

In-situ-Hybridisierung

Lungenkarzinome



ZYTOMED[®]
SYSTEMS

ZytoLight[®] SPEC ALK/EML4 TriCheck[™] Sonde

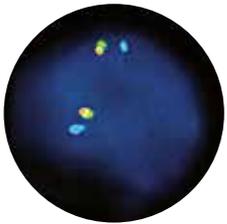
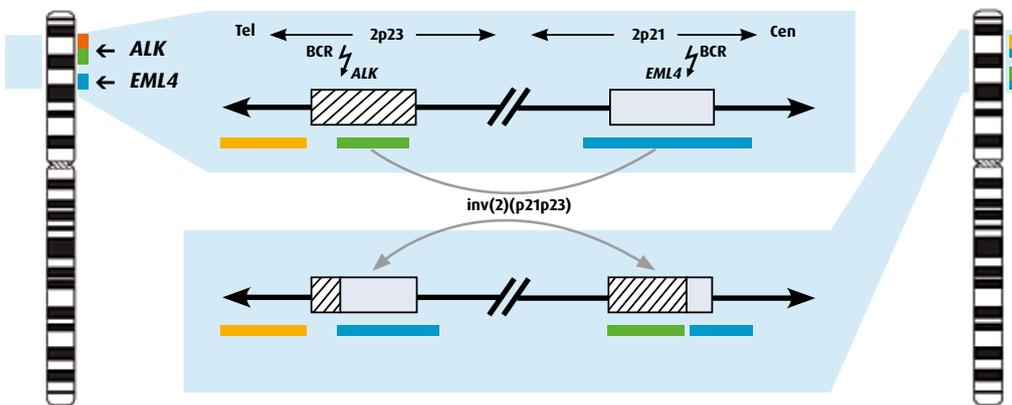
► Hintergrundinformationen

Lungenkrebs führt weltweit häufiger als jede andere Krebsart zum Tode, so dass der Verbesserung von Diagnostik und Therapie eine besondere Bedeutung zukommt. Das Konzept der Behandlung des nicht kleinzelligen Lungenkarzinoms (*Non small cell lung cancer, NSCLC*) mit zytotoxischen Chemotherapeutika wird seit ca. 15 Jahren zunehmend durch gezielte Therapieansätze bei Vorliegen bestimmter Treibermutationen ergänzt [1].

Eine dieser Treibermutationen ist ein Bruch des ALK-Gens auf Chromosom 2. Dabei gerät der 3'-Bereich von ALK incl. der Tyrosinkinase-Domäne unter die

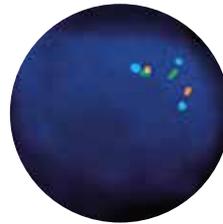
Kontrolle starker Promotoren anderer Gene, was ein unreguliertes Zellwachstum zur Folge hat. Rearrangements des ALK-Gens treten bei 3% bis 6% aller Patienten mit einem NSCLC auf [2]. Am häufigsten ist dabei infolge einer Inversion auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 eine Fusion von ALK mit dem EML4-Gen [3]. Zahlreiche weitere Fusionspartner von ALK sind mittlerweile bekannt [4]. Inzwischen existieren ALK-Inhibitoren der 2. und 3. Generation, die auch bei Resistenzmutationen wirken, und bei einer Behandlung mit zwei aufeinanderfolgenden ALK-Inhibitoren beträgt das Überleben von ALK-positiven NSCLC-Patienten mehr als 5 Jahre [5].

Detektion von *EML4-ALK* Inversionen in NSCLC mit der ZytoLight[®] ALK/*EML4* TriCheck[™] Sonde



Im Falle einer *EML4-ALK* Inversion *inv(2)(p21p23)* wird ein ALK-spezifisches orange-grünes Fusionssignal in ein oranges und ein grünes Signal getrennt. Gleichzeitig wird auch das *EML4*-spezifische blaue Signal in zwei separate blaue Signale aufgetrennt, die dann jeweils mit einem grünen und einem orangenen Signal colokalisiert vorliegen. (BCR: breakpoint cluster region).

