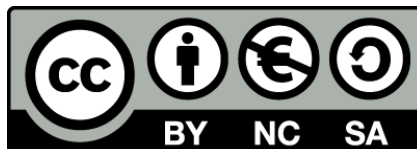




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Diagnòstic molecular de biomarcadors predictius en pacients amb càncer de pulmó de cèl·lula no petita

Sergi Clavé Safont



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – CompartirIgual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – CompartirIgual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License.**

DIAGNÒSTIC MOLECULAR DE BIOMARCADORS PREDICTIUS EN PACIENTS AMB CÀNCER DE PULMÓ DE CÈL·LULA NO PETITA

Memòria presentada per Sergi Clavé Safont per a optar al grau de

Doctor per a la Universitat de Barcelona

Programa de Doctorat en Biomedicina

Barcelona, 2019

Tesi realitzada sota la direcció de la Dra. Marta Salido Galeote i la Dra. Edurne Arriola
Aperribay, de l'Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques i sota la tutorització
de la Dra. Maria Teresa Mampel Astals, del Departament de Bioquímica i Biomedicina
Molecular de la Universitat de Barcelona

Dra. Marta Salido Galeote

Dra. Maria Teresa Mampel Astals

Dra. Edurne Arriola Aperribay

Sergi Clavé Safont

La Dra. Marta Salido Galeote, citogenetista adjunta al Servei de Patologia de l'Hospital del Mar i membre del Grup de Recerca en Neoplàsies Hematològiques de l'Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques i la Dra. Edurne Arriola Aperribay, metgessa adjunta al Servei d'Oncologia de l'Hospital del Mar i membre del Grup de Recerca en Teràpia Molecular del Càncer de l'Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques

CERTIFIQUEN

Que la tesi doctoral titulada "Diagnòstic molecular de biomarcadors predictius en pacients amb càncer de pulmó de cèl·lula no petita", presentada per Sergi Clavé Safont per a accedir al títol de Doctor en Biomedicina per la Universitat de Barcelona s'ha realitzat sota la seva supervisió i compleix els requisits formals i científics per a ser defensada davant del tribunal corresponent.

El treball ha estat realitzat al Laboratori de Citogenètica Molecular del Servei de Patologia de l'Hospital del Mar de Barcelona.

Barcelona, 2019

Dra. Marta Salido Galeote

Dra. Edurne Arriola Aperribay

A la meva família

AGRAÏMENTS

Considero que la gratitud és una emoció complexa, que a vegades pot ser difícil d'expressar. Personalment reconec que a mi me n'és molt. Per això, al final de tots aquests mesos escrivint la tesi, em resta pendent aquest apartat. Crec que tot i tancar una etapa professional rellevant em resulta fins i tot estrany desxifrar quins són els motius pels quals estic agraït i poder dedicar-hi unes paraules. El que si veig clar és la sort d'haver comptat durant aquests últims anys amb tanta gent al meu voltant que ha col·laborat activament en els projectes que en aquesta tesi hem recollit.

Les meves primeres paraules d'agraïment són per les directores, Marta Salido i Edurne Arriola. Moltes gràcies per l'esforç invertit en aquest treball i per guiar-me en aquest camí professional. Crec que no és fàcil transmetre com d'important és la feina ben feta i sens dubte vosaltres ho aconsegiu, sou exemple de determinació i ganes de millora constant. També considero fonamental el reconeixement en aquesta tesi a la Blanca Espinet. Gràcies per comptar amb mi any rere any i posar en valor la meva feina, no tindria tesi si no m'haguessis 'obligat' a matricular-me al màster. Sovint pensem en la generositat com un valor humà vinculat exclusivament als projectes solidaris o a les accions de voluntariat. Per mi vosaltres tres sou exemple de generositat en compartir i generar coneixement i desitjo que continueu amb aquesta incansable energia per escriure projectes, publicar articles, formar professionals, demanar beques, etc. Si en algun d'aquests projectes ens hi podem trobar i continuar treballant junts, no podré estar més agraït.

Als companys del Servei de Patologia i d'Oncologia de l'Hospital del Mar, en especial a la Lara Pijuan i al Javier Gimeno que amb les seves hores de dedicació han fet possible els treballs que aquí es reuneixen. Als altres professionals que també formen part del

Comitè molecular de càncer de pulmó, Beatriz Bellosillo i Álvaro Taus. A les meves companyes de feina més directes, per donar-me el suport diari que tothom que es proposi escriure una tesi necessita: Anna Puiggros, Conchi Fernández i Gemma Navarro, moltes gràcies. I a la resta de companys dels Laboratoris de Citogenètica, Biologia Molecular i Citologia Hematològica, tots heu col·laborat i influenciat en el meu camí mentre feia la tesi. Malgrat no us nombri un a un, moltes gràcies a tots.

Un agraïment molt especial als companys d'altres institucions i laboratoris que han col·laborat en els nostres projectes, un dels principals aprenentatges que reconec en mi després d'aquests anys és el valor de la cooperació professional entre tots. Gràcies a l'ineestimable suport de la Natalia Rodon i del Dr. Xavier Puig per ajudar-nos a donar forma a un projecte que ha esdevingut cabdal per finalitzar aquesta etapa. I a la Mireia Farrés per ser tant generosa durant tants anys amb tots nosaltres.

És important per mi fer una breu mirada enrere per valorar com va iniciar l'activitat professional que m'ha portat a escriure aquesta tesi. El meu agraïment més sincer a la meva amiga Sílvia Simó, al Dr. Oriol Vall i al Xavi Joya pels primers anys al PRBB. A les feines s'hi arriba, s'hi fa camí i s'hi creix, però algú t'hi permet l'entrada. Gràcies.

Finalment, més que un agraïment és una dedicatòria a tota la meva família pel recolzament i per l'energia invertida, en especial als meus pares per procurar-me l'ensenyament. I al Miguel per compartir amb mi aquesta experiència, pels encerts i les casualitats que ens han portat fins on som ara.

SINOPSI

Non-small cell lung cancer can be defined at the molecular level by recurrent 'driver' mutations that occur in multiple oncogenes, including *ALK* and *ROS1*. To improve outcome, molecular profiling should be available to all patients in order to make targeted therapies accessible. Since 2011, the standard test to detect *ALK*- and *ROS1*-rearranged tumors has been fluorescence in situ hybridization using break-apart probes and later on, immunohistochemistry. Both techniques have strengths and limitations and should be used within an appropriate diagnostic context and after proper laboratory validations. In this thesis, we confirmed the low prevalence of *ROS1* rearrangements in the Spanish population and identified a high prevalence of *ROS1* copy number alterations that neither affect *ROS1* protein expression nor present associated clinical implications. More recently, the use of next-generation sequencing panels to assess multiple clinically relevant genomic abnormalities has shown feasibility to detect gene rearrangements in lung adenocarcinoma. Comparison with widely accepted fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry methodologies has been tested herein for clinical application. Discrepancies between techniques have been found, especially in *ALK* and *ROS1* rearranged cases with isolated 3' signals FISH pattern. As the effectiveness of therapies targeting *ALK* and *ROS1* is highly dependent upon appropriate selection of patients, we propose a detailed reporting of positive FISH patterns. Next-generation sequencing represents a practical and reliable *ALK* and *ROS1* testing approach for use with routine non-small cell lung cancer tissue specimens, enabling patients to receive optimal therapies. This novel methodology can also assess genomic-related mechanism of resistance to targeted therapies and guide the appropriate treatment selection.

ÍNDEX

Llistat d'abreviatures	III
Llistat de taules i figures	VII
Introducció	1
Diagnòstic del càncer de pulmó de cèl·lula no petita	3
Biologia dels reordenaments dels gens <i>ALK</i> i <i>ROS1</i>	6
Característiques clíniques dels pacients amb reordenaments	14
Tractaments inhibidors de les cinases d' <i>ALK</i> i <i>ROS1</i>	18
Obtenció de les mostres per a la determinació molecular	22
Anàlisi de reordenaments per hibridació in situ fluorescent	25
Anàlisi de sobreexpressió per immunohistoquímica	31
Detecció de fusions per seqüenciació massiva	36
Hipòtesi i Objectius	41
Resultats	45
Article 1: Clavé S, et al. <i>ROS1</i> copy number alterations are frequent in non-small cell lung cancer. <i>Oncotarget</i> . 2016;7:8019-28	49
Article 2: Clavé S, et al. <i>Next-generation Sequencing for ALK and ROS1 Rearrangement Detection in Patients With Non-small-cell Lung Cancer: Implications of FISH-positive Patterns</i> . <i>Clinical Lung Cancer</i> . 2019;20:e421-9	63
Discussió	77
Prevalença i caracterització dels reordenaments de <i>ROS1</i>	79
Caracterització de les alteracions de número de còpies de <i>ROS1</i>	81
Comparació de tècniques per a la detecció dels reordenaments d' <i>ALK</i> i <i>ROS1</i>	85

Implicacions dels patrons de positivitat per hibridació in situ fluorescent	90
Caracterització de les alteracions concurrents	93
Conclusions	99
Bibliografia	103
Annexos	123
Article 3: Vidal J i Clavé S, <i>et al.</i> Assessment of <i>ALK</i> status by FISH on 1000 Spanish non-small cell lung cancer patients. <i>Journal of Thoracic Oncology</i> . 2014;9:1816-20	127
Article 4: Casadevall D, Gimeno J i Clavé S, <i>et al.</i> <i>MET</i> expression and copy number heterogeneity in nonsquamous non-small cell lung cancer (<i>nsNSCLC</i>). <i>Oncotarget</i> . 2015;6:16215-26	137
Article 5: Clavé S, <i>et al.</i> <i>CD274 (PDL1)</i> and <i>JAK2</i> genomic amplifications in pulmonary squamous-cell and adenocarcinoma patients. <i>Histopathology</i> . 2018;72:259-69	153

LLISTAT D'ABREVIATURES

ADC	Adenocarcinoma
ALCL	Limfomes anaplàsics de cèl·lules grans
ALK	<i>Anaplastic lymphoma kinase</i>
BRAF	<i>B-Raf proto-oncogene</i>
cDNA	Àcid desoxiribonucleic complementari
CNAs	Alteracions del número de còpies
CNVs	Variacions del número de còpies
CPCNP	Càncer de pulmó de cèl·lula no petita
DNA	Àcid desoxiribonucleic
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EMA	Agència Europea del Medicament
EML4	<i>Echinoderm Microtubule-Associated Protein-Like 4</i>
FFPE	Fixat amb formol i inclòs en parafina
IHQ	Immunohistoquímica
INDELS	Petites insercions i delecions
MET	<i>MET proto-oncogene</i>
NGS	Seqüenciació massiva
NTRK1	<i>Tropomyosin receptor kinase 1</i>
ORR	Taxa de resposta global
OS	Supervivència global
PD-L1	<i>Programmed cell death 1 ligand 1</i>
PFS	Supervivència lliure de progressió
RET	<i>Ret proto-oncogene</i>
ROS1	<i>ROS proto-oncogen 1</i>
RNA	Àcid ribonucleic
RTKs	Receptors tirosina-cinasa
RT-PCR	Reacció en cadena de la polimerasa a temps real

LLISTAT DE TAULES I FIGURES

TAULES

Taula 1. Percentatges de prevalença identificats en sèries de diagnòstic per a la caracterització dels reordenaments del gen *ALK*.

Taula 2. Percentatges de prevalença identificats en sèries de diagnòstic per a la caracterització dels reordenaments del gen *ROS1*.

Taula 3. Resultats dels estudis fase III amb molècules inhibidores d'ALK.

Taula 4. Resultats dels estudis clínics amb molècules inhibidores de ROS1.

Taula 5. Sensibilitat i especificitat dels anticossos anti-ALK.

Taula 6. Sensibilitat i especificitat de l'anticòs anti-ROS1 D4D6.

FIGURES

Figura 1. Classificació histològica del càncer de pulmó i molecular dels ADC de pulmó.

Figura 2. Algoritme de diagnòstic molecular per les mostres de CPCNP.

Figura 3. Fusió *EML4(13)-ALK(20)* identificada per primera vegada en CPCNP.

Figura 4. Transcrits de fusió identificats en el reordenament del gen *ALK*.

Figura 5. Transcrits de fusió identificats en el reordenament del gen *ROS1*.

Figura 6. Vies de senyalització cel·lular activades pels dominis catalítics dels RTKs.

Figura 7. Publicacions inicials sobre la identificació i inhibició dels reordenaments *d'ALK* i de *ROS1*.

Figura 8. Proposta d'algoritme de diagnòstic molecular per tècnica de NGS.

Figura 9. Exemples de disseny de sondes de trencament per l'estudi de reordenaments per FISH.

Figura 10. Patrons de senyals de FISH per a l'avaluació dels reordenaments *d'ALK*.

Figura 11. Imatges representatives de casos *ALK* i *ROS1* hibridats per FISH.

Figura 12. Diferències entre l'estratègia de NGS per amplicons o captura.

INTRODUCCIÓ

DIAGNÒSTIC DEL CÀNCER DE PULMÓ DE CÈL·LULA NO PETITA

El càncer de pulmó continua sent la principal causa de mort per càncer al món malgrat els avenços tant en el diagnòstic com en el tractament, amb uns 1,8 milions de morts anuals (Bray, 2018). Clàssicament, el tractament dels pacients amb carcinoma de pulmó avançat ha estat la quimioteràpia, amb poc guany en supervivència i qualitat de vida, essent inferior al 5% la taxa de supervivència a 5 anys en els estadis avançats de la malaltia (Siegel, 2018). Histològicament, els carcinomes de pulmó és divideixen en dos grups: els de cèl·lula petita i els de cèl·lula no petita (CPCNP), representant aquest últim el 85% dels casos (Molina, 2008) (Figura 1-A). Tanmateix, en els darrers anys, s'ha modificat la classificació d'aquests pacients degut a la identificació d'alteracions genòmiques que confereixen capacitat transformadora oncogènica a les cèl·lules tumorals i al conseqüent desenvolupament de teràpies dirigides contra aquestes alteracions, basades majoritàriament en inhibidors tirosina-cinasa (TKIs).

S'ha demostrat que es poden definir subgrups de pacients amb alteracions moleculars que actuen com a biomarcadors predictius de resposta a fàrmacs dirigits. El llistat actual de gens que poden presentar algun tipus d'alteració en el CPCNP són: *ALK*, *BRAF*, *EGFR*, *HER2*, *MET*, *RET*, *NTRK1* i *ROS1* (Lindeman, 2018) (Figura 1-B). Actualment però només es poden oferir aquests tractaments de forma estandarditzada pel sistema públic de salut als pacients amb diagnòstic histològic de CPCNP que presenten mutacions sensibilitzadores del gen *EGFR*, del codó 600 del gen *BRAF* o reordenaments dels gens *ALK* i *ROS1*. La caracterització d'alteracions en els altres oncogens queda vinculada a l'àmbit dels assaigs clínics a l'espera d'evidència clínica suficient per a la comercialització de nous fàrmacs inhibidors.

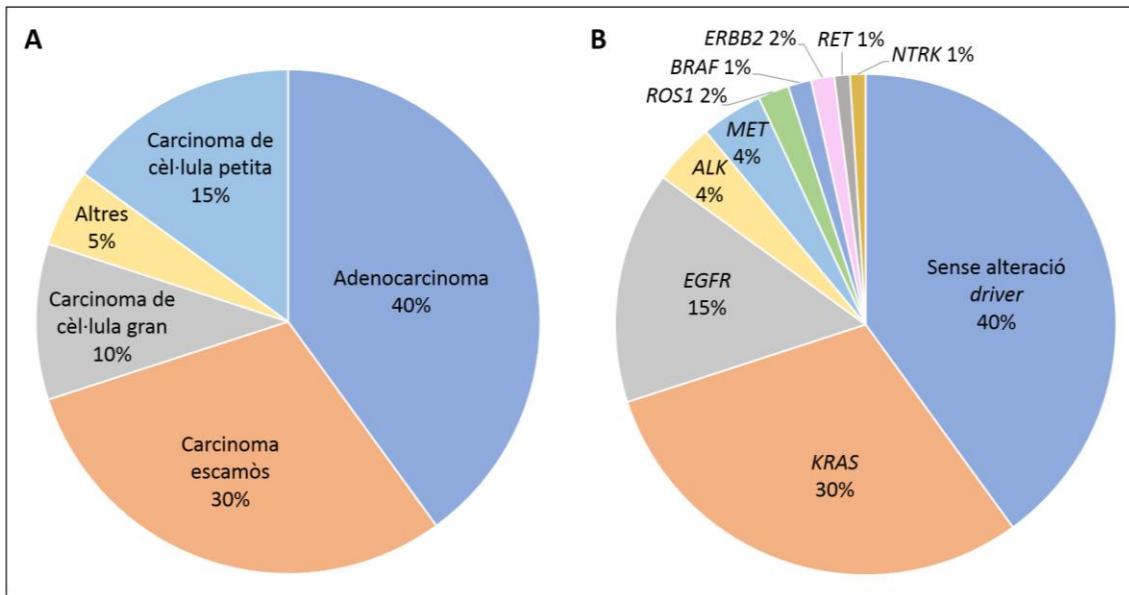


FIGURA 1. (A) Classificació histològica del càncer de pulmó. (B) Classificació molecular dels adenocarcinomes (ADC) de pulmó segons les alteracions genètiques *driver* que s'utilitzen com a biomarcadors predictius per l'ús de fàrmacs dirigits. Dades extretes i actualitzades de Travis, 2015 i *Cancer Genome Atlas Research Network*, 2014.

D'altre banda, hi ha hagut un interès terapèutic creixent en les interaccions entre les cèl·lules tumorals i el propi sistema immunitari del pacient, que ha donat lloc al desenvolupament de diferents fàrmacs immunomoduladors que actuen a l'eix PD-1/PD-L1 i promouen respostes immunitàries efectives contra el càncer. Paral·lelament als estudis de les alteracions moleculars, és necessària doncs l'avaluació de l'estat d'expressió del lligant PD-L1 en les cèl·lules tumorals per la indicació de tractament amb anticossos anti-PD-1/PD-L1. Per tant, immediatament després de la classificació histològica de les mostres de CPCNP que realitza el metge especialista en anatomia patològica, es obligatori analitzar en tots els pacients amb malaltia oncològica localment avançada o metastàtica, les alteracions en les regions d'interès dels gens *EGFR* i *BRAF*, els reordenaments dels gens *ALK* i *ROS1*, i l'expressió de PD-L1 (Felip, 2015) (Figura 2).

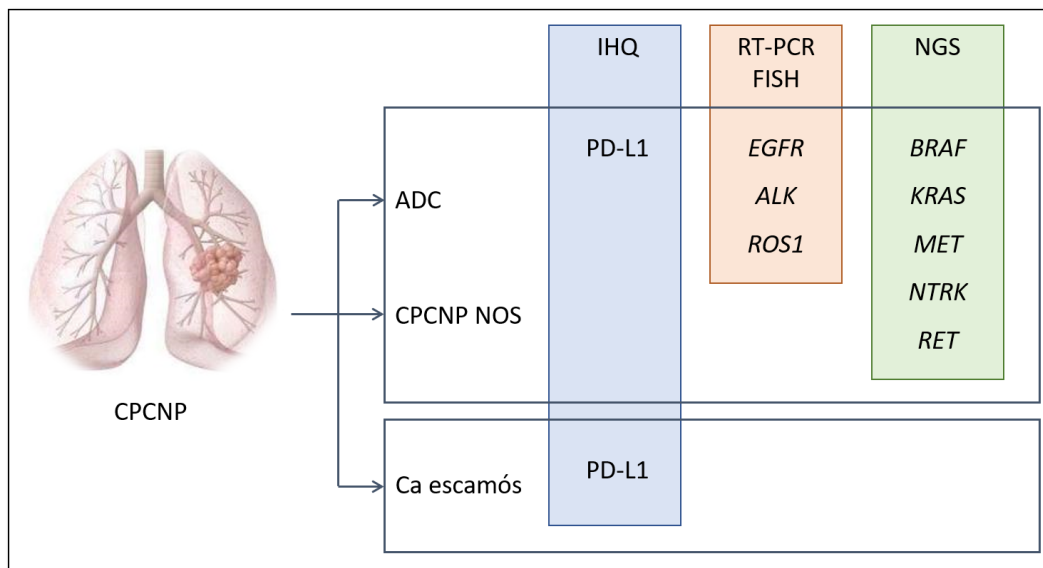


FIGURA 2. Algoritme de diagnòstic molecular del CPCNP utilitzat per a l'optimització del circuit de les biòpsies i citologies de càncer de pulmó al Servei de Patologia de l'Hospital del Mar.

La incorporació de l'anàlisi d'aquests biomarcadors a les mostres de CPCNP ha estat seqüencial, iniciant-se l'any 2004 quan es van definir les primeres mutacions d'*EGFR* que conferien sensibilitat a gefitinib, presents en un 15% dels pacients occidentals (Lynch, 2004). Posteriorment es van descriure els reordenaments del gen *ALK* identificats en aproximadament un 4% dels pacients amb la conseqüent aprovació del tractament dirigit amb crizotinib (Kwak, 2010). Quatre anys més tard es va aprovar el mateix tractament en pacients amb reordenaments de *ROS1* (aproximadament un 2%) donada la homologia de la seqüència amb la del receptor del gen *ALK* i els bons resultats de l'inhibidor en aquest subgrup de pacients (Shaw, 2014). Les alteracions del codó 600 del gen *BRAF* es van començar a identificar com a tractables amb TKIs específics en pacients amb melanoma i actualment també s'ha aprovat en pacients amb CPCNP, on aquestes mutacions suposen un 1-2% dels casos (Planchard, 2016). En el camp de la immunoteràpia, els resultats dels estudis clínics amb inhibidors de la

senyalització PD-1/PD-L1 es publiquen al voltant de l'any 2015 i, malgrat no es pot considerar un biomarcador predictiu òptim, l'expressió de PD-L1 en les cèl·lules tumorals és el més acceptat ja que la seva positivitats incrementa la probabilitat de resposta a aquests fàrmacs (Garon, 2015; Borghaei, 2015; Fehrenbacher, 2016). L'amplificació del gen *CD274*, que codifica per a PD-L1, va ser estudiada com a possible biomarcador alternatiu a la seva expressió en un dels articles que es presenta com a annex d'aquesta tesi doctoral (Clavé, 2018).

