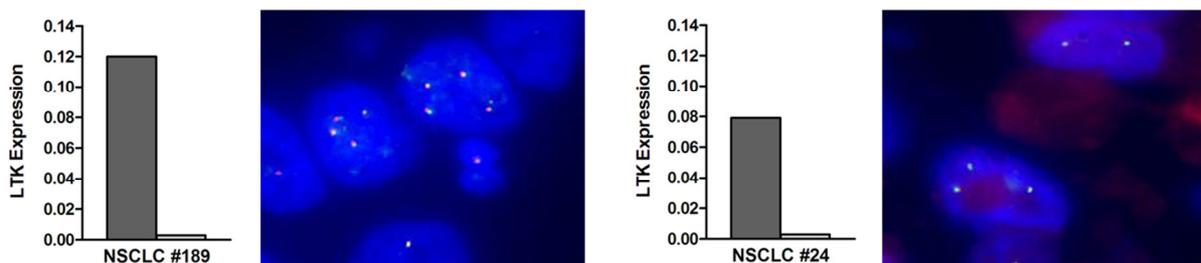


Abbildung 30: Beispiel der *LTK*-Expression und der break-apart FISH. Für NSCLC #189 und #24 wurde eine deutliche unbalancierte Expression des 3'-Bereichs detektiert. In den Tumorzellen war keine Rearrangierung nachweisbar, es wurden ausschließlich Fusionssignale der *LTK* break-apart Sonde detektiert.

3.5.3 Identifizierung von *LTK*-Transkriptvarianten

Mit Hilfe der FISH-Analysen wurde nachgewiesen, dass die unbalancierte Expression von *LTK* in Lungenkarzinomen nicht durch Rearrangierungen des Gens verursacht wurde. Eine mögliche Ursache für eine erhöhte Expression des 3'-Bereichs bei gleichzeitig nur sehr geringer Expression des 5'-Bereichs (Exon 3/4) kann auch in der Bildung von Transkriptvarianten liegen, in denen die Exons 3 und/oder 4 fehlen. Wie in Abb. 32 A) dargestellt, sind bereits Transkriptvarianten von *LTK* mit alternativem Spleißen in den Bereichen von Exon 7 sowie den Exons 9 – 13 verifiziert und postuliert worden. Die Exons 3 und 4 sind in den bekannten Transkriptvarianten nicht betroffen (GenBank: www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4058). Es sollte daher untersucht werden, ob in NSCLC *LTK*-Transkripte mit alternativem 5'-Bereich (Exon 3/4) gebildet werden.

Für die Identifizierung von Transkriptvarianten wurden spezifische RT-PCR-Amplifikationen mit Primern in den Exons 1, 2 und 3 sowie in den Exons 8, 9, 10 und 19 durchgeführt. Es erfolgten Test-PCRs mit unterschiedlichen Primerkombinationen und cDNA von fetaler Lunge, der Zelllinie RH30 und 2 NSCLC mit einer unbalancierten *LTK*-Expression. Aufgrund des limitierten Probenmaterials wurden die Analysen auf wenige Tumorproben beschränkt. Die RT-PCR-Produkte wurden durch Sequenzierung charakterisiert.

Bei der Verwendung von Primern in Exon 1 und 8 wurden PCR-Produkte mit einer Größe von ca. 100 bp (fetale Lunge, NSCLC #190 und #193) und ca. 410 bp (RH30) amplifiziert. DNA-Sequenzanalysen identifizierten 2 Transkriptvarianten mit Deletionen von mehreren Exons im 5'-Bereich (s. Abb. 31): *LTK*-(1) wies eine Deletion von Exon 2 – 7 auf und wurde in fetaler Lunge und 2 Tumorproben (#190, #193) nachgewiesen. Die Transkriptvariante erklärt die fehlende Amplifikation des 5'-Bereichs in der qRT-PCR-Analyse dieser Fälle (s. Abb. 32 B/C). Der Variante *LTK*-(2) fehlten die Exons 4 – 7, sie wurde ausschließlich in der Zelllinie RH30 nachgewiesen. Diese Variante konnte außerdem mit Primern in Exon 2 und 9 nachgewiesen werden. Die Bindungsstelle der 5'-Primer des qRT-PCR-Assays ist in der Variante ebenfalls nicht enthalten.

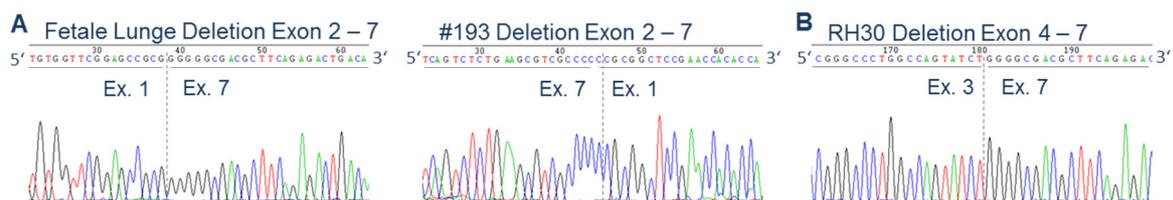


Abbildung 31: Transkriptvarianten von *LTK*. **A)** *LTK*-(1), Deletion der Exons 2 – 7 **B)** *LTK*-(2), Deletion der Exons 4 – 7. Die Deletion der Exons 2 – 7 konnte in fetaler Lunge und 2 NSCLC (#193, #190) nachgewiesen werden (Bsp. A), die Deletion der Exons 4 – 7 ausschließlich in der Zelllinie RH30 (B).

Das von Tumorzellen amplifizierte RT-PCR-Produkt *LTK*-(1) ist identisch mit dem 5'-Bereich eines cDNA-Klons mit vollständiger codierender Region (BC143903, Colon). Das potentielle Translationsprodukt dieses cDNA-Klons ist ein verkürztes *LTK*-Protein (562 AS), das die vollständige Kinasedomäne enthält, jedoch im Vergleich zur Isoform 1 Unterschiede sowohl in der extrazellulären als auch der Transmembranregion aufweist: Eine Deletion von 318 AS (A16 – G333) führt zum Verlust eines Großteils des extrazellulären Bereichs, was potentielle Auswirkungen auf die Ligandenbindung hat. Zusätzlich wird die Transmembranregion durch die Insertion von 16 AS in Kombination mit einer Aminosäuresubstitution (L448ins16aa, V449M) verändert (s. Abb. 32 D). Dieses *LTK*-Protein könnte aufgrund der veränderten Struktur als Tyrosinkinase nicht-membrangebunden und Liganden-unabhängig und damit konstitutiv aktiv sein.

Das potentielle Translationsprodukt der Variante *LTK*-(2) ist ein trunkiertes Protein. Aufgrund einer Verschiebung des Leserahmens entsteht durch einen vorzeitigen Abbruch der

Translation nach AS D126 eine verkürzte Variante, die bis AS L120 mit LTK-Isoform 1 (NP_002335.2) identisch ist. Bei der Nutzung eines alternativen Startcodons könnte außerdem ein Protein gebildet werden, das ab der AS M406 identisch mit LTK ist und die Kinasedomäne enthält (s. Abb. 32 D).

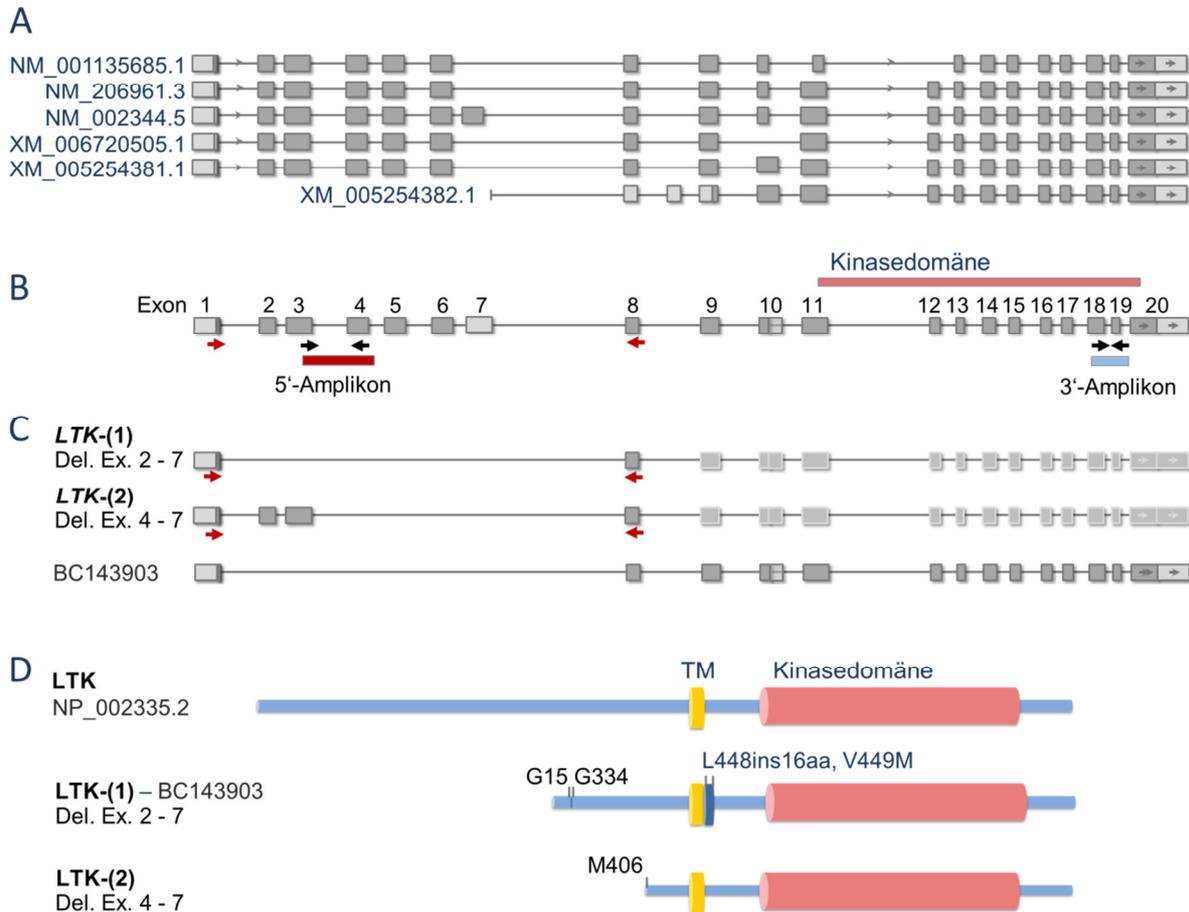


Abbildung 32: Transkriptvarianten von LTK. **A)** Bekannte und postulierte Transkriptvarianten von LTK. **B)** Schematische Darstellung der Amplikons der qRT-PCR-Analyse (NM_002344.5) **C)** Mit den Primerkombinationen in Exon 1 und Exon 8 konnten PCR-Produkte generiert werden (rote Pfeile). Sequenzierungen bestätigten eine Deletion der Exons 2 – 7 bzw. 4 – 7. LTK-(1) ist mit dem 5'-Bereich des cDNA-Klons BC143903 identisch. **D)** Mögliche Translationsprodukte der Transkriptvarianten: Durch eine Verschiebung des Leserahmens entsteht kurz nach dem Translationsstart ein Stopp-Codon (nicht gezeigt). Durch ein zweites Start-Codon könnten verkürzte LTK-Varianten entstehen. LTK-(1): Die Deletion der Exons 2 – 7 verursacht Veränderungen in der extrazellulären und Transmembranregion, die bei unveränderter Kinasedomäne zu ligandenunabhängiger und nicht membrangebundener Aktivität führen können. LTK-(2): Die Deletion der Exons 4 – 7 verursacht eine Verkürzung der extrazellulären Region, die bei unveränderter Kinasedomäne zu einer ligandenunabhängigen Aktivität führen kann.

4. Diskussion

4.1 Referenzgene für die qRT-PCR-Analyse von Lungenkarzinomen

In der Interpretation von qRT-PCR-Analysen sind valide und vergleichbare Expressionswerte von der Auswertung und von den durchgeführten Normalisierungen abhängig (Scheffe et al. 2006; Nolan et al. 2006; VanGuilder et al. 2008). Da viele bekannte Referenzgene für die entsprechenden Gewebe nicht ausreichend validiert sind, wurden in dieser Arbeit fünf Gene (*PGK1*, *ACTB*, *COX4I1*, *LMNB1*, *KPNA4*) auf ihre Eignung als Referenzgene für Expressionsanalysen von NSCLC getestet (Søes et al. 2013; Radonić et al. 2004). Die Expression des in NSCLC differentiell exprimierten Gens *NKX2-1* wurde in einer Serie von Adenokarzinomen sowie normalem Lungengewebe gemessen und jeweils mit den zu testenden Referenzgenen normalisiert. Die Ergebnisse wurden anschließend mit der Proteinexpression von *NKX2-1* verglichen.

PGK1, *ACTB* und *COX4I1* zeigten im Gegensatz zu *LMNB1* und *KPNA4* in Tumor- und Normalgewebe sowie untereinander eine konstante Expression und übereinstimmende Ergebnisse hinsichtlich einer positiven *NKX2-1*-Färbung des Tumors. Die Höhe der Proteinexpression korrelierte bei keinem der möglichen Kandidaten exakt mit der Genexpression. Dies ist nicht zwangsläufig auf die alleinige Expression der Referenzgene zurückzuführen, sondern kann auch durch die Komplexität der Regulationsmechanismen, die an der Proteinsynthese beteiligt sind, bedingt sein. Viele Faktoren beeinflussen die Entstehung und die Beständigkeit von Proteinen, wie die RNA-Stabilität, die Geschwindigkeit der mRNA-Degradation, die Effizienz der Translation sowie die Proteinstabilität (Fabian et al. 2010; Hargrove und Schmidt 1989; Houseley und Tollervey 2009; Moore und Proudfoot 2009; Newbury 2006).

Aufgrund der übereinstimmenden Ergebnisse bei der Verwendung von *PGK1*, *ACTB* und *COX4I1* wurden diese als geeignete Referenzgene für die Analyse von Lungenkarzinomen identifiziert. Um die geringen Schwankungen der Expression untereinander auszugleichen, wären eine gleichzeitige Verwendung aller drei Referenzgene und die Bildung eines Mittelwertes zur Berechnung der Expressionswerte optimal. Da die Expression aller Gene gewissen Schwankungen unterliegt eignet sich diese Strategie, um zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten (Pfaffl et al. 2004; Vandesompele et al. 2002). Die Verwendung von nur einem Referenzgen zur Normierung ist jedoch Standard und wird in vielen Expressionsanalysen aus Zeit- und Kostengründen bevorzugt. Bei vorheriger Validierung der verwendeten Gene werden ebenfalls zuverlässige Ergebnisse generiert (Tanic et al. 2007; Erickson et al. 2007; Suzuki et al. 2000). Für die in dieser Studie entwickelten qRT-PCR-Assays (*ALK*, *ROS1*, *LTK*) wurde aus Gründen der Kosteneffizienz

und der oft nur geringen Menge des Probenmaterials sowie wegen der besseren Handhabung der Assays das Referenzgen *PGK1* zur Normalisierung verwendet.

4.2 Molekulare Diagnostik einer ALK-Aktivierung in NSCLC

In dieser Studie wurde der *ALK*-Status mit den molekularbiologischen Methoden qRT-PCR, FISH und IHC in zwei großen Kohorten mit insgesamt 976 NSCLC untersucht. Auf diese Weise sollte die Eignung dieser Methoden für die Routine-Molekulardiagnostik untersucht werden sowie die Frage beantwortet werden, ob eine Präselektion anhand histologischer Marker, des Alters, des Geschlechts oder des Raucherstatus prinzipiell möglich ist.

Eine *ALK*-Rearrangierung wurde für 36 NSCLC nachgewiesen. Die klinisch-pathologischen Eigenschaften der identifizierten rearrangierten Tumore stimmten mit den Ergebnissen früherer Studien überein: Patienten mit *ALK*-positiven Tumoren waren mit einem Durchschnittsalter von 59 Jahren generell jünger und häufig weiblich (74 %), die Tumore enthielten oft Siegelringzellen und waren teilweise muzinös (Rodig et al. 2009; Shaw et al. 2009; Just et al. 2012; Murakami et al. 2012; Nishino et al. 2012). Dennoch kann aufgrund dieser Charakteristika nicht zwangsläufig auf eine *ALK*-Rearrangierung des Tumors geschlossen werden. Bei einer Vorauswahl der Tumore nach diesen Kriterien wären 74 % der Fälle nicht erkannt worden. Ein Zusammenhang zwischen *ALK*-rearrangierten Tumoren und nichtrauchenden Patienten wurde, im Gegensatz zu einigen Publikationen, in dieser Studie mit 8 rauchenden und 7 nichtrauchenden Patienten nicht gefunden (Shaw et al. 2009; Koivunen et al. 2008; Murakami et al. 2012; Nishino et al. 2012). Eine Präselektion von Patienten ist infolgedessen nicht möglich. Die Ergebnisse stützen die Empfehlung der Richtlinie für die Molekulare Diagnostik für Patienten mit NSCLC in den USA, alle fortgeschrittenen NSCLC unabhängig von Geschlecht, Alter, Raucherstatus und Morphologie des Tumors mit molekularbiologischen Methoden auf *ALK*-Rearrangierungen zu untersuchen (Lindeman et al. 2013).

4.2.1 Etablierung und Validierung eines qRT-basierten Assays zur Detektion von ALK-Rearrangierungen

Zurzeit stellt die break-apart FISH die Standard-Methode zur Analyse des *ALK*-Status im Lungenkarzinom dar. Für ein Screening von allen nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen ist diese Methode jedoch nur bedingt geeignet, da FISH-Sonden teuer und die Auswertungen zeitaufwändig sind (Lindeman et al. 2013). Die Analyse benötigt zudem sehr viel Erfahrung, da die Signalkonstellationen eine hohe Komplexität aufweisen können. Aufgrund einer intrachromosomalen Translokation sind die Signalabstände bei *EML4-ALK*-Fusionen nur gering und können leicht mit Signalen von z.B. nekrotischen Zellen verwechselt werden.

Zusätzlich liegen im Lungenkarzinom häufig Polysomien vor, die die Auswertung zusätzlich erschweren (Salido et al. 2011; von Laffert et al. 2014; Shaw et al. 2011).

In dieser Arbeit wurde ein qRT-PCR-basierter Assay entwickelt, mit dem Rearrangierungen durch eine quantitative Messung der *ALK*-Expression nachgewiesen werden. Die unbalancierte Expression, die aus der Entstehung von Fusionstranskripten bei Rearrangierungen resultiert, wird durch die Verwendung von zwei Amplikons im 3'- und im 5'-Bereich von *ALK* eindeutig nachgewiesen. Der Assay wurde für den Einsatz im diagnostischen Bereich konzipiert und wurde deshalb für die Verwendung von RNA aus FFPE-Material adaptiert. Um optimale Ergebnisse bei der Verwendung von RNA aus FFPE-Gewebe zu erhalten, die generell stark fragmentiert vorliegt, wurden mit 66 – 83 bp sehr kleine Amplikons gewählt. Außerdem erfolgte die RNA-Isolation mit Hilfe eines Verfahrens, das speziell für die Isolation aus FFPE-Gewebe entwickelt wurde und Formaldehyd-Modifikationen der RNA entfernt. Diese Modifikationen entstehen durch die Fixierung in Formalin und inhibieren enzymatische Reaktionen (z. B. die reverse Transkription). Sie führen außerdem zu einer RNA-Degradation (Masuda et al. 1999). Der qRT-PCR-Assay wurde zunächst in einer Serie mit Resektaten und Biopsien (652 NSCLC) getestet. Die Validierung für die Routinediagnostik und die Verwendung von Biopsien erfolgte an einer zweiten Serie (324 NSCLC), die hauptsächlich aus Biopsien bestand. Die Auswertbarkeit des Assays lag in den NSCLC-Serien bei 80 % (erste Serie) bzw. bei 79 % (zweite Serie), Zahlen die mit der Interpretierbarkeit der FISH-Analyse (60 – 90 %, 92 % in dieser Studie) vergleichbar sind (Just et al. 2012; McLeer-Florin et al. 2012). Für die qRT-PCR-Analyse sind Resektat- und Biopsiematerial gleichermaßen geeignet. Mögliche Probleme bei der Qualität können durch eine zu kurze Fixierung bei Resektaten oder eine zu lange Fixierung von Biopsiematerial verursacht werden (Castiglione et al. 2007).

Für die Überprüfung der Eignung des qRT-PCR-Assays zur Diagnostik von *ALK*-Rearrangierungen wurden insgesamt 976 NSCLC untersucht. Alle 32 Tumore, für die mittels FISH-Analyse eine *ALK*-Rearrangierung nachgewiesen wurde, wurden anhand einer unbalancierten *ALK*-Expression durch die qRT-PCR-Analyse identifiziert. Alle 28 NSCLC mit mäßiger oder starker 3'-Expression (erste Serie $3' > 0,40$, zweite Serie $3' > 0,43$) waren rearrangiert. NSCLC mit einer geringen unbalancierten Expression ($3' 0,2 - 0,4$) waren in 4 Fällen rearrangiert und in 12 Fällen nicht-rearrangiert. Derartige NSCLC mit kritischen Werten müssen daher mit alternativen Methoden (FISH oder IHC) verifiziert werden.

Durch die qRT-PCR-Analyse wurden in fünf Tumoren *ALK*-Rearrangierungen nachgewiesen, die in der FISH-Analyse nicht auswertbar waren (#61, #62, #94) oder bei denen die Signalkonstellationen nicht eindeutig war (#17, #135). Bei #17 war durch die FISH-Analyse nicht klar, ob die Kinasedomäne und damit das Therapietarget im Zuge der Rearrangierung deletiert wurde, da separierte grüne und sehr kleine orange Signale auf eine partielle

Deletion in der 3'-Region von *ALK* deuteten. Durch den qRT-PCR-Assay konnte mit einem Wert von 0,55 eine deutliche Expression des 3'-Bereichs von *ALK* nachgewiesen werden, die eine Rearrangierung mit Erhalt der Kinasedomäne bestätigte. Der Fall #135 wies mit 10 % break-apart Signalen und 59 % zusätzlichen grünen Signalen ein formal negatives FISH-Ergebnis auf. Mittels qRT-PCR konnte jedoch eine hohe unbalancierte Expression der Kinasedomäne (1,75) detektiert werden. Entweder wurde die Kinasedomäne in diesem Fall mit einem sehr stark exprimierten Gen fusioniert, sodass ein kleiner positiver Klon des Tumors zu dieser hohen Expression führte, oder die Kinasedomäne wurde bei den Zellen mit zusätzlichen grünen Signalen bei der Rearrangierung nicht deletiert, sondern ein Bereich 3' des Gens. Wie in Abbildung 4 (s. Kap. 2.2.6.4) skizziert, detektiert das orange Signal der Sonde den Bereich 3' des *ALK*-Gens, außerhalb der Kinasedomäne. Vor kurzem wurde bei einem Patienten, dessen Tumor wegen einer atypischen Signalkonstellation ebenfalls ein formal-negatives FISH-Ergebnis aufwies, ein Ansprechen auf Crizotinib dokumentiert (Ren et al. 2014). Durch die Detektion der Expressionshöhe mittels qRT-PCR-Analyse kann bei den Fällen, die in der FISH kein eindeutiges Ergebnis zeigen, oder auffällige Signalkonstellationen aufweisen, eine Therapieentscheidung getroffen werden.

Bis auf einen Fall (#21), der eine geringe, aber unbalancierte 3'-Expression von 0,15 aufwies, waren alle NSCLC mit einem 3'-Expressionswert < 0,2 nicht rearrangiert. Die Relevanz des rearrangierten NSCLC #21 in Bezug auf ein Therapieansprechen ist nicht klar. Für geringe *ALK*-Expressionswerte trotz Rearrangierung können prinzipiell verschiedene Faktoren verantwortlich sein: 1) Ein sehr niedriger Tumorzellgehalt beeinflusst die Höhe der relativen Expressionswerte, betrug bei diesem Fall (#21) jedoch 40 – 50 %. Außerdem konnten Rearrangierungen bei vier NSCLC, die einen Tumorzellgehalt von 10 – 30 % aufwiesen, aufgrund der unbalancierten Expression zuverlässig nachgewiesen werden. 2) Die Expression der *ALK*-Fusionstranskripte wird von der Stärke der Expression des Fusionspartners bestimmt. *EML-ALK* ist zwar die häufigste Variante, es werden dennoch immer wieder neue, ebenfalls tumorigene *ALK*-Fusionen in NSCLC beschrieben (Yoshida et al. 2013; Fang et al. 2014). Die Relevanz der Höhe der Genexpression der *ALK*-Fusionstranskripte wurde jedoch noch nicht untersucht. Eine weitere Möglichkeit könnte eine niedrige Expression von *EML4* darstellen. Weil *ALK*-Rearrangierungen in der Vergangenheit meist durch FISH-Analysen detektiert wurden, wurde bisher nicht geklärt, wie hoch die Expression von *EML4-ALK* ist und ob die Höhe der RNA- mit der Proteinexpression korreliert. 3) Die Expression des zur Normierung verwendeten Referenzgens *PGK1* kann geringen Schwankungen unterliegen. Im Vorfeld wurde die Eignung dieses Gens als Referenz im Lungenkarzinom getestet, jedoch unterliegen auch im entsprechenden Gewebe konstant exprimierte Gene gewissen Schwankungen (Erickson et al. 2007; Vandesompele et al. 2002).

EML4-ALK ist im Vergleich zu anderen ALK-Fusionsproteinen, wie zum Beispiel NPM-ALK in Lymphomen, in NSCLC eher schwach exprimiert. Dennoch ist seine Expression für eine Tumorentstehung und -Progression offenbar ausreichend (Mino-Kenudson et al. 2010). Ob eine geringe Expression, wie bei Fall #21, für eine erfolgreiche Behandlung mit Crizotinib von Nutzen ist und deshalb in der Routinediagnostik bestimmt werden sollte, ist unklar und sollte in zukünftigen Studien untersucht werden.

Mittlerweile wurden weitere Nachweisverfahren für die Detektion von *ALK*-Rearrangierungen entwickelt, die z.B. auf der Nanostring nCounter-Technologie oder auf Next-Generation Sequencing basieren und das Prinzip des qRT-PCR-Assays – die Identifizierung einer unbalancierten Expression von *ALK*-Transkripten – als zuverlässigen Nachweis von *ALK*-Rearrangierungen bestätigen. Für Diagnostik-Labore sind diese Nachweisverfahren derzeit jedoch noch zu aufwändig und meist nicht verfügbar (Lira et al. 2013; Lipson et al. 2012b; Abel et al. 2014). Die qRT-PCR gehört dagegen zu den Standardmethoden und ist in vielen Laboren etabliert. Kürzlich wurde ein vergleichbarer Assay zum Nachweis von *ALK*-Rearrangierungen beschrieben, welcher allerdings nur für RNA aus Frischgewebe etabliert ist und somit in der Routine-Diagnostik nicht verwendet werden kann (Wang et al. 2012). Der hier entwickelte qRT-PCR-Assay kann dagegen standardisiert an FFPE-Material durchgeführt werden und ist im Vergleich zur FISH-Analyse deutlich kostengünstiger. Die Durchführung im 96-Well- oder 384-Well-Format erlaubt die gleichzeitige Analyse vieler Tumore. Des Weiteren kann, wie in dieser Untersuchung gezeigt, die RNA sowie DNA durch die Verwendung eines geeigneten Verfahrens gleichzeitig und damit materialsparend isoliert werden. Infolgedessen wird limitiertes Biopsiematerial optimal für die Diagnostik verwendet, da zusätzlich zu *ALK*-Analysen generell auch der *EGFR*-Status durch DNA-basierte Mutationsanalysen bestimmt werden kann.

Zusammenfassend kann der *ALK*-Status in Lungenkarzinomen mit Hilfe des entwickelten qRT-PCR-basierten Assays zuverlässig bestimmt werden. Dabei können Rearrangierungen unabhängig vom Fusionspartner identifiziert und gleichzeitig von einer erhöhten Expression des Gesamttranskripts (s. Kap. 4.2.3) unterschieden werden. Im Gegensatz dazu können mit Hilfe einer break-apart FISH die Fälle, die eine Gesamttranskript-Expression aufweisen, nicht detektiert werden. Die Vorteile einer qRT-PCR liegen in einer sehr hohen Sensitivität, einer einfachen Durchführung und Auswertung sowie der Möglichkeit, sehr viele Proben gleichzeitig ohne größeren Aufwand analysieren zu können. Im Bereich der Routinediagnostik könnte diese Methode nicht nur zum Screening nach *ALK*-Rearrangierungen in NSCLC, sondern auch für die Detektion von Rearrangierungen in anderen Tumorentitäten, beispielsweise in ALCL oder inflammatorischen myofibroblastischen Tumoren verwendet werden. Zusätzlich ist der Assay für eine

Charakterisierung von Tumoren geeignet, die eine erhöhte ALK-Expression aufweisen, wie z. B. Neuroblastome und Sarkome.

4.2.2 Immunfärbungen zur Identifizierung ALK-rearrangierter NSCLC

Immunfärbungen für Tyrosinkinasen stellen eine gute Screeningmethode für die Routinediagnostik dar. Da während der Durchführung dieser Dissertation neue Antikörper mit erhöhter Sensitivität und sensitivere Nachweis-Systeme entwickelt wurden, wurden drei IHC-Systeme an zwei Serien mit jeweils 21 bzw. 20 rearrangierten NSCLC zur Detektion ALK-rearrangierter NSCLC getestet: Die Antikörper 1A4 (Origene) und D5F3 (Cell Signaling) mit einem konventionellen Färbesystem sowie das D5F3/Ventana-System mit Signalamplifikation. Die Immunfärbungen mit diesen 3 Systemen führten zu vergleichbaren Ergebnissen. Der 1A4-Antikörper und der D5F3-Antikörper (Cell Signaling) erkannten alle rearrangierten Fälle und besaßen damit eine Sensitivität von 100 %. Das D5F3/Ventana-System zeigte eine Sensitivität von 95 %, da 19 von 20 rearrangierten Fällen detektiert wurden. Ergebnisse aus publizierten Studien zeigten eine Sensitivität des D5F3/Ventana-Systems von 83 – 100 %, und für D5F3 in Kombination mit Signalverstärkung von 100 % (Guo et al. 2014; Ying et al. 2013; Wynes et al. 2014; Le Quesne et al. 2014; Mino-Kenudson et al. 2010; Conklin et al. 2013; Selinger et al. 2013). Zu dem 1A4 Antikörper sind noch keine Publikationen verfügbar.

Die Färbungen mit dem Antikörper D5F3 und dem neuen Antikörper 1A4 wurden nach Standardprotokoll ohne Signalverstärkung durchgeführt. In den meisten rearrangierten Fällen wiesen die Tumorzellen eine moderate Signalintensität auf; insgesamt zeigte sich eine sehr geringe Hintergrundfärbung. Mit dem D5F3/Ventana-System wurde eine intensive zytoplasmatische Färbung erreicht, jedoch zeigten einzelne ALK-negative Fälle eine Hintergrund- oder membranassoziierte Färbung, die wahrscheinlich durch die Tyramid-Signalverstärkung verursacht wurde. Diese Färbemuster sind laut Herstellerangaben negativ zu werten, erfordern jedoch Erfahrung, um die Fälle von positiven Tumoren unterscheiden zu können. Beispielsweise ähnelte eine membranassoziierte Färbung bei einem ALK-negativem Fall der Färbung eines positiven, stark muzinösen Tumors, dessen zytoplasmatische Signale sich aufgrund des Muzins im Bereich der Zellmembran konzentrierten (#330 und #7; siehe Abb. 15).

Die Intensität der Genexpression wies bei den rearrangierten NSCLC keine signifikante Korrelation mit der Proteinexpression auf. Aufgrund der vielen Variablen, die die Entstehung von Proteinen beeinflussen, wie (Post-) Transkriptionelle Regulation, RNA-Prozessierung und -Stabilität, Translationseffizienz sowie Proteinmodifikationen, kann generell nicht von einer strikten Korrelation der RNA- und Proteinmenge ausgegangen werden (Vogel und Marcotte 2012; Ghazalpour et al. 2011). Eine Analyse, in der die Höhe der RNA- und die

Höhe der Proteinexpression von *ALK*-rearrangierten Tumoren in Bezug auf ein Therapieansprechen verglichen werden, könnte weitere Informationen liefern. Anhand dieser Daten könnte ermittelt werden, ob ein Ansprechen mit der RNA- oder Proteinmenge korreliert, welche diagnostische Methode Hinweise auf ein Therapieansprechen gibt, oder ob dieses von weiteren Faktoren abhängt.

Die Spezifität aller drei verwendeten Systeme war sehr hoch: Mit dem Antikörper D5F3 wurden alle *ALK*-rearrangierten und *ALK*-negativen Fälle korrekt erkannt. Bei 4 von 5 Gesamttranskript-exprimierenden NSCLC wurde eine schwache Färbung detektiert. Die Fälle mit einer Gesamttranskript-Expression wurden aufgrund des limitierten Materials nicht mit dem D5F3/Ventana-Assay und dem Antikörper 1A4 untersucht. Mit diesen Systemen wurde eine Spezifität von 99,5 % (D5F3/Ventana) und 99,1 % (1A4) erreicht.

Ergebnisse, welche mit der qRT-PCR- und/oder FISH-Analyse nicht übereinstimmend waren, betrafen bei den verwendeten Antikörpern nur Tumore, die eine schwache oder fokale, atypische *ALK*-Färbung aufwiesen. Es wäre daher bei routinemäßigen Färbungen sinnvoll, alle Tumore mit einer schwachen bzw. fokalen Färbung, die in etwa 1 – 2 % der Fälle auftrat, mit Hilfe einer zweiten Methode zu untersuchen, um ein korrektes Ergebnis sicherzustellen.

Immunfärbungen, die *ALK*-Rearrangierungen unabhängig vom Fusionspartner nachweisen, können als Screeningverfahren genutzt werden. Die Auswertung der Ergebnisse benötigt allerdings auch bei der IHC viel Erfahrung, um schwach positive Färbungen (Bsp. #17, Abb. 12) von einer Hintergrundfärbung zu unterscheiden. Es ist zu beachten, dass bei einer positiven Immunfärbung außerdem nicht zwischen einer Rearrangierung und einer Gesamttranskript-Expression der Tumore unterschieden werden kann. Letztere wurde bisher auch in der Literatur nicht beschrieben und wurde in dieser Studie in etwa 1 % der untersuchten Tumore nachgewiesen; bei 80 % dieser Fälle wurde eine Proteinexpression detektiert. Es wurde noch nicht untersucht, ob diese Gruppe von Patienten auf eine Crizotinib-Behandlung anspricht. Ob beide Patientengruppen gleichermaßen von der Therapie mit *ALK*-Inhibitoren profitieren, muss daher in zukünftigen Studien geklärt werden. Um die Subgruppen voneinander zu unterscheiden, sollten daher alle IHC-positiven NSCLC mit weiteren Methoden analysiert werden.

Aufgrund der hohen Sensitivität und Spezifität ist die IHC mit dem Antikörper 1A4 und dem D5F3/Ventana-System für ein Screening von *ALK*-positiven Lungenkarzinomen gut geeignet. Nach Abschluss der Studie mit dem Antikörper D5F3 (Cell Signaling) wurde eine neue Charge des Antikörpers verwendet, mit der viele falsch-positive Färbungen beobachtet wurden. Aufgrund dessen kann der Antikörper zurzeit nicht empfohlen werden. Insbesondere der Antikörper 1A4 ist eine kostengünstige Alternative zum Nachweis von *ALK*-Rearrangierungen, da das D5F3/Ventana-System, wie die FISH-Analyse, hohe Kosten verursacht.

Zusammenfassend kann als Ergebnis dieser Arbeit derzeit folgende Vorgehensweise empfohlen werden: Ein Screening aller nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome kann zuverlässig und kostengünstig mittels Immunfärbung durchgeführt werden. Alle positiven und kritischen Fälle sollten mit weiteren Methoden, wie der qRT-PCR- oder FISH-Analyse, validiert werden, um den *ALK*-Status eindeutig zu bestimmen. Der Aufwand und die Kosten für die *ALK*-Untersuchung kann mit Hilfe der Immunhistochemie stark reduziert werden, da etwa 94 % der Fälle als eindeutig negativ identifiziert werden können.

4.2.3 Lungenkarzinome mit *ALK*-Gesamttranskript-Expression

4.2.3.1 Mutationsanalyse der Kinasedomäne von NSCLC mit *ALK*-Gesamttranskript-Expression

Aufgrund von bereits durchgeführten Untersuchungen war bekannt, dass *ALK* in Lungenkarzinomen durch Rearrangierung und Expression von Fusionsproteinen aktiviert wird. In Neuroblastomen erfolgt eine Aktivierung von *ALK* durch Überexpression von Wildtyp- oder mutierten Transkripten (Chand et al. 2013; Passoni et al. 2009; Duijkers et al. 2011). In einer Studie wurden onkogene Punktmutationen in Lungenkarzinomen identifiziert (Wang et al. 2011).

