

Aus dem Zentrum für Pathologie der Universität zu Köln
Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. R. Büttner

Die Prävalenz und potentielle biologische Rolle von *TERT*-Genamplifikationen in *ALK*-Gen translozierten Adenokarzinomen der Lunge

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Nicolai Karl Miguel Dürbaum
aus Düren

promoviert am 26. September 2022

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachterin: Privatdozentin Dr. med. A. M. Schultheis
2. Gutachterin: Privatdozentin Dr. med. L. Nogovà

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Frau Priv.-Doz. Dr. med. Anne Schultheis, Institut für Pathologie der Uniklinik Köln
Frau Dr. rer. nat. Christina Alidousty, Institut für Pathologie der Uniklinik Köln

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind von mir mit Unterstützung von Frau Priv.-Doz. Dr. med. Anne Schultheis sowie Fr. Dr. rer. nat. Christina Alidousty und der biologisch-technischen Assistentin Frau Barbara Holz durchgeführt worden.

Die verwendeten Patientendaten wurden von mir selbst ausgewertet. Die Nachuntersuchungen der Patientendaten wurden gemeinsam mit Frau Priv. Doz. Dr. med. Anne Schultheis durchgeführt.

Das Manuskript wurde vollständig von mir unter der Leitung von von Frau Priv.-Doz Dr. med. Anne Schultheis erstellt.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 20.09.2021

Unterschrift: 

Danksagung

Ohne die außergewöhnliche Unterstützung aller beteiligten Mitarbeiter des Instituts für Allgemeine Pathologie der Universitätsklinik Köln unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. med. Reinhard Büttner wäre diese Arbeit nie möglich gewesen.

Ein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe um Priv.-Doz. Dr. med. Anne Schultheis. Liebe Barbara, ohne deine Hilfe und Geduld wäre ich bereits beim Anfertigen der ersten Gewebeschnitte und der DNA-Extraktion gescheitert, deine Einführung in die Laborarbeit haben diese Arbeit erst möglich gemacht. Als Coautor der Publikation hätte ich mir keine bessere Partnerin als Dr. rer. nat. Christina Alidousty wünschen können. Vielen Dank für die tolle Zusammenarbeit und dein unermüdliches Engagement dabei, mir die einfachsten Sachverhalte mit einer stoischen Gelassenheit immer wieder zu erklären, ohne deine Hilfe wäre eine Promotion und Publikation in dieser Form nicht möglich gewesen. Ganz besonders möchte ich mich jedoch bei dir bedanken, Anne. Vielen Dank für den Einblick in die Grundlagenforschung die ich in den Jahren als Mitarbeiter deiner Arbeitsgruppe erhalten durfte. Durch unsere gemeinsame Arbeit war es für mich als völlig unerfahrener Medizinstudent möglich, einen Einblick in richtiges wissenschaftliches Arbeiten zu erlangen. Eine Erfahrung, die mich für mein künftiges Arbeitsleben als Arzt geprägt hat und die mir zeigt, dass eben nicht immer alles auf Anhieb funktioniert, die Erfolge aber dann umso motivierender und schöner sind.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern und Geschwistern. Der lange Weg zur Erfüllung meines Berufswunsches wurde durch euch immer unterstützt und gefördert, ohne je an meinem Können zu zweifeln. Dies ist nicht selbstverständlich und Ihr verdient dafür nichts anderes als meine Hochachtung und meinen Dank.

Zuletzt möchte ich mich bei der Liebe meines Lebens bedanken. Vielen Dank Lisa, dass du diesen oft endlos erscheinenden Weg mit mir gemeinsam gegangen bist und ebenfalls nie an mir und meinem Vorhaben auch nur ansatzweise gezweifelt hast. Vielen Dank, dass du Teil meines Lebens bist und mir diese beiden wundervollen Söhne geschenkt hast, ohne euch wäre mein Leben nicht komplett.

Diese Arbeit ist der krönende Abschluss meines Studiums und gleichzeitig der Beginn meines ärztlichen Berufslebens, ich bedanke mich bei Allen, die mich begleitet haben und die all dies möglich gemacht haben.

Für den Falken und den Wolf...

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Zusammenfassung	8
2. Einleitung	10
2.1. Das Lungenkarzinom	10
2.1.1. Epidemiologie und Ätiologie	10
2.1.2. Histopathologie	11
2.1.3. Molekular-Pathologie des NSCLC	14
2.1.4. Treibermutationen des NSCLC	15
2.1.5. Therapie des NSCLC	17
2.1.5.1. Zielgerichtete Therapie des NSCLC	20
2.2. Die anaplastische Lymphomkinase	21
2.2.1. <i>ALK</i> -Mutationen bei NSCLC	22
2.2.1.1. <i>EML4-ALK</i> Translokationsmutation	23
2.2.2. Therapie des <i>ALK</i> -translozierten NSCLC	25
2.2.3. Resistenzmechanismen unter zielgerichteter <i>ALK</i> -Therapie	27
2.2.3.1. <i>ALK</i> -abhängige Resistenzmechanismen	27
2.2.3.2. <i>ALK</i> -unabhängige Resistenzmechanismen	28
2.3. Die Telomere, Telomerase und <i>TERT</i>	30
2.3.1. Telomere	30
2.3.2. Telomerase und <i>TERT</i>	31
2.3.3. <i>TERT</i> - und Telomerasefunktion in Tumorerkrankungen	32
3. Publikation	33
4. Diskussion	42
5. Literaturverzeichnis	47
6. Anhang	53
6.1. Abbildungsverzeichnis	53
6.2. Tabellenverzeichnis	53

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenokarzinom
ALK	Anaplastische Lymphomkinase
ATP	Adenosintriphosphat
BIRC6	Baculoviral IAP Repeat Containing 6
BRAF	serine/threonine-protein Kinase B-Raf
CCDC6	Coiled-Coil Domain Containing 6
DDR2	Discoidin Domain Receptor Tyrosine Kinase 2
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EML4	Echinoderm microtubule-associated protein-like 4-Gen
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
FISH	Fluorescence in-situ Hybridisierung
FRGR2	Fibroblast Growth Factor Receptor 2
GTPase	Guanintriphosphatase
Ki-67	Kiel-Antigen Nr. 67
KIF5B	Kinesin family member 5b
KLC1	Kinesin Light Chain 1
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene
MET	Mesenchymal Epithial Transition Protoonkogen
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NCOA4	Nuclear Receptor Coactivator 4
NGS	Next Generation Sequencing
NRAS	Neuroblastoma RAS Viral Oncogene
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
ORR	Objective response rate
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-L1	Programmed Cell Death Ligand 1
PFS	Progressionsfreies Überlebenszeit
PIK3CA	Posphoinositide-3-Kinase α
PRKAR1A	Protein Kinase CAMP-Dependent Type I Regulatory Subunit α
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma

RET	Rezeptor-Tyrosinkinase RET
RNA	Ribonukleinsäure
ROS1	ROS proto-oncogene 1 Tyrosinkinase
SCLC	Small Cell Lung Cancer
SLC34A2	Solute Carrier Family 34 Member 2
SqCC	Plattenepithelkarzinom
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TERC	Telomerase RNA Component
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TP53	Tumor Protein 53
TPR	Translocated Promoter Region
TTF1	thyroidaler Transkriptionsfaktor 1
WHO	World Health Organisation

1. Zusammenfassung

Nicht-kleinzellige Lungenkarzinome zählen weltweit zu den häufigsten Krebsarten und sind eine der häufigsten Ursachen für krebsassoziierten Todesfälle. Die Therapie des Lungenkarzinoms erfolgt stadienabhängig und verfolgt verschiedenste Therapieansätze. Besonders im metastasiertem Stadium IV der Erkrankung spielen zielgerichtete, auf bestimmte Treibermutationen angepasste Medikamente eine entscheidende Rolle in der Behandlung der Patienten. Dabei ist insbesondere die prätherapeutische Analytik auf therapierbare Treibermutationen von essentieller Wichtigkeit.

Die Entwicklung und Einführung von auf den anaplastischen Lymphomkinase (ALK) - Rezeptor spezifisch abzielenden Therapeutika hat die Behandlung und das Therapieergebnis dieser Patientengruppen mit nachgewiesenen Treibermutationen von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen grundlegend verändert. Trotzdem stellt bei der Behandlung von *ALK*-translozierten Lungenkarzinomen die Entwicklung einer Therapieresistenz gegen ALK-Tyrosinkinaseinhibitoren ein Hauptproblem im Verlauf der Therapie betroffener Patienten dar.

In vorangehenden Publikationen untersuchten wir zwei *ALK*-translozierte Kohorten (*TP53*-Wildtyp und *TP53*-mutiert) hinsichtlich Genkopieanzahlvariationen des *ALK*-Gens. Alle Patienten der *TP53*-Wildtyp Kohorte zeigten mit einer Ausnahme ein genetisch stabiles Genom. Dieser Sonderfall präsentierte sich mit deutlicher genomischer Instabilität und der Amplifikation zahlreicher krebsassoziiierter Genloci. Bei einem dieser Genloci handelte es sich um die Telomerase reverse transcriptase (*TERT*), der für die katalytische Untereinheit kodierende Genabschnitt des Telomerase-Enzyms.

Das Ziel dieser Arbeit war es eine unabhängige Kohorte von 109 *ALK*-alterierten Lungenkrebspatienten auf die Prävalenz von *TERT*-Amplifikationen hin zu untersuchen. In dem Rahmen analysierten wir außerdem die Genkopieanzahl zahlreicher weiterer krebsrelevanter Gene und anderer genetischer Aberrationen.

Mit Hilfe der sog. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) untersuchten wir zunächst die Prävalenz von *TERT*-Amplifikationen. Kopieanzahlvariationen von 87 Krebs relevanten Genen wurden per NanoString nCounter® Technologie ermittelt. FoundationOne® und Lungen-spezifische Next Generation Sequencing Panels wurden neben klinischen Daten in einigen der *TERT*-amplifizierten Fällen angewendet.

Wir konnten mit unserer Untersuchung nachweisen, dass fünf (4,6%) der 109 analysierten ALK-translozierten Patienten eine zusätzliche Amplifikation des *TERT*-Gens besaßen und diese Amplifikation mit genetisch instabilem Genom einherging. Unsere einleitende Studie zeigt erneut, dass *ALK*-translozierte Adenokarzinome eine heterogenere Gruppe von Tumoren darstellen, als initial angenommen wurde und im Kontext ihres genomischen Hintergrundes betrachtet und evaluiert werden sollten, um den individuellen Krankheits- und Therapieverlauf besser verstehen und vorhersagen zu können.

Teile dieser Zusammenfassung sind bereits publiziert in: Alidousty C, Duerbaum N, Wagener-Rydzek S, et al. Prevalence and potential biological role of *TERT* amplifications in *ALK* translocated adenocarcinoma of the lung. *Histopathology* 2021; **78**(4): 578-85.

2. Einleitung

2.1. Das Lungenkarzinom

2.1.1. Epidemiologie und Ätiologie

Das Lungenkarzinom ist mit ca. 45000 Todesfällen jährlich die dritthäufigste Todesursache beider Geschlechter- und aller Altersgruppen in Deutschland.⁷ Weltweit sind bösartige Neoplasien der Lunge für jede dritte Krebsneuerkrankung verantwortlich und sorgen dabei global für die höchste krebsassoziierte Mortalität. Männer erkranken ca. doppelt so häufig wie Frauen, obwohl die Inzidenz bei Männern in Mitteleuropa seit Jahren sinkt und bei Frauen kontinuierlich steigt.⁸ Lungenkarzinome treten dabei besonders häufig in Bevölkerungsgruppen mit niedrigem sozioökonomischem Status auf.⁹ Ein deutlich erhöhter Anteil an Rauchenden sowie vermehrte berufliche Exposition gegenüber den unten genannten Kanzerogenen sind vermutlich ursächlich für das gesteigerte Auftreten in diesen sozialen Schichten.^{10,11}

Bezüglich der Ätiologie des Lungenkarzinoms differenziert man zwischen endogenen und exogenen Risikofaktoren welche die Krankheitsentstehung begünstigen. Das größte Risiko für das Entwickeln eines Lungenkarzinoms ist der inhalative Konsum von Tabakprodukten in aktiver und passiver Form. Tabakrauch ist mit einem Anteil von ca. 90% der Hauptrisikofaktor für das Entstehen von Lungenkrebserkrankungen. Es lässt sich hier eine deutliche Korrelation zu der Anzahl der gerauchten Zigaretten, der Konsumdauer sowie der Inhalationstiefe des Rauchs erkennen.^{12,13} Ein weiterer exogener Faktor für die Ausbildung einer bösartigen Neoplasie der Lunge ist zudem die berufliche Exposition gegenüber Karzinogenen. Ursächlich zeigen sich dabei diverse Metalle (Arsen, Chrome, Nickel etc.), polyzyklische Kohlenwasserstoffe und die als besonders karzinogen geltenden, ubiquitär vorkommenden Noxen wie Asbest, Feinstaub und Industrie- und Verkehrsabgase. Krankheitsauslösend ist ebenfalls ionisierende Strahlung, sei es durch eine hohe Radonbelastung der Umwelt oder im Zusammenhang mit medizinischer Strahlenexposition z.B. in der Radiologie und Nuklearmedizin.¹⁴ Endogene Risikofaktoren spielen gleichermaßen eine Rolle in der Entstehung maligner Erkrankungen der Lunge. Eine Lungenkrebserkrankung in der engen Verwandtschaft geht insbesondere mit einem erhöhten Risiko für eine sich schon im jungen Alter manifestierenden Lungenkrebserkrankung einher. Ebenso sorgen Vorerkrankungen wie eine chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) oder eine Lungentuberkulose für ein erhöhtes Erkrankungsrisiko.¹⁴

2.1.2. Histopathologie

Lungenkarzinome werden klassischerweise bezüglich ihrer Morphologie/Histologie anhand der WHO-Klassifikation unterteilt. Dabei unterscheidet man zunächst zwei große Gruppen, welche sich auch prognostisch deutlich voneinander unterscheiden: Die kleinzelligen (SCLC)- und die nicht-kleinzelligen (NSCLC) Lungenkarzinome.¹⁵

Erstere zählen zur Subgruppe der neuroendokrinen Tumoren der Lunge und haben bei Erstdiagnose einen Anteil von ca. 15% aller Krebserkrankungen der Lunge. SCLC sind histologisch charakterisiert durch kleinzellige Zellverbände mit hyperchromatischem Zellkern mit feingranulärem Chromatin und schmalen Zytoplasmasaum. Sie sind stark proliferativ aktiv, dies äußert sich histologisch durch eine hohe Anzahl mitotisch aktiver Zellen und immunhistochemisch mittels eines Ki-67 Index von mehr als 50%. Diese Krebsvariante ist durch ein besonders aggressives Verhalten bezüglich ihres Zellwachstums und ihres Krankheitsverlaufs gekennzeichnet.¹⁶

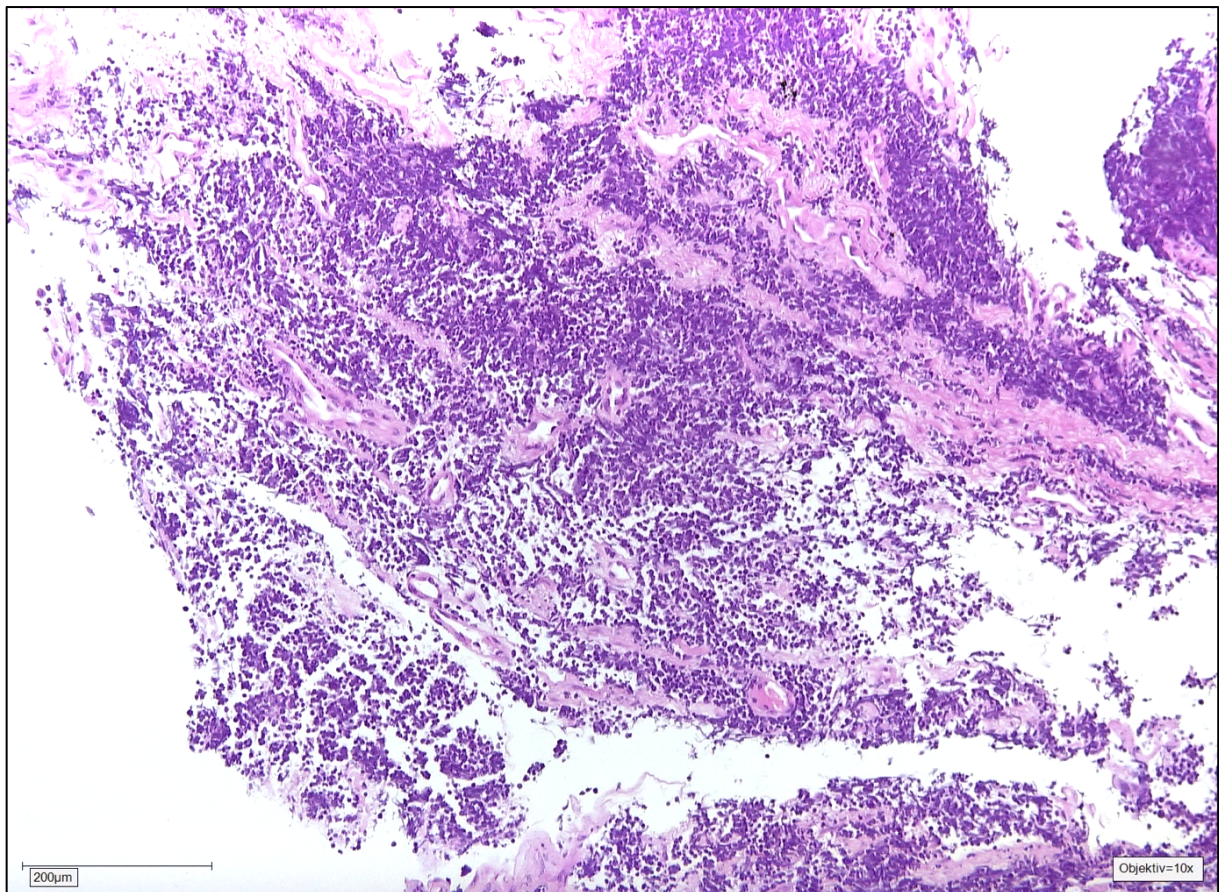


Abbildung 1: Kleinzelliges Karzinom der Lunge, 10x Vergrößerung, zur Verfügung gestellt durch Priv.-Doz. Dr. med. Anne Schultheis, Institut für Pathologie der Uniklinik Köln

Nicht-kleinzellige Karzinome können weiter nach dem Subtyp der Ursprungszelle differenziert werden und besitzen einen Anteil von ca. 85% aller Lungenkarzinome.^{15,17} Es wird unterschieden zwischen Adenokarzinomen (AC), Plattenepithelkarzinomen (SqCC) und sonstigen Karzinomen (z.B. Spindelzell-Karzinome, Riesenzell-Karzinome), welche sich weitergehend noch in diverse Subtypen separieren lassen.¹⁵ Diese morphologisch basierte Einteilung der NSCLC ist historisch und ohne therapeutisch Relevanz. Sie entstand, weil damals bei diesen unterschiedlichen Subgruppen, im Gegensatz zum kleinzelligen Karzinom, kaum biologische und therapeutische Differenzen festgestellt werden konnten.