BIOLOGIA DELS REORDENAMENTS DELS GENS *ALK* I *ROS1*

El gen *ALK* es va identificar l'any 1994 mitjançant la clonació de la translocació t(2;5)(p23;35) trobada en un subconjunt de limfomes anaplàsics de cèl·lules grans (ALCL), un tumor de llinatge de cèl·lules T (Morris, 1994). El gen *ALK* es localitza al braç curt del cromosoma 2 (2p23) i codifica un receptor tirosina-cinasa (RTKs) homòleg als receptors de la família de la insulina que normalment només s'expressa en determinats tipus de cèl·lules neuronals. El receptor *ALK* té un paper rellevant en el desenvolupament fetal del teixit nerviós i deixa d'actuar en l'adult excepte en algunes cèl·lules neuronals, glials i endotelials (Pulford, 1997). L'activitat dels RTKs depèn de l'expressió gènica, que en determina la seva presència en la membrana plasmàtica, i de la unió dels seus lligands, que en provoquen la seva activació. Ara bé, les alteracions moleculars en el gens que els codifiquen poden desencadenar una estimulació de la seva acció de forma independent a la regulació per expressió o per lligand. En el cas de RTK com l'*ALK* que activa vies de senyalització cel·lular principalment durant la embriogènesis, la desregulació genètica de les seves molècules efectores es relaciona

directament amb les vies que afavoreixen la progressió tumoral. D'aquesta manera, en els pacients amb ALCL portadors de la translocació $t(2;5)(p23;35)$, la porció intracitoplasmàtica d'ALK es fusiona amb la part N-terminal de la nucleofosmina, resultant en una proteïna quimèrica amb activitat cinasa constitutiva sense control per expressió gènica ni per unió amb el lligand (Lamant, 1996). D'ençà, altres translocacions cromosòmiques del locus *ALK* s'han anat identificant en altres subtipus de limfomes així com en altres tumors no hematològics com són els tumors miofibroblàstics inflamatoris (Griffin, 1999; Pulford, 2004).

En el CPCNP els reordenaments del gen *ALK* s'identifiquen l'any 2007 a partir d'una mostra d'ADC pulmonar ressecat quirúrgicament d'un pacient fumador de 62 anys (Soda, 2007). Soda i col·laboradors van generar una llibreria d'expressió d'àcid desoxiribonucleic complementari (cDNA) retroviral per tal de descriure noves oncoproteïnes implicades en el desenvolupament del CPCNP. La seqüenciació de nucleòtids d'un dels fragments de la llibreria va revelar que l'intró 13 del gen *EML4*, localitzat a 2p21, al mateix braç curt del cromosoma 2 on també es troba *ALK*, estava interromput i invertit per a connectar-se a una posició intrònica amunt de l'exó 21 del gen *ALK*, situat a 2p23 (Figura 3). Aquesta inversió paracèntrica dins del mateix braç curt del cromosoma 2 genera un transcrit de fusió de 1.059 aminoàcids, la part N-terminal del qual correspon al gen *EML4* mentre que la C-terminal al gen *ALK*. La regió codificant d'*EML4* conserva un domini proteic bàsic inespecífic, un domini hidrofòbic anomenat HELP i una zona de repeticions de tipus WC que s'uneix a porció intracel·lular d'ALK, on es conserven els dominis tirosina-cinasa que provoquen l'activació transcripcional efectora (Smith, 1999; Eichenmuller, 2002).

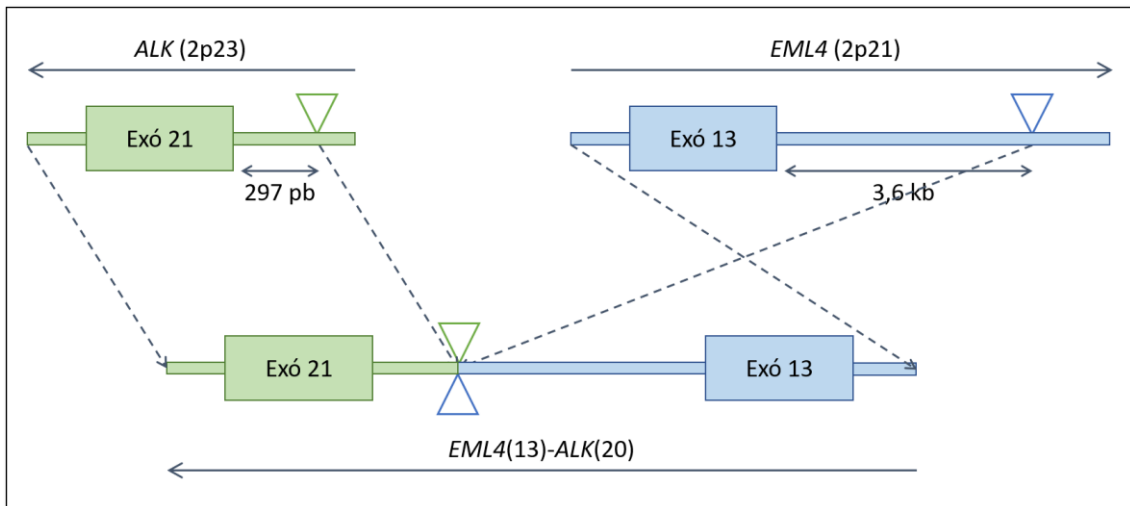


FIGURA 3. Inversió paracèntrica dins del braç curt del cromosoma 2 identificada per Soda i col·laboradors. La imatge mostra la fusió de l'intró 20 del gen *ALK* (2p23) amb l'intró 13 del gen *EML4* (2p21). Es genera un transcrit amb capacitat de traducció d'una proteïna quimèrica on la regió N-terminal correspon a la porció del gen *EML4* i la C-terminal a la del domini catalític tirosina-cinasa del gen *ALK*. Adaptat de Soda, 2007.

Els mateixos autors van analitzar posteriorment l'activitat transformadora d'aquesta oncoproteïna en models murins, en els que hi van injectar cèl·lules transfectades amb el constructe *EML4-ALK*, i hi van observar que l'activitat catalítica dels dominis tirosina-cinasa d'*ALK* generava tumors. Finalment, en una cohort de 75 pacients d'ètnia japonesa van realitzar el cribratge tant per a la presència de la fusió *EML4-ALK* com per la de les mutacions ja conegudes dels gens *EGFR* i *KRAS*. Van detectar cinc pacients amb fusions per mètode de reacció en cadena de la polimerasa a temps real (RT-PCR) i van descriure que aquestes fusions eren excloents de les mutacions d'*EGFR* i *KRAS*. D'aquesta manera, Soda i col·laboradors van poder concloure que la fusió del gen *ALK* amb *EML4* tenia un paper oncogènic de transformació cel·lular i que definia un subgrup específic de pacients amb CPCNP. La inversió paracèntrica causant de la fusió *EML4-ALK* no sempre es produeix a la mateixa ubicació dins del cromosoma 2 i des de la seva identificació s'han descrit múltiples variants d'aquesta (Sasaki, 2010). Totes

elles per ser efectives impliquen el domini intracel·lular tirosina-cinasa catalític d'ALK que comença a codificar-se per l'exó 21 i, en canvi, *EML4* és truncat de forma variable i dona lloc a diverses variants depenent dels dominis que s'incorporen al transcrit de fusió. Pel que fa a *EML4* només és necessari que mantingui algun domini peptídic inespecífic en espiral a la porció N-terminal que permeti l'activació dels dominis catalítics de la porció C-terminal, que corresponen a ALK, per la dimerització amb altres proteïnes de fusió *EML4*-ALK. En total s'han descrit unes 20 fusions diferents *EML4*-ALK amb diferències entre elles en quan a prevalença. La considerada variant 1 *EML4*(13)-ALK(20) és la més freqüent, descrita al voltant del 33% del total de casos ALK reordenats, seguida de la variant 3 *EML4*(6)-ALK(20) present a un 29%, i finalment la variant 2 *EML4*(20)-ALK(20) identificada en aproximadament un 10% dels casos (Sabir, 2017). La resta de variants *EML4*-ALK es troben en menor freqüència i es descriuen de forma variable depenent de la tipologia de la cohort on s'analitzen. Es calcula que del total de reordenaments del gen *ALK*, *EML4* n'és la parella més freqüent, descrita fins a un 80% dels casos (Soda, 2012). Totes elles tenen diferents distribucions en els compartiments cel·lulars en funció dels dominis peptídics que es conserven en la regió N-terminal corresponent a *EML4* malgrat es considera que la seva localització principal és citoplasmàtica. El restant 20% dels casos ALK positius tenen com a parella de fusió diversos gens localitzats arreu del genoma, generant productes de reordenament actius pel domini catalític d'ALK. Els més freqüentment identificats són els següents: *KIF5B* (10p11), *KLC1* (14q32), *TFG* (3q12), *HIP1* (7q11), *TPR* (1q31), *STRN* (2p22), *DCTN1* (2p13), *SQSTM1* (5q35), *NPM1* (5q35), *BCL11A* (2p16) i *BIRC6* (2p22) (Du, 2018) (Figura 4). Les proteïnes de fusió resultants tindran diverses distribucions cel·lulars, per exemple *KIF5B*-ALK s'associa al compartiment perinuclear (Takeuchi, 2009).

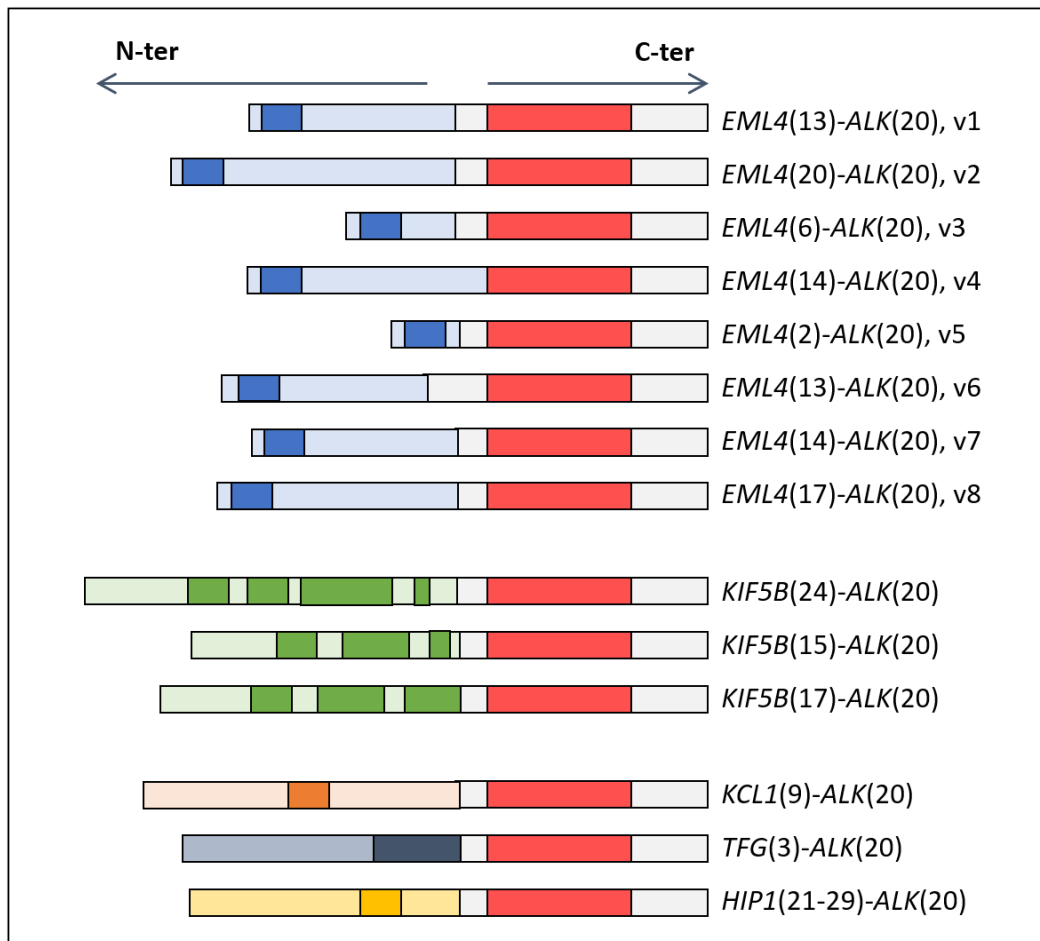


FIGURA 4. Transcrits de fusió identificats en el reordenament d'*ALK*. La porció C-terminal correspon al gen *ALK* a partir de l'exó 21 que codifica pel domini catalític tirosina-cinasa actiu (en vermell). En el cas de la porció N-terminal hi ha variacions en el número de regions implicades malgrat per exemple en el cas d'*EML4* es conserva el domini inespecífic en espiral que en permet la dimerització (en blau fosc).

El mateix any 2007 de la identificació de la fusió *EML4-ALK* es descriu també per primera vegada en mostres de CPCNP el reordenament del gen *ROS1*, localitzat al braç llarg del cromosoma 6, regió 6q22 (Rikova, 2007). Les alteracions moleculars que impliquen el gen *ROS1* ja havien estat descrites anteriorment en línies cel·lulars derivades de glioblastoma, per primera vegada l'any 1987, en les quals van trobar específicament una elevada expressió de *ROS1* (Birchmeier, 1987). Rikova i col·laboradors van analitzar l'activitat de diferents RTKs implicats en vies de

senyalització per a la diferenciació i progressió cel·lulars, considerades principalment alterades en tumors sòlids. A partir del perfil de fosforilació analitzat en 41 línies cel·lulars de CPCNP i del posterior anàlisi per immunohistoquímica (IHQ) en mostres histològiques fixades en formol i incloses en parafina (FFPE) de teixit tumoral provinent de pacients, van descriure per primera vegada les fusions *CD74-ROS1* i *SLC34A2-ROS1*. El gen *CD74*, situat a la localització cromosòmica 5q33, codifica una proteïna que s'associa al complex major d'histocompatibilitat de classe II i participa en la regulació de la presentació d'antígens que genera la resposta immune. L'altre gen identificat com a parella de fusió de *ROS1*, *SLC34A2*, es troba situat a 4p15 i codifica per una proteïna que intervé en la regulació dels nivells de fosfat. Per tant, a diferència de les fusions del gen *ALK* en que el 80% dels casos reordenen amb *EML4* producte d'una inversió paracèntrica dins del mateix braç curt del cromosoma 2, en les fusions de *ROS1* es van identificar d'entrada dues translocacions amb diferents cromosomes. En aquest estudi també identifiquen la fusió *EML4-ALK* i, analitzant la seva capacitat transformadora conjuntament amb les dues fusions de *ROS1* identificades, van concloure que la sobreexpressió de la proteïna quimèrica resultant és deguda a la fusió gènica.

L'expressió del RTK *ROS1* natiu es troba regulada tant temporalment com espacialment. La seva localització durant l'embriogènesi en diversos òrgans suggereix que *ROS1* pot tenir un paper en la maduració d'aquests i en el desenvolupament de les interaccions epiteli-mesènquima (Acquaviva, 2009). L'expressió de la proteïna *ROS1* també es troba en adults, on sembla ser més alta en ronyó, però també es troba en cerebel, teixit neuronal perifèric, estómac, intestí prim i còlon (Rimkunas, 2012). *ROS1*

està format per una porció C-terminal intracel·lular que conté el domini cinasa actiu, un domini transmembrana i un gran domini extracel·lular N-terminal que conté repeticions de fibronectina de tipus III (Acquaviva, 2009). De la mateixa manera que en els reordenaments del gen *ALK*, la porció tirosina-cinasa catalítica de *ROS1* activa es manté en el transcrit de fusió quimèric i la resta de la conformació N-terminal correspon a la parella del reordenament. S'han identificat 10 gens de fusió diferents, essent *CD74* el més comú en aproximadament el 50% dels casos. Les altres parelles de reordenament més observades inclouen *SDC4* (20q13), *TPM3* (1q21), *LRIG3* (12q14), *CCDC6* (10q21), *EZR* (6q25) i *GOPC* (6q22) (Neel, 2019) (Figura 5).

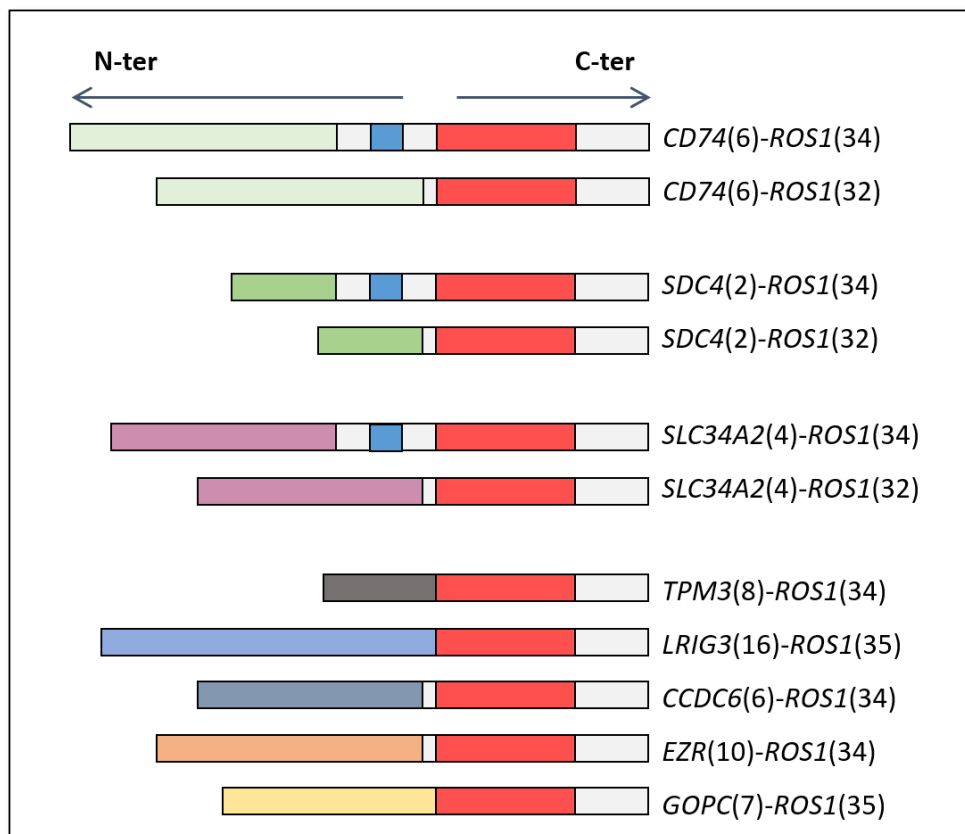


FIGURA 5. Transcrits de fusió identificats en el reordenament de *ROS1*. A diferència d'*ALK* que s'incorpora a partir de l'intró 20, *ROS1* presenta variabilitat en el punt de trencament, malgrat que per ser funcional tots codifiquen el domini catalític tirosina-cinasa actiu (en vermell).

Tant ALK com ROS1 en la seva forma activa com a oncoproteïnes de fusió, desencadenen diverses vies de senyalització que són importants per al creixement i la supervivència cel·lular del tumor. L'activació d'aquestes vies està vehiculada per l'activitat dels dominis cinasa actius que recluten substrats específics com la fosfotirosina a l'extrem C-terminal catalític. Aquest domini efector dels RTK té una alta homologia entre ambdós receptors, ALK i ROS1, compartint un 49% dels seus aminoàcids (Ou, 2012). Principalment, la seva activació condueix a la cascada de senyalització PI3K/AKT, STAT3 i MAPK/ERK que activen factors de transcripció regulant l'expressió gènica. D'aquesta manera, l'activació anòmla dels dominis actius dels RTK d'ALK i ROS1 confereix a les cèl·lules tumorals capacitat oncogènica de transformació cel·lular (Acquaviva, 2009; Davies, 2013) (Figura 6).

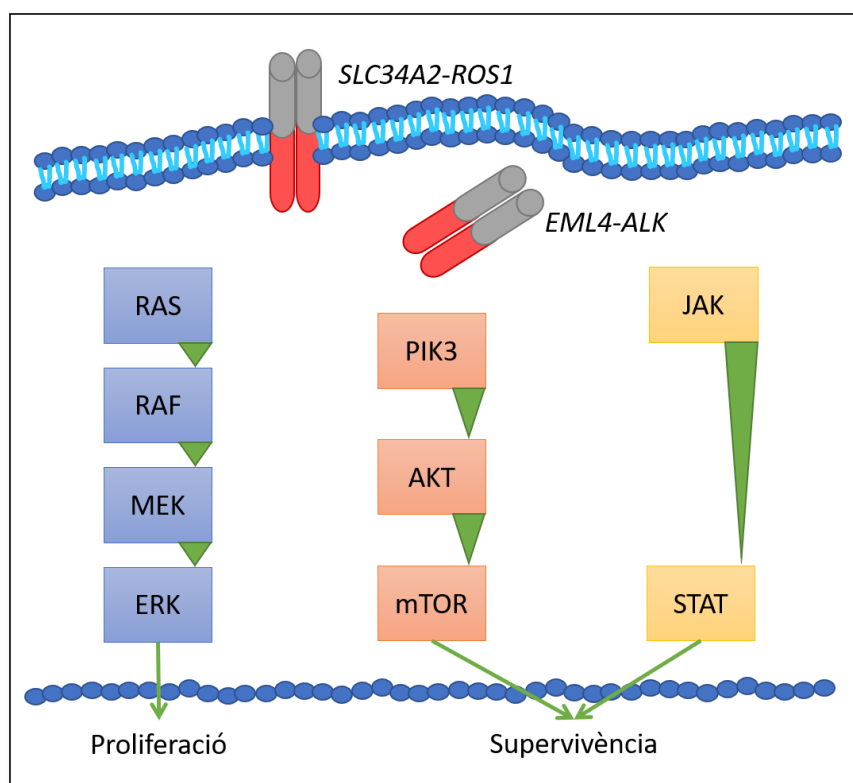


FIGURA 6. Principals vies de senyalització cel·lular activades per l'autofosforilació dels dominis tirosina-cinasa catalítics dels receptors ALK i ROS1. Adaptat de Lemmon, 2010 i Alamgeer, 2013.

CARACTERÍSTIQUES CLÍNiques DELS PACIENTS AMB REORDENAMENTS

Posteriorment a la seva identificació, l'anàlisi dels reordenaments d'*ALK* i de *ROS1* en cohorts de pacients va començar a formar part del diagnòstic molecular del CPCNP i es van desenvolupar assajos clínics amb molècules TKIs. Les fusions del gen *ALK* són poc freqüents, es produeix aproximadament en el 4% dels casos amb CPCNP (amb un rang descrit en diferents publicacions des del 0,7 al 9,2%; Taula 1), i en població caucàsica és predominant en dones i amb histologia d'ADC. A més, el 70-80% dels pacients amb CPCNP *ALK* reordenat no han estat mai fumadors i són pacients joves amb una mitjana d'edat d'aproximadament 55 anys (Shaw, 2009; Rodig, 2009; Kim, 2015).