In dieser Arbeit wurde mit dem qRT-PCR-Assay eine hochregulierte *ALK*-Expression von nicht-rearrangierten Transkripten in 9 NSCLC (jeweils 1 % der ersten und zweiten Serie) detektiert. Bei 4 von 5 Fällen wurde die *ALK*-Expression mit der Expression von *ALK*-Protein assoziiert. Diese neue Subgruppe von Patienten mit NSCLC könnte daher, wie Patienten mit rearrangierten Tumoren, von einer Crizotinib-Behandlung profitieren.

Bei einer Mutationsanalyse der Kinasedomäne von 6 NSCLC mit *ALK*-Expression, konnte bei einem Fall (#25) mit *ALK*-Proteinexpression ein heterozygoter Nukleotidaustausch im zentralen Bereich der Kinasedomäne identifiziert werden (3569 C>A). Da die Mutation auch in normalem Lungengewebe des Patienten nachgewiesen werden konnte, handelte es sich um eine Keimbahnmutation. Eine familiäre Veranlagung, wie bei Neuroblastomen, ist nicht auszuschließen (Mossé et al. 2008). Obwohl bei anderen Tumorentitäten, wie z. B. Neuroblastomen, verschiedene *ALK*-Mutationen in der Kinasedomäne auftreten, wurde ein Austausch der Aminosäure S220 noch nicht beschrieben (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>). Es handelt sich daher höchstwahrscheinlich nicht um einen Polymorphismus. Die Expression des mutierten Allels war tumorspezifisch und im normalen Lungengewebe nicht nachzuweisen, ein Befund der auf eine Beteiligung in der Tumorpathogenese hinweist. Die zu einem Aminosäureaustausch führende Mutation (S220Y) könnte eine verstärkte oder konstitutive Aktivierung des Proteins zur Folge haben, die wie bei *EGFR*-Mutationen zu einem konstitutiven Wachstumssignal führt (Han und Lo 2012). Außerdem könnte, wie für Resistenzmutationen in der Kinasedomäne bekannt, eine Bindung von Inhibitoren beeinflusst

oder verhindert werden (Wang et al. 2011; Katayama et al. 2012; Kim et al. 2013). Die Sequenzierung der *ALK*-exprimierenden Fälle fokussierte sich auf die Tyrosinkinasedomäne, da aktivierende *ALK*-Mutationen in Neuroblastomen diesen Bereich betreffen (Azarova et al. 2011; Janoueix-Lerosey et al. 2008). Es wäre allerdings möglich, dass in den untersuchten NSCLC auch Mutationen außerhalb der Kinasedomäne existieren. Erst kürzlich wurden in Lungenkarzinomen mehrere *ALK*-Mutationen außerhalb der Kinasedomäne identifiziert, die ebenfalls eine tumorigene Wirkung zeigten (Wang et al. 2011).

Anhand von *in vitro*-Versuchen an Neuroblastomzelllinien, die *ALK* oder mutiertes *ALK* überexprimierten, sowie Xenograft-Experimenten an Mäusen konnte gezeigt werden, dass *ALK*-Inhibitoren das Wachstum der Zellen hemmen bzw. zur Apoptose führen. Außerdem wurde nachgewiesen, dass ab einer bestimmten Transkriptmenge auch nicht-mutiertes *ALK* eine tumorigene Wirkung in Neuroblastom-Zellen besitzt (Passoni et al. 2009; George et al. 2008; Bresler et al. 2011; Hasan et al. 2013). Die ersten Ergebnisse einer Crizotinib-Therapie im Rahmen von klinischen Studien an Kindern mit Neuroblastomen und aktivierenden *ALK*-Mutationen zeigten ein Ansprechen bei einem Teil der Patienten (Mossé et al. 2013). Dies verdeutlicht die Möglichkeit einer zielgerichteten Behandlung von Neuroblastom-Patienten mit aktiviertem *ALK*. Die Bindung des Inhibitors Crizotinib kann durch die Mutationen beeinflusst werden, weshalb zurzeit in klinischen Studien verschiedene Inhibitoren (Crizotinib, LDK378, RXDX-101) zur Behandlung von Tumoren mit aktivierenden *ALK*-Mutationen getestet werden (NCT01742286, NCT00939770, NCT00939770, NCT02097810). In Analogie zu anderen Tumorentitäten könnte überexprimiertes *ALK* mit und ohne aktivierende Mutationen in NSCLC ebenfalls von therapeutischer Relevanz sein. Dafür sprechen folgende Beobachtungen: Eine ektopische Überexpression von Wildtyp- und mutierten Transkripten zeigte bei Zellkulturexperimenten eine tumorigene Wirkung. Die Behandlung mit verschiedenen *ALK*-Inhibitoren (TAE684, CEP-14083, Crizotinib) führt zu einer Inhibierung des Wachstums und der Proliferation (Passoni et al. 2009; Duijkers et al. 2011; Bresler et al. 2011). Weitere Daten geben Hinweise auf eine *ALK*-Expression ohne Rearrangierung in NSCLC: Bei einem FISH-negativen, IHC-positiven Fall wurde ein Ansprechen auf Crizotinib dokumentiert. Es könnte sich jedoch auch um ein falsch-negatives FISH-Ergebnis handeln (Sun et al. 2012).

Expressions- und Mutationsanalysen sollten in zukünftige Studien zu *ALK* in NSCLC mit einbezogen werden, um die Beteiligung an einer Tumorentwicklung und die Möglichkeit einer Therapie mit *ALK*-Inhibitoren zu klären.

4.2.3.2 Nachweis des aktivierten *ALK*-Proteins in FFPE-Gewebe

Durch Immunfärbung des autophosphorylierten *ALK*-Proteins in FFPE-Gewebe sollte ein Nachweis der *ALK*-Aktivierung in Fällen mit *ALK*-Expression im Vergleich mit *ALK*-rearrangierten und *ALK*-negativen NSCLC erfolgen. Zwei verschiedene Phospho-*ALK*-

Antikörper, pY1604 (Epitomics) und pTyr1507 (Acris Antibodies), reagierten spezifisch mit Tumorgewebe, färbten aber unabhängig vom *ALK*-Status alle NSCLC mit derselben Intensität. Dieses Ergebnis lässt auf Kreuzreaktionen mit anderen Tyrosinkinasen schließen. Der spezifische Nachweis einer *ALK*-Autophosphorylierung mittels IHC war aus diesem Grund nicht möglich. Der Antikörper pY1604 war im Vorfeld als guter Antikörper zur Identifizierung *ALK*-rearrangierter Lungenkarzinome beschrieben worden. In einer Studie von Wang *et al.* (2011) konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen einer *ALK*-Färbung und der spezifischen pY1606-Färbung festgestellt werden. Bei der Verwendung des phospho-*ALK*-Antikörpers wurde eine moderate bis starke Färbung in fast allen Tumoren eines TMA (92,5 %) detektiert, während die parallel durchgeführte Färbung mit einem anti-*ALK*-Antikörper nur eine Färbung in 18,3 % der Tumore zeigte. Die Autoren zogen den Schluss, dass *ALK* in der Mehrzahl der NSCLC-Fälle aktiviert vorlag und der *ALK*-spezifische Antikörper nicht zu dessen Nachweis geeignet ist (Wang *et al.* 2011). Aufgrund der Daten dieser Dissertation kann davon ausgegangen werden, dass auch bei der Studie von Wang *et al.* (2011) Kreuzreaktionen mit Tyrosinkinasen vorlagen. Da Phosphorylierungsstellen häufig konserviert sind, ist ein spezifischer Nachweis generell nicht einfach. Unspezifische Färbungen sollten daher für jeden Antikörper durch detaillierte Tests ausgeschlossen werden (Mandell 2003).

4.2.3.3 Nachweis der Aktivierung *ALK*-induzierter Signalwege an FFPE-Gewebe

Eine Aktivierung der durch *ALK* induzierten Signalwege JAK-STAT3, Ras-MAPK und PI3K-Akt sollte mit phospho-spezifischen Immunfärbungen von STAT3, MAPK und Akt bestätigt werden. Es sollte geklärt werden, ob ein Nachweis der Aktivierung der Zielproteine an FFPE-Gewebe mittels Immunhistochemie möglich ist, und ob die Signalwege auch bei Tumoren mit *ALK*-Expression aktiviert sind. Ein zuverlässiger Nachweis von p-Akt war aufgrund einer zu geringen Signalintensität nicht möglich.

Beide untersuchten *ALK*-exprimierenden NSCLC zeigten eine pSTAT3-, aber keine p44/42 MAPK-Färbung. Dies lässt darauf schließen, dass STAT3 in diesen Tumorzellen aktiviert war. Wegen des geringen Probenumfangs kann jedoch nicht auf eine spezifische Aktivierung des JAK-STAT3-Signalwegs bei einer Gesamttranskript-Expression geschlossen werden. Obwohl verschiedene Studien an Zelllinien zu dem Ergebnis gekommen sind, dass eine Aktivierung von *ALK* generell zu einer Phosphorylierung von STAT3 und MAPK führen, (Zamo *et al.* 2002; Chiarle *et al.* 2005; Souttou *et al.* 2001), waren in dieser Arbeit nur 71 % der rearrangierten NSCLC positiv für STAT3 und nur 39 % positiv für pMAPK. Die meisten Informationen zur Phosphorylierung von *ALK*-Zielmolekülen stammen aus der Charakterisierung von *NPM-ALK*-Fusionen in Lymphomen, weshalb Unterschiede in der Aktivierung von Signalwegen bei verschiedenen Fusionsproteinen im NSCLC nicht

ausgeschlossen werden können (Zamo et al. 2002; Vega et al. 2006; Turner et al. 2007; Amin und Lai 2007). Die geringe Färberate von pSTAT3 und p44/22 MAPK bei den rearrangierten Fällen kann auch auf Fixierungsartefakte zurückzuführen sein. Wenn Proteinphosphorylierungen nachgewiesen werden sollen, ist aufgrund der geringen Stabilität der Phosphatgruppen eine sehr schnelle Fixierung des Gewebes von großer Bedeutung. Um die Phosphatgruppen zu konservieren, ist außerdem ein frisches Anschneiden des Paraffinblocks und sofortiges Färben essentiell (Mandell 2008). Bei den negativen Fällen könnte eine Phosphorylierung vorgelegen haben, die aber nicht mehr zu detektieren war. Da die Fixierung des Materials im Rahmen der Routinediagnostik erfolgte, kann nicht gewährleistet sein, dass alle Proben identisch fixiert wurden. Daher kann anhand des verwendeten FFPE-Materials keine generelle Aussage über die Phosphorylierung der Zielproteine in *ALK*-rearrangierten und -exprimierenden NSCLC getroffen werden.

Eine Phosphorylierung von STAT3 und MAPK wurde auch bei *ALK*-negativen Fällen beobachtet (68 % pSTAT3, 37 % pMAPK). Es war zu erwarten, dass eine Aktivierung dieser Signalwege nicht nur in den rearrangierten Fällen auftritt, da diese Signalwege häufig in der Entstehung und der Progression von NSCLC involviert sind (Shaw und Cantley 2006; Shtivelman et al. 2014; Siegfried et al. 2013; Webb und Simon 2010; Li et al. 2013).

4.2.3.1 Charakterisierung der Genexpression von *ALK*-Liganden

Rearrangierungen von *ALK* führen zu einer Expression von *ALK*-Fusionsproteinen, welche die Kinasedomäne von *ALK* enthalten, jedoch nicht die Ligandenbindungsregion. Die Aktivierung erfolgt ligandenunabhängig in Abhängigkeit vom Fusionspartner. Eine Aktivierung nicht-fusionierten *ALK*-Proteins kann im Gegensatz dazu formal nur durch eine Bindung spezifischer Liganden erfolgen.

Bei allen sechs untersuchten Gesamttranskript-exprimierenden NSCLC wurde eine deutliche Überexpression des *ALK*-Liganden *MDK* sowie eine schwache Expression des *ALK*-Liganden *PTN* nachgewiesen. Damit könnte der nicht-translozierte *ALK*-Rezeptor in den betroffenen NSCLC insbesondere durch den Liganden *MDK* aktiviert werden.

MDK zeigte in Lungenkarzinomen generell – auch in *ALK*-negativen und *ALK*-rearrangierten NSCLC – eine hohe Expression: 41 % der NSCLC zeigten im Vergleich zu normaler Lunge eine signifikant höhere Expression. *PTN* war im Vergleich schwächer exprimiert und nur in einzelnen Fällen unabhängig vom *ALK*-Status stark exprimiert. Mit dieser Analyse wurden Literaturdaten bezüglich einer erhöhten Expression von *MDK* und *PTN* in NSCLC bestätigt, die eine erhöhte Expression von *MDK* und von *PTN* in Tumorgewebe, Zelllinien und Serum beschreiben (Ikematsu et al. 2000; Tsutsui et al. 1993; Garver et al. 1993; Jäger et al. 2002; Jäger et al. 1997). Die *ALK*-Liganden besitzen vielfältige Funktionen. Es konnte eine Beteiligung an der Tumorentstehung, dem Überleben von Zellen und der Metastasenbildung nachgewiesen werden (Papadimitriou et al. 2009; Sakamoto und Kadomatsu 2012).

Aufgrund der in NSCLC nachgewiesenen hohen Expression könnte insbesondere *MDK* ein neues Target für die zielgerichtete Therapie von NSCLC darstellen.

Für *MDK* wurde bereits ein Inhibitor entwickelt, der bei *MDK*-exprimierenden NSCLC-Zelllinien, wie H441, durch Hemmung des PI3K-Akt-Signalwegs zur Apoptose führt (Hao et al. 2013). Die Expression der Liganden war auch in *ALK*-rearrangierten Tumoren nachzuweisen und unterstützt möglicherweise die Tumorentwicklung und -progression *ALK*-positiver Tumore durch Aktivierung anderer Kinasen. Eine Kombinationstherapie von *MDK*- und *ALK*-Inhibitoren könnte ein Ansprechen verbessern und die Dauer bis zur Progression verlängern.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass nicht nur *ALK*-Rearrangierungen, sondern auch eine Expression von *ALK*-Transkripten zu einer *ALK*-Aktivierung in einer Subgruppe von NSCLC führen können. Die Expression des nicht-rearrangierten *ALK* führte zu einer detektierbaren Menge an *ALK*-Protein, wobei in einem der Fälle ein potentiell aktivierender Aminosäureaustausch in der Kinasedomäne identifiziert wurde. Die Gen- und Proteinexpression von *ALK* war außerdem mit der Genexpression der *ALK*-Liganden *MDK* und *PTN* sowie der Aktivierung von *STAT3* assoziiert. Ob *ALK*-exprimierende NSCLC-Zellen – in Analogie zu Neuroblastomzellen – mit *ALK*-Inhibitoren therapierbar sind muss mit zellbiologischen Experimenten untersucht werden.

4.3 Detektion und Analyse von *ROS1* in Adenokarzinomen der Lunge

Die Entdeckung einer Rearrangierung der Rezeptortyrosinkinase *ROS1* im Lungenkarzinom, die in etwa 1 – 2 % der NSCLC vorliegt, eröffnete wie bei *ALK*-rearrangierten Tumoren neue, vielversprechende Therapieoptionen (Bos et al. 2013; Ou et al. 2012; Shaw et al. 2014). Es ist daher wichtig, die Patienten zu identifizieren, die von einer Behandlung profitieren.

4.3.1 Etablierung und Validierung eines qRT-PCR-basierten Assays zur Detektion einer *ROS1*-Rearrangierung und Charakterisierung der *ROS1*-Expression

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 9 Fälle mit *ROS1*-Translokationen in einer Serie von 686 NSCLC identifiziert. Die verfügbaren klinischen und histologischen Daten der Patienten mit *ROS1*-Rearrangierung zeigten, dass eine Präselektion von potentiell rearrangierten NSCLC anhand dieser Parameter nicht möglich ist. In Übereinstimmung mit Literaturdaten war mit einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 62 Jahren eine Tendenz zu einem früheren Erkrankungsalter der Patienten erkennbar. Eine Assoziation zu weiblichen Patienten sowie dem Nichtraucherstatus, welche in verschiedenen Studien gezeigt wurde, konnte nicht bestätigt werden (Jin et al. 2015; Lee et al. 2014; Mescam-Mancini et al. 2014). Bezüglich

der Histologie wurden häufig solide, cibriforme und azinäre Wachstumsmuster und ein auffällig hoher Anteil siegelringzellhaltiger Tumore beschrieben (Chen et al. 2014; Lee et al. 2014; Pan et al. 2014; Boland et al. 2014). Die *ROS1*-rearrangierten Tumore dieser Serie zeigten ebenfalls häufig ein solides Wachstumsmuster (3/7 NSCLC) und Siegelringzellen (2/7 NSCLC). Eine Tendenz zu einem cibriformen oder azinären Wachstumsmuster konnte nicht festgestellt werden. Für eine statistisch signifikante Aussage müsste jedoch eine größere Anzahl *ROS1*-rerangierter Tumore charakterisiert werden. In Analogie zu *ALK* können Tumore mit *ROS1*-Aktivierung nur mittels molekularer Diagnostik der *ROS1*-Rearrangierung selektiert werden.

Da im Rahmen dieser Arbeit bereits ein gut funktionierender qRT-PCR-Assay für den Nachweis *ALK*-rearrangierter Tumoren entwickelt wurde (Gruber et al. 2014), sollte ein vergleichbarer Assay auch für *ROS1*-rearrangierte Tumore etabliert werden. Für eine Optimierung des Assays für FFPE-Gewebe wurden, wie für die Detektion von *ALK*-Rearrangierungen, sehr kleine Amplikons gewählt.

In einer Serie von 671 auswertbaren NSCLC konnten alle fünf Tumore, für die mittels FISH eine *ROS1*-Rearrangierung nachgewiesen wurde, anhand einer unbalancierten Expression identifiziert werden. Allerdings wurde bei der Verwendung nur eines 5'-Amplikons im Bereich der Exons 15 und 16 (5'-A1) auch für 13 nicht-rearrangierte Tumore eine unbalancierte Expression beobachtet, sodass die Spezifität des Assays für eine eindeutige Identifizierung rearrangierter Tumore nicht ausreichend war. Die Verwendung von zwei verschiedenen 5' Amplikons in Exon 15/16 sowie in Exon 17/18 verbesserte die Spezifität des Assays erheblich. Zwölf nicht-rearrangierte NSCLC mit unbalancierter 3'-Expression von Exon 15/16 zeigten eine deutliche Expression des 5'-Bereichs in der Region von Exon 17/18, ein Fall eine relativ schwache Expression (#84). Die fehlende bzw. geringe Amplifizierung von Exon 15/16 bzw. Exon 17/18 (#84) konnte auf die Expression von Transkriptvarianten zurückgeführt werden (s. Kap. 4.3.3).

Anhand des zweiten 5'-Amplikons konnten Tumore mit Transkriptvarianten eindeutig von den rearrangierten Tumoren unterschieden werden, bei denen aufgrund der Genfusion nur der 3'-Bereich von *ROS1* exprimiert und für beide 5'-Amplikons eine unbalancierte Expression beobachtet wurde. Eine Ausnahme bildeten zwei Tumore mit schwacher bis mäßiger Expression beider 5'-Amplikons. NSCLC #84 war nicht rearrangiert, exprimierte allerdings eine Transkriptvariante, die die Amplifikation der Exone 17/18 unmöglich macht, NSCLC #65 war laut FISH-Analyse rearrangiert, exprimierte aber auch *ROS1*-Gesamtranskript. Eine *ROS1*-Rearrangierung kann in NSCLC, bei denen zwar eine deutliche *ROS1*-Expression ($3' > 0,3$), aber eine schwache unbalancierte Expression (Quotient < 5) eines oder beider 5'-Amplikons beobachtet wird, mit dem qRT-PCR-Assay nicht eindeutig identifiziert werden.

Diese sollten deshalb mit einer weiteren Methode, wie FISH oder IHC, weiter charakterisiert werden.

Der qRT-PCR-Assay stellt eine geeignete Methode für die Identifizierung *ROS1*-rearrangierter und *ROS1*-exprimierender NSCLC dar. Eine hochregulierte Expression von *ROS1* ohne Genrearrangierung wurde in 8 % der Tumore nachgewiesen. Durch die Verwendung von 2 Amplikons im 5'-Bereich konnten rearrangierte und nicht-rearrangierte Tumore mit Expression sicher voneinander unterschieden werden. *ROS1*-negative NSCLC können zudem eindeutig identifiziert werden und müssen nicht weiter analysiert werden. Aufgrund der geringen Anzahl *ROS1*-rearrangierter Tumore in dieser Serie sollten für die weitere Charakterisierung und für besser validierte Schwellenwerte des Assays in weiterführenden Studien alle Fälle mit einer *ROS1*-Expression ($3' > 0,3$) mit weiteren Methoden, wie FISH und IHC, untersucht werden. Dieser Assay stellt den ersten qRT-PCR-basierten Assay zur Diagnostik von *ROS1*-Rearrangierungen dar. Die Entwicklung eines zuverlässigen Assays für die Detektion von *ROS1*-Rearrangierungen war aufgrund der in dieser Arbeit gefundenen Transkriptvarianten schwierig. Eine erste Studie zum Nachweis von *ROS1*-Rearrangierungen mittels Nanostring nCounter-Technologie, die auf demselben Prinzip wie der entwickelte qRT-PCR-Assay basiert, konnte eine *ROS1*-Rearrangierung aufgrund der unbalancierten Expression des Fusionstranskripts nachweisen. Wegen der geringen Anzahl von 69 untersuchten NSCLC enthielt die Studie allerdings nur einen rearrangierten Fall (Suehara et al. 2012).

4.3.2 Immunfärbungen zur Detektion *ROS1*-rearrangierter NSCLC

Derzeit werden Immunfärbungen intensiv auf ihre Eignung in der Diagnostik von *ROS1*-Rearrangierungen getestet. Die bereits publizierten Studien weisen große Unterschiede auf: Die Sensitivität der *ROS1*-IHC ist sehr hoch (94 – 100 %), jedoch gibt es deutliche Unterschiede in der Spezifität des Antikörpers D4D6. In drei Studien wurde eine Proteinexpression von *ROS1* ausschließlich bei rearrangierten Lungenkarzinomen detektiert, mit Ausnahme von einem falsch-positiv-detektiertem NSCLC bei Sholl *et al.* (2012) und zwei falsch-positiv-detektierten NSCLC bei Mescam-Mancini *et al.* (2014) (Sholl et al. 2013; Rimkunas et al. 2012; Mescam-Mancini et al. 2014). In weiteren Studien wurde in bis zu 31 % der Fälle eine Reaktivität beobachtet (Yoshida et al. 2013; Cha et al. 2014; Warth et al. 2014). Es stellt sich die Frage, ob in letzterer Arbeit eine unspezifische Hintergrundfärbung aufgetreten ist, die aufgrund verschiedener Verdünnungen sowie Färbe- und Detektionsmethoden auftreten und variieren kann, oder ob eine Proteinexpression von nicht-rearrangiertem *ROS1* nachgewiesen wurde. Teilweise wurde die Färbung bei nicht-rearrangierten NSCLC als schwach und fokal beschrieben, was in der Tat auf eine unspezifische Färbung hindeutet. Ob ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten *ROS1*-

Genexpression und einer Proteinexpression besteht, wurde erstmalig in dieser Studie untersucht.

Zur Beantwortung der Frage, ob ein Screening nach *ROS1*-rearrangierten Lungenkarzinomen mittels Immunfärbungen möglich ist und ob in *ROS1*-exprimierenden, nicht-rearrangierten Tumoren auch Protein gebildet wird, erfolgte eine Analyse mit dem Antikörper D4D6 in einer Serie von 249 NSCLC, für die qRT-PCR Daten zum *ROS1*-Status vorlagen sowie in zwei weiteren rearrangierten Tumoren ohne qRT-PCR-Daten. Eine zytoplasmatische Immunfärbung wurde ausschließlich bei rearrangierten NSCLC und in einem Fall mit erhöhter *ROS1*-Genexpression beobachtet. Interessanterweise war ein Tumor IHC-negativ, aber FISH- und qRT-PCR-positiv. Auffällig war die besonders hohe Transkriptmenge in diesem Fall, die etwa das 20-fache der Expression der rearrangierten NSCLC betrug. Eine Proteinexpression konnte auch bei Wiederholung der Färbung mit höherer Konzentration des Antikörpers nicht detektiert werden. Eine mögliche Ursache für die hohe Genexpression könnte ein alternativer Fusionspartner mit hoher Transkriptionsrate darstellen. Dass dennoch kein Protein nachweisbar war, könnte verschiedene Ursachen besitzen: eine Genfusion mit einer Verschiebung des Leserahmens würde zu einem Abbruch der Translation führen. Die Proteinmenge kann außerdem durch eine Regulation der Translation oder Stabilität des Fusionsproteins beeinflusst werden. Es wäre zudem möglich, dass der Antikörper das Fusionsprotein nicht erkennen konnte, weil die Antigenregion durch eine Mutation verändert war. Letzteres konnte durch eine DNA-Sequenzanalyse des entsprechenden genomischen Bereichs (Exon 43) kürzlich ausgeschlossen werden (C. Kalla, unveröffentlichte Daten). Ob bei diesem Fall eine tumorigene Wirkung des *ROS1*-Fusionsgens gegeben ist und der Tumor mit Crizotinib therapierbar ist, bleibt zu klären.

In 29 untersuchten NSCLC mit einer *ROS1*-Expression ohne Rearrangierung des Gens wurde nur in einem Fall nachweislich Protein exprimiert. Damit wird in diesen Tumoren generell kein Protein oder nur in sehr geringer Menge unterhalb der Nachweisgrenze gebildet. Der fehlenden Nachweisbarkeit könnten eine zu geringe Menge der gebildeten Proteine, eine nicht vorhandene Expression, oder Veränderungen der Konformation zugrunde liegen. Zudem werden die potentiellen N-terminalen Proteine, die von Transkriptvarianten gebildet werden (Kap. 4.3.3), mit diesem Antikörper nicht erkannt. Interessanterweise fanden Sholl *et al.* (2013) ebenfalls einen nicht-rearrangierten Fall mit deutlicher Proteinexpression bei ansonsten ausschließlich rearrangierten, IHC-positiven sowie nicht-rearrangierten, IHC-negativen Fällen (Sholl *et al.* 2013). Dies spricht im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Studien in diesem IHC-positiven, nicht-rearrangierten Fall für eine spezifische Färbung.

Die Analyse der *ROS1*-Proteinexpression mit dem Antikörper D4D6 zeigte unter den in dieser Arbeit etablierten Bedingungen in Bezug auf die Detektion *ROS1*-rearrangierter

Tumore mit einem falsch-negativen sowie einem falsch-positiven Fall eine hohe Sensitivität (87,5 %) und Spezifität (99,6 %). Die IHC stellt damit eine sensitive Screeningmethode dar, die im Vergleich zur FISH-Analyse einfach und relativ kostengünstig durchzuführen und auszuwerten ist.

Der Antikörper erkennt den C-terminalen Bereich von ROS1 und damit sowohl ROS1-Fusionsproteine als auch ROS1-Gesamtprotein. Für den eindeutigen Nachweis von *ROS1*-Rearrangierungen sollten deshalb alle positiv gefärbten Fälle mit einer zweiten Methode (qRT-PCR, FISH) validiert werden. Es wäre außerdem von großem Interesse, das Therapieansprechen von Patienten mit Rearrangierung ohne nachweisbare Proteinexpression bzw. ohne Rearrangierung, aber mit Proteinexpression, zu untersuchen. Bis heute wurde noch nicht geklärt, von welchen Faktoren das Ansprechen der Patienten auf die Therapie abhängt.

4.3.3 Expression von *ROS1*-Transkriptvarianten

Bislang wurde nur eine Transkriptvariante des *ROS1*-Gens beschrieben. Darüber hinaus wurden mehrere Spleißvarianten postuliert, denen Exon 4 und/oder einzelne Exons im Bereich der Exons 28 – 44 fehlen (ncbi.nlm.nih.gov/gene/6098). In dieser Arbeit konnten durch die Sequenzanalyse von PCR-Produkten, die mit Hilfe unterschiedlich kombinierter Primer im 5'-Bereich erhalten wurden, fünf exprimierte Transkriptvarianten von *ROS1* in fetaler Lunge und NSCLC-Tumorproben identifiziert werden. Darunter waren vier bisher nicht beschriebene *ROS1*-Spleißvarianten, denen verschiedene Exons im 5'-Bereich fehlten: *ROS1*-(1): Deletion Exon 8 – 16, *ROS1*-(2): Deletion Exon 13 – 17, *ROS1*-(3): Deletion Exon 15 – 18 und *ROS1*-(4): Exon 18. Bei einer weiteren Transkriptvariante (*ROS1*-(5)) wurde eine Insertion von 3 bp am Übergang von Exon 17/18 identifiziert. Die Expression dieser Varianten beeinflusste die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse. Die Transkriptvarianten (1) – (3) enthalten keine Bindungsstellen für das 5'-Amplikon (1). Dementsprechend wurde die Transkriptvariante (1) in allen untersuchten Tumoren mit unbalancierter 3'/5'-A1-Expression nachgewiesen. Bei den Varianten (2), (4) und (5) ist die Amplifizierung des Amplikons 5'-A2 nicht möglich. Die Varianten (2) und (4) wurden entsprechend in Tumoren mit gering unbalancierter 3'/5'-A2-Expression nachgewiesen. Variante (5) wurde bei allen NSCLC gering exprimiert, sodass der Einfluss auf die qRT-PCR-Werte begrenzt war.

Die nachgewiesenen Transkriptvarianten erklären, weshalb bei einer quantitativen Messung des 3'- und 5'-Bereichs von *ROS1* Unterschiede in der Expressionshöhe des Gens auftraten. Da verschiedene Varianten identifiziert wurden, ist eine Festlegung auf einen 5'-Bereich schwierig. Es ist daher sinnvoll, die Messung des qRT-PCR-Assays mit beiden 5'-Amplikons durchzuführen, um die Auswirkung verschiedener Transkriptvarianten auf die Expressionsdaten zu reduzieren und aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Es ist

außerdem möglich, dass noch weitere Transkriptvarianten existieren, die mit den verwendeten Primerkombinationen nicht detektiert oder die in Tumorgewebe aufgrund der degradierten FFPE-RNA nicht amplifiziert werden konnten.

Vier der 5 Transkriptvarianten wurden in NSCLC und fetaler Lunge nachgewiesen, sodass es sich bei den in NSCLC exprimierten Transkripten um fetale Transkriptvarianten handelte. *ROS1*-(3) wurde ausschließlich in Tumorgewebe exprimiert. Eine Charakterisierung der vollständigen Transkripte anhand von RACE-Experimenten war aufgrund des FFPE-Materials nicht möglich, weshalb die Transkriptvarianten außerhalb der sequenzierten Bereiche nicht verifiziert werden konnten.

Während bei Variante (5) lediglich die Aminosäure Serin in das ROS1-Protein eingefügt wird, führen die detektierten Transkriptvarianten (1) – (4), eine Translation vorausgesetzt, aufgrund einer Verschiebung des Leserasters zu der Entstehung von verkürzten Proteinen, die ausschließlich einen Teil des extrazellulären Bereichs von ROS1 enthalten. Durch die Verwendung eines zweiten Startcodons könnte bei allen 4 Varianten ein alternatives ROS1-Protein entstehen, das einen kleinen Teil der extrazellulären Domäne, die Transmembrandomäne sowie die Kinasedomäne enthält. Wie es für andere alternativ oder aberrant gespleißte Transkriptvarianten bekannt ist, könnten diese Proteine aufgrund des verkürzten extrazellulären Bereichs und des Fehlens der Ligandenbindungsstelle konstitutiv aktiviert sein oder eine alternative Funktion besitzen und auf diese Weise tumorigen wirken. Beispielsweise wird die Aktivität der Rezeptor-Tyrosinkinase RON durch alternatives Spleißen reguliert: In kolorektalen Karzinomen und im Mammakarzinom erfolgt die Expression einer konstitutiv aktiven Variante, die aufgrund eines Transkripts ohne Exon 11 entsteht (Zhou et al. 2003; Ghigna et al. 2005). Eine tumorigene Wirkung von Spleißvarianten, die aufgrund fehlender oder zusätzlicher Exons entstehen, ist bei vielen Tumorentitäten bekannt, wie beispielsweise *EHNA* in Mammakarzinomen, *KLF6* in Prostatakarzinomen, *HDMX* in Sarkomen, *Fam3B* in kolorektalen Karzinomen sowie *MUC1* in Ösophaguskarzinomen (Bartel et al. 2005; Di Modugno et al. 2012; Li et al. 2013; Roussos et al. 2011; DiFeo et al. 2009; Kahkhaie et al. 2014)

Bei einem der 7 untersuchten Tumore, bei denen die *ROS1*-Transkriptvarianten (1) und (5) exprimiert waren, konnte eine ROS1-Proteinexpression nachgewiesen werden. Dieser nicht-rearrangierte Fall zeigte trotz relativ geringer *ROS1*-Expression (#91 3' 0,54; 3'/5'-A1 2,4; 3'/5'-A2 1,1) eine deutliche zytoplasmatische Proteinexpression, die potentiell zur Bildung eines ROS1-Proteins mit Serin-Insertion in der extrazellulären Domäne sowie von verkürzten N-terminalen bzw. C-terminalen Proteinen führt. Ob die Immunfärbung das bekannte ROS1-Protein oder die neu identifizierten Varianten nachweist, kann nicht unterschieden werden. Der Antikörper bindet am C-Terminus von ROS1, sodass verkürzte N-terminale Varianten nicht nachgewiesen werden können. Interessanterweise zeigte die Färbung eine

zytoplasmatische Lokalisation, obwohl die Rezeptortyrosinkinase in nicht-rearrangiertem Zustand membrangebunden ist. Aufgrund des FFPE-Materials ist eine weitere Charakterisierung des nachgewiesenen ROS1-Proteins, wie z. B. mit Hilfe von Western Blots, nicht möglich.

In dieser Studie wurde bei 9 % der NSCLC eine deutliche *ROS1*-Expression festgestellt; in Publikationen wird eine erhöhte Expression in ca. 20 % beschrieben (Bhattacharjee et al. 2001; Garber et al. 2001). In 1 % der NSCLC wurde, als Folge einer *ROS1*-Rearrangierung, ausschließlich die Kinasedomäne exprimiert. Diese Tumore sind mit Crizotinib therapierbar und können anhand der unbalancierten Expression sicher diagnostiziert werden. Bei 8 % der Tumore wurde eine hochregulierte Expression ohne Rearrangierung beobachtet, in 25 % dieser Fälle waren Transkriptvarianten von *ROS1* exprimiert. Nur bei einem dieser Tumore wurde eine Proteinexpression beobachtet. Allerdings ist auch mit sehr geringer Proteinexpression, die wie bei EGFR-mutierten NSCLC unterhalb der Nachweisgrenze liegen kann, eine tumorigene Wirkung vorstellbar (Hirsch et al. 2013).

Um die Frage einer potentiellen Aktivierung der Kinasedomäne durch aktivierende Mutationen zu beantworten, wurden der nicht-rearrangierte Fall #91, der eine Proteinexpression aufwies, sowie 11 weitere nicht-rearrangierte NSCLC mit *ROS1*-Expression einer Mutationsanalyse unterzogen. Es konnte jedoch in keinem der analysierten NSCLC eine Mutation identifiziert werden. Eine konstitutive Aktivierung der Kinasedomäne von ROS1 durch Mutationen tritt daher wahrscheinlich nicht auf. Andere Nachweismethoden zur Detektion von aktiviertem ROS1 standen nicht zur Verfügung. Der Nachweis von autophosphoryliertem ROS1 mittels IHC war nicht möglich, da kein spezifischer Antikörper verfügbar war (der keine Kreuzreaktionen mit anderen aktivierten Tyrosinkinasen eingeht). Ein Nachweis des Proteins sowie einer Protein-Phosphorylierung durch Western-Blot-Analysen ist sinnvoll. Da jedoch kryokonserviertes Tumormaterial für diese Analysen erforderlich ist, war eine weitere Untersuchung nicht möglich. Inwiefern eine *ROS1*-Expression insbesondere von fetalen Transkriptvarianten in der Pathogenese von NSCLC beteiligt ist und ob diese Tumore durch Inaktivierung von ROS1 potentiell therapierbar sind, muss in weiteren Studien untersucht werden.