© ZytoVision GmbH



► Diagnostik

Mit konventionellen ALK Break Apart FISH-Sonden sind *EML4-ALK*-Inversionen in manchen Fällen nicht sicher detektierbar. Das ALK- und das *EML4*-Gen liegen auf Chromosom 2 relativ dicht im Abstand von ca. 12 Mb nebeneinander, was zu einer nur geringen Signaltrennung des grünen und des orangenen Signals bei reinen ALK Break Apart-Sonden führen kann [6].

Mit der patentierten ZytoLight[®] SPEC ALK/*EML4* TriCheck[™] Sonde unserer Schwesterfirma ZytoVision ist es möglich, Fusionen der 3'-Region von ALK mit der 5'-Region von *EML4* eindeutig nachzuweisen (Abbildung Seite 3). Auch wenn es zu Deletionen im Bereich des ALK-Bruchpunkts bzw. Translokationen ohne Beteiligung des *EML4*-Gens kommt, kann dies sicher diagnostiziert werden.

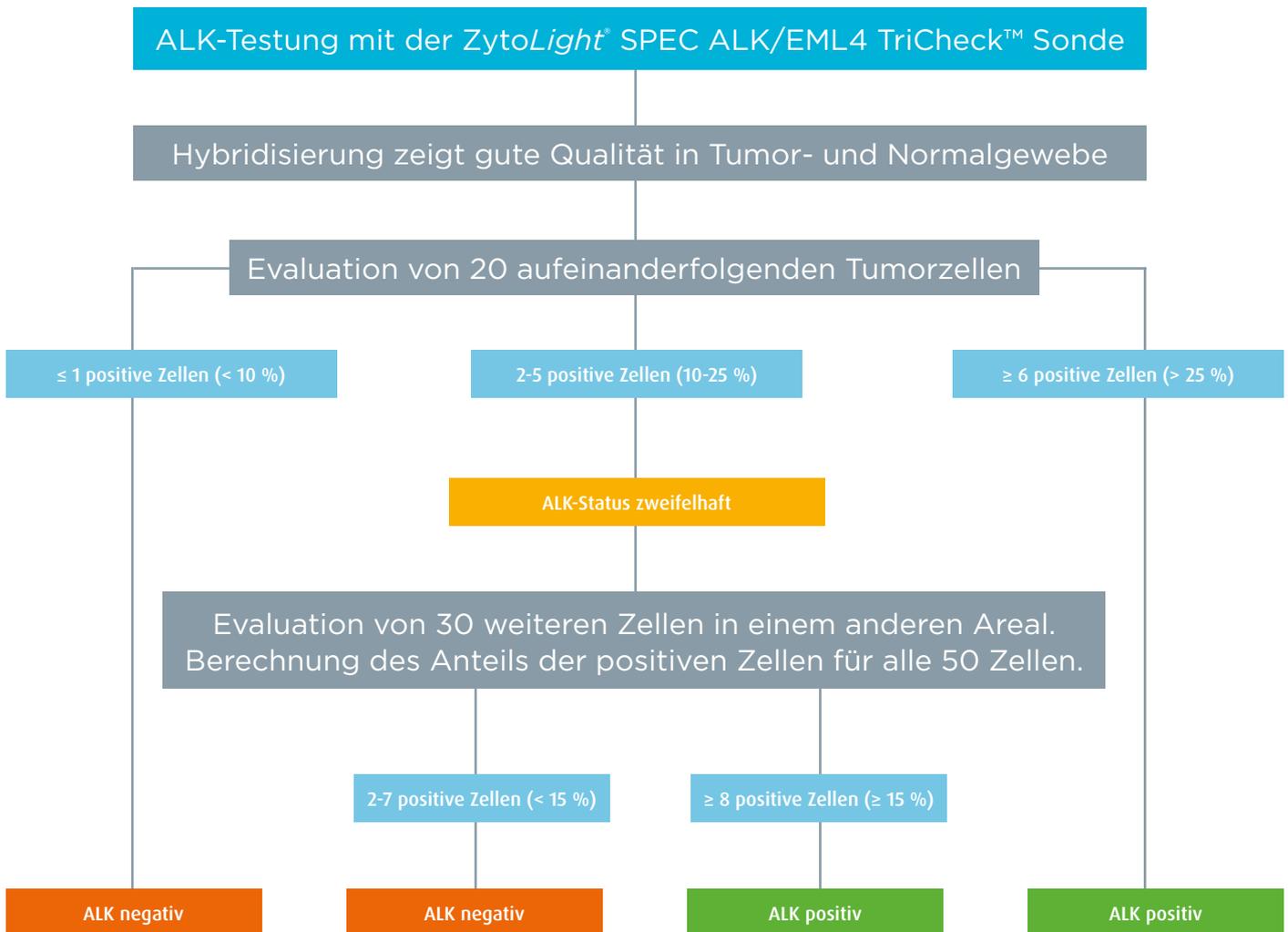
► Literatur

- [1] Arbour KC & Riely GJ. Systemic therapy for locally advanced and metastatic non-small cell lung cancer. *JAMA* 322:764-774, 2019.
- [2] Korpany GJ *et al.* Biomarkers that currently affect clinical practice in lung cancer: EGFR, ALK, MET, ROS-1, and KRAS. *Front Oncol* 4:204, 2014.
- [3] Soda M *et al.* Identification of the transforming *EML4-ALK* fusion gene in non-small cell lung cancer. *Nature* 448:561-566, 2007.