SqCC sind epitheliale Tumore, welche aus dem Epithel der Bronchialschleimhaut hervorgehen und zum Teil mit Verhornung und Interzellularbrücken auftreten können. Da SqCCs aber auch undifferenziert vorkommen ist eine immunhistochemische Betrachtung des Tumors von großer Bedeutung.¹⁶

Hier dient zur Diagnosesicherung insbesondere eine Aufarbeitung mit den Antikörpern p40, p63 und p64 und via Zytokeratin 5/6.¹⁸

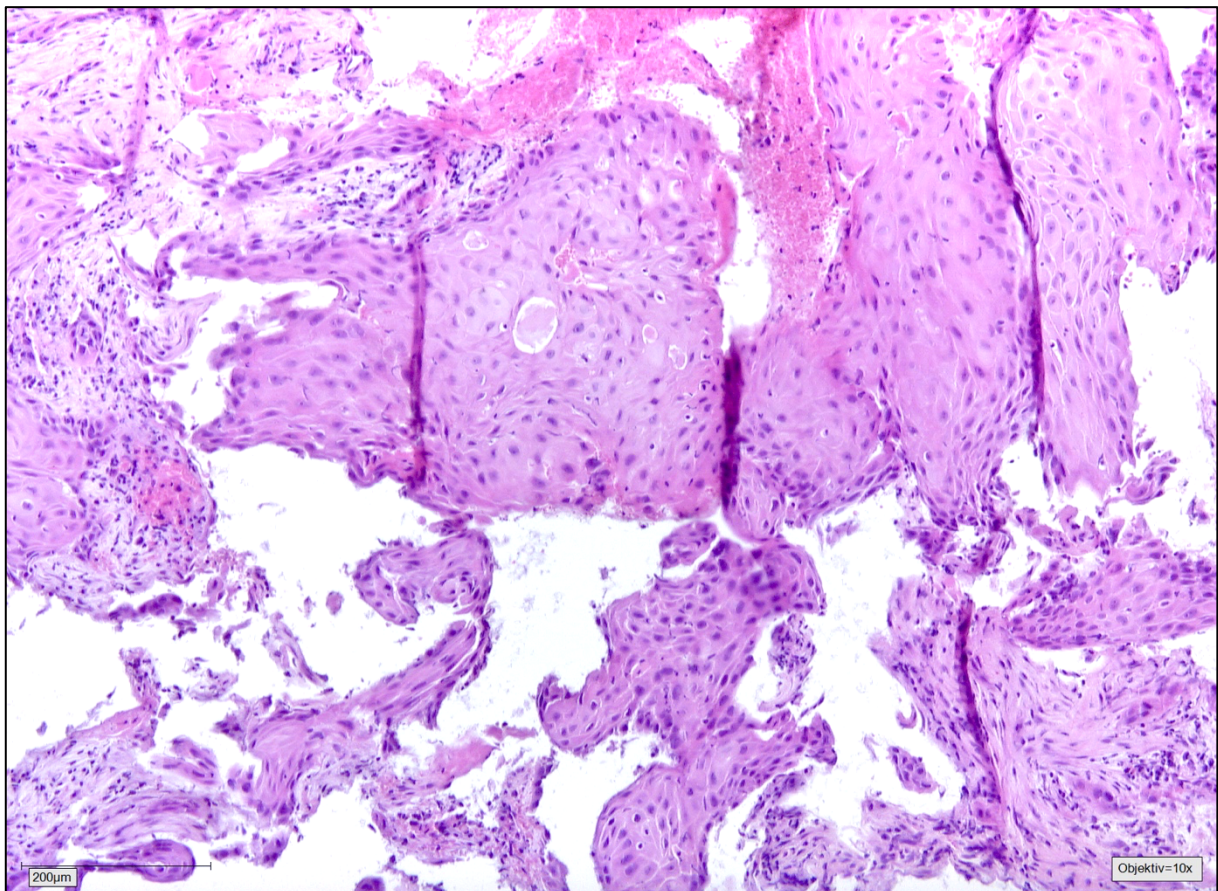


Abbildung 2: Plattenepithelkarzinom der Lunge, 10x Vergrößerung, zur Verfügung gestellt durch Priv.-Doz. Dr. med. Anne Schultheis, Institut für Pathologie der Uniklinik Köln

Adenokarzinome stammen von alveolären Deckepithelien (Pneumozyten Typ 1 und 2) ab und zeichnen sich durch Muzinproduktion mit teils sogar drüsenartiger Differenzierung aus.¹⁶ Nach prädominantem Wachstumsmuster unterscheidet man diese weitergehend in azinär, papillär, mikropapillär, solide und lepidisch.¹⁵ Immunhistochemische Untersuchung auf den thyroidalen Transkriptionsfaktor 1 (TTF1) sowie auf Napsin A zeigen eine Sensitivität von ca. 80% auf diesen Lungenkarzinomsubtyp.^{19,20}

Mit der Etablierung moderner molekularpathologischen Methoden und vor allem der Durchführung großer Sequenzierungsstudien von Lungenkarzinomen wurde die Heterogenität von Lungenkarzinomen auf molekularer Ebene entschlüsselt. Die molekularen Subtypen sind therapeutisch relevant, da einige der genetischen Veränderungen als Zielstrukturen von Medikamenten genutzt werden können; die molekulare Subtypisierung ist nun fester Bestandteil des klinischen Alltags bei der Behandlung von Lungenkarzinomen.¹⁶

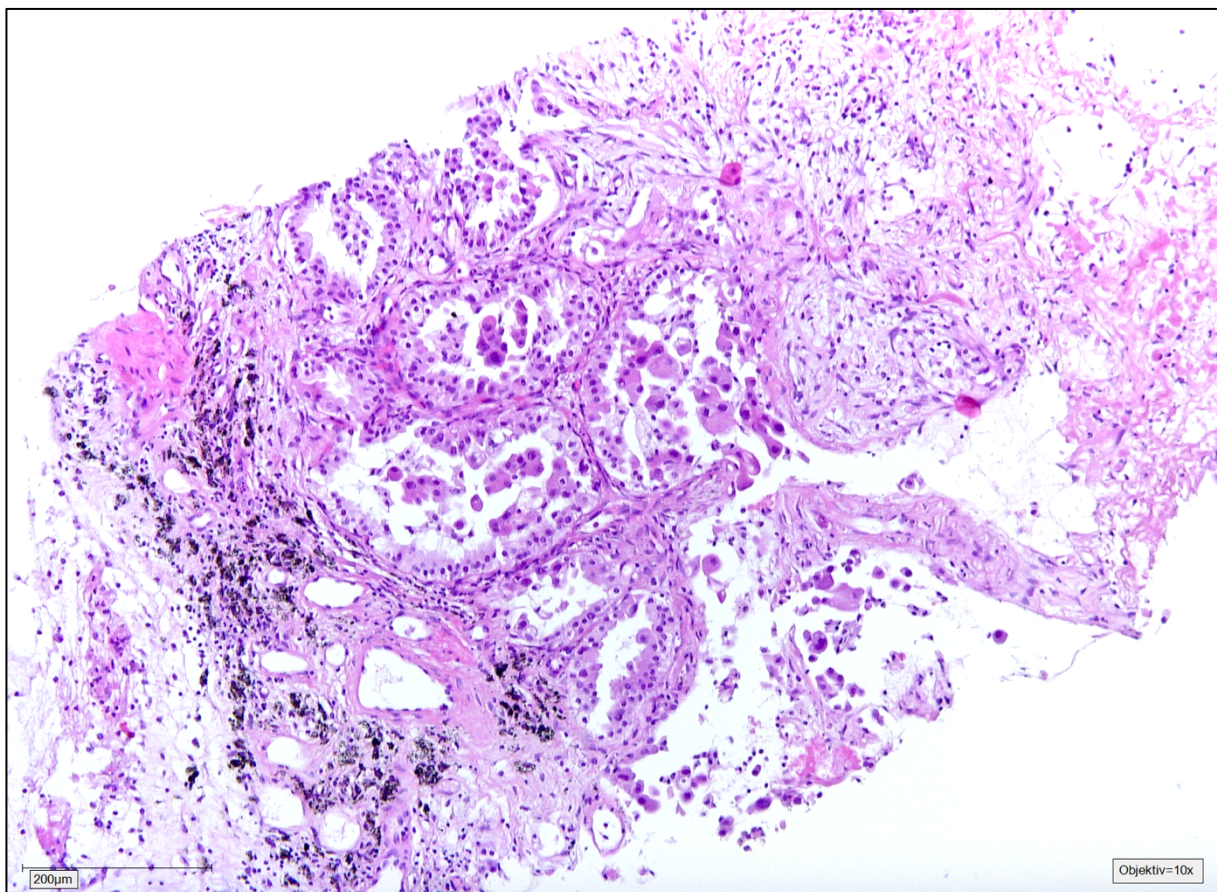
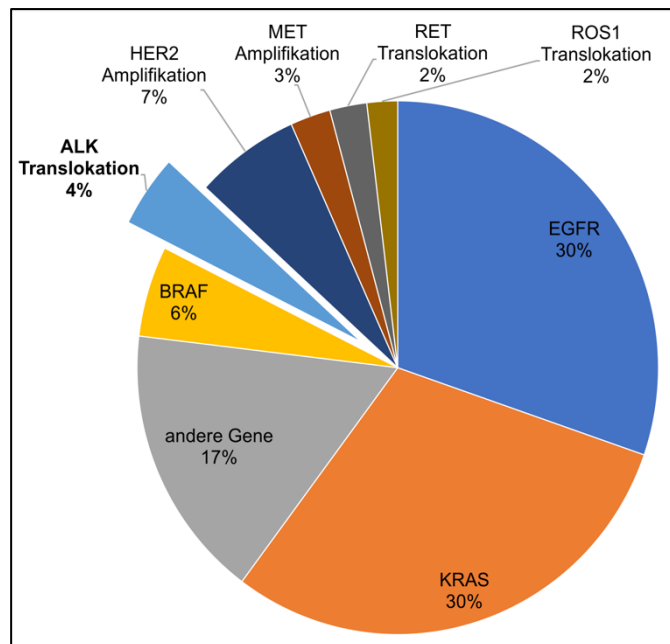


Abbildung 3: Adenokarzinom der Lunge, 10x Vergrößerung, zur Verfügung gestellt durch Priv.-Doz. Dr. med. Anne Schultheis, Institut für Pathologie der Uniklinik Köln

2.1.3. Molekular-Pathologie des NSCLC

Lungenkarzinome entstehen durch eine stufenförmige Anhäufung genetischer Aberrationen, wobei die unkontrollierte Zellproliferation dieser Tumoren insbesondere durch eine Gruppe von sog. Treibermutationen hervorgerufen wird.¹⁵ Obwohl Krebszellen zahlreiche Mutationen akkumulieren, wird vermutet, dass die maligne Transformation und der Tumorprogress besonders stark von diesen Treibermutationen



determiniert ist. Diese Abhängigkeit von einzelnen Alterationen (engl. „Oncogene Addiction“) ist es was manche Krebsarten angreifbar für eine gezielte Therapie, z.B. durch Tyrosin-Kinaseinhibitoren (TKI), macht.²¹

Abbildung 4: Treibermutationen des Adenokarzinoms der Lunge im metastasierten Stadium modifiziert nach Jordan et al.¹ und Frampton et al.³ (n=5262)

„Oncogene Addiction“) ist es was manche Krebsarten angreifbar für eine gezielte Therapie, z.B. durch Tyrosin-Kinaseinhibitoren (TKI), macht.²¹

Mit der Entdeckung des Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) und der erfolgreichen Therapie von Patienten mit gezielt gegen den EGFR gerichteten Medikamenten wie monoklonalen Antikörpern wurde sowohl der Grundstein für die molekulare Behandlung als auch die molekular basierte Klassifikation von Lungenkarzinomen gelegt.²² Das Verständnis von Lungenkarzinomen hat sich seither fundamental verändert. Schnell folgte die Entdeckung zahlreicher weiterer, teils therapeutisch nutzbarer Treibermutationen. Seither spiegelt die Einteilung aller NSCLC nach ihrem molekularen Subtyp wesentlich präziser die Biologie des jeweiligen Tumors wider und verdeutlicht erneut die Heterogenität dieser Gruppe an Tumoren.²³

Zu den häufigsten genetischen Mutationen, insbesondere bei Nicht-Plattenepithelkarzinomen, zählen unter anderen: Veränderungen des *EGFR*, des Kirsten rat sarcoma viral oncogene (*KRAS*), des serine/threonine-protein Kinase B-Raf (*BRAF*) sowie Translokationen der anaplastischen Lymphomkinase (*ALK*), des ROS proto-oncogene 1 (*ROS1*) und des *RET*-Gens.²⁴

2.1.4. Treibermutationen des NSCLC

Das *EGFR*-Gen kodiert für ein Transmembranprotein mit Tyrosinkinaseaktivität, welches besonders dazu dient extrazelluläre Wachstumssignale ins Zellinnere zu leiten.^{23,25} Bis zu 10 % aller NSCLC bei kaukasischen Patienten sowie 50% bei der asiatischen Bevölkerung zeichnen sich durch eine Mutation im *EGFR*-Gen aus und treten häufiger bei Patienten ohne Raucheranamnese auf.² Bei Mutationen dieser Art handelt es sich hauptsächlich um Punktmutationen bzw. kurze Deletionen, vornehmlich in den Exonen 19 und 21 des *EGFR*-Gens.²²

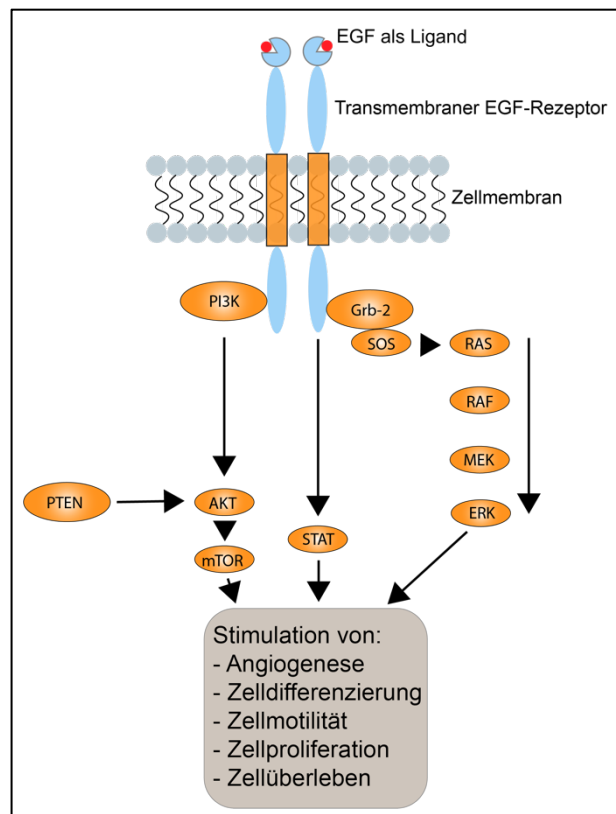


Abbildung 5: Schematische Darstellung des EGF-Rezeptors und dessen Signalkaskade modifiziert nach C. Santos et al.⁵

Eine verstärkte Kinaseaktivität oder eine EGFR-Protein Überexpression führen

konsekutiv zu ungehemmten Zellwachstum, gesteigertem Zellüberleben und vermehrter Angiogenese. Zudem kommt es zu einer erhöhten Motilität und veränderter Differenzierung der Tumorzellen. Lungenkarzinome mit *EGFR* Mutationen können jedoch gezielt mit einem *EGFR*-Inhibitor wie Afatinib behandelt werden.^{23,26}

Sog. *KRAS* Mutationen lassen sich in ca. 25% aller NSCLC, besonders in der Subgruppe der Adenokarzinome, nachweisen und entstehen gehäuft bei Patienten mit positiver Raucheranamnese.^{27,28} Dem G-Protein *KRAS* wird als GTPase, wie auch vielen anderen Transmembranproteinen, eine große Rolle bei der Transduktion von Wachstumssignalen zugesprochen. Dies wirkt sich ebenfalls im Sinne überschießender Zellproliferation, verminderte Apoptose sowie gestörter Zelldifferenzierung aus.²⁶ Seit Juni 2021 besteht mit dem Medikament Sotorasib, insbesondere bei der Subtypmutation p.G12C, in *KRAS* mutierten NSCLC eine zielgerichtete Tumorthherapie.²⁹

BRAF-Gen Mutationen treten in ca. 5-7 % aller Adenokarzinome der Lunge auf. Dabei handelt es sich in ca. 80% der Fälle um eine Substitutionsmutation der Aminosäure

Glutamat durch Valin an Position 600 (BRAFFV600E) der Aminosäurenkette. Bei dem durch das *BRAF*-Gen kodierte Protein (ebenfalls BRAF) handelt es sich um eine RAF-Kinase. Wie der Großteil der bereits genannten Treibermutationen hat eine genetische Veränderung dieser RAF-Kinase eine Überstimulation der Zellproliferation sowie eine Verhinderung der Apoptose zur Folge. Dies geschieht hauptsächlich durch unkontrollierte Aktivierung des Mitogen-Activated Protein Kinase pathways (MAPK-Pathway). Eine zielgerichtete Therapie ist bei Mutationen dieser Art ebenfalls möglich.³⁰

Das Ret Proto-Oncogene ist wie EGFR auch ein transmembranes Protein mit intrazellulär gelegener Tyrosinkinase, die durch Mutation oder durch Rearrangement mit Entstehung von Fusionsgenen eine Daueraktivierung erfährt.^{31,32} Dabei entsteht bei ca. 2% der NSCLC eine Translokation zwischen dem *RET*-Gen auf Chromosom 10 mit dem sich ebenfalls auf Chromosom 10 befindlichen *KIF5B*-Gen.³¹ Es sind mittlerweile allerdings auch weitere Translokationspartner im Rahmen von Lungenkarzinomerkrankungen bekannt. Dazu zählen unter anderem Fusionen mit dem *CCDC6*-Gen sowie dem *NCOA4*-Gen.^{33,34} Bei Patienten mit NSCLC kann in ca. 1-2 % der Fälle eine Mutation im *RET*-Gen nachgewiesen werden, dabei sind ein jüngeres Erkrankungsalter und der Nichtraucher-Status der Betroffenen besonders häufig.^{35,36} Hierbei unterscheidet sich der RET-Rezeptor gegenüber „klassischen“ Tyrosinkinasen, indem er neben seinem eigentlichen Liganden für die Aktivierung einen Co-Liganden benötigt. Letztendlich führt die Phosphorylierung des Rezeptors zur Aktivierung zahlreicher weiterer Signalkaskaden. Beim gesunden Menschen entsteht dadurch ebenfalls eine Beeinflussung von Zellwachstums- und Differenzierungssignalen. Aktuell kann eine *RET*-Mutation bzw. Rearrangement mit sog. Multikinaseinhibitoren therapiert werden, die jedoch nicht spezifisch am RET-Rezeptor wirken.³²

ROS1-Rearrangements treten ebenfalls in ca. 1-2 % der NSCLC auf und sind hier häufig in jungen Patientengruppen, welche keine Raucheranamnese besitzen, zu finden. Dabei handelt es sich fast ausschließlich um den Subtyp des Adenokarzinoms. *ROS1* ist auch ein Tyrosinkinase-Rezeptor, welcher sich in die Untergruppe der Insulinrezeptoren einordnen lässt. Mutationen von *ROS1* treten in der Regel in Form einer Translokation auf. Diese Translokation zwischen *ROS1* auf Chromosom 6 mit dem Gen *SLC34A2* auf Chromosom 4 führt ebenfalls zur Entstehung eines

Fusionsproteins, welches letztendlich eine irreguläre Überfunktion des ROS1-Proteins mit den bereits beschriebenen Konsequenzen für die Zellproliferation ermöglicht. Bei der genannten Fusionsmutation handelt es sich um die häufigste Variante. Auch hier sind weitere Mutationspartner bekannt.³⁷ ROS1-Translokationen sprechen auf die Therapie mit dem ALK-Inhibitor Crizotinib an.³⁸

Neben diesen beim NSCLC am häufigsten vorkommenden Mutationen und unmittelbar therapierelevanten genetischen Veränderungen, existieren noch zahlreiche weitere Mutationen die in dieser Arbeit nicht detailliert erwähnt werden. Auf Translokationsmutationen des *ALK*-Gens wird im weiteren Verlauf der Arbeit näher eingegangen.