4.4 Charakterisierung von *LTK* in NSCLC

LTK ist aufgrund der großen Homologie zu *ALK* ein interessanter Kandidat für eine zielgerichtete Therapie von NSCLC bei einer Rearrangierung oder aberranten Aktivierung des Gens. In dieser Arbeit wurde erstmalig die Genexpression von *LTK* systematisch quantitativ und qualitativ in einer großen Serie von NSCLC untersucht, sowie die Existenz von Genrearrangierungen in Lungenkarzinomen geprüft. Um diese Fragestellungen zu untersuchen wurden ein qRT-PCR- sowie ein FISH-Assay etabliert.

Die Charakterisierung der *LTK*-Expression erfolgte an einer Serie von 542 NSCLC und 9 normalen Lungen. Die Expression von *LTK* war in etwa 11 % der NSCLC im Vergleich zu normalem Lungengewebe signifikant erhöht, wobei in der Mehrzahl dieser Fälle (9 %) eine deutlich unbalancierte Expression der 3'-Region vorlag. Es ist jedoch zu beachten, dass die *LTK*-Expression in NSCLC im Vergleich zur Genexpression von *ROS1* generell relativ gering war, da nur 3 Fälle (#143, #60, #3) eine mit *ROS1* in *ROS1*-rearrangierten NSCLC vergleichbare Expression besaßen. Da NSCLC #3 *ALK*-rearrangiert war, wurde das in diesem Fall amplifizierte 3'-qRT-PCR-Produkt durch eine Sequenzierung verifiziert, um eine Amplifikation von *ALK* auszuschließen.

Für den Nachweis einer genomischen Rearrangierung von *LTK*, die eine Ursache für die unbalancierte 3'-Expression darstellen könnte, wurde eine break-apart FISH etabliert und 71 NSCLC, einschließlich 37 der 43 Fälle mit erhöhter und deutlich unbalancierter *LTK*-Expression, untersucht. Da in keinem der Fälle eine Rearrangierung anhand von break-apart- oder einzelnen Signalen nachgewiesen wurde, scheinen *LTK*-Rearrangierungen in NSCLC keine Rolle zu spielen.

Im Anschluss wurden Untersuchungen auf potentielle Transkriptvarianten im 5'-Bereich von *LTK* durchgeführt, da auch diese zu einer unbalancierten Expression führen und zudem eine tumorigene Wirkung besitzen können. Im Gegensatz zu *ROS1* waren für *LTK* drei Transkriptvarianten bekannt sowie drei weitere postuliert worden, die Unterschiede im Bereich der Exons 7 und 9 – 13 aufweisen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4058>). Da die Exons 3 und 4 in allen bekannten Varianten enthalten sind, wurde dieser Bereich für das 5'-Amplikon gewählt (Exon 3/4). Bei der Sequenzanalyse von RT-PCR-Produkten, die mit Hilfe unterschiedlicher Primerkombinationen im 5'-Bereich generiert wurden, konnten in der Zelllinie RH30, die eine leichte unbalancierte Expression aufwies, in fetaler Lunge sowie in zwei NSCLC-Tumorproben mit unbalancierter Expression 2 neue *LTK*-Varianten identifiziert werden, denen mehrere Exons im 5'-Bereich fehlten. In der Variante *LTK*-(1), die in fetaler Lunge und den beiden NSCLC detektiert wurde, fehlten die Exons 2 – 7, der Variante *LTK*-(2), die ausschließlich in der Rhabdomyosarkom-Zelllinie RH30 nachgewiesen wurde, fehlten die Exons 4 – 7. Bei beiden Transkriptvarianten können die 5'-Primer nicht binden, mit der Folge einer unbalanciert detektierten Expression auch ohne Rearrangierung. Eine systematische RT-PCR-Analyse der NSCLC mit unbalancierter Expression war aufgrund des limitierten Materials nicht möglich. Anhand der vorliegenden Daten kann allerdings darauf geschlossen werden, dass die unbalancierte Amplifizierung von *LTK* in NSCLC nicht generell durch eine Genrearrangierung, sondern durch eine Expression von bislang nicht bekannten *LTK*-Transkriptvarianten, insbesondere die in fetaler Lunge und Tumoren nachgewiesene Variante *LTK*-(1), verursacht wird. Die Durchführung einer RACE zur

Charakterisierung der vollständigen Transkripte in Tumorproben war aufgrund des ausschliesslich vorliegenden FFPE-Materials nicht möglich.

Interessanterweise ist die Variante *LTK*-(1) mit dem 5'-Bereich eines cDNA-Klons identisch, der aus Kolongewebe stammt. Dem klonierten Transkript fehlen ebenfalls die Exons 2 – 7 und es enthält ein alternativ gespeißtes, verlängertes Exon 10, das in zwei postulierten *LTK*-Varianten enthalten ist (s. Abb.32).

Diese Daten verdeutlichen, dass Transkriptvarianten von *LTK* mit einer veränderten 5'-Region in verschiedenen Tumorentitäten (NSCLC, Rhabdomyosarkom) und Normalgewebe (Lunge, Kolon) exprimiert werden. In normaler Lunge wurde eine schwache, zumeist unbalancierte Expression gemessen, sodass vermutlich auch in diesen Zellen *LTK*-Varianten gebildet werden. Eine qualitative Analyse dieser Transkripte war aufgrund der geringen Expression nicht möglich. Prinzipiell scheint die Bildung von *LTK*-Transkripten mit verkürztem 5'-Bereich nicht Tumorzell-spezifisch zu sein, aber die Überexpression dieser Transkripte wird in einer Subgruppe von NSCLC gefunden.

Ob die *LTK*-Überexpression biologisch relevante Auswirkungen hat, oder ab welcher Transkriptmenge eine messbare Translation stattfindet, ist nicht bekannt. Eine Veröffentlichung, bei der ein Zusammenhang zwischen einer *LTK*-Überexpression und der Metastasierung bei NSCLC nachgewiesen wurde, lässt jedoch Rückschlüsse auf eine tumorigene Wirkung zu (Müller-Tidow et al. 2005). Müller-Tidow *et al.* beobachteten eine ektopische Überexpression in 20 % der 70 analysierten NSCLC, ein Wert der mit der in dieser Arbeit gefundenen signifikanten Überexpression von *LTK* im Vergleich zu normaler Lunge in 11 % der NSCLC vergleichbar ist. In der genannten Studie wurde ausschließlich die Expression der 3'-Region gemessen, dementsprechend wurde die Expression aller Isoformen detektiert. Anhand der Daten dieser Studie, bei der eine unbalancierte Expression in 82 % der Fälle mit *LTK*-Überexpression vorlag, die auf die Expression 5'-verkürzter Transkriptvarianten hinweist, kann jedoch ein Zusammenhang zwischen der Expression von *LTK*-Transkriptvarianten und der Metastasierung von NSCLC vermutet werden.

Die Translation der Variante *LTK*-(1) entsprechend dem cDNA-Klon BC143903 würde zu einem Protein führen, dem der Großteil des extrazellulären Bereichs fehlt, sowie durch die Insertion von 16 Aminosäuren und einer Aminosäuresubstitution (L448ins16aa, V449M) eine veränderte Transmembrandomäne aufweist. Die Folgen könnten eine veränderte Lokalisation und eine durch den Verlust der Ligandenbindungsregion im extrazellulären Bereich fehlende Regulierung der Kinase darstellen. Somit ist eine aberrante oder konstitutive Aktivierung der *LTK*-Kinase möglich, die Auswirkungen auf die Pathogenese von Lungenkarzinomen haben kann, wie es für Transkriptvarianten anderer Gene, wie z. B. RON, MENA und APC, in malignen Tumoren beschrieben wurde (Bonomi et al. 2013; Biamonti et al. 2014). Die Translation der Variante *LTK*-(2) würde aufgrund einer

Verschiebung des Leserahmens zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation führen. Das stark verkürzte, aus 16 Aminosäuren bestehende Protein kann durch Interaktion mit anderen Isoformen deren Funktion beeinflussen. Ein derartiger Effekt wurde für das Gen *Nucleolin* nachgewiesen (Hsu et al. 2015). Durch ein weiteres Startcodon ist bei LTK-(2) die Bildung eines weiteren Proteins möglich, welches nur die Transmembran- und die Kinasedomäne, jedoch keinen extrazellulären Bereich enthält. Dieses Protein könnte als Kinase aktiv sein und ebenfalls tumorigen wirken.

Es wurden noch keine Arbeiten publiziert, in denen ein LTK-Antikörper erfolgreich getestet wurde. In einem Vorversuch mit einem LTK-Antikörper (Acris Antibodies) wurden unspezifische Färbungen in NSCLC, die keine Genexpression zeigten, gemessen. Aufgrund des Fehlens eines geeigneten Antikörpers, war es im Rahmen dieser Studie nicht möglich, das LTK-Protein nachzuweisen und die Translation der Transkriptvarianten in NSCLC zu verifizieren.

Für eine bessere Charakterisierung von LTK müssten weitere Antikörper getestet werden, die den C-terminalen Bereich von LTK erkennen und damit alle Isoformen nachweisen können. Außerdem könnte mit einem zweiten Antikörper, der den N-terminalen Bereich erkennt, festgestellt werden, ob die langen LTK-Proteine (Isoform 1 – 3) mit vollständiger Transmembrandomäne, oder ob verkürzte Proteine von LTK-(1) exprimiert werden. Es wäre daher von Vorteil, eine Charakterisierung von LTK mit Western Blot-Analysen durchzuführen. Im Rahmen dieser Studie waren diesbezügliche weiterführende Analysen nicht möglich, da von den entsprechenden Fällen kein kryokonserviertes Gewebe vorhanden war.

Durch die qRT-PCR-basierte Analyse von *LTK* konnte eine Subgruppe von NSCLC mit *LTK*-Überexpression identifiziert werden. Die hochregulierte Expression von *LTK* ist vermutlich in der Pathogenese von NSCLC beteiligt. Eine Therapie dieser Tumore mit einem LTK-Inhibitor wäre damit theoretisch möglich. Durch eine Einführung von *ALK*-homologen Mutationen konnte in Zellkulturexperimenten eine tumorigene Wirkung von *LTK* erzeugt und das Zellwachstum durch eine Behandlung mit Crizotinib gehemmt werden (Roll und Reuther, 2014).

Ob *LTK*-überexprimierende Tumore tatsächlich therapierbar sind, muss in weiterführenden Untersuchungen mit zellbiologischen Experimenten an *LTK*-überexprimierenden Zelllinien und Xenograft-Experimenten geklärt werden.

4.5 Empfehlung für die *ALK*- und *ROS1*-Diagnostik

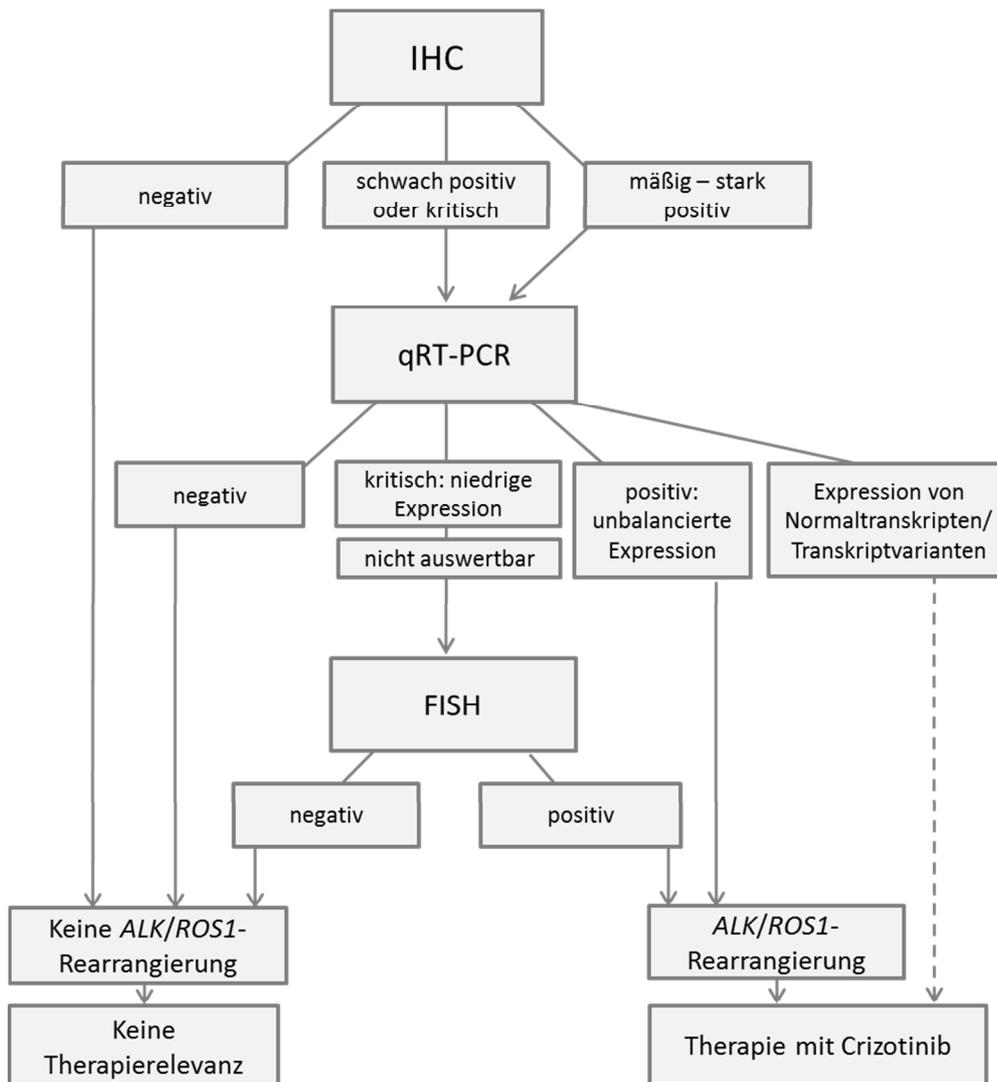


Abbildung 33: Vorgehensweise zum Screening für *ALK*- und *ROS1*-rearrangierte NSCLC

Die IHC eignet sich als sensitive Screeningmethode für die Identifizierung *ALK*- und *ROS1*-rearrangierter NSCLC. Bis ein Therapieansprechen von Tumoren mit einer *ALK*- oder *ROS1*-Expression ohne Genrearrangierung untersucht ist, sollte bei allen IHC-positiven und kritischen Fällen eine qRT-PCR-Analyse durchgeführt werden, um rearrangierte Tumore eindeutig zu identifizieren. Schwach positive und nicht auswertbare Fälle sollten weiterhin mit der break-apart FISH untersucht werden. Wenn die IHC-, FISH- und qRT-PCR-Analysen negativ sind, besteht keine Therapierelevanz. Für NSCLC mit einer Expression von *ALK* und *ROS1* ohne Genrearrangierung muss die Therapierelevanz noch geklärt werden.

Die prinzipielle Möglichkeit einer zielgerichteten Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren stellt die Diagnostik zunehmend vor die Herausforderung, an limitiertem Biopsiematerial immer mehr Untersuchungen durchzuführen um Patienten, die von einer Therapie profitieren, zu identifizieren. Deshalb wurden in dieser Dissertation neue qRT-PCR-basierte Assays zum Nachweis von *ALK*- und *ROS1*-Rearrangierungen entwickelt, sowie neu verfügbare Antikörper getestet und die verschiedene Nachweismethoden, sowie deren Vor- und Nachteile verglichen. Infolgedessen kann folgender Algorithmus für ein Screening von *ALK*- und *ROS1*-rearrangierten NSCLC empfohlen werden (Abb. 33): Aufgrund der hohen

Sensitivität und Spezifität der seit kurzem verfügbaren ALK- (D5F3, 1A4 D5F3/Ventana) und ROS1-Antikörper (D4D6) sowie die einfache Einbindung in die Routinediagnostik der Pathologie wird ein Screening nach *ALK*- und *ROS1*-rearrangierten NSCLC mittels IHC empfohlen. Für ALK- und ROS1-negative NSCLC, die anhand der ausbleibenden Immunreaktion mit den Antikörpern definiert sind, ergibt sich keine Therapierelevanz. Die ALK- und ROS1-positiven NSCLC sollten bis auf Weiteres zusätzlich mit dem qRT-PCR-Assay untersucht werden, da in dieser Arbeit neue Subgruppen von NSCLC mit einer Genexpression von *ALK* und *ROS1* sowie eine Expression von *ROS1*-Transkriptvarianten nachgewiesen wurde, und ein Therapieansprechen dieser Subgruppen noch nicht untersucht ist. Durch die qRT-PCR-Analyse können die nicht-rearrangierten Tumore mit einer *ALK*- und *ROS1*-Expression von rearrangierten Tumoren unterschieden werden. Tumore, die bei der qRT-PCR-Analyse nicht eindeutig auswertbar sind, sollten zusätzlich einer FISH-Analyse unterzogen werden. Mit diesem Vorgehen können NSCLC zuverlässig sowie kostengünstig, material- und zeitsparend auf *ALK*- und *ROS1*-Rearrangierungen untersucht werden.

4.6 Ausblick

Mit den in dieser Arbeit etablierten qRT-PCR-Assays und den mittlerweile auch in anderen Studien erfolgreich getesteten IHC-Systemen existieren verschiedene Methoden zum Nachweis von *ALK*- und *ROS1*-Rearrangierungen in Tumoren, die als Alternative zu FISH-Untersuchungen in der Routine-Diagnostik verwendet werden können. Eine Aussage darüber, welche Methode den bestmöglichen diagnostischen Test darstellt, kann letztendlich nur durch eine umfassende molekulare Charakterisierung der Tumore und einen Vergleich mit dem Therapieansprechen von Patienten gewonnen werden. Ein weiteres wichtiges Ergebnis dieser Arbeit stellt die Identifizierung von NSCLC-Subgruppen dar, die durch die Expression von *ALK*-, *ROS1*- und *LTK*-Transkripten und Transkriptvarianten charakterisiert sind. Inwiefern die tumorspezifische Expression dieser Kinasen die Pathogenese von NSCLC beeinflusst und die entsprechenden Tumore mit spezifischen Inhibitoren therapierbar sind, sollte in weiterführenden Studien geklärt werden.

Im Einzelnen sollten folgende Aspekte untersucht werden: in Bezug auf *ALK*-exprimierende NSCLC-Tumore ohne Rearrangierung sollte das Therapieansprechen auf Crizotinib geklärt werden, da diese Subgruppe von Patienten möglicherweise von der Behandlung profitiert. Die Identifizierung und Abgrenzung dieser Fälle ist nur durch eine qRT-PCR-Analyse möglich, sodass für eine weitere Charakterisierung von *ALK* in NSCLC ein Screening mittels qRT-PCR-Assays und weiterführende Untersuchungen relevanter Fälle mittels FISH und IHC erfolgen sollten.

Des Weiteren sollten im Hinblick auf aktivierende Mutationen weitere Sequenzanalysen von *ALK* bei Gesamttranskript-exprimierenden Tumoren durchgeführt werden, die auch bei nicht

nachweisbarer oder sehr schwacher Proteinexpression zu einer konstitutiven Aktivierung von ALK führen könnten. Außerdem wäre eine Untersuchung der neu identifizierten Mutation im zentralen Bereich der Kinasedomäne (3659C>A) im Hinblick auf die Tumorigenität und das Ansprechen auf eine Behandlung mit ALK-Inhibitoren von Interesse. Mittels *in vitro*-Mutagenese und der Überexpression in 3T3- oder rat1-Zellen könnte eine transformierende Wirkung nachgewiesen werden. Durch eine subkutane Injektion der transfizierten Zellen in Nacktmäusen könnten entsprechende Xenograft-Modelle hergestellt werden, mit denen eine Tumorentwicklung und ein Ansprechen auf Inhibitoren untersucht werden kann.

Für die Wahl der optimalen Methode zur Diagnostik von *ROS1*-Rearrangierungen sind die Korrelation der in dieser Arbeit gewonnenen molekularen Daten mit dem Therapieansprechen sowie die umfassende Analyse von *ROS1* mittels IHC, qRT-PCR und FISH an einer weiteren NSCLC-Serie in Bezug auf ein Therapieansprechen von großer Bedeutung. In den bekannten Studien zur molekularen *ROS1*-Diagnostik wurden aufgrund der geringen Frequenz der Translokation in NSCLC nur sehr wenige *ROS1*-rearrangierte Fälle charakterisiert.

Bei *ROS1*-Protein-exprimierenden Tumoren ohne *ROS1*-Rearrangierung sollte geklärt werden, inwiefern diese Tumore therapierbar sind, sodass bei Therapieansprechen die IHC-Analyse als prädiktive Methode prinzipiell ausreichen würde. Mittels zellbiologischen Experimenten an *ROS1*-überexprimierenden NSCLC-Zelllinien könnte die Hemmbarkeit mit *ROS1*-Inhibitoren untersucht werden. Die IHC-Analyse für den Nachweis *ROS1*-rearrangierter Tumore sollte zudem aufgrund möglicher unspezifischer Färbungen, für die Literaturdaten Hinweise geben, weiter verifiziert werden.

Außerdem sollten die Transkriptvarianten von *ROS1* weiter charakterisiert werden, da eine Expression trunkierter Proteine mit pathogener Wirkung möglich ist. Weiterführende Analysen sollten an kryokonserviertem Gewebe erfolgen, um vollständige Transkriptvarianten zum Beispiel mittels RACE oder NGS zu identifizieren. Durch Western Blots oder MALDI-TOF-Analysen könnten trunkierte Proteine nachgewiesen werden. Die Wirkung der Transkriptvarianten und der möglicherweise aberrant aktivierten Translationsprodukte könnten in Zellkultur- und Xenograft-Experimenten, wie bei *ALK*-mutierten Transkripten beschrieben, weiter untersucht werden.

Hinsichtlich einer möglichen onkogenen Wirkung von *LTK* in NSCLC wären eine weitere Charakterisierung von Transkriptvarianten in Tumorzellen sowie die Analyse der Proteinexpression – im Falle von neu verfügbaren Antikörpern – von Interesse. Eine potentielle Tumorigenität und Therapierbarkeit von *LTK* und der nachgewiesenen Transkriptvarianten sollten ebenfalls mit Hilfe von Zellkultur- und Xenograft-Experimenten abgeklärt werden.

V. Literaturverzeichnis

- Abel, Haley J., Hussam Al-Kateb, Catherine E. Cottrell, Andrew J. Bredemeyer, Colin C. Pritchard, Allie H. Grossmann, Michelle L. Wallander, John D. Pfeifer, Christina M. Lockwood, und Eric J. Duncavage. 2014. „Detection of Gene Rearrangements in Targeted Clinical next-Generation Sequencing“. *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD* 16 (4): 405–17. doi:10.1016/j.jmoldx.2014.03.006.
- Acquaviva, Jaime, Ricky Wong, und Al Charest. 2009. „The Multifaceted Roles of the Receptor Tyrosine Kinase ROS in Development and Cancer“. *Biochimica et Biophysica Acta* 1795 (1): 37–52. doi:10.1016/j.bbcan.2008.07.006.
- Ambrogio, Chiara, Claudia Voena, Andrea D Manazza, Roberto Piva, Ludovica Riera, Laura Barberis, Carlotta Costa, et al. 2005. „p130Cas Mediates the Transforming Properties of the Anaplastic Lymphoma Kinase“. *Blood* 106 (12): 3907–16. doi:10.1182/blood-2005-03-1204.
- Amin, Hesham M, und Raymond Lai. 2007. „Pathobiology of ALK+ Anaplastic Large-Cell Lymphoma“. *Blood* 110 (7): 2259–67. doi:10.1182/blood-2007-04-060715.
- Arai, Yasuhito, Yasushi Totoki, Hiroyuki Takahashi, Hiromi Nakamura, Natsuko Hama, Takashi Kohno, Koji Tsuta, et al. 2013. „Mouse Model for ROS1-Rearranged Lung Cancer“. *PLoS One* 8 (2): e56010. doi:10.1371/journal.pone.0056010.
- Armstrong, Florence, Marie-Michèle Duplantier, Pascal Trempat, Corinne Hieblot, Laurence Lamant, Estelle Espinos, Claire Racaud-Sultan, et al. 2004. „Differential Effects of X-ALK Fusion Proteins on Proliferation, Transformation, and Invasion Properties of NIH3T3 Cells“. *Oncogene* 23 (36): 6071–82. doi:10.1038/sj.onc.1207813.
- Asahina, H, K Yamazaki, I Kinoshita, N Sukoh, M Harada, H Yokouchi, T Ishida, et al. 2006. „A Phase II Trial of Gefitinib as First-Line Therapy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer with Epidermal Growth Factor Receptor Mutations“. *British Journal of Cancer* 95 (8): 998–1004. doi:10.1038/sj.bjc.6603393.
- Awad, Mark M, Jeffrey A Engelman, und Alice T Shaw. 2013. „Acquired Resistance to Crizotinib from a Mutation in CD74-ROS1“. *The New England Journal of Medicine* 369 (12): 1173. doi:10.1056/NEJMc1309091.
- Azarova, Anna M, Gargi Gautam, und Rani E George. 2011. „Emerging Importance of ALK in Neuroblastoma“. *Seminars in Cancer Biology* 21 (4): 267–75. doi:10.1016/j.semcan.2011.09.005.
- Azzoli, Christopher G, Sarah Temin, Timothy Aliff, Sherman Baker Jr, Julie Brahmer, David H Johnson, Janessa L Laskin, et al., American Society of Clinical Oncology. 2011. „2011 Focused Update of 2009 American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update on Chemotherapy for Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer“. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (28): 3825–31. doi:10.1200/JCO.2010.34.2774.
- Bai, R Y, T Ouyang, C Miething, S W Morris, C Peschel, und J Duyster. 2000. „Nucleophosmin-Anaplastic Lymphoma Kinase Associated with Anaplastic Large-Cell Lymphoma Activates the Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt Antiapoptotic Signaling Pathway“. *Blood* 96 (13): 4319–27.
- Bartel, Frank, Jödis Schulz, Anja Böhnke, Karen Blümke, Matthias Kappler, Matthias Bache, Hannelore Schmidt, Peter Würfl, Helge Taubert, und Steffen Hauptmann. 2005. „Significance of HDMX-S (or MDM4) mRNA Splice Variant Overexpression and HDMX Gene Amplification on Primary Soft Tissue Sarcoma Prognosis“. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 117 (3): 469–75. doi:10.1002/ijc.21206.
- Beasley, Mary Beth, Elisabeth Brambilla, und William D. Travis. 2005. „The 2004 World Health Organization Classification of Lung Tumors“. *Seminars in Roentgenology* 40 (2): 90–97.
- Ben-Neriah, Y, und A R Bauskin. 1988. „Leukocytes Express a Novel Gene Encoding a Putative Transmembrane Protein-Kinase Devoid of an Extracellular Domain“. *Nature* 333 (6174): 672–76. doi:10.1038/333672a0.

- Bergethon, Kristin, Alice T Shaw, Sai-Hong Ignatius Ou, Ryohei Katayama, Christine M Lovly, Nerina T McDonald, Pierre P Massion, et al. 2012. „ROS1 Rearrangements Define a Unique Molecular Class of Lung Cancers“. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 30 (8): 863–70. doi:10.1200/JCO.2011.35.6345.
- Bhattacharjee, A, W G Richards, J Staunton, C Li, S Monti, P Vasa, C Ladd, et al. 2001. „Classification of Human Lung Carcinomas by mRNA Expression Profiling Reveals Distinct Adenocarcinoma Subclasses“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (24): 13790–95. doi:10.1073/pnas.191502998.
- Biamonti, Giuseppe, Morena Catillo, Daniela Pignataro, Alessandra Montecucco, und Claudia Ghigna. 2014. „The Alternative Splicing Side of Cancer“. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 32C (August): 30–36. doi:10.1016/j.semcdb.2014.03.016.
- Bilsland, James G, Alan Wheeldon, Andrew Mead, Petr Znamenskiy, Sarah Almond, Kerry A Waters, Matthew Thakur, et al. 2008. „Behavioral and Neurochemical Alterations in Mice Deficient in Anaplastic Lymphoma Kinase Suggest Therapeutic Potential for Psychiatric Indications“. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 33 (3): 685–700. doi:10.1038/sj.npp.1301446.
- Birch, Ashley H, Suzanna L Arcand, Kathleen K Oros, Kurosh Rahimi, A Kevin Watters, Diane Provencher, Celia M Greenwood, Anne-Marie Mes-Masson, und Patricia N Tonin. 2011. „Chromosome 3 Anomalies Investigated by Genome Wide SNP Analysis of Benign, Low Malignant Potential and Low Grade Ovarian Serous Tumours“. *PLoS One* 6 (12): e28250. doi:10.1371/journal.pone.0028250.
- Birchmeier, C, S Sharma, und M Wigler. 1987. „Expression and Rearrangement of the ROS1 Gene in Human Glioblastoma Cells“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (24): 9270–74.
- Bischof, D, K Pulford, D Y Mason, und S W Morris. 1997. „Role of the Nucleophosmin (NPM) Portion of the Non-Hodgkin’s Lymphoma-Associated NPM-Anaplastic Lymphoma Kinase Fusion Protein in Oncogenesis“. *Molecular and Cellular Biology* 17 (4): 2312–25.
- Boland, Jennifer M., Jason A. Wampfler, Jin S. Jang, Xiaoke Wang, Michele R. Erickson-Johnson, Andre M. Oliveira, Ping Yang, Jin Jen, und Eunhee S. Yi. 2014. „Pulmonary Adenocarcinoma with Signet Ring Cell Features: A Comprehensive Study from 3 Distinct Patient Cohorts“. *The American Journal of Surgical Pathology* 38 (12): 1681–88. doi:10.1097/PAS.0000000000000280.
- Bonomi, Serena, Stefania Gallo, Morena Catillo, Daniela Pignataro, Giuseppe Biamonti, und Claudia Ghigna. 2013. „Oncogenic Alternative Splicing Switches: Role in Cancer Progression and Prospects for Therapy“. *International Journal of Cell Biology* 2013: 962038. doi:10.1155/2013/962038.
- Bos, M, M Gardizi, H U Schildhaus, L C Heukamp, T Geist, B Kaminsky, T Zander, et al. 2013. „Complete Metabolic Response in a Patient with Repeatedly Relapsed Non-Small Cell Lung Cancer Harboring ROS1 Gene Rearrangement after Treatment with Crizotinib“. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 81 (1): 142–43. doi:10.1016/j.lungcan.2013.02.018.
- Brambilla, E., W. D. Travis, T. V. Colby, B. Corrin, und Y. Shimosato. 2001. „The New World Health Organization Classification of Lung Tumours“. *The European Respiratory Journal* 18 (6): 1059–68.
- Bray, Freddie Ian, und Elisabete Weiderpass. 2010. „Lung Cancer Mortality Trends in 36 European Countries: Secular Trends and Birth Cohort Patterns by Sex and Region 1970-2007“. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 126 (6): 1454–66. doi:10.1002/ijc.24855.
- Bresler, Scott C, Andrew C Wood, Elizabeth A Haglund, Joshua Courtright, Lili T Belcastro, Jefferson S Plegaria, Kristina Cole, et al. 2011. „Differential Inhibitor Sensitivity of Anaplastic Lymphoma Kinase Variants Found in Neuroblastoma“. *Science Translational Medicine* 3 (108): 108ra114. doi:10.1126/scitranslmed.3002950.

- Cabillic, Florian, Audrey Gros, Frédéric Dugay, Hugues Begueret, Laura Mesturoux, Dan Cristian Chiforeanu, Leila Dufrenot, et al. 2014. „Parallel FISH and Immunohistochemical Studies of ALK Status in 3244 Non-Small-Cell Lung Cancers Reveal Major Discordances“. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 9 (3): 295–306. doi:10.1097/JTO.000000000000072.
- Camidge, D Ross, Yung-Jue Bang, Eunice L Kwak, A John Iafrate, Marileila Varella-Garcia, Stephen B Fox, Gregory J Riely, et al. 2012. „Activity and Safety of Crizotinib in Patients with ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer: Updated Results from a Phase 1 Study“. *The Lancet Oncology* 13 (10): 1011–19. doi:10.1016/S1470-2045(12)70344-3.
- Camidge, D Ross, Fred R Hirsch, Marileila Varella-Garcia, und Wilbur A Franklin. 2011. „Finding ALK-Positive Lung Cancer: What Are We Really Looking For?“. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 6 (3): 411–13. doi:10.1097/JTO.0b013e31820cf068.
- Camidge, D Ross, Scott A Kono, Antonella Flacco, Aik-Choon Tan, Robert C Doebele, Qing Zhou, Lucio Crino, Wilbur A Franklin, und Marileila Varella-Garcia. 2010. „Optimizing the Detection of Lung Cancer Patients Harboring Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) Gene Rearrangements Potentially Suitable for ALK Inhibitor Treatment“. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 16 (22): 5581–90. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0851.
- Castiglione, Francesca, Duccio Rossi Degl’Innocenti, Antonio Taddei, Francesca Garbini, Anna Maria Buccoliero, Maria Rosaria Raspollini, Monica Pepi, et al. 2007. „Real-Time PCR Analysis of RNA Extracted from Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues: Effects of the Fixation on Outcome Reliability“. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology: AIMM / Official Publication of the Society for Applied Immunohistochemistry* 15 (3): 338–42. doi:10.1097/01.pai.0000213119.81343.7b.
- Chand, Damini, Yasuo Yamazaki, Kristina Ruuth, Christina Schönherr, Tommy Martinsson, Per Kogner, Edward F Attiyeh, et al. 2013. „Cell Culture and Drosophila Model Systems Define Three Classes of Anaplastic Lymphoma Kinase Mutations in Neuroblastoma“. *Disease Models & Mechanisms* 6 (2): 373–82. doi:10.1242/dmm.010348.
- Charest, Al, Erik W Wilker, Margaret E McLaughlin, Keara Lane, Ram Gowda, Shanie Coven, Kevin McMahon, et al. 2006. „ROS Fusion Tyrosine Kinase Activates a SH2 Domain-Containing Phosphatase-2/phosphatidylinositol 3-Kinase/mammalian Target of Rapamycin Signaling Axis to Form Glioblastoma in Mice“. *Cancer Research* 66 (15): 7473–81. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1193.
- Cha, Yoon Jin, Jae Seok Lee, Hye Ryun Kim, Sun Min Lim, Byoung Chul Cho, Chang Young Lee, und Hyo Sup Shim. 2014. „Screening of ROS1 Rearrangements in Lung Adenocarcinoma by Immunohistochemistry and Comparison with ALK Rearrangements“. *PloS One* 9 (7): e103333. doi:10.1371/journal.pone.0103333.
- Chen, J, C S Zong, und L H Wang. 1994. „Tissue and Epithelial Cell-Specific Expression of Chicken Proto-Oncogene c-Ros in Several Organs Suggests That It May Play Roles in Their Development and Mature Functions“. *Oncogene* 9 (3): 773–80.
- Chen, Yen-Fu, Min-Shu Hsieh, Shang-Gin Wu, Yih-Leong Chang, Jin-Yuan Shih, Yi-Nan Liu, Meng-Feng Tsai, et al. 2014. „Clinical and the Prognostic Characteristics of Lung Adenocarcinoma Patients with ROS1 Fusion in Comparison with Other Driver Mutations in East Asian Populations“. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 9 (8): 1171–79. doi:10.1097/JTO.0000000000000232.
- Chen, Yuyan, Junko Takita, Young Lim Choi, Motohiro Kato, Miki Ohira, Masashi Sanada, Lili Wang, et al. 2008. „Oncogenic Mutations of ALK Kinase in Neuroblastoma“. *Nature* 455 (7215): 971–74. doi:10.1038/nature07399.
- Chiari, Rita, Fiamma Buttitta, Daniela Iacono, Chiara Bennati, Giulio Metro, Alessia Di Lorito, Manuela Iezzi, et al. 2014. „Dramatic Response to Crizotinib in ROS1 Fluorescent In