TAULA 1. Percentatges de prevalença identificats en sèries de diagnòstic per a la caracterització dels reordenaments del gen *ALK*.

Estudi	País	Tècniques	N	N <i>ALK</i>	%	Histologia
Barlesi, 2016	França	FISH	8.134	388	2,1	CPCNP
Sacher, 2016	Estats Units	FISH, IHQ i NGS	1.783	84	4,7	CPCNP
Lee, 2016	Corea	FISH i IHQ	4.870	281	5,8	CPCNP
Gainor, 2013	Estats Units	FISH	1.683	75	4,5	CPCNP
Scarpino, 2016	Itàlia	FISH i IHQ	637	47	4,7	ADC
Hong, 2014	Xina	FISH	1.016	94	9,2	CPCNP
Kris, 2016	Estats Units	FISH	1.007	80	7,9	ADC
Serizawa, 2014	Japó	FISH i IHQ	411	12	2,9	ADC
Rogers, 2015	Austràlia	FISH	429	3	0,7	CPCNP
Vidal, 2014	Espanya	FISH	1.092	35	3,2	CPCNP

Abreviatures: N, número de pacients; N *ALK*, número de pacients *ALK* reordenats.

Els primers resultats d'un assaig clínic amb un inhibidor selectiu d'ALK, crizotinib, van ser publicats per Kwak i col·laboradors l'any 2010 (Kwak, 2010). L'estudi va analitzar 1.500 mostres de pacients amb CPCNP utilitzant la tècnica d'hibridació in situ fluorescent (FISH) amb sondes de trencament. El criteri de positivitat es va establir analitzant un mínim de 100 nuclis tumorals per mostra en els que el 15% o més presenta senyals de trencament o extra 3'ALK. Així, van identificar 82 pacients positius en els que hi van administrar la dosi recomanada de crizotinib i en van avaluar la resposta i els possibles efectes adversos. Amb una durada mitjana de tractament de 6,4 mesos, la taxa de resposta global (ORR) va ser del 57% (47 de 82 pacients, amb 46 respostes parcials i 1 resposta completa); 27 pacients (33%) addicionals van assolir una estabilització de la malaltia. En el moment de finalitzar l'estudi, 63 dels 82 pacients (77%) van continuar rebent crizotinib i la probabilitat estimada de supervivència lliure de progressió (PFS) als 6 mesos es va calcular al 72%.

Posteriorment, Bergethon i col·laboradors van descriure la primera sèrie de pacients amb reordenaments de *ROS1*. Utilitzant la tècnica de FISH amb els mateixos criteris de positivitat que els utilitzats a l'estudi de reordenaments d'ALK, van examinar 1.073 pacients amb CPCNP (Bergethon, 2012). Van identificar vuit casos *ROS1* reordenats (1,7%) amb unes característiques clíniques similars a les dels pacients ALK positius: histologia d'ADC, poc o mai fumadors i significativament més joves que els no reordenats. En el moment de la publicació de Bergethon només s'havia indicat que crizotinib tenia efecte d'inhibició del receptor ROS1 en estudis amb línies cel·lulars (McDermott, 2008), de manera que els autors van descriure l'efecte de crizotinib només en un dels vuit pacients positius. McDermott i col·laboradors van examinar la sensibilitat de

diversos inhibidors moleculars en un panell de 602 línies cel·lulars derivades de tumors humans per identificar respostes relacionades amb alteracions moleculars que poguessin ser clínicament rellevants. Van descriure la molècula crizotinib com a potent inhibidor de cèl·lules transformades amb fusions d'*ALK* i paral·lelament van identificar que la línia cel·lular HCC78, descrita l'any anterior per Rikova i col·laboradors per ser portadora de la fusió *SLC34A2-ROS1*, era també altament sensible a crizotinib. Van concloure que donat l'alt nivell d'homologia estructural entre els dominis cinases dels receptors *ALK* i *ROS1*, el mateix fàrmac és actiu per a la inhibició d'ambdues molècules.

Més endavant, l'any 2012, Davies i col·laboradors van publicar una sèrie de 447 mostres quirúrgiques de pacients amb CPCNP analitzades per a la presència de reordenaments de *ROS1* per FISH i RT-PCR (Davies, 2012). Els criteris de positivitat que van establir continuaren essent els mateixos descrits anteriorment (Bergethon, 2012). Van identificar cinc pacients positius (1,2%) dels quals dos són portadors de la fusió *CD74-ROS1* i altres dos de la *SLC34A2-ROS1*. Els percentatges de positivitat dels reordenaments de *ROS1* doncs es van situar entre l'1 i el 2% (Taula 2). Paral·lelament els autors van realitzar l'estudi de fusions de *ROS1* de forma rutinària en pacients amb CPCNP, un cop descartades les mutacions d'*EGFR* i *KRAS* i els reordenaments d'*ALK*. Van identificar un pacient de 65 anys no fumador amb histologia d'ADC i portador de la fusió *SDC4-ROS1*. El pacient va ser tractat amb crizotinib i va presentar una resposta parcial amb una reducció del 57% del volum del tumor després de dos cicles de tractament (56 dies). Les característiques clíniques dels pacients *ROS1* reordenats corresponen a pacients joves, d'aproximadament 60 anys, amb una prevalença més alta de no fumadors i amb histologia predominant d'ADC (Park, 2018).

TAULA 2. Percentatges de prevalença identificats en sèries de diagnòstic per a la caracterització dels reordenaments del gen *ROS1*.

Estudi	País	Tècniques	N	N <i>ROS1</i>	%	Histologia
Bergethon, 2012	Estats Units	FISH	1.073	18	1,7	CPCNP
Sholl, 2013	Estats Units	FISH	167	2	1,2	ADC
Scheffler, 2015	Alemanya	FISH	1.035	19	1,8	ADC
Scarpino, 2016	Itàlia	FISH	637	8	1,3	ADC
Rimkunas, 2012	Xina	IHQ	556	9	1,6	CPCNP
Chen, 2014	Taiwan	RT-PCR	492	12	2,4	ADC
Shan, 2015	Xina	FISH	681	13	1,9	ADC
Wang, 2015	Xina	NGS	1.356	11	0,8	ADC
Clavé, 2016	Espanya	FISH	283	5	1,8	CPCNP

Abreviatures: N, número de pacients; N *ROS1*, número de pacients *ROS1* reordenats.

Quatre anys després de l'estudi fase I de crizotinib de Kwak i col·laboradors en pacients amb fusions del gen *ALK*, es va publicar el fase I de crizotinib en pacients *ROS1* reordenats (Shaw, 2014). L'estudi liderat per Shaw i col·laboradors va fer el seguiment a una cohort d'expansió de 50 pacients amb reordenaments de *ROS1*, els quals van ser tractats amb dos dosis orals estàndard de crizotinib. Els casos van ser analitzats per FISH amb sondes de trencament i posteriorment es van analitzar per RT-PCR per descriure els gens de fusió, que van ser els següents en ordre de freqüència: *CD74*, *SDC4*, *EZR* i *SLC34A2*. La ORR va ser del 72%, amb 3 respostes completes i 33 respostes parcials. No es va observar que hi hagués una relació entre el gen de fusió i la resposta

al inhibidor. La durada mitjana de la resposta va ser de 17,6 mesos i la PFS mitjana va ser de 19,2 mesos, amb 25 pacients (50%) encara en seguiment de la progressió.

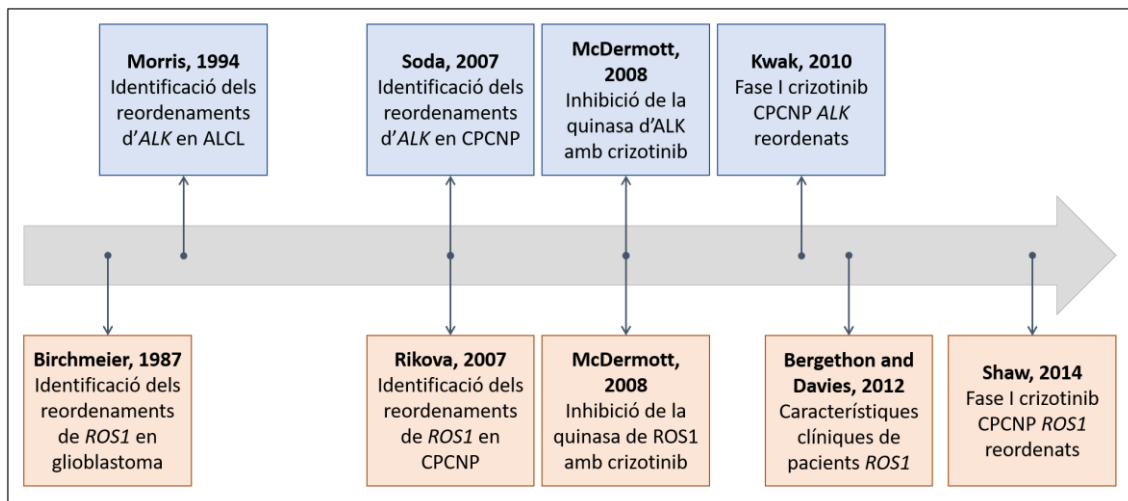


FIGURA 7. Publicacions inicials comentades amb dades rellevants pel desenvolupament de la inhibició d'ALK (fila superior) i de ROS1 (fila inferior) com a estàndards de tractament en els pacients amb CPCNP reordenats.

TRACTAMENTS INHIBIDORS DE LES CINASES D'ALK I ROS1

L'octubre del 2012 l'Agència Europea del Medicament (EMA) va autoritzar l'ús de crizotinib (Xalkori, Pfizer) pel tractament en segona línia dels pacients amb CPCNP *ALK* reordenats presentant malaltia localment avançada o metastàtica. Més endavant, l'estudi fase III va demostrar que l'eficàcia de crizotinib era superior a la quimioteràpia estàndard. L'any 2014 Solomon i col·laboradors van publicar l'assaig fase III que va comparar crizotinib versus quimioteràpia en 343 pacients *ALK* reordenats. Es va demostrar una prolongació de la PFS (10,9 vs. 7 mesos, respectivament) i una millora de la qualitat de vida (Solomon, 2014). Amb aquestes dades es va expandir l'ús de crizotinib pel tractament en primera línia dels pacients CPCNP *ALK* reordenats.

Actualment però, el tractament no està limitat a crizotinib i existeixen tres agents inhibidors més que són actius davant d'aquesta alteració (Facchinetti, 2016). Ceritinib (Zykadia, Novartis) és un inhibidor oral d'ALK considerat de segona generació amb una acció 20 vegades més potent a crizotinib, que inicialment s'havia indicat en progressió de la malaltia o resistència després de l'ús de crizotinib (Shaw, 2014). L'estudi fase III amb 376 pacients amb CPCNP avançat *ALK* positiu que eren aleatoritzats a rebre en primera línia ceritinib o quimioteràpia estàndard, va demostrar un augment de la PFS de 16,6 vs. 8,1, respectivament (Soria, 2017). El fàrmac actualment es troba juntament amb crizotinib com a opció en primera línia de tractament dels pacients *ALK* positius.

També s'ha desenvolupat alectinib (Alecensa, Roche), una altre molècula inhibidora encara més potent i amb una activitat provada contra les mutacions de resistència d'*ALK* en les que crizotinib perd la seva activitat (Ou, 2016; Shaw, 2016). Un aspecte important d'alectinib és la seva penetració a sistema nerviós central (SNC) on aconsegueix una resposta de les metàstasis cerebrals similar a la seva activitat sistèmica (Zhang, 2015). Alectinib va demostrar la seva superioritat sobre crizotinib en l'estudi fase III publicat l'any 2017 en el que es van aleatoritzar 303 pacients *ALK* positius entre crizotinib i alectinib en primera línia (Peters, 2017). La PFS en pacients tractats amb alectinib va ser del 68,4% vs. 48,7% dels tractats amb crizotinib i només un 12% dels pacients tractats amb alectinib va presentar progressió a nivell de SNC, en comparació amb un 45% en el grup amb crizotinib. Així doncs, en comparació amb crizotinib, alectinib va mostrar una eficàcia superior en el tractament primari dels pacients amb CPCNP *ALK* reordenat de manera que actualment també està aprovat pel tractament en primera línia juntament amb crizotinib i ceritinib.

Més recentment s'ha afegit a l'armament terapèutic inhibidor de la cinasa d'ALK el compost brigatinib (Alunbrig, Takeda). En un sentit similar als altres fàrmacs comentats, brigatinib va demostrar una millora en la ORR i la PFS en pacients amb i sense malaltia intracranial (Camidge, 2018). En aquest estudi fase III publicat al novembre de 2018 amb un total de 275 pacients *ALK* reordenats aleatoritzats a rebre brigatinib o crizotinib, la taxa de PFS estimada a 12 mesos es va calcular en 67% vs. 43%, respectivament. A més la ORR intracranial dels pacients amb lesions mesurables tractats amb brigatinib va ser del 78% vs. 29% dels tractats amb crizotinib. El mateix mes de novembre de 2018, la EMA va posicionar-se a favor de l'ús de brigatinib en segona línia pel tractament dels pacients CPCNP amb fusions del gen *ALK* que hagin estat prèviament tractats amb crizotinib (Taula 3).

TAULA 3. Resultats dels estudis fase III amb les molècules inhibidores testades pel tractament de pacients amb CPCNP *ALK* reordenats.

Inhibidor	Assaig clínic fase III	N <i>ALK</i>	Comparador	ORR (%)	PFS (m)
Crizotinib	PROFILE 1014 ^a	343	Pemetrexed + platí	74 vs 45	10,9 vs 7
Ceritinib	ASCEND 4 ^b	376	Pemetrexed + platí	73 vs 27	16,6 vs 8,1
Alectinib	ALEX ^c	303	Crizotinib	83 vs 76	25,7 vs 10,4
Brigatinib	ALTA 1L ^d	275	Crizotinib	71 vs 60	NR vs 9,8

Abreviatures: N *ALK*, número de pacients *ALK* reordenats; NR, *not reached*.

^a Solomon, 2014; ^b Soria, 2017; ^c Peters, 2017; ^d Camidge, 2018.

Estudis recents han avaluat de forma inicial l'eficàcia de tres agents més com a opcions potencials d'inhibició d'ALK: entrectinib (Drilon, 2017), lorlatinib (Solomon, 2018), i

ensartinib (Horn, 2018). De moment, a l'espera d'estudis comparatius, l'ús d'aquests inhibidors potencials està restringit als assajos clínics o als usos compassius.

En el cas dels pacients amb reordenaments del gen *ROS1* les opcions terapèutiques són més limitades (Taula 4). L'estudi d'expansió de cohort fase I de crizotinib per a pacients amb fusions de *ROS1* va desencadenar en l'aprovació d'aquest fàrmac per part de la EMA a finals d'agost del 2016 pel tractament en primera línia dels pacients amb reordenaments (Shaw, 2014).

Posteriorment els fàrmacs ceritinib i entrectinib, de la mateixa manera que pels casos *ALK* reordenats, han demostrat ser inhibidors potents pels pacients amb reordenaments de *ROS1* (Sehgal, 2018). En el cas de ceritinib es va dissenyar un estudi fase II amb 32 pacients *ROS1* positius sense tractament previ amb crizotinib i es va objectivar una PFS de 19,3 mesos al ser tractats amb 750 mg de ceritinib diaris. A més, dels vuit pacients que presentaven malaltia metastàtica a nivell del SNC, cinc van ser controlats intracranialment (63%) (Lim, 2017). Pel que fa a l'acció d'entrectinib, es van publicar els resultats de dos estudis fase I en els que es tractaven pacients *ALK*, *ROS1* i *NTRK1/2/3* reordenats però pel qual la informació és limitada ja que, dels 119 pacients que s'estudien, només 24 són *ROS1* reordenats (Drilon, 2017). Els investigadors van seleccionar un subgrup de 14 pacients *ROS1* positius sense tractament inhibidor específic previ i els hi van administrar una dosi de 600 mg d'entrectinib diaris. La ORR d'aquests pacients va ser d'un 86% i cal destacar unes duracions de tractament de fins a 32 mesos consecutius en el millor dels casos. Tot i els potencials resultats, de moment cap d'aquests dos inhibidors ha estat aprovat per la EMA com a estàndards de tractaments.

TAULA 4. Resultats dels diferents estudis clínics amb agents inhibidors pel tractament de pacients amb CPCNP *ROS1* reordenats.

Inhibidor	Autor	Disseny	N <i>ROS1</i>	TTM previ	ORR (%)	PFS (m)
Crizotinib	Shaw, 2016	Fase I/II	53	No TKIs	72	19,2
Ceritinib	Lim, 2017	Fase II	32	No TKIs (n= 30)	62	9,3
Entrectinib	Drilon, 2017	Fase II	14	Crizotinib	86	19
Lorlatinib	Shaw, 2017	Fase I	12	Crizotinib (n= 7)	50	7

Abreviatures: N *ROS1*, número de pacients *ROS1* reordenats; TTM, tractament.

Lorlatinib, considerat en el tractament dels pacients amb CPCNP *ALK* positiu que han progressat a línies prèvies, també pot superar la resistència adquirida a crizotinib en els pacients amb CPCNP *ROS1* positiu, incloent-hi malaltia al SNC (Shaw, 2017). L'estudi fase I d'escalada de dosi de lorlatinib publicat a finals de 2017 va estudiar 41 pacients *ALK* reordenats i 12 *ROS1* reordenats, el 53% dels quals ja havia progressat a dues o més línies de tractament inhibidor. Lorlatinib va demostrar tant activitat sistèmica com intracranial en pacients tant *ALK* com *ROS1* reordenats, la majoria dels quals tenien metàstasis a SNC i havien fallat dos o més línies prèvies de TKIs.

OBTENCIÓ DE LES MOSTRES DE TEIXIT PER A LA DETERMINACIÓ MOLECULAR

L'anàlisi dels reordenaments dels gens *ALK* i *ROS1* és un dels diversos procediments diagnòstics que requereixen les mostres de CPCNP. En la majoria dels pacients, les mostres de biòpsies o citologies diagnòstiques que s'obtenen tenen poca quantitat de cèl·lules tumorals de manera que han de ser utilitzades de la forma més òptima

possible. Per tant, l'adquisició i el processament de les mostres són passos crucials en el control de qualitat per tal de fer possible l'algoritme diagnòstic necessari per a cada pacient. Les determinacions moleculars s'efectuen generalment en mostres de biòpsies petites o en citologies de pacients amb malaltia avançada. Menys sovint, la mostra disponible és el tumor sencer que s'obté per resecció quirúrgica en els casos de pacients amb malaltia en estadis inicials quan aquests són operables. En qualsevol cas, l'obtenció de mostra tumoral ha de tenir com a objectiu aconseguir el major rendiment de la manera més segura i menys invasiva possible pel pacient. Tot i que s'han descrit discrepàncies en les alteracions genètiques detectades al tumor primari i a les metàstasis, aquestes són poc freqüents per *ALK* i *ROS1* i es poden analitzar tant en uns com en altres (Salido, 2012; Kim, 2013).

Un cop la mostra arriba al laboratori d'anatomia patològica, es recomana la fixació per immersió amb formol tamponat neutre al 10% (Dietel, 2016). La fixació prèvia amb fixadors basats en alcohol pot alterar l'antigenicitat dels teixits o la integritat del DNA i RNA, de la mateixa manera que les solucions de descalcificació àcides que s'utilitzen en les mostres de biòpsia òssia. En aquests casos, els resultats de les determinacions moleculars quedaran compromesos i no es podran valorar (Kerr, 2014). En general, es recomana un període de fixació de més de 6 hores i menys de 72 hores, depenent de la mida de la mostra de CPCNP que s'hagi de processar (Thunnissen, 2012). A part del tipus i el temps de fixació, una altre fase crucial és el temps d'isquèmia, que comença immediatament després que la mostra s'extreu del pacient i finalitza quan és conservada com a teixit FFPE (Thunnissen, 2014). La majoria dels laboratoris han hagut de començar a controlar i ajustar aquest temps ja que influeix en la preservació dels

teixits per a les futures determinacions moleculars. Una altre recomanació és que el mateix especialista en anatomia patològica revisi tot el material tumoral disponible del pacient, tant les biòpsies com les citologies, per tal de seleccionar el més adequat per a la determinació de biomarcadors (Dietel, 2016). Les mostres citològiques són una bona font de material tumoral que preferiblement s'ha de conservar en forma de bloc cel·lular i utilitzar en el laboratori de diagnòstic molecular sempre i quant hi hagi suficients cèl·lules tumorals (Wolff, 2013). Finalment, es recomana l'enriquiment de mostres mitjançant micro o macrodissecció per maximitzar el contingut de cèl·lules tumorals abans de l'extracció de DNA i RNA (Bonin, 2010).

A mesura que la caracterització genètica del CPCNP ha anat avançant, s'han anat desenvolupant teràpies dirigides que requereixen la determinació en el laboratori d'altres alteracions genètiques més enllà d'*EGFR*, *BRAF*, *ALK* i *ROS1*. És per això, que els laboratoris de diagnòstic molecular han de poder expandir el nombre de gens a caracteritzar (Figura 8). Segons les guies de selecció molecular de pacients amb CPCNP, actualitzades l'any 2018 per Lindeman i col·laboradors, hi ha 3 categories de prioritització d'anàlisi de biomarcadors (Lindeman, 2018). Primer, tots els laboratoris que realitzen proves diagnòstiques en CPCNP han d'oferir com a mínim absolut les determinacions d'*EGFR*, *ALK* i *ROS1*. S'hauria d'incloure un segon grup de gens quan les determinacions es realitzin per panell de seqüenciació massiva (NGS), sempre que hi hagi material disponible, per tal d'analitzar les alteracions de *BRAF*, *MET*, *RET*, *ERBB2* i *KRAS*. Finalment, tots els altres gens que es puguin considerar determinar pertanyen a la tercera categoria de biomarcadors d'interès en l'àmbit de la recerca clínica i dependran de les opcions de cada centre. Cal mencionar a part el cas de les

determinacions del codó V600 del gen *BRAF* donat que aquesta actualització de les guies de determinacions moleculars és prèvia al posicionament de la EMA pel tractament amb dabrafenib en combinació amb trametinib en pacients amb CPCNP (Planchard, 2016). Per tant, actualment el cribatge d'aquesta alteració de *BRAF* ha de ser considerada al primer grup de prioritat de determinació molecular.