2.1.5. Therapie des NSCLC

Die leitliniengerechte Therapie des NSCLC ist abhängig vom Tumorstadium und berücksichtigt darüber hinaus den Allgemeinzustand, die Restlungenfunktion und die Vorerkrankungen/Komorbiditäten des Patienten. Primäres Ziel der Erstdiagnostik sollte die Ermittlung hinsichtlich der Tumorausbreitung (T-Status), der Infiltration der regionalen Lymphknoten (N-Status) und der Existenz von Fernmetastasen entsprechend der TNM-Klassifikation sein.^{2,39}

In niedrigen Tumorstadien (Stadium I bis II) ist die vollständige Tumoresektion mit kurativer Absicht die Behandlung der Wahl. Je nach Tumorausbreitung sind hier Lobektomie, Pneumektomie oder Segmentresektionen mit anschließender Entfernung der interlobären, hilären und mediastinalen Lymphknoten durchzuführen. Dies geschieht unter der Bedingung, dass postoperativ eine ausreichende pulmonale und kardiale Reserve fortbesteht. Ziel der Tumoresektion sollte nach Möglichkeit immer eine vollständige Entfernung des Tumorgewebes samt aller befallener Lymphknoten mit möglichst mikroskopisch nachgewiesenen, tumorfreien Gewebsrändern (R0-Resektion) sein. Ist es nicht möglich das Tumorgewebe in Gänze zu entfernen, besteht also ein mikroskopischer (R1-Resektion) bzw. makroskopischer (R2-Resektion) Resttumornachweis, kann eine Re-Resektion angestrebt werden. In Abhängigkeit von der Schwere des Tumorstadiums sollte ggf. eine adjuvante, cisplatinhaltige Kombinationschemotherapie an die operative Behandlung angeschlossen werden.^{2,40}

T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	<3cm, umgeben von Lungengewebe od. Pleura, Hauptbronchus nicht beteiligt
T1a(mi)	Minimalinvasives Adenokarzinom
T1a	≤ 1cm
T1b	> 1cm aber ≤ 2cm
T1c	> 2cm aber ≤ 3cm
T2	> 3cm aber ≤ 5cm - Infiltration des Hauptbronchus oder, - Infiltration der viszeralen Pleura oder, - Tumorbedingte partielle Atelektase oder obstruktive Pneumonie
T2a	> 3cm aber ≤ 4cm
T2b	> 4cm aber ≤ 5cm
T3	> 5cm aber ≤ 7 cm oder - Infiltration der Thoraxwand, N. phrenicus oder parietalem Perikard oder, - zusätzlicher Tumorknoten im selben Lungenlappen des Primärtumors
T4	> 7 cm oder, -direkte Infiltration von Diaphragma, Mediastinum, Herz, größeren Gefäße, Trachea, N. laryngeus recurrens, Ösophagus, Wirbelkörper oder Carina oder, - zusätzliche Tumorknoten in einem anderen ipsilateralen Lungenlappen
N0	Keine Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in ipsilateralen peribronchialen und/oder ipsilateralen Hilus- oder intrapulmonalen Lymphknoten (einschließlich eines Befalls durch direkte Ausbreitung des Primärtumors)
N2	Metastase(n) in ipsilateralen mediastinalen und/oder subkarinalen Lymphknoten
N3	Metastase(n) in kontralateralen mediastinalen, kontralateralen Hilus-, ipsi- oder kontralateralen Skalenus- oder supraklavikulären Lymphknoten
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
M1a	Vom Primärtumor getrennte Tumorherde in einem kontralateralen Lungenlappen; Tumor mit Pleurametastasen oder malignem Pleura- oder Perikarderguss
M1b	Eine solitäre Fernmetastase in einem solitären extrathorakalen Organ
M1c	Mehrere Fernmetastasen (>1) in einem oder mehreren Organen

Tabelle 1: TNM Klassifikation der Adenokarzinome der Lunge, 8. Edition 2018 nach der American Joint Commission on Cancer (AJCC)⁴¹

Patienten im Stadium IIIA der Erkrankung werden durch, an das TNM-Stadium angepasste, im zeitlichen Ablauf variable Kombinationen von Resektion, adjuvanter oder bei primär nicht resektablen Tumoren neoadjuvanter Chemotherapie behandelt. Im Anschluss daran kann in indizierten Fällen eine Strahlentherapie angeschlossen werden. Für die Chemotherapie werden ebenfalls platinhaltige Therapieregime in Kombination mit weiteren Chemotherapeutika verwendet. Da im Stadium III noch keine Standardtherapie definiert wurde, erfolgt hier eine individuelle Behandlung im Rahmen von Studien in designierten Behandlungszentren.^{2,40}

In den Stadien IIIB und IIIC wird eine kurative Resektion des Tumorgewebes nicht mehr empfohlen. Stattdessen besteht in diesen Fällen die Behandlung aus der Gabe des monoklonalen Antikörpers Durvalumab in Kombination mit simultaner Strahlentherapie. Bei Durvalumab handelt es sich um einen Checkpoint Inhibitor, der an den programmed cell death ligand 1 (PD-L1) bindet und zur Immuntherapie von

primär nicht operablen NSCLC genutzt wird. Dieses Therapieregime kann ggf. mit Chemotherapie kombiniert erfolgen.^{2,40}

Die Behandlung Erkrankter im Stadium IV wird mit primär palliativer Zielsetzung durchgeführt. In dessen Rahmen sollte schon frühzeitig eine professionelle, palliative Begleitung („Early palliativ Care“) mit multidimensionalem Konzept erfolgen. Sofern der Primärtumor resektabel ist und wenige, zeitgleiche Metastasen existieren, kann eine radikale lokale Behandlung der Metastasen z.B. in Form einer Operation und/oder Strahlentherapie zur Symptomkontrolle, dem Lindern von Leiden sowie der Verbesserung der Lebensqualität sinnvoll sein. Im Anschluss daran ist in manchen Fällen eine patientenadaptierte Chemotherapie indiziert.^{40,42-44}

Neben den bisher geschilderten Therapieregimen besteht in einer Vielzahl der Fälle die Möglichkeit einer zielgerichteten Therapie hinsichtlich der zum Teil bereits genannten Treibermutationen der Lungenkarzinome. Aktuell sollten schon vor Beginn einer Erstlinientherapie bestehende Tumorgewebeproben auf eine Mindestanzahl dieser Treibermutationen mit therapeutischer Konsequenz getestet werden. Hier sind insbesondere die bereits genannten Alterationen von *EGFR*, *BRAF* und *RET* sowie *ALK* und *ROS1* Translokationen zu nennen.^{2,40} Der Nachweis einer solchen Treibermutation, z.B. einer *ALK*-Translokation, kann abhängig vom Mutationstyp per FISH, durch spezielle immunhistochemische Verfahren, durch sog. Next Generation Sequencing (NGS) Panels oder mittels herkömmlicher Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfolgen.⁴⁵

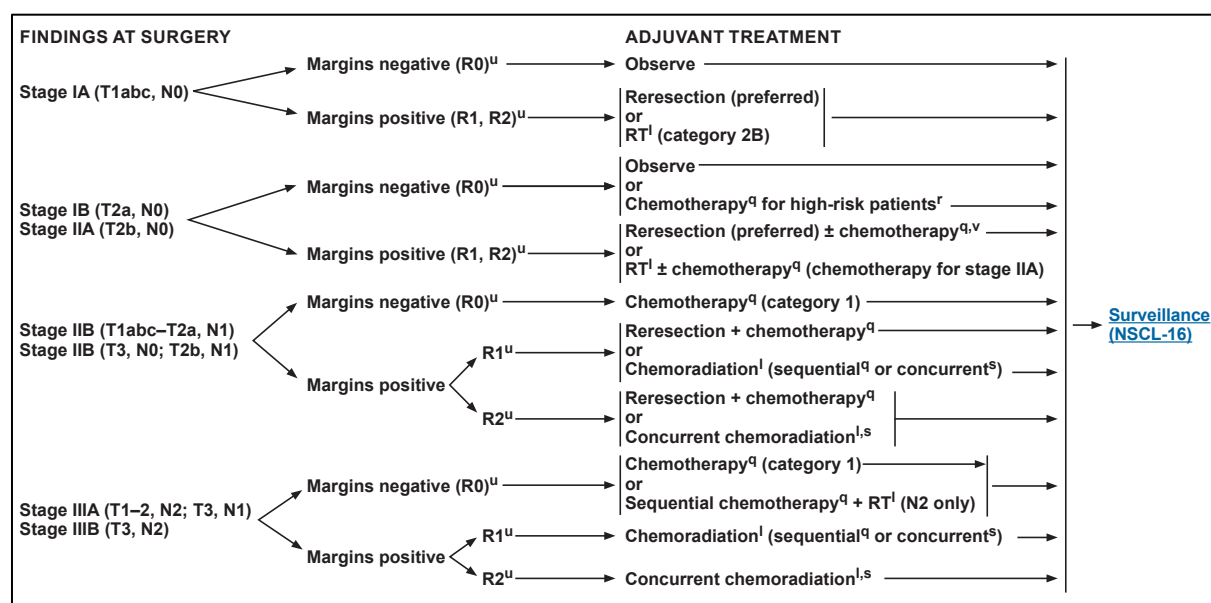


Abbildung 6: Behandlungsleitlinien für Lungenkrebs im Frühstadium übernommen aus der Leitlinie des National Comprehensive Cancer Network, Version 8, September 2020²

2.1.5.1. Zielgerichtete Therapie des NSCLC

Kann im Tumorgewebe des Patienten eine therapierbare *EGFR*-Alteration nachgewiesen werden, besteht eine Indikation zur Behandlung mit einem TKI.⁴⁰ Diese Therapie hat sich im Vergleich zur Behandlung mit herkömmlicher, platinhaltiger Chemotherapie als deutlich überlegen hinsichtlich des progressionsfreien Intervalls dargestellt.⁴⁶ Bei aktivierenden Mutationen von *EGFR* bietet sich eine Therapie mit verschiedenen TKI wie Gefitinib, Erlotinib, Afatinib oder Osimertinib an. Dabei können je nach Studie Ansprechraten von initial 50-100% erreicht werden.^{23,47}

Patienten mit einer *BRAFV600*-Tumormutation können mit einer Kombinationstherapie aus Dabrafenib und Trametinib therapiert werden.⁴⁸ In Studien stellte sich heraus, dass diese Kombinationstherapie nicht nur im Vergleich zur Standardchemotherapie, sondern auch im Vergleich zur Monotherapie mit Dabrafenib eine Überlegenheit in Bezug auf Ansprechraten und progressionsfreier Überlebenszeit (PFS) zeigt, weshalb sie bei betroffenen Patienten zur Erstlinientherapie zählt.⁴⁹

ROS1-Rearrangements sollten in der Erstlinie mit dem ALK-Inhibitor Crizotinib behandelt werden,³⁸ da Tumoren mit *ROS1*-Alterationen deutliche Ähnlichkeiten hinsichtlich ihrer Morphologie und der Struktur ihrer Kinasedomäne im Vergleich zu *ALK*-Translokationen aufweisen. Aktuell können durch diese Therapie initiale Ansprechraten von ca. 80% erzielt werden.⁵⁰

TARGETED THERAPY OR IMMUNOTHERAPY FOR ADVANCED OR METASTATIC DISEASE		
Monitoring During Initial Therapy		
• Response assessment after 2 cycles, then every 2–4 cycles with CT of known sites of disease with or without contrast or when clinically indicated.		
Monitoring During Subsequent Therapy		
• Response assessment with CT of known sites of disease with or without contrast every 6–12 weeks. Timing of CT scans within Guidelines parameters is a clinical decision.		
Sensitizing <i>EGFR</i> Mutation Positive	<i>ROS1</i> Rearrangement Positive	PD-L1 ≥1%
• First-line therapy	• First-line therapy	• First-line therapy*
▶ Afatinib ¹	▶ Ceritinib ²⁰	▶ Pembrolizumab ³⁵⁻³⁷
▶ Erlotinib ²	▶ Crizotinib ²¹	▶ (Carboplatin or cisplatin)/pemetrexed/ pembrolizumab (nonsquamous) ³⁸
▶ Dacomitinib ³	▶ Entrectinib ²²	▶ Carboplatin/paclitaxel/bevacizumab**/ atezolizumab (nonsquamous) ³⁹
▶ Gefitinib ^{4,5}		▶ Carboplatin/(paclitaxel or albumin-bound paclitaxel)/pembrolizumab (squamous) ⁴⁰
▶ Osimertinib ⁶	<i>BRAF V600E</i> Mutation Positive	▶ Carboplatin/albumin-bound paclitaxel/ atezolizumab (nonsquamous) ⁴¹
▶ Erlotinib + ramucirumab ⁷	• First-line therapy	▶ Nivolumab/ipilimumab ⁴²
▶ Erlotinib + bevacizumab (nonsquamous) ⁸	• Subsequent therapy	▶ Nivolumab + ipilimumab + pemetrexed + (carboplatin or cisplatin) (nonsquamous) ⁴³
• Subsequent therapy	▶ Dabrafenib/trametinib ^{24,25}	▶ Nivolumab + ipilimumab + paclitaxel + carboplatin (squamous) ⁴³
▶ Osimertinib ⁹		
<i>ALK</i> Rearrangement Positive	<i>NTRK</i> Gene Fusion Positive	PD-L1 ≥50%
• First-line therapy	• First-line/Subsequent therapy	• First-line therapy
▶ Alectinib ^{10,11}	▶ Larotrectinib ²⁶	▶ Atezolizumab ⁴⁴
▶ Brigatinib ¹²	▶ Entrectinib ²⁷	
▶ Ceritinib ¹³	<i>MET</i> Exon 14 Skipping Mutation	
▶ Crizotinib ^{10,14}	• First-line therapy/Subsequent therapy	
• Subsequent therapy	▶ Capmatinib ²⁸	
▶ Alectinib ^{15,16}	▶ Crizotinib ²⁹	
▶ Brigatinib ¹⁷	<i>RET</i> Rearrangement Positive	
▶ Ceritinib ¹⁸	• First-line therapy/Subsequent therapy	
▶ Lorlatinib ¹⁹	▶ Selpercatinib ³⁰	
	▶ Pralsetinib ³¹	
	▶ Cabozantinib ^{32,33}	
	▶ Vandetanib ³⁴	

Abbildung 7: Zielgerichtete Therapie oder Immuntherapie für fortgeschrittene oder metastasierte Lungenkarzinome übernommen aus der Leitlinie des National Comprehensive Cancer Network, Version 8, September 2020²

RET-Transformationen stellen eine sehr kleine Gruppe der in NSCLC bekannten Treibermutationen dar. Therapieempfehlungen für Patienten mit Mutationen dieser Art basieren derzeit lediglich auf Kasuistiken. So wurde in einzelnen Fällen bei der genannten Mutation ein Ansprechen auf die Antikörper Vandetinib und Cabozantinib beschrieben. Es sind aber weitere klinische Studien nötig, um eindeutige Therapieregime für diesen Subtyp des NSCLC zu definieren.^{51,52}

Zusätzlich besteht seit Februar 2021 mit dem *RET*-TKI Selpercatinib ein in der EU zugelassener und hochwirksames Therapeutika für diesen Mutationstyps.⁵³

2.2. Die anaplastische Lymphomkinase

Die anaplastische Lymphomkinase konnte bereits in der Mitte der Neunzigerjahre als Fusionspartner diverser anderer Genomabschnitte im Rahmen von Translokationsmutationen identifiziert werden. Alterationen dieser Art konnten insbesondere bei erkrankten Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen entdeckt werden. In diesem Zusammenhang wurde erstmalig das Nucleophosmin (*NPM*)-*ALK* Fusionsgen nachgewiesen.⁵⁴

Die *ALK*-Gensequenz kodiert im natürlichen Zustand einen Tyrosinkinase-Rezeptor, dessen Kinasedomäne der Subgruppe der Insulinrezeptoren zuzuordnen ist. Dieses Protein besteht aus einer Aminosäuresequenz von 1620 Aminosäuren, dessen Genlocus auf dem kleinen Arm des zweiten Chromosoms zu finden ist (2p23.2-p23.1). Der Aufbau der *ALK* Tyrosinkinase wird grob in drei Komplexe unterteilt: Eine extrazellulär liegende Bindungsstelle für die passenden Liganden, einen die Zellmembran durchspannenden Transmembrandomäne, sowie die intrazellulär liegende Tyrosinkinase. Bindet ein entsprechender Ligand an den äußeren Rezeptor, wird eine Konformationsänderung durch Dimerisierung angestoßen, welche letztendlich in der Aktivierung der eigentlichen Tyrosinkinase resultiert.⁵⁵ Die im Tiermodell den *ALK*-Rezeptor stimulierenden Liganden sind schon länger bekannt, bis dato konnten im Menschen nur zwei den Rezeptor physiologisch erregende Cytokine identifiziert werden: FAM150, auch augmentor-a (*AUG-α*) genannt, sowie FAM150A, Synonym augmentor-b (*AUG-β*), der mit einer geringeren Affinität an *ALK* bindet.⁵⁶

Die tatsächliche biologisch/physiologische Funktion der *ALK*-Tyrosinrezeptorkinase ist bislang nicht ausreichend geklärt. Bisherige Studien an Menschen und am Tiermodell legen jedoch eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des Gehirns und bestimmter Nervenzelltypen des zentralen Nervensystems, hier insbesondere im

Hirnstamm, Cortex, Hippocampus sowie im Bulbus olfactorius, und des peripheren Nervensystems nahe. Vermutlich spielt die ALK-Tyrosinkinase hier eine essentielle Rolle bei deren zellulären Kommunikationsmechanismen. Beim Menschen selbst lassen sich unter Therapie mit ALK-Inhibitoren einige Nebeneffekte wie Bradykardie, eine Verminderung des Testosteronspiegels und Einschränkungen des Sehvermögens feststellen. Diese Nebenwirkungen geben möglicherweise Hinweise auf die eigentlichen Funktionen bzw. auf Einflussfaktoren des ALK-Rezeptors.^{55,57,58}

2.2.1. ALK-Mutationen bei NSCLC

Bei *ALK*-Mutationen handelt es sich meist um Translokationen mit einem weiteren Partnergen, was in einem überstimulierten Fusions-Onkogen mündet. Es lassen sich jedoch auch Überexpressionen mit Entstehung mehrerer zusätzlicher Genkopien in diversen Tumorerkrankungen nachweisen. Zu diesen zählen insbesondere Neuroblastome, Melanome, Mammakarzinome und NSCLC. Dabei handelt es sich um Gen-Amplifikationen, die ebenfalls mit einer konstitutiven Daueraktivierung des ALK-Rezeptors einhergehen. Außerdem scheinen insbesondere Punktmutationen im *ALK*-Gen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Resistenzmechanismen in der treibermutationspezifischen Therapie von NSCLC zu spielen. Auf diese wird im weiteren Verlauf detaillierter eingegangen.^{57,59}

ALK-Translokationen stellen die wichtigste Mutationsgruppe der Lungenkarzinome dar: Mittlerweile sind durch die Entwicklung von verbesserten NGS-Verfahren, gezielten RNA-Sequenzierungstechniken und Möglichkeiten des sog. whole-exome-sequencing ca. 90 unterschiedliche Translokationsvarianten des *ALK*-Gens in NSCLC nachgewiesen worden, wobei die biologische Konsequenz, insbesondere in Bezug auf die Kanzerogenese, bei dem Großteil dieser Translokationsvarianten bis dato nicht ausreichend oder gar nicht geklärt ist.⁶⁰ Es wird vermutet, dass Translokationsmutationen in ihrer Gesamtheit für die Entstehung von ca. 20% aller Krebserkrankungen verantwortlich sind.^{57,61}

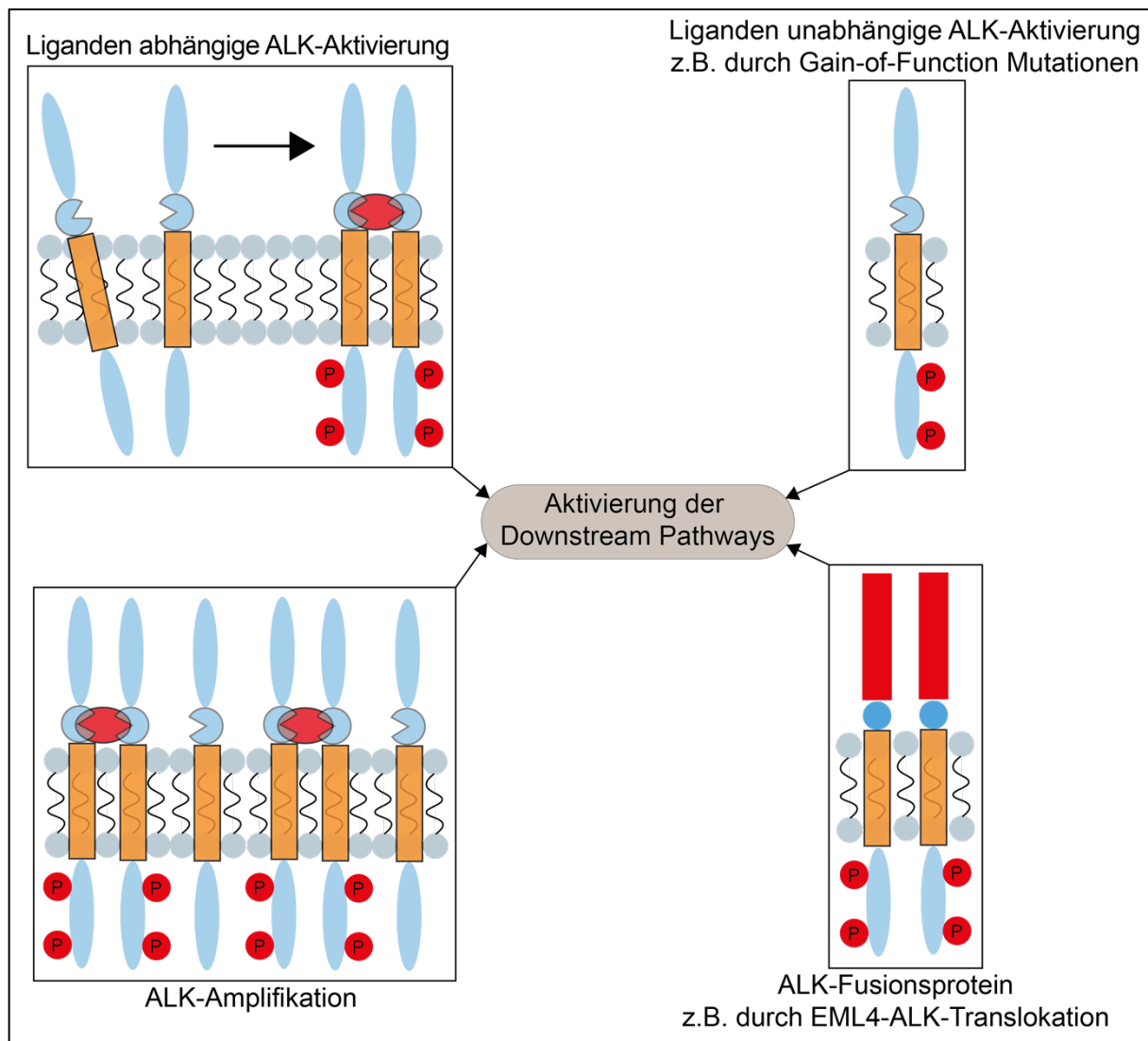


Abbildung 8: Schematische Darstellung der ALK-Rezeptor Aktivierungstypen modifiziert nach Huang H.⁶