- Situ Hybridization- and Immunohistochemistry-Positive Lung Adenocarcinoma: A Case Series". *Clinical Lung Cancer*, Juni. doi:10.1016/j.clcc.2014.06.004.
- Chiarle, Roberto, William J Simmons, Honjying Cai, Girish Dhall, Alberto Zamo, Regina Raz, James G Karras, David E Levy, und Giorgio Inghirami. 2005. „Stat3 Is Required for ALK-Mediated Lymphomagenesis and Provides a Possible Therapeutic Target“. *Nature Medicine* 11 (6): 623–29. doi:10.1038/nm1249.
- Chiarle, Roberto, Claudia Voena, Chiara Ambrogio, Roberto Piva, und Giorgio Inghirami. 2008. „The Anaplastic Lymphoma Kinase in the Pathogenesis of Cancer“. *Nature Reviews. Cancer* 8 (1): 11–23. doi:10.1038/nrc2291.
- Chiba, I, T Takahashi, M M Nau, D D'Amico, D T Curiel, T Mitsudomi, D L Buchhagen, D Carbone, S Piantadosi, und H Koga. 1990. „Mutations in the p53 Gene Are Frequent in Primary, Resected Non-Small Cell Lung Cancer. Lung Cancer Study Group“. *Oncogene* 5 (10): 1603–10.
- Choi, Young Lim, Manabu Soda, Yoshihiro Yamashita, Toshihide Ueno, Junpei Takashima, Takahiro Nakajima, Yasushi Yatabe, et al., ALK Lung Cancer Study Group. 2010. „EML4-ALK Mutations in Lung Cancer That Confer Resistance to ALK Inhibitors“. *The New England Journal of Medicine* 363 (18): 1734–39. doi:10.1056/NEJMoa1007478.
- Choi, Young Lim, Kengo Takeuchi, Manabu Soda, Kentaro Inamura, Yuki Togashi, Satoko Hatano, Munehiro Enomoto, et al. 2008. „Identification of Novel Isoforms of the EML4-ALK Transforming Gene in Non-Small Cell Lung Cancer“. *Cancer Research* 68 (13): 4971–76. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6158.
- Coffin, C M, A Patel, S Perkins, K S Elenitoba-Johnson, E Perlman, und C A Griffin. 2001. „ALK1 and p80 Expression and Chromosomal Rearrangements Involving 2p23 in Inflammatory Myofibroblastic Tumor“. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 14 (6): 569–76. doi:10.1038/modpathol.3880352.
- Coffin, C M, J Watterson, J R Priest, und L P Dehner. 1995. „Extrapulmonary Inflammatory Myofibroblastic Tumor (inflammatory Pseudotumor). A Clinicopathologic and Immunohistochemical Study of 84 Cases“. *The American Journal of Surgical Pathology* 19 (8): 859–72.
- Conklin, Chris M J, Kenneth J Craddock, Cherry Have, Janessa Laskin, Christian Couture, und Diana N Ionescu. 2013. „Immunohistochemistry Is a Reliable Screening Tool for Identification of ALK Rearrangement in Non-Small-Cell Lung Carcinoma and Is Antibody Dependent“. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 8 (1): 45–51. doi:10.1097/JTO.0b013e318274a83e.
- Cools, Jan, Iwona Wlodarska, Riet Somers, Nicole Mentens, Florence Pedeutour, Brigitte Maes, Christiane De Wolf-Peeters, Patrick Pauwels, Anne Hagemeyer, und Peter Marynen. 2002. „Identification of Novel Fusion Partners of ALK, the Anaplastic Lymphoma Kinase, in Anaplastic Large-Cell Lymphoma and Inflammatory Myofibroblastic Tumor“. *Genes, Chromosomes & Cancer* 34 (4): 354–62. doi:10.1002/gcc.10033.
- Darby, S, D Hill, A Auvinen, J M Barros-Dios, H Baysson, F Bochicchio, H Deo, et al. 2005. „Radon in Homes and Risk of Lung Cancer: Collaborative Analysis of Individual Data from 13 European Case-Control Studies“. *BMJ (Clinical Research Ed.)* 330 (7485): 223. doi:10.1136/bmj.38308.477650.63.
- Davies, Kurtis D, und Robert C Doebele. 2013. „Molecular Pathways: ROS1 Fusion Proteins in Cancer“. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 19 (15): 4040–45. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2851.
- Davies, Kurtis D, Anh T Le, Mariana F Theodoro, Margaret C Skokan, Dara L Aisner, Eamon M Berge, Luigi M Terracciano, et al. 2012. „Identifying and Targeting ROS1 Gene Fusions in Non-Small Cell Lung Cancer“. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 18 (17): 4570–79. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0550.
- Davies, Kurtis D, Sakshi Mahale, David P Astling, Dara L Aisner, Anh T Le, Trista K Hinz, Aria Vaishnavi, et al. 2013. „Resistance to ROS1 Inhibition Mediated by EGFR

- Pathway Activation in Non-Small Cell Lung Cancer". *PloS One* 8 (12): e82236. doi:10.1371/journal.pone.0082236.
- De Brouwer, Sara, Katleen De Preter, Candy Kumps, Piotr Zabrocki, Michaël Porcu, Ellen M Westerhout, Arjan Lakeman, et al. 2010. „Meta-Analysis of Neuroblastomas Reveals a Skewed ALK Mutation Spectrum in Tumors with MYCN Amplification". *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 16 (17): 4353–62. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2660.
- DiFeo, Analisa, John A. Martignetti, und Goutham Narla. 2009. „The Role of KLF6 and Its Splice Variants in Cancer Therapy". *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy* 12 (1-2): 1–7. doi:10.1016/j.drug.2008.11.001.
- Di Modugno, Francesca, Pierluigi Iapicca, Aaron Boudreau, Marcella Mottolese, Irene Terrenato, Letizia Perracchio, Russ P. Carstens, Angela Santoni, Mina J. Bissell, und Paola Nisticò. 2012. „Splicing Program of Human MENA Produces a Previously Undescribed Isoform Associated with Invasive, Mesenchymal-like Breast Tumors". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (47): 19280–85. doi:10.1073/pnas.1214394109.
- Ding, Li, Gad Getz, David A. Wheeler, Elaine R. Mardis, Michael D. McLellan, Kristian Cibulskis, Carrie Sougnez, et al. 2008. „Somatic Mutations Affect Key Pathways in Lung Adenocarcinoma". *Nature* 455 (7216): 1069–75. doi:10.1038/nature07423.
- Doebele, Robert C, Amanda B Pilling, Dara L Aisner, Tatiana G Kutateladze, Anh T Le, Andrew J Weickhardt, Kimi L Kondo, et al. 2012. „Mechanisms of Resistance to Crizotinib in Patients with ALK Gene Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer". *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 18 (5): 1472–82. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2906.
- Duijkers, Floor A M, José Gaal, Jules P P Meijerink, Pieter Admiraal, Rob Pieters, Ronald R de Krijger, und Max M van Noesel. 2011. „Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) Inhibitor Response in Neuroblastoma Is Highly Correlated with ALK Mutation Status, ALK mRNA and Protein Levels". *Cellular Oncology (Dordrecht)* 34 (5): 409–17. doi:10.1007/s13402-011-0048-2.
- Engelman, Jeffrey A, Kreshnik Zejnullahu, Tetsuya Mitsudomi, Youngchul Song, Courtney Hyland, Joon Oh Park, Neal Lindeman, et al. 2007. „MET Amplification Leads to Gefitinib Resistance in Lung Cancer by Activating ERBB3 Signaling". *Science (New York, N.Y.)* 316 (5827): 1039–43. doi:10.1126/science.1141478.
- Englund, Camilla, Christina E Lorén, Caroline Grabbe, Gaurav K Varshney, Fabienne Deleuil, Bengt Hallberg, und Ruth H Palmer. 2003. „Jeb Signals through the Alk Receptor Tyrosine Kinase to Drive Visceral Muscle Fusion". *Nature* 425 (6957): 512–16. doi:10.1038/nature01950.
- Erickson, Heidi S, Paul S Albert, John W Gillespie, Benjamin S Wallis, Jaime Rodriguez-Canales, W Marston Linehan, Sergio Gonzalez, Alfredo Velasco, Rodrigo F Chuaqui, und Michael R Emmert-Buck. 2007. „Assessment of Normalization Strategies for Quantitative RT-PCR Using Microdissected Tissue Samples". *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 87 (9): 951–62. doi:10.1038/labinvest.3700659.
- Esfahani, Khashayar, Jason Scott Agulnik, und Victor Cohen. 2014. „A Systemic Review of Resistance Mechanisms and Ongoing Clinical Trials in ALK-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer". *Frontiers in Oncology* 4: 174. doi:10.3389/fonc.2014.00174.
- Ettinger, David S, Wallace Akerley, Gerold Bepler, Matthew G Blum, Andrew Chang, Richard T Cheney, Lucian R Chirieac, et al. 2010. „Non-Small Cell Lung Cancer". *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN* 8 (7): 740–801.
- Fabian, Marc Robert, Nahum Sonenberg, und Witold Filipowicz. 2010. „Regulation of mRNA Translation and Stability by microRNAs". *Annual Review of Biochemistry* 79: 351–79. doi:10.1146/annurev-biochem-060308-103103.
- Falini, B, S Pileri, P L Zinzani, A Carbone, V Zagonel, C Wolf-Peeters, G Verhoef, et al. 1999. „ALK+ Lymphoma: Clinico-Pathological Findings and Outcome". *Blood* 93 (8): 2697–2706.

- Fang, Douglas D, Bin Zhang, Qingyang Gu, Maruja Lira, Qiang Xu, Hongye Sun, Maoxiang Qian, et al. 2014. „HIP1-ALK, A Novel ALK Fusion Variant That Responds to Crizotinib“. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 9 (3): 285–94. doi:10.1097/JTO.000000000000087.
- Friboulet, Luc, Nanxin Li, Ryohei Katayama, Christian C Lee, Justin F Gainor, Adam S Crystal, Pierre-Yves Michellys, et al. 2014. „The ALK Inhibitor Ceritinib Overcomes Crizotinib Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer“. *Cancer Discovery*, März. doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0846.
- Garber, M E, O G Troyanskaya, K Schluens, S Petersen, Z Thaesler, M Pacyna-Gengelbach, M van de Rijn, et al. 2001. „Diversity of Gene Expression in Adenocarcinoma of the Lung“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (24): 13784–89. doi:10.1073/pnas.241500798.
- Garver, R. I., C. S. Chan, und P. G. Milner. 1993. „Reciprocal Expression of Pleiotrophin and Midkine in Normal versus Malignant Lung Tissues“. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 9 (5): 463–66. doi:10.1165/ajrcmb/9.5.463.
- Gaughan, Elizabeth M, und Daniel B Costa. 2011. „Genotype-Driven Therapies for Non-Small Cell Lung Cancer: Focus on EGFR, KRAS and ALK Gene Abnormalities“. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 3 (3): 113–25. doi:10.1177/1758834010397569.
- George, Rani E, Takaomi Sanda, Megan Hanna, Stefan Fröhling, William Luther 2nd, Jianming Zhang, Yebin Ahn, et al. 2008. „Activating Mutations in ALK Provide a Therapeutic Target in Neuroblastoma“. *Nature* 455 (7215): 975–78. doi:10.1038/nature07397.
- Ghazalpour, Anatole, Brian Bennett, Vladislav A. Petyuk, Luz Orozco, Raffi Hagopian, Imran N. Mungrue, Charles R. Farber, et al. 2011. „Comparative Analysis of Proteome and Transcriptome Variation in Mouse“. *PLoS Genetics* 7 (6): e1001393. doi:10.1371/journal.pgen.1001393.
- Ghigna, Claudia, Silvia Giordano, Haihong Shen, Federica Benvenuto, Fabio Castiglioni, Paolo Maria Comoglio, Michael R. Green, Silvano Riva, und Giuseppe Biamonti. 2005. „Cell Motility Is Controlled by SF2/ASF through Alternative Splicing of the Ron Protooncogene“. *Molecular Cell* 20 (6): 881–90. doi:10.1016/j.molcel.2005.10.026.
- Gleason, B C, und J L Hornick. 2008. „Inflammatory Myofibroblastic Tumours: Where Are We Now?“. *Journal of Clinical Pathology* 61 (4): 428–37. doi:10.1136/jcp.2007.049387.
- Gouzi, Jean Y, Anastasios Moressis, James A Walker, Anthi A Apostolopoulou, Ruth H Palmer, André Bernards, und Efthimios M C Skoulakis. 2011. „The Receptor Tyrosine Kinase Alk Controls Neurofibromin Functions in Drosophila Growth and Learning“. *PLoS Genetics* 7 (9): e1002281. doi:10.1371/journal.pgen.1002281.
- Govindan, Ramaswamy, Li Ding, Malachi Griffith, Janakiraman Subramanian, Nathan D Dees, Krishna L Kanchi, Christopher A Maher, et al. 2012. „Genomic Landscape of Non-Small Cell Lung Cancer in Smokers and Never-Smokers“. *Cell* 150 (6): 1121–34. doi:10.1016/j.cell.2012.08.024.
- Griffin, C A, A L Hawkins, C Dvorak, C Henkle, T Ellingham, und E J Perlman. 1999. „Recurrent Involvement of 2p23 in Inflammatory Myofibroblastic Tumors“. *Cancer Research* 59 (12): 2776–80.
- Gruber, Kim, Heike Horn, Jörg Kalla, Peter Fritz, Andreas Rosenwald, Martin Kohlhäufel, Godehard Friedel, Matthias Schwab, German Ott, und Claudia Kalla. 2014. „Detection of Rearrangements and Transcriptional Up-Regulation of ALK in FFPE Lung Cancer Specimens Using a Novel, Sensitive, Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assay“. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 9 (3): 307–15. doi:10.1097/JTO.000000000000068.
- Gruber, Kim, Martin Kohlhäufel, Godehard Friedel, German Ott, und Claudia Kalla. 2015. „A Novel, Highly Sensitive ALK Antibody 1A4 Facilitates Effective Screening for ALK Rearrangements in Lung Adenocarcinomas by Standard Immunohistochemistry“.

- Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 10 (4): 713–16. doi:10.1097/JTO.0000000000000427.
- Guo, Lei, Xiuyun Liu, Tian Qiu, Yun Ling, Ling Shan, und Yongqiang Xie. 2014. „[ALK fusion gene assessment by fully automatic immunohistochemistry in non-small cell lung cancer]“. *Zhonghua bing li xue za zhi Chinese journal of pathology* 43 (2): 95–98.
- Gu, Ting-Lei, Xiaping Deng, Feizhou Huang, Meghan Tucker, Katherine Crosby, Victoria Rimkunas, Yi Wang, et al. 2011. „Survey of Tyrosine Kinase Signaling Reveals ROS Kinase Fusions in Human Cholangiocarcinoma“. *PloS One* 6 (1): e15640. doi:10.1371/journal.pone.0015640.
- Hamburg, Margaret A., und Francis S. Collins. 2010. „The Path to Personalized Medicine“. *The New England Journal of Medicine* 363 (4): 301–4. doi:10.1056/NEJMp1006304.
- Hanahan, Douglas, und Robert A. Weinberg. 2011. „Hallmarks of Cancer: The next Generation“. *Cell* 144 (5): 646–74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hanna, Nasser, Frances A Shepherd, Frank V Fossella, Jose R Pereira, Filippo De Marinis, Joachim von Pawel, Ulrich Gatzemeier, et al. 2004. „Randomized Phase III Trial of Pemetrexed versus Docetaxel in Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer Previously Treated with Chemotherapy“. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 22 (9): 1589–97. doi:10.1200/JCO.2004.08.163.
- Hantson, Inge, Christophe Doms, Eric Verbeken, Peter Vandenberghe, Liesbet Vliegen, Tania Roskams, Sara Vander Borght, Kris Nackaerts, Isabelle Wauters, und Johan Vansteenkiste. 2014. „Performance of Standard Procedures in Detection of EGFR Mutations in Daily Practice in Advanced NSCLC Patients Selected according to the ESMO Guideline: A Large Caucasian Cohort Study“. *Translational Respiratory Medicine* 2 (1): 9. doi:10.1186/s40247-014-0009-0.
- Han, Woody, und Hui-Wen Lo. 2012. „Landscape of EGFR Signaling Network in Human Cancers: Biology and Therapeutic Response in Relation to Receptor Subcellular Locations“. *Cancer Letters* 318 (2): 124–34. doi:10.1016/j.canlet.2012.01.011.
- Hao, Huifang, Yutaka Maeda, Takuya Fukazawa, Tomoki Yamatsuji, Munenori Takaoka, Xiao-Hong Bao, Junji Matsuoka, et al. 2013. „Inhibition of the Growth Factor MDK/midkine by a Novel Small Molecule Compound to Treat Non-Small Cell Lung Cancer“. *PloS One* 8 (8): e71093. doi:10.1371/journal.pone.0071093.
- Hargrove, J L, und F H Schmidt. 1989. „The Role of mRNA and Protein Stability in Gene Expression“. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 3 (12): 2360–70.
- Hasan, Md Kamrul, Asmaa Nafady, Atsushi Takatori, Satoshi Kishida, Miki Ohira, Yusuke Suenaga, Shamim Hossain, et al. 2013. „ALK Is a MYCN Target Gene and Regulates Cell Migration and Invasion in Neuroblastoma“. *Scientific Reports* 3: 3450. doi:10.1038/srep03450.
- Herbst, Roy S, John V Heymach, und Scott M Lippman. 2008. „Lung Cancer“. *The New England Journal of Medicine* 359 (13): 1367–80. doi:10.1056/NEJMra0802714.
- Hernández, L, M Pinyol, S Hernández, S Beà, K Pulford, A Rosenwald, L Lamant, et al. 1999. „TRK-Fused Gene (TFG) Is a New Partner of ALK in Anaplastic Large Cell Lymphoma Producing Two Structurally Different TFG-ALK Translocations“. *Blood* 94 (9): 3265–68.
- Hernández, Luis, Sílvia Beà, Beatriz Bellosillo, Magda Pinyol, Brunangelo Falini, Antonino Carbone, German Ott, et al. 2002. „Diversity of Genomic Breakpoints in TFG-ALK Translocations in Anaplastic Large Cell Lymphomas: Identification of a New TFG-ALK(XL) Chimeric Gene with Transforming Activity“. *The American Journal of Pathology* 160 (4): 1487–94. doi:10.1016/S0002-9440(10)62574-6.
- Hirsch, Fred R, Pasi A Jänne, Wilfried E Eberhardt, Federico Cappuzzo, Nick Thatcher, Robert Pirker, Hak Choy, et al. 2013. „Epidermal Growth Factor Receptor Inhibition in Lung Cancer: Status 2012“. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 8 (3): 373–84. doi:10.1097/JTO.0b013e31827ed0ff.

- Hoffman, P C, A M Mauer, und E E Vokes. 2000. „Lung Cancer“. *Lancet* 355 (9202): 479–85. doi:10.1016/S0140-6736(00)82038-3.
- Hojjat-Farsangi, Mohammad. 2014. „Small-Molecule Inhibitors of the Receptor Tyrosine Kinases: Promising Tools for Targeted Cancer Therapies“. *International Journal of Molecular Sciences* 15 (8): 13768–801. doi:10.3390/ijms150813768.
- Honda, H, K Harada, I Komuro, F Terasaki, H Ueno, Y Tanaka, K Kawamura, Y Yazaki, und H Hirai. 1999. „Heart-Specific Activation of LTK Results in Cardiac Hypertrophy, Cardiomyocyte Degeneration and Gene Reprogramming in Transgenic Mice“. *Oncogene* 18 (26): 3821–30. doi:10.1038/sj.onc.1202736.
- Houseley, Jonathan, und David Tollervey. 2009. „The Many Pathways of RNA Degradation“. *Cell* 136 (4): 763–76. doi:10.1016/j.cell.2009.01.019.
- Hsu, T.-I., S.-C. Lin, P.-S. Lu, W.-C. Chang, C.-Y. Hung, Y.-M. Yeh, W.-C. Su, P.-C. Liao, und J.-J. Hung. 2015. „MMP7-Mediated Cleavage of Nucleolin at Asp255 Induces MMP9 Expression to Promote Tumor Malignancy“. *Oncogene* 34 (7): 826–37. doi:10.1038/onc.2014.22.
- Hubbard, S. R. 1999. „Structural Analysis of Receptor Tyrosine Kinases“. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 71 (3-4): 343–58.
- Huchtagowder, Vishwanathan, Rekha Meyer, Chelsea Mullins, Rakesh Nagarajan, John F DiPersio, Ravi Vij, Michael H Tomasson, und Shashikant Kulkarni. 2012. „Resequencing Analysis of the Candidate Tyrosine Kinase and RAS Pathway Gene Families in Multiple Myeloma“. *Cancer Genetics* 205 (9): 474–78. doi:10.1016/j.cancergen.2012.06.007.
- Hurley, Shawn P, Douglas O Clary, Valerie Copie, und Frances Lefcort. 2006. „Anaplastic Lymphoma Kinase Is Dynamically Expressed on Subsets of Motor Neurons and in the Peripheral Nervous System“. *The Journal of Comparative Neurology* 495 (2): 202–12. doi:10.1002/cne.20887.
- Hyytinen, E, T Visakorpi, A Kallioniemi, O P Kallioniemi, und J J Isola. 1994. „Improved Technique for Analysis of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tumors by Fluorescence in Situ Hybridization“. *Cytometry* 16 (2): 93–99. doi:10.1002/cyto.990160202.
- Ikematsu, S, A Yano, K Aridome, M Kikuchi, H Kumai, H Nagano, K Okamoto, et al. 2000. „Serum Midkine Levels Are Increased in Patients with Various Types of Carcinomas“. *British Journal of Cancer* 83 (6): 701–6. doi:10.1054/bjoc.2000.1339.
- Inamura, Kentaro, Kengo Takeuchi, Yuki Togashi, Satoko Hatano, Hironori Ninomiya, Noriko Motoi, Ming-yon Mun, et al. 2009. „EML4-ALK Lung Cancers Are Characterized by Rare Other Mutations, a TTF-1 Cell Lineage, an Acinar Histology, and Young Onset“. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 22 (4): 508–15. doi:10.1038/modpathol.2009.2.
- Iwahara, T, J Fujimoto, D Wen, R Cupples, N Bucay, T Arakawa, S Mori, B Ratzkin, und T Yamamoto. 1997. „Molecular Characterization of ALK, a Receptor Tyrosine Kinase Expressed Specifically in the Nervous System“. *Oncogene* 14 (4): 439–49. doi:10.1038/sj.onc.1200849.
- Jäger, R., B. List, C. Knabbe, B. Souttou, D. Raulais, T. Zeiler, A. Wellstein, A. Aigner, A. Neubauer, und G. Zugmaier. 2002. „Serum Levels of the Angiogenic Factor Pleiotrophin in Relation to Disease Stage in Lung Cancer Patients“. *British Journal of Cancer* 86 (6): 858–63. doi:10.1038/sj.bjc.6600202.
- Jäger, R., K. Noll, K. Havemann, K. H. Pflüger, C. Knabbe, H. Rauvala, und G. Zugmaier. 1997. „Differential Expression and Biological Activity of the Heparin-Binding Growth-Associated Molecule (HB-GAM) in Lung Cancer Cell Lines“. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 73 (4): 537–43.
- Janik, Joseph S, Joseph P Janik, Mark A Lovell, Richard J Hendrickson, Denis D Bensard, und Brian S Greffe. 2003. „Recurrent Inflammatory Pseudotumors in Children“. *Journal of Pediatric Surgery* 38 (10): 1491–95.
- Janoueix-Lerosey, Isabelle, Delphine Lequin, Laurence Brugières, Agnès Ribeiro, Loïc de Pontual, Valérie Combaret, Virginie Raynal, et al. 2008. „Somatic and Germline

- Activating Mutations of the ALK Kinase Receptor in Neuroblastoma". *Nature* 455 (7215): 967–70. doi:10.1038/nature07398.
- Jehan, Z, S Uddin, und K S Al-Kuraya. 2012. „In-Situ Hybridization as a Molecular Tool in Cancer Diagnosis and Treatment“. *Current Medicinal Chemistry* 19 (22): 3730–38.
- Jemal, Ahmedin, Freddie Bray, Melissa M Center, Jacques Ferlay, Elizabeth Ward, und David Forman. 2011. „Global Cancer Statistics“. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 61 (2): 69–90. doi:10.3322/caac.20107.
- Jin, Yan, Ping-Li Sun, Hyojin Kim, Eunhyang Park, Hyo Sup Shim, Sanghoon Jheon, Kwahnmien Kim, Choon-Taek Lee, und Jin-Haeng Chung. 2015. „ROS1 Gene Rearrangement and Copy Number Gain in Non-Small Cell Lung Cancer“. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology* 466 (1): 45–52. doi:10.1007/s00428-014-1679-2.
- Joos, S, T M Fink, A Räscht, und P Lichter. 1994. „Mapping and Chromosome Analysis: The Potential of Fluorescence in Situ Hybridization“. *Journal of Biotechnology* 35 (2-3): 135–53.
- Jung, Yeonjoo, Pora Kim, Yeonhwa Jung, Juhee Keum, Soon-Nam Kim, Yong Soo Choi, In-Gu Do, et al. 2012. „Discovery of ALK-PTPN3 Gene Fusion from Human Non-Small Cell Lung Carcinoma Cell Line Using next Generation RNA Sequencing“. *Genes, Chromosomes & Cancer* 51 (6): 590–97. doi:10.1002/gcc.21945.
- Jun, Hyun Jung, Hannah Johnson, Roderick T Bronson, Sebastien de Feraudy, Forest White, und Alain Charest. 2012. „The Oncogenic Lung Cancer Fusion Kinase CD74-ROS Activates a Novel Invasiveness Pathway through E-Syt1 Phosphorylation“. *Cancer Research* 72 (15): 3764–74. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3990.
- Just, Pierre-Alexandre, Aurélie Cazes, Anne Audebourg, Anatole Cessot, Karine Pallier, Claire Danel, Marie-Cécile Vacher-Lavenu, Pierre Laurent-Puig, Benoît Terris, und Hélène Blons. 2012. „Histologic Subtypes, Immunohistochemistry, FISH or Molecular Screening for the Accurate Diagnosis of ALK-Rearrangement in Lung Cancer: A Comprehensive Study of Caucasian Non-Smokers“. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 76 (3): 309–15. doi:10.1016/j.lungcan.2011.11.004.
- Kadomatsu, Kenji, und Takashi Muramatsu. 2004. „Midkine and Pleiotrophin in Neural Development and Cancer“. *Cancer Letters* 204 (2): 127–43. doi:10.1016/S0304-3835(03)00450-6.
- Kahkhaie, Kolsoum Rezaie, Omeed Moaven, Mohammad Reza Abbaszadegan, Mehdi Montazer, und Mehran Gholamin. 2014. „Specific MUC1 Splice Variants Are Correlated with Tumor Progression in Esophageal Cancer“. *World Journal of Surgery* 38 (8): 2052–57. doi:10.1007/s00268-014-2523-1.
- Kan, Zhengyan, Bijay S Jaiswal, Jeremy Stinson, Vasantharajan Janakiraman, Deepali Bhatt, Howard M Stern, Peng Yue, et al. 2010. „Diverse Somatic Mutation Patterns and Pathway Alterations in Human Cancers“. *Nature* 466 (7308): 869–73. doi:10.1038/nature09208.
- Katayama, Ryohei, Alice T Shaw, Tahsin M Khan, Mari Mino-Kenudson, Benjamin J Solomon, Balazs Halmos, Nicholas A Jessop, et al. 2012. „Mechanisms of Acquired Crizotinib Resistance in ALK-Rearranged Lung Cancers“. *Science Translational Medicine* 4 (120): 120ra17. doi:10.1126/scitranslmed.3003316.
- Kim, Soyeon, Tae Min Kim, Dong-Wan Kim, Heounjeong Go, Bhumsuk Keam, Se-Hoon Lee, Ja-Lok Ku, Doo Hyun Chung, und Dae Seog Heo. 2013. „Heterogeneity of Genetic Changes Associated with Acquired Crizotinib Resistance in ALK-Rearranged Lung Cancer“. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 8 (4): 415–22. doi:10.1097/JTO.0b013e318283dccc0.
- Kobayashi, Susumu, Titus J Boggon, Tajhal Dayaram, Pasi A Jänne, Olivier Kocher, Matthew Meyerson, Bruce E Johnson, Michael J Eck, Daniel G Tenen, und Balázs Halmos. 2005. „EGFR Mutation and Resistance of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib“. *The New England Journal of Medicine* 352 (8): 786–92. doi:10.1056/NEJMoa044238.

- Koivunen, Jussi P, Craig Mermel, Kreshnik Zejnnullahu, Carly Murphy, Eugene Lifshits, Alison J Holmes, Hwan Geun Choi, et al. 2008. „EML4-ALK Fusion Gene and Efficacy of an ALK Kinase Inhibitor in Lung Cancer“. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 14 (13): 4275–83. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0168.
- Kozutsumi, H, H Toyoshima, K Hagiwara, A Furuya, H Mioh, N Hanai, Y Yazaki, und H Hirai. 1993. „Identification of the Human Ltk Gene Product in Placenta and Hematopoietic Cell Lines“. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 190 (2): 674–79. doi:10.1006/bbrc.1993.1101.
- Kreuzer, K. A., U. Lass, O. Landt, A. Nitsche, J. Laser, H. Ellerbrok, G. Pauli, D. Huhn, und C. A. Schmidt. 1999. „Highly Sensitive and Specific Fluorescence Reverse Transcription-PCR Assay for the Pseudogene-Free Detection of Beta-Actin Transcripts as Quantitative Reference“. *Clinical Chemistry* 45 (2): 297–300.
- Krolewski, J J, und R Dalla-Favera. 1991. „The Ltk Gene Encodes a Novel Receptor-Type Protein Tyrosine Kinase“. *The EMBO Journal* 10 (10): 2911–19.
- Kwak, Eunice L, Yung-Jue Bang, D Ross Camidge, Alice T Shaw, Benjamin Solomon, Robert G Maki, Sai-Hong I Ou, et al. 2010. „Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibition in Non-Small-Cell Lung Cancer“. *The New England Journal of Medicine* 363 (18): 1693–1703. doi:10.1056/NEJMoa1006448.
- Lamant, L, N Dastugue, K Pulford, G Delsol, und B Mariamé. 1999. „A New Fusion Gene TPM3-ALK in Anaplastic Large Cell Lymphoma Created by a (1;2)(q25;p23) Translocation“. *Blood* 93 (9): 3088–95.
- Lee, Hee Jin, Hyang Sook Seol, Joo Young Kim, Sung-Min Chun, Young-Ah Suh, Young-Soo Park, Sang-we Kim, et al. 2013. „ROS1 Receptor Tyrosine Kinase, a Druggable Target, Is Frequently Overexpressed in Non-Small Cell Lung Carcinomas via Genetic and Epigenetic Mechanisms“. *Annals of Surgical Oncology* 20 (1): 200–208. doi:10.1245/s10434-012-2553-6.
- Lee, Ho-June, Gabriele Schaefer, Timothy P Heffron, Lily Shao, Xiaofen Ye, Steve Sideris, Shiva Malek, et al. 2013. „Noncovalent Wild-Type-Sparing Inhibitors of EGFR T790M“. *Cancer Discovery* 3 (2): 168–81. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0357.
- Lee, Hsiu-Hsiang, Audra Norris, Joseph B Weiss, und Manfred Frasch. 2003. „Jelly Belly Protein Activates the Receptor Tyrosine Kinase Alk to Specify Visceral Muscle Pioneers“. *Nature* 425 (6957): 507–12. doi:10.1038/nature01916.
- Lee, Seung Eun, Boram Lee, Mineui Hong, Ji-Young Song, Kyungsoo Jung, Maruja E. Lira, Mao Mao, Joungho Han, Jhingook Kim, und Yoon-La Choi. 2014. „Comprehensive Analysis of RET and ROS1 Rearrangement in Lung Adenocarcinoma“. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, September. doi:10.1038/modpathol.2014.107.
- Lemmon, Mark A, und Joseph Schlessinger. 2010. „Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases“. *Cell* 141 (7): 1117–34. doi:10.1016/j.cell.2010.06.011.
- Le Quesne, John, Manisha Maurya, Slaveya G Yancheva, Mary O'Brien, Sanjay Papat, Andrew C Wotherspoon, David Gonzalez de Castro, und Andrew G Nicholson. 2014. „A Comparison of Immunohistochemical Assays and FISH in Detecting the ALK Translocation in Diagnostic Histological and Cytological Lung Tumor Material“. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, April. doi:10.1097/JTO.000000000000157.
- Liao, Edward H, Wesley Hung, Benjamin Abrams, und Mei Zhen. 2004. „An SCF-like Ubiquitin Ligase Complex That Controls Presynaptic Differentiation“. *Nature* 430 (6997): 345–50. doi:10.1038/nature02647.
- Li, Chun-Jie, Yue-Chuan Li, Dong-Rui Zhang, und Jian-Hui Pan. 2013. „Signal Transducers and Activators of Transcription 3 Function in Lung Cancer“. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 9 Suppl 2 (September): S67–73.
- Lindeman, Neal I, Philip T Cagle, Mary Beth Beasley, Dhananjay Arun Chitale, Sanja Dacic, Giuseppe Giaccone, Robert Brian Jenkins, et al. 2013. „Molecular Testing Guideline for Selection of Lung Cancer Patients for EGFR and ALK Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline from the College of American Pathologists, International Association for the

- Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology". *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD* 15 (4): 415–53. doi:10.1016/j.jmoldx.2013.03.001.
- Lin, Eva, Li Li, Yinghui Guan, Robert Soriano, Celina Sanchez Rivers, Sankar Mohan, Ajay Pandita, Jerry Tang, und Zora Modrusan. 2009. „Exon Array Profiling Detects EML4-ALK Fusion in Breast, Colorectal, and Non-Small Cell Lung Cancers". *Molecular Cancer Research: MCR* 7 (9): 1466–76. doi:10.1158/1541-7786.MCR-08-0522.
- Lipson, Doron, Marzia Capelletti, Roman Yelensky, Geoff Otto, Alex Parker, Mirna Jarosz, John A Curran, et al. 2012a. „Identification of New ALK and RET Gene Fusions from Colorectal and Lung Cancer Biopsies". *Nature Medicine* 18 (3): 382–84. doi:10.1038/nm.2673.
- Lipson, Doron, Marzia Capelletti, Roman Yelensky, Geoff Otto, Alex Parker, Mirna Jarosz, John A. Curran, et al. 2012b. „Identification of New ALK and RET Gene Fusions from Colorectal and Lung Cancer Biopsies". *Nature Medicine* 18 (3): 382–84. doi:10.1038/nm.2673.
- Lira, Maruja E, Tae Min Kim, Donghui Huang, Shibing Deng, Youngil Koh, Bogun Jang, Heounjeong Go, et al. 2013. „Multiplexed Gene Expression and Fusion Transcript Analysis to Detect ALK Fusions in Lung Cancer". *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD* 15 (1): 51–61. doi:10.1016/j.jmoldx.2012.08.006.
- Livak, K J, und T D Schmittgen. 2001. „Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method". *Methods (San Diego, Calif.)* 25 (4): 402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- Li, Yongjun, Xiaofen Ye, Jinfeng Liu, Jiping Zha, und Lin Pei. 2011. „Evaluation of EML4-ALK Fusion Proteins in Non-Small Cell Lung Cancer Using Small Molecule Inhibitors". *Neoplasia (New York, N.Y.)* 13 (1): 1–11.
- Li, Y S, P G Milner, A K Chauhan, M A Watson, R M Hoffman, C M Kodner, J Milbrandt, und T F Deuel. 1990. „Cloning and Expression of a Developmentally Regulated Protein That Induces Mitogenic and Neurite Outgrowth Activity". *Science (New York, N.Y.)* 250 (4988): 1690–94.
- Li, Yuan, Yunjian Pan, Rui Wang, Yihua Sun, Haichuan Hu, Xuxia Shen, Yongming Lu, Lei Shen, Xiongze Zhu, und Haiquan Chen. 2013. „ALK-Rearranged Lung Cancer in Chinese: A Comprehensive Assessment of Clinicopathology, IHC, FISH and RT-PCR". *PloS One* 8 (7): e69016. doi:10.1371/journal.pone.0069016.
- Li, Zongmeng, Haiwei Mou, Ting Wang, Jing Xue, Bo Deng, Lihua Qian, Ye Zhou, et al. 2013. „A Non-Secretory Form of FAM3B Promotes Invasion and Metastasis of Human Colon Cancer Cells by Upregulating Slug Expression". *Cancer Letters* 328 (2): 278–84. doi:10.1016/j.canlet.2012.09.026.
- Lopes, Susana S, Xueyan Yang, Jeanette Müller, Thomas J Carney, Anthony R McAdow, Gerd-Jörg Rauch, Arie S Jacoby, et al. 2008. „Leukocyte Tyrosine Kinase Functions in Pigment Cell Development". *PLoS Genetics* 4 (3): e1000026. doi:10.1371/journal.pgen.1000026.
- Lorente, M, S Torres, M Salazar, A Carracedo, S Hernández-Tiedra, F Rodríguez-Fornés, E García-Taboada, et al. 2011. „Stimulation of the midkine/ALK Axis Renders Glioma Cells Resistant to Cannabinoid Antitumoral Action". *Cell Death and Differentiation* 18 (6): 959–73. doi:10.1038/cdd.2010.170.
- Lovly, Christine M, Johannes M Heuckmann, Elisa de Stanchina, Heidi Chen, Roman K Thomas, Chris Liang, und William Pao. 2011. „Insights into ALK-Driven Cancers Revealed through Development of Novel ALK Tyrosine Kinase Inhibitors". *Cancer Research* 71 (14): 4920–31. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3879.
- Lynch, Thomas J, Daphne W Bell, Raffaella Sordella, Sarada Gurubhagavatula, Ross A Okimoto, Brian W Brannigan, Patricia L Harris, et al. 2004. „Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib". *The New England Journal of Medicine* 350 (21): 2129–39. doi:10.1056/NEJMoa040938.
- Majewski, Ian J, Lorenza Mittempergher, Nadia M Davidson, Astrid Bosma, Stefan M Willems, Hugo M Horlings, Iris de Rink, et al. 2013. „Identification of Recurrent

- FGFR3 Fusion Genes in Lung Cancer through Kinome-Centred RNA Sequencing". *The Journal of Pathology* 230 (3): 270–76. doi:10.1002/path.4209.
- Mandell, James W. 2003. „Phosphorylation State-Specific Antibodies: Applications in Investigative and Diagnostic Pathology“. *The American Journal of Pathology* 163 (5): 1687–98. doi:10.1016/S0002-9440(10)63525-0.
- Mandell, James W. 2008. „Immunohistochemical Assessment of Protein Phosphorylation State: The Dream and the Reality“. *Histochemistry and Cell Biology* 130 (3): 465–71. doi:10.1007/s00418-008-0474-z.
- Marchetti, Antonio, Carla Martella, Lara Felicioni, Fabio Barassi, Simona Salvatore, Antonio Chella, Pier P Camplese, et al. 2005. „EGFR Mutations in Non-Small-Cell Lung Cancer: Analysis of a Large Series of Cases and Development of a Rapid and Sensitive Method for Diagnostic Screening with Potential Implications on Pharmacologic Treatment“. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (4): 857–65. doi:10.1200/JCO.2005.08.043.
- Maris, John M, Michael D Hogarty, Rochelle Bagatell, und Susan L Cohn. 2007. „Neuroblastoma“. *Lancet* 369 (9579): 2106–20. doi:10.1016/S0140-6736(07)60983-0.
- Maru, Y, H Hirai, und F Takaku. 1990. „Human Ltk: Gene Structure and Preferential Expression in Human Leukemic Cells“. *Oncogene Research* 5 (3): 199–204.
- Masuda, N, T Ohnishi, S Kawamoto, M Monden, und K Okubo. 1999. „Analysis of Chemical Modification of RNA from Formalin-Fixed Samples and Optimization of Molecular Biology Applications for Such Samples“. *Nucleic Acids Research* 27 (22): 4436–43.
- Ma, Zhihong, Hongwei Li, Bin Wang, Qibin Shen, Enhai Cui, Lishan Min, Fuchu Qian, Jinliang Ping, und Licheng Dai. 2013. „Midkine mRNA Level in Peripheral Blood Mononuclear Cells Is a Novel Biomarker for Primary Non-Small Cell Lung Cancer: A Prospective Study“. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 139 (4): 557–62. doi:10.1007/s00432-012-1357-1.
- McDermott, Ultan, A John Iafrate, Nathanael S Gray, Toshi Shioda, Marie Classon, Shyamala Maheswaran, Wenjun Zhou, et al. 2008. „Genomic Alterations of Anaplastic Lymphoma Kinase May Sensitize Tumors to Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibitors“. *Cancer Research* 68 (9): 3389–95. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6186.
- McLeer-Florin, Anne, Denis Moro-Sibilot, Adrien Melis, Dimitri Salameire, Christine Lefebvre, Françoise Ceccaldi, Florence de Fraipont, Elisabeth Brambilla, und Sylvie Lantuejoul. 2012. „Dual IHC and FISH Testing for ALK Gene Rearrangement in Lung Adenocarcinomas in a Routine Practice: A French Study“. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 7 (2): 348–54. doi:10.1097/JTO.0b013e3182381535.
- Mescam-Mancini, Lénaïg, Sylvie Lantuejoul, Denis Moro-Sibilot, Isabelle Rouquette, Pierre-Jean Souquet, Clarisse Audigier-Valette, Jean-Christophe Sabourin, et al. 2014. „On the Relevance of a Testing Algorithm for the Detection of ROS1-Rearranged Lung Adenocarcinomas“. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 83 (2): 168–73. doi:10.1016/j.lungcan.2013.11.019.
- Mino-Kenudson, Mari, Lucian R Chirieac, Kenny Law, Jason L Hornick, Neal Lindeman, Eugene J Mark, David W Cohen, et al. 2010. „A Novel, Highly Sensitive Antibody Allows for the Routine Detection of ALK-Rearranged Lung Adenocarcinomas by Standard Immunohistochemistry“. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 16 (5): 1561–71. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2845.
- Mok, Tony S., Yi-Long Wu, Sumitra Thongprasert, Chih-Hsin Yang, Da-Tong Chu, Nagahiro Saijo, Patrapim Sunpaweravong, et al. 2009. „Gefitinib or Carboplatin–Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma“. *New England Journal of Medicine* 361 (10): 947–57. doi:10.1056/NEJMoa0810699.
- Moore, Melissa J., und Nick J. Proudfoot. 2009. „Pre-mRNA Processing Reaches Back to Transcription and Ahead to Translation“. *Cell* 136 (4): 688–700. doi:10.1016/j.cell.2009.02.001.