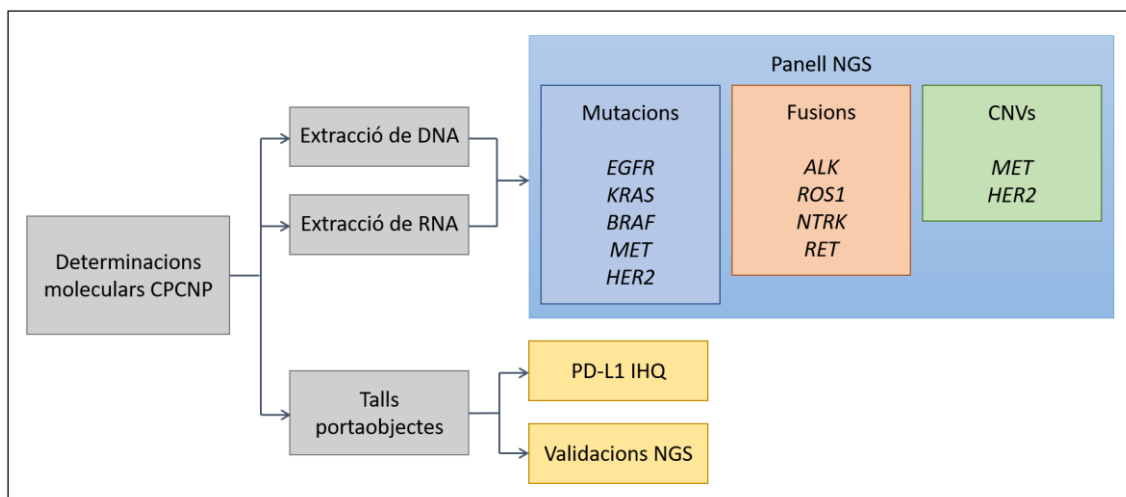


FIGURA 8. Proposta d'algoritme de diagnòstic molecular del CPCNP optimitzant la mostra per tècnica de NGS.

ANÀLISI DE REORDENAMENTS PER HIBRIDACIÓ IN SITU FLUORESCENT

La tècnica de FISH consisteix en la hibridació de petites seqüències d'àcid desoxiribonucleic (DNA) de cadena senzilla marcades amb molècules fluorescentes, com fluoresceïna o rodamina, sobre locus específics del DNA de la mostra a analitzar. Aquesta pot ser de diversos tipus: preparacions cromosòmiques, extensions cel·lulars i talls de teixit FFPE que engloba tant biòpsies com citologies conservades en forma de blocs cel·lulars. La tècnica es va desenvolupar a finals dels anys 80 i va suposar una revolució tant en l'estudi de citogenètica constitucional com en el d'alteracions en

neoplàsies hematològiques i tumors sòlids (Pinkel, 1986). La base metodològica de la tècnica recau en l'habilitat de desnaturalització i renaturalització del DNA i en la visualització amb un microscopi de fluorescència que excita els fluorocroms i ens permet la seva detecció en nuclis morfològicament preservats. En el cas concret dels reordenaments d'*ALK* i *ROS1*, estudiats principalment en mostres de teixit FFPE, el procediment tècnic és el següent: La mostra sobre un portaobjectes es desparafina i renta amb etanol per posteriorment aplicar-hi solucions salines combinades amb agents caotròpics que trencaran els ponts bisulfur i altres unions formades entre proteïnes extracel·lulars que acomplexen el teixit a causa del formol. Serà necessari un pas de digestió amb proteasa per a fer accessible la sonda de DNA al nucli. Posteriorment es realitzen els passos de desnaturalització i hibridació posant en contacte el DNA de la mostra i de la sonda i aplicant canvis de temperatura. Finalment es fan rentats amb solucions salines a alta temperatura per eliminar unions inespecífiques i es contratenyeix amb el marcador fluorescent inespecífic DAPI per localitzar els nuclis a la mostra (Lim, 2017).

En el cas dels reordenaments d'*ALK* i de *ROS1* la tècnica de FISH es va aplicar des d'un inici com a mètode de selecció dels pacients en els estudis clínics de crizotinib (Kwak, 2010; Shaw, 2014). El disseny dels assajos de FISH en ambdós casos és de sondes de trencament amb les quals es detecta un únic locus sense importar les múltiples parelles de reordenament que poden tenir, fins i tot si aquestes no es coneixen. Així, s'hibriden amb fluorocroms diferents els extrems 3' i 5' del locus del gen a estudiar de manera que la separació o l'absència de senyals de fusió és indicativa de reordenament del gen estudiat (Figura 9).

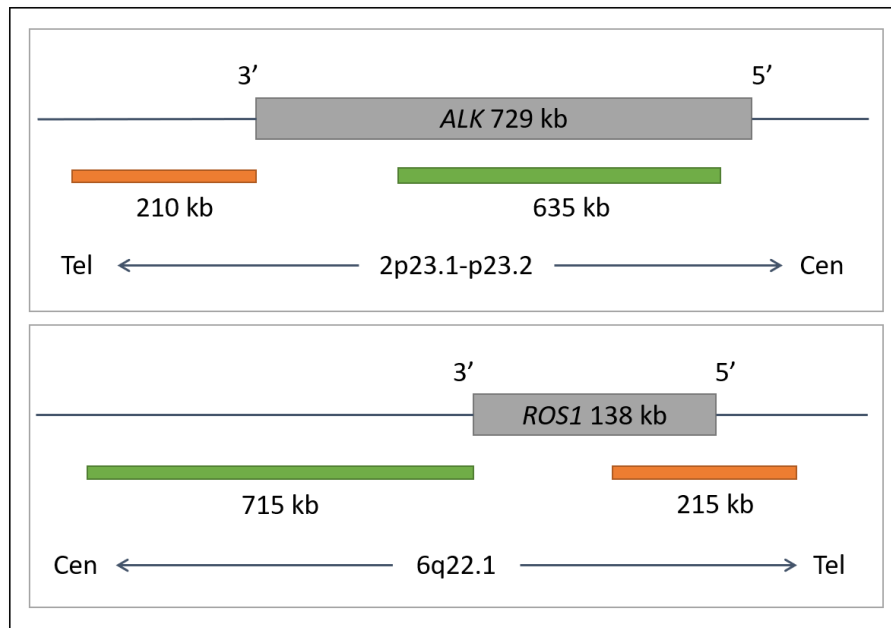


FIGURA 9. Exemples de disseny de les sondes de trencament utilitzades pels estudis de reordenaments dels gens *ALK* i *ROS1*. En gris es mostra la seqüència dels gens, la seva mida i les sondes que hi hibriden, marcades amb els fluorocroms que emeten en l'espectre del taronja (excitació a 547nm i emissió a 572nm) i del verd (excitació a 503nm i emissió a 528nm). Imatge adaptada de *ZytoLight SPEC ALK and ROS1 Dual Color Break Apart*.

El criteri de positivitat tant d'*ALK* com de *ROS1* es el mateix i parteix inicialment del recompte per part de l'observador de 50 cèl·lules tumorals. Tenint en compte els patrons de FISH que es presenten en la Figura 10, si menys del 10% dels nuclis tenen senyals positius, la mostra es considera negativa. Per contra, si més del 50% dels nuclis tenen senyals positius, la mostra es considera positiva. Els casos que estiguin entre el 10% i el 50% de nuclis amb senyals positius es consideren equívocs i han de ser avaluats per un segon observador que ha d'interpretar 50 cèl·lules tumorals addicionals. En aquests casos es fa el recompte conjunt de les 100 cèl·lules i el punt de tall s'estableix en el 15% de senyals positius, sent negatius els casos que tinguin menys d'aquest valor (Camidge, 2010; Yoshida, 2013).

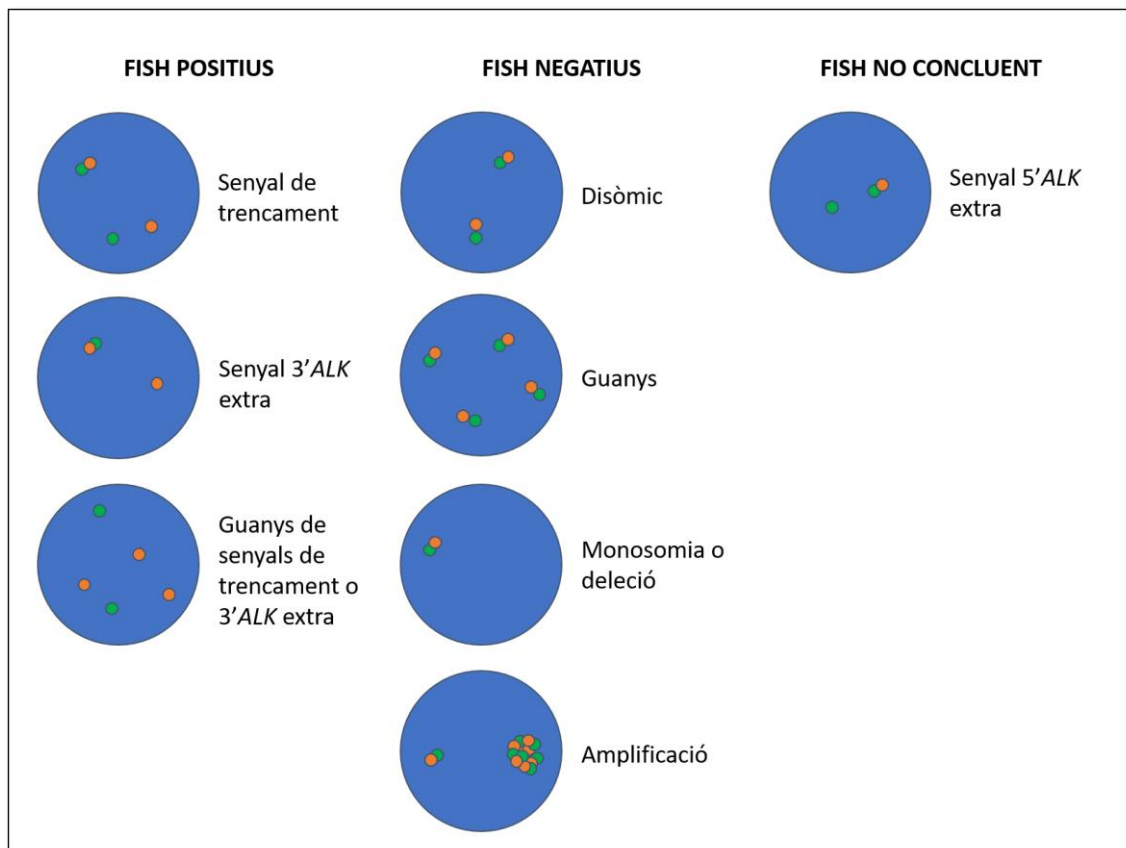


FIGURA 10. Patrons de senyals de les sondes de trencament per a l'avaluació dels reordenaments d'*ALK* per FISH (3' en taronja i 5' en verd). En el cas de *ROS1* la interpretació dels patrons és la mateixa tenint en compte que la majoria de sondes marquen de forma inversa, 3' en verd i 5' en taronja.

Els patrons de FISH considerats positius són: els senyals de trencament, en els que la separació entre 3' i 5' es major al diàmetre de dos senyals individuals, i els senyals 3' extrems sense aparellar, acompanyats d'una pèrdua del fragment 5' (Camidge, 2012) (Figura 11). Aquests casos amb senyals extra 3' es van investigar en les primeres cohorts de pacients reordenats per mètode ortogonal de RT-PCR i es va veure que eren positius per la presència de fusions *EML4-ALK*. Així, aquesta pèrdua del fragment 5' *ALK* és conseqüència d'una deleció associada al reordenament (Kwak, 2010; Dai, 2012). La bona correlació d'aquestes dues tècniques per a aquests casos va fer que s'incorporés aquest patró com a positiu quan es realitza el cribratge per FISH, sense necessitat de

realitzar un test reflex. Per contra, els senyals 5' extres sense aparellar s'han de considerar variants FISH negatius. Teòricament, aquests productes de reordenament no contenen la regió 3' *ALK* on es troba codificat el domini catalític de cinasa d'*ALK* de manera que es consideren un producte de fusió probablement no funcional (Thunnissen, 2012; Tsao, 2016). Malgrat això, hi ha casos clínics publicats en els que aquests pacients mostren resposta a crizotinib fent que aquest criteri es trobi actualment en revisió (Guyard, 2019). La Figura 11 mostra diferents imatges de casos *ALK* i *ROS1* amb patrons FISH positius i negatius.

La tècnica de FISH també permet detectar alteracions de número de còpies (CNAs) dels gens *ALK* i *ROS1* que, malgrat no determinen opcions a tractament dirigit, descriuen el grau d'aneuploïdia del tumor. L'any 2011 el nostre grup va publicar un dels primers estudis sobre 107 de casos de pacients amb CPCNP estudiats mitjançant FISH per a la detecció reordenaments d'*ALK* (Salido, 2011). Es va descriure que el 63% dels casos no reordenats presentaven guanys i un 10% amplifícacions del gen *ALK*, sense que en cap dels casos tingués efecte en la sobreexpressió del receptor *ALK*. Aquesta manca d'expressió juntament amb el baix percentatge de cèl·lules que presenten amplifícacions suggereix que aquest esdeveniment no és biològicament rellevant i no sensibilitza al tractament amb TKIs. Actualment les guies clíniques per a la selecció de pacients CPCNP recomanen no incorporar el valor de CNAs dels casos no reordenats en l'informe del laboratori (Tsao, 2016). En el cas de *ROS1* es van descriure en un inici amplifícacions del gen en un percentatge menor, del 4,8% (Jin, 2015), que més tard van ser estudiades en series més àmplies entre les quals destaca el primer article que es presenta com a resultat d'aquesta tesi doctoral (Clavé, 2016).

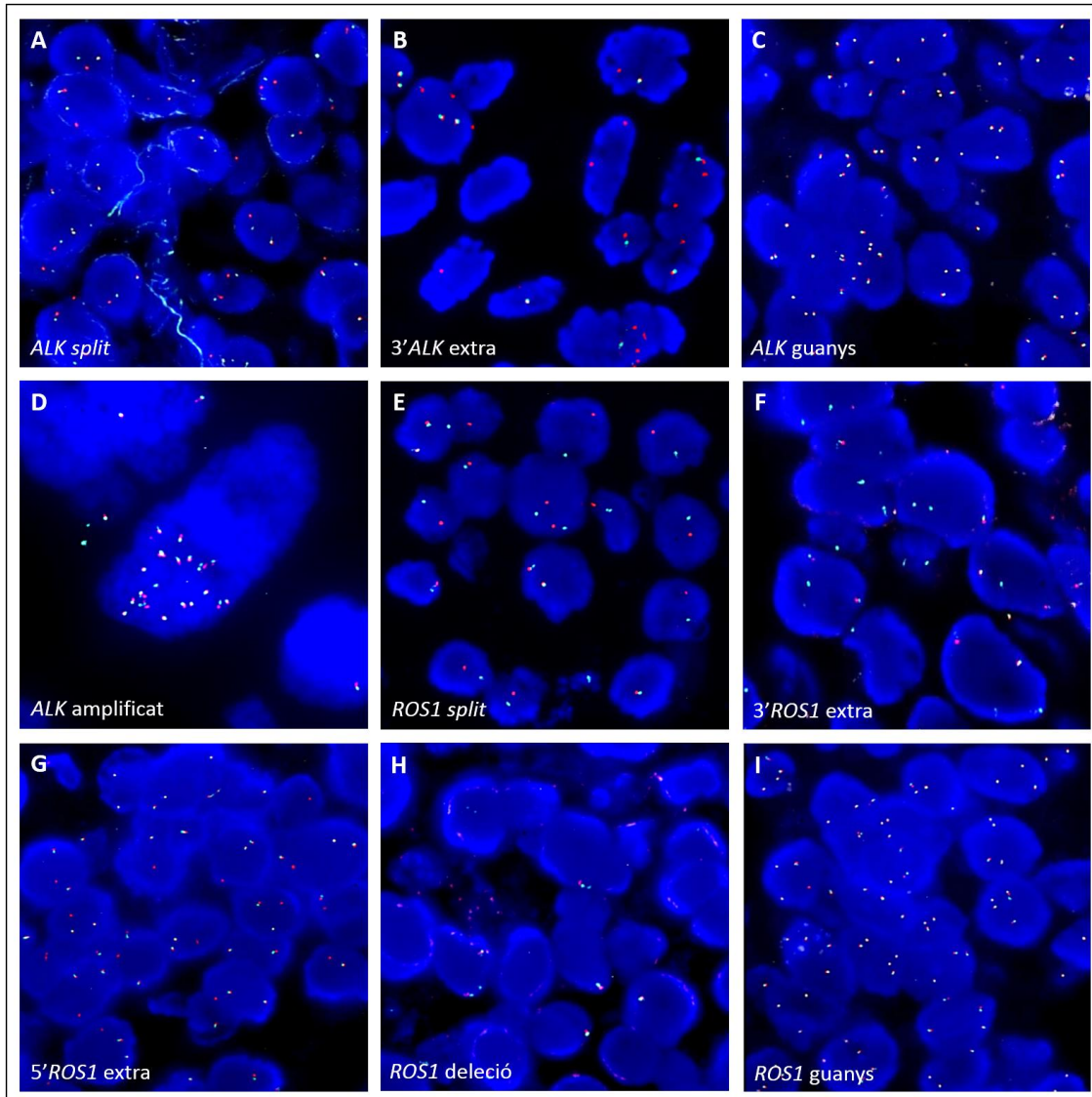


FIGURA 11. Imatges representatives de casos *ALK* i *ROS1*. (A-D) Casos hibridats amb la sonda de trencament (en la imatge referida com a *split*) per l'avaluació del gen *ALK* que conté marcat en taronja l'extrem 3' i en verd el 5'. (E-I) Casos hibridats amb la sonda de trencament per l'avaluació del gen *ROS1* que conté marcat en verd l'extrem 3' i en taronja el 5'. Tots els casos han estat contratenyits amb DAPI (100X).

Com a assaig basat en DNA, la tècnica de FISH té un avantatge important en la seva robustesa i especificitat. No obstant això, es pot veure afectada per molts factors preanalítics, especialment pel temps i el tipus de fixador utilitzats. Per exemple, un excés en el temps d'isquèmia del teixit pot provocar la degradació del DNA i la

incapacitat de valorar aquella mostra (Babic, 2010). També és imprescindible avaluar rigorosament els factors postanalítics com la qualitat de la morfologia dels nuclis i la intensitat del senyal de fluorescència. En els casos que hi hagi evidència de sobredigestió del teixit o poca penetració de la sonda de FISH de manera que no s'aconsegueix una imatge suficientment nítida, es recomana repetir la tècnica o bé decantar-se cap a una de les altres tècniques d'estudi de reordenaments. Finalment, també és rellevant que la valoració de la mostra la dugui a terme un especialista amb coneixements histològics que, en el cas de no ser directament el patòleg que ha valorat el teixit, aquest pugui seleccionar l'àrea tumoral a hibridar.

ANÀLISI DE SOBREEXPRESSION PER IMMUNOHISTOQUÍMICA

Els pacients amb CPCNP candidats a rebre TKIs tant per ALK com per ROS1 depenen d'una manera crítica d'una prova validada per a detectar l'alteració molecular corresponent tenint en compte la baixa freqüència amb la que es presenten (4 i 1-2%, respectivament). La tècnica d'IHQ és un mètode de cribratge ràpid i econòmic que consisteix a fer un examen amb microscopi de camp clar que permet avaluar l'arquitectura del teixit i la histologia de cèl·lules tumorals a la vegada que es valora la intensitat de la immunotinció. De forma nativa, els receptors ALK i ROS1 no s'expressen de forma constant en el teixit pulmonar normal, de manera que es necessita utilitzar un control positiu intern per poder valorar si un resultat és negatiu o correspon a un fals negatiu (Mino-Kenudson, 2010; Rimkunas, 2012). A part d'això, els requeriments a nivell preanalític són els mateixos que els de la tècnica de FISH, hi destaquen com a generadors d'artefactes el tipus de fixador utilitzat i el temps de

fixació de la mostra. Cal tenir en compte també que en les mostres de teixit FFPE els components cel·lulars queden conservats contra les condicions oxidatives. No obstant això, una vegada es fan les seccions amb el micròmetre, el temps d'emmagatzematge d'aquestes mostres ja muntades en portaobjectes es limita a un màxim de 3 mesos a temperatura ambient (Blind, 2008).

A diferència de la tècnica de FISH en la que hi ha diverses opcions de sondes d'hibridació comercials, l'estudi d'expressió per IHQ d'ALK s'ha de realitzar preferentment amb l'anticòs ALK D5F3 (Thorne-Nuzzo, 2017). Aquest kit inclou un pas d'amplificació que redueix resultats equívocs augmentant el contrast entre la senyal específica i el possible soroll de fons. L'assaig D5F3 en comparació amb els altres que hi ha disponibles (Taula 5), produeix senyals citoplasmàtiques més intenses que s'han de valorar per evitar falsos positius, en casos amb problemes preanalítics (Ibrahim, 2015). La tinció d'ALK en mostres de CPCNP és citoplasmàtica, pot tenir un caràcter granular i, en alguns casos, pot haver accentuació de la membrana (Takeuchi, 2016). La tècnica d'IHQ presenta algunes limitacions que també es poden donar quan s'utilitza el clon D5F3. En primer lloc, les cèl·lules tumorals amb mucina citoplasmàtica, sovint observades en casos de CPCNP *ALK* reordenats, poden ser una font de resultats falsos negatius a causa de l'expressió limitada d'ALK en un citoplasma comprimit i escàs a causa de l'acumulació de mucina (Uruga, 2018). En segon lloc, es pot observar en alguns casos tinció en macròfags alveolars, cèl·lules neuronals, cèl·lules epitelials de les vies aèries, mucines extracel·lulars i restes necròtiques, especialment quan s'utilitzen sistemes d'amplificació de les senyals d'IHQ (Cutz, 2014). En tercer lloc, s'han detectat casos de cèl·lules tumorals amb diferenciació neuroendocrina (carcinoma de cèl·lules

petites, carcinoma neuroendocrí de cèl·lules grans i tumor carcinoide) que mostren una reactivitat que pot ser informada com a fals positiva, tot i que els seus patrons d'expressió solen ser heterogenis (Nakamura, 2013). Tenint en compte totes aquestes indicacions, la tècnica d'IHQ per a la detecció dels casos ALK positius s'ha validat en nombroses sèries de pacients, incloent-hi els assajos clínics d'aprovació dels fàrmacs ceritinib i alectinib (Soria, 2017; Peters, 2017).