2.2.1.1. **EML4-ALK Translokationsmutation**

Im Jahr 2007 gelang erstmalig der Nachweis einer *ALK*-Translokation bei Lungenkarzinomen. Hierbei handelt es sich um eine Inversion innerhalb des kleinen Armes des zweiten Chromosoms (*inv(2)(p21;p23)*). Daraus resultierend entsteht durch Verschmelzung des für die intrazellulär liegende katalytische Domäne kodierenden *ALK*-Genabschnitts mit dem N-terminalen Abschnitt des Echinoderm microtubule-associated protein-like 4-Gen (*EML4*) ein neues Fusionsgen.⁶²

EML4-ALK Translokationen sind mit einem Anteil von ca. 95% die dominierende *ALK*-Fusionsvarianten bei NSCLC.⁶⁰ Zusätzlich sind mehr als 30 verschiedene *EML4-ALK* Mutationsvarianten bekannt, wobei die Variationen durch unterschiedliche Bruchpunkte innerhalb des *EML4*-Gens zustande kommen, während der betroffene Abschnitt des *ALK*-Gens konstant zu sein scheint.^{63,64} Vermutlich beeinflussen diese

unterschiedlichen Fusionsvarianten das PFS sowie die Wahrscheinlichkeit Resistenzmechanismen gegenüber der Therapie mit TKI zu entwickeln.⁶⁵

Die Entstehung dieses Fusionsgens führt letztendlich zur Deregulation der katalytischen Einheit des ALK-Rezeptors. Durch eine konstitutive Daueraktivierung kommt es auch hier zu einer von Wachstumsfaktoren unabhängigen Stimulation der Zellteilung und Zelldifferenzierung sowie zum Schutz vor vorzeitiger Apoptose mit resultierendem ungehemmten Tumorwachstum des betroffenen Gewebes.⁶⁶

Neben der, in NSCLC am häufigsten auftretenden *EML4-ALK*-Translokation und deren zahlreichen Varianten, treten zusätzliche weitere *ALK*-Translokationsarten mit seltener

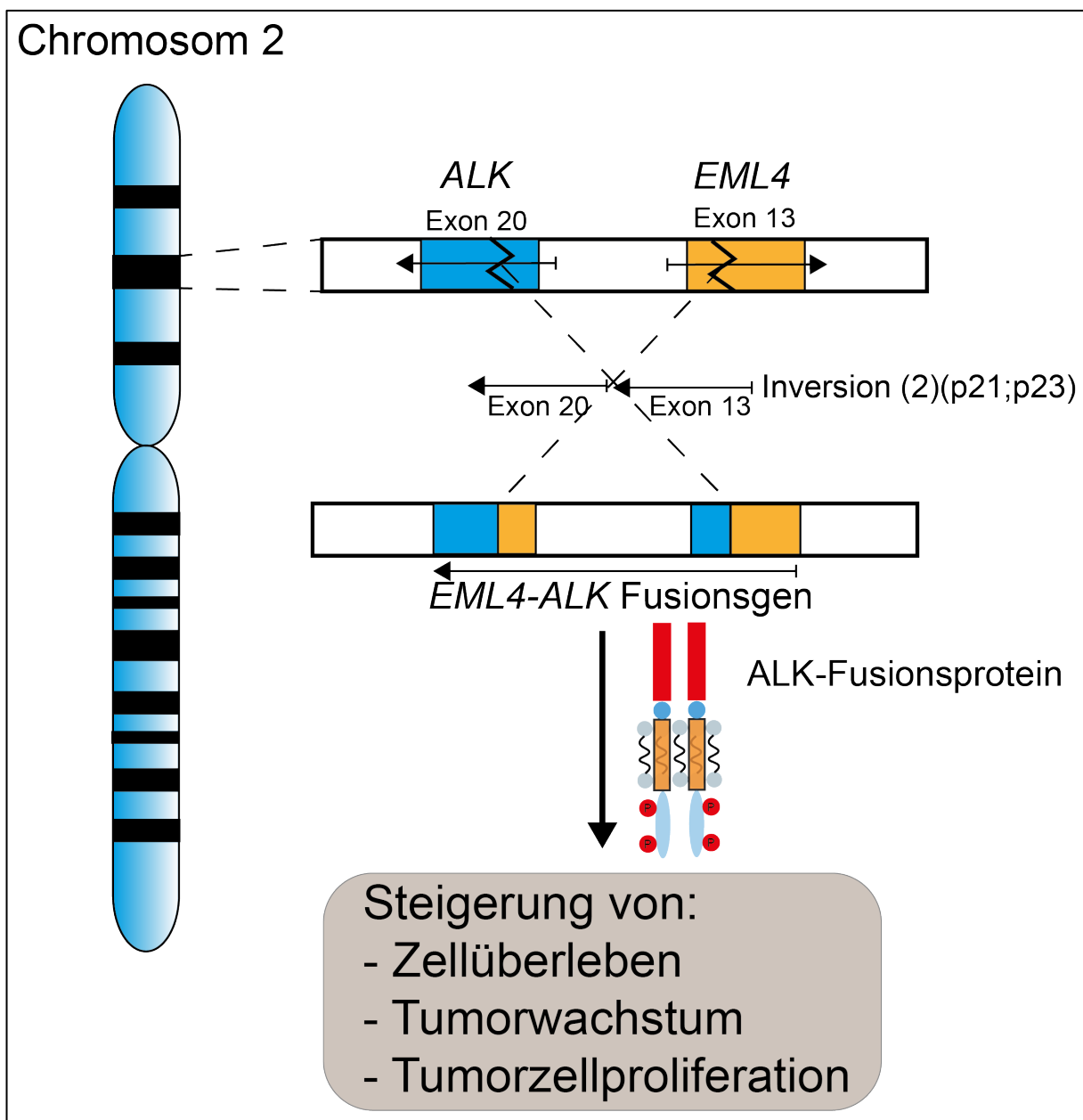


Abbildung 9: Vereinfachte Darstellung der Entstehung des *EML4-ALK* Fusionsproteins modifiziert nach E. Sánchez-Herrero et al.⁴

Häufigkeit auf. Darunter sind unter anderem Fusionen mit dem *KIF5B*-Gen⁶⁷, *KLC1*-Gen⁶⁸, *TPR*-Gen⁶⁹, sowie dem *BIRC6*-Gen⁷⁰, um nur einige wenige der zahlreichen Varianten aufzuführen. Deren Signifikanz auf die Onkogenese von NSCLC sowie das Ansprechen auf TKI ist bei zahlreichen der unterschiedlichen *ALK*-Fusionsmutationen nicht bekannt. Die Fusionsvariante *PRAKR1A-ALK* stellt jedoch ein Beispiel dar, welches deutlich weniger sensitiv auf die Therapie mit selbst neu entwickelten *ALK*-TKI anspricht.^{71,72}

Interessanterweise treten sowohl *ALK*-Fusionsmutationen als auch *EGFR* und *KRAS*-Mutationen vor initialer Therapie als exklusive Treibermutationen auf: Augenscheinlich kommt es weder bei mutierten *EGFR* noch bei *KRAS* mutierten NSCLC zu *ALK*-Translokationen, ebenso wenig wie umgekehrt. Dies untermauert die unabhängige Individualität dieser molekularen Subtypen der NSCLC.⁷³

Nicht kleinzellige Lungenkarzinome, insbesondere beim histopathologischen Subtyp des Adenokarzinoms, weisen in ca. 3-5% der Fälle eine solche *EML4-ALK*-Translokation mit einhergehendem Fusionsgen auf. Diese Konstellation tritt besonders häufig bei vergleichsweise jungen Patienten (medianes Erkrankungsalter ca. 52 Jahre⁷³) ohne bzw. mit nur geringer Raucheranamnese auf (70% Nichtraucheranteil der Erkrankten⁷³). Dabei erkranken Männer häufiger an NSCLCs mit *EML4-ALK* Translokation. Des Weiteren scheint diese Subgruppe der NSCLC durch aggressivere Krankheitsverläufe charakterisiert zu sein: In fast 90% der Fälle liegt bei Erstdiagnose eine Krebserkrankung im Stadium IV vor. Im Vergleich dazu stehen *ALK*-Wildtyp Karzinome mit ca. 60% Erstdiagnose im Stadium IV.^{63,73,74}

Histomorphologisch treten *ALK*-translozierte NSCLC besonders durch kribriiforme und/oder siegelringartige Zellstrukturen sowie ein solides Tumorstadiumsmuster in Erscheinung.^{73,75}

2.2.2. Therapie des *ALK*-translozierten NSCLC

Sollte vor Beginn der Behandlung eine therapierbare *ALK*-Translokation im Tumorgewebe des Patienten nachgewiesen werden, stehen aktuell die zielgerichteten *ALK*-Inhibitoren Alectinib, Brigatinib, Ceritinib und Crizotinib für die Erstlinientherapie nach Leitlinie des NSCLC im Stadium IV zur Verfügung.^{2,40}

So werden diese *ALK*-Inhibitoren je nach Datum ihrer Zulassung, ihrer Wirksamkeit/Funktion und ihrer Fähigkeit Therapieresistenzen zu überwinden bzw. zu verhindern, in mehrere Generationen eingeteilt. Manche dieser TKI finden in der

aktuellen deutschen Leitlinie zur Behandlung des Lungenkarzinoms noch keine Anwendung.⁴⁰

Zurzeit gilt in dieser Konstellation Alectinib, ein TKI der zweiten Generation, als Therapeutikum der Wahl. Alectinib konnte im direkten Vergleich mit Crizotinib, einem Erstgenerations-TKI, in zahlreichen Studien bessere Langzeitergebnisse hinsichtlich der progressionsfreien Überlebenszeit, eine erhöhte Ansprechrate auf die Therapie sowie eine deutlich verbesserte Verträglichkeit aufweisen.^{76,77}

ALK-Tyrosinkinase Inhibitoren der...	Wirkstoffname und Jahr der EU-Zulassung
<i>ersten Generation:</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Crizotinib, 2012⁷⁸
<i>zweiten Generation:</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Ceritinib, 2015⁷⁹ • Alectinib, 2017^{77,80} • Brigatinib, 2018⁸¹
<i>dritten Generation:</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Lorlatinib, 2019^{82,83}

Tabelle 2: Übersicht der in der Europäischen Union im Juli 2021 zugelassenen ALK-Tyrosinkinaseinhibitoren

Der Erstgenerations-ALK-TKI Crizotinib zeigte in einer Phase III Studie eine deutliche Überlegenheit gegenüber einer gängigen platinbasierten Chemotherapie im Rahmen einer Erstlinientherapie bei Patienten, die sich ohne vorher behandelt worden zu sein, im fortgeschrittenem Erkrankungsstadium befanden. Die spezifische Behandlung ermöglichte hier nicht nur eine deutlich verlängerte progressionsfreie Überlebenszeit, sondern auch eine erhöhte Ansprechrate auf die begonnene Therapie sowie eine Reduktion der Krankheitssymptome mit einhergehend gesteigerter Lebensqualität.⁷⁸ Patienten, die bereits eine platinbasierte Chemotherapie erhalten haben und unter dieser Therapie einen Tumorprogress entwickeln, sollten ebenfalls fortführend mit Crizotinib weiterbehandelt werden.⁴⁰ Diese Patienten profitieren ebenfalls von einem längeren PFS sowie ORR mit mildereren Krankheitssymptomen und verbesserter Lebensqualität gegenüber platinbasierter Chemotherapie.⁸⁴

Neben besserer Wirksamkeit im zentralen Nervensystem konnten ähnliche Studienergebnisse für den Zweitgenerations-TKI Ceritinib, im Vergleich zu Crizotinib beobachtet werden.⁷⁹ Kommt es bei ALK-positiven Patienten zu einem Krankheitsprogress oder Nichtansprechen auf die bereits begonnene Therapie mit

einem Erstgenerations-TKI, bietet sich hier eine Fortsetzung der Behandlung mit einem TKI der zweiten bzw. dritten Generation an.⁸⁵⁻⁸⁷

Aktuell befinden sich noch weitere ALK- und Multikinaseinhibitoren in der Entwicklung bzw. werden in Phase I-III Studien auf ihre Wirksamkeit geprüft.⁸⁸⁻⁹⁰

2.2.3. Resistenzmechanismen unter zielgerichteter ALK-Therapie

Das anfängliche Therapieansprechen des betroffenen Patientenkollektiv auf die zielgerichtete ALK-Inhibition ist sehr gut. Beispielsweise konnte der TKI Crizotinib in seiner Phase III Studie, im Vergleich zur Standardchemotherapie, Ansprechraten von 74% im Vergleich zu 45%, sowie eine Verlängerung des PFS um fast 4 Monate erzielen.⁷⁸

Jedoch kann bei fast allen Betroffenen, mit einer Latenz von einigen Jahren, während der Therapie ein Fortschreiten der Erkrankung festgestellt werden. Dieses ist vermutlich auch auf die Entwicklung sekundärer intrinsischer Mutationen, also vom ALK-Rezeptor selbst abhängige Mutationen, sowie auf die Entstehung weiterer extrinsischer, vom ALK-Rezeptor unabhängiger Mutationen, zurückzuführen. Ziel der eigentlichen zielgerichteten Therapie ist es, die überschießende Kinaseaktivität des ALK-Rezeptors und die damit verbundene maligne Zellproliferation zu verhindern. Sekundäre Mutationen sorgen im Allgemeinen dafür, dass diese Hemmung unterbleibt, obwohl ein theoretisch passender TKI therapeutisch genutzt wird.⁹¹

2.2.3.1. ALK-abhängige Resistenzmechanismen

Ein möglicher Resistenzmechanismus ist die sterische Umstrukturierung des ALK-Rezeptors selbst z.B. auf Basis einer entstandenen Substitutionsmutation. Erfolgt die Substitution einer Aminosäure wie bei den bekannten *ALK-Gatekeeper-Mutationen* *ALK-L1196M* und *ALK-G1202R*, können TKI der ersten Generation nicht mehr an den ALK-Rezeptor binden oder deren Bindungsaffinität wird durch die Mutation stark herabgesetzt. Auf diese Weise verliert Crizotinib beispielsweise aufgrund einer G1269A Substitutionsmutation des *ALK-Gens*, seine Bindungsfähigkeit an den ALK-Rezeptor.⁹²⁻⁹⁵ Weitere Punktmutationen wie C1156Y, L1152R und I1151Tins am N-terminus sowie die Mutationen F1174C/L/V am C-Terminus des ALK-Proteins führen zu einer erhöhten Affinität des ALK-Rezeptors gegenüber ATP. Der bereits überstimulierte Rezeptor erfährt so durch die erhöhte Sensitivität gegenüber ATP eine weiter verstärkte Aktivierung.^{92,94,95}

Solche Mutationen mit Einfluss auf die Rezeptorstruktur treten insbesondere bei der Therapie mit Erst- und Zweitgenerations-TKI auf.⁹⁶

Zusätzlich sorgt eine Amplifikation des *ALK*-Gens, also die numerische Vervielfältigung des genannten Genabschnitts, bei ca. 7 % der behandelten Patienten für einen Progress unter Therapie mit TKI der ersten Generation. Insgesamt treten diese *ALK*-Amplifikation jedoch deutlich seltener auf als die bereits o.g. erwähnten Mutationsarten. Außerdem scheinen Amplifikationen als Resistenzmechanismus während der Behandlung TKI höherer Generationen noch keine Rolle zu spielen.^{94,96} Zusammenfassend bedingen *ALK*-abhängige Mutationen ca. 30% aller Resistenzen gegen Erstgenerations-TKI wie Crizotinib und treten primär bei dieser TKI-Generation auf. Drittgenerations-TKI wie Lorlatinib wurden speziell entwickelt, um manche der genannten Mutationen (z.B. G1202R) zu überwinden und bieten so eine Therapiemöglichkeit bei Therapieversagen.⁹²⁻⁹⁴

2.2.3.2. ALK-unabhängige Resistenzmechanismen

Den *ALK*-abhängigen Mutationen stehen *ALK*-unabhängige bzw. sog. Off-target Mutationen gegenüber. Deren Wirkungsweise besteht vornehmlich in der Umgehung der Aktivierung des *ALK*-Rezeptors über alternative Signalwege. Diese sog. Bypass-Mechanismen fungieren etwa über eine Fehlregulation der Feedbackmechanismen oder über die zusätzliche autokrine Aktivierung des *ALK*-Rezeptors. Das Entstehen solcher *ALK*-unabhängiger Resistenzmechanismen führt zu einer Anregung diverser Signalwege mit dem Ziel, die Zellproliferation und das Zellüberleben der betroffenen malignen, transformierten Zellen zu sichern.^{92,97-99}

Eine *EGFR* Überstimulation konnte als einer der ersten Bypass-Mechanismen bei der Therapie mit Erstgenerations-TKI resistenten *ALK* positiven NSCLC nachgewiesen werden. Die vermehrte, mutationsunabhängige Phosphorylierung des *EGFR* führt auch in diesem Fall zu einer verstärkten Aktivierung nachgeschalteter Signalwege mit enthemmendem Einfluss auf Zellproliferation und Zellüberleben.^{98,99}

MET (Mesenchymal Epithelial Transition Protoonkogen) -Amplifikationen sind schon seit längerem als Resistenzmechanismen in *EGFR*-mutierten NSCLC bekannt. Ihre Rolle bei *ALK*-positiven NSCLC wurde zunächst unterschätzt, da mit dem Erstgenerations-TKI Crizotinib nicht nur der *ALK*-Rezeptor, sondern auch durch die Multikinaseaktivität auch der *MET*-Rezeptor erfolgreich blockiert wurde. Durch die fehlende *MET*-hemmende Wirkung neuerer *ALK*-TKI Generationen konnte in einem Fall, trotz eines

nachgewiesenen *ALK* und *EGFR* Wildtyps, eine *MET*-Amplifikation mit simultaner Resistenz gegenüber dieser ALK-TKI nachgewiesen werden.^{97,100}

Im Rahmen einer NGS-Studie zeigten sich im Anschluss an eine Behandlung mit Zweitgenerations-TKI zahlreiche Mutationen in weiteren Genen wie *TP53*, *DDR2*, *BRAF*, *FGFR2*, *MET*, *NRAS* und *PIK3CA*-Genen. Deren Rolle im Rahmen von ALK-unabhängigen Resistenzmechanismen ist bis dato jedoch nicht ausführlich geklärt.⁹⁶

Ein weiterer wichtiger Mechanismus in der Entwicklung ALK unabhängiger Resistenzen gegen die verwendete Therapie ist die sog. Epithelial-mesenchymale Transition (EMT). Durch EMT verlieren Tumorzellen ihre epithelialen Charakteristika wie Zellpolarität, Zell-Zellkontaktstrukturen wie Tight- und Gap-Junctions sowie die Expression von E-Cadherinen auf ihrer Zelloberfläche. Die Tumorzellen nehmen somit einen mesenchymalen Phänotyp an. Insbesondere der Verlust der E-Cadherine und die Ausbildung von mesenchymalen Markern wie Vimentin und N-Cadherin ermöglichen den transformierten Zellen, ihre Zellverbände durch enthemmte Zellmotilität zu verlassen und resultiert somit in verstärkter Metastasierung.¹⁰¹

In weiteren Fällen konnte die Entwicklung einer sog. Effluxpumpe durch die Tumorzellen festgestellt werden. Eine erhöhte Expression der sog. P-glycoprotein (P-gp) Effluxpumpe sorgt dabei für eine ATP-abhängige Ausschleusung der verwendeten Therapeutika aus den Tumorzellen in den Extrazellularraum und verhindert somit z.B. die Wirkung des Erstgenerations-TKI Crizotinib.¹⁰²

Die genannten sowie weitere Resistenzmechanismen treten nicht nur als singuläre Veränderungen des Genoms auf, sondern auch in Form von polyklonalen genetischen Veränderungen. Es handelt sich bei diesen Resistenzen gegen die verwendeten Therapeutika um komplexe Konstellationen, welche in verschiedener Form kombiniert oder mit zeitlicher Latenz im Verlauf oder bereits vor Beginn der gezielten Therapie mit TKI entstehen bzw. bestehen.^{94,103}

ALK-abhängige Resistenzmechanismen:

- Sekundäre Mutationen der ALK-Tyrosinkinase Domäne
 - *ALK*-Gatekeepermutationen mit Verringerung der TKI-Affinität
 - *ALK*-Gatekeepermutationen mit Verhinderung der TKI-Bindung
 - Punktmutationen mit Erhöhung der ATP-Sensitivität
- *ALK*-Amplifikation

ALK-unabhängige Resistenzmechanismen:

- Aktivierung von alternativen Signalwegen
 - EGFR-Überstimulation
 - *MET*-Amplifikation
 - Mutationen in div. anderen Genen *TP53*, *DDR2*, *BRAF*, *FGFR2* etc.
- Epitheliale-mesenchymale Transition
- Effluxpumpe zur Ausschleusung bestimmter TKI

Tabelle 3: Übersicht über ausgewählte ALK-abhängige und unabhängige Resistenzmechanismen

2.3. Die Telomere, Telomerase und *TERT*

2.3.1. Telomere

Bei der DNA-Replikation ergibt sich auf Grund des Replikationsablaufs ein die Zellteilung und damit die Lebensspanne einer jeden gesunden Zelle limitierender Mechanismus. Nach Termination jeder Replikation verkürzen sich die Chromosomenenden um ca. 50 bis 200 Basenpaare. Durch die fehlende 3'OH-Gruppe an der ehemaligen Position des Primers können durch die DNA-Polymerase keine weiteren Nucleotide an den DNA-Strang angehängt werden. Um dem stetigen Verlust an Basenpaaren entgegenzuwirken sowie zum Schutz vor vorzeitiger Zellalterung, genomischer Instabilität und Degradation der DNA besitzen alle Chromosomen an ihren Enden die sog. Telomere: DNA-Abschnitte welche aus repetitiven, nicht kodierenden Basenabfolgen bestehen. Diese sog. tandem-repeats. setzen sich aus hundert- bis tausendfachen Wiederholungen der Nucleotidabfolge 5'-TTAGGG-3' zusammen. So kann bei jeder Replikation ein Teil der Basenpaare verloren gehen, ohne dass kodierende Genabschnitte betroffen sind und die o.g. Prozesse eintreten.