- Morris, S W, M N Kirstein, M B Valentine, K G Dittmer, D N Shapiro, D L Saltman, und A T Look. 1994. „Fusion of a Kinase Gene, ALK, to a Nucleolar Protein Gene, NPM, in Non-Hodgkin's Lymphoma“. *Science (New York, N.Y.)* 263 (5151): 1281–84.
- Morris, S W, C Naeve, P Mathew, P L James, M N Kirstein, X Cui, und D P Witte. 1997. „ALK, the Chromosome 2 Gene Locus Altered by the t(2;5) in Non-Hodgkin's Lymphoma, Encodes a Novel Neural Receptor Tyrosine Kinase That Is Highly Related to Leukocyte Tyrosine Kinase (LTK)“. *Oncogene* 14 (18): 2175–88. doi:10.1038/sj.onc.1201062.
- Mossé, Yaël P, Marci Laudenslager, Luca Longo, Kristina A Cole, Andrew Wood, Edward F Attiyeh, Michael J Laquaglia, et al. 2008. „Identification of ALK as a Major Familial Neuroblastoma Predisposition Gene“. *Nature* 455 (7215): 930–35. doi:10.1038/nature07261.
- Mossé, Yael P, Megan S Lim, Stephan D Voss, Keith Wilner, Katherine Ruffner, Julie Laliberte, Delphine Rolland, et al. 2013. „Safety and Activity of Crizotinib for Paediatric Patients with Refractory Solid Tumours or Anaplastic Large-Cell Lymphoma: A Children's Oncology Group Phase 1 Consortium Study“. *The Lancet Oncology* 14 (6): 472–80. doi:10.1016/S1470-2045(13)70095-0.
- Motegi, Akira, Jiro Fujimoto, Masaharu Kotani, Hitoshi Sakuraba, und Tadashi Yamamoto. 2004. „ALK Receptor Tyrosine Kinase Promotes Cell Growth and Neurite Outgrowth“. *Journal of Cell Science* 117 (Pt 15): 3319–29. doi:10.1242/jcs.01183.
- Mountain, Clifton F. 1997. „REvisions in the international system for staging lung cancer“. *CHEST Journal* 111 (6): 1710–17. doi:10.1378/chest.111.6.1710.
- Müller-Tidow, Carsten, Sven Diederichs, Etmar Bulk, Thorsten Pohle, Björn Steffen, Joachim Schwäble, Sylvia Plewka, et al. 2005. „Identification of Metastasis-Associated Receptor Tyrosine Kinases in Non-Small Cell Lung Cancer“. *Cancer Research* 65 (5): 1778–82. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3388.
- Müller-Tidow, Carsten, Joachim Schwäble, Björn Steffen, Nicola Tidow, Burkhardt Brandt, Kerstin Becker, Eric Schulze-Bahr, et al. 2004. „High-Throughput Analysis of Genome-Wide Receptor Tyrosine Kinase Expression in Human Cancers Identifies Potential Novel Drug Targets“. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 10 (4): 1241–49.
- Murakami, Yoshiko, Tetsuya Mitsudomi, und Yasushi Yatabe. 2012. „A Screening Method for the ALK Fusion Gene in NSCLC“. *Frontiers in Oncology* 2: 24. doi:10.3389/fonc.2012.00024.
- Muramatsu, Takashi. 2002. „Midkine and Pleiotrophin: Two Related Proteins Involved in Development, Survival, Inflammation and Tumorigenesis“. *Journal of Biochemistry* 132 (3): 359–71.
- Murugan, Avaniyapuram Kannan, und Mingzhao Xing. 2011. „Anaplastic Thyroid Cancers Harbor Novel Oncogenic Mutations of the ALK Gene“. *Cancer Research* 71 (13): 4403–11. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-4041.
- Nanjo, Shigeki, Tadaaki Yamada, Hiroshi Nishihara, Shinji Takeuchi, Takako Sano, Takayuki Nakagawa, Daisuke Ishikawa, et al. 2013. „Ability of the Met Kinase Inhibitor Crizotinib and New Generation EGFR Inhibitors to Overcome Resistance to EGFR Inhibitors“. *PloS One* 8 (12): e84700. doi:10.1371/journal.pone.0084700.
- Nelson, Valerie, Jacqueline Ziehr, Mark Agulnik, und Melissa Johnson. 2013. „Afatinib: Emerging next-Generation Tyrosine Kinase Inhibitor for NSCLC“. *OncoTargets and Therapy* 6: 135–43. doi:10.2147/OTT.S23165.
- Newbury, S F. 2006. „Control of mRNA Stability in Eukaryotes“. *Biochemical Society Transactions* 34 (Pt 1): 30–34. doi:10.1042/BST20060030.
- Nguyen, Kevin T, Cong S Zong, Shailaja Uttamsingh, Pallavi Sachdev, Monica Bhanot, Mai-Thao Le, Joseph L-K Chan, und Lu-Hai Wang. 2002. „The Role of Phosphatidylinositol 3-Kinase, Rho Family GTPases, and STAT3 in Ros-Induced Cell Transformation“. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (13): 11107–15. doi:10.1074/jbc.M108166200.
- Nishino, Michiya, Veronica E Klepeis, Beow Y Yeap, Kristin Bergethon, Vicente Morales-Oyarvide, Dora Dias-Santagata, Yukako Yagi, Eugene J Mark, A John Iafrate, und

- Mari Mino-Kenudson. 2012. „Histologic and Cytomorphologic Features of ALK-Rearranged Lung Adenocarcinomas“. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 25 (11): 1462–72. doi:10.1038/modpathol.2012.109.
- Nolan, Tania, Rebecca E Hands, und Stephen A Bustin. 2006. „Quantification of mRNA Using Real-Time RT-PCR“. *Nature Protocols* 1 (3): 1559–82. doi:10.1038/nprot.2006.236.
- Olson, M, L Hood, C Cantor, und D Botstein. 1989. „A Common Language for Physical Mapping of the Human Genome“. *Science (New York, N.Y.)* 245 (4925): 1434–35.
- Ou, Sai-Hong Ignatius, Cynthia Huang Bartlett, Mari Mino-Kenudson, Jean Cui, und A. John Iafrate. 2012. „Crizotinib for the Treatment of ALK-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer: A Success Story to Usher in the Second Decade of Molecular Targeted Therapy in Oncology“. *The Oncologist* 17 (11): 1351–75. doi:10.1634/theoncologist.2012-0311.
- Ou, Sai-Hong Ignatius, Jackie Tan, Yun Yen, und Ross A Soo. 2012. „ROS1 as a ‚Druggable‘ Receptor Tyrosine Kinase: Lessons Learned from Inhibiting the ALK Pathway“. *Expert Review of Anticancer Therapy* 12 (4): 447–56. doi:10.1586/era.12.17.
- Packenham, J P, J A Taylor, C M White, C H Anna, J C Barrett, und T R Devereux. 1995. „Homozygous Deletions at Chromosome 9p21 and Mutation Analysis of p16 and p15 in Microdissected Primary Non-Small Cell Lung Cancers“. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 1 (7): 687–90.
- Paez, J Guillermo, Pasi A Jänne, Jeffrey C Lee, Sean Tracy, Heidi Greulich, Stacey Gabriel, Paula Herman, et al. 2004. „EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy“. *Science (New York, N.Y.)* 304 (5676): 1497–1500. doi:10.1126/science.1099314.
- Paik, Jin Ho, Gheeyoung Choe, Hyojin Kim, Ji-Young Choe, Hyun Ju Lee, Choon-Taek Lee, Jong Seok Lee, Sanghoon Jheon, und Jin-Haeng Chung. 2011. „Screening of Anaplastic Lymphoma Kinase Rearrangement by Immunohistochemistry in Non-Small Cell Lung Cancer: Correlation with Fluorescence in Situ Hybridization“. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 6 (3): 466–72. doi:10.1097/JTO.0b013e31820b82e8.
- Palmer, Ruth H, Emma Vernersson, Caroline Grabbe, und Bengt Hallberg. 2009. „Anaplastic Lymphoma Kinase: Signalling in Development and Disease“. *The Biochemical Journal* 420 (3): 345–61. doi:10.1042/BJ20090387.
- Pan, Yunjian, Yang Zhang, Yuan Li, Haichuan Hu, Lei Wang, Hang Li, Rui Wang, et al. 2014. „ALK, ROS1 and RET Fusions in 1139 Lung Adenocarcinomas: A Comprehensive Study of Common and Fusion Pattern-Specific Clinicopathologic, Histologic and Cytologic Features“. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 84 (2): 121–26. doi:10.1016/j.lungcan.2014.02.007.
- Pao, William, Vincent A Miller, Katerina A Politi, Gregory J Riely, Romel Somwar, Maureen F Zakowski, Mark G Kris, und Harold Varmus. 2005. „Acquired Resistance of Lung Adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib Is Associated with a Second Mutation in the EGFR Kinase Domain“. *PLoS Medicine* 2 (3): e73. doi:10.1371/journal.pmed.0020073.
- Pao, William, Vincent Miller, Maureen Zakowski, Jennifer Doherty, Katerina Politi, Inderpal Sarkaria, Bhuvanesh Singh, et al. 2004. „EGF Receptor Gene Mutations Are Common in Lung Cancers from ‚Never Smokers‘ and Are Associated with Sensitivity of Tumors to Gefitinib and Erlotinib“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (36): 13306–11. doi:10.1073/pnas.0405220101.
- Papadimitriou, Evangelia, Constantinos Mikelis, Evgenia Lampropoulou, Marina Koutsoumpa, Katerina Theochari, Sotiria Tsirmoula, Christina Theodoropoulou, et al. 2009. „Roles of Pleiotrophin in Tumor Growth and Angiogenesis“. *European Cytokine Network* 20 (4): 180–90. doi:10.1684/ecn.2009.0172.

- Parkin, D Max, Freddie Bray, J Ferlay, und Paola Pisani. 2005. „Global Cancer Statistics, 2002“. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 55 (2): 74–108.
- Passoni, Lorena, Luca Longo, Paola Collini, Addolorata Maria Luce Coluccia, Fabio Bozzi, Marta Podda, Andrea Gregorio, et al. 2009. „Mutation-Independent Anaplastic Lymphoma Kinase Overexpression in Poor Prognosis Neuroblastoma Patients“. *Cancer Research* 69 (18): 7338–46. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4419.
- Pfaffl, Michael W, Ales Tichopad, Christian Prgomet, und Tanja P Neuvians. 2004. „Determination of Stable Housekeeping Genes, Differentially Regulated Target Genes and Sample Integrity: BestKeeper--Excel-Based Tool Using Pair-Wise Correlations“. *Biotechnology Letters* 26 (6): 509–15.
- Piccinini, Gina, Roberta Bacchiocchi, Michela Serresi, Caterina Vivani, Silvia Rossetti, Claudia Gennaretti, Damiano Carbonari, und Francesca Fazioli. 2002. „A Ligand-Inducible Epidermal Growth Factor Receptor/anaplastic Lymphoma Kinase Chimera Promotes Mitogenesis and Transforming Properties in 3T3 Cells“. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (25): 22231–39. doi:10.1074/jbc.M111145200.
- Pillay, K, D Govender, und R Chetty. 2002. „ALK Protein Expression in Rhabdomyosarcomas“. *Histopathology* 41 (5): 461–67.
- Ponchel, Frederique, Carmel Toomes, Kieran Bransfield, Fong T Leong, Susan H Douglas, Sarah L Field, Sandra M Bell, et al. 2003. „Real-Time PCR Based on SYBR-Green I Fluorescence: An Alternative to the TaqMan Assay for a Relative Quantification of Gene Rearrangements, Gene Amplifications and Micro Gene Deletions“. *BMC Biotechnology* 3 (Oktober): 18. doi:10.1186/1472-6750-3-18.
- Powers, Ciaran, Achim Aigner, Gerald E Stoica, Kevin McDonnell, und Anton Wellstein. 2002. „Pleiotrophin Signaling through Anaplastic Lymphoma Kinase Is Rate-Limiting for Glioblastoma Growth“. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (16): 14153–58. doi:10.1074/jbc.M112354200.
- Raaschou-Nielsen, Ole, Zorana J Andersen, Rob Beelen, Evangelia Samoli, Massimo Stafoggia, Gudrun Weinmayr, Barbara Hoffmann, et al. 2013. „Air Pollution and Lung Cancer Incidence in 17 European Cohorts: Prospective Analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE)“. *The Lancet Oncology* 14 (9): 813–22. doi:10.1016/S1470-2045(13)70279-1.
- Radonić, Aleksandar, Stefanie Thulke, Ian M Mackay, Olfert Landt, Wolfgang Siegert, und Andreas Nitsche. 2004. „Guideline to Reference Gene Selection for Quantitative Real-Time PCR“. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313 (4): 856–62.
- Ren, Hong, Zhi-Ping Tan, Xin Zhu, Katherine Crosby, Herbert Haack, Jian-Min Ren, Sean Beausoleil, et al. 2012. „Identification of Anaplastic Lymphoma Kinase as a Potential Therapeutic Target in Ovarian Cancer“. *Cancer Research* 72 (13): 3312–23. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3931.
- Ren, Shengxiang, Fred R Hirsch, Marileila Varella-Garcia, Dara L Aisner, Theresa Boyle, Caicun Zhou, und D Ross Camidge. 2014. „Atypical Negative ALK Break-Apart FISH Harboring a Crizotinib-Responsive ALK Rearrangement in Non-Small-Cell Lung Cancer“. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 9 (3): e21–23. doi:10.1097/JTO.000000000000013.
- Riely, Gregory J, Mark G Kris, Daniel Rosenbaum, Jenifer Marks, Allan Li, Dhananjay A Chitale, Khedoudja Nafa, et al. 2008. „Frequency and Distinctive Spectrum of KRAS Mutations in Never Smokers with Lung Adenocarcinoma“. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 14 (18): 5731–34. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0646.
- Rikova, Klarisa, Ailan Guo, Qingfu Zeng, Anthony Possemato, Jian Yu, Herbert Haack, Julie Nardone, et al. 2007. „Global Survey of Phosphotyrosine Signaling Identifies Oncogenic Kinases in Lung Cancer“. *Cell* 131 (6): 1190–1203. doi:10.1016/j.cell.2007.11.025.
- Rimkunas, Victoria M, Katherine E Crosby, Daiqiang Li, Yerong Hu, Meghan E Kelly, Ting-Lei Gu, Jennifer S Mack, Matthew R Silver, Xinmin Zhou, und Herbert Haack. 2012.

- „Analysis of Receptor Tyrosine Kinase ROS1-Positive Tumors in Non-Small Cell Lung Cancer: Identification of a FIG-ROS1 Fusion“. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 18 (16): 4449–57. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-3351.
- Robinson, D R, Y M Wu, und S F Lin. 2000. „The Protein Tyrosine Kinase Family of the Human Genome“. *Oncogene* 19 (49): 5548–57. doi:10.1038/sj.onc.1203957.
- Rodenhuis, S, R J Slebos, A J Boot, S G Evers, W J Mooi, S S Wagenaar, P C van Bodegom, und J L Bos. 1988. „Incidence and Possible Clinical Significance of K-Ras Oncogene Activation in Adenocarcinoma of the Human Lung“. *Cancer Research* 48 (20): 5738–41.
- Rodig, Scott J, Mari Mino-Kenudson, Sanja Dacic, Beow Y Yeap, Alice Shaw, Justine A Barletta, Hannah Stubbs, et al. 2009. „Unique Clinicopathologic Features Characterize ALK-Rearranged Lung Adenocarcinoma in the Western Population“. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 15 (16): 5216–23. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0802.
- Roll, J Devon, und Gary W Reuther. 2012. „ALK-Activating Homologous Mutations in LTK Induce Cellular Transformation“. *PloS One* 7 (2): e31733. doi:10.1371/journal.pone.0031733.
- Roussos, Evanthia T., Michele Balsamo, Shannon K. Alford, Jeffrey B. Wyckoff, Bojana Gligorijevic, Yarong Wang, Maria Pozzuto, et al. 2011. „Mena Invasive (MenaINV) Promotes Multicellular Streaming Motility and Transendothelial Migration in a Mouse Model of Breast Cancer“. *Journal of Cell Science* 124 (Pt 13): 2120–31. doi:10.1242/jcs.086231.
- Sakamoto, Kazuma, und Kenji Kadomatsu. 2012. „Midkine in the Pathology of Cancer, Neural Disease, and Inflammation“. *Pathology International* 62 (7): 445–55. doi:10.1111/j.1440-1827.2012.02815.x.
- Salido, Marta, Lara Pijuan, Luz Martínez-Avilés, Ana B. Galván, Israel Cañadas, Ana Rovira, Montserrat Zanui, et al. 2011. „Increased ALK Gene Copy Number and Amplification Are Frequent in Non-Small Cell Lung Cancer“. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 6 (1): 21–27. doi:10.1097/JTO.0b013e3181fb7cd6.
- Sanchez-Cespedes, Montserrat, Paola Parrella, Manel Esteller, Shuji Nomoto, Barry Trink, James M Engles, William H Westra, James G Herman, und David Sidransky. 2002. „Inactivation of LKB1/STK11 Is a Common Event in Adenocarcinomas of the Lung“. *Cancer Research* 62 (13): 3659–62.
- Sanders, Heather R, Hai-Rong Li, Jean-Marie Bruey, Jay A Scheerle, Aurelia M Meloni-Ehrig, JoAnn C Kelly, Constance Novick, und Maher Albitar. 2011. „Exon Scanning by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction for Detection of Known and Novel EML4-ALK Fusion Variants in Non-Small Cell Lung Cancer“. *Cancer Genetics* 204 (1): 45–52. doi:10.1016/j.cancergencyto.2010.08.024.
- Sandler, Alan, Robert Gray, Michael C Perry, Julie Brahmer, Joan H Schiller, Afshin Dowlati, Rogerio Lilenbaum, und David H Johnson. 2006. „Paclitaxel-Carboplatin Alone or with Bevacizumab for Non-Small-Cell Lung Cancer“. *The New England Journal of Medicine* 355 (24): 2542–50. doi:10.1056/NEJMoa061884.
- Sasaki, Hidefumi, Katsuhiko Okuda, Osamu Kawano, Katsuhiko Endo, Haruhiro Yukiue, Tomoki Yokoyama, Motoki Yano, und Yoshitaka Fujii. 2007. „Nras and Kras Mutation in Japanese Lung Cancer Patients: Genotyping Analysis Using LightCycler“. *Oncology Reports* 18 (3): 623–28.
- Sasaki, Takaaki, Jussi Koivunen, Atsuko Ogino, Masahiko Yanagita, Sarah Nikiforow, Wei Zheng, Christopher Lathan, et al. 2011. „A Novel ALK Secondary Mutation and EGFR Signaling Cause Resistance to ALK Kinase Inhibitors“. *Cancer Research* 71 (18): 6051–60. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1340.
- Scheffe, Jan H, Kerstin E Lehmann, Ivo R Buschmann, Thomas Unger, und Heiko Funke-Kaiser. 2006. „Quantitative Real-Time RT-PCR Data Analysis: Current Concepts and the Novel ‚Gene Expression’s CT Difference’ Formula“. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 84 (11): 901–10. doi:10.1007/s00109-006-0097-6.

- Schulte, Johannes H, Hagen S Bachmann, Bent Brockmeyer, Katleen Depreter, André Oberthür, Sandra Ackermann, Yvonne Kahlert, et al. 2011. „High ALK Receptor Tyrosine Kinase Expression Supersedes ALK Mutation as a Determining Factor of an Unfavorable Phenotype in Primary Neuroblastoma“. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 17 (15): 5082–92. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2809.
- Selinger, Christina I, Toni-Maree Rogers, Prudence A Russell, Sandra O’Toole, Poyee Yip, Gavin M Wright, Zoe Wainer, et al. 2013. „Testing for ALK Rearrangement in Lung Adenocarcinoma: A Multicenter Comparison of Immunohistochemistry and Fluorescent in Situ Hybridization“. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 26 (12): 1545–53. doi:10.1038/modpathol.2013.87.
- Settleman, Jeff. 2009. „Cell Culture Modeling of Genotype-Directed Sensitivity to Selective Kinase Inhibitors: Targeting the Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK)“. *Seminars in Oncology* 36 (2 Suppl 1): S36–41. doi:10.1053/j.seminoncol.2009.02.006.
- Shan, Ling, Fang Lian, Lei Guo, Xin Yang, Jianming Ying, und Dongmei Lin. 2014. „Combination of Conventional Immunohistochemistry and qRT-PCR to Detect ALK Rearrangement“. *Diagnostic Pathology* 9: 3. doi:10.1186/1746-1596-9-3.
- Sharma, Sreenath V, Daphne W Bell, Jeffrey Settleman, und Daniel A Haber. 2007. „Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Lung Cancer“. *Nature Reviews. Cancer* 7 (3): 169–81. doi:10.1038/nrc2088.
- Shaw, Alice T, Dong-Wan Kim, Raneer Mehra, Daniel S W Tan, Enriqueta Felip, Laura Q M Chow, D Ross Camidge, et al. 2014. „Ceritinib in ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer“. *The New England Journal of Medicine* 370 (13): 1189–97. doi:10.1056/NEJMoa1311107.
- Shaw, Alice T, Dong-Wan Kim, Kazuhiko Nakagawa, Takashi Seto, Lucio Crinó, Myung-Ju Ahn, Tommaso De Pas, et al. 2013. „Crizotinib versus Chemotherapy in Advanced ALK-Positive Lung Cancer“. *The New England Journal of Medicine* 368 (25): 2385–94. doi:10.1056/NEJMoa1214886.
- Shaw, Alice T., Sai-Hong I. Ou, Yung-Jue Bang, D. Ross Camidge, Benjamin J. Solomon, Ravi Salgia, Gregory J. Riely, et al. 2014. „Crizotinib in ROS1-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer“. *The New England Journal of Medicine*, September. doi:10.1056/NEJMoa1406766.
- Shaw, Alice T, und Benjamin Solomon. 2011. „Targeting Anaplastic Lymphoma Kinase in Lung Cancer“. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 17 (8): 2081–86. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1591.
- Shaw, Alice T, Benjamin Solomon, und Mari Mino Kenudson. 2011. „Crizotinib and Testing for ALK“. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN* 9 (12): 1335–41.
- Shaw, Alice T, Beow Y Yeap, Mari Mino-Kenudson, Subba R Digumarthy, Daniel B Costa, Rebecca S Heist, Benjamin Solomon, et al. 2009. „Clinical Features and Outcome of Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer Who Harbor EML4-ALK“. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (26): 4247–53. doi:10.1200/JCO.2009.22.6993.
- Shaw, Reuben J., und Lewis C. Cantley. 2006. „Ras, PI(3)K and mTOR Signalling Controls Tumour Cell Growth“. *Nature* 441 (7092): 424–30. doi:10.1038/nature04869.
- Shepherd, F A, J Dancey, R Ramlau, K Mattson, R Gralla, M O’Rourke, N Levitan, et al. 2000. „Prospective Randomized Trial of Docetaxel versus Best Supportive Care in Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer Previously Treated with Platinum-Based Chemotherapy“. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 18 (10): 2095–2103.
- Shepherd, Frances A, José Rodrigues Pereira, Tudor Ciuleanu, Eng Huat Tan, Vera Hirsh, Sumitra Thongprasert, Daniel Campos, et al., National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. 2005. „Erlotinib in Previously Treated Non-Small-Cell Lung

- Cancer". *The New England Journal of Medicine* 353 (2): 123–32. doi:10.1056/NEJMoa050753.
- Shigematsu, Hisayuki, und Adi F Gazdar. 2006. „Somatic Mutations of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Pathway in Lung Cancers“. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 118 (2): 257–62. doi:10.1002/ijc.21496.
- Shigematsu, Hisayuki, Li Lin, Takao Takahashi, Masaharu Nomura, Makoto Suzuki, Ignacio I Wistuba, Kwun M Fong, et al. 2005. „Clinical and Biological Features Associated with Epidermal Growth Factor Receptor Gene Mutations in Lung Cancers“. *Journal of the National Cancer Institute* 97 (5): 339–46. doi:10.1093/jnci/dji055.
- Sholl, Lynette M, Heather Sun, Mohit Butaney, Chengsheng Zhang, Charles Lee, Pasi A Jänne, und Scott J Rodig. 2013. „ROS1 Immunohistochemistry for Detection of ROS1-Rearranged Lung Adenocarcinomas“. *The American Journal of Surgical Pathology* 37 (9): 1441–49. doi:10.1097/PAS.0b013e3182960fa7.
- Shtivelman, Emma, Thomas Hensing, George R. Simon, Phillip A. Dennis, Gregory A. Otterson, Raphael Bueno, und Ravi Salgia. 2014. „Molecular pathways and therapeutic targets in lung cancer“. *Oncotarget* 5 (6): 1392–1433.
- Siegfried, Zahava, Serena Bonomi, Claudia Ghigna, und Rotem Karni. 2013. „Regulation of the Ras-MAPK and PI3K-mTOR Signalling Pathways by Alternative Splicing in Cancer“. *International Journal of Cell Biology* 2013. doi:10.1155/2013/568931.
- Soda, Manabu, Young Lim Choi, Munehiro Enomoto, Shuji Takada, Yoshihiro Yamashita, Shunpei Ishikawa, Shin-ichiro Fujiwara, et al. 2007. „Identification of the Transforming EML4-ALK Fusion Gene in Non-Small-Cell Lung Cancer“. *Nature* 448 (7153): 561–66. doi:10.1038/nature05945.
- Soda, Manabu, Shuji Takada, Kengo Takeuchi, Young Lim Choi, Munehiro Enomoto, Toshihide Ueno, Hidenori Haruta, et al. 2008. „A Mouse Model for EML4-ALK-Positive Lung Cancer“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (50): 19893–97. doi:10.1073/pnas.0805381105.
- Søes, Signe, Brita Singers Sørensen, Jan Alsner, Jens Overgaard, Henrik Hager, Lise Lotte Hansen, und Lasse Sommer Kristensen. 2013. „Identification of Accurate Reference Genes for RT-qPCR Analysis of Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue from Primary Non-Small Cell Lung Cancers and Brain and Lymph Node Metastases“. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 81 (2): 180–86. doi:10.1016/j.lungcan.2013.04.007.
- Sonnenberg, E, A Gödecke, B Walter, F Bladt, und C Birchmeier. 1991. „Transient and Locally Restricted Expression of the *ros1* Protooncogene during Mouse Development“. *The EMBO Journal* 10 (12): 3693–3702.
- Sonnenberg-Riethmacher, E, B Walter, D Riethmacher, S Gödecke, und C Birchmeier. 1996. „The c-Ros Tyrosine Kinase Receptor Controls Regionalization and Differentiation of Epithelial Cells in the Epididymis“. *Genes & Development* 10 (10): 1184–93.
- Souttou, B, N B Carvalho, D Raulais, und M Vigny. 2001. „Activation of Anaplastic Lymphoma Kinase Receptor Tyrosine Kinase Induces Neuronal Differentiation through the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway“. *The Journal of Biological Chemistry* 276 (12): 9526–31. doi:10.1074/jbc.M007333200.
- Stein, H, H D Foss, H Dürkop, T Marafioti, G Delsol, K Pulford, S Pileri, und B Falini. 2000. „CD30(+) Anaplastic Large Cell Lymphoma: A Review of Its Histopathologic, Genetic, and Clinical Features“. *Blood* 96 (12): 3681–95.
- Stenhouse, G., N. Fyfe, G. King, A. Chapman, und K. M. Kerr. 2004. „Thyroid Transcription Factor 1 in Pulmonary Adenocarcinoma“. *Journal of Clinical Pathology* 57 (4): 383–87.
- Stoica, G E, A Kuo, A Aigner, I Sunitha, B Souttou, C Malerczyk, D J Caughey, et al. 2001. „Identification of Anaplastic Lymphoma Kinase as a Receptor for the Growth Factor Pleiotrophin“. *The Journal of Biological Chemistry* 276 (20): 16772–79. doi:10.1074/jbc.M010660200.
- Stoica, Gerald E, Angera Kuo, Ciaran Powers, Emma T Bowden, Elaine Buchert Sale, Anna T Riegel, und Anton Wellstein. 2002. „Midkine Binds to Anaplastic Lymphoma Kinase

- (ALK) and Acts as a Growth Factor for Different Cell Types“. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (39): 35990–98. doi:10.1074/jbc.M205749200.
- Suda, Kenichi, Kenji Tomizawa, Yasushi Yatabe, und Tetsuya Mitsudomi. 2011. „Lung Cancers Unrelated to Smoking: Characterized by Single Oncogene Addiction?“. *International Journal of Clinical Oncology* 16 (4): 294–305. doi:10.1007/s10147-011-0262-y.
- Suehara, Yoshiyuki, Maria Arcila, Lu Wang, Adnan Hasanovic, Daphne Ang, Tatsuo Ito, Yuki Kimura, et al. 2012. „Identification of KIF5B-RET and GOPC-ROS1 Fusions in Lung Adenocarcinomas through a Comprehensive mRNA-Based Screen for Tyrosine Kinase Fusions“. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 18 (24): 6599–6608. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0838.
- Sukov, William R, Jennelle C Hodge, Christine M Lohse, Monica K Akre, Bradley C Leibovich, R Houston Thompson, und John C Cheville. 2012. „ALK Alterations in Adult Renal Cell Carcinoma: Frequency, Clinicopathologic Features and Outcome in a Large Series of Consecutively Treated Patients“. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 25 (11): 1516–25. doi:10.1038/modpathol.2012.107.
- Sun, Jong-Mu, Yoon-La Choi, Jae-Kyung Won, Fred R Hirsch, Jin Seok Ahn, Myung-Ju Ahn, und Keunchil Park. 2012. „A Dramatic Response to Crizotinib in a Non-Small-Cell Lung Cancer Patient with IHC-Positive and FISH-Negative ALK“. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 7 (12): e36–38. doi:10.1097/JTO.0b013e318274694e.
- Sun, Sophie, Joan H Schiller, und Adi F Gazdar. 2007. „Lung Cancer in Never Smokers--a Different Disease“. *Nature Reviews. Cancer* 7 (10): 778–90. doi:10.1038/nrc2190.
- Sutani, A, Y Nagai, K Udagawa, Y Uchida, N Koyama, Y Murayama, T Tanaka, et al. 2006. „Gefitinib for Non-Small-Cell Lung Cancer Patients with Epidermal Growth Factor Receptor Gene Mutations Screened by Peptide Nucleic Acid-Locked Nucleic Acid PCR Clamp“. *British Journal of Cancer* 95 (11): 1483–89. doi:10.1038/sj.bjc.6603466.
- Suzuki, Kazufumi, und Hisahiro Matsubara. 2011. „Recent Advances in p53 Research and Cancer Treatment“. *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 2011: 978312. doi:10.1155/2011/978312.
- Suzuki, T, P J Higgins, und D R Crawford. 2000. „Control Selection for RNA Quantitation“. *BioTechniques* 29 (2): 332–37.
- Szeles, Anna. 2002. „Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) in the Molecular Cytogenetics of Cancer“. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 49 (1): 69–80. doi:10.1556/AMicr.49.2002.1.7.
- Takahashi, T, M M Nau, I Chiba, M J Birrer, R K Rosenberg, M Vinocour, M Levitt, H Pass, A F Gazdar, und J D Minna. 1989. „p53: A Frequent Target for Genetic Abnormalities in Lung Cancer“. *Science (New York, N. Y.)* 246 (4929): 491–94.
- Takeuchi, Kengo, Young Lim Choi, Manabu Soda, Kentaro Inamura, Yuki Togashi, Satoko Hatano, Munehiro Enomoto, et al. 2008. „Multiplex Reverse Transcription-PCR Screening for EML4-ALK Fusion Transcripts“. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 14 (20): 6618–24. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1018.
- Takeuchi, Kengo, Young Lim Choi, Yuki Togashi, Manabu Soda, Satoko Hatano, Kentaro Inamura, Shuji Takada, et al. 2009. „KIF5B-ALK, a Novel Fusion Oncokinase Identified by an Immunohistochemistry-Based Diagnostic System for ALK-Positive Lung Cancer“. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 15 (9): 3143–49. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-3248.
- Takeuchi, Kengo, Manabu Soda, Yuki Togashi, Ritsuro Suzuki, Seiji Sakata, Satoko Hatano, Reimi Asaka, et al. 2012. „RET, ROS1 and ALK Fusions in Lung Cancer“. *Nature Medicine* 18 (3): 378–81. doi:10.1038/nm.2658.
- Takezawa, Ken, Isamu Okamoto, Kazuto Nishio, Pasi A Jänne, und Kazuhiko Nakagawa. 2011. „Role of ERK-BIM and STAT3-Survivin Signaling Pathways in ALK Inhibitor-