TAULA 5. Sensibilitat i especificitat dels anticossos anti-ALK (clons D5F3, 5A4 i ALK1) utilitzats en estudis d'harmonització de la tècnica d'IHQ.

Estudi	N	Tècnica comparativa	Clon IHQ	Sensibilitat (%)	Especificitat (%)
Rogers, 2015	341	FISH / CISH	D5F3	100	99,7
			5A4	100	99,4
			ALK1	100	99,4
Lantuejoul, 2015	547	FISH / RT-PCR	D5F3	92	76
			5A4	87	89
Shen, 2015	60	FISH	D5F3	93,8	100
			5A4	56,3	100
Jiang, 2016	3754	FISH	D5F3	99	98
			5A4	86	99
			ALK1	56	100
Demidova, 2017	122	FISH	D5F3	100	99
Shukla, 2019	614	FISH	D5F3	100	100
			5A4	87,5	100
			ALK1	50	95,5

Abreviatures: N, número de pacients, CISH, hibridació in situ cromogènica.

En el cas de ROS1 es prefereix l'ús de l'anticòs ROS1 D4D6 que ha estat avaluat en diferents cohorts en comparació amb els resultats per FISH i actualment es troba en desenvolupament comercial com a kit integrat de diagnòstic (Taula 6). La sobreexpressió de ROS1 en CPCNP és típicament citoplasmàtica, però pot variar segons

les parelles de reordenament amb les que estigui fusionat *ROS1*. L'oncoproteïna de fusió *CD74-ROS1* s'ha associat amb l'expressió de *ROS1* de tipus citoplasmàtic granular amb agregats globulars de proteïna focals o difusos de tinció intensa mentre que, per exemple, la fusió *EZR-ROS1* es correlaciona amb una expressió citoplasmàtica més dèbil i amb accentuació a la membrana (Yoshida, 2014; Boyle, 2015).

TAULA 6. Sensibilitat i especificitat de l'anticòs anti-*ROS1* D4D6 utilitzat en els estudis d'harmonització de la tècnica d'IHQ en comparativa amb la tècnica de FISH.

Estudi	N	Mètode d'avaluació ^a	Criteri	N ROS1	Sensibilitat (%)	Especificitat (%)
Sholl, 2013	218	Intensitat	≥2+	30	100	92
Mescam-Mancini, 2014	121	Intensitat	≥2+	13	100	96,9
Yoshida, 2014	270	<i>H-score</i>	≥150	95*	94	98
Cha, 2014	330	<i>H-score</i>	>100	56*	100	86,4
Cao, 2016	183	Intensitat	≥1+	9	100	96,7
Wu, 2016	238	<i>H-score</i>	≥150	42*	100	100

Abreviatures: N, número de pacients; N ROS1, número de casos ROS1 positius.

^a Mètode d'avaluació: Intensitat, classificació de 0 a 3+; *H-score*, càlcul semiquantitatiu que té en compte tant la intensitat com el percentatge de cèl·lules amb tinció.

* Casos amb algun valor de tinció *H-score* >0.

Una de les limitacions de l'anticòs D4D6 és la detecció d'expressió anòmala en cèl·lules gegants tipus osteoclast i en proliferacions epitelials reactives, incloses àrees d'hiperplàsia pneumocítica de tipus II i metaplàsia bronquiolar (Sholl, 2013). Actualment es troben en desenvolupament altres clons d'anticossos que presenten

una millora en l'especificitat de detecció. L'anticòs anti-ROS1 SP384 ha estat testat amb èxit en una cohort de 43 casos *ROS1* positius i 193 negatius prèviament analitzats per FISH i s'ha calculat una sensibilitat del 93% i especificitat del 100%, valors similars als obtinguts amb l'anticòs D4D6 (Conde, 2019).

Les discrepàncies entre els resultats de FISH i IHQ són freqüents i s'han reportat nombroses series amb casos discordants, la majoria amb expressió de l'oncoproteïna però sense reordenament detectable per FISH. En mostres amb poca infiltració tumoral, per exemple, la IHQ té l'avantatge respecte al FISH en detectar petits grups de cèl·lules tumorals positives dins d'una majoria de cèl·lules no neoplàstiques (Bubendorf, 2016). Cabillic i col·laboradors van publicar l'any 2014 un estudi en 3.244 mostres de CPCNP en les que van fer en paral·lel FISH i IHQ per a *ALK*. Van identificar 150 casos positius (4.6%) dels quals 80 ho van ser per ambdues tècniques (Cabillic, 2014). Aquesta discordança és deguda a la interpretació errònia de patrons de FISH com a positius, especialment quan els percentatges de positivitat són propers al punt de tall del 15% (von Laffert, 2015). També en el sentit contrari, en la interpretació positiva de resultats d'IHQ que haurien de ser considerats negatius o no valorables degut a tinció equívoca per soroll de fons o artefactes preanalítics (Marchetti, 2016). En el cas de *ROS1*, a diferència d'*ALK* el qual té restringida la seva expressió a cèl·lules amb reordenament, l'expressió es pot observar en tumors sense fusions, principalment generant un patró de tinció heterogeni focal (Mescam-Mancini, 2014). Tot i així, la tendència ha estat buscar que la IHQ esdevingui un mètode de determinació equivalent al FISH i, mentre que en l'estudi d'*ALK* ja és així, en el cas de *ROS1* les tècniques ortogonals són de moment necessàries.

DETECCIÓ DE FUSIONS PER SEQÜENCIACIÓ MASSIVA

Per tal de fer front a la creixent demanda diagnòstica de diferents alteracions genètiques en les mostres de CPCNP, a partir de l'any 2013 comença la implantació de la tecnologia de NGS mitjançant panells dirigits (Frampton, 2013). De forma resumida, aquesta tècnica es basa en l'amplificació de seqüències obtingudes de múltiples locus de la mostra a interrogar. Primer s'alineen amb el genoma de referència i després es realitza un anàlisi de variants amb eines bioinformàtiques per tal d'identificar les diferències entre seqüències que poden representar canvis genòmics aberrants (Metzker, 2010). A més, el gran avantatge de la NGS és que representa una solució ràpida i escalable ja que és capaç d'avaluar amb una mateixa tècnica totes les classes d'alteracions clínicament rellevants que pot tenir una mostra de CPCNP: mutacions puntuals, petites insercions i delecions (INDELS), variacions de número de còpies (CNVs) i variants estructurals com són les fusions. D'aquesta manera es possible realitzar un diagnòstic molecular complet evitant l'ús de diferents tests diagnòstics per cada alteració i optimitzant la mostra necessària, que en el cas del CPCNP és usualment limitada.

S'han anat desenvolupant diversos mètodes de seqüenciació NGS amb èxit i aplicables a laboratoris de diagnòstic, dels que destaquen els basats en amplicons i els basats en captura d'híbrids (Figura 12). En general, quan es tracta de determinar diferents locus rellevants en el diagnòstic molecular, es prefereix la seqüenciació d'amplicons per obtenir una profunditat de lectura elevada que augmenti la sensibilitat de l'assaig, mentre que la seqüenciació per captura d'híbrids és l'enfocament a triar quan es vol tenir una cobertura més àmplia però comprometent la profunditat. En el cas de

l'estudi de reordenaments, a nivell teòric s'hauria d'utilitzar la NGS per captura d'híbrids ja que es necessita capturar fragments grans de DNA que continguin àmplies regions intròniques, que és on es produeixen els punts de trencament amb més freqüència. La sensibilitat d'aquest mètode però és limitat, i s'ha de valorar tenint en compte els potencials falsos negatius en les mostres amb poca infiltració tumoral. A més, la detecció dels reordenaments a partir de DNA presenta més dificultats en quan a l'anàlisi bioinformàtic ja que alguns algorismes poden descartar seqüències curtes que capturen dos gens diferents a la vegada i podrien suposar un reordenament (Abo, 2015).

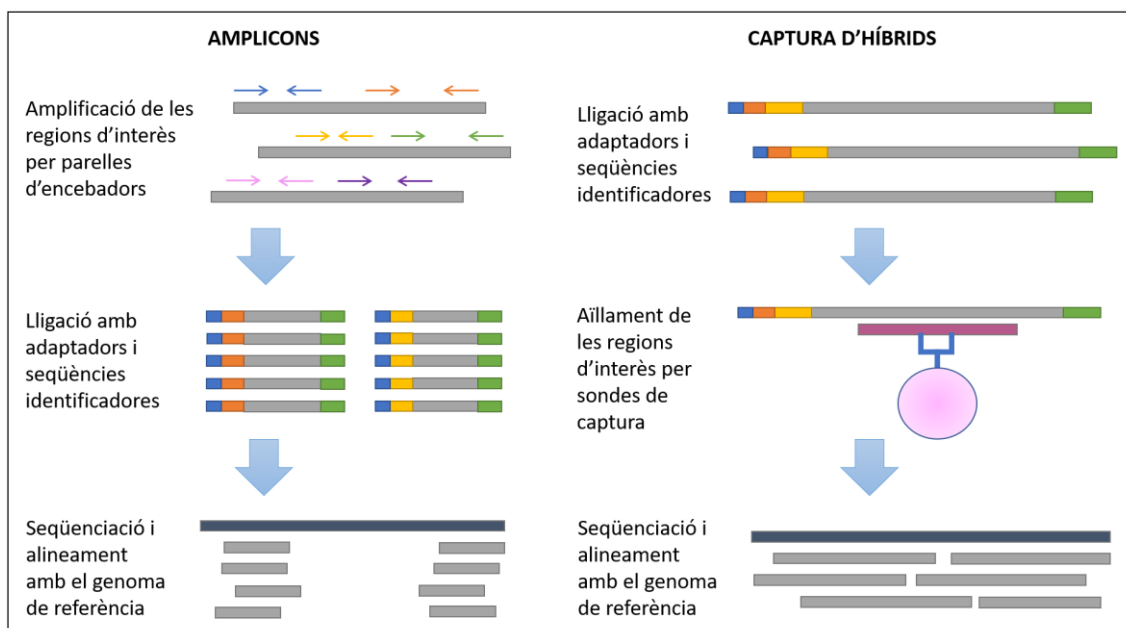


FIGURA 12. Amplificació per parelles d'encebadors o captura per sondes de les regions d'interès i lligació amb adaptadors per generar la llibreria de NGS a seqüenciar. Imatge adaptada de Jennings, 2017.

Una altra estratègia per a la detecció dels reordenaments d'*ALK* i *ROS1* és l'assaig de NGS basat en amplicons a partir d'àcid ribonucleic (RNA) com a material de partida (Schröder, 2019). El RNA de la mostra es retrotranscriu a cDNA, s'amplifica mitjançant

encebadors específics per a les diferents parelles de reordenament descrites, s'identifica amb petites seqüències de nucleòtids úniques per cada mostra, i es seqüencia. Aquest enfocament és aplicable a la rutina diagnòstica d'un laboratori de biologia molecular ja que permet treballar a partir del RNA provinent de mostres FFPE malgrat aquest pugui presentar problemes de preservació (Vendrell, 2017). No obstant això, l'assaig de NGS per amplicons a partir de RNA necessita d'adaptacions per evitar els falsos negatius que suposarien els casos en que la fusió continguda a la mostra no es trobés representada entre les parelles d'encebadors del test (Pfarr, 2016). Per això, les tecnologies de seqüenciació per amplicons basades en RNA incorporen assajos que permeten detectar l'expressió desequilibrada de les regions 3' i 5' dels gens de fusió (Beadling, 2016).

Actualment, els diferents panells de NGS que s'utilitzen en els laboratoris de biologia molecular varien en funció dels requisits de la mostra, de l'àcid nucleic avaluat, de la relació cost-rendiment, i dels gens i tipus d'alteracions interrogades (Hovelson, 2015). Per poder aplicar amb èxit la NGS en el diagnòstic molecular del CPCNP es necessari avaluar els següents factors: selecció acurada del teixit tumoral (evitant àrees necròtiques) i confirmant que el contingut de cèl·lules tumorals compleix els requisits mínims de l'assaig de NGS; ús d'una quantitat correctament validada de DNA/RNA de partida; i establiment de la profunditat i cobertura mínima de seqüenciació per cada locus interrogat (Kanagal-Shamanna, 2014; Goswami, 2016).

Un gran avantatge que presenta l'estudi de fusions d'*ALK* i de *ROS1* per NGS és la capacitat de detecció simultània d'altres alteracions, les quals poden implicar mecanismes de resistència als tractaments TKIs (Gainor, 2016; Roys, 2019). En els

panells de NGS, a part dels reordenaments, s'interroguen regions on es troben mutacions secundàries dels gens *ALK* i *ROS1*, així com mutacions o amplificacions en altres gens que poden representar mecanismes bypass de resistència. Aquestes alteracions tenen com a resultat una disminució de la unió de l'inhibidor al domini del RTK d'*ALK* o *ROS1* anòmal de manera que la molècula deixa de ser efectiva (Awad, 2013; Gainor, 2017). D'una forma similar als casos de CPCNP amb mutacions sensibilitzadores d'*EGFR*, gairebé tots els tumors *ALK* i *ROS1* reordenats desenvoluparan resistència als tractament TKIs (Lin, 2017). Els mecanismes de resistència en el cas dels reordenaments són més diversos i afecten menys freqüentment al propi receptor que en el cas de la inhibició d'*EGFR* (Gainor, 2016). La primera mutació de resistència d'*ALK* reportada va ser la mutació p.L1196M que altera un residu inferior de la butxaca d'unió al ATP en el domini catalític i disminueix la capacitat d'unió de crizotinib (Choi, 2010). L'alteració p.G1269A també es troba en la butxaca que uneix l'ATP i dificulta la unió de crizotinib i ambdós es consideren anàlegs a la mutació p.T790M d'*EGFR* (Doebele, 2012). La mutació frontal p.G1202R representa una altra classe de mutacions de resistència d'*ALK* ja que afecta a la unió dels fàrmacs a causa d'un obstacle estèric per modificació de l'estructura peptídica. Aquesta alteració es troba més freqüentment relacionada amb l'aparició de resistències als tractaments amb ceritinib i alectinib (Friboulet, 2014; Ou, 2014). L'amplificació d'*ALK* es produeix amb menys freqüència que les mutacions puntuals secundàries del propi gen però és una altra causa reconeguda de resistència adquirida a crizotinib (Katayama, 2012). L'altre categoria de mecanismes de resistència són aquells independents d'*ALK* que representen mecanismes de bypass que, malgrat la inhibició amb TKIs, reactiven la senyalització cel·lular necessària per la supervivència

tumoral. En són exemples l'activació de les vies d'EGFR (Sasaki, 2011), la desregulació d'altres membres de la família de lligands i receptors HER (Tanizaki, 2012), l'amplificació de *MET* en casos tractats amb alectinib (Gouji, 2014) i l'activació de les rutes efectores RAS-MAPK (Hrustanovic, 2015).

En el cas dels mecanismes de resistència de la teràpia anti-ROS1 hi ha menys mecanismes que els descrits per a ALK, consistent amb la baixa prevalença de casos que en dificulta la seva comprensió. Les mutacions més freqüents en el lloc d'unió de crizotinib són la p.G2032R i p.D2033N mentre que p.L2026M és la més freqüent en la butxaca que uneix l'ATP al domini catalític (Sehgal, 2018). Les alteracions de tipus bypass es donen de forma similar a les descrites en els casos *ALK* reordenats per activació de les vies d'EGFR (Davies, 2013) i, particularment, per activació del gen *KIT* (Dziedziszko, 2016). L'estudi d'aquests mecanismes ha anat augmentant gràcies a que la NGS es troba implementada en molts laboratoris i això permet fer un diagnòstic més exhaustiu del tumor. Generalment el criteri mèdic de tractament en aquests casos és l'alternança entre els diferents TKIs aprovats ja que els mecanismes de resistència van associats a la molècula inhibidora específica amb la que s'està tractant al pacient.

Els estudis comparatius entre els resultats per NGS i per les tècniques de FISH i IHQ per a la detecció de reordenaments d'*ALK* i de *ROS1* són actualment limitats. De moment les dades demostren una bona concordança entre els assajos malgrat apunten discrepàncies, sobretot entre el FISH i la resta de tècniques (Zugazagoitia, 2018; Letovanec, 2018). La comparativa entre els tres assajos ha estat també objecte d'estudi d'aquesta tesi doctoral de la que se'n presenten els resultats en el segon treball que s'hi inclou (Clavé, 2019).

HIPÒTESI I OBJECTIUS

El tractament dels pacients amb CPCNP avançat ha canviat dràsticament en els últims anys degut al desenvolupament de teràpies dirigides basades en la inhibició selectiva d'alteracions oncogèniques. Provada la millora en la supervivència i qualitat de vida dels pacients és necessari el correcte diagnòstic molecular d'aquestes alteracions. Atesa la creixent demanda d'anàlisis de nous biomarcadors, la baixa freqüència dels reordenaments d'*ALK* i de *ROS1*, i la limitació de material de les mostres de CPCNP, la nostra hipòtesi és que un estudi molecular precís avaluant diferents tècniques de detecció pot ajudar a l'optimització del maneig del curs clínic dels pacients amb CPCNP portadors d'aquests reordenaments.

Els objectius d'aquesta tesi doctoral són:

1. Determinar la prevalença dels reordenaments del gen *ROS1* i descriure les diferents parelles de fusió mitjançant FISH en una cohort de pacients amb CPCNP procedents de la rutina diagnòstica.
2. Investigar la prevalença i les possibles implicacions clíniques de les alteracions de número de còpies del gen *ROS1*.
3. Explorar la correlació entre les tècniques de FISH, IHQ i NGS per a la detecció de reordenaments d'*ALK* i *ROS1*.
4. Identificar els possibles patrons de FISH fals positius que poden aparèixer en comparar mètodes d'avaluació ortogonals.
5. Caracteritzar les coalteracions moleculars en casos amb reordenaments dels gens *ALK* i *ROS1*.

RESULTATS

Aquesta memòria de tesi doctoral titulada “Diagnòstic molecular de biomarcadors predictius en pacients amb càncer de pulmó de cèl·lula no petita” es presenta com a compendi de dues publicacions en les que el doctorant Sergi Clavé Safont consta com a primer autor i són fruit directament del treball de tesi.

ARTICLE 1: Clavé S, et al. *ROS1 copy number alterations are frequent in non-small cell lung cancer*. *Oncotarget*. 2016;7:8019-28.

doi: 10.18632/oncotarget.6921. PMID: 30898567

Índexs de qualitat: IF2016 = 5,168; 1er quartil en la categoria *Oncology*

ARTICLE 2: Clavé S, et al. *Next-generation Sequencing for ALK and ROS1 Rearrangement Detection in Patients With Non-small-cell Lung Cancer: Implications of FISH-positive Patterns*. *Clinical Lung Cancer*. 2019;20:e421-9.

doi: 10.1016/j.clc.2019.02.008. PMID: 30898567

Índexs de qualitat: IF2016 = 4,204; 1er quartil en les categories *Oncology* i *Pulmonary and Respiratory Medicine*

ARTICLE 1

ROS1 COPY NUMBER ALTERATIONS ARE FREQUENT IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER

Sergi Clavé^{1,2}, Javier Gimeno³, Ana M. Muñoz-Mármol⁴, Joana Vidal⁵, Noemí Reguart⁶, Enric Carcereny⁷, Lara Pijuan³, Sílvia Menéndez^{2,3}, Álvaro Taus⁵, José Luís Mate⁴, Sergio Serrano³, Joan Albanell^{2,5}, Blanca Espinet^{1,2}, Edurne Arriola^{2,5} i Marta Salido^{1,2}

¹ Laboratori de Citogenètica Molecular, Hospital del Mar, Barcelona; ² Programa de Recerca en Càncer, Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM), Barcelona; ³ Servei de Patologia, Hospital del Mar, Barcelona; ⁴ Servei d'Anatomia Patològica, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona; ⁵ Servei d'Oncologia Mèdica, Hospital del Mar, Barcelona; ⁶ Servei d'Oncologia Mèdica, Institut Clínic de Malalties Hematològiques i Oncològiques (ICMHO), Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona; ⁷ Departament d'Oncologia Mèdica, Institut Català d'Oncologia (ICO), Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona.

En aquest primer treball es van examinar els reordenaments de *ROS1* mitjançant FISH amb sondes de trencament en 314 pacients diagnosticats de CPCNP provinents de l'Hospital del Mar i de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. D'aquests, 47 eren mostres quirúrgiques de tumors que es van incloure en *arrays* de teixit per duplicat, tenint en compte dues àrees histològicament diferents. En aquests es va analitzar l'heterogeneïtat en l'expressió per IHQ així com les possibles CNAs de *ROS1* tenint en compte la ploïdia utilitzant una sonda pel centròmer del cromosoma 6. En els casos positius, per a caracteritzar els gens de fusió de *ROS1* més freqüentment descrits (*CD74*, *SLC34A2*, *EZR* i *SDC3*), es van desenvolupar sondes de trencament no-comercials a partir

d'una llibreria de cromosomes artificials bacterians. També es va estudiar l'expressió i els diferents patrons de tinció de *ROS1* per IHQ amb l'anticòs D4D6 en els casos positius per FISH.

Com a resultats de l'article destaca la baixa prevalença dels reordenaments de *ROS1* en la població caucàsica, amb un 1,8% de casos positius (n= 5), similar a la descrita en la literatura. Pel que fa a la identificació de parelles de reordenament, es van poder caracteritzar dos gens de fusió coneguts en tres pacients: *CD74* i *SLC34A2*. Clínicament, quatre dels cinc pacients *ROS1* reordenats eren dones, no fumadores i amb histologia d'ADC. Tots els casos reordenats també presentaven expressió positiva de *ROS1* detectable per IHQ. De manera rellevant, en referència a les CNAs dels casos *ROS1* no reordenats, es van detectar un 38% de casos amb guanys/amplificacions i un 25% amb delecions. A més, l'estudi de FISH als *arrays* de teixit va permetre identificar heterogeneïtat en el número de còpies del cromosoma 6, on localitza *ROS1* (6q22). No es va detectar que aquestes CNAs tinguessin repercussió en el curs clínic dels pacients *ROS1* no reordenats.