- [4] Ducray SP *et al.* The transcriptional roles of ALK fusion proteins in tumorigenesis. *Cancers (Basel)* 11:1074, 2019.
- [5] Duruisseaux M *et al.* Overall survival with crizotinib and next-generation ALK inhibitors in ALK-positive non-small-cell lung cancer (IFCT-1302 CLINALK): a French nationwide cohort retrospective study. *Oncotarget* 8: 21903-21917, 2017
- [6] Smuk G *et al.* Immense random colocalization, revealed by automated high content image cytometry, seriously questions FISH as gold standard for detecting *EML4-ALK* fusion. *Cytometry A* 93:653-661, 2018
- [7] Schildhaus HU *et al.* Validation of a simplified approach to detect ALK translocations in lung cancer samples by FISH. *Mod Pathol* 29:482A, 2016.

In-situ-Hybridisierung

Lungenkarzinome

Neue Auswertekriterien für eine einfachere ALK FISH-Analyse nach Schildhaus HU *et al.* 2016



© Zytomed Systems nach Vorlage von ZytoVision GmbH

► Vorgehensweise bei der Evaluierung

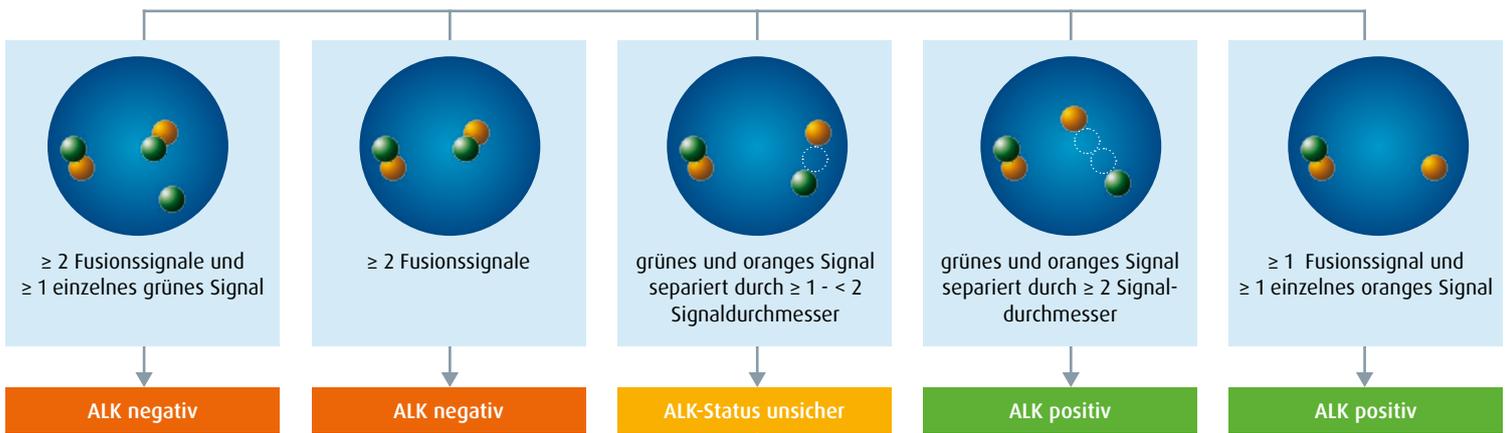
- Identifizierung eines Tumorareals mit klar unterscheidbaren Kernen.
- Auszählen von 20 aufeinanderfolgenden und nicht überlappenden Kernen (ausreichend in 99% der Fälle).
- Bestimmung des ALK-Status aufgrund der o. g. Auswertekriterien und des Screening-Schemas auf Seite 3.
- Nur in seltenen Grenzfällen (1%) müssen zusätzliche 30 Kerne ausgezählt werden.