- Induced Apoptosis in EML4-ALK-Positive Lung Cancer". *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 17 (8): 2140–48. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2798.
- Tamura, K, I Okamoto, T Kashii, S Negoro, T Hirashima, S Kudoh, Y Ichinose, et al., West Japan Thoracic Oncology Group. 2008. „Multicentre Prospective Phase II Trial of Gefitinib for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer with Epidermal Growth Factor Receptor Mutations: Results of the West Japan Thoracic Oncology Group Trial (WJTOG0403)". *British Journal of Cancer* 98 (5): 907–14. doi:10.1038/sj.bjc.6604249.
- Tanic, Nikola, Milka Perovic, Aleksandra Mladenovic, Sabera Ruzdijic, und Selma Kanazir. 2007. „Effects of Aging, Dietary Restriction and Glucocorticoid Treatment on Housekeeping Gene Expression in Rat Cortex and Hippocampus-Evaluation by Real Time RT-PCR". *Journal of Molecular Neuroscience: MN* 32 (1): 38–46.
- Thunnissen, Erik, Lukas Bubendorf, Manfred Dietel, Göran Elmberger, Keith Kerr, Fernando Lopez-Rios, Holger Moch, et al. 2012. „EML4-ALK Testing in Non-Small Cell Carcinomas of the Lung: A Review with Recommendations". *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology* 461 (3): 245–57. doi:10.1007/s00428-012-1281-4.
- Togashi, Yuki, Manabu Soda, Seiji Sakata, Emiko Sugawara, Satoko Hatano, Reimi Asaka, Takashi Nakajima, Hiroyuki Mano, und Kengo Takeuchi. 2012. „KLC1-ALK: A Novel Fusion in Lung Cancer Identified Using a Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Only". *PloS One* 7 (2): e31323. doi:10.1371/journal.pone.0031323.
- Touriol, C, C Greenland, L Lamant, K Pulford, F Bernard, T Rousset, D Y Mason, und G Delsol. 2000. „Further Demonstration of the Diversity of Chromosomal Changes Involving 2p23 in ALK-Positive Lymphoma: 2 Cases Expressing ALK Kinase Fused to CLTCL (clathrin Chain Polypeptide-Like)". *Blood* 95 (10): 3204–7.
- Toyoshima, H, H Kozutsumi, Y Maru, K Hagiwara, A Furuya, H Mioh, N Hanai, F Takaku, Y Yazaki, und H Hirai. 1993. „Differently Spliced cDNAs of Human Leukocyte Tyrosine Kinase Receptor Tyrosine Kinase Predict Receptor Proteins with and without a Tyrosine Kinase Domain and a Soluble Receptor Protein". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (12): 5404–8.
- Trask, B J. 1991. „Fluorescence in Situ Hybridization: Applications in Cytogenetics and Gene Mapping". *Trends in Genetics: TIG* 7 (5): 149–54.
- Travis, William D, Elisabeth Brambilla, Masayuki Noguchi, Andrew G Nicholson, Kim R Geisinger, Yasushi Yatabe, David G Beer, et al. 2011. „International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma". *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 6 (2): 244–85. doi:10.1097/JTO.0b013e318206a221.
- Travis, William D, Elisabeth Brambilla, Masayuki Noguchi, Andrew G Nicholson, Kim Geisinger, Yasushi Yatabe, Yuichi Ishikawa, et al. 2013. „Diagnosis of Lung Cancer in Small Biopsies and Cytology: Implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society Classification". *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 137 (5): 668–84. doi:10.5858/arpa.2012-0263-RA.
- Tsuchiya, Karen D. 2011. „Fluorescence in Situ Hybridization". *Clinics in Laboratory Medicine* 31 (4): 525–42, vii – viii. doi:10.1016/j.cll.2011.08.011.
- Tsutsui, J, K Kadomatsu, S Matsubara, A Nakagawara, M Hamanoue, S Takao, H Shimazu, Y Ohi, und T Muramatsu. 1993. „A New Family of Heparin-Binding Growth/differentiation Factors: Increased Midkine Expression in Wilms' Tumor and Other Human Carcinomas". *Cancer Research* 53 (6): 1281–85.
- Turner, Suzanne D., Debra Yeung, Kathryn Hadfield, Simon J. Cook, und Denis R. Alexander. 2007. „The NPM-ALK Tyrosine Kinase Mimics TCR Signalling Pathways, Inducing NFAT and AP-1 by RAS-Dependent Mechanisms". *Cellular Signalling* 19 (4): 740–47. doi:10.1016/j.cellsig.2006.09.007.
- Ueno, H, H Honda, T Nakamoto, T Yamagata, K Sasaki, K Miyagawa, K Mitani, Y Yazaki, und H Hirai. 1997. „The Phosphatidylinositol 3' Kinase Pathway Is Required for the

- Survival Signal of Leukocyte Tyrosine Kinase". *Oncogene* 14 (25): 3067–72. doi:10.1038/sj.onc.1201153.
- Ueno, H, K Sasaki, H Kozutsumi, K Miyagawa, K Mitani, Y Yazaki, und H Hirai. 1996. „Growth and Survival Signals Transmitted via Two Distinct NPXY Motifs within Leukocyte Tyrosine Kinase, an Insulin Receptor-Related Tyrosine Kinase". *The Journal of Biological Chemistry* 271 (44): 27707–14.
- Vandesompele, Jo, Kathleen De Preter, Filip Pattyn, Bruce Poppe, Nadine Van Roy, Anne De Paepe, und Frank Speleman. 2002. „Accurate Normalization of Real-Time Quantitative RT-PCR Data by Geometric Averaging of Multiple Internal Control Genes". *Genome Biology* 3 (7): RESEARCH0034.
- VanGuilder, Heather D, Kent E Vrana, und Willard M Freeman. 2008. „Twenty-Five Years of Quantitative PCR for Gene Expression Analysis". *BioTechniques* 44 (5): 619–26. doi:10.2144/000112776.
- Varella-Garcia, Marileila. 2010. „Chromosomal and Genomic Changes in Lung Cancer". *Cell Adhesion & Migration* 4 (1): 100–106.
- Vega, Francisco, L Jeffrey Medeiros, Vasiliki Leventaki, Coralyn Atwell, Jeong Hee Cho-Vega, Ling Tian, Francois-Xavier Claret, und George Z Rassidakis. 2006. „Activation of Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway Contributes to Tumor Cell Survival in Anaplastic Lymphoma Kinase-Positive Anaplastic Large Cell Lymphoma". *Cancer Research* 66 (13): 6589–97. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3018.
- Vernersson, Emma, Nelson K S Khoo, Maria L Henriksson, Göran Roos, Ruth H Palmer, und Bengt Hallberg. 2006. „Characterization of the Expression of the ALK Receptor Tyrosine Kinase in Mice". *Gene Expression Patterns: GEP* 6 (5): 448–61. doi:10.1016/j.modgep.2005.11.006.
- Vineis, P, M Alavanja, P Buffler, E Fontham, S Franceschi, Y T Gao, P C Gupta, et al. 2004. „Tobacco and Cancer: Recent Epidemiological Evidence". *Journal of the National Cancer Institute* 96 (2): 99–106.
- V Laffert, Maximilian, Arne Warth, Roland Penzel, Peter Schirmacher, Danny Jonigk, Hans Kreipe, Hans-Ulrich Schildhaus, et al. 2013. „Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) Gene Rearrangement in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): Results of a Multi-Centre ALK-Testing". *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 81 (2): 200–206. doi:10.1016/j.lungcan.2013.04.015.
- Voena, Claudia, Chiara Conte, Chiara Ambrogio, Elisabetta Boeri Erba, Francesco Boccalatte, Shabaz Mohammed, Ole N Jensen, Giorgio Palestro, Giorgio Inghirami, und Roberto Chiarle. 2007. „The Tyrosine Phosphatase Shp2 Interacts with NPM-ALK and Regulates Anaplastic Lymphoma Cell Growth and Migration". *Cancer Research* 67 (9): 4278–86. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4350.
- Vogel, Christine, und Edward M. Marcotte. 2012. „Insights into the Regulation of Protein Abundance from Proteomic and Transcriptomic Analyses". *Nature Reviews. Genetics* 13 (4): 227–32. doi:10.1038/nrg3185.
- Von Laffert, Maximilian, Roland Penzel, Peter Schirmacher, Arne Warth, Dido Lenze, Michael Hummel, und Manfred Dietel. 2014. „Multicenter ALK Testing in Non-Small-Cell Lung Cancer: Results of a Round Robin Test". *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, August. doi:10.1097/JTO.0000000000000307.
- Wakelee, Heather, Sarita Dubey, und David Gandara. 2007. „Optimal Adjuvant Therapy for Non-Small Cell Lung Cancer--How to Handle Stage I Disease". *The Oncologist* 12 (3): 331–37. doi:10.1634/theoncologist.12-3-331.
- Walter, Annette O, Robert Tjin Tham Sjin, Henry J Haringsma, Kadoaki Ohashi, Jing Sun, Kwangho Lee, Aleksandr Dubrovskiy, et al. 2013. „Discovery of a Mutant-Selective Covalent Inhibitor of EGFR That Overcomes T790M-Mediated Resistance in NSCLC". *Cancer Discovery* 3 (12): 1404–15. doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0314.
- Wang, Rui, Yunjian Pan, Chenguang Li, Haichuan Hu, Yang Zhang, Hang Li, Xiaoyang Luo, et al. 2012. „The Use of Quantitative Real-Time Reverse Transcriptase PCR for 5' and 3' Portions of ALK Transcripts to Detect ALK Rearrangements in Lung Cancers".

- Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 18 (17): 4725–32. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0677.
- Wang, Ying, Shumin Wang, Shiguang Xu, Jiaqi Qu, und Bo Liu. 2014. „Clinicopathologic Features of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer Harboring the EML4-ALK Fusion Gene: A Meta-Analysis“. *PloS One* 9 (10): e110617. doi:10.1371/journal.pone.0110617.
- Wang, Yi-Wei, Pang-Hsien Tu, Kuen-Tyng Lin, Shu-Chen Lin, Jenq-Yuh Ko, und Yuh-Shan Jou. 2011. „Identification of Oncogenic Point Mutations and Hyperphosphorylation of Anaplastic Lymphoma Kinase in Lung Cancer“. *Neoplasia (New York, N.Y.)* 13 (8): 704–15.
- Warth, Arne, Thomas Muley, Hendrik Dienemann, Benjamin Goeppert, Albrecht Stenzinger, Philipp A. Schnabel, Peter Schirmacher, Roland Penzel, und Wilko Weichert. 2014. „ROS1 Expression and Translocations in Non-Small-Cell Lung Cancer: Clinicopathological Analysis of 1478 Cases“. *Histopathology*, Januar. doi:10.1111/his.12379.
- Webb, James D, und M Celeste Simon. 2010. „Novel Insights into the Molecular Origins and Treatment of Lung Cancer“. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 9 (20): 4098–4105.
- Weir, Barbara A, Michele S Woo, Gad Getz, Sven Perner, Li Ding, Rameen Beroukhi, William M Lin, et al. 2007. „Characterizing the Cancer Genome in Lung Adenocarcinoma“. *Nature* 450 (7171): 893–98. doi:10.1038/nature06358.
- Weiss, Joseph B, Changhui Xue, Ted Benice, Liquan Xue, Stephan W Morris, und Jacob Raber. 2012. „Anaplastic Lymphoma Kinase and Leukocyte Tyrosine Kinase: Functions and Genetic Interactions in Learning, Memory and Adult Neurogenesis“. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 100 (3): 566–74. doi:10.1016/j.pbb.2011.10.024.
- Wellmann, A, V Doseeva, W Butscher, M Raffeld, P Fukushima, M Stetler-Stevenson, und K Gardner. 1997. „The Activated Anaplastic Lymphoma Kinase Increases Cellular Proliferation and Oncogene up-Regulation in Rat 1a Fibroblasts“. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 11 (12): 965–72.
- Wong, Daisy Wing-Sze, Elaine Lai-Han Leung, Kimpton Kam-Ting So, Issan Yee-San Tam, Alan Dart-Loon Sihoe, Lik-Cheung Cheng, Kwok-Keung Ho, et al. 2009. „The EML4-ALK Fusion Gene Is Involved in Various Histologic Types of Lung Cancers from Nonsmokers with Wild-Type EGFR and KRAS“. *Cancer* 115 (8): 1723–33. doi:10.1002/cncr.24181.
- Wu, Yi-Cheng, Il-Chi Chang, Chi-Liang Wang, Tai-Di Chen, Ya-Ting Chen, Hui-Ping Liu, Yen Chu, et al. 2013. „Comparison of IHC, FISH and RT-PCR Methods for Detection of ALK Rearrangements in 312 Non-Small Cell Lung Cancer Patients in Taiwan“. *PloS One* 8 (8): e70839. doi:10.1371/journal.pone.0070839.
- Wynes, Murry W, Lynette M Sholl, Manfred Dietel, Ed Schuuring, Ming S Tsao, Yasushi Yatabe, Raymond R Tubbs, und Fred R Hirsch. 2014. „An International Interpretation Study Using the ALK IHC Antibody D5F3 and a Sensitive Detection Kit Demonstrates High Concordance between ALK IHC and ALK FISH and between Evaluators“. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 9 (5): 631–38. doi:10.1097/JTO.000000000000115.
- Xiong, Q, J L Chan, C S Zong, und L H Wang. 1996. „Two Chimeric Receptors of Epidermal Growth Factor Receptor and c-Ros That Differ in Their Transmembrane Domains Have Opposite Effects on Cell Growth“. *Molecular and Cellular Biology* 16 (4): 1509–18.
- Yamada, Shigeru, Takashi Nomura, Kota Takano, Satoshi Fujita, Masato Miyake, und Jun Miyake. 2008. „Expression of a Chimeric CSF1R-LTK Mediates Ligand-Dependent Neurite Outgrowth“. *Neuroreport* 19 (17): 1733–38. doi:10.1097/WNR.0b013e3283186bf8.
- Yang, Hai-Ling, Therese Eriksson, Emma Vernersson, Marc Vigny, Bengt Hallberg, und Ruth H Palmer. 2007. „The Ligand Jelly Belly (Jeb) Activates the Drosophila Alk RTK to Drive PC12 Cell Differentiation, but Is Unable to Activate the Mouse ALK RTK“.

- Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular and Developmental Evolution* 308 (3): 269–82. doi:10.1002/jez.b.21146.
- Yasuda, Hiroyuki, Lorena L. de Figueiredo-Pontes, Susumu Kobayashi, und Daniel B. Costa. 2012. „Preclinical rationale for use of the clinically-available multitargeted tyrosine kinase inhibitor crizotinib in ROS1 translocated lung cancer“. *Journal of Thoracic Oncology* 7 (7): 1086–90. doi:10.1097/JTO.0b013e3182570919.
- Yatabe, Yasushi, Tetsuya Mitsudomi, und Takashi Takahashi. 2002. „TTF-1 Expression in Pulmonary Adenocarcinomas“. *The American Journal of Surgical Pathology* 26 (6): 767–73.
- Yi, Eunhee S, Jennifer M Boland, Joseph J Maleszewski, Anja C Roden, Andre M Oliveira, Marie-Christine Aubry, Michele R Erickson-Johnson, et al. 2011. „Correlation of IHC and FISH for ALK Gene Rearrangement in Non-Small Cell Lung Carcinoma: IHC Score Algorithm for FISH“. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 6 (3): 459–65. doi:10.1097/JTO.0b013e318209edb9.
- Ying, J, L Guo, T Qiu, L Shan, Y Ling, X Liu, und N Lu. 2013. „Diagnostic Value of a Novel Fully Automated Immunohistochemistry Assay for Detection of ALK Rearrangement in Primary Lung Adenocarcinoma“. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 24 (10): 2589–93. doi:10.1093/annonc/mdt295.
- Yoshida, Akihiko, Takashi Kohno, Koji Tsuta, Susumu Wakai, Yasuhito Arai, Yoko Shimada, Hisao Asamura, Koh Furuta, Tatsuhiro Shibata, und Hitoshi Tsuda. 2013. „ROS1-Rearranged Lung Cancer: A Clinicopathologic and Molecular Study of 15 Surgical Cases“. *The American Journal of Surgical Pathology* 37 (4): 554–62. doi:10.1097/PAS.0b013e3182758fe6.
- Yoshida, Akihiko, Tatsuhiro Shibata, Koji Tsuta, Shun-Ichi Watanabe, und Hitoshi Tsuda. 2013. „Inflammatory Myofibroblastic Tumour of the Lung with a Novel PPFIBP1-ALK Fusion Variant“. *Histopathology* 63 (6): 881–83. doi:10.1111/his.12218.
- Yoshida, Akihiko, Koji Tsuta, Harumi Nakamura, Takashi Kohno, Fumiaki Takahashi, Hisao Asamura, Ikuo Sekine, et al. 2011. „Comprehensive Histologic Analysis of ALK-Rearranged Lung Carcinomas“. *The American Journal of Surgical Pathology* 35 (8): 1226–34. doi:10.1097/PAS.0b013e3182233e06.
- Yoshida, Akihiko, Koji Tsuta, Susumu Wakai, Yasuhito Arai, Hisao Asamura, Tatsuhiro Shibata, Koh Furuta, Takashi Kohno, und Ryoji Kushima. 2013. „Immunohistochemical Detection of ROS1 Is Useful for Identifying ROS1 Rearrangements in Lung Cancers“. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, November. doi:10.1038/modpathol.2013.192.
- Youlten, Danny R, Susanna M Cramb, und Peter D Baade. 2008. „The International Epidemiology of Lung Cancer: Geographical Distribution and Secular Trends“. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 3 (8): 819–31. doi:10.1097/JTO.0b013e31818020eb.
- Zamo, Alberto, Roberto Chiarle, Roberto Piva, Jennifer Howes, Yan Fan, Marco Chilosi, David E Levy, und Giorgio Inghirami. 2002. „Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) Activates Stat3 and Protects Hematopoietic Cells from Cell Death“. *Oncogene* 21 (7): 1038–47. doi:10.1038/sj.onc.1205152.
- Zhang, Yun-Gang, Mu-Lan Jin, Li Li, Hong-Ying Zhao, Xuan Zeng, Lei Jiang, Ping Wei, et al. 2013. „Evaluation of ALK Rearrangement in Chinese Non-Small Cell Lung Cancer Using FISH, Immunohistochemistry, and Real-Time Quantitative RT-PCR on Paraffin-Embedded Tissues“. *PloS One* 8 (5): e64821. doi:10.1371/journal.pone.0064821.
- Zhou, Yong-Qing, Chao He, Yi-Qing Chen, Dong Wang, und Ming-Hai Wang. 2003. „Altered Expression of the RON Receptor Tyrosine Kinase in Primary Human Colorectal Adenocarcinomas: Generation of Different Splicing RON Variants and Their Oncogenic Potential“. *Oncogene* 22 (2): 186–97. doi:10.1038/sj.onc.1206075.
- Zong, C S, L Zeng, Y Jiang, H B Sadowski, und L H Wang. 1998. „Stat3 Plays an Important Role in Oncogenic Ros- and Insulin-like Growth Factor I Receptor-Induced

- Anchorage-Independent Growth“. *The Journal of Biological Chemistry* 273 (43): 28065–72.
- Zou, Peng, Hisako Muramatsu, Michihiko Sone, Hideo Hayashi, Tsutomu Nakashima, und Takashi Muramatsu. 2006. „Mice Doubly Deficient in the Midkine and Pleiotrophin Genes Exhibit Deficits in the Expression of Beta-Tectorin Gene and in Auditory Response“. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 86 (7): 645–53. doi:10.1038/labinvest.3700428.

VI. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit unter Einhaltung des §5(2) der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Tübingen selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen verfasst habe. Alle verwendeten Zitate oder Inhalte anderer Autoren sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Stuttgart, Februar 2016

VII. Danksagung

Prof. Ott danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in der AG Pathologie durchführen zu können und die Überlassung des interessanten Themas, für die hilfreichen Besprechungen und Ideen sowie die hervorragende fachliche Unterstützung bei der Auswertung und Beurteilung immunhistochemischer Färbungen.

Bei Prof Schwab möchte ich mich für die Übernahme der Betreuung sowie der Möglichkeit, die Arbeit am Institut für Klinische Pharmakologie durchführen zu können, herzlich bedanken.

Auch Prof. Ruth danke ich für die Übernahme der Betreuung und der Begutachtung, die mir diese externe Doktorarbeit ermöglicht hat.

Bei Dr. Claudia Kalla möchte ich mich sehr herzlich für die herausragende fachliche Anleitung sowie die positive und motivierende Art, das Korrekturlesen der Arbeit und die vielen fundierten Ratschläge bedanken.

Annette Staiger und Dr. Heike Horn danke ich besonders für die vielen Gespräche und Anregungen, sehr hilfreichen Besprechungen und kritischen Diskussionen.

Für die kompetente Unterstützung und Hilfe im Labor, die immer positive, fröhliche Art und für die tolle Zusammenarbeit danke ich ganz herzlich Katja Bräutigam sowie Petra Hitschke, Stefanie Laukemann und Susanne Gutzeit.

Dr. Andreas Grabner und Dr. Sabine Bode danke ich für die fachliche Unterstützung in Bezug auf die Histologie der Tumore. Daniela Rau möchte ich für die kompetente Hilfe bei immunhistochemischen Färbungen danken.

Ein Besonderer Dank geht an meine Arbeitsgruppe AG Ott, meine Labor- sowie Bürokollegen für die interessanten Gespräche und die angenehme und schöne Zeit am IKP.

Meiner Familie danke ich für die Unterstützung und Rückhalt in allen Lebenslagen.

VIII. Anhang

Primer

Primer Referenzgene

Bezeichnung	Gen/Lokalisation	Sequenz
PGK_TM_C ^a	<i>PGK1</i> Exon 9	CTGCTGGCTGGATGGGC
PGK_TM_D ^a	<i>PGK1</i> Exon 9	ATCTGCTTAGCCCGAGTG
COX4I1_TM3 ^a	<i>COX4I1</i> Exon 3	GAGAAAGTCGAGTTGTATCG
COX4I1_TM4 ^a	<i>COX4I1</i> Exon 4	GTCTTCCACTCGTTTCGAG
LAMIN_B1_fwd ^a	<i>Lamin B1</i> Exon 1/2	GCTGCTCCTCAACTATGCTAAGAA
LAMIN_B1_rev ^a	<i>Lamin B1</i> Exon 2	TCTTTCGAATTCAGTGCTGCTTC
ACTB_TM2 ^a	<i>ACTB</i> Exon 2	GCGATATCATCATCCATGG
ACTB_TM1 ^b	<i>ACTB</i> Exon 1	AGCCTCGCCTTTGCCGA
KPNA4_TM1 ^a	<i>KPNA4</i> Exon 1	CCATGGCGGACAACGAG
KPNA4_TM2 ^a	<i>KPNA4</i> Exon 2	CATAGTCTCCAAGTCGCG

^a Primer zur Verfügung gestellt von C. Kalla, ^b Primer-Sequenzen von (Kreuzer et al. 1999)

Primer qRT-PCR ALK

Bezeichnung	Gen/Lokalisation	Sequenz
ALK_TM3	<i>ALK</i> Exon 25	TCAAGAGGCAGTTTCTGG
ALK_TM4	<i>ALK</i> Exon 24	TCGGGACATTGCCTGTGG
ALK_TM5	<i>ALK</i> Exon 4	AGGGAAGCATGGTTGGAC
ALK_TM6	<i>ALK</i> Exon 5	GCCACTCGAAATGGGTTG

Primer Sequenzierungen ALK

Bezeichnung	Gen/Lokalisation	Sequenz
ALK20ex_R ^c	<i>ALK</i> Intron 20	5'- GAGTCTGCGGTGCTGTGATA-3'
ALK20ex_F ^c	<i>ALK</i> Intron 19	5'- TCAGAGCTCAGGGGAGGATA-3'
ALK20ex_NR1	<i>ALK</i> Intron 20	5'-AACATTCAGCCCCTACACTG-3'
ALK20ex_NR2	<i>ALK</i> Intron 20	5'-TGCTGTGATAACATTTCAGCC-3'
ALK20ex_NF	<i>ALK</i> Intron 19	5'-GAAGTGGCCTGTGTAGTGC-3'
ALK21_22ex_R ^c	<i>ALK</i> Intron 22	5'- AACCATCAAGGGTTGTTCCA-3'
ALK21_22ex_F ^c	<i>ALK</i> Intron 20	5'- CCCAGCTGCCTCATTATTGT-3'
ALK21_22ex_NR	<i>ALK</i> Intron 22	5'-GTAAGAAGTGTCTAGAATGTTTG-3'
ALK21_22ex_NF	<i>ALK</i> Intron 20	5'-CATTATTGTGGCCTGTTTGAC-3'
ALK23ex_R ^c	<i>ALK</i> Intron 23	5'- TCCATTCTCTCCAGCCAGT-3'
ALK23ex_F ^c	<i>ALK</i> Intron 22	5'- ACCTGCTCACCAGCAAGATT-3'
ALK23ex_NR	<i>ALK</i> Intron 23	5'-TGTCCAAGCCTAAAGTTGAC-3'
ALK23ex_NF	<i>ALK</i> Intron 22	5'-TTGTAGCTGCTGAAAATGTAAC-3'
ALK24ex_R	<i>ALK</i> Intron 24	5'-AGCTGAATCATCCTACATCC-3'
ALK24ex_F	<i>ALK</i> Intron 23	5'-TTCACGGTCTGCCTCCTTG-3'
ALK24ex_NR	<i>ALK</i> Intron 24	5'-ACATCCAAATGGCTCTGGAG-3'
ALK24ex_NF	<i>ALK</i> Intron 23	5'-TTCACGGTCTGCCTCCTTG-3'
ALK25ex_R ^c	<i>ALK</i> Intron 25	5'- GTGATCCCAGATTTAGGCCTTC-3'
ALK25ex_F ^c	<i>ALK</i> Intron 24	5'- CATTTCCTAATCCTTTTCCA-3'

ALK25ex_NR	<i>ALK</i> Intron 25	5'-TTAAGGTTTCCCATAGCCTG-3'
ALK25ex_NF1	<i>ALK</i> Intron 24	5'-TTCCATTTCTCTCTTAGTTGTG-3'
ALK25ex_NF2	<i>ALK</i> Intron 24	5'-CTAGTGATGGCCGTTGTAC-3'
ALK26ex_R ^c	<i>ALK</i> Intron 26	5'-CTAGTGATGGCCGTTGTAC-3'
ALK26ex_F ^c	<i>ALK</i> Intron 25	5'-GCCTCTCGTGGTTTGTGTTTGTGTC-3'
ALK26ex_NR ^c	<i>ALK</i> Intron 26	5'-CAGGGATACCTGGAGGATGA-3'
ALK26ex_NF ^c	<i>ALK</i> Intron 25	5'-CCTGCTCTCCTCCTGAACC-3'
ALK27ex_R ^c	<i>ALK</i> Intron 27	5'-CAGTCACATTCGCATCTTGG-3'
ALK27ex_F ^c	<i>ALK</i> Intron 26	5'-GAATGTGGGTGGGTGTGTCT-3'
ALK27ex_NF	<i>ALK</i> Intron 27	5'-GTGTCTATATCCATCTCCATG-3'
ALK27ex_NR	<i>ALK</i> Intron 26	5'-TTGGGGCATATTAAGGGAG-3'
ALK28ex_R ^c	<i>ALK</i> Intron 28	5'-AAATGGGCAAATGGAGACAC-3'
ALK28ex_F ^c	<i>ALK</i> Intron 27	5'-CCTTTACACCTGCGCACTCT-3'
ALK28ex_NR	<i>ALK</i> Intron 28	5'-AATCTTGTACTCTGACTGGC-3'
ALK28ex_NF	<i>ALK</i> Intron 27	5'-GCCTAGACGAGTTCGCAC-3'
ALK29ex_1R ^c	<i>ALK</i> Intron 29	5'-GTGTGGCTCCTTCTTTGCTA-3'
ALK29ex_1F ^c	<i>ALK</i> Intron 28	5'-AAATCCTGGTTTCCTCATCTG-3'
ALK29ex_1NF	<i>ALK</i> Intron 28	5'-GTTTAGATAACATCATCTCTAAGG-3'
ALK29ex_1NR	<i>ALK</i> Intron 29	5'-TGTTTCTGGATCCGTGGAC-3'

^c Primer-Sequenzen von (Wang et al. 2011)

Primer qRT-PCR *MDK*

Bezeichnung	Gen/Lokalisation	Sequenz
MDK_TM2	<i>MDK</i> Exon 2	TTTGGAGCCGACTGCAAG
MDK_TM3	<i>MDK</i> Exon 2	CCTTGGCGGACTTTGGTG

Primer qRT-PCR *PTN*

Bezeichnung	Gen/Lokalisation	Sequenz
PTN_TM1	<i>PTN</i> Exon 4	CACTCCGCGCCAAATTGC
PTN_TM2	<i>PTN</i> Exon 3	GCAAGCAAACCATGAAGACC

Primer qRT-PCR *ROS1*

Bezeichnung	Gen/Lokalisation	Sequenz
ROS1_TM1	<i>ROS1</i> Exon 15	AAGACATATGTGATACAAAGGC
ROS1_TM3	<i>ROS1</i> Exon 16	AATAGCTTCACGTGGGTAAC
ROS1_TM22	<i>ROS1</i> Exon 17	CTCCTGTATTGGTTGGTTC
ROS1_TM23	<i>ROS1</i> Exon 17/18	TATCCCCAGTGCTCTGTC
ROS1_TM4	<i>ROS1</i> Exon 40	ACTACTCAATCTGATGTATGG
ROS1_TM5	<i>ROS1</i> Exon 41	ATGAGCTGGATAAGGCTG

Primer Sequenzierungen *ROS1*

Bezeichnung	Gen/Lokalisation	Sequenz
ROS_36_1	<i>ROS1</i> Intron 35	CAATACTGCAAAGCCATGAG
ROS_36_2	<i>ROS1</i> Intron 35	CACCCTATATATGTGGAGG

ROS_36_3	<i>ROS1</i> Intron 36	TATCCAGGTCAATCTTTGTAG
ROS_36_4	<i>ROS1</i> Intron 36	ATGTGTCAAGGAGTTCGAAG
ROS1_37_1	<i>ROS1</i> Intron 36	AGAACAAACAGAACAATCTCC
ROS1_37_2	<i>ROS1</i> Intron 36	CAATCTCCATTAACCCACTG
ROS1_37_3	<i>ROS1</i> Intron 37	TACTTGCTCTGCAGATGTAG
ROS1_37_4	<i>ROS1</i> Intron 37	GCTCTGCAGATGTAGTTCC
ROS1_38_1	<i>ROS1</i> Intron 37	TGCTGTACTCCATAAAGACC
ROS1_38_2	<i>ROS1</i> Intron 37	GTTAGAGACACTAAGTCAGG
ROS1_38_3	<i>ROS1</i> Intron 38	AAGGTTTTACCACTGCAGCC
ROS1_38_4	<i>ROS1</i> Intron 38	GGGAATTATAGGGCATTTCG
ROS1_39_1	<i>ROS1</i> Intron 38	TTCCATATTGCCTCTACTTAC
ROS1_39_2	<i>ROS1</i> Intron 38	ATACATGTATCCACTTATATTAC
ROS1_39_4	<i>ROS1</i> Intron 39	TGCTTTACCTGCACTACAG
ROS1_39_3	<i>ROS1</i> Intron 39	ATCTTGTGTGCTTTACCTGC
ROS1_40_1	<i>ROS1</i> Intron 39	TCTTCTTTACAGACCTACTAG
ROS1_40_2	<i>ROS1</i> Intron 39	AGACCTACTAGGGCTACTTC
ROS1_40_3	<i>ROS1</i> Intron 40	CTGGTCTTCTGTTTTCTCAC
ROS1_40_4	<i>ROS1</i> Intron 40	CCTCTAATGTTTGATGATTCTG
ROS1_41_1	<i>ROS1</i> Intron 40	ACAAAGTAGACCCTGCTAG
ROS1_41_2	<i>ROS1</i> Intron 40	AATGTTGTTGGAGAACTACTG
ROS1_41_3	<i>ROS1</i> Intron 41	TTAACAACTATATCAAGAGGC
ROS1_41_4	<i>ROS1</i> Intron 41	AACTATATCAAGAGGCCTAAG
ROS1_42_1	<i>ROS1</i> Intron 41	AACTGGCAATAACTCAGATTC
ROS1_42_2	<i>ROS1</i> Intron 41	TCTAAAATGACCCTACCTGG
ROS1_42_3	<i>ROS1</i> Intron 42	AAATGCTTTCTGTGTACATTCC
ROS1_42_4	<i>ROS1</i> Intron 42	CTTTGTTCAAGTTCACAGTGC

Primer Transkriptvarianten *ROS1*^d

Bezeichnung	Gen/Lokalisation	Sequenz
ROS1_TM29	<i>ROS1</i> Exon 7	AGGGACACAGAGAACCAG
ROS1_TM30	<i>ROS1</i> Exon 7	CACAGAGAACCAGTTTCCAG
ROS1_10	<i>ROS1</i> Exon 12	ATGGCAAGGTCATTTTCCAAC
ROS1_9	<i>ROS1</i> Exon 12	TTTGGGTTTGGTAACTTGGTC
ROS1_28	<i>ROS1</i> Exon 14	GCCAGCTAGTGAACCACC
ROS1_27	<i>ROS1</i> Exon 14	CACCATTTATCATGGCTGTG
ROS1_TM18	<i>ROS1</i> Exon 16	GTTCCCTTGTACTACAGAC
ROS1_TM17	<i>ROS1</i> Exon 16	TTGTACTACAGACACAGCC
ROS1_TM20	<i>ROS1</i> Exon 17	GAGCCCATCACTGAGGTC
ROS1_TM19	<i>ROS1</i> Exon 17	CTGAGGTCTAAAGTTAGAGC
ROS1_TM20	<i>ROS1</i> Exon 17	GAGCCCATCACTGAGGTC
ROS1_24	<i>ROS1</i> Exon 17	CTGTCTTGAACCAACCAATAC
ROS1_TM22	<i>ROS1</i> Exon 17	CTCCTGTATTGGTTGGTTC
ROS1_TM21	<i>ROS1</i> Exon 17	GTATTGGTTGGTTCAAGACAG
ROS1_TM24	<i>ROS1</i> Exon 18	TTCTGTGATGGTGGTATCC
ROS1_21	<i>ROS1</i> Exon 19	CTTGAAGCATTTCCTTCAATCC
ROS1_22	<i>ROS1</i> Exon 19	TCAATCCTAAATGAAGACTCTTG

^d Primer Transkriptvarianten *ROS1* zur Verfügung gestellt von C. Kalla

Primer qRT-PCR *LTK*

Bezeichnung	Gen/Lokalisation	Sequenz
LTK_TM4	<i>LTK</i> Exon 3/4	GCCAGTATCTGATCTCAGC
LTK_TM5	<i>LTK</i> Exon 4	TGAGACGAAGACGCCATG
LTK_TM8	<i>LTK</i> Exon 18/19	GGCCTGTGTACCGCATC
LTK_TM9	<i>LTK</i> Exon 19	GCAAAGCTAGGGCGGAG

Primer Transkriptvarianten *LTK*^e

Bezeichnung	Gen/Lokalisation	Sequenz
LTK_PCR1	<i>LTK</i> Exon 1	CAAGGGCTTTTGTGCGG
LTK_PCR2	<i>LTK</i> Exon 1	GGCTTTTGTGCGGGTG
LTK_PCR3	<i>LTK</i> Exon 1	AGCTGCTGGTGTGGTTCCG
LTK_PCR4	<i>LTK</i> Exon 1	GCTGGTGTGGTTCGGAGC
LTK_PCR13	<i>LTK</i> Exon 2	CCCGAAAGTCAGCGCCC
LTK_PCR14	<i>LTK</i> Exon 2	CCGCCTAGTATCTTGGAGC
LTK_PCR6	<i>LTK</i> Exon 8	GGAAGAGCTCGCTGCTGG
LTK_PCR7	<i>LTK</i> Exon 8	CTGGGGTGTATGAAGGATAC
LTK_PC18	<i>LTK</i> Exon 9	GTGCCTTCGGATCTCTAC