Oncotarget. 2016;7:8019-28. doi: 10.18632/oncotarget.6921.

Acceptat: 6 de gener de 2016

ROS1 copy number alterations are frequent in non-small cell lung cancer

Sergi Clavé^{1,2}, Javier Gimeno³, Ana M. Muñoz-Mármol⁴, Joana Vidal⁵, Noemí Reguart⁶, Enric Carcereny⁷, Lara Pijuan³, Sílvia Menéndez^{2,3}, Álvaro Taus⁵, José Luís Mate⁴, Sergio Serrano³, Joan Albanell^{2,5}, Blanca Espinet^{1,2}, Edurne Arriola^{2,8} and Marta Salido^{1,2}

¹ Laboratori de Citogenètica Molecular, Servei de Patologia, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

² Programa de Recerca en Càncer, IMIM (Institut Hospital del Mar de Investigacions Mèdiques), Barcelona, Spain

³ Servei de Patologia, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

⁴ Servei de Anatomia Patològica, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

⁵ Servei de Oncologia Mèdica, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

⁶ Servei de Oncologia Mèdica, ICMHO, Hospital Clinic Barcelona, Barcelona, Spain

⁷ Departament de Oncologia Mèdica, Institut Català de Oncologia (ICO), Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

⁸ Cancer Sciences Unit, University of Southampton. Southampton, United Kingdom

Correspondence to: Sergi Clavé, **email:** sclave@imim.es

Keywords: ROS1, FISH, copy number alterations, heterogeneity, IHC

Received: September 17, 2015

Accepted: January 06, 2016

Published: January 15, 2016

ABSTRACT

Objectives: We aimed to determine the prevalence and partners of *ROS1* rearrangements, to explore the correlation between FISH and IHC assays, and to investigate clinical implications of *ROS1* copy number alterations (CNAs).

Methods: A total of 314 NSCLC patients were screened using *ROS1* FISH break-apart probes. Of these, 47 surgical tumors were included in TMAs to analyze *ROS1* heterogeneity assessed either by FISH and IHC, and chromosome 6 aneusomy. To characterize *ROS1* partners, probes for *CD74*, *EZR*, *SLC34A2* and *SDC3* genes were developed. *ROS1* positive FISH cases were screened also by IHC.

Results: Five patients were *ROS1* positive (1.8%). We identified two known fusion partners in three patients: *CD74* and *SLC34A2*. Four out of five *ROS1* rearranged patients were female, never smokers and with adenocarcinoma histology. Rearranged cases were also positive by IHC as well. According to *ROS1* CNAs, we found a prevalence of 37.8% gains/amplifications and 25.1% deletions.

Conclusions: This study point out the high prevalence of *ROS1* CNAs in a large series of NSCLC. *ROS1* gains, amplifications and deletions, most of them due to chromosome 6 polysomy or monosomy, were heterogeneous within a tumor and had no impact on overall survival.

INTRODUCTION

Over the last decade there have been important advances in understanding the biology of non-small cell lung cancer (NSCLC), identifying oncogene-driven subtypes of tumors such as epidermal growth factor receptor (*EGFR*) mutations or anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) and ROS proto-oncogene 1 (*ROS1*) rearrangements [1-3]. Targeted therapies based on molecular diagnostics have opened a new era of personalized medicine in

NSCLC treatment, and during the last years new predictive biomarkers have emerged [4, 5].

ROS1 gene (located at chromosome 6q22) encodes for a receptor tyrosine kinase which belongs to the insulin receptor family [6]. In a similar way to *ALK* aberrant kinase activity, rearrangements involving the *ROS1* gene lead to a constitutively activated downstream signaling of several oncogenic pathways [7, 8]. *ROS1* rearrangements are rare events accounting for up to 0.6-1.8% of patients with NSCLC [9, 10]. Until now, several

fusion partners (n=12) have been described, being *CD74*, *EZR*, *SLC34A2* and *SDC3* the most prevalent [11, 12]. *ROS1* rearrangements are more commonly found in never or mild smokers patients with adenocarcinoma (ADC) histology and in triple negative (*EGFR/KRAS/ALK*) population, similar to patients with *ALK*-rearranged NSCLC [13, 14].

Crizotinib (Xalkori®, Pfizer), approved by the US Food and Drug Administration (FDA) in treating *ALK* positive NSCLC, binds also with high affinity to *ROS1*-rearranged receptors [15]. In addition to previous case reports [2, 13], a recent study described marked antitumor responses to Crizotinib in patients harboring *ROS1*-rearranged NSCLC [11].

Adequate molecular-based selection is essential for NSCLC patients to achieve optimal results from targeted therapies. Fluorescence in-situ hybridization (FISH) with break-apart probes remains the gold standard method for detecting both *ALK* and *ROS1* rearrangements in lung clinical trials [11, 16]. However, other methods such as immunohistochemistry (IHC) using anti-*ROS1* antibodies could provide a widely available alternative screening method. Despite previous manuscripts described a reasonable correlation between FISH and IHC, more information about IHC sensitivity and specificity is needed [17, 18].

In this study, we analyzed a Spanish cohort of NSCLC to determine the prevalence and specific features of *ROS1* rearranged patients and to explore the correlation between FISH and IHC assays. We also investigated *ROS1* copy number alterations (CNAs) to clarify the correlation between *ROS1* gene alteration and clinicopathological parameters.

RESULTS

Clinicopathological characteristics

The median age was 64 years, 69% were males and 71% were ever smokers with a median cumulative index of 52 packs per year (Table 1). Fifty-two per cent of the study population presented stage IV disease and 83% were ADC. The predominant histological patterns in ADC were acinar and solid (some of them mucinous type), whereas lepidic and micropapillary patterns were less common. Other histological subtypes were: squamous cell carcinoma (SCC), 3%; large cell carcinoma (LCC), 2%; and non-small cell lung carcinoma not otherwise specified (NSCLC NOS), 12% of patients. Patients with SCC were added in the analysis due to their clinical characteristics (non-smoking patients). *KRAS* and *EGFR* mutations were found in 17% and 6% of the samples respectively, whereas 1% (4 cases) presented *ALK* rearrangements.

ROS1 rearrangements

ROS1 FISH was evaluable in 283 cases (90.1%). The basket cases were due to insufficient tumor material or FISH assay failure. *ROS1* rearrangements were found in five cases (1.8%); three of them showed a typical rearranged pattern with deletion of the fused allele (1O1G) and the other two cases had an atypical rearranged pattern with 5' *ROS1* deletion (1F1G) and with gains (1F2G) (Figure 1). Of note, one of the typical rearranged cases was heterogeneous showing a negative area with *ROS1* deletion. The mean percentage of positive cells in all cases was 70%. Regarding to *ROS1* partners, they were identified in three cases: two harbored a t(5;6) (q32;q22) with *CD74-ROS1* fusion, one of them showing isolated 5' *CD74* signals; and the third presented a t(4;6) (q15.2;q22) with *SLC34A2-ROS1* rearrangement.

Four of these five tumors presented ADC histology, the other one classified as NSCLC NOS. Two of the confirmed ADC had a predominantly solid pattern, whereas the two remaining cases had a predominantly papillary pattern. Regarding to *ROS1* IHC pattern of staining, three out of the five cases presented a cytoplasmic predominant pattern whereas only one case presented a membranous predominant pattern (with mild +1 cytoplasmic associated *ROS1* staining). Material was not available from the last case to perform *ROS1* IHC assay. Characteristics of *ROS1* positive cases are presented in Table 2.

We observed a significant association between *ROS1* rearrangement and female gender ($p=0.039$) as well as with non-smoking history ($p=0.030$).

ROS1 copy number alterations

In *ROS1* non-rearranged cases, gains were the most prevalent CNAs observed in 96 cases (33.9%) and in a high proportion of cells (mean percentage of 48%). Using CEP6 control probe, we confirm that gain of *ROS1* was due to chromosome 6 polysomy. *ROS1* amplifications were identified in eleven cases (3.9%), all of them with ADC histology. Amplified cases were classified in two groups: patients that had *ROS1* signal clusters (n=3) and patients with a chromosome 6 high polysomy (n=8) (Figure 2). In addition, 71 cases (25.1%) had *ROS1* deletions with a mean percentage of *ROS1* deleted cells of 42%. After CEP6 hybridization, heterogeneity in the enumeration of chromosome 6 was observed. Both monosomy and polysomy of CEP6 were observed in the same tumor sample.

All the specimens that were negative for the *ROS1* rearrangements by FISH presented negative IHC *ROS1* staining. In some of them, mild (+1/+2) and diffuse cytoplasmic staining was detected (presenting H-score: <200). If only 3+ (diffusely) expressing tumors were

Table 1: Clinicopathological features of the 314 *ROS1*-screened NSCLC patients

Feature	Global population	<i>ROS1</i> positive (n = 5)	p-value
	n (%)		
Median Age: y (range) (n = 307)	64 (25-91)	59 (42-74)	0.503
Sex (n = 309)			
Male	212 (69)	1 (20)	0.039
Female	97 (31)	4 (80)	
Smoking status (n = 287)			
Non smoker	82 (29)	4 (80)	0.030
Ever smoker	205 (71)	1 (20)	
Stage (n = 284)			
I	63 (22)	0	0.646
II	23 (8)	0	
III	51 (18)	1 (20)	
IV	147 (52)	4 (80)	
Histology (n = 309)			
ADC ¹	256 (83)	4 (80)	0.827
SCC ²	11 (3)	0	
LCC ³	6 (2)	0	
NSCLC NOS ⁴	36 (12)	1 (20)	
<i>KRAS</i> (n = 210)			
Wild-type	174 (83)	5 (100)	1.000
Mutated	36 (17)	0	
<i>EGFR</i> (n = 276)			
Wild-type	260 (94)	5 (100)	1.000
Mutated	16 (6)	0	
<i>ALK</i> (n = 311)			
Non-rearranged	309 (99)	5 (100)	1.000
Rearranged	4 (1)	0	

¹Adenocarcinoma²Squamous cell carcinoma³Large cell carcinoma⁴Non-small cell lung carcinoma not otherwise specified**Table 2: Histopathological features of *ROS1*-rearranged specimens**

Case	FISH pattern ¹	Fusion partner	H-Score	Staining pattern	Sample	Histology, predominant
<i>ROS1</i> 1	1O1G	<i>SLC34A2</i>	400	Cytoplasmic	Visceral pleura	NSCLC NOS ² , N/A ³
<i>ROS1</i> 2	1F2G	<i>CD74</i>	300-400	Cytoplasmic	Lung	ADC ⁴ , acinar
<i>ROS1</i> 3	1O1G	N/A	400	Membranous	Lung	ADC, solid
<i>ROS1</i> 4	1O1G	<i>CD74</i>	300-400	Cytoplasmic	Lung	ADC, papillary
<i>ROS1</i> 5 ⁵	1F1G	N/A	N/A	N/A	Lung	ADC, papillary

1 FISH pattern indicates the result of the *ROS1* break-apart probe used, labeled 5'*ROS1* Spectrum orange (O) and 3'*ROS1* Spectrum green (G).

2 Non-small cell lung carcinoma not otherwise specified

3 Not available

4 Adenocarcinoma

5 Material was not available to perform FISH fusion partner studies and *ROS1* IHC assay.

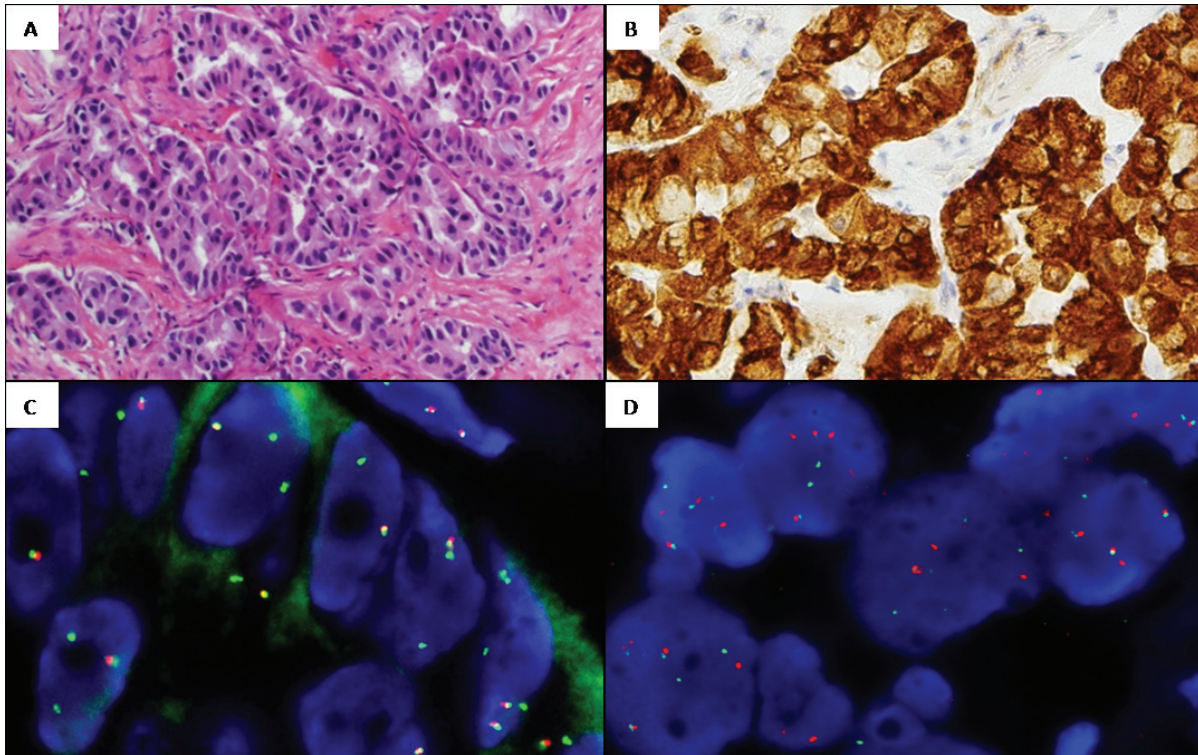


Figure 1: Representative images from case 2 *ROS1*-rearranged: **A.** Hematoxylin and eosin, 20x. Adenocarcinoma showing a predominantly acinar pattern. **B.** *ROS1* IHC, 20x. Cytoplasmatic +3/+4 staining pattern. **C.** *ROS1* FISH, 100x. Break-apart probe showing an atypical rearranged pattern with 5' *ROS1* deletions (1F2G). **D.** CD74 FISH, 100x. Break-apart probe showing a typical rearranged pattern with fused and split signals (2F2O2G).

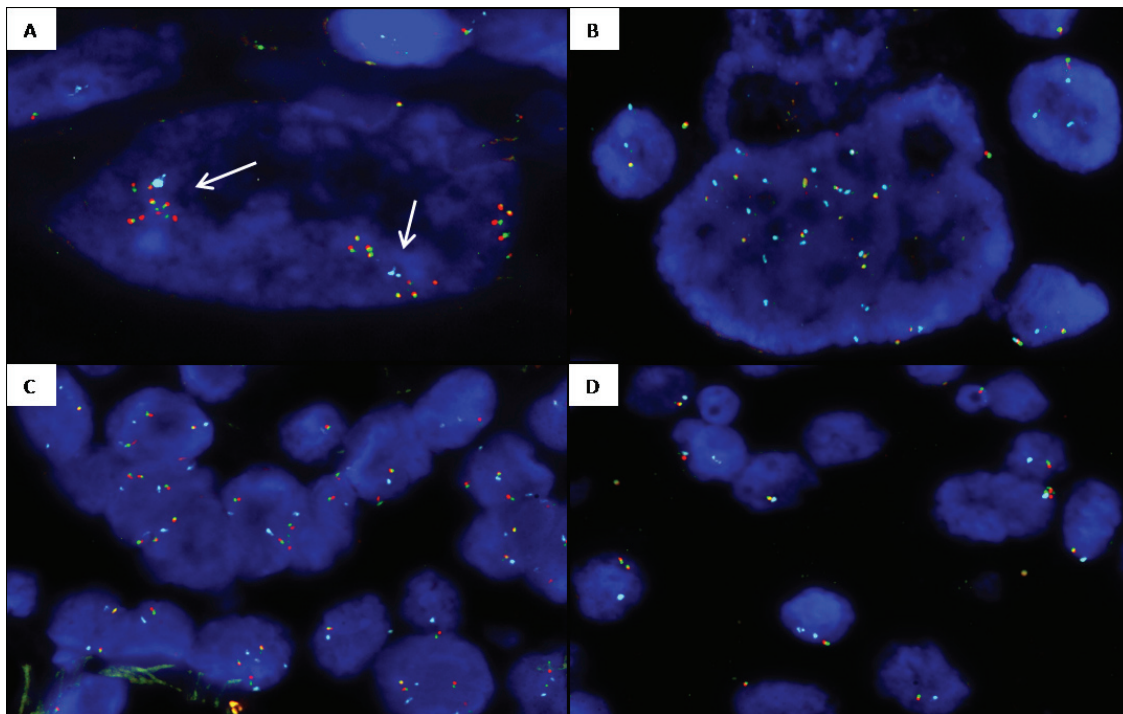


Figure 2: Representative images from *ROS1* copy number alterations detected by FISH (*ROS1* break-apart probe (spec.orange/green fusion signals) and CEP6 probe (spec.aqua signals)). **A.** *ROS1* cluster amplification (arrows) in a nuclei with two copies of CEP6. **B.** *ROS1* amplification with chromosome 6 high polysomy (15 *ROS1* and 15 CEP6 copies). **C.** Polysomic nuclei with 3-4 copies of chromosome 6 and 3-4 copies of *ROS1*. **D.** Case showing heterogeneity of *ROS1* deletion: nuclei with *ROS1* monosomy (1 *ROS1* 1 CEP6) and nuclei with *ROS1* deletion and chromosome 6 disomy (1 *ROS1*/ 2 CEP6).

considered positive, ROS1 IHC is 100% sensitive and 87.5% specific for the presence of *ROS1* rearrangements by FISH. Of note, in some cases mild (+1) ROS1 cytoplasmic staining was detected in benign type II pneumocytes.

Heterogeneity assessment

Focusing on heterogeneity in TMAs, 161 out of 192 cores were assessable for *ROS1* FISH analysis and 174 for ROS1 IHC (Figure 3). As no positive *ROS1* cases were found in the TMAs, the heterogeneity assessment was performed considering only *ROS1* CNAs. When evaluating CNAs as a categorical variable (gain, amplification, deletion and disomic), Kappa agreement index for *ROS1* FISH status between cores A and B was 0.24. When ROS1 IHC status was analyzed considering 0, +1, +2 and +3 score criteria, no differences in classification between cores A and the remaining three cores (B to D) were observed. The result changed from negative to borderline +2 only in four cases.

Survival analysis

We sought to explore the potential impact on survival of *ROS1* alterations, analyzed only in patients with advanced disease (stages III-IV). Out of 144 cases with available data, 94 death events occurred during the follow-up period. The median follow-up time for the whole series was 15.2 months (95% CI 12-18.3) and median survival time was 26.2 month. One, two and three-year survival rates were 59.1%, 33% and 21.6%, respectively. The median survival time in *ROS1*-positive patients was significantly higher: 69.8 month vs. 13.7 months (95% CI 9.9-17.5) in the *ROS1*-negative group ($p=0.028$) (Figure 4). All positive patients received Crizotinib treatment. Setting survival analysis according to CNAs, neither copy number gains nor deletions of *ROS1* gene had impact on survival.

DISCUSSION

We examined *ROS1* status in a cohort of patients with NSCLC. The main findings of our study are the following: (1) the prevalence of *ROS1* gene rearrangement in a Spanish cohort is 1.8%; (2) *ROS1*-rearranged cases are significantly associated with female gender and never smoker patients; (3) IHC correlates with FISH in *ROS1*-rearranged cases; (4) *ROS1* CNAs are frequent, with a remarkably 33.9% of gains, 3.9% of amplifications, and 25.1% of deletions; (5) *ROS1* CNAs had no impact on overall survival.

In previous studies, *ROS1* rearrangements were detected in 0.8 to 2.5% of unselected NSCLC patients [12, 19]. Here we present a cohort of cases evaluated for *ROS1*

status using FISH that confirms the low frequency of *ROS1* rearrangements in a Caucasian population. Similar to prior reports, we found an association of *ROS1* rearrangement with non-smoking history [19, 20]. Moreover our study reports an association with female patients. The clinical profile of these patients is remarkably similar to that of *ALK*-rearranged, including features like gender and non-smoking history [13] and also advanced stage [21]. As recent publications demonstrate, the frequency of *ROS1* rearrangements in clinically selected patients is higher, reaching values of 7.4% [18]. Giving that fact, a properly clinical selection can significantly enrich for the incidence of *ROS1* rearrangements in the tested population.

ROS1 rearranged cases were detected also with ROS1 D4D6 IHC. In previous studies, FISH and IHC had a good correlation although optimal IHC criteria need to be established [9, 17]. As other authors mentioned, *ROS1* is expressed in NSCLC without concomitant translocation [22] and also some cases with *ROS1* rearrangements detected by FISH have low protein expression suggesting a low sensitivity of IHC [9, 23]. In our hands, IHC analysis optimally detects *ROS1* positive cases although additional studies are needed to consider this method as a screening routine test.

Regarding FISH characterization of positive cases, we identify two known fusion partners: *CD74* and *SLC34A2*. Clinically, the small numbers of cases preclude any correlation between the specific fusion partner and outcome [12, 24] as well as to date, no correlation has been observed between the type of *ROS1* rearrangement and clinical response to Crizotinib [11]. Next generation sequencing (NGS) techniques could be a better approach to identify all *ROS1* fusion genes, due to the high number of fusion partners described. Still, the main limitation of these techniques is to have sufficient material to be studied [25].