Somatische Zellen erreichen so in Zellkulturen eine Lebensspanne von ca. 50-60 Replikationszyklen bevor ihre Apoptose eingeleitet wird.^{104,105}

2.3.2. Telomerase und *TERT*

Die Telomere werden durch die Telomerase synthetisiert. Dabei handelt es sich um eine hochspezialisierte Reverse Transkriptase, die aus mehreren Untereinheiten besteht: Einem RNA-Abschnitt bestehend aus ca. 150 Basenpaaren welcher Bestandteil des Enzyms ist und als RNA-Matrize dient (*TERC*), sowie der eigentlichen katalytischen Untereinheit Telomerase reverse transcripase (*TERT*). Der für *TERT* kodierende Genlocus liegt auf dem kleinen Arm des fünften Chromosoms (5p15-33) und ist im Gesunden nur als einfache Genkopie vorhanden. Beide Komponenten zusammen bilden als Ribonukleoprotein den menschlichen Telomerase-Komplex.^{105,106}

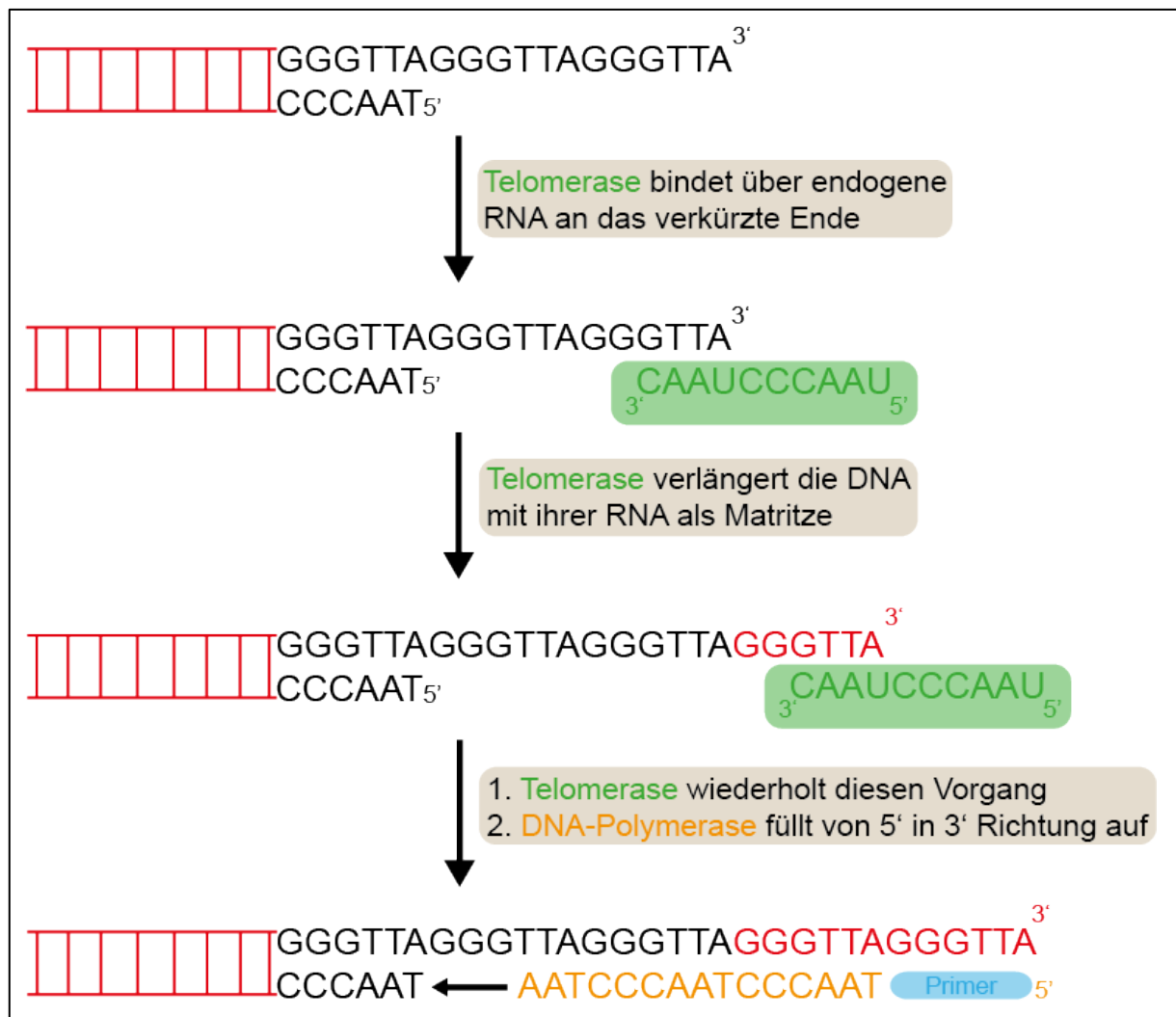


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Telomerasefunktion

In somatischen Zellen ist die *TERT*-Expression und damit die Funktion des Enzyms epigenetisch unterdrückt. Eine kontinuierliche Zellteilung führt in nicht maligne-transformierten Zellen somit zu einer fortschreitenden Verkürzung der Telomerlänge. Erreicht diese eine kritische Grenze, wird durch DNA-Kontroll- und Reparaturmechanismen die Zelle in einen permanenten Zustand der Zellruhe versetzt, auch Zellseneszenz genannt, oder eine kontrollierte Apoptose eingeleitet. Die Limitierung der Zellteilungszahl und die damit einhergehende Begrenzung der Lebensspanne der Zellen bietet somit einen möglichen Schutz vor dem Risiko maligner Transformation, welches sich mit jedem abgeschlossenen Replikationszyklus erhöht. Stammzellen sowie Keimbahnzellen besitzen dahingegen eine fortbestehende Telomerase-Aktivität.^{107,108}

2.3.3. *TERT*- und Telomerasefunktion in Tumorerkrankungen

In bis zu 90% aller Tumorentitäten kann eine *TERT*-Reaktivierung, beispielsweise durch Promotormutationen, festgestellt werden. Insbesondere bei Glioblastomen, Melanomen und Urothelkarzinomen können sehr hohe Anteile dieser Reaktivierungen festgestellt werden.¹⁰⁷ Durch erhöhte Zellteilungsraten sind gerade Krebszellen in kürzester Zeit von verkleinerten Telomeren betroffen. Die häufig damit einhergehende genomische Instabilität durch die fehlende protektive Wirkung der Telomere führt in zahlreichen Tumorarten zur Wiederherstellung der *TERT*-Funktion und somit zur Verlängerung der Telomere selbst. Davon betroffene Krebszellen entwickeln so die Fähigkeit zur numerisch unlimitierten Replikation und erreichen damit trotz großer Mutationslast eine verstärkte Proliferation.^{109,110}

Neben der eigentlichen Funktion der Telomerverlängerung besitzt *TERT* noch zahlreiche weitere Funktionen, die sie für Tumorzellen essentiell macht. Zu diesen zählt die Einflussnahme auf die Mitochondrienfunktion, die Gentranskription und Expression sowie der DNA-Reparatur. Primär tragen sie zur Krebsentstehung und zum Progress der Tumorerkrankung bei.¹⁰⁷

Genetische Veränderung in der *TERT*-Domäne existieren in Form von verschiedenen Subtypen. Wie bereits erwähnt treten *TERT*-Promotormutationen je nach Krebsart mit unterschiedlicher Prävalenz (von weniger als 10% bei Lungenkarzinomen bis zu ca. 90% in Melanomen) auf.¹¹¹ Neben diesen Promotermutationen spielen außerdem *TERT*-Gen Rearrangements sowie Amplifikationen eine wichtige Rolle. Vermeintliches Ziel all dieser Mechanismen ist es, die Telomerase zu aktivieren bzw. deren Aktivität

zu erhöhen und somit maligne Transformation und zelluläre Unsterblichkeit durch Telomerstabilisation zu sichern. Dabei sollte man den betroffenen Zellen jedoch kein intentionelles Handeln zusprechen, sondern dies als Prozess betrachten der insbesondere vom Zufall geprägt ist.^{107,111}

Mit besonderem Blick auf Amplifikationen des *TERT*-Gens konnte durch High-Sequenzierungsstudien gezeigt werden, dass in 31 unterschiedlichen Tumorarten ca. 4% aller Lungenkarzinome eine *TERT*-Amplifikation besitzen.¹¹²


Die Expression und damit die Funktion von *TERT* scheint auf dem Prinzip der sog. Gene-Dosage, also der tatsächlichen Anzahl von Genkopien eines bestimmten Gens im Genom, zu beruhen. Folglich erzeugen Amplifikation des Gens vermutlich auch eine erhöhte Telomerase-Aktivität in malignen Zellen.^{112,113}

In zahlreichen Studien mit Blick auf verschiedene Tumorentitäten, insbesondere beim Neuroblastom, wurde verdeutlicht, dass eine erhöhte *TERT*-Expression mit einem auffallend schlechtem Krankheitsverlauf mit Blick auf die Überlebenszeit des Patientenkollektivs einhergeht (40% PFS nach 7 Jahren bei *TERT*-Alterationen gegenüber fast 100% PFS über 15 Jahre bei Hochrisikoerkrankung ohne Alterationen).¹¹⁴ Zusätzlich scheinen Krebserkrankungen, bei denen eine Alteration im *TERT*-Gen festgestellt werden kann, mit besonders aggressiveren Krankheitsverläufen assoziiert zu sein.¹¹⁴⁻¹¹⁶

3. Publikation

Die folgende Publikation wurde am 18. September 2020 im Rahmen einer geteilten Erstautorenschaft mit Fr. Dr. rer. nat. Christina Alidousty im Journal Histopathology erstveröffentlicht.

Prevalence and potential biological role of *TERT* amplifications in *ALK* translocated adenocarcinoma of the lung

Christina Alidousty,^{1,*}  Nicolai Duerbaum,^{1,*} Svenja Wagener-Ryczek,¹ Till Baar,² Luciano G Martelotto,³ Carina Heydt,¹ Janna Siemanowski,¹ Barbara Holz,¹ Elke Binot,¹ Jana Fassunke,¹ Sabine Merkelbach-Bruse,¹ Jürgen Wolf,^{4,5,6} Anna Kron,^{4,5,6} Reinhard Buettner^{1,4,6} & Anne M Schultheis¹

¹Institute of Pathology, University Hospital Cologne, Cologne, ²Faculty of Medicine, Institute of Medical Statistics and Computational Biology, University of Cologne, Cologne, Germany, ³Monash Health, Monash University, Clayton, Vic., Australia, ⁴Network Genomic Medicine, Cologne, ⁵Lung Cancer Group Cologne, Department I of Internal Medicine, University Hospital of Cologne, Cologne, and ⁶Center for Integrated Oncology Koeln Bonn, Cologne, Germany

Date of submission 10 June 2020

Accepted for publication 11 September 2020

Published online Article Accepted 18 September 2020

Alidousty C, Duerbaum N, Wagener-Ryczek S, Baar T, Martelotto L G, Heydt C, Siemanowski J, Holz B, Binot E, Fassunke J, Merkelbach-Bruse S, Wolf J, Kron A, Buettner R & Schultheis A M

(2021) *Histopathology* 78, 578–585. <https://doi.org/10.1111/his.14256>

Prevalence and potential biological role of *TERT* amplifications in *ALK* translocated adenocarcinoma of the lung

Aims: The advent of specific *ALK*-targeting drugs has radically changed the outcome of patients with *ALK* translocated non-small-cell lung cancer (NSCLC). However, emerging resistance to treatment with *ALK* inhibitors in these patients remains a major concern. In previous studies, we analysed two *ALK*⁺ patient cohorts (*TP53* wild-type/*TP53* mutated) in terms of copy number alterations. All patients belonging to the *TP53* wild-type group had mainly genetically stable genomes, with one exception showing chromosomal instability and amplifications of several gene loci, including *TERT*. Here, we aimed to determine the prevalence of *TERT* amplifications in these *ALK*⁺ lung cancer patients by analysing an independent cohort of 109 *ALK* translocated cases. We further analysed the copy

numbers of numerous cancer-relevant genes and other genetic aberrations.

Methods and results: The prevalence of *TERT* amplifications was determined by means of FISH analyses. Copy numbers of 87 cancer-relevant genes were determined by NanoString nCounter[®] technology, FoundationOne[®] and lung-specific NGS panels in some of these *TERT*-amplified samples, and clinical data on patients with *TERT*-amplified tumours were collected. Our data revealed that five (4.6%) of all 109 analysed *ALK*⁺ patients harboured amplification of *TERT* and that these patients had genetically unstable genomes.

Conclusions: Our preliminary study shows that *ALK*⁺ adenocarcinomas should be evaluated in the context of their genomic background in order to more clearly understand and predict patients' individual course of disease.

Keywords: *ALK*, cancer, lung, *TERT*

Introduction

Lung cancer is the leading cause of cancer-related mortality worldwide.¹ Approximately 85% of the cases belong to the group collectively known as non-

Address for correspondence: Anne M Schultheis, MD, Institute of Pathology, University Hospital Cologne, Kerpener Straße 62, 50937 Cologne, Germany. e-mail: anne.schultheis@uk-koeln.de
*These authors contributed equally to this work.

© 2020 The Authors. *Histopathology* published by John Wiley & Sons Ltd.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

small-cell lung cancer (NSCLC).² One distinct molecular subtype of NSCLC is defined by rearrangement of the *ALK* (anaplastic lymphoma kinase) gene, leading to a subsequent constitutive activation of the kinase and thereby driving cell proliferation and malignant growth.³ Despite the development of potent *ALK* inhibitors, patients' responses remain limited in time, with resistance commonly occurring within 4–5 years after first treatment.

Historically, *ALK* alterations have been presumed to be independent, mutually exclusive events. Our group recently reassessed 201 *ALK*+ cases and found that 23.8% of *ALK*+ patients harboured an additional *TP53* mutation prior to therapy⁴ and that these cases showed genetic instability compared to *ALK*+/*TP53*^{WT} patients.⁵ Interestingly, in both patient cohorts, we found one *TERT* amplified case, each showing particular genomic instability. In contrast to the *TP53* mutated group, where gene amplifications are expected due to loss of genomic protection by the p53 protein,⁶ the *TERT* amplification in the *TP53* wild-type (WT) group was surprising, and alerted special attention.

Telomerase reverse transcriptase (*TERT*) is the catalytic subunit of the enzyme telomerase that forms, together with the telomerase RNA component (*TERC*), the human telomerase complex. *TERT* catalyses the addition of nucleotides to the ends of telomeres,⁷ preventing the degradation of the chromosomal ends. This enables cells (that otherwise would undergo apoptosis) to continuously replicate their DNA and proliferate, leading to immortality.

In somatic cells, the expression of *TERT* is epigenetically silenced⁸ and consequently the transcriptase is not expressed. In highly proliferating cancer cells, continuous shortening of telomeres can lead to significant genomic instability.⁹ Within tumour formation, telomere function can be reconstituted, leading to addition of telomeric repeats by the enzyme and enhanced replication, proliferation and immortality in these heavily rearranged cells.¹⁰

Given the finding that our *ALK*-rearranged patients with *TERT* amplification showed significant genomic instability, we aimed to assess the prevalence of *TERT* amplifications among *ALK*+ patients. Further, we investigated if *TERT* amplifications in *ALK*-rearranged lung tumours are always associated with significant genomic instability and worse clinical outcome.

Here, we analysed a total subset of 109 *ALK*+ patients by *TERT*-fluorescence *in-situ* hybridisation (FISH) and further determined the gene copy numbers of 87 cancer genes in *TERT*-positive cases by means of NanoString nCounter[®] technology. In

addition, we investigated the mutational load and mutational profile of two cases using the FoundationOne[®] platform.

Materials and methods

CASE SELECTION, PATIENT INFORMATION AND HISTOPATHOLOGICAL CLASSIFICATION

Tumour tissue was fixed in buffered formalin and embedded in paraffin blocks (FFPE). All primary diagnoses were reviewed by two experienced pathologists (A.M.S., R.B.). Morphological features, e.g. predominant growth pattern, size of cells and nuclei, nucleus/cytoplasm ratio and chromatin structure, as well as mitotic activity, were evaluated on haematoxylin and eosin (H&E)-stained slides. To confirm the diagnosis and to exclude squamous cell carcinoma of the lung or neuroendocrine differentiation, ancillary immunohistochemical staining was performed as established for our accredited routine staining platform (antibodies and staining details are given in Table S1), e.g. cytokeratins (CK5/6, CK7, p40), synaptophysin and thyroid transcription factor 1 (TTF1), and further, for all cases, *ALK* protein expression was evaluated; if any positivity was seen *ALK* translocation was confirmed using FISH, as described below. *ALK* IHC was performed on FFPE samples. Briefly, the staining was performed with the BOND-MAX automated immunohistochemistry slide staining system (Leica, Wetzlar, Germany). The following antibody and conditions were applied: anti-human *ALK* mouse monoclonal primary antibody, clone: 1A4, Zytomed, Berlin, Germany; FFPE retrieving conditions: 5 min in ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) Bond Epitope Retrieval Solution 2, pH 9; dilution: 1:100; incubation: 20 min, 100°C, 12 min 37°C (Table S1). Tumour diagnoses were made in accordance with the current World Health Organisation classification system.¹¹

One hundred and nine patients with *ALK*-translocated adenocarcinomas of the lung with sufficient material available after routine diagnostics were selected and screened for *TERT* amplification by FISH.

Clinical follow-up data were provided by the Network Genomic Medicine database that covers molecular diagnostics and basic demographic and clinical data. Patients' characteristics of all analysed samples, FISH results, specimen type and other identified molecular alterations are given in Table S2.

The study was conducted in accordance with the local ethical guidelines and was reviewed and approved by the institutional ethics committee.

DNA EXTRACTION

All tumour samples were formalin-fixed and paraffin-embedded according to local practice. Three to nine 10- μ m-thick sections were cut from FFPE tissue blocks. Tumour areas were macrodissected from unstained slides using a marked H&E-stained slide as reference. After deparaffinisation, the DNA was isolated with the Maxwell[®] 16 FFPE Plus Tissue LEV DNA Purification Kit (Promega, Mannheim, Germany) on the Maxwell[®] 16 (Promega, Walldorf, Germany), following the manufacturer's instructions.

TARGETED MASSIVELY PARALLEL SEQUENCING

Next-generation sequencing (NGS) was performed with 98 of 109 *ALK*⁺ samples with sufficient material available. For NGS, the DNA content was measured using a quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) kit (GoTaq qPCR Master Mix; Promega). Multiplex PCR-based parallel sequencing was performed on all FFPE samples. Isolated DNA was amplified with a customised GeneRead DNaseq Targeted Panel V2 (Qiagen, Hilden, Germany) and the GeneRead DNaseq Panel PCR Kit V2 (Qiagen) or an Ion AmpliSeq Custom DNA panel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and the Ion AmpliSeq Library Kit version 2.0 (Thermo Fisher Scientific) following the manufacturer's instructions. Gene panels are listed in Table S3.

Libraries were constructed using the Gene Read DNA Library I Core Kit and the Gene Read DNA I Amp Kit (Qiagen). After end-repair and adenylation, NEXTflex DNA barcodes were ligated (Bio Scientific, Austin, TX, USA). Barcoded libraries were amplified; final library products were quantified, diluted and pooled in equal amounts. Finally, 12 pM of the constructed libraries were sequenced on the MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) with a MiSeq reagent kit V2 (300-cycles) (Illumina), following the manufacturer's recommendations.

Data were exported as FASTQ files. Alignment and annotation was performed using a modified version of a previously described method.¹² BAM files were visualised in the Integrative Genomics Viewer (<http://www.broadinstitute.org/igv/>; Cambridge, MA, USA). A 5% cut-off for variant calls was used and results were only interpreted if the coverage was $> \times 200$.

FISH ANALYSIS

Only cases with previous positive ALK IHC staining underwent further FISH analyses to avoid false positive FISH results.