^e Primer Transkriptvarianten *LTK* zur Verfügung gestellt von C. Kalla

Daten qRT-PCR-Analyse von *ALK*Tabelle 10: Zur ROC-Analyse verwendete Daten der qRT-PCR- und FISH-Analyse von *ALK*

Fall #	<i>ALK</i> qRT-PCR		Quotient 3'/5'	FISH
	<i>ALK</i> 3' Exon	<i>ALK</i> 5' Exon		<i>ALK</i> break-apart Sonde
1	7,10	0,01	909,4	Translokation
2	6,23	0,03	194,5	Translokation
3	5,94	0,02	275,7	Translokation
4	3,96	0,03	127,6	Translokation mit Deletion
5	3,12	0,03	94,9	Translokation
6	1,84	0,00	921,1	Translokation mit Deletion
7	1,58	0,01	163,7	Translokation mit Deletion
8	1,30	0,01	186,0	Translokation
9	1,03	0,00	251,6	Translokation
10	1,01	0,16	6,5	Translokation
11	0,95	0,19	5,0	Translokation mit Deletion
12	0,86	0,01	156,0	Translokation
12	0,73	0,05	14,0	Translokation
14	0,72	0,02	42,2	Translokation mit Deletion
15	0,65	0,00	170,2	Translokation mit Deletion
16	0,62	0,11	5,6	Translokation
17	0,55	0,00	545,7	Translokation mit Deletion
18	0,50	0,02	23,7	Translokation
19	0,41	0,01	58,8	Translokation mit Deletion
21	0,15	0,01	24,6	Translokation
20	0,22	0,01	23,3	Translokation
22	0,96	1,85	0,5	normal
23	0,76	1,19	0,6	normal

24	0,60	0,94	0,6	normal
25	0,47	0,82	0,6	normal
26	0,42	1,26	0,3	normal
27	0,42	0,66	0,6	normal
28	0,38	0,02	21,1	normal
29	0,33	0,02	16,5	normal
30	0,32	0,01	53,0	normal
267	0,29	0,01	36,8	normal
470	0,26	0,00	127,6	normal
578	0,22	0,03	6,6	normal
48	0,00	0,06	0,1	normal
303	0,01	0,01	1,2	normal
370	0,08	0,01	12,0	normal
463	0,25	0,28	0,9	normal
276	0,00	0,02	0,2	normal
309	0,02	0,01	1,7	normal
197	0,00	0,01	0,1	normal
477	0,01	0,02	0,6	normal
240	0,04	0,04	1,0	normal
478	0,01	0,04	0,3	normal
198	0,02	0,04	0,6	normal
479	0,01	0,01	1,6	normal
281	0,01	0,06	0,2	normal
480	0,02	0,01	1,7	normal
295	0,01	0,01	1,9	normal
360	0,00	0,01	0,3	normal
481	0,01	0,00	4,9	normal
482	0,01	0,02	0,6	normal
259	0,00	0,01	0,7	normal
217	0,02	0,02	1,4	normal
484	0,01	0,05	0,2	normal
366	0,01	0,00	1,8	normal
485	0,00	0,01	0,3	normal
315	0,01	0,01	0,8	normal
225	0,01	0,04	0,3	normal
297	0,02	0,01	1,5	normal
486	0,01	0,01	0,5	normal
278	0,01	0,01	0,8	normal
346	0,01	0,01	1,0	normal
204	0,01	0,01	0,8	normal
296	0,03	0,03	1,0	normal
489	0,01	0,00	2,7	normal
490	0,01	0,01	0,6	normal
283	0,03	0,01	3,3	normal
491	0,01	0,01	0,4	normal
268	0,00	0,00	14,2	normal
493	0,04	0,01	4,8	normal
495	0,03	0,05	0,6	normal
252	0,01	0,02	0,8	normal
213	0,00	0,00	5,7	normal
307	0,02	0,01	2,3	normal
244	0,01	0,01	0,9	normal
369	0,01	0,00	3,3	normal
206	0,01	0,01	0,7	normal
521	0,01	0,01	1,4	normal

522	0,02	0,01	1,9	normal
523	0,00	0,00	1,3	normal
525	0,00	0,01	0,4	normal
526	0,02	0,04	0,5	normal
263	0,05	0,09	0,6	normal
63	0,01	0,00	3,0	normal
89	0,03	0,02	2,0	normal
355	0,01	0,01	1,0	normal
536	0,05	0,01	4,8	normal
537	0,01	0,03	0,6	normal
538	0,01	0,02	0,6	normal
324	0,01	0,00	6,5	normal
94	0,01	0,01	0,7	normal
540	0,04	0,09	0,4	normal
541	0,00	0,00	0,5	normal
542	0,02	0,22	0,1	normal
210	0,03	0,00	14,8	normal
294	0,07	0,20	0,4	normal
543	0,03	0,08	0,4	normal
223	0,01	0,08	0,1	normal
546	0,03	0,01	4,3	normal
266	0,10	0,23	0,4	normal
343	0,01	0,02	0,4	normal
106	0,10	0,01	8,2	normal
188	0,06	0,04	1,4	normal
548	0,12	0,02	5,8	normal
550	0,02	0,00	15,7	normal
357	0,11	0,11	1,0	normal
261	0,02	0,02	1,2	normal
553	0,07	0,02	3,1	normal
554	0,03	0,01	2,8	normal
557	0,07	0,08	0,9	normal
79	0,07	0,01	7,6	normal
558	0,01	0,01	1,4	normal
327	0,01	0,01	0,6	normal
559	0,07	0,01	9,9	normal
560	0,08	0,05	1,8	normal
564	0,02	0,00	7,5	normal
203	0,01	0,01	0,9	normal
310	0,05	0,06	0,7	normal
565	0,00	0,01	0,4	normal
566	0,01	0,01	1,1	normal
567	0,01	0,03	0,4	normal
321	0,02	0,01	1,2	normal
101	0,01	0,07	0,2	normal
570	0,01	0,00	4,0	normal
571	0,06	0,02	4,1	normal
576	0,01	0,02	0,7	normal
236	0,05	0,05	0,9	normal
226	0,09	0,16	0,5	normal
354	0,08	0,08	1,0	normal
339	0,19	0,16	1,2	normal
580	0,03	0,01	3,0	normal
582	0,16	0,27	0,6	normal
585	0,02	0,02	1,0	normal

99	0,05	0,06	0,8	normal
199	0,03	0,02	1,7	normal
590	0,01	0,03	0,5	normal
592	0,15	0,55	0,3	normal
254	0,08	0,10	0,8	normal
77	0,09	0,00	30,0	normal
95	0,16	0,14	1,1	normal
194	0,05	0,09	0,6	normal
598	0,19	0,06	2,9	normal
599	0,02	0,01	4,0	normal
605	0,10	0,01	10,0	normal
67	0,06	0,03	2,1	normal
609	0,02	0,18	0,1	normal
964	0,04	0,01	3,0	normal
610	0,01	0,02	0,4	normal
630	0,01	0,04	0,2	normal
215	0,03	0,04	0,9	normal
72	0,05	0,17	0,3	normal
689	0,20	0,04	4,9	normal
192	0,08	0,07	1,2	normal
676	0,00	0,01	0,3	normal
693	0,03	0,05	0,5	normal
695	0,14	0,07	1,9	normal
696	0,01	0,00	1,3	normal
291	0,04	0,04	1,1	normal
302	0,00	0,00	0,3	normal
326	0,01	0,01	0,9	normal
730	0,01	0,02	0,6	normal

Dargestellt sind die qRT-PCR- und FISH-Daten der NSCLC, die für die ROC-Analyse verwendet wurden. Als rearrangiert gewertet wurden Fälle mit mindestens 15 % break-apart Signalen oder zusätzlichen Orange-Signalen

Daten der qRT-PCR-, FISH- und IHC-Analysen von *ROS1*

Tabelle 11: Zur ROC-Analyse verwendete qRT-PCR und FISH-Daten von *ROS1*, sowie Ergebnisse der ROS1-IHC

Fall #	<i>ROS1</i> qRT-PCR			Quotient		FISH	IHC
	<i>ROS1</i> 3' Ex. 40/41	<i>ROS1</i> 5' (1) Exon 16/17	<i>ROS1</i> 5' (2) Exon 17/18	3'/5' (1)	3'/5' (2)	<i>ROS1</i> break-apart Sonde	<i>ROS1</i> D4D6
964	0,86	0,03	n. u.	33,2	n. u.	n. u.	n. u.
67	0,53	0,04	0,02	12,9	25,5	n. u.	1+
60	23,38	0,00	0,00	36040,1	8641,9	positiv	negativ
701	0,99	0,10	0,11	9,8	9,2	positiv	3+
63	0,70	0,00	0,00	2190,9	533,9	positiv	2+
64	0,32	0,03	0,10	11,6	3,3	positiv	1+
65	0,98	0,28	0,52	3,5	1,9	positiv	n. u.
69	1,41	0,22	0,59	6,5	2,4	negativ	0
70	1,60	0,19	0,67	8,6	2,4	negativ	0
74	0,77	0,06	0,37	13,5	2,1	negativ	0
78	0,37	0,03	0,20	12,4	1,9	negativ	0
68	1,08	0,20	0,87	5,5	1,2	negativ	0
71	0,98	0,08	1,15	12,4	0,9	negativ	0
72	0,82	0,16	1,42	5,1	0,6	negativ	0

73	0,80	0,11	0,72	7,1	1,1	negativ	0
75	0,60	0,15	0,43	4,1	1,4	negativ	0
76	0,54	0,10	0,39	5,4	1,4	negativ	0
77	0,57	0,10	0,32	5,7	1,8	negativ	0
79	0,74	0,13	0,45	5,8	1,6	negativ	0
80	0,31	0,05	n. u.	6,7	n. u.	n. u.	n. u.
84	1,05	0,32	0,30	3,3	3,5	negativ	0
81	2,01	0,76	1,12	2,7	1,8	negativ	0
82	1,12	1,00	1,48	1,1	0,8	negativ	0
83	1,06	0,40	1,42	2,7	0,7	negativ	0
89	0,64	0,45	1,48	1,4	0,4	negativ	0
34	0,56	0,46	0,78	1,2	0,7	negativ	0
66	0,55	0,28	0,55	2,0	1,0	negativ	0
91	0,54	0,22	0,49	2,4	1,1	negativ	1+
93	0,51	0,18	0,45	2,8	1,1	negativ	0
41	0,49	0,89	0,84	0,5	0,6	negativ	0
97	0,47	0,22	0,82	2,2	0,6	negativ	0
98	0,47	0,23	0,65	2,1	0,7	negativ	0
102	0,42	0,16	0,52	2,6	0,8	negativ	0
51	0,36	0,25	0,25	1,4	1,4	negativ	0
33	0,02	0,05	0,07	0,5	0,4	negativ	0
35	0,04	0,00	0,00	75,1	160,9	negativ	0
40	0,12	0,12	0,34	1,0	0,3	negativ	0
42	0,01	0,03	0,01	0,2	0,9	negativ	0
54	0,07	0,06	0,05	1,1	1,2	negativ	0
55	0,02	0,04	0,04	0,4	0,4	negativ	0
56	0,03	0,03	0,04	0,8	0,7	negativ	0
3	0,07	0,05	0,20	1,4	0,4	negativ	0
57	0,05	0,13	0,29	0,4	0,2	negativ	0
58	0,16	0,13	0,17	1,2	0,9	negativ	0
117	0,05	0,07	0,04	0,7	1,1	negativ	0
118	0,05	0,06	0,12	0,8	0,4	negativ	0
119	0,02	0,02	0,00	1,2	6,8	negativ	0
120	0,01	0,00	0,01	1,9	0,9	negativ	0
121	0,06	0,05	0,02	1,2	3,5	negativ	0
123	0,01	0,00	0,07	3,0	0,2	negativ	0
387	0,01	0,01	0,02	1,2	0,6	negativ	0
124	0,10	0,08	0,04	1,3	2,8	negativ	0
125	0,00	0,01	0,00	0,1	0,5	negativ	0
126	0,01	0,06	0,07	0,2	0,2	negativ	0
127	0,01	0,02	0,16	0,3	0,0	negativ	0
30	0,14	0,10	0,46	1,4	0,3	negativ	0
128	0,00	0,01	0,00	0,3	5,9	negativ	0
129	0,15	0,14	0,23	1,1	0,7	negativ	0
130	0,05	0,07	0,05	0,7	1,2	negativ	0
131	0,02	0,01	0,00	1,5	5,2	negativ	0
132	0,01	0,01	0,01	1,9	1,1	negativ	0
370	0,12	0,11	0,27	1,0	0,4	negativ	0
242	0,15	0,06	0,32	2,4	0,5	negativ	0
290	0,20	0,12	0,29	1,7	0,7	negativ	0
17	0,14	0,11	0,25	1,3	0,6	negativ	0
672	0,12	0,01	0,09	8,5	1,4	negativ	0

430	0,01	0,00	0,02	2,7	0,6	negativ	0
257	0,15	0,10	0,02	1,6	9,0	negativ	0
219	0,02	0,01	0,02	1,6	1,4	negativ	0
265	0,07	0,05	0,09	1,5	0,8	negativ	0
436	0,10	0,11	0,07	0,9	1,4	negativ	0
435	0,01	0,01	0,03	0,6	0,3	negativ	0
281	0,00	0,00	0,00	2,3	0,8	negativ	0
440	0,03	0,02	0,05	2,0	0,7	negativ	0
364	0,00	0,00	0,00	2,8	11,2	negativ	0
333	0,01	0,01	0,02	0,9	0,3	negativ	0
445	0,19	0,10	0,19	1,9	1,0	negativ	0
249	0,17	0,11	0,15	1,6	1,2	negativ	0
367	0,03	0,01	0,04	3,2	0,6	negativ	0
447	0,01	0,00	0,00	7,4	42,5	negativ	0
241	0,02	0,01	0,02	2,7	1,1	negativ	0
217	0,06	0,01	0,05	4,5	1,1	negativ	0
484	0,22	0,19	0,24	1,1	0,9	negativ	0
330	0,10	0,04	0,03	2,3	3,1	negativ	0
338	0,00	0,00	0,00	2,3	7,6	negativ	0
485	0,00	0,00	0,01	1,8	0,6	negativ	0
358	0,02	0,00	0,00	5,1	23,9	negativ	0
315	0,00	0,00	0,00	10,0	26,6	negativ	0
225	0,01	0,01	0,01	1,3	0,9	negativ	0
297	0,03	0,02	0,06	1,8	0,4	negativ	0
453	0,04	0,14	0,04	0,3	1,0	negativ	0
486	0,07	0,03	0,10	2,2	0,7	negativ	0
320	0,00	0,00	0,12	0,4	0,0	negativ	0
204	0,04	0,02	0,05	1,8	0,8	negativ	0
670	0,20	0,02	0,03	11,6	7,0	negativ	0
186	0,28	0,02	0,05	12,1	5,4	negativ	0
490	0,01	0,01	0,03	1,7	0,5	negativ	0
283	0,00	0,00	0,01	1,4	0,2	negativ	0
491	0,00	0,00	0,01	1,4	0,5	negativ	0
268	0,00	0,00	0,00	1,0	0,2	negativ	0
29	0,05	0,08	0,05	0,6	1,0	negativ	0
307	0,00	0,00	0,00	0,5	2,2	negativ	0
244	0,11	0,05	0,12	2,2	0,9	negativ	0
369	0,00	0,00	0,00	2,5	43,3	negativ	0
325	0,00	0,00	0,01	1,3	0,3	negativ	0
715	0,17	0,07	0,12	2,4	1,4	negativ	n. u.
498	0,11	0,03	0,15	3,8	0,8	negativ	0
517	0,22	0,11	0,16	2,1	1,4	negativ	0
7	0,02	0,03	0,06	0,8	0,3	negativ	0
437	0,09	0,05	0,02	1,9	4,4	negativ	0
304	0,01	0,01	0,01	1,2	0,6	negativ	0

NSCLC #964, #80 und #67 sind in der ROC-Analyse aufgrund fehlender FISH-Daten nicht eingeschlossen. Aufgrund ihrer qRT-PCR Daten kann von einer Rearrangierung ausgegangen werden. n. u. = Fall wegen des limitierten Materials nicht untersucht. Als rearrangiert gewertet wurden Fälle mit mindestens 15 % break-apart Signalen oder zusätzlichen Grün-Signalen, IHC-positiv gewertet wurden Fälle mit schwacher Färbung (1+) in mindestens 10 % der Tumorzellen.

Potentielle Translationsprodukte der *ROS1*-Transkriptvarianten

Mögliche Translationsprodukte der *ROS1*-Transkriptvariante mit einer Deletion von Exon 8 – 16 (r.[=,780-2496del])

Produkt 1:

>EMBOSS_001_1

QAFKHSKV*MKKAKYYFKRQVYPNIAKQTKQNP SATPP IEVMKPK*FI*QNGEN*TGHLK
ICHW*SDEEHLLSYSEACQFCNSWLPMDFCGAVYSFK*LPKVVCN*SGPAA*PWHTT*SE
*TVYPRMSLLELCRSEKLCFKVSGVV*GWL*QRGRCI*RGSTGKCRPTNCSLCCFFHWKPQ
YDITMEICKLLWSKIHHSVEICTTSGKLDLY*DCVQTVLTCGQAPAPLH*VHFPSGLDLHS
AAAALLPSKSQLQDSSSWSS*NCTFD*EY*ELKSRHCGSQLGSTSIPRWTFYGL*LKADQ
QKSKIRCRDTENQFPVLLHFTKYLLQVIALTLDLSDGLLYWLVDQSQCIHLYTAVLRGQS
TGDTTITEFAAWSTSEISQNALMYYSGRLEFWINGFRIITTQEIGQKTSVSVLEPARFNQF
TIIQTSCLKPLPGNFSFTPKVIPDSVQESSFRIEGNASSFQILWNGPPAVDWGVVVFYSVEF
SAHSKFLASEQHSPLPVFTVEGLEPYALFNLSVTPYTYWGKGPKTSLSLRAPETVPSAPEN
PRIFILPSGKCCNKNEVVVEFRWNKPKHENGVLTKFEIFYNISNQSITNKTCEDWIAVNV
TPSVMSFQLEGMSPRCFIAFQVRAFTSKGPGPYADVVKSTTSEINFPFHLITLLGNKIVF
LDMQDQNVVWTF SAERVI SAVCYTADNEMGYAEGDSLFLHLHNRSSSELFQDSLVDI
TVITIDWISRHLVFALKESQNGMQVFDVDLEHKVKYPREVKIHNRNSTIISFSVYPLLSR
LYWTEVSNFGYQMFYYSIISHTLHRILQPTATNQNKRNQCSCNVTEFELS GAMADTSN
LEKPLIYFAKAQEIWAMDLEGCQCWRVITVPAMLAGKTLVSLTVDGDLIYWIITAKDSTQ
IYQAKKGNAIVSQVKALRSRHILAYSSVMQPPDKAFLSLASDTVEPTIILNATNTSLTI
RLPLAKTNLTWYGITSPPTYL VVYAEVNDRKNSSDLKYRILEFQDSIALIEDLQPFSTY
MIQIAVKNYSDPLEHLPPGKEIWGKTKNGVPEAVQLINTTVRSDTSLIISWRESHKPNG
PKESVRYQLAISHLALIPETPLRQSEFPNGRLTLLVTRLSSGNIYVLKVLACHSEEMWCT
ESHVPTVEMFNTPEKPYSLVPENTSLQFNWKAPLNVNLRFWVELQWKYNEFYHVKTSC
SQGPAYVCNITNLQPYTSYNVRVVVVYKGTGENSTSLPESFKTKAGVPNKPGIPKLEGSK
NSIQWEKAEDNGCRITYYILEIRKSTSNLQNLQNLRWKMTFNGSCSSVCTWKSKNLKGIF
QFRVVAANNLGFGEYSGISENIILVGDDFWIPETSFILTIVGIFLVVTIPLTFVWHRRLL
KNQKSAKEGVTVLINEDKELAE LRGLAAGVGLANACYAIHTLPTQEEIENLPAFPREKLT
LRLLLGSGAFGEVYEGTAVDILGVGSGEIKVAVKTLKKGSTDQEKIEFLKEAHLMSKFNH
PNILKQLGVCLLNEPQYIILELMEGGDLLTYLRKARMAFYGPLLLTLVDLVDLCVDISKG
CVYLERMHFIHRDLAARNCLVSVKDYTSPIVKIGDFGLARDIYKNDYRKRGEGLLPVR
WMAPESLMDGIFTTQSDVWSFGILWEILTLGHQPYPAHNSLDVNLVYVQTGGRLEPPRNC
PDDLWNLMTQCWAQEPDQRP TFHRIQDQLQLFNFFLNSIYKSRDEANNSSGVINESFEGE
DGDVICLNDDIMPVALMETKNREGLNYMVLATECGQGEKSEGPLGSESESCGLRKEE
KEPHADKDFCQEKQVAYCPSGKPEGLNYACLTHSGYGDGSD**RCLGNRELRTLSFSSY
*KKTLL**MSWWSITPNKQCNVP

Produkt 2:

>EMBOSS_001_2

KLSSIQRSK*KRLSIIISKGYILI*QNKQSKIHQLLLQLK**SPNNSYSKMEKIRPAI*K
SAIGEVKNKIYCLIPKLVNFATLGCLWISVVQCTVLNSCLKSCVTNLGQQDLGTPHNLS
EPCIQGCHFVNSVDQKNCALKCRESEVGCSSAEGAYEEVLENADLP TAPFASSIGSHN
MTRLWKSANFSGVKYIIQWKYAQLLGSWYTKTVSRPSYVVKPLHPFTEYIFRVVWIFTA
QLQLYSPSPSYRTHPHGVPEAPLIRNIESSPDTVEVSWDPPQFPGGPILGYNLRLIS
KNQKLDAGTQRTSFQFYSTLPTNTIYR*LL*L*TSVMGSCIGWFKTVNVFTCTQLFFGDRA
LGIPPSQNLQPGVLLKFRMH*CTIVVGCSSGSMALGSLK*VRKPVSLFWNQPDLISS
QLFRHPLSPCQGTFLPLRLFLQILFKSLHLGLKEMLVFKSCGMVPLR*TG*FSTV*NL
VLILSSWLVNNTLYLYLLWKDWNLMPLYLIFLSLLIPTGERAPKHLCHFELKQFHQHQRT
PEYLYYQVENAATRMKLWNNLGGTNLSMKMGC*QNLKFS TIYPKVLQTKHVKTGLLSMS
LPQ*CLFNLKA*VPDALLPSRLGPLHLRGQDHMLTL*SLQHOKSTHFLTS*FLVTR*FF
*IWIKIKLCGRFQQKELSVFPATQLIMRWDIMLKGTHSFFCTCTIALALSFSKIHWFLLIS
QLLQLTGFQGTSTLH*KNHKMECKYLMLILNTR*NIPER*RFTIGIQ*FLFLYILF*VA
CIGQKFPILATRCSTTVLSVTPCTEFCNPQLQTNKTKGINVLM*LNLS*VEQWLLIPLT
*RNH*YTLPKHKRSGQWIWKA VSVGELSQYLLCSQEKPLLA*LWMEILYTGSSQQRTAHR
FIRQRKEMGPSFPR*RP*GVGISWLTVQLCSLQIKRFCL*LOTLWNQLYLMPPLTLASQS

DYLRWPRQTSHGMA SPALLQHTWFMIMQKLMTGKTALT*NIEFWNFRTV*LLLKIYNHFQHT
 *YR*L*KIIIIQILWNIYHQEKRFGEKLMKEYQRQCSSLIQLCGQTPASLYLGENLTSQMD
 LKNQSVISWQSHTWP*FLKLL*DKVNFQMEGSLSLLLDCLVEIFMC*RFLPATLRKCGVQ
 RVILSLWKCLTHQRNLIPWFQRTLVCNLIIGRLH*MLTSSDFGLSYRSGNTMSFTMLKLHA
 AKVLLMSVISQIYNLILHIMSE*WWFIRREKIAPHFQKALRQKLESQINQAFPNY*KGVK
 IQYSGRKLKIMDVELHTISLR*ERALQIIYRTRI*GGR*HLMDDPAVVFAHGSPKT*KEYF
 SSE**LQII*GLVNIVESVRILY*LEMIFGYQKQVSYLLL*LEYFWLLQSH*PLSGIED*
 RIKKVPKRG*QCL*TKTKSWLSCEVWQPE*AWLMPAMQYILFQPKRRLKIFLPSLGKN*L
 CVSCWEVEPLEKCMKEQQWTS*ELEVESK*Q*RL*RRVPQTRRRRLNS*RRHI**ANLII
 PTF*SSLEFVC*MNPNTLSWN*WREETFLLCVKPGWQRFMVLYSPWLT*TCV*IFQKA
 VSTWNGCISFTGIWQLEIALFP*KTIPVHG**RLETLDSPETS IKMITIEREGKACSQFG
 GWLQKV*WMESLLNLMYGLLEF*FGRF*LLVISLIQLIPTLMC*TMCKQEGDWSHQEIV
 LMICGI**PSAGLKNPTKDLLFIEFRTNFSYSEIFS*IAFISPEMKQTTVES*MKALKVK
 MAM*FV*IQMTLCQLL*WKRRTK*TIWYLLQNVAKVKKSLRVL*APRNLNLVV*GKKR
 RNHMQTKISAKKNKWL TALLASLKA*TMPVSLTVDMEMGLINSVVWEIES*DKHSHSVVT
 ERKLC*NDKCHGGL*LQINNATFX

Die Deletion führt zu einer Verschiebung des Leserasters

Mögliche Translationsprodukte (grau unterlegt):

1. Verkürztes Protein (1459 AS), ist ab AS M889 identisch mit ROS1, enthält partiellen extrazellulären Teil, Transmembrandomäne, Kinasedomäne (Leserahmen 1)
2. Produkt enthält einen verkürzten extrazellulären Teil von ROS1, Abbruch der Translation aufgrund einer Leserasterverschiebung nach Aminosäure R260 (Leserahmen 2)

Mögliche Translationsprodukte der *ROS1*-Transkriptvariante mit einer Deletion von Exon 18 (r.[=,2598-2812del])

Produkt 1:

```
>EMBOSS_001_2
KLSSIQRSK*KRLSIIISKGKYILI*QNKQSKIHQLLLQLK**SPNNSYSKMEKIRPAI*K
SAIGEVMKNIYCLIPKLVNFATLGCLWISVVQCTVLNSCLKSCVTNLGQQLDLGTPHNLS
EPCIQGCHEFVNSVDQKNCALKCRESEVGCSSAEGAYEEEEVLENADLP TAPFASSIGSHN
MTLRWKSANFSGVKYIIQWKYAQLLGSWYTKTVSRPSYVVKPLHPFTEYIFRVVWIFTA
QLQLYSPSPSYRTHPHGVPEAPLIRNIESSPDTVEVSWDPPQFPGGPILGYNLRLIS
KNQKLDAGTQRTSFQFYSTLNPNTIYRFSIAAVNEVGEGPEAESSITSSSAVQQEEQWLF
LSRKTSLRKRSLKHLVDEAHCLRLDAIYHNITGISVDVHQQIVYFSEGTLIWAKKANMS
DVSDLRIFYRGSGLISSISIDWLYQRMFYIMDELVCVCDLENCNIEEITPPSISAPQKI
VADSYNGYVYLLRDGIYRADLPVPSGRCAEAVRIVESCTLKDFAIKPOAKRIYFNDTA
QVFMSTFLDGSASHLILPRIPFADVKSFAENNDLFLVTDGKVIFQQDALSFNEFIVGCDL
SHIEEFGFNLVIFGSSSQLHPLPGRPQELSVLFGSHQALVQWKPPALAI GANVILISDI
IELFELGPSAWQNWTYEVKVSTQDPPEVTHIFLNI SGTMLNVP ELQSAMKYKVSVRASSP
KRPGPWSEPSVGTTLVPA SEPPFIMAVKEDGLWSKPLNSFGPGEFLSSDIGNVSDMDWYN
NSLYSDTKGDVFWLLNGTDISENYHLP SIAGAGALAFEWLGHFLYWAGKTYVIQRQSV
LTGHTDIVTHVKLLVNDMVVDSVGGYLYWTTLYSVESTRLN GESSLVLQTPWFSGKKVI
ALTLDLSDGLLYWLVDQSDQCIHLYTAVLRGQRELFYLP*GYSRFC SRVFI*D*RKCFKFS
NPVEWSPCGRGLGCSFLQCRI*CSF*VLG**TTLFTCIYCGRTGTLCLI*SFCHSLYLLGK
GPQNI SVTSS*NSSISTREPQNIYITKWKMLQOE*SCGGI*VEQT*A*KWGVNKI*NFL
QYIQSKYKQNM*RLDCCQCHSLSDVFS*RHESQMLYCLPG*GLYI*GARTIC*RCKVY
NIRNQPISSPHNSSW*QDSFFRYGSKSSCVDFSRKSYQRLLHS***DGILC*RGLTLS
SALAQSL*L*AFPRFTGF*YHSYYN*LDFKAPLLCTERITKWNASI*C*S*TQGEISQRG
EDSQ*EFNNNFFFCISSFKSLVLD RSFQFWLPDVLQYYSQSHLAPNSATHSYKPTKQKES
MFL*CD*I*VKWSNGY*YL*PRETIDILCQSTRDLGNGSGRLSVLESYHSTCYARRKNPC
*LNCGWRSYILDHHSKGQHTDLSGKERKKGHRFPGEKPKE*AYLGLQFSYAAF SR*SVSV
```

SSFRHCCTNYT*CH*H*PHNQITSGQDKPHMVVHHQPYSNIPGLLCRS**QEKQL*LEI*
NSGISGQYSSY*RFTTIFNIHDTSDCKKLLFRSFGTFTTRKRD LGKN*KWSTRGSAAH*Y
NCAVRHQPHYILERISQAKWT*RISPLSVGNLTPGPNS*NSSKTK*ISKWKAHSPCY*TV
WWKYLVCVKGSCSCLPL*GNVVYRESSCHCGNV*HTRETFLFLGSREH*FAI*LEGSIEC*PHQ
ILG*ATEVEIQ*VLPC*NFMQPRSCSCL*YHKSTTYLFI*COSSGGL*DGRK*HLTSRKL
*DKSWSPK*TRHSQITRE*KFNVTGES*R*WM*NYILYP*DKKEHFK*FTEPEFKVEDD
I*WILQ*CLHMEVQKPERNISVQSSSCK*SRVW*I*WNQ*EYYISWR*FLDTRNKFHTYY
YSWNI SGCYNPTDLCLA*KIKESKKCQGRGDSAYKRRQVRG*AARSGRSRPG*CLLCNT
YSSNPRGD*KSSCLPSGKTDSASLAGKWSLWRSV*RNSSGHLRSWKWRNQSSSEDFEEGF
HRPGED*IPEGGTDEQI*SSQHSEAAWLSAE*TP IHYPGTDGRRP SYLFA*SPDGNV
LWSFTHLG*PCRPVCRYFKRLCLLGTDAFHSQSGS*KLPCFRERLYQSTDSEDWRLWTR
QRHL*K*LL*KERGRPAPSSVDGSRKFDGWNLHYSI*CMVFNWSDLGDFNSWSSALSSSF
QP*CVKLCANRRETGATKLS**SVEFNDPVLSRTRPKTYFS*NSGPTSVIQKFFLK*H
L*VQR*SKQQWSHK*KL*R*RWRCDLFEFR*HYASC FNGNEEPRRVKLYGT CYRMWPR*R
KV*GSSRLPGI*ILWSEERREGTTCRQRFLPRKTSGLLPFWQA*RPCLCLSHSQWIWRWV
*LIALFGK*RVEINTLIQ*LLKENSARMINVMVYNSK*TMQRS

Produkt 2:

>EMBOSS_001_3

SFQAFKGLNEKG*VLFQKASIS*YSKTNKAKSISYSSN*SDEAQI IHI AKWRKLD RP SKN
LPLVK**RTFTVLF RSL SILQLLAAYGFLWCSVQF*IAA*SRV*LIWASSLTLAHHII*V
NRVSKDVTFTGL*IRKTVL*SVGSRVRLAVAARKVHMKRKYWKMQTYQLLPLLLPLEATI
*HYDGNLQTSLE*NTSFSGNMHNFW EAGLILRLCPDRPMWSSPCTPSLSTFSEWFGSSQR
SCSSTPLQVPVTGLILMEFLKHL*LGILRAQVPTLWKSAGIHLNSQVDLFWVIT*G*SA
KIKN*MQGHREPVSFTPLYQILSTGFLLOQ*MKLV RVQKQNLVLP LHLQOFNKRN S GSF
YPEKLL*ERDL*NI**MKHIAFGWMLYTIILQEYLLMSTSKLFI SLKELSYGRRRLPTCL
MYLT*EFFTEVQD*FLLSP*IGFIKECISSWMNWVSVI*RTAQTSRKL LHP L LVHLKKL
WLIHTMGMSFTS*EMAFIEQTFLYHLAGVQKLCVLRVAR*RTLQSSHKPSSEFTSMTLP
KSSCQHFWMALLPISSYLASPLLM*KVLLVKTMTFLSQMARSF SNRMLC LLMNSWDVT*
VT*KNLGLVTWSSLAHPPSCTLCQAARRSFRCCALTRLLFNGLLPLP*EPMSS*SVIL
LNSLN*ALLPGRGTGPMR*KYPPKTLKSLIFS*T*VEPC*MYLSCRVL*NTRFL*EQVLQ
RGQAPGQSPQWVLPWCQLVNHLSWL*KKMGFGVNH*IALAQESSYPLI*EMCQTWIGIT
TASTTVTRKATFLCGC*MGRI SQRIITYPALQEQGL*LLSGWVTFSTGLERHM*YKGLC
*RDTQTL LPT*SYW*MTWWWIQLVDISTGPHSIQWKAPD*MGKVPLYRHS LGFLGKR*L
L*L*TSVMGSCIGWFKTVNVFTCTQLFFGDRGNFSFTPKVIPDSVQESSFRIEGNASSFQ
ILWNGPPAVDWGVVYFVSVEFSAHSKFLASEQHSLPVFTVEGLEPYALFNLSVTPYTYWKG
GPKTSLSLRAPETVPSAPENPRIFILPSGKCCNKNEVVVEFRWNKPKHENGVLTKFEIFY
NISNQSITNKTCEDWIAVNVTPSVMSFQLEGMSPRCFIAFQVRAFTSKGPGPYADVVKST
TSEINPFPHLITLLGNKIVFLDMDQNQVWVTF SAERVISAVCYTADNEMGYAEGDSLFL
LHLHNRSSSELFQDSLVDITVITIDWISRHL YFALKESQNGMQVFDVDLEHKVKYPREV
KIHNRSNTIISFSVYPLL SRLYWTEVSNFGYQMFYYSIISHTLHRILQPTATNQNKRNQ
CSCNVTEFELSGAMAIDTSNLEKPLIYFAKAQEIWAMDLEGCQCWRVITVPAMLAGKTLV
SLTVDGDLIYWIITAKDSTQIYQAKKNGAIVSQVKALRSRHILAYSSVMQFPDPKAFLS
LASDTEPTILNATNTSLTIRLPLAKTNLTWYGITSPPTYL VVYAEVNDRKNS S DLKYR
ILEFQDSIALIEDLQPFSTYMIQIAVKNYSDPLEHLPPGKEIWGKTKNGVPEAVQLINT
TVRSDTSLIISWRESHKPNGPKESVRYQLAISHLALIPETPLRQSEFPNGRLTLLVTRLS
GGNIYVLKVLACHSEEMWCTESHVPTVEMFNTPEKPYSLVPENTSLQFNWKAPLNVNLR
FWVELQKWYNEFYHVKTSCSQGPAYVCNITNLQPYTSYNVRVVVYKTKGENSTSLPESF
KTKAGVPNKPGIPKLEGSKNSIQWEKAEDNGCRITYYILEIRKSTSNNLQNLNRWKMT
FNGSCSSVCTWKSKNLKGIFQFRVVAANNLGFGEYSGISENIILVGDDFWIPETSFILT
IVGIFLVVITPLTFVWHRRLLKNQKSAKEGVTVLINEDKELAE LRGLAAGVGLANACYA
IHTLPTQEEIENLPAFPREKLTLLRLLGSGAFGEVYEGTAVIDLGVSGEIKVAVKTLKKS
TDQEKIEFLKEAHLMSKFNHPNLIKQLGVCLLNEPQYIILELMEGGDLLTYLRKARMATF
YGPLLTLVDLVDLCVDISKGCVYLERMHFIHRDLAARNCLVSVKDYTSPRIVKIGDFGLA
RDIYKNDYRKRGEGLLPVRWMAPESLMDGIFTTQSDVWSFGILIWEILTLGHQPYPAHS
NLDVNLVYQTTGGRLEPPRNCDDDLWNLMTQCWAQEPDQRP TFHRIQDQLQFRNFFLNSI
YKSRDEANN SGVINESFEGEDGDVICLNSDDIMPVALMETKNREGLNYMVLA T ECGQGE
KSEGPLGSQESESCGLRKEEKEPHADKDFCQEKQVAYCPSGKPEGLNYACLTHSGYGDGS
D**RCLGNRELRTLSFSSY*KKTLL**MSWWSITPNKQCNVP