Regarding *ROS1* CNAs, we found a high prevalence of *ROS1* gene copy number gains without impact in overall survival. Jin et al. (2015) recently reported that *ROS1* gains were significantly associated with both shorter disease-free survival and shorter overall survival [19]. It is remarkable that they only found 4.8% of cases with *ROS1* gains whereas in our cohort the percentage of samples with gains/amplifications was significantly higher (37.8%). They studied unselected cohort of surgically resected NSCLC patients, and found that copy number gains are more common in male patients with squamous histology. Most of the patients included in our study had a stage III-IV (70%) with a low representation of squamous histology (3%). Differences in patient selection could explain discrepancies. In our series, amplifications were identified in only eleven specimens, all of them presenting signal clusters or chromosome 6 high polysomy in large cells. Remarkably, ROS1 protein expression was not detectable in any of these cases suggesting that amplification might not be a biologically relevant event or predict response to

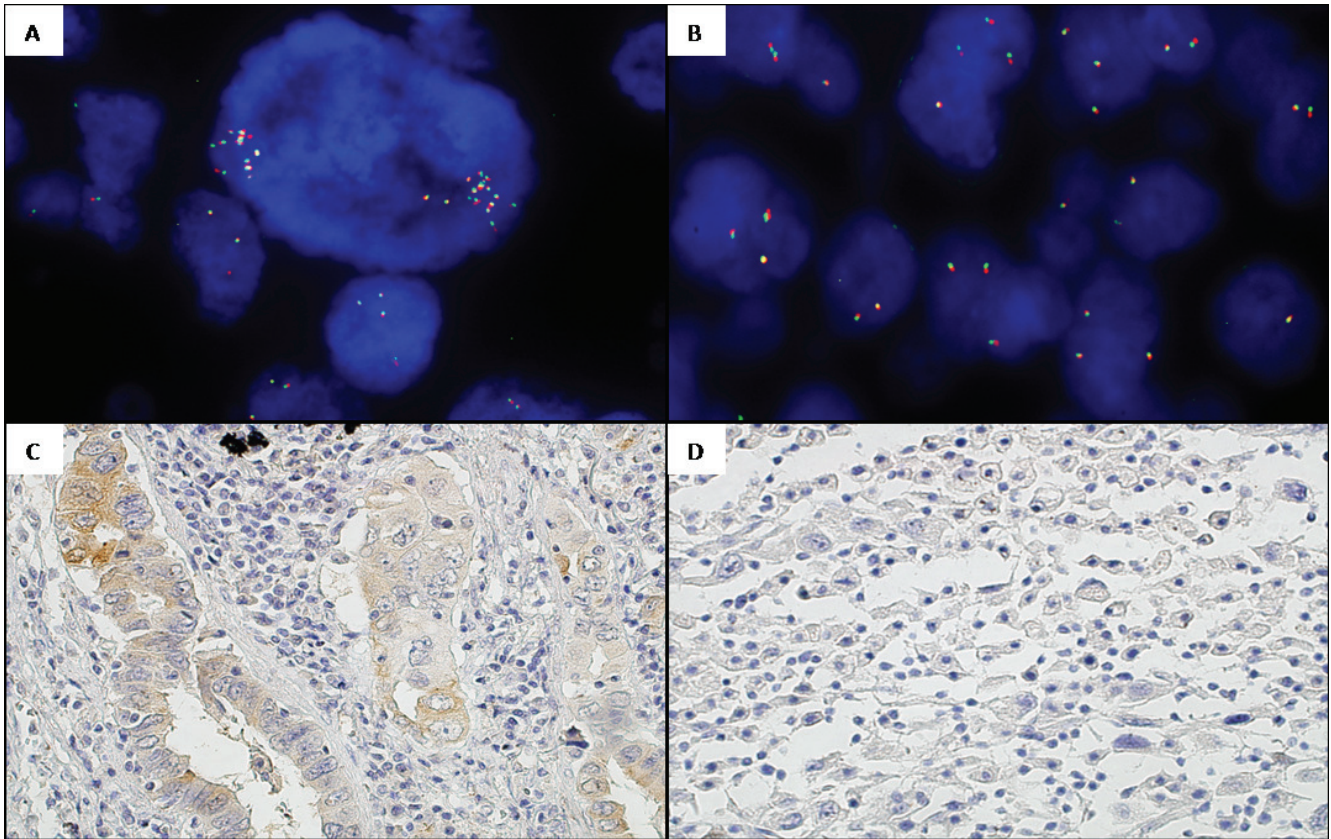


Figure 3: Intra-tumor heterogeneity regarding *ROS1* status by FISH and IHC in one TMA case. **A.** *ROS1* FISH, 100x. Core 1: Negative *ROS1* presenting cells with focal amplifications. **B.** *ROS1* FISH, 100x. Core 2: Disomic *ROS1* cells and nuclei with *ROS1* gene gains without amplification. **C.** *ROS1* IHC, 20x. Core 1: *ROS1* +1/+2 predominantly acinar. **D.** *ROS1* IHC, 20x. Core 2: *ROS1* 0 discohesive (sarcomatoid).

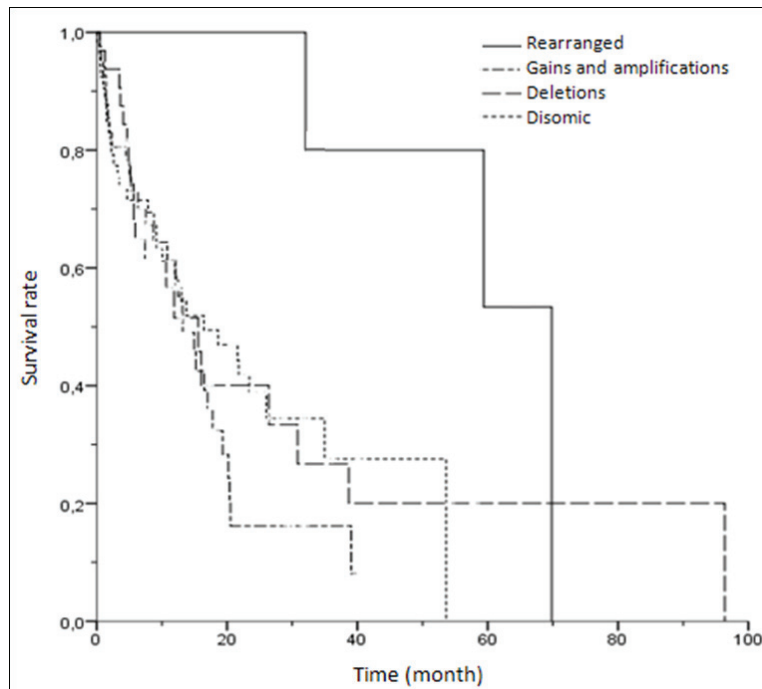


Figure 4: Kaplan-Meier univariate analysis of survival rates among patients with different *ROS1* FISH results (rearranged, gains/amplifications, deletions and disomic cases) ($p = 0.087$).

ROS1 inhibitors [26].

Additionally, the current study demonstrates that *ROS1* gene copy number is heterogeneous within surgical NSCLC specimens. This finding has potential diagnostic implications considering that in our routine clinical practice endoscopic, core-needle biopsies or cytology samples containing only a small part of tumor were used to make treatment decisions.

Interestingly, our study is the first to report a high prevalence of *ROS1* deletions. Heterogeneity in the enumeration of chromosome 6 was observed, being 6q deletion or monosomy or both, the cause of *ROS1* loss. Previous cytogenetic studies demonstrated that loss of 6q, where *ROS1* gene is located, is one of the commonest chromosomal aberrations in lung ADC [27, 28]. So, as shown in our cohort, it is expected to observe *ROS1*-positive samples with concomitant deletion of *ROS1* non-rearranged allele. Particularly, one of the *ROS1* positive tumors exhibits two distinct areas, one with *ROS1* gene deletion without rearrangement and the other with positive *ROS1* 101G pattern suggesting that even though *ROS1* rearrangements are driver mutations, 6q deletion/monosomy could occur as a primary event in NSCLC. Opposed to the other *ROS1* positive patients that elicited a partial response to Crizotinib, this patient did not respond, suggesting that heterogeneity of genetic alterations could explain differences in response to treatments.

Our study demonstrates a significant increased median overall survival time for *ROS1*-positive compared to *ROS1*-negative NSCLC patients (69.8 vs. 13.7 month) ($p=0.028$). This result is consistent with recently data reported by Scheffler et al. (2015): *ROS1* seems to be one of the best prognostic molecular markers in NSCLC and stays in line of recent reports pointing the high efficacy of Crizotinib treatment for these patients [29, 30].

In conclusion, our study confirms the low prevalence of *ROS1* rearrangements in Spanish NSCLC patients and shows a high prevalence of *ROS1* CNAs that should be taken into account when assessed by FISH although do not present associated clinical implications. *ROS1* break-apart FISH is herein validated as a reliable method to diagnose *ROS1* rearrangements and also as a detailed method that helps us to understand the biology of NSCLC tumors more deeply.

MATERIAL AND METHODS

Study population

A total of 314 formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) samples referred between 2012 and 2014 were available for this study. Material confirmed for NSCLC (surgical specimens, core-needle biopsies or cytological

cell-blocks) was screened for *ROS1* rearrangements using FISH in two Spanish centers: Hospital del Mar, Barcelona (n=247), and Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona (n=67). *ROS1* FISH was performed in sequence to *EGFR*, *KRAS* and *ALK* testing. This project was approved by the local ethics committee (CEIC-IMAS) and all patients provided written informed consent. Clinical data were extracted from medical records and included age, sex, smoking history, tumor disease stage and clinical follow-up information.

Tissue microarray construction

Based on tissue availability, 47 surgically resected tumors from our Institution were selected to construct three tissue microarrays (TMAs) [31]. Briefly, original hematoxylin and eosin-stained sections were reviewed from each patient to determine different malignant areas and to identify benign lung tissue. Three tissue cores were obtained from each patient, two of them containing different histological areas of the carcinoma (named A and B) and the third containing benign lung parenchyma. The cores then were brought into a new recipient and a paraffin block was constructed using a tissue microarrayer (Beecher Instruments, Sun Prairie WI). To assess heterogeneity three other TMAs were constructed with different replicas of each tumoral area (named C and D).

ROS1 fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

FISH was conducted on FFPE tissues from the whole tumor samples and the TMAs sections as previously described [32], using commercially break-apart *ROS1* locus probes (Abbott Molecular, Des Plaines, IL and/or ZytoVision, Bremerhaven, Germany). A minimum of fifty non-overlapping cells with hybridization signals were examined for each case with a BX51 fluorescence microscope (Olympus, Tokyo, Japan). Samples were considered positive if more than 15% of cells showed split 5'*ROS1* (Spec. Orange) and 3'*ROS1* (Spec. Green) signals (typical rearranged pattern) or isolated 3'*ROS1* signals (atypical rearranged pattern). The FISH rearrangement patterns are described in the text as the number of fusion signals (F) followed by the number of 5'*ROS1* signals (O) and 3'*ROS1* signals (G). *ROS1* CNAs such as gains/amplifications and deletions were also recorded. Gain was defined as a mean copy number greater than 3 fused signals in >40% of nuclei, and amplification as the presence of >15 copies of *ROS1* per cell (high polysomy) or clusters, in a minimum of 15% of analyzed cells. Cut-off for *ROS1* deletion was assessed in benign lung parenchyma from TMAs cores and established at 1 copy in >30% of nuclei. Moreover, in order to determine the cause of *ROS1* CNAs, TMAs and *ROS1* amplified cases were

analyzed with CEP6 control probe (Spec. Aqua; Abbott Molecular, Des Plaines, IL).

Positive cases were screened for the detection of fusion partners using break-apart non-commercial probes selected from the Human 32K BAC Re-Array Library (BACPAC Resource Center, Oakland, CA). The following clones were selected: *CD74* (5q32): RP11-725L10 and RP11-690J03; *EZR* (6q25.3): RP11-654E18 and RP11-268N15; *SLC34A2* (4p15.2): RP11-659J14 and RP11-790A19; and *SDC4* (20q12): RP11-69D17 and RP11-220B01.

ROS1 immunohistochemistry (IHC)

ROS1 IHC was performed using the commercially available clone D4D6 (Cell Signalling Technology, Danvers, MA) on unstained FFPE tissue sections from the whole tumor of *ROS1* positive and the TMAs samples. The primary antibody was manually applied at 1:50 dilution and incubated at 37°C for 1 hour. Samples were then revealed using the FlexPlus DAB Detection Kit in a Dako Autostainer Plus (Dako, Carpinteria, CA). ROS1 IHC staining was evaluated by two independent pathologists. Staining was graded semiquantitatively as follows: 0 for absent expression or nuclear expression only, 1+ for cytoplasmic faint, barely perceptible staining not exceeding background in any percentage of cells, 2+ for cytoplasmic staining exceeding background in 0 to 50% of tumor cells, and 3+ for cytoplasmic staining exceeding background in >50% of tumor cells [33]. Moreover, H-score was recorded as initially described to evaluate EGFR expression [34]. Briefly, this score ranges from 0 to 400 that result from the combination of the staining intensity (0-4) and the percentage of positive tumor cells (0-100%) in each sample.

Statistical analysis

The whole series of cases were studied in order to characterize associations between clinicopathological variables and FISH data (*ROS1* rearrangement and *ROS1* CNAs). From TMAs cases, the core with the most prevalent CNA was selected. Statistical associations were assessed using Pearson's χ^2 test or Fisher's exact test, depending on the sample size. All statistical tests were conducted at the two-sided 0.05 alpha level of significance. Survival curves were obtained with the Kaplan-Meier method, and log-rank test was used for comparison of survival curves between different groups of patients. For each patient, cumulative survival was calculated from the date of diagnosis to death (from any cause) or last follow-up. Heterogeneity of FISH and IHC data of TMAs was assessed using Kappa agreement index for categorical variables. All statistical analyses were carried out with SPSS version 15 (SPSS Inc., Chicago, IL).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors want to thank María Rodríguez-Rivera, Carme Melero and Marta Lorenzo for their technical support. This work was supported in part by a grant from (1) *Fundació La Marató de TV3* (666/C/2013), from (2) *Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer* (RD12/0036/0044), from (3) *Instituto de Salud Carlos III FEDER* (PT13/0010/0005), (4) from *Xarxa de Bancs de Tumors* (XBTC), (5) from *Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca* (2014SGR740) and (6) from *Fondo de Investigaciones Sanitarias* (FIS-ISCI) (PI13/00140).

CONFLICT OF INTERESTS

There is no conflict of interest.

Editorial note

This paper has been accepted based in part on peer-review conducted by another journal and the authors' response and revisions as well as expedited peer-review in *Oncotarget*.

REFERENCES

1. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, 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; 350:2129-39.
2. Davies KD, Le AT, Theodoro MF, Skokan MC, Aisner DL, Berge EM, Terracciano LM, Cappuzzo F, Incarbone M, Roncalli M, Alloisio M, Santoro A, Camidge DR, et al. Identifying and targeting ROS1 gene fusions in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2012; 18:4570-9.
3. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, Fujiwara S, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Bando M, Ohno S, Ishikawa Y, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007; 448:561-6.
4. Li T, Kung HJ, Mack PC and Gandara DR. Genotyping and genomic profiling of non-small-cell lung cancer: implications for current and future therapies. *J Clin Oncol*. 2013; 31:1039-49.
5. Oxnard GR, Binder A and Janne PA. New targetable oncogenes in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2013; 31:1097-104.
6. Birchmeier C, Birnbaum D, Waitches G, Fasano O and Wigler M. Characterization of an activated human *ros* gene. *Mol Cell Biol*. 1986; 6:3109-16.
7. Chin LP, Soo RA, Soong R and Ou SH. Targeting ROS1

with anaplastic lymphoma kinase inhibitors: a promising therapeutic strategy for a newly defined molecular subset of non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2012; 7:1625-30.

8. Davies KD and Doebele RC. Molecular pathways: ROS1 fusion proteins in cancer. *Clin Cancer Res.* 2013; 19:4040-5.
9. Warth A, Muley T, Dienemann H, Goepfert B, Stenzinger A, Schnabel PA, Schirmacher P, Penzel R and Weichert W. ROS1 expression and translocations in non-small-cell lung cancer: clinicopathological analysis of 1478 cases. *Histopathology.* 2014; 65:187-94.
10. Go H, Kim DW, Kim D, Keam B, Kim TM, Lee SH, Heo DS, Bang YJ and Chung DH. Clinicopathologic analysis of ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer and proposal of a diagnostic algorithm. *J Thorac Oncol.* 2013; 8:1445-50.
11. Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, Riely GJ, Varella-Garcia M, Shapiro GI, Costa DB, Doebele RC, Le LP, Zheng Z, et al. Crizotinib in ROS1-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2014; 371:1963-71.
12. Yoshida A, Kohno T, Tsuta K, Wakai S, Arai Y, Shimada Y, Asamura H, Furuta K, Shibata T and Tsuda H. ROS1-rearranged lung cancer: a clinicopathologic and molecular study of 15 surgical cases. *Am J Surg Pathol.* 2013; 37:554-62.
13. Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, Massion PP, Siwak-Tapp C, Gonzalez A, Fang R, Mark EJ, Batten JM, Chen H, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol.* 2012; 30:863-70.
14. Gainor JF and Shaw AT. Novel targets in non-small cell lung cancer: ROS1 and RET fusions. *Oncologist.* 2013; 18:865-75.
15. Huber KV, Salah E, Radic B, Gridling M, Elkins JM, Stukalov A, Jemth AS, Gokturk C, Sanjiv K, Stromberg K, Pham T, Berglund UW, Colinge J, et al. Stereospecific targeting of MTH1 by (S)-crizotinib as an anticancer strategy. *Nature.* 2014; 508:222-7.
16. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, Ou SH, Dezube BJ, Janne PA, Costa DB, Varella-Garcia M, Kim WH, Lynch TJ, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2010; 363: 1693-703.
17. Yoshida A, Tsuta K, Wakai S, Arai Y, Asamura H, Shibata T, Furuta K, Kohno T and Kushima R. Immunohistochemical detection of ROS1 is useful for identifying ROS1 rearrangements in lung cancers. *Mod Pathol.* 2014; 27:711-20.
18. Mescam-Mancini L, Lantuejoul S, Moro-Sibilot D, Rouquette I, Souquet PJ, Audigier-Valette C, Sabourin JC, Decroisette C, Sakhri L, Brambilla E and McLeer-Florin A. On the relevance of a testing algorithm for the detection of ROS1-rearranged lung adenocarcinomas. *Lung Cancer.* 2014; 83:168-73.
19. Jin Y, Sun PL, Kim H, Park E, Shim HS, Jheon S, Kim K, Lee CT and Chung JH. ROS1 gene rearrangement and copy number gain in non-small cell lung cancer. *Virchows Arch.* 2015; 466:45-52.
20. Kim HR, Lim SM, Kim HJ, Hwang SK, Park JK, Shin E, Bae MK, Ou SH, Wang J, Jewell SS, Kang DR, Soo RA, Haack H, et al. The frequency and impact of ROS1 rearrangement on clinical outcomes in never smokers with lung adenocarcinoma. *Ann Oncol.* 2013; 24:2364-70.
21. Vidal J, Clave S, de Muga S, Gonzalez I, Pijuan L, Gimeno J, Remon J, Reguart N, Vinolas N, Girones R, Bernet L, Majem M, Bosch-Barrera J, et al. Assessment of ALK Status by FISH on 1000 Spanish Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *J Thorac Oncol.* 2014; 9:1816-20.
22. Lee HJ, Seol HS, Kim JY, Chun SM, Suh YA, Park YS, Kim SW, Choi CM, Park SI, Kim DK, Kim YH and Jang SJ. ROS1 receptor tyrosine kinase, a druggable target, is frequently overexpressed in non-small cell lung carcinomas via genetic and epigenetic mechanisms. *Ann Surg Oncol.* 2013; 20:200-8.
23. Rogers TM, Russell PA, Wright G, Wainer Z, Pang JM, Henricksen LA, Singh S, Stanislaw S, Grille J, Roberts E, Solomon B and Fox SB. Comparison of methods in the detection of ALK and ROS1 rearrangements in lung cancer. *Journal of thoracic oncology.* 2015; 10:611-8.
24. Gold KA. ROS1--targeting the one percent in lung cancer. *N Engl J Med.* 2014; 371:2030-1.
25. Ou SH, Chalmers ZR, Azada MC, Ross JS, Stephens PJ, Ali SM and Miller VA. Identification of a novel TMEM106B-ROS1 fusion variant in lung adenocarcinoma by comprehensive genomic profiling. *Lung Cancer.* 2015; 88:352-4.
26. Salido M, Pijuan L, Martinez-Aviles L, Galvan AB, Canadas I, Rovira A, Zanui M, Martinez A, Longaron R, Sole F, Serrano S, Bellosillo B, Wynes MW, et al. Increased ALK gene copy number and amplification are frequent in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2011; 6:21-7.
27. Zhu H, Wong MP and Tin V. High-resolution detection of recurrent aberrations in lung adenocarcinomas by array comparative genomic hybridization and expression analysis of selective genes by quantitative PCR. *Int J Oncol.* 2014; 44:2068-76.
28. Shen H, Zhu Y, Wu YJ, Qiu HR and Shu YQ. Genomic alterations in lung adenocarcinomas detected by multicolor fluorescence in situ hybridization and comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet.* 2008; 181:100-7.
29. Scheffler M, Schultheis A, Teixido C, Michels S, Morales-Espinosa D, Viteri S, Hartmann W, Merkelbach-Bruse S, Fischer R, Schildhaus HU, Fassunke J, Sebastian M, Serke M, et al. ROS1 rearrangements in lung adenocarcinoma: prognostic impact, therapeutic options and genetic variability. *Oncotarget.* 2015; 6:10577-85. doi: 10.18632/oncotarget.3387

30. Mazieres J, Zalcman G, Crino L, Biondani P, Barlesi F, Filleron T, Dingemans AM, Lena H, Monnet I, Rothschild SI, Cappuzzo F, Besse B, Thiberville L, et al. Crizotinib therapy for advanced lung adenocarcinoma and a ROS1 rearrangement: results from the EUROS1 cohort. *Journal of clinical oncology*. 2015; 33:992-9.
31. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G and Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998; 4:844-7.
32. Salido M, Tusquets I, Corominas JM, Suarez M, Espinet B, Corzo C, Bellet M, Fabregat X, Serrano S and Sole F. Polysomy of chromosome 17 in breast cancer tumors showing an overexpression of ERBB2: a study of 175 cases using fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *Breast Cancer Res*. 2005; 7:R267-73.
33. Sholl LM, Sun H, Butaney M, Zhang C, Lee C, Janne PA and Rodig SJ. ROS1 immunohistochemistry for detection of ROS1-rearranged lung adenocarcinomas. *The American journal of surgical pathology*. 2013; 37:1441-9.
34. Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L, Haney J, Witta S, Danenberg K, Domenichini I, Ludovini V, Magrini E, Gregorc V, et al. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2005; 97:643-55.