► Zusammenfassung

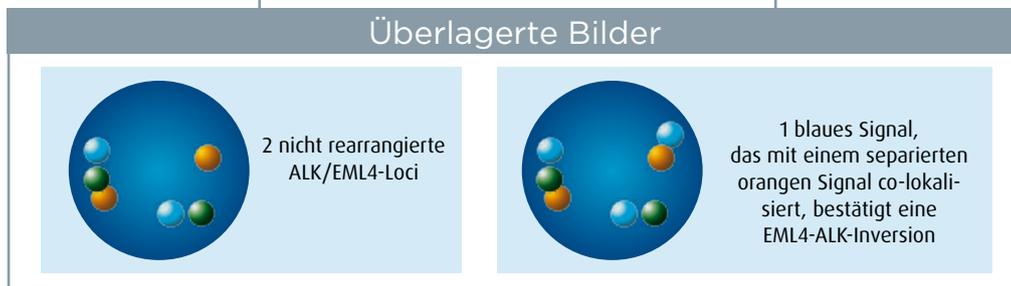
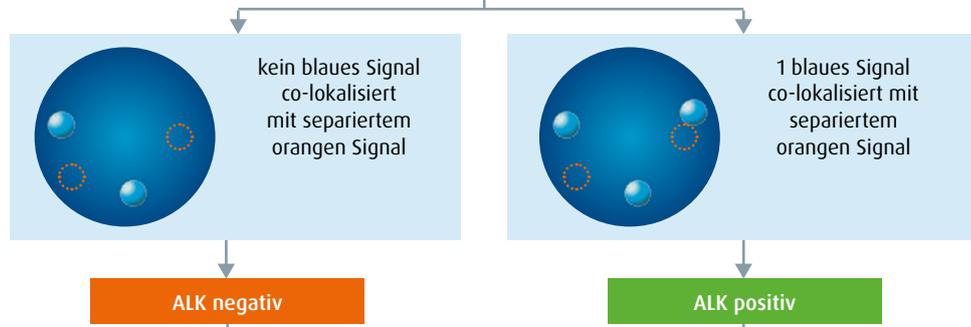
- Die neuen Auswertekriterien ergaben eine Sensitivität und Spezifität von 100 %, verglichen mit der Vysis LSI ALK Dual Color Break Apart Probe.
- Der Zeitaufwand pro Fall wird halbiert.