FISH analyses were performed in all 109 samples, as previously described,¹³ with a few modifications: 2 μ m tissue sections were mounted on silanised slides and hybridised overnight with the respective probes, according to the manufacturer's instructions (ZytoVision, Bremerhaven, Germany). For *ALK*-FISH analysis the ZytoLight[®] SPEC *ALK/EML4* TriCheck[™] (ZytoVision, Bremerhaven, Germany) probe was used. One hundred tumour cell nuclei were counted per case, and break-apart or extra red signals were classified as aberrant signal. A cut-off value of 15% aberrant signals was used to validate the *ALK* translocation,¹⁴ as described previously.^{15,16}

For *TERT*-FISH analyses, hybridisation was performed with ZytoLight[®] SPEC *TERT/5q31* Dual Color Probe (ZytoVision). For *TERT* amplification, a ratio of two or more *TERT/5q31* or an average of five or more *TERT* signals per cell according to Zhang et al.,¹⁷ was used to define a case as 'amplified'.

NANOSTRING NCOUNTER[®] ASSAY

Copy number alterations were analysed in four of five *TERT* amplified samples (*TERT*^{amp1}, *TERT*^{amp3}, *TERT*^{amp4} and *TERT*^{amp5}) using the NanoString nCounter[®] platform (NanoString Technologies, Seattle, WA, USA).

For detection of copy number variation (CNV), nCounter CNV CodeSets were used with 300–600 ng of genomic DNA extracted as described above. DNA purity was measured by NanoDrop[™] 2000c spectrophotometer and only DNA samples with an A260/280 ratio of the absorbance between 1.7 and 1.9 (indicating optimal purity of DNA) were used for further studies.

DNA was fragmented into small pieces [approximately 500 base pairs (bp)] via AluI digestion (37°C for 1 h) and subsequently denatured to produce single strands (95°C for 5 min). Fragmented DNA was hybridised with the CodeSet of 87 genes in the nCounter version 2 Cancer CN Assay Kit (NanoString Technologies, Seattle, WA, USA) for 16 h at 65°C and processed according to the manufacturer's instructions.

The nCounter Digital Analyser counted and tabulated the signals of reporter probes. The data were normalised to the invariant control probes and to positive and negative controls in each hybridisation reaction. Finally, data analysis was performed using nSolver[™] analysis software version 3.0. Copy number was determined by averaging over three probes per region.

Each assay contained six positive dsDNA control probes, eight negative control probes and 54

invariant genomic control probes (INVs) designed for autosomal genomic regions predicted not to contain common CNVs.

COPY NUMBER PLOTS

The read count data obtained from the NanoString® analyses was plotted using the ggPlot2 package version 2.2.1¹⁸ for R version 3.4.0,¹⁹ expanded with the ggthemes package version 3.4.0.²⁰ Data processing was accomplished using the plyr version 1.8.4,²¹ dplyr version 0.7.0,²² reshape2 version 1.4.2²³ and stringr version 1.2.0²⁴ packages. For each sample, the counts were plotted according to their position in the genome and their magnitude. Both axes are linearly scaled and equal for all faceted plots.

FOUNDATIONONE®

Two *TERT* amplified cases (*TERT*^{amp3} and *TERT*^{amp4}) with sufficient remaining tissue were sequenced with deep coverage across all coding exons from 315 cancer-related genes using the commercially available Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA)-approved FoundationOne® assay. Base substitutions, short insertions, deletions, copy number changes, gene fusions and rearrangements were assessed in a manner akin to previous reports.²⁵

Results

Using FISH, we found that 4.6% (five of 109) of the *ALK*+ adenocarcinomas of the lung showed amplification of *TERT* (Table S2). A representative case showing histology, *ALK* rearrangement and *TERT* amplification is depicted in Figure 1.

To validate our findings and further investigate if *TERT* amplifications in *ALK*+ tumours cause genetic

instability, we analysed four *TERT*^{amp}/*ALK*+ cases with sufficient remaining DNA regarding changes in copy number of 87 cancer-relevant genes with NanoString nCounter® technology. As shown in Figure 2 and Tables S2 and S4, our results confirmed *TERT* amplification: patient *TERT*^{amp1} had five, patient *TERT*^{amp3} and *TERT*^{amp5} had four and patient *TERT*^{amp4} had 16 copies of *TERT*. Further, we found that these samples displayed strikingly unstable chromosomal genomic profiles in terms of copy number alterations, harbouring recurrent gains, losses and amplifications of cancer-related genes, such as *CCND1*, *MAP3K5*, *PARK2*, *TP53* and *NKX2-8* (as comprehensively shown in Table S4). In contrast, we have shown in previous studies that *ALK*+/*TP53*^{WT} samples with two copies of *TERT* display mainly chromosomally stable genomic profiles in terms of copy number alterations.⁵

We additionally performed comprehensive mutational analyses using the FoundationOne® platform, an NGS-based device that detects genetic mutations, copy number alterations of 324 genes as well as genetic rearrangements. Sufficient primary tissue was only available in two of the five *TERT*^{amp}/*ALK*+ patients (cases *TERT*^{amp3} and *TERT*^{amp4}). Tables S5 and S6 show the results of the analysis. Both the NanoString® and the FoundationOne® analysis revealed chromosomal instability of the patient's genome, with numerous genes amplified. In contrast, as expected, the number of mutations (two mutations/megabase) was very low [Table S6, TBM (tumour mutation burden)], and we could not detect any other mutation by FoundationOne® or by running our lung-specific NGS panels (Tables S3, S5 and S6).

To evaluate if *TERT* amplified adenocarcinomas displayed a specific histological subtype, we performed a detailed morphological assessment for all *TERT* amplified cases included in the study and all other cases

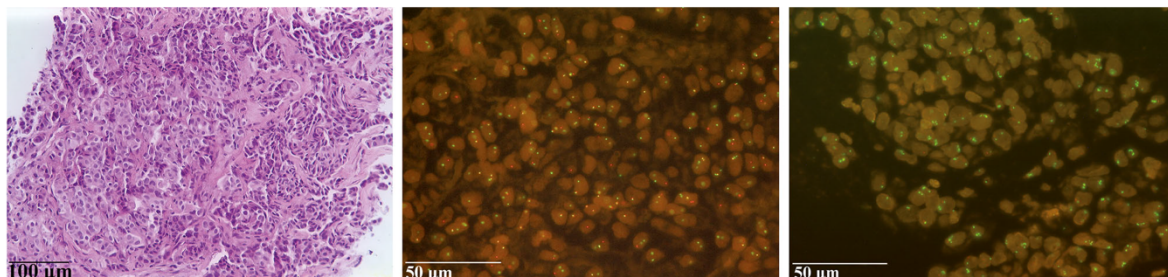


Figure 1. Representative pictures of *ALK*+ lung-adenocarcinoma-tumour tissue (patient case *TERT*^{amp1}). Haematoxylin and eosin (H&E)-stained tumour (left) and fluorescence *in-situ* hybridisation (FISH) analysis (middle and right) showing *ALK* rearrangement (middle) and *TERT* amplification (right).

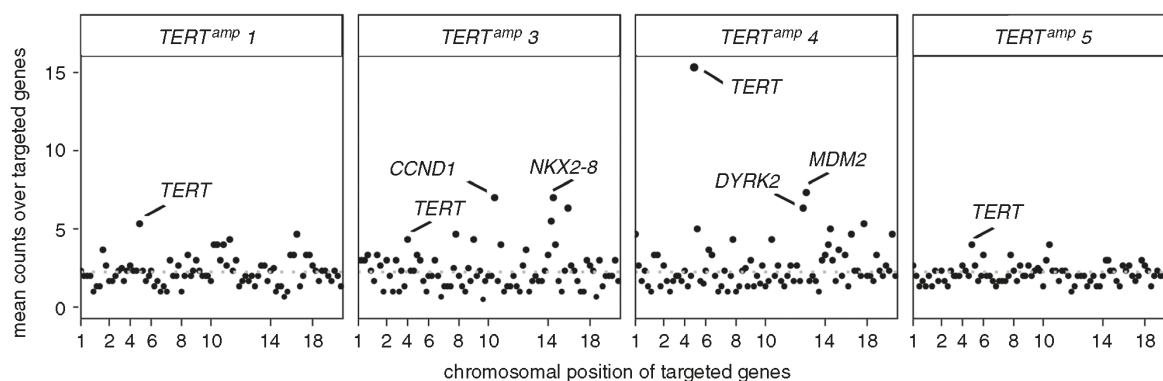


Figure 2. *TERT* amplification is associated with genomic instability in *ALK*⁺ tumours of the lung. Copy number plots of four *ALK*⁺ samples from patients with *TERT* amplification; 200–600 ng DNA were used to determine the copy numbers of 87 genes by means of NanoString nCounter[®] technology. Absolute copy numbers (*y*-axis) for each gene are plotted according to their chromosomal location (*x*-axis).

with well-preserved morphology (data not shown). Two of the *TERT* amplified cases showed papillary features and three displayed a predominant solid growth pattern with significant nuclear atypia allowing the classification as a grade 3 adenocarcinoma of the lung. No other particular morphological features were noted. We further compared the grades between *TERT*^{WT} and *TERT*^{amp} tumours by performing a χ^2 test with our currently available data. The *P*-value of grade comparison was *P* = 0.59844, and consequently *TERT*^{WT} and *TERT*^{amp} did not show significant differences regarding their grades. Of note, the number of *TERT*^{amp} tumours was very low, making comprehensive analyses extremely difficult. Larger cohorts are needed to address this issue in the future.

In order to gain insights into the biological behaviour of *TERT*^{amp}/*ALK*⁺ tumours, we requested the clinical history of the patients. As the number of patients is very limited, no statistical analyses could be performed. However, all patients initially showed a good response to treatment, but progressed under *ALK*-inhibitor treatment within 1 year after the start of therapy. Interestingly, one patient (*TERT*^{amp} 1) had received the following *ALK* inhibitors subsequently: crizotinib, alectinib, ceritinib, alectinib once again, lorlatinib and finally brigatinib, and had progressed under each different treatment option within 1 year of treatment initiation.

Discussion

Drug resistance remains a major cause of therapeutic failure in *ALK*⁺ NSCLC patients. Despite the increasing knowledge and understanding of the molecular

mechanisms driving resistance, why some patients relapse faster than others is not fully understood.

Our group reported that 23.8% of *ALK*⁺ patients harboured a *TP53* mutation prior to therapy and that these patients showed poorer survival as well as unstable genomes.^{4,5} Similar findings were recently reported by Liu *et al.*, showing that *TP53* was mutated in 24% of their analysed *ALK*-positive NSCLC cohort.²⁶ Further, Christopoulos *et al.* reported that co-occurring *TP53* mutations are a strong indicator of poor prognosis in *ALK*⁺ lung cancer patients.²⁷ Interestingly, two cases within our analysed cohort (one with a *TP53* mutation and one with WT *TP53*), both displaying significant genomic instability, harboured additional *TERT* amplifications. Therefore, we analysed an independent cohort of 109 *ALK*⁺ NSCLC cases in order to determine the prevalence of *TERT* amplifications in *ALK* translocated adenocarcinomas of the lung, and examined whether these tumours display particular genomic and morphological features or clinical presentation. We have shown that 4.6% of patients with *ALK*-translocated adenocarcinomas harbour additional *TERT* amplification, have significantly unstable genomes, and show a trend towards poorly differentiated carcinomas as well as comparably fast relapse under treatment.

Amplifications of oncogenes occur frequently in cancer. The *TERT* amplification in human cancer was first identified in 2000.^{17,28} A recent study by Barthel *et al.*, in which telomere length, *TERT* expression and related genomic alterations in a large TCGA cohort including 6835 patients and 31 cancer types were analysed, revealed that *TERT* promoter mutations, and focal *TERT* amplification/rearrangements were associated with enhanced *TERT* expression and

telomerase activity in tumours.²⁹ *TERT*-related alterations have been evaluated as prognostic factors in cancer in several clinical studies. In numerous cancer types, high *TERT* expression was associated with poor patient outcome.^{29–31} It was reported that neuroblastoma, a tumour type that can also be driven by *ALK*-alterations,³² without detectable *TERT* mRNA frequently undergoes spontaneous regression.³³ In contrast, *TERT* expression, gene amplification or rearrangements lead to aggressive disease and shorter survival in patients.^{34–36}

Chiba *et al.* recently showed that *TERT* promoter mutations promote tumorigenesis by causing immortalisation and genomic instability in human embryonic stem cell-derived fibroblasts.³⁷

Mechanistically, it was shown that mutations first up-regulate *TERT* expression to promote immortalisation by stabilising critically short telomeres which, in turn, cause genomic instability in the cells. By analogy to mechanisms in tumours with *TERT* promoter mutations, we assume that the extraordinary genomic instability in the four patients analysed with Nanostring nCounter[®] technology may be explained by telomere dysfunction followed by *TERT* reconstitution caused by the amplification of the corresponding gene. Strikingly, three of four cases (*TERT*^{amp}1, *TERT*^{amp}3 and *TERT*^{amp}4) with *TERT* amplification and enough material for Nanostring[®] analyses had additional mutations/gains or losses in *TP53* and/or *Rb1/MDM2* (Table S4). It should be noted that our lung-specific NGS panel captures only the most frequent, but not all, *TP53* mutations. Therefore, an existing *TP53* mutation cannot be completely excluded in patient *TERT*^{amp}5. It can be hypothesised that early development of mutations of the above-mentioned genes increase the proliferation rate of the tumour cells, leading to telomere shortening and ‘cellular crises’ such as ‘chromothripsis’, as telomere protection cannot be maintained. By amplification of *TERT*, telomeres lengthen and genetically unstable cells become immortal.

As mentioned previously, focal *TERT* amplifications were associated with overexpression in lung adenocarcinoma and other cancer types by several groups.^{29,38}

Several recent studies indicate that the process of chromothripsis, defined by massive genomic rearrangements and complex patterns of alternating copy number changes that are often generated in a single catastrophic event,^{39–42} strongly correlates with more aggressive tumours and poor prognosis in various types of cancer,^{43–46} and can potentially be used as a prognostic or predictive biomarker for patient outcome. However, in our study it remains difficult to define the

impact of *TERT* amplification on treatment response due to limited patient numbers, and future larger studies are necessary to confirm our preliminary findings.

Our study has some major limitations. The total number of patients with concurrent *ALK* translocation and *TERT* amplification is small and tissue for subsequent analyses is limited, as most patients present with advanced stage disease and all therapeutically relevant analyses have to be performed prior to additional experimental analyses. Therefore, we were unable to perform all methodologies on each sample. Further, our lung-specific NGS panels comprise only 15–17 genes, limiting the detection of mutations in cancer-relevant genes. Larger panels would be needed for more comprehensive studies in the future. Also, measurement of the *TERT* expression within these tumours is impossible, as higher amounts of tissue would be needed. Larger studies, including expression analyses and functional data, need to be conducted in order to confirm our preliminary, hypothesis-generating study.

Here, we show that *TERT* amplifications occur in a subset of *ALK*+ cases and that these cases show significant levels of genomic instability. Despite initial response, these tumours seem to be prone to fast development of resistance to *ALK* inhibitors.

Our preliminary data further support our initial hypothesis that *ALK* translocated carcinomas of the lung are a heterogeneous group of tumours,⁵ and we encourage investigators and clinicians to evaluate *ALK*+ adenocarcinomas in the context of their genomic background in order to more clearly understand and predict the course of disease in individual patients.

Acknowledgment

Open access funding enabled and organized by ProjektDEAL. AMS, CA and BH were financially supported by Roche Pharma AG and Kölner Krebsstiftung.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J. Clin.* 2015; **65**: 87–108.
2. Reck M, Popat S, Reinmuth N, De Ruysscher D, Kerr KM, Peters S. Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO

- clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 2014; **25**(Suppl 3); iii27–iii39.
3. Soda M, Choi YL, Enomoto M *et al.* Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007; **448**; 561–566.
 4. Kron A, Alidousty C, Scheffler M *et al.* Impact of TP53 mutation status on systemic treatment outcome in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* 2018; **29**; 2068–2075.
 5. Alidousty C, Baar T, Martelotto LG *et al.* Genetic instability and recurrent MYC amplification in ALK-translocated NSCLC: a central role of TP53 mutations. *J. Pathol.* 2018; **246**; 67–76.
 6. Chumakov PM. Versatile functions of p53 protein in multicellular organisms. *Biochem. Biokhimiia* 2007; **72**; 1399–1421.
 7. Wu RA, Upton HE, Vogan JM, Collins K. Telomerase mechanism of telomere synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 2017; **86**; 439–460.
 8. Liu L, Saldanha SN, Pate MS, Andrews LG, Tollefsbol TO. Epigenetic regulation of human telomerase reverse transcriptase promoter activity during cellular differentiation. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; **41**; 26–37.
 9. Artandi SE, Chang S, Lee SL *et al.* Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature* 2000; **406**; 641–645.
 10. Maciejowski J, de Lange T. Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017; **18**; 175–186.
 11. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. *WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart.* Lyon, France: IARC Press; 2015; 412.
 12. Peifer M, Fernandez-Cuesta L, Sos ML *et al.* Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer. *Nat. Genet.* 2012; **44**; 1104–1110.
 13. Schultheis AM, Bos M, Schmitz K *et al.* Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) amplification is a potential therapeutic target in small-cell lung cancer. *Mod. Pathol.* 2014; **27**; 214–221.
 14. Tsao MS, Hirsch FR, Yatabe Y, eds. *IASCLC Atlas of ALK and ROS1 testing in lung cancer.* North Fort Myers, FL: Editorial Rx Press; 2016; 41–53.
 15. Heydt C, Kostenko A, Merkelbach-Bruse S, Wolf J, Buttner R. ALK evaluation in the world of multiplex testing: network genomic medicine (NGM): the cologne model for implementing personalised oncology. *Ann. Oncol.* 2016; **27**(Suppl 3); iii25–iii34.
 16. Schildhaus HU, Deml KF, Schmitz K *et al.* Chromogenic in situ hybridization is a reliable assay for detection of ALK rearrangements in adenocarcinomas of the lung. *Mod. Pathol.* 2013; **26**; 1468–1477.
 17. Zhang A, Zheng C, Lindvall C *et al.* Frequent amplification of the telomerase reverse transcriptase gene in human tumors. *Cancer Res.* 2000; **60**; 6230–6235.
 18. Wickham H. *Ggplot2: Elegant graphics for data analysis.* New York: Springer-Verlag, 2009.
 19. Team RC. *R: A language and environment for statistical computing.* Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2017.
 20. Arnold JB. *Ggthemes: Extra themes, scales and geoms for ggplot2.* 2017.
 21. Wickham H. The split-apply-combine strategy for data analysis. *J. Stat. Softw.* 2011; **40**: 1–29.
 22. Wickham H. *Dplyr: A grammar of data manipulation.* 2017.
 23. Wickham H. Reshaping data with the reshape package. *J. Stat. Softw.* 2007; **21**: 1–20.
 24. Wickham H. *Stringr: Simple, consistent wrappers for common string operations.* 2017.
 25. Frampton GM, Fichtenholtz A, Otto GA *et al.* Development and validation of a clinical cancer genomic profiling test based on massively parallel DNA sequencing. *Nat. Biotechnol.* 2013; **31**; 1023–1031.
 26. Liu S, Huang T, Liu M *et al.* The genomic characteristics of ALK fusion positive tumors in Chinese NSCLC patients. *Front. Oncol.* 2020; **10**; 726.
 27. Christopoulos P, Endris V, Bozorgmehr F *et al.* EML4-ALK fusion variant v3 is a high-risk feature conferring accelerated metastatic spread, early treatment failure and worse overall survival in ALK+ non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer* 2018; **142**; 2589–2598.
 28. Zhao JQ, Glasspool RM, Hoare SF, Bilsland A, Szatmari I, Keith WN. Activation of telomerase RNA gene promoter activity by NF- κ B, Sp1, and the retinoblastoma protein and repression by Sp3. *Neoplasia* 2000; **2**; 531–539.
 29. Barthel FP, Wei W, Tang M *et al.* Systematic analysis of telomere length and somatic alterations in 31 cancer types. *Nat. Genet.* 2017; **49**; 349–357.
 30. Liu TT, Yuan XT, Xu DW. Cancer-specific telomerase reverse transcriptase (TERT) promoter mutations: biological and clinical implications. *Genes-Basel* 2016; **7**: 38–56.
 31. Ma R, Liu C, Lu M *et al.* The TERT locus genotypes of rs2736100-CC/CA and rs2736098-AA predict shorter survival in renal cell carcinoma. *Urol. Oncol.* 2019; **37**; 301.e301–301.e310.
 32. Carpenter EL, Mosse YP. Targeting ALK in neuroblastoma—pre-clinical and clinical advancements. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2012; **9**; 391–399.
 33. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Matsuura Y, Piatyszek MA, Shay JW. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat. Med.* 1995; **1**; 249–255.
 34. Peifer M, Hartwig F, Roels F *et al.* Telomerase activation by genomic rearrangements in high-risk neuroblastoma. *Nature* 2015; **526**; 700–704.
 35. Ackermann S, Cartolano M, Hero B *et al.* A mechanistic classification of clinical phenotypes in neuroblastoma. *Science* 2018; **362**; 1165–1170.
 36. Valentijn LJ, Koster J, Zwijnenburg DA *et al.* TERT rearrangements are frequent in neuroblastoma and identify aggressive tumors. *Nat. Genet.* 2015; **47**; 1411–1414.
 37. Chiba K, Lorbeer FK, Shain AH *et al.* Mutations in the promoter of the telomerase gene TERT contribute to tumorigenesis by a two-step mechanism. *Science* 2017; **357**; 1416–1420.
 38. Xie H, Liu T, Wang N *et al.* TERT promoter mutations and gene amplification: Promoting TERT expression in Merkel cell carcinoma. *Oncotarget* 2014; **5**; 10048–10057.
 39. Stephens PJ, Greenman CD, Fu B *et al.* Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* 2011; **144**; 27–40.
 40. Leibowitz ML, Zhang CZ, Pellman D. Chromothripsis: a new mechanism for rapid karyotype evolution. *Annu. Rev. Genet.* 2015; **49**; 183–211.
 41. Zhang CZ, Spektor A, Cornils H *et al.* Chromothripsis from DNA damage in micronuclei. *Nature* 2015; **522**; 179–184.
 42. Korbel JO, Campbell PJ. Criteria for inference of chromothripsis in cancer genomes. *Cell* 2013; **152**; 1226–1236.
 43. Notta F, Chan-Seng-Yue M, Lemire M *et al.* A renewed model of pancreatic cancer evolution based on genomic rearrangement patterns. *Nature* 2016; **538**; 378–382.
 44. Hirsch D, Kemmerling R, Davis S *et al.* Chromothripsis and focal copy number alterations determine poor outcome in malignant melanoma. *Cancer Res.* 2013; **73**; 1454–1460.