Die Deletion führt zu einer Verschiebung des Leserasters

Mögliche Produkte (grau unterlegt):

1. Produkt enthält einen verkürzten extrazellulären Teil von ROS1, Abbruch der Translation aufgrund einer Leserasterverschiebung nach Aminosäure P872, identisch mit ROS1 bis Q865 (Leserahmen 2)
2. Produkt von 1434 AS, ist ab Aminosäure G938 identisch mit ROS1, enthält partiellen extrazellulären Teil, Transmembrandomäne, Kinasedomäne (Leserahmen 3)

Mögliche Translationsprodukte der *ROS1*-Transkriptvariante mit einer Deletion von Exon 15 – 16 (r.[=,2126-2496del])

Produkt 1:

>EMBOSS_001_2

```

KLSSIQRSK*KRLSIIISKGYILI*QNKQSKIHQLLLQLK**SPNNSYSKMEKIRPAI*K
SAIGEVMKNIYCLIPKLVNFATLGCLWISVVQCTVLNSCLATLGCLWISVVQCTVLNSCL
KSCVTNLGQQDLGTPHNLSEPCIQGCHFVNSVDQKNCALKCRESCVEVGCSSAEGAYEEE
VLENADLPTAPFASSIGSHNMTLRWKSANFSGVKYIIQWKYAQLLGSWTYTKTVSRPSYV
VKPLHPFTEYIFRVVWIFTAQLQLYSPPSPSYRTHPHGVPETAPLIRNIESSSPDIVEVS
WDPQPFPGGPILGYNLRLISKNQKLDAGTQRTSFQFYSTLPNTIYRFSIAAVNEVGEVPE
AESSITSSSAVQQEEQWLFLSRKTSLRKRSLKHLVDEAHCLRLDAIYHNI TGISVDVHQ
QIVYFSEGTLIWAKKAANMSDVSDLRIFYRGSGLISSISIDWLYQRMYPIMDELVCVCDL
ENCNIEEITPPSISAPQKIVADSYNGYVFYLLRDGIYRADLPVPSGRCAEAVRIVESCT
LKDFAIKPQAKRIIYFNDAQVFMSTFLDGSASHLILPRIPFADVKSFACENNDLFTVDG
KVIFQDALSFNFI VGCDSLHIEEFGFNLVIFGSSSQLHPLPGRPQELSVLFGSHQAL
VQWKPPALAI GANVILISDI IELFELGPSAWQNWYEVKVSTQDPPEVTHIFLNI SGTML
NVPQLQSAMKYKVSVRASSPKRPGPWSEPSVGTTLVPAEPPFIMAVKEDGLWSKPLNSF
GPGEFLSSDIGNVSGNCSNFRPQ*WAPVLVGSRQSMYSPVHSCSSGTEHWGYHHHRICSL
EYF*NFPECTDVL*WSAVLDQWL*DYHNSRNRSENQCLCFGTSQI*SVHNYSDIP*APAR
ELFLYP*GYSRFCSRVFI*D*RKCFKFSNPVEWSPCGRLGCSFLQCRI*CSF*VLG**TT
LFTCIYCGRTGTLCLI*SFCHSLYLLGKGPQNI SVTSS*NSSISTREPQNIYITKWKML
QQE*SCGGI*VEQT*A*KWGVNKI*NFLQYIQSKYKQNM*RLDCCQCHSLSDVFAST*RH
ESQMLYCLPG*GLYI*GARTIC*RCKVYNIRNQPISSPHNSSW*QDSFFRYGSKSSCVDV
FSRKSQYQCRLLHS***DGILC*RGLTLSSALAQSL*L*AFPRFTGF*YHSYYN*LDFKAP
LLCTERITKWNASI*C*S*TOGEISQRGEDSQ*EFNNNFFFCISSFKSLVLDRSFQFWLP
DVLQYYQSHLAVLESYHSTCYARRKNPC*LNCGWRSYILDHHSKGQHTDLSGKERKWGHR
FPGEGPKE*AYLGLQFSYAAF SR*SVSVSFRHCGTNYT*CH*H*PHNQITSGQDKPHMV
WHHQPYSNIPGLLCS**QEKQL*LEI*NSGISGQYSSY*RFTTIFNIHDTDSCKLLFR
SFGTFTTRKRD LGKN*KWSTRGSAAH*YNCAVRHQPHYILERISQAKWT*RISPLSVGNL
TPGPNS*NSSKTK*ISKWKAHSPCY*TVWWKYL CVKGSCLPL*GNVVYRESSCHCGNV*H
TRETFLGSRH*FAI*LEGSIEC*PHQILG*ATEVEIQ*VLPC*NFMQPRSCCL*YHK
STTLFYI*CQSSGGL*DGK*HLTSRKL*DKSWSPK*TRHSQITRRE*KFNTVGES*R*W
M*NYILYP*DKKEHFK*FTEPEFKVEDDI*WILQ*CLHMEVQKPERNISVQSSSCK*SRV
W*I*WNQ*EYYISWR*FLDTRNKFHTYYSWNI SGCYNPTDLCLA*KIKESKQCQGRGDS
AYKRRQRVG*AARSGRSRPG*CLLCNTYSSNPRGD*KSSCLPSGKTDSASLAGKWSLWR
SV*RNSSGHLRSWKWRNQSSSEDFEFGFHRPGE* IPEGGTSDEQI*SSQHSEAAWSLSA
E*TPIHYPGTDGRRPSYLF*SPDGNVLWFSFTHLG*PCRVPCRYFKRLCCLLGTDAFHSQ
GSGS*KLPCFRERLYQSTDSEDWRLWTRQRHL*K*LL*KERGRPAPSSVDGSRKFDGWNL
HYSI*CMVFNWSDLGDFNSWSSALSSSFQP*CVKLCANRRETGATKKS**SVEFNDFVL
GSRTRPKTYFS*NSGPTSVIQKFFLK*HL*VQR*SKQQWSHK*KL*R*RWRCDLFEFR*H
YASCFNNGEPRRVKLYGT CYRMWPR*RKV*GSSRLPGI*ILWSEERREGTTCRQRF LPR
KTSGLLPFWQA*RPELCLSHSQWIWRWV*LIALFGK*RVEINTLIQ*LLKENSARMINVM
VVYNSK*TMQRS

```

Produkt 2:

```
>EMBOSS_001_3
SFQAFKGLNEKG*VLFQKASIS*YSKTNKAKSISYSSN*SDEAQIIHIAKWRKLDLDRPSKN
LPLVK**RTFTVLFRLSLSILQLLAAYGFLWCSVQF*IAALQLLAAYGFLWCSVQF*IAA*
SRV*LIWASSLTLAHHII*VNRVSKDVTFTGL*IRKTVL*SVGSRVRLAVAARKVHMKRK
YWKMQTYQLLPLLLPLEATI*HYDGNLQTSLE*NTSFSGNMHNFWAAGLILRLCPDRPMW
SSPCTPSLSTFSEWFGSSQSRSCSSTPLQVPVTGLIILMEFLKHL*LGILRAQVPTLWKS
GIHLNSQVDLFWVIT*G*SAKIKN*MQGHREPVSSTPLYQILSTGFLLQQ*MKLVRVQK
QNLVPLHLQFNRKNSGFSFYPEKLL*ERDL*NI**MKHIAFGWMLYTIILQEYLLMSTS
KLFISLKELSYGRRLPTCLMYLT*EFFTEVQD*FLLSP*IGFIKECISWNNWYVSVI*
RTAQTSRKLHLPLLVHLKKLWLIHTMGMSFTS*EMAFIEQTFLYHLAGVQKLCVLRVAR
*RTLQSSHKPSSEFTSMTLPKSSCQHFWMALLPISYLAAPLLM*KVLLVKTMTFFLSQMA
RSFSNRMLCLLMNSWDVT*VT*KNLGLVTWSSLAHPPSCTLCQAARRSFRCCALTRLL
FNGSLLPLP*EPMSS*SVILLNSLN*ALLPGRGTGPMR*KYPPKTLKSLIFS*T*VEPC*
MYLSCRVL*NTRFL*EQVLQRGQAPGQSPQWVLPWCQLVNHHSWL*KKMGFGVNH*IAL
AQESSYPLI*EMCQVIALTLDSLGLLYWLVQDSQCIHLYTAVLRGQSTGDTTITEFAAW
STSEISQNALMYYSGRLEFWINGFRIITTEIGQKTSVSVLEPARFNQFTIIQTSLKPLPG
NFSFTPKVIPDSVQESSFRIEGNASSFQILWNGPPAVDWGVVVFYSVEFSAHSKFLASEQH
SLPVFTVEGLEPYALFNLSVTPYTYWGGKPKTSLSLRAPETVPSAPENPRIFILPSGKCC
NKNEVVVEFRWNKPKHENGVLTKFEIFYNISNQSITNKTCEDWIAVNVTPSVMSFQLEGM
SPRCFIAFQVRAFTSKGPGPYADVVKSTTSEINPFPHLITLLGNKIVFLDMDQNVVWTF
SAERVISAVCYTADNEMGYAEGDSLFLHLHNRSSSELFQDSLVDITVITIDWISRHL
YFALKESQNGMQVFDVDLEHKVKYPREVKIHNRSSTIISFSVYPLLSRLYWTEVSNFGYQ
MFYYSIISHTLHRILQPTATNQONKRNQCSCNVTEFELSGAMAIDTSNLEKPLIYFAKAQ
EIWAMDLEGQCWRVITVPAMLAGKTLVSLTVGDLIYWIITAKDSTQIYQAKKGNGAIV
SQVKALRSRHLIAYSSVMQFPDKAFLSLASDTVEPTILNATNTSLTIRLPLAKTNLTWY
GITSPTPTYLVIYAENVDRKNSSDLKYRILEFQDSIALIEDLQPFSTYMIQIAVKNYSD
PLEHLPPGKEIWGKTKNGVPEAVQLINTTVRSDSLII SWRESHKPNGPKESVRYQLAIS
HLALIPETPLRQSEFPNGRLTLLVTRLSSGNIYVLKVLACHSEEMWCTESHVPTVEMFNT
PEKPYSLVPENTSLQFNWKAPLNVNLRIFWVELQKWYNEFYHVKTSCSQGPAYVCNITN
LQPYTSYNVRVVVYKGTGENSTSLPESFKTKAGVFNKPGIPKLEGSKNSIQWEKAEDNG
CRITYYILEIRKSTSNLQNLNRWKMTFNGSCSSVCTWKSKNLKGIFQFRVVAANNLGF
GEYSGISENIIILVGDDFWIPETSFILTIIVGIFLVVTIPLTFVWHRRLKNQSAKEGVTV
LINEDKELAEALRGLAAGVLANACYAIHTLPTQEEIENLPAFPREKTLRLLLGSGAFGE
VYEGTAVDILGVSGEIKVAVKTLKKGSTDQEKIEFLKEAHLMSKFNHPNLIKQLGVCLL
NEPQYIILELEGGDLLTYLRKARMATFYGPLLTLVDLVDLCVDISKGCVYLERMHFIHR
DLAARNCLVSVKDYTSPIVKIGDFGLARDIYKNDYRKRGEGLLPVRWMAPESLMDGIF
TTQSDVWSFGILIWEILTLGHQPYPAHNSLDVLNIVQTGGRLEPPRNCPPDDLWNLMTQCW
AQEPDQRPTFHRIQDQLQFLRNFFLNSIYKSRDEANNSGVINESFEGEDGDVICLNSDDI
MPVALMETKNREGLNYMVLATECGQGEKSEGPLGSQSESESCGLRKEEKEPHADKDFCQE
KQVAYCPSGKPEGLNYACLTHSGYGDGSD**RCLGNRELRTLSFSSY*KKTLL*MSW
WSITPNKQCNVP
```

Die Deletion führt zu einer Verschiebung des Leserasters

Mögliche Produkte (grau unterlegt):

1. Produkt enthält einen verkürzten extrazellulären Teil von ROS1, Abbruch der Translation aufgrund einer Leserasterverschiebung nach Aminosäure Q717, identisch bis Aminosäure S708 (Leserahmen 2)
2. Produkt (1518 AS) ist ab Aminosäure V833 identisch mit ROS1, enthält partiellen extrazellulären Teil, Transmembrandomäne, Kinasedomäne (Leserahmen 3)

Mögliche Translationsprodukte der *ROS1*-Transkriptvariante mit einer Deletion von Exon 13 – 17 inklusive der letzten 3 bp aus Exon 12 durch Verwenden einer alternativen Spleiße-Site (r.[=,1757-2587del])

Produkt 1:

```
>EMBOSS_001_1
QAFKHSKV*MKKAKYFFKRQVYPNIAKQTKQNP SATPP IEVMKPK*FI*QNGEN*TGHLK
ICHW*SDEEHLLSYSEACQFCNSWLPMDFCGAVYSFK*LPKVVCN*SGPAA*PWHTT*SE
*TVYPRMSLLELCRSEKLCFKVSGVV*GWL*QRGRCI*RGSTGKCRPTNCSLFCFFHWKPQ
YDITMEICKLLWSKIHHSVEICTTSGKLDLY*DCVQTVLCGQAPAPLH*VHFPSGLDLHS
AAAALLPKSKSQLQDSSSWSS*NCTFD*EY*ELKSRHCGSQLGSTSIPRWTFYFGL*LKADQ
QKSKIRCRDTEHQFPVLLHFTKYLLQVFYCSSK*SW*GSRRI*YYHFIFSSSTRGTVAL
FIQKNFSKKEIFKTFSR*STLPSVGCYIP*YYRNIC*CPPANCLFL*RNSHMGEEGCQHV
*CI*PENFLQRFRINFFYLHRLALSKNVHHG*TMCL*FRELLKHRGNYSTLY*CTSKN
CG*FIQWVCLLPPERWHL*SRPSCIWVPCRSCAYCGELHVKGLCNQATSQANHLLQ*HC
PSLHVNIISGLWLCFSPHPTSHPLC*CEKFCL*KQ*LSCHRWQGHFPTGCFV**IHRGM*P
ESHRRIVW*LGHLWLILPAAP SARPPAGAFGAVWLSPGSCSMEASCPCHRSTGDTTITE
FAAWSTSEISQNALMYSGRLFWINGFRIITTOEIGQKTSVSVLEPARFNQFTIIQOTSLK
PLPGNFSFTPKVIPDSVQESSFRIEGNASSFQILWNGPPAVDWGVVVFYSVEFSAHSKFLA
SEQHSLPVFTVEGLEPYALFNLSVTPYTYWGKPKTSLSLRAPETVPSAPENPRIFILPS
GKCCNKNEVVVEFRWNKPKHENGVLTKFEIFYNISNQSITNKTCEDWIAVNVTPSVMSFQ
LEGMSPRCFIAFQVRAFTSKGPGPYADVVKSTTSEINPFPHLITLLGNKIVFLDMDQNV
VWTF SAERVI SAVCYTADNEMGYAEGDSLFLHLHNRSSSELFQDSLVDITVITIDWI
SRHLYFALKESQNGMQVFDVDLEHKVKYPREVKIHNRNSTIISFSVYPLLRLYWTEVSN
FGYQMFYYSIIISHTLHRILQPTATNQONKRNQCSCNVTEFELSGAMAIDTSNLEKPLIYF
AKAQEIWAMDLEGCQCWRVITVPAMLAGKTLVSLTVDGDLIYWIITAKDSTQIYQAKKGN
GAIVSQVKALRSRHLAYSSVMQFPDKAFLSLASDTVEPTILNATNTSLTIRLPLAKTN
LTWYGITSPPTYL VVYAEVNDKNSDLKYRILEFQDSIALIEDLQPFSTYMIQI AVKN
YSDPLLEHLPPGKEIWGKTKNGVPEAVQLINTTVRSDSLII SWRESHKPNGPKE SVRYQ
LAISHLALIPETPLRQSEFPNGRLTLLVTRLSGGNIYVLKVLACHSEEMWCTESHVPTVE
MFNTPEKPYSLVPENTSLQFNWKAPLNVNLI RFWVELQKWYNEFYHVKTSCSQGPAYVC
NITNLQPYTSYNVRVVVYKGTENSTSLPESFKTKAGVPNKP GIPKLLLEGSKNSIQWEKA
EDNGCRITYYILEIRKSTSNLQNLNRWKMTFNGSCSSVCTWKSKNLKGIFQFRVVAAN
NLGFGEYSGISENII LVGDDFWIPETSFILTIIVGIFLVVTIPLTFVWHRRLLKNQKSAKE
GVTVLINEDKELAE LRGLAAGVGLANACYAIHTLPTQEEIENLPAFPREKLT LRLLLGSG
AFGEVYEGTAVDILGVGSGEIKVAVKTLKKGSTDOEKIEFLKEAHLMSKFNHPNILKQLG
VCLLNEPQYIILELMEGGDLLTYLRKARMATFYGPLLTLVDLVDLCVDISKGCVYLERMH
FIHRDLAARNCLVSVKDYTSPRIVKIGDFGLARDIYKNDYRKRGEGLLPVRWMAPESLM
DGIFTTQSDVWSFGILIWEILTLGHQPYPAHNSLDVLYVQTTGGRLEPPRNCPPDDLWNLM
TQCWAQEPDQRPTFHRIQDQLQLFRNFFLNSIYKSRDEANNSGVINESFEGEDGDVICLN
SDDIMPVALMETKNREGLNYMVLATECGQGEKSEGPLGSQESSESCGLRKEEKEPHADKD
FCQEKQVAYCPSGKPEGLNYACLTHSGYGDGSD**RCLGNRELRTLSFSSY*KKTLL*
*MSWWSITPNKQCNVP
```

Produkt 2:

```
>EMBOSS_001_2
KLSSIQRSK*KRLSII SKGKYILI*QNKQSKIHQLLLQLK**SPNNSYSKMEKIRPAI*K
SAIGEVMKNIYCLIPKLVNFATLGCLWISVVQCTVLNSCLKSCVTNLGQQLDLGTPHNLS
EPCIQGCHEFWNSVDQKNCALKCRESEVGCSSAEGAYEEEEVLENADLP TAPFASSIGSHN
MTRLRWSANFSGVKYIIQWKYAQLLGSWYTKTVSRPSYVVKPLHPFTEYIFRVVWIFTA
QLQLYSPSPSYRTHPHGVPE TAPLIRNIESSPDTVEVSWDPPQFPGGPILGYNLRLIS
KNQKLDAGTQRTSFQFYSTLPTNTIYRFSIAAVNEVGEGPEAESSITSSSAVQQEEQWLF
LSRKTSLRKRSLKHLVDEAHCLRLDAIYHNITGISVDVHQQIVYFSEGTLIWAKKANMS
DVSDLRIFYRYSGLLSSIIADWLYQRMFYIMDELVCVCDLENCNIEEITPPSISAPQKI
VADSYNGYVYGLLDGIYRADLPVPSGRCAEAVRIVESCTLKDFAIKPAKRIIYFNDTA
QVFMSTFLDGSASHLILPRIPFADVKSFACENNDLVTDGKVIQFDALSFNEFIVGCDL
SHIEEFGFGNLVIFGSSSQLHPLPGRPQELSVLFGSHQALVQWKPPALAI GALGIPPSQN
```

LQPGVLLKFRPMH*CTIVVGCSSGSMALGLSQLKK*VRKPVSLFVNQPDLISSQLFRHPLS
 PCQGTFFPLPLRFLQILFKSLHLGLKEMLQVFKSCGMVPLR*TGV*FSTV*NLVLISSWL
 VNNTLYLYLLWKDWNLMPLYLIFLSLLIPTGERAPKHLCHFHEHLKQFHQHQRTPEYLYYQV
 ENAATRMKLWNNLGGTNLSMKMGC*QNLKFSTIYP IKVLQTKHVKTGLLSMSLPQ*CLFN
 LKA*VPDALLPSRLGPLHLRGQDHMLTL*SLQHOKSTHFLTS*LFLVTR*FF*IWIKIKL
 CGRFQOKELSVPFATQLIMRWDIMLKGTHSFFCTCTIALALSFSKIHWFLLISQLLQLTGF
 QGTSTLH*KNHKMECKYLMLILNTR*NIPER*RFTIGIQQ*FLFLYILF*VACIGQKFP I
 LATRCSTTVLSVTPCTEFCNPNQLQTNKTKGINVLM*LNLS*VEQWLLIPLT*RNH*YTL
 PKHKRSGQWIWKAVSVGELSQYLLCSQEKPLLA*LWMEILYTGSSQORTAHRF IRQRKEM
 GPSFPR*RP*GVGISWLTVQLCSLQIKRFL*LOTLWNQLYLMLPLTLASQSDYLWPRQT
 SHGMASBALLQHTWFIMQKLMGTGKTALT*NIEFWNFRTV*LLLKIYNHFQHT*YR*L*KI
 I IQILWNIYHQEKRFGEKLMKMEYQRQCSSLIQLCGQTPASLYLGENLTSQMDLKNQSVIS
 WQSHTWP*FLKLL*DKVNFQMEGSLSLLLDCLVEIFMC*RFLPATLRKCGVQRVILSLWK
 CLTHQRNLIIPWFQRTLVCNLIIGRLH*MLTSSDFGLSYRSGNTMSFTMLKLHAAKVLMSV
 ISQIYNLILHIMSE*WWFIRREKIAPHFQKALRQKLESQINQAFPNY*KGVKIQYSGRKL
 KIMDVELHTISLR*ERALQIIYRTRI*GGR*HLMDPAVVFAHGSPKT*KEYFSSE**LQI
 I*GLVNIVESVRILY*LEMIFGYQKQVSYLLL*LEYFWLLQSH*PLSGIED*RIKKVPRK
 G*QCL*TKTKSWLSCEVWQPE*AWLMPAMQYILFQPKRRLKIFLPSLGKN*LCVSCWEVE
 PLEKCMKEQQWTS*ELEVESK*Q*RL*RRVPQTRRRLNS*RRHI**ANLIIPTF*SSLE
 FVC*MNPNTLSWN*WREETFLLCVKGWQRFMVLYSPWLT*TCV*IFQKAVSTWNGCI
 SFTGIWQLEIALFP*KTIPVHG**RLETLDSPETS IKMITIEREGKACSQFGGWLQKV*W
 MESSLLNLMYGLLEF*FGRF*LLVISLIQLIPTLMC*TMCKQEGDWSHQEIVLMICGI**
 PSAGLKNPTKDLLFIEFRNTNFSYSEIFS*IAFISPEMKQTTVES*MKALKVKMAM*FV*I
 QMTLCQLL*WKRTEKG*TIWYLLQNVAKVKKSLRVL*APRNLLV*GKKRRNHMQTKI
 SAKKNKWL TALLASLKA*TMPVSLTVDMEMGLINSVVVEIES*DKHSHSVVTERKLC*ND
 KCHGGL*LQINNATFX

Die Deletion führt zu einer Verschiebung des Leserasters

Mögliche Produkte (grau unterlegt):

1. Produkt (1491 AS) ist ab Aminosäure S866 identisch mit ROS1, enthält partiellen extrazellulären Teil, Transmembrandomäne, Kinasedomäne (Leserahmen 1)
2. Produkt enthält einen verkürzten extrazellulären Teil von ROS1, Abbruch der Translation aufgrund einer Leserasterverschiebung nach Aminosäure A607, identisch mit ROS1 bis Aminosäure A586 (Leserahmen 2)

Mögliche Translationsprodukte der ROS1-Transkriptvarianten mit einer Insertion von 3 bp zwischen Exon 17 und Exon 18 (r.[=,2597-2598insCAG])

Produkt:

>EMBOSS_001_2
 KLSSIQRSK*KRLSIIISKGYILI*QNKQSKIHQQLLQLK**SPNNSYSKMEKIRPAI*K
 SAIGEVKNIYCLIPKLVNFATLGCLWISVVQCTVLNSCLKSCVTNLGQQDLGTPHNLS
 EPCIQGCHEWNSVDQKNCALKCRESEVGCSSAEGAYEEVLENADLP TAPFASSIGSHN
 MTLRWKSANFSGVKYIIQWKYAQLLGSWYTKTVSRPSYVVKPLHPFTEYIFRVVWIFTA
 QLQLYSPSPSYRTHPHGVPETAPLIRNIESSPDTVEVSWDPPQFPGGPILGYNLRLIS
 KNQKLDAGTQRTSFQFYSTLPNTIYRFSIAAVNEVGEGPEAESSITSSSAVQQEEQWLF
 LSRKTSLRKRSLKHLVDEAHCLRLDAIYHNITGISVDVHQQIVYFSEGTLIWAKKANMS
 DVSDLRIFYRGSGLISSISIDWLYQRMFYIMDELVCVCDLENCNIEEITPPSISAPQKI
 VADSYNGYVYLLRDGIYRADLPVPSGRCAEAVRIVESCTLKDFAIKPAKRIIYFNDDTA
 QVFMSTFLDGSASHLILPRIPFADVKSFACENNDLVTDGKVIQDALSFNFIYVGCIDL
 SHIEEFGFGNLVIFGSSSQLHPLPGRPQELSVLFGSHQALVQWKPPALAIGANVILISDI
 IELFELGPSAWQNWTYEVKVSTQDPPEVTHIFLNI SGTMLNVPPELQSAMKYKVSVRASSP
 KRPGPWSEPSVGTTLVPASEPPFIMAVKEDGLWSKPLNSFGPGEFLSSDIGNVSDMDWYN

```

NSLYYSDTKGDVFWLLNGTDI I SENYHLP S IAGAGALAFEWLGHFLYWAGKTYVIQRQSV
LTGHTDIVTHVKLLVNDMVDVSVGGYLYWTTLYSVESTRLNGESSLVLQTQPWFSGKKVI
ALTLDLSDGLLYWLVQDSQCIHLYTAVLRGQSSSTGDTTITEFAAWSTSEISQNALMYYSG
RLFWINGFRIITTQEIGQKTSVSVLEPARFNQFTIIQTSCLKPLPGNFSFTPKVIPDSVQE
SSFRIEGNASSFQILWNGPPAVDWGVVVFYSVEFSAHSKFLASEQHSLPVFTVEGLEPYAL
FNLSVTPYTYWGKPKTSLSLRAPETVPSAPENPRIFILPSGKCCNKNEVVVEFRWNKPK
HENGVLTKFEIFYNISNQSITNKTCEDWIAVNVTPSVMFSQLEGMSPRCFIAFQVRAFTS
KGGPGYADVVKSTTSEINFPFLITLLGNKIVFLDMDQNQVWTFSAERVISAVCYTADN
EMGYAAEGDSLFLHLHNRSSSELFQDSLVDITVITIDWISRHLVFALKESQNGMQVFD
VDLEHKVKYPREVKIHNRNSTIISFSVYPLLSRLYWTVEVSNFGYQMFYYSIISHTLHRIL
QPTATNQKNRNCSCNVTEFELSGAMAIDTSNLEKPLIYFAKAQEIWAMDLEGCQCWRV
ITVPAMLAGKTLVSLTVDGDLIYWIITAKDSTQIYQAKKNGAIVSQVKALRSRHILAYS
SVMQPFDPKAFSLASDTVEPTILNATNTSLTIRLPLAKTNLTWYGITSP TPTYL VYYAE
VNDRKNSSDLKYRILEFQDSIALIEDLQPFSTYMIQI AVKNYSDPLEHLPPGKEIWGKT
KNGVPEAVQLINTTVRSDTSLIISWRESHKPNPKESVRYQLAISHLALIPETPLRQSEF
PNGRLTLLVTRLSSGNIYVLKVLACHSEEMWCTESHPTVEMFNTPEKPYSLVPENTSLQ
FNWKAPLNVNLRFWVELQWKYNEFYHVKTSCSQGPAYVCNITNLQPYTSYNVRVVVVY
KTGENSTSLPESFKTKAGVNPKPGIPKLLLEGSKNSIQWEKAEDNGCRITYYLEIRKSTS
NNLQNLQNLRWKMTFNGSCSSVCTWKSKNLKGIFQFRVVAANNLGFGEYSGISENIILVGD
DFWIPETSFILTIIVGI FLVVTIPLTFVWHRRLNKQKSAKEGVTVLINEDKELAE LRGLA
AGVGLANACYAIHTLPTQEEIENLPAFPREKLT LRLLLGS GAFGEVYEGTAVDILGVGSG
EIKVAVKTLKKGSTQEKIEFLKEAHLMSKFNHPNILKQLGVCLLNEPQYIILELMEGGD
LLTYLRKARMATFYGPLLTLVDLVDLCVDISKGCVYLERMHFIHRDLAARNCLVSVKDYT
SPRIVKIGDFGLARDIYKNDYYRKRGEGLLPVRWMAPESLMDGIFTTQSDVWSFGIL IWE
ILTLGHQPYPAHSNLDVNLVYVQTGGRLEPPRNCDDLWNLMTQCWAQEPDQRP TFHRIQD
QLQLFRNFFLNSIYKSRDEANNSGVINESFEGEDGVI CLNSDDIMPVALMETKNREGLN
YMLVLAATECGQGEKSEGPLGSQESESCGLRKEEKEPHADKDFCQEKQVAYCP SGKPEGLN
YACLTHSGYGDGSD**RCLGNRELR*TLFSFSSY*KKTLL E**MSWWSITPNKQCNVP

```

Die Insertion führt zu keiner Verschiebung des Leserasters. Nach Aminosäure S866 wird ein zusätzliches Serin (S) eingefügt (Position dunkelgrau markiert), (Leserahmen 2).

Potentielle Translationsprodukte der *LTK*-Transkriptvarianten

Mögliche Translationsprodukte der *LTK*-Transkriptvariante mit einer Deletion von Exon 2 – 7 (r. 222-1175del)

Produkt:

>EMBOSS_001_1

```

PWQNELSTLG*QGCGRDRKGFCCRVDPTGMGCWGQLLVWFGAAGGDASETDNLWADGEDG
VSFIHPSSEFLQPLAVTENHGEVEIRRHLNCSHCPLRDCQWQAEQLQAECLCPEGMELA
VDNVT CMDLHKPPGPLVLMVAVVATSTLSLLMVCGVLI LGTKRLAGTVDSRLLLSMKQKK
WQGLQEMRLPSPELELSKLR TSAIRTAPNPYYCQVGLGPAQSWPLPPGVTEVSPANVTLL
RALGHGAFGEVYGLVIGLPGDSSPLQVAIKTLPELCSPODELDFLMEALII SKFRHQNI
VRCVGLSLRATPRLILLELMSSGDMKSF LRHSRPHLGQPSPLVMRDLQLAQDIAQGCHY
LEENHF IHRDLAARNCLLSCAGPSRVAKIGDFGMARDIYRASYYRRGDRALLPVKWMPE
AFLEGIFTSKTD SWSFGVLLWEIFSLGYMPYPGR TNQEVLD FVVGGRMDPPRGCPGPVY
RIMTQCWQHEPEL RPSFASILERLQYCTQDPDVLNSLLPMELGPTPEEEGTSGLGNRSLE
CLRPPQPQELSPEKLSWGGSP LGPWLSSGLKPLKSRGLQPQNLWNP TYRS*APRGPEGK
D*GTEGP

```

Durch die Deletion der Exons 2 – 7 entsteht keine Verschiebung des Leserasters.

Mögliches Produkt (grau unterlegt), bezogen auf den cDNA-Klon (BC143903):

Im Vergleich zu Isoform 1 sind die AS M1 – G15, G334 – L448 und K450 – S864 identisch, die AS A16 bis G333 sind deletiert. Zusätzlich erfolgen eine Insertion von 16 AS im Bereich der Transmembrandomäne sowie ein Aminosäureaustausch (V449M).

Eine veränderte Funktion und Lokalisation des Proteins ist wahrscheinlich, da die Kinasedomäne vollständig enthalten ist, jedoch ein großer Teil des extrazellulären Bereichs fehlt und der Bereich der Transmembrandomäne verändert ist.

Die Sequenz des cDNA-Klons BC143903 entspricht der Variante X1 (XM_005254381), bei der die Exons 2 – 7 fehlen.

Mögliche Translationsprodukte der *LTK*-Transkriptvariante mit einer Deletion von Exon 4 – 7 (r. 538-1175del)

Produkt 1:

```
>EMBOSS_001_2
GSEVGVARPALGPGSVSPAAAHPCKWWPGLPWQNELSTLG*QGCGRDRKGFCCRVDPTGM
GCWGQLLVWFGAAGAILCSPSPGSQETFLRSSPLPLASPSPRDPKVSAPPSILEPASPLNS
PGTEGSWLFSTCGASGRHGPTQTQCDGAYAGTSVVVTVGAAGQLRQVQLWRVPGPGQYLG
RRFRD*QPLG*WGRWSILHTPQQRALPAASGSHREPRRGRDPKAPQLQSLPFFERLPMAGR
APAG*MPVPRRHGASCG*RHLHGPAQAPRPSGSDGGCGGNLNTPEPPYGVWGPDSGEAEV
AGPAGDEAAEP*A*AEQASNLCHQDSPQSLLLPGGAWPGPVLASATRCHRGFPSPQCYSQAQ
SPGPWCLWGGV*GTGNWPSWGLQSPAGSYQDPARTLLASG*AGFPHGGPHHQVSPSEHC
AVCGAQPOGHPSPHSAGTDVWRGHEEFPEAQSATPGPAITSGHAGPAATGPGHSPGLPLP
GGKSLHPQGYCRPELPAELRWTPSGQDWGLWDGTRYLPQQLLPQGGPGLAPSQVDAPRG
LPGGHLHIQDRFLVFWGAALGDLLTGLHALSWAHQPGGAGLRRRWRDPGSP*GLPRACVP
HNDPVLAAARA*APP*LCQHLGASAVLHSGPGCAEFTPANAGAHPRGGRDFWAGEQIFGV
PKTPTAPGTESREVEKLG*PSWPLAVLWPQAPQIQGPPTSEPLESHLSLLSPKGP*G*G
LRH*GSLPILLRLLGGLLCQRPLFPVAVCLGLSRGWPGSAALAMLETSPGLPGKGPAT
SSF*SWGQRPPYTHPRCPWGALDCSPIMSLHLGRPPTLQMLLIKSSSHQKKKKX
```

Produkt 2:

```
>EMBOSS_001_3
GLRWAWPDQL*VRGVSRQRQHTPVSGGQGCRGKMSCQL*VDRGVAATARAFVAGWTQQGW
AAGDSCWCGSEPRAPFSALARGPRRLFCGRPCRWPAPGTRKSAPRLVSWSQPPR*IL
RAPRGLGCFPLPAGPAAGMGPHRHNTGRTRGPAWW*PWGPPGS*EACSCGACRALASIWG
DASETDNLWADGEDGVSF IHPSSSELFLOPLAVTENHGEVE IRRHLNCSHCPLRDCQWQAE
LQLAECLCPEGMELAVDNVTCMDLHKPPGPLVLMVAVVATSTLSLLMVCGVLIILVKQKKW
QGLQEMRLPSPELELSKLRTSAIRTAPNPYYCQVGLGPAQSWPLPPGVTEVSPANVTLLR
ALGHGAFGEVYEGLVIGLPGDSSPLQVAIKTLPELCSPODELDFLMEALII SKFRHQINIV
RCVGLSLRATPRLILLELMSGGDMKSF LRHSRPHLGQPSPLVMRDLLQLAQDIAQGCHYL
EENHFIHRDIAARNCLLSCAGPSRVAKIGDFGMARDIYRASYYRRGDRALLPVKWPPEA
FLEGIFTSKTDSSWFGVLLWEIFSLGYMPYPGRTNQEVLDVVGGRMDPPRGCPGPVYR
IMTQCWQHEPELRPSFASILERLQYCTQDPDVLNLSLLPMELGPTPEEEGTSGLGNRSLEC
LRPPQPQELSPEKLSWGGSPGLPWLSSGLKPLKSRGLQPQNLWNPTYRS*APRGPEGKD
*GTEGPSLYSSGSWVACYASGLCSLQSVLCVWACLGAGLAALHPLCWKPAQASQGRAQPL
PAFDL GARGRLTHTPGVHGEHWIALPL*ASFIWADPPP CRCF**KALLIKKKKKX
```

Die Deletion führt zu einer Verschiebung des Leserasters

Mögliche Produkte (grau unterlegt), bezogen auf Isoform 1 (NP_002335.2):

1. Produkt enthält einen verkürzten extrazellulären Teil von LTK, Abbruch der Translation aufgrund einer Leserasterverschiebung nach 126 AS, das Protein ist bis L120 identisch mit LTK (Leserahmen 2).
2. Produkt (459 AS) ist ab Aminosäure M406 identisch mit LTK, enthält partiellen extrazellulären Teil, Transmembrandomäne, Kinasedomäne (Leserahmen 3).