Initiales Screening mit einem Grün/Orange Doppelfilter



Überprüfung einer Co-Lokalisierung von Blau/Orange mit einem Blaufilter



© Zytomed Systems nach Vorlage von ZytoVision GmbH

► **Kriterien zur Evaluation der ALK/EML4 TriCheck™-Sonde**

Ein ALK-Brech liegt vor, wenn zusätzlich zu mindestens einem Fusionssignal

- Split-Signale (eines oder mehrere) auftreten (≥ 2 Signalabstände zwischen grün und orange)
- Isolierte orange Signale (eines oder mehrere) auftreten

Diese Kerne sind – unabhängig von den blauen Signalen – als positiv zu werten. Eine Colokalisation des separierten orangen Signals mit einem blauen Signal zeigt eine ALK/EML4-Fusion an. Wenn keine Colokalisation des orangen Signals mit einem blauen Signal auftritt, liegt ein ALK-Brech ohne Beteiligung von EML4 vor.

Ein ALK-Brech ist fraglich, wenn

- Split-Signale einen Abstand von ≥ 1 aber < 2 Signaldurchmessern aufweisen.

In diesem Fall muß die Lokalisation der blauen Signale überprüft werden. Wenn eine Colokalisation des orangen Signals mit einem blauen Signal auftritt, liegt eine ALK/EML4-Fusion vor. Wenn keine Colokalisation des orangen Signals mit einem blauen Signal auftritt, liegt keine ALK/EML4-Fusion vor. Ein solcher Kern ist als negativ zu werten.

In-situ-Hybridisierung

Lungenkarzinome



► ZytoLight® FISH-Sonden für die Diagnostik von Lungenkarzinomen (in Auswahl)

Bezeichnung	Markierung	CE/IVD	Menge	Bestell-Nr.
FlexISH® ALK/ROS1 DistinguISH™ Probe	Grün/Orange/ Blau	✓	50 µl (5 Tests)	Z-2203-50
			200 µl (20 Tests)	Z-2203-200
ZytoLight® SPEC ALK Dual Color Break Apart Probe	Grün/Orange	✓	50 µl (5 Tests)	Z-2124-50
			200 µl (20 Tests)	Z-2124-200
ZytoLight® SPEC ALK/EML4 TriCheck™ Probe	Grün/Orange/ Blau	✓	50 µl (5 Tests)	Z-2117-50
			200 µl (20 Tests)	Z-2117-200
ZytoLight® SPEC MET/CEN 7 Dual Color Probe	Grün/Orange	✓	50 µl (5 Tests)	Z-2087-50
			200 µl (20 Tests)	Z-2087-200
ZytoLight® SPEC NTRK1 Dual Color Break Apart Probe	Grün/Orange	✓	50 µl (5 Tests)	Z-2167-50
			200 µl (20 Tests)	Z-2167-200
ZytoLight® SPEC NTRK2 Dual Color Break Apart Probe	Grün/Orange	✓	50 µl (5 Tests)	Z-2205-50
			200 µl (20 Tests)	Z-2205-200
ZytoLight® SPEC NTRK3 Dual Color Break Apart Probe	Grün/Orange	✓	50 µl (5 Tests)	Z-2206-50
			200 µl (20 Tests)	Z-2206-200
ZytoLight® SPEC RET Dual Color Break Apart Probe	Grün/Orange	✓	50 µl (5 Tests)	Z-2148-50
			200 µl (20 Tests)	Z-2148-200
FlexISH® RET/KIF5B TriCheck™ Probe	Grün/Orange/ Blau	✓	50 µl (5 Tests)	Z-2269-50
			200 µl (20 Tests)	Z-2269-200
ZytoLight® SPEC ROS1 Dual Color Break Apart Probe	Grün/Orange	✓	50 µl (5 Tests)	Z-2144-50
			200 µl (20 Tests)	Z-2144-200

Zahlreiche weitere FISH-Sonden für die Diagnostik von Lungenkarzinomen sowie sämtliche Preise zu unseren Produkten finden Sie auf www.zyto-med-systems.de

Vorteile der FISH:

- Es existiert ein direkter morphologischer Bezug.
- Auch bei nur wenigen Tumorzellen ist eine sichere Beurteilung möglich.
- Fokale Heterogenität wird erkannt.
- Ergebnisse liegen spätestens am nächsten Tag vor.