45. Molenaar JJ, Koster J, Zwijnenburg DA *et al.* Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neurogenesis genes. *Nature* 2012; **483**: 589–593.
46. Smida J, Xu H, Zhang Y *et al.* Genome-wide analysis of somatic copy number alterations and chromosomal breakages in osteosarcoma. *Int. J. Cancer* 2017; **141**: 816–828.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Applied immunohistochemistry.

Table S2. Patient's characteristics.

Table S3. NGS gene panel 3 (left) and 4 (right).

Table S4. Gene copy numbers of four patients analysed by NanoString nCounter® technology.

Table S5. Results of FoundationOne® analysis of patient *TERT*^{amp3}.

Table S6. Results of FoundationOne® analysis of patient *TERT*^{amp4}.

4. Diskussion

Arzneimittelresistenzen während der Behandlung von *ALK*-translozierten NSCLC-Patienten stellen weiterhin einen der Hauptgründe für ein Therapieversagen dar. Unabhängig von dem wachsenden Wissen und Verständnis der molekularen Mechanismen, die zu einer solchen Resistenz führen, ist bis heute immer noch nicht ersichtlich, warum manche Patienten früher einen Krankheitsrückfall erleiden als andere.

Unsere Arbeitsgruppe konnte mit ihrer bisherigen Forschungsarbeit nachweisen, dass 23,8% der *ALK*-translozierten Patienten eine *TP53*-Mutation vor Therapiebeginn aufweisen. Diese Kohorte zeigte nicht nur eine verringerte Überlebenszeit, sondern auch ein deutlich instabileres Genom als die Vergleichskohorte.^{117,118} Dieses Phänomen, dass innerhalb der Untergruppe einer spezifischen Treibermutation Patienten so unterschiedlich auf die gleiche Therapie reagieren, mündet in objektiven Ansprechraten auf eine zielgerichtete Krebstherapie von 50% bis 80%.^{81,119} Ähnliche Ergebnisse konnten kürzlich durch Liu et al. berichtet werden. Ihre Daten zeigten, dass ca. 24% ihrer analysierten *ALK*-translozierten NSCLC-Patienten ebenfalls eine *TP53*-Mutation aufwiesen.¹²⁰ Zusätzlich scheinen zeitgleich auftretende *TP53*-Mutationen, nach einer Publikation von Christopoulos et al. ein starker Indikator für eine schlechte Verlaufsprognose in der beschriebenen Kohorte zu sein.¹²¹

Zwei Fälle (ein Fall mit *TP53*-Mutation, ein Fall mit Wildtyp *TP53*) unserer untersuchten Kohorten zeigten interessanterweise extreme genomische Instabilität sowie eine zusätzliche *TERT*-Amplifikation.

Aus diesem Grund entschlossen wir uns, eine von den vorherigen Untersuchungen unabhängige Kohorte von 109 *ALK*-Translozierten NSCLC Fällen hinsichtlich eines Auftretens von *TERT*-Amplifikationen bei *ALK*-Translokation positiven Adenokarzinomen der Lunge zu untersuchen. Ziel war es außerdem zu determinieren, ob bei dieser Konstellation besondere genomische und morphologische Eigenschaft oder besondere klinische Verläufe auftreten.

Als Resultat unserer Arbeit konnten wir nachweisen, dass 4,6% der *ALK*-translozierten Patienten mit Adenokarzinomen eine zusätzliche *TERT*-Amplifikation aufweisen, signifikante genomische Instabilität besitzen, eine gewisse Tendenz hin zu schlechter Differenzierung erkennen lassen sowie eine vergleichsweise hohe Rückfallrate während der Therapie besitzen.

Onkogen-Amplifikationen treten häufig bei verschiedenen Arten von malignen Neoplasien auf. Die Erstbeschreibung der *TERT*-Amplifikation im Rahmen von menschlichen Krebserkrankungen erfolgte im Jahr 2000, insbesondere im Rahmen von Tumorerkrankungen durch Lungen-, Ovarial- und Brustkrebs sowie durch Neuroblastome.^{122,123} Barthel et. al. analysierten in einer neuerlichen Studie mit großer TCGA Kohorte (6835 Patienten verteilt auf 31 verschiedene Krebsarten) jeweils die Telomerlänge, *TERT*-Expression und auf das *TERT*-Gen bezogene genomische Alterationen. Dabei konnte gezeigt werden, dass *TERT*-Promotormutationen und fokale *TERT*-Amplifikationen bzw. Rearrangements mit einer verstärkten *TERT*-Expression und Telomeraseaktivität in den betroffenen Tumoren verbunden sind.¹¹² Alterationen des *TERT*-Gens wurden als prognostische Faktoren bei Krebserkrankungen bereits in einigen klinischen Studien identifiziert. Diese zeigten unter anderem, dass in zahlreichen unterschiedlichen Krebsentitäten eine erhöhte *TERT*-Expression mit einem deutlich schlechteren Krankheitsverlauf und einer deutlich reduzierten Prognose für den Patienten assoziiert ist.^{111,112,124} Außerdem konnte insbesondere bei Neuroblastomen, einer malignen Erkrankung die ebenfalls häufig von Veränderungen des *ALK*-Gens abhängig ist, eine häufige spontane Regression der Krankheit festgestellt werden, wenn keine spezifische *TERT*-mRNA nachgewiesen wurde.^{125,126} Dem gegenüber stehen maligne Entartungen, die Veränderungen des *TERT*-Gens in Form von übermäßiger *TERT*-Expression, *TERT*-Genamplifikation oder Rearrangements besitzen. Diese spezifischen Veränderungen im Genom der Patienten scheinen zu aggressiveren Krankheitsverläufen mit einhergehender verkürzter Überlebenszeit zu prädestinieren.¹¹⁴⁻¹¹⁶

Chiba et. al. demonstrierten mit ihrer Arbeit, dass insbesondere *TERT*-Promotormutationen ein möglicher Auslöser der malignen Transformation sind: Im in-vitro Modell mit aus menschlichen Stammzellen gewonnenen Fibroblasten zeigte sich hier eine deutliche genomische Instabilität und Immortalisierung der Zellen als Resultat der *TERT*-Promotormutationen.¹²⁷

Unsterblichkeit der betroffenen Zellen wird vermutlich durch eine zunächst stattfindende Überregulation bzw. Überexpression von *TERT* erreicht. Diese hat zum Ziel die durch stark erhöhte Zellteilungsrate verkürzte Telomere wieder zu stabilisieren. Letztendlich mündet dieser Prozess dann in einer genomischen Instabilität der betroffenen Zellen, da trotz hoher Mutationslast eine Apoptose

verhindert wird. Die genomische Instabilität, welche bei vier unserer untersuchten Patienten per Nanostring nCounter® Technologie nachgewiesen wurde, ist vermutlich in Analogie zum bereits beschriebenen Ablauf bei *TERT*-Promotormutationen zu erklären: Telomerdysfunktion führt zur Amplifikation des *TERT*-Gens mit der daraus resultierenden Wiederherstellung der Telomeraseaktivität und der Verlängerung der kritisch verkürzten Telomere. Dieser Prozess bewirkt dann möglicherweise eine Immortalisierung der betroffenen Zellen. Auffallend ist, dass drei der vier genannten Fälle mit *TERT*-Amplifikation (*TERT*^{amp1}, *TERT*^{amp3}, *TERT*^{amp4}), die genügend Zellmaterial für ergänzende Untersuchungen per Nanostring® bereitstellten, zusätzliche gain- und/oder loss-of-function Mutationen in den Genen *TP53* und/oder Retinoblastom-Protein1 (*Rb1*) sowie im mouse-double-minute-2-homlog Gen (*MDM2*) aufwiesen. Hierbei ist jedoch anzumerken, dass durch unser lungenspezifisches NGS-panel nicht alle *TP53*-Mutationen detektiert werden, sondern dieses nur auf die am häufigsten auftretenden Mutationen beschränkt ist. Folglich kann im Fall *TERT*^{amp5} eine unentdeckte *TP53*-Mutation nicht völlig ausgeschlossen werden, weil diese nicht durch unser spezifisches NGS-panel abgedeckt wurde. Da ab einem gewissen Grad der Telomerverkürzung deren zellprotektive Mechanismen nicht mehr funktionieren, lässt sich vermuten, dass ein frühes Entstehen der entdeckten zusätzlichen Mutationen in einer gesteigerten Zellteilungsrate der Tumorzellen resultiert, welche dann wiederum zu einer weiteren Verkürzung der Telomere und beispielsweise zu einer Zellkrise in Form einer Chromothripsis führen kann. Chromothripsis, ein Prozess bei dem in einem singulären Mutationsereignis massive genetische Rearrangements mit der Umlagerung ganzer Chromosomenabschnitte und variierenden Kopieanzahlveränderungen entstehen, korreliert laut der aktuellen Studienlage ebenfalls mit eher aggressiverem Tumorverhalten und einer schlechteren Prognose in diversen Tumorarten und kann daher als prädiktiver Biomarker für deren Prognose verwendet werden.¹²⁸⁻¹³⁵

Durch *TERT*-Amplifikation können die kritisch verkürzten Telomere wieder verlängert werden und die betroffenen Zellen trotz größter genetischer Instabilität einen Zustand der theoretischen Unsterblichkeit erreichen.

Wie bereits erwähnt sind fokale *TERT*-Amplifikationen mit der damit assoziierten Überexpression in Adenokarzinomen der Lunge sowie in weiteren Krebsarten durch einige Arbeitsgruppen belegt worden.^{112,136}

Trotzdem begrenzt die limitierte Gesamtfallzahl unserer Forschungsarbeit eine gesicherte Aussage über den Einfluss einer *TERT*-Amplifikation auf die Ansprechraten der verschiedenen zielgerichteten Antikörpertherapien. Es konnte durch unsere Forschungsarbeit auch nicht bewiesen werden, dass bei den untersuchten Patienten tatsächlich eine Chromothripsis stattgefunden hat, dies bleibt bis dato nur zu vermuten. Aus diesem Grund wären weitere, insbesondere mit einer deutlich größeren Patientenkohorte designte Studien nötig, um unsere ersten Entdeckungen zu untermauern und ggf. zu bestätigen.

Des Weiteren hat unsere Studie einige erwähnenswerte Limitationen: Zunächst die geringe Fallzahl (5 von 109) der tatsächlich nachgewiesenen, zeitgleich auftretenden *ALK*-Translokation kombiniert mit einer *TERT*-Amplifikation. Einschränkend ist zusätzlich, dass Gewebeproben aufgrund des fortgeschrittenen Krankheitsstadiums zunächst für therapierelevante Untersuchungen genutzt wurden und daraus resultierend für experimentelle bzw. Studienanalysen nur noch im begrenzten Maß zur Verfügung standen. So konnten weiterführend nur 98 der 109 Fälle wegen des Mangels an Gewebematerial per NGS sequenziert werden und im Anschluss daran an 4 von 5 *ALK*+/*TERT*^{amp} eine Analyse auf Copy-Number-Alterationen via NanoString nCounter Technologie durchgeführt werden. Anschließend war nach den bereits abgeschlossenen und materialaufwendigen Untersuchungen nur noch in zwei *ALK*+/*TERT*^{amp} Fällen (*TERT*^{amp3}, *TERT*^{amp4}) suffizientes Gewebematerial erhalten, um exemplarisch tiefgehende Exonanalysen auf krebsrelevante Gene per FoundationOne®-Panel abzuschließen. Leider war es außerdem nicht möglich die tatsächliche *TERT*-Expression zu validieren, da hierfür zusätzlich sehr große Mengen an Tumorgewebe benötigt worden wären. Zu erwähnen sei auch, dass es sich bei dem gewonnenen Tumormaterial nicht um einheitliche Proben mit dem gleichen Ausgangsgewebe handelt. So war es nur in den Fällen *TERT*^{amp2}, *TERT*^{amp4} und *TERT*^{amp5} möglich Proben aus dem eigentlichen Primärtumor zu gewinnen. Beim Fall *TERT*^{amp1} handelte es sich um Proben aus der Biopsie einer Lebermetastase und bei *TERT*^{amp3} um eine Biopsie aus dem mit Crizotinib vorbehandelten Primärtumor.

Resultierend konnten insbesondere durch den Mangel an ausreichendem Tumormaterial leider nicht alle der von uns gewünschten Methoden an allen Fällen der Studienkohorte angewandt werden. Erschwerend dazu waren die gewonnenen

Proben nicht komplett identisch in Bezug auf ihren Ursprungsort sowie den Status der Vorbehandlung mit einem ALK-spezifischen TKI.

Weiter sei einschränkend erwähnt, dass unser verwendetes Lungenkarzinom spezifisches NGS-Panel nur 15-17 der karzinomrelevanten Gene abdeckt. Um in Zukunft weitere krebserlevante Gene mit untersuchen zu können, werden größere NGS-Panels benötigt, um dahingehend aussagekräftigere Forschungsergebnisse zu produzieren.

Schlussfolgernd wären also größere Studien, die insbesondere Expressionsanalysen sowie funktionelle Daten beinhalten, wünschenswert, um die durch uns erarbeiteten vorläufigen Daten und Hypothesen zu konsolidieren.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass *TERT*-Amplifikationen in der Subgruppe der *ALK*-positiven Adenokarzinomen der Lunge auftreten und dass diese Karzinome mit einer signifikanten genomischen Instabilität verbunden sind. *ALK*-translozierte NSCLC sprechen initial sehr gut auf eine zielgerichtete Therapie mit *ALK*-Inhibitoren an, jedoch besteht in dieser Subgruppe der Lungenkarzinome die Tendenz, im Therapieverlauf sehr schnell Resistenzmechanismen gegen die verwendeten Pharmazeutika zu entwickeln. Es wird durch unsere Daten jedoch weitergehend untermauert, dass es sich bei der Subgruppe der *ALK*-translozierten Lungenkarzinome anders als anfänglich angenommen um eine äußerst heterogene Tumorgruppe handelt.¹¹⁷

Deswegen sollten sich gerade im klinischen Bereich arbeitende Ärzte bewusst sein, dass speziell bei ungewöhnlichen Therapieverläufen *ALK*-positive NSCLC vornehmlich auf Basis ihrer genomischen Individualität zu betrachten sind. Diese Therapie sollte möglichst das Ziel haben, den Krankheitsverlauf bei jedem Betroffenen personalisiert zu bestimmen und im besten Fall gezielt zu behandeln.

Teile dieser Diskussion sind bereits publiziert in: Alidousty C, Duerbaum N, Wagener-Ryczek S, et al. Prevalence and potential biological role of *TERT* amplifications in *ALK* translocated adenocarcinoma of the lung. *Histopathology* 2021; **78**(4): 578-85.

5. Literaturverzeichnis

1. Jordan EJ, Kim HR, Arcila ME, et al. Prospective Comprehensive Molecular Characterization of Lung Adenocarcinomas for Efficient Patient Matching to Approved and Emerging Therapies. *Cancer Discov* 2017; **7**(6): 596-609.
2. Ettinger DS, Wood DE, Aisner DL, et al. Non-Small Cell Lung Cancer, Version 5.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 2017; **15**(4): 504-35.
3. Frampton GM, Ali SM, Rosenzweig M, et al. Activation of MET via diverse exon 14 splicing alterations occurs in multiple tumor types and confers clinical sensitivity to MET inhibitors. *Cancer Discov* 2015; **5**(8): 850-9.
4. Sánchez-Herrero E, Provencio M, Romero A. Clinical utility of liquid biopsy for the diagnosis and monitoring of EML4-ALK NSCLC patients. *Advances in Laboratory Medicine / Avances en Medicina de Laboratorio* 2020; **1**(1).
5. Santos GdC, Shepherd FA, Tsao MS. EGFR Mutations and Lung Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 2011; **6**(1): 49-69.
6. Huang H. Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) Receptor Tyrosine Kinase: A Catalytic Receptor with Many Faces. *Int J Mol Sci* 2018; **19**(11).
7. (GEKID) RK-ludGdeKiDeV. Krebs in Deutschland 2015/2016. 2019; **12**.
8. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; **65**(2): 87-108.
9. (RKI) RKI. Robert-Koch-Institut Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Robert Koch Institut; 2016.
10. Kuznetsov L, Mielck A. [Regional concentration of social disadvantage and of risks for lung cancer and colon cancer: systematic review and recommendations for research]. *Gesundheitswesen* 2012; **74**(6): 42-51.
11. Van der Heyden JHA, Schaap MM, Kunst AE, et al. Socioeconomic inequalities in lung cancer mortality in 16 European populations. *Lung Cancer* 2009; **63**(3): 322-30.
12. Cancer IAFRo. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Tobacco Smoke and Involuntary Smoking: World Health Organisation; 2004.
13. Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest* 2003; **123**(1): Suppl.
14. Malhotra J, Malvezzi M, Negri E, La Vecchia C, Boffetta P. Risk factors for lung cancer worldwide. *Eur Respir J* 2016; **48**(3): 889-902.
15. W. D. T, Brambilla E, A. P. B, Marx A, A. G. N. WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. 2015.
16. Mairinger T. [Histology, cytology and molecular diagnostics of lung cancer]. *Pathologe* 2019; **40**(6): 649-61.
17. Planchard D, Popat S, Kerr K, et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2018; **29**(Suppl): 4.
18. Rekhtman N, Ang DC, Sima CS, Travis WD, Moreira AL. Immunohistochemical algorithm for differentiation of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma based on large series of whole-tissue sections with validation in small specimens. *Mod Pathol* 2011; **24**(10): 1348-59.
19. Kim MJ, Shin HC, Shin KC, Ro JY. Best immunohistochemical panel in distinguishing adenocarcinoma from squamous cell carcinoma of lung: tissue microarray assay in resected lung cancer specimens. *Ann Diagn Pathol* 2013; **17**(1): 85-90.
20. Loo PS, Thomas SC, Nicolson MC, Fyfe MN, Kerr KM. Subtyping of undifferentiated non-small cell carcinomas in bronchial biopsy specimens. *J Thorac Oncol* 2010; **5**(4): 442-7.
21. Weinstein IB, Joe A. Oncogene Addiction. *Cancer Research* 2008; **68**(9): 3077-80.
22. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004; **350**(21): 2129-39.
23. da Cunha Santos G, Shepherd FA, Tsao MS. EGFR Mutations and Lung Cancer. *Annu Rev Pathol: Mech Dis* 2011; **6**(1): 49-69.
24. Project TCG, Medicine NG. A Genomics-Based Classification of Human Lung Tumors. *Sci Transl Med* 2013; **5**(209): 209ra153-209ra153.
25. Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TPJ, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* 2003; **284**(1): 31-53.
26. Chapman AM, Sun KY, Ruestow P, Cowan DM, Madl AK. Lung cancer mutation profile of EGFR, ALK, and KRAS: Meta-analysis and comparison of never and ever smokers. *Lung Cancer* 2016; **102**: 122-34.

27. Slebos R, Hruban R, Dalesio O. Relationship between K-ras oncogene activation and smoking in adenocarcinoma of the human lung. *J Natl Cancer Inst* 1991; **83**: 1024-7.
28. Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC, et al. Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J Clin Oncol* 2005; **23**(25): 5900-9.
29. Skoulidis F, Li BT, Dy GK, et al. Sotorasib for Lung Cancers with KRAS p.G12C Mutation. *N Engl J Med* 2021; **384**(25): 2371-81.
30. Rosell R, Karachaliou N. BRAFV600E and BRAF-inactivating mutations in NSCLC. *Lancet Oncol* 2017; **18**(10): 1286-7.
31. Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, et al. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nat Med* 2012; **18**(3): 375-7.
32. Bronte G, Ulivi P, Verlicchi A, Cravero P, Delmonte A, Crinò L. Targeting RET-rearranged non-small-cell lung cancer: future prospects. *LCTT* 2019; **10**: 27-36.
33. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med* 2012; **18**(3): 378-81.
34. Li F, Feng Y, Fang R, et al. Identification of RET gene fusion by exon array analyses in "pan-negative" lung cancer from never smokers. *Cell Res* 2012; **22**(5): 928-31.
35. Michels S, Scheel AH, Scheffler M, et al. Clinicopathological Characteristics of RET Rearranged Lung Cancer in European Patients. *J Thorac Oncol* 2016; **11**(1): 122-7.
36. Wang R, Hu H, Pan Y, et al. RET fusions define a unique molecular and clinicopathologic subtype of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2012; **30**(35): 4352-9.
37. Bergethon K, Shaw AT, Ignatius Ou S-H, et al. ROS1 Rearrangements Define a Unique Molecular Class of Lung Cancers. *J Clin Oncol* 2012; **30**(8): 863-70.
38. Shaw AT, Ou S-HI, Bang Y-J, et al. Crizotinib in ROS1-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2014; **371**(21): 1963-71.
39. Postmus PE, Kerr KM, Oudkerk M, et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol* 2017; **28**: iv1-iv21.
40. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF). Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms, Langversion 1.0. 2018.
41. Amin MB, Greene FL, Edge SB, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin* 2017; **67**(2): 93-9.
42. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF). Palliativmedizin für Patienten mit einer nicht-heilbaren Krebserkrankung, Langversion 2.2. 2020.
43. Temel JS, Greer JA, Muzikansky A, et al. Early Palliative Care for Patients with Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2010; **363**(8): 733-42.
44. Zimmermann C, Swami N, Krzyzanowska M, et al. Early palliative care for patients with advanced cancer: a cluster-randomised controlled trial. *Lancet* 2014; **383**(9930): 1721-30.
45. Weickhardt AJ, Aisner DL, Franklin WA, Varella-Garcia M, Doebele RC, Camidge DR. Diagnostic assays for identification of anaplastic lymphoma kinase-positive non-small cell lung cancer. *Cancer* 2013; **119**(8): 1467-77.
46. Mok TS, Wu Y-L, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009; **361**(10): 947-57.
47. Kathryn C. Arbour MD. Systemic Therapy for Locally Advanced and Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: A Review. *JAMA* 2019; **322**(8): 764-74.
48. Planchard D, Smit EF, Groen HJM, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAF(V600E)-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2017; **18**(10): 1307-16.
49. Planchard D, Besse B, Groen HJM, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAFV600E-mutant metastatic non-small cell lung cancer: an open-label, multicentre phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2016; **17**(7): 984-93.
50. Mazières J, Zalcman G, Crinò L, et al. Crizotinib Therapy for Advanced Lung Adenocarcinoma and a ROS1 Rearrangement: Results From the EUROS1 Cohort. *J Clin Oncol* 2015; **33**(9): 992-9.
51. Drilon A, Wang L, Hasanovic A, et al. Response to Cabozantinib in patients with RET fusion-positive lung adenocarcinomas. *Cancer Discov* 2013; **3**(6): 630-5.
52. Gautschi O, Zander T, Keller FA, et al. A patient with lung adenocarcinoma and RET fusion treated with vandetanib. *J Thorac Oncol* 2013; **8**(5): e43-4.

53. Drlon A, Oxnard GR, Tan DSW, et al. Efficacy of Selpercatinib in RET Fusion-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2020; **383**(9): 813-24.
54. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 1994; **263**(5151): 1281-4.
55. Iwahara T, Fujimoto J, Wen D, et al. Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene* 1997; **14**(4): 439-49.
56. Reshetnyak AV, Murray PB, Shi X, et al. Augmentor α and β (FAM150) are ligands of the receptor tyrosine kinases ALK and LTK: Hierarchy and specificity of ligand-receptor interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; **112**(52): 15862-7.
57. Hallberg B, Palmer RH. Mechanistic insight into ALK receptor tyrosine kinase in human cancer biology. *Nat Rev Cancer* 2013; **13**(10): 685-700.
58. Vernersson E, Khoo NKS, Henriksson ML, Roos G, Palmer RH, Hallberg B. Characterization of the expression of the ALK receptor tyrosine kinase in mice. *Gene Expr Patterns* 2006; **6**(5): 448-61.
59. Du X, Shao Y, Qin HF, Tai YH, Gao HJ. ALK-rearrangement in non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Thorac Cancer* 2018; **9**(4): 423-30.
60. Ou S-HI, Zhu VW, Nagasaka M. Catalog of 5' Fusion Partners in ALK-positive NSCLC Circa 2020. *JTO Clinical and Research Reports* 2020; **1**(1): 100015.
61. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer* 2007; **7**(4): 233-45.
62. Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007; **448**(7153): 561-6.
63. Shaw AT, Engelman JA. ALK in lung cancer: past, present, and future. *J Clin Oncol* 2013; **31**(8): 1105-11.
64. Li T, Maus MK, Desai SJ, et al. Large-scale screening and molecular characterization of EML4-ALK fusion variants in archival non-small-cell lung cancer tumor specimens using quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Thorac Oncol* 2014; **9**(1): 18-25.
65. Lin JJ, Zhu VW, Yoda S, et al. Impact of EML4-ALK Variant on Resistance Mechanisms and Clinical Outcomes in ALK-Positive Lung Cancer. *J Clin Oncol* 2018; **36**(12): 1199-206.
66. Pulford K, Morris SW, Turturro F. Anaplastic lymphoma kinase proteins in growth control and cancer. *J Cell Physiol* 2004; **199**(3): 330-58.
67. Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, et al. KIF5B-ALK, a novel fusion oncokine identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009; **15**(9): 3143-9.
68. Togashi Y, Soda M, Sakata S, et al. KLC1-ALK: a novel fusion in lung cancer identified using a formalin-fixed paraffin-embedded tissue only. *PLoS One* 2012; **7**(2): e31323.
69. Choi YL, Lira ME, Hong M, et al. A novel fusion of TPR and ALK in lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2014; **9**(4): 563-6.
70. Shan L, Jiang P, Xu F, et al. BIRC6-ALK, a Novel Fusion Gene in ALK Break-Apart FISH-Negative Lung Adenocarcinoma, Responds to Crizotinib. *J Thorac Oncol* 2015; **10**(6): e37-9.
71. Kwak E, Bang Y, Camidge D. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2010; **363**: 1693-703.
72. Childress MA, Himmelberg SM, Chen H, Deng W, Davies MA, Lovly CM. ALK Fusion Partners Impact Response to ALK Inhibition: Differential Effects on Sensitivity, Cellular Phenotypes, and Biochemical Properties. *Molecular Cancer Research* 2018; **16**(11): 1724-36.
73. Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, et al. Clinical Features and Outcome of Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Who Harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol* 2009; **27**(26): 4247-53.
74. Wong DW-S, Leung EL-H, So KK-T, et al. The EML4-ALK fusion gene is involved in various histologic types of lung cancers from nonsmokers with wild-type EGFR and KRAS. *Cancer* 2009; **115**(8): 1723-33.
75. Kim H, Chung JH. Overview of clinicopathologic features of ALK-rearranged lung adenocarcinoma and current diagnostic testing for ALK rearrangement. *Transl Lung Cancer Res* 2015; **4**(2): 149-55.
76. Zhou C, Kim SW, Reungwetwattana T, et al. Alectinib versus crizotinib in untreated Asian patients with anaplastic lymphoma kinase-positive non-small-cell lung cancer (ALESIA): a randomised phase 3 study. *Lancet Respir Med* 2019; **7**(5): 437-46.
77. Peters S, Camidge DR, Shaw AT, et al. Alectinib versus Crizotinib in Untreated ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2017; **377**(9): 829-38.
78. Solomon BJ, Mok T, Kim D-W, et al. First-Line Crizotinib versus Chemotherapy in ALK-Positive Lung Cancer. *N Engl J Med* 2014; **371**(23): 2167-77.

79. Soria JC, Tan DSW, Chiari R, et al. First-line ceritinib versus platinum-based chemotherapy in advanced ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (ASCEND-4): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* 2017; **389**(10072): 917-29.
80. Gainor JF, Shaw AT. J-ALEX: alectinib versus crizotinib in ALK-positive lung cancer. *Lancet* 2017; **390**(10089): 3–4.
81. Camidge DR, Kim HR, Ahn MJ, et al. Brigatinib versus Crizotinib in ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2018; **379**(21): 2027-39.
82. Solomon BJ, Besse B, Bauer TM, et al. Lorlatinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: results from a global phase 2 study. *Lancet Oncol* 2018; **19**(12): 1654-67.
83. Shaw AT, Bauer TM, de Marinis F, et al. First-Line Lorlatinib or Crizotinib in Advanced ALK-Positive Lung Cancer. *N Engl J Med* 2020; **383**(21): 2018-29.
84. Shaw AT, Kim D-W, Nakagawa K, et al. Crizotinib versus Chemotherapy in Advanced ALK-Positive Lung Cancer. *N Engl J Med* 2013; **368**(25): 2385–94.
85. Shaw AT, Kim TM, Crinò L, et al. Ceritinib versus chemotherapy in patients with ALK-rearranged non-small-cell lung cancer previously given chemotherapy and crizotinib (ASCEND-5): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2017; **18**(7): 874-86.
86. Ou S-HI, Ahn JS, De Petris L, et al. Alectinib in Crizotinib-Refractory ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer: A Phase II Global Study. *J Clin Oncol* 2015; **34**(7): 661–8.
87. Shaw AT, Engelman JA. Ceritinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2014; **370**(26): 2537-9.
88. Horn L, Wu Y-L, Reck M, et al. eXalt3: Phase 3 randomized study comparing ensartinib to crizotinib in anaplastic lymphoma kinase (ALK) positive non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. *J Clin Oncol* 2018; **36**(15_suppl): 1–TPS9115.
89. Drilon A, Siena S, Ou SI, et al. Safety and Antitumor Activity of the Multitargeted Pan-TRK, ROS1, and ALK Inhibitor Entrectinib: Combined Results from Two Phase I Trials (ALKA-372-001 and STARTRK-1). *Cancer Discov* 2017; **7**(4): 400-9.
90. Drilon A, Ou SI, Cho BC, et al. Repotrectinib (TPX-0005) Is a Next-Generation ROS1/TRK/ALK Inhibitor That Potently Inhibits ROS1/TRK/ALK Solvent- Front Mutations. *Cancer Discov* 2018; **8**(10): 1227-36.
91. Lin JJ, Shaw AT. Resisting Resistance: Targeted Therapies in Lung Cancer. *Trends Cancer* 2016; **2**(7): 350-64.
92. Lin JJ, Riely GJ, Shaw AT. Targeting ALK: Precision Medicine Takes on Drug Resistance. *Cancer Discov* 2017; **7**(2): 137-55.
93. Doebele RC, Pilling AB, Aisner DL, et al. Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2012; **18**(5): 1472-82.
94. Katayama R, Shaw AT, Khan TM, et al. Mechanisms of Acquired Crizotinib Resistance in ALK-Rearranged Lung Cancers. *Sci Transl Med* 2012; **4**(120): 120ra17–ra17.
95. Choi YL, Soda M, Yamashita Y, et al. EML4-ALK Mutations in Lung Cancer That Confer Resistance to ALK Inhibitors. *N Engl J Med* 2010; **363**(18): 1734–9.
96. Gainor JF, Dardaei L, Yoda S, et al. Molecular Mechanisms of Resistance to First- and Second-Generation ALK Inhibitors in ALK-Rearranged Lung Cancer. *Cancer Discov* 2016; **6**(10): 1118-33.
97. Gouji T, Takashi S, Mitsuhiro T, Yukito I. Crizotinib can overcome acquired resistance to CH5424802: is amplification of the MET gene a key factor? *J Thorac Oncol* 2014; **9**(3): e27-8.
98. Miyawaki M, Yasuda H, Tani T, et al. Overcoming EGFR Bypass Signal-Induced Acquired Resistance to ALK Tyrosine Kinase Inhibitors in ALK-Translocated Lung Cancer. *Molecular Cancer Research* 2017; **15**(1): 106-14.
99. Sasaki T, Koivunen J, Ogino A, et al. A novel ALK secondary mutation and EGFR signaling cause resistance to ALK kinase inhibitors. *Cancer Res* 2011; **71**(18): 6051-60.
100. Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med* 2011; **3**(75): 75ra26.
101. Kim HR, Kim WS, Choi YJ, Choi CM, Rho JK, Lee JC. Epithelial-mesenchymal transition leads to crizotinib resistance in H2228 lung cancer cells with EML4-ALK translocation. *Mol Oncol* 2013; **7**(6): 1093-102.
102. Katayama R, Sakashita T, Yanagitani N, et al. P-glycoprotein Mediates Ceritinib Resistance in Anaplastic Lymphoma Kinase-rearranged Non-small Cell Lung Cancer. *EBioMedicine* 2016; **3**: 54-66.
103. Crystal AS, Shaw AT, Sequist LV, et al. Patient-derived models of acquired resistance can identify effective drug combinations for cancer. *Science* 2014; **346**(6216): 1480-6.

104. Fernandez-Garcia I, Ortiz-de-Solorzano C, Montuenga LM. Telomeres and telomerase in lung cancer. *J Thorac Oncol* 2008; **3**(10): 1085-8.
105. Wu RA, Upton HE, Vogan JM, Collins K. Telomerase Mechanism of Telomere Synthesis. *Annu Rev Biochem* 2017; **86**: 439-60.
106. Cong YS, Wen J, Bacchetti S. The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum Mol Genet* 1999; **8**(1): 137-42.
107. Yuan X, Larsson C, Xu D. Mechanisms underlying the activation of TERT transcription and telomerase activity in human cancer: old actors and new players. *Oncogene* 2019; **38**(34): 6172-83.
108. Liu L, Saldanha SN, Pate MS, Andrews LG, Tollefsbol TO. Epigenetic regulation of human telomerase reverse transcriptase promoter activity during cellular differentiation. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; **41**(1): 26–37.
109. Maciejowski J, de Lange T. Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017; **18**(3): 175-86.
110. Artandi SE, Chang S, Lee SL, et al. Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature* 2000; **406**(6796): 641-5.
111. Liu T, Yuan X, Xu D. Cancer-Specific Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) Promoter Mutations: Biological and Clinical Implications. *Genes (Basel)* 2016; **7**(7).
112. Barthel FP, Wei W, Tang M, et al. Systematic analysis of telomere length and somatic alterations in 31 cancer types. *Nat Genet* 2017; **49**(3): 349-57.
113. Zhang A, Zheng C, Hou M, et al. Deletion of the telomerase reverse transcriptase gene and haploinsufficiency of telomere maintenance in Cri du chat syndrome. *Am J Hum Genet* 2003; **72**(4): 940-8.
114. Peifer M, Hartwig F, Roels F, et al. Telomerase activation by genomic rearrangements in high-risk neuroblastoma. *Nature* 2015; **526**(7575): 700-4.
115. Valentijn LJ, Koster J, Zwijnenburg DA, et al. TERT rearrangements are frequent in neuroblastoma and identify aggressive tumors. *Nat Genet* 2015; **47**(12): 1411-4.
116. Ackermann S, Cartolano M, Hero B, et al. A mechanistic classification of clinical phenotypes in neuroblastoma. *Science* 2018; **362**(6419): 1165-70.
117. Alidousty C, Baar T, Martelotto LG, et al. Genetic instability and recurrent MYC amplification in ALK-translocated NSCLC: a central role of TP53 mutations. *J Pathol* 2018; **246**(1): 67-76.
118. Kron A, Alidousty C, Scheffler M, et al. Impact of TP53 mutation status on systemic treatment outcome in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2018; **29**(10): 2068-75.
119. Skoulidis F, Heymach JV. Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer* 2019; **19**(9): 495-509.
120. Liu S, Huang T, Liu M, et al. The Genomic Characteristics of ALK Fusion Positive Tumors in Chinese NSCLC Patients. *Front Oncol* 2020; **10**: 726.
121. Christopoulos P, Endris V, Bozorgmehr F, et al. EML4-ALK fusion variant V3 is a high-risk feature conferring accelerated metastatic spread, early treatment failure and worse overall survival in ALK(+) non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 2018; **142**(12): 2589-98.
122. Zhao JQ, Glasspool RM, Hoare SF, Bilsland A, Szatmari I, Keith WN. Activation of telomerase rna gene promoter activity by NF-Y, Sp1, and the retinoblastoma protein and repression by Sp3. *Neoplasia* 2000; **2**(6): 531-9.
123. Zhang A, Zheng C, Lindvall C, et al. Frequent amplification of the telomerase reverse transcriptase gene in human tumors. *Cancer Res* 2000; **60**(22): 6230-5.
124. Ma R, Liu C, Lu M, et al. The TERT locus genotypes of rs2736100-CC/CA and rs2736098-AA predict shorter survival in renal cell carcinoma. *Urol Oncol* 2019; **37**(5): 301.e1-.e10.
125. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Matsuura Y, Piatyszek MA, Shay JW. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat Med* 1995; **1**(3): 249–55.
126. Carpenter EL, Mossé YP. Targeting ALK in neuroblastoma--preclinical and clinical advancements. *Nat Rev Clin Oncol* 2012; **9**(7): 391-9.
127. Chiba K, Lorbeer FK, Shain AH, et al. Mutations in the promoter of the telomerase gene TERT contribute to tumorigenesis by a two-step mechanism. *Science* 2017; **357**(6358): 1416-20.
128. Smida J, Xu H, Zhang Y, et al. Genome-wide analysis of somatic copy number alterations and chromosomal breakages in osteosarcoma. *Int J Cancer* 2017; **141**(4): 816-28.
129. Molenaar JJ, Koster J, Zwijnenburg DA, et al. Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neuritogenesis genes. *Nature* 2012; **483**(7391): 589-93.
130. Hirsch D, Kemmerling R, Davis S, et al. Chromothripsis and focal copy number alterations determine poor outcome in malignant melanoma. *Cancer Res* 2013; **73**(5): 1454-60.

131. Notta F, Chan-Seng-Yue M, Lemire M, et al. A renewed model of pancreatic cancer evolution based on genomic rearrangement patterns. *Nature* 2016; **538**(7625): 378-82.
132. Korbelt JO, Campbell PJ. Criteria for inference of chromothripsis in cancer genomes. *Cell* 2013; **152**(6): 1226-36.
133. Zhang CZ, Spektor A, Cornils H, et al. Chromothripsis from DNA damage in micronuclei. *Nature* 2015; **522**(7555): 179-84.
134. Leibowitz ML, Zhang CZ, Pellman D. Chromothripsis: A New Mechanism for Rapid Karyotype Evolution. *Annu Rev Genet* 2015; **49**: 183-211.
135. Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* 2011; **144**(1): 27-40.
136. Xie H, Liu T, Wang N, et al. TERT promoter mutations and gene amplification: promoting TERT expression in Merkel cell carcinoma. *Oncotarget* 2014; **5**(20): 10048-57.

6. Anhang

6.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kleinzelliges Karzinom der Lunge, 10x Vergrößerung, zur Verfügung gestellt durch Priv.-Doz. Dr. med. Anne Schultheis, Institut für Pathologie der Uniklinik Köln	11
Abbildung 2: Plattenepithelkarzinom der Lunge, 10x Vergrößerung, zur Verfügung gestellt durch Priv.-Doz. Dr. med. Anne Schultheis, Institut für Pathologie der Uniklinik Köln	12
Abbildung 3: Adenokarzinom der Lunge, 10x Vergrößerung, zur Verfügung gestellt durch Priv.-Doz. Dr. med. Anne Schultheis, Institut für Pathologie der Uniklinik Köln	13
Abbildung 4: Treibermutationen des Adenokarzinoms der Lunge im metastasierten Stadium modifiziert nach Jordan et al. ¹ und Frampton et al. ³ (n=5262)	14
Abbildung 5: Schematische Darstellung des EGF-Rezeptors und dessen Signalkaskade modifiziert nach C. Santos et al. ⁵	15
Abbildung 6: Behandlungsleitlinien für Lungenkrebs im Frühstadium übernommen aus der Leitlinie des National Comprehensive Cancer Network, Version 8, September 2020 ²	19
Abbildung 7: Zielgerichtete Therapie oder Immuntherapie für fortgeschrittene oder metastasierte Lungenkarzinome übernommen aus der Leitlinie des National Comprehensive Cancer Network, Version 8, September 2020 ²	20
Abbildung 8: Schematische Darstellung der ALK-Rezeptor Aktivierungstypen modifiziert nach Huang H. ⁶	23
Abbildung 9: Vereinfachte Darstellung der Entstehung des EML4-ALK Fusionsproteins modifiziert nach E. Sánchez-Herrero et al. ⁴	24
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Telomerasefunktion	31

6.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM Klassifikation der Adenokarzinome der Lunge, 8. Edition 2018 nach der American Joint Commission on Cancer (AJCC) ⁴¹	18
Tabelle 2: Übersicht der in der Europäischen Union im Juli 2021 zugelassenen ALK-Tyrosinkinaseinhibitoren	26
Tabelle 3: Übersicht über ausgewählte ALK-abhängige und unabhängige Resistenzmechanismen	30