ARTICLE 2

NEXT-GENERATION SEQUENCING FOR ALK AND ROS1 REARRANGEMENT DETECTION IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER PATIENTS: IMPLICATIONS OF FISH POSITIVE PATTERNS

Sergi Clavé^{1,2}, Natalia Rodon³, Lara Pijuan¹, Olga Díaz³, Marta Lorenzo^{1,2}, Pedro Rocha⁴, Álvaro Taus^{2,4}, Remei Blanco⁵, Joaquim Bosch-Barrera⁶, Noemí Reguart⁷, Noelia de la Torre⁸, Glòria Oliveras⁶, Blanca Espinet^{1,2}, Beatriz Bellosillo^{1,2}, Xavier Puig³, Edurne Arriola^{2,4} i Marta Salido^{1,2}

¹ Servei de Patologia, Hospital del Mar, Barcelona; ² Programa de Recerca en Càncer, Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM), Barcelona; ³ BIOPAT Biopatologia Molecular, Grup Assistència, Barcelona; ⁴ Servei d'Oncologia Mèdica, Hospital del Mar, Barcelona; ⁵ Servei d'Oncologia Mèdica, Consorci Sanitari de Terrassa, Terrassa; ⁶ Servei d'Oncologia Mèdica, Institut Català d'Oncologia (ICO), Hospital Dr. Josep Trueta, Girona; ⁷ Servei d'Oncologia Mèdica, Institut Clínic de Malalties Hematològiques i Oncològiques (ICMHO), Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona; ⁸ Servei de Patologia, Consorci Sanitari de Terrassa, Terrassa.

En aquest segon article es van seleccionar 40 mostres FFPE de pacients amb CPCNP amb reordenaments d'*ALK* i *ROS1* que havien estat prèviament identificats per FISH (33 *ALK* i set *ROS1* positius). Es van analitzar per les altres tècniques ortogonals de detecció de reordenaments: IHQ i NGS. Es va fer servir el panell d'amplicons per RNA Oncomine Focus Assay i en el cas de la IHQ els anticossos anti-*ALK* D5F3 i anti-*ROS1* D4D6. També es va extreure DNA dels casos per a la determinació d'alteracions concomitants utilitzant

el mateix panell de NGS. Es va avaluar la concordança entre tècniques, les possibles implicacions clíniques de les alteracions moleculars concurrents i la identificació de patrons de FISH que poguessin ser suggestius de resultats fals positius al comparar-los entre les tècniques.

Com a resultats de l'article destaca que en vuit casos la limitació de material no va permetre tenir resultat de la seqüenciació NGS, obtenint resultats valorables en 32 casos (80%): 25 *ALK* i set *ROS1*. Es van detectar poques alteracions concurrents, només un cas *ALK* reordenat tenia una mutació del mateix gen *ALK* p.L1196M, considerada de resistència, i quatre casos positius tenien amplificacions dels gens *CDK4*, *FGFR4*, *MYC* i *ALK*. La comparació entre les tècniques va revelar cinc casos discordants FISH+/NGS-/IHQ- (16%). En aquests, el patró de FISH amb senyals extres 3', considerat un patró positiu per a la identificació de reordenaments per *ALK* i *ROS1*, es va associar amb un resultat discordant ($p= 0,026$). A més, es va descriure que aquests casos discordants, només positius per FISH, presentaven un major nombre d'alteracions moleculars concurrents (dos casos van mostrar amplificació de *MET* i *ERBB2*, respectivament) i una menor PFS després del tractament amb TKIs que els casos concordants: 7,6 (95% CI, 2,2-13) vs. 19,4 mesos (95% CI, 10,1-28,6).

Clinical Lung Cancer. 2019;20:e421-9. doi: 10.1016/j.clcc.2019.02.008.

Acceptat: 17 de febrer del 2019



Next-generation Sequencing for *ALK* and *ROS1* Rearrangement Detection in Patients With Non–small-cell Lung Cancer: Implications of FISH-positive Patterns

Sergi Clavé,^{1,2} Natalia Rodon,³ Lara Pijuan,¹ Olga Díaz,³ Marta Lorenzo,^{1,2} Pedro Rocha,⁴ Álvaro Taus,^{2,4} Remei Blanco,⁵ Joaquim Bosch-Barrera,⁶ Noemí Reguart,⁷ Noelia de la Torre,⁸ Glòria Oliveras,⁶ Blanca Espinet,^{1,2} Beatriz Bellosillo,^{1,2} Xavier Puig,³ Edurne Arriola,^{2,4} Marta Salido^{1,2}

Abstract

Detection of *ALK* and *ROS1* rearrangements was assessed using next-generation sequencing and immunohistochemistry in a retrospective cohort of 40 patients with non–small-cell lung cancer with known fluorescence in situ hybridization (FISH) data. Comparison between methods revealed that isolated 3' signal FISH pattern might suggest a false-positive result. When used as a screening method, detailed reporting of FISH patterns should be strongly considered.

Background: Detection of *ALK* and *ROS1* gene rearrangements in non–small-cell lung cancer is required for directing patient care. Although fluorescence in situ hybridization (FISH) and immunohistochemistry have been established as gold standard methods, next-generation sequencing (NGS) platforms are called to be at least equally successful. Comparison of these methods for translation into daily use is currently under investigation. **Patients and Methods:** Forty non–small-cell lung cancer paraffin-embedded samples with previous *ALK* (n = 33) and *ROS1* (n = 7) FISH results were examined with the OncoPrint Focus Assay and tested for *ALK* and *ROS1* immunoreactivity. Clinical implications of concurrent molecular alterations and concordance between methods were evaluated. **Results:** NGS was successful in 32 (80%) cases: 25 *ALK* and 7 *ROS1*. Few concomitant alterations were detected: 1 *ALK* rearranged case had an *ALK* p.L1196M-resistant mutation, 4 had *CDK4*, *MYC*, and/or *ALK* amplifications, and 1 *ROS1* rearranged case showed a *FGFR4* amplification. Comparison between techniques revealed 5 (16%) discordant cases that had lower progression-free survival than concordant cases: 7.6 (95% confidence interval, 2.2-13) versus 19.4 (95% confidence interval, 10.1-28.6). Remarkably, 4 of these cases had isolated 3' signal FISH pattern ($P = .026$). **Conclusion:** Our data support that the identification of 3' isolated signal FISH pattern in *ALK* and *ROS1* cases might suggest a false-positive result. NGS seems a reliable technique to assess *ALK* and *ROS1* rearrangements, offering the advantage over immunohistochemistry of detecting other molecular alterations with potential therapeutic implications.

Clinical Lung Cancer, Vol. 20, No. 4, e421-9 © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Concurrent alterations, Fluorescence in situ hybridization, Gene copy number variations, Resistance mutations, Targeted therapies

E.A. and M.S. contributed equally to this article as senior authors.

¹Pathology Department, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

²Cancer Research Program, Hospital del Mar Medical Research Institute, Barcelona, Spain

³BIOPAT Biopatologia Molecular, Grup Assistència, Barcelona, Spain

⁴Medical Oncology Department, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

⁵Medical Oncology Department, Consorci Sanitari de Terrassa, Terrassa, Spain

⁶Medical Oncology Department, Catalan Institute of Oncology, Hospital Dr. Josep Trueta, Girona, Spain

⁷Medical Oncology Department, Hospital Clinic, Barcelona, Spain

⁸Pathology Department, Consorci Sanitari de Terrassa, Terrassa, Spain

Submitted: Nov 9, 2018; Revised: Feb 13, 2019; Accepted: Feb 17, 2019; Epub: Feb 26, 2019

Address for correspondence: Marta Salido, PhD, Passeig Marítim 25-29, 08003 Barcelona, Spain

E-mail contact: msalido@parcdesalutmar.cat

ALK and ROS1 Testing by Next-generation Sequencing

Introduction

ALK and ROS1 gene fusions are important predictive biomarkers for targeted tyrosine kinase inhibitor (TKI) efficacy in non-small-cell lung cancer (NSCLC).^{1,2} The development of TKIs such as crizotinib has led to a breakthrough in the treatment of ALK- and ROS1-rearranged patients that gain significant survival benefit.^{3,4} More recently, second-generation drugs, such as alectinib and ceritinib, have provided improved outcomes and joined the armamentarium for the treatment of these patients.⁵⁻⁷ Thus, incorporation of molecular analyses for detecting any of these rearrangements is considered a standard of care in the diagnostic management of patients with NSCLC with advanced disease.⁸

The first gold standard method for detecting these rearrangements was fluorescence in situ hybridization (FISH), adding on immunohistochemistry (IHC) when properly validated.⁹ In 2018-updated guidelines, ALK IHC was considered an acceptable alternative to FISH, whereas ROS1 IHC was recommended as a screening test with need for confirmation by another cytogenetic method when positive.¹⁰ Neither FISH nor IHC methods are perfect predictors of response to targeted therapies, and several studies have reported discordant results.¹¹⁻¹³ Next-generation sequencing (NGS) can detect multiple gene variants simultaneously, including ALK and ROS1 rearrangements, enabling comprehensive biomarker testing in NSCLC. Consequently, NGS assays are being used in several diagnostic settings to test for gene fusions. Comparison of these molecular testing methodologies is now being reviewed for clinical application.^{14,15}

In the current study, we analyzed a retrospective cohort of ALK- and ROS1-rearranged cases initially diagnosed by break-apart FISH and later assessed by NGS and IHC, in a single institution. Our aim was to investigate the performance of NGS for ALK and ROS1 gene

fusion detection, the clinical implications of concurrent molecular alterations, and the potential false-positive results that could appear when comparing with orthogonal evaluation methods.

Patients and Methods

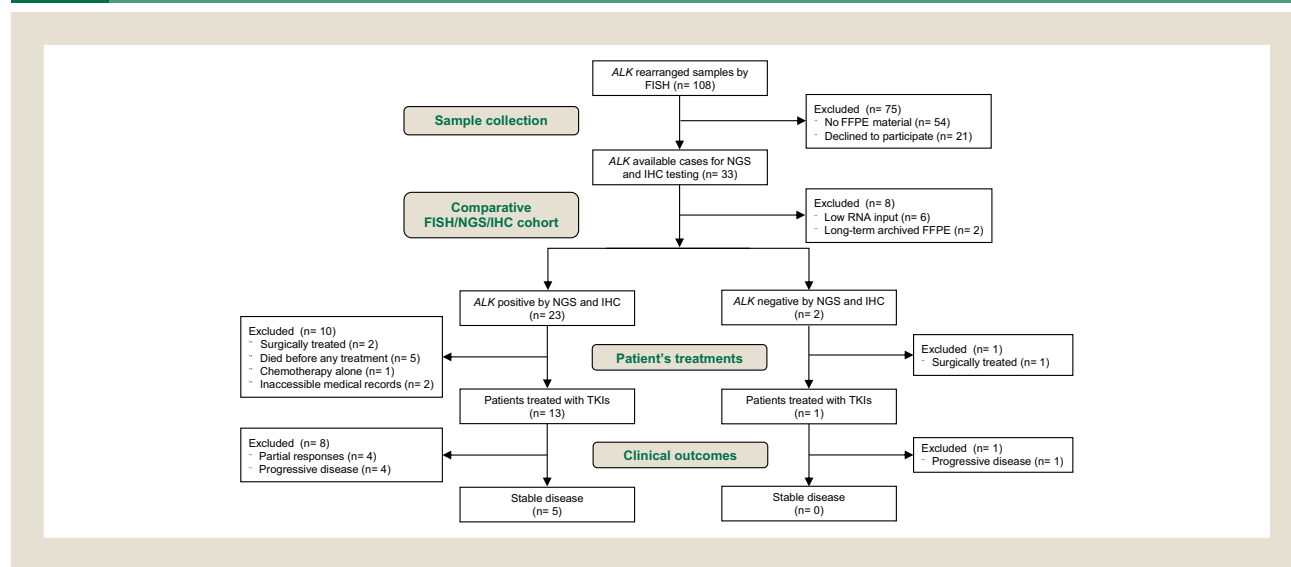
Study Population

Our institution, Hospital del Mar, has tested rearrangements over 3010 NSCLC samples since 2012 (2580 ALK and 1370 ROS1 tests) as a referral center for ALK and ROS1. We screened all cases by FISH with Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit, Vysis 6q22 ROS1 Break Apart FISH Probe (Abbott Molecular, Des Plaines, IL) or ZytoLight SPEC ROS1 Dual Color Break Apart Probe (Zyto-Vision, Bremerhaven, Germany), considering positivity when the presence of $\geq 15\%$ of nuclei with split or isolated 3' signals. The percentage of rearranged cases in our series was 4.2% for ALK (n = 108) and 0.9% for ROS1 (n = 12). For the present study, we have been able to retrospectively select 33 ALK- and 7 ROS1-rearranged samples (Figures 1 and 2), based on material availability and the presence of split signals, isolated 3' signals (both positive patterns) or isolated 5' signals (negative pattern). Samples and data from patients included in this study were provided by MARBiobanc, Biobanc IDIBGI, and Consorci Sanitari de Terrassa, integrated in the Xarxa de Bancs de Tumors de Catalunya (XBTC). This project was approved by the local ethics committee (CEIC-PSMAR: 2015/6336/I), and all patients provided written informed consent.

Sample Collection

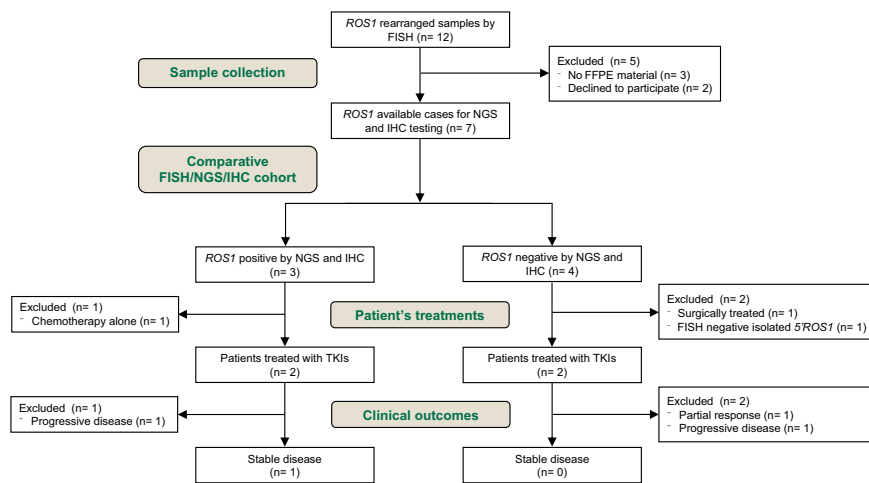
Formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue samples from all patients were collected and reviewed centrally in order to determine tumor content, percentage of infiltration, and microdissection area when appropriate. This initial sample evaluation and technical performance and interpretation was carried out by S.C.,

Figure 1 Patients with ALK Rearrangement Detected by FISH and Selected for Further NGS and IHC Analysis. Flow Diagram Show Also Treatment Characteristics and Clinical Outcome of These Patients



Abbreviations: FFPE = formalin-fixed, paraffin embedded; FISH = fluorescence in situ hybridization; IHC = immunohistochemistry; NGS = next-generation sequencing; TKIs = tyrosine kinase inhibitors.

Figure 2 Patients With *ROS1* Rearrangement Detected by FISH and Selected for Further NGS and IHC Analysis. Flow Diagram Show Also Treatment Characteristics and Clinical Outcome of These Patients



Abbreviations: FFPE = formalin-fixed, paraffin embedded; FISH = fluorescence in situ hybridization; IHC = immunohistochemistry; NGS = next-generation sequencing; TKIs = tyrosine kinase inhibitors.

N.R., L.P., and M.S. Four-micron sections of each case were stained with VENTANA ALK D5F3 CDx Assay (Ventana, Tucson, AZ) or ROS1 D4D6 Rabbit mAb (Cell Signalling Technology, Danvers, MA) following standard protocols. Four consecutive 10-micron FFPE sections were used to isolate DNA and RNA with the RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE and quantified using a Qubit Quantitation Assay Kit in a Qubit Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, San Francisco, CA).

NGS Assessment

A minimum of 10 ng of DNA and RNA were amplified using the NGS targeted panel Oncomine Focus Assay (OFA). This NGS assay enables simultaneous detection of 23 fusion genes: *ALK*, *RET*, *ROS1*, *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *MET*, *BRAF*, *RAF1*, *ERG*, *ETV1*, *ETV4*, *ETV5*, *ABL1*, *AKT3*, *AXL*, *EGFR*, *ERBB2*, *PDGFRA*, and *PPARG*; 35 targeted hotspot mutations: *AKT1*, *ALK*, *AR*, *BRAF*, *CDK4*, *CTNNA1*, *DDR2*, *EGFR*, *ERBB2*, *ERBB3*, *ERBB4*, *ESR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *GNA11*, *GNAQ*, *HRAS*, *IDH1*, *IDH2*, *JAK1*, *JAK2*, *JAK3*, *KIT*, *KRAS*, *MAP2K1*, *MAP2K2*, *MET*, *MTOR*, *NRAS*, *PDGFRA*, *PIK3CA*, *RAF1*, *RET*, *ROS1*, and *SMO*; and 19 copy number variations (CNVs): *ALK*, *AR*, *BRAF*, *CCND1*, *CDK4*, *CDK6*, *EGFR*, *ERBB2*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *FGFR4*, *KIT*, *KRAS*, *MET*, *MYC*, *MYCN*, *PDGFRA*, and *PIK3CA*. The sequencing was performed with an Ion PGM platform and analyzed with the Torrent Suite program v5.8. The detected variants were annotated and filtered with the Ion Reporter software and reviewed with the Integrative Genomics Viewer v2.4 (Broad Institute, Cambridge, MA). Fusion genes were considered positive when ≥ 20 fusion amplicon or when ≥ 0.0015 3'/5' imbalance value for *ALK* and ≥ 2.1 3'/5' imbalance value for *ROS1* were found. Regarding hotspot mutations, only those variants with a frequency $\geq 2\%$ covered by more than 1000 reads were reported. CNVs were annotated when confidence interval (CI) at

5% was ≥ 4 gene copies with ≤ 0.5 median of the absolute values of all pairwise differences quality control measure. Cases with CNVs detected by OFA panel were validated using locus specific FISH probes. Both OFA library preparation, sequencing reagents, and analysis pipeline were from Thermo Fisher Scientific.

Statistical Analysis

Statistical associations were assessed using the Pearson χ^2 test or Fisher exact test, depending on the sample size. Survival curves were obtained with the Kaplan-Meier method, and the log-rank test was used for comparison between different groups of patients. All statistical tests were conducted at the 2-sided 0.05 alpha level of significance, carried out with SPSS Statistics software v25 (SPSS Inc, Chicago, IL).

Results

Demographic and Clinical Characteristics

Demographic and clinical characteristic of the study population are summarized in Table 1. Patients have been classified according to their FISH pattern (split vs. 3' isolated), and no significant differences were observed between them. ALK/ROS1 TKIs were given to 9 patients as first-line and to 13 as second-line treatment after standard chemotherapy, leading to 18 ALK- and 4 ROS1-treated patients. Four patients that received crizotinib at first-line switched to a second-generation TKI at second-line treatment. Seven (32%) patients experienced a stable disease, 8 (36%) a partial response, and 7 (32%) a progressive disease. The median progression-free survival (PFS) was 21.3 months (95% CI, 11.7-30.9 months). No differences in median PFS were found between TKI-treated patients with ALK positive FISH split (n = 14) or 3' isolated (n = 5) patterns (21.7 months [95% CI, 10.2-33.2 months] vs. 21.3 months [95% CI, 1.1-41.4 months], respectively). The median follow-up time of our series was 27 months (range, 2.3-96.4 months).

ALK and ROS1 Testing by Next-generation Sequencing

Table 1 Demographic and Clinical Data of Patients With ALK- and ROS1-Rearranged Tumors

	ALK (n = 32), n (%) ^a		ROS1 (n = 6), n (%) ^a		Total (n = 38), n (%)
	Split (n = 17)	Isolated 3' (n = 15)	Split (n = 3)	Isolated 3' (n = 3)	
Age, y (range)	61 (30-85)	61 (36-86)	62 (42-76)	68 (67-71)	61 (30-86)
Gender					
Male	7 (41)	8 (53)	1 (33)	2 (67)	18 (47)
Female	10 (59)	7 (47)	2 (67)	1 (33)	20 (53)
Histology					
ADC	16 (94)	11 (73)	3 (100)	2 (67)	32 (84)
SCC	0	1 (7)	0	0	1 (3)
NSCLC NOS	1 (6)	3 (20)	0	1 (33)	5 (13)
Smoking status					
Never/light	10 (59)	9 (60)	3 (100)	1 (33)	23 (61)
Current/former	7 (41)	6 (40)	0	2 (67)	15 (39)
Stage					
I-II	3 (18)	2 (13)	1 (33)	0	6 (16)
III-IV	14 (82)	13 (87)	2 (67)	3 (100)	32 (84)
Biopsy site					
Lung parenchyma	12 (70)	7 (47)	1 (33)	2 (67)	22 (58)
Lymph node	1 (6)	1 (6)	1 (33)	1 (33)	4 (10)
Pleura	2 (12)	4 (27)	0	0	6 (16)
Other	2 (12)	3 (20)	1 (33)	0	6 (16)
First-line treatment ^b					
Chemotherapy	9 (64)	4 (37)	0	1 (34)	14 (45)
Crizotinib	3 (22)	3 (27)	2 (67)	1 (33)	9 (29)
Untreated ^c	2 (14)	4 (36)	1 (33)	1 (33)	8 (26)
Second-line treatment ^d					
Crizotinib	7 (70)	3 (60)	0	0	10 (59)
Alectinib	2 (20)	1 (20)	1 (50)	0	4 (23)
Ceritinib	1 (10)	1 (20)	1 (50)	0	3 (18)

Abbreviations: ADC = adenocarcinoma; FISH = fluorescence in situ hybridization; NSCLC NOS = non-small-cell lung cancer not otherwise specified; SCC = squamous cell carcinoma.

^aThe 2 patients with isolated 5' ALK and ROS1 FISH negative pattern were excluded from the analysis.

^bWe were unable to access the medical records of 7 patients, 3 ALK rearranged with split signals and 4 ALK rearranged with isolated 3' signals.

^cUntreated patients were those that died either before any treatment could be given, were surgically treated, or were treated with other targeted therapy for other driver alteration.

^dSecond-line treatment was available for 13 of the 14 patients that received first-line treatment with chemotherapy, and for 4 patients that switched upon first-line crizotinib progression.

Fusion Genes Detected by NGS

From the initial 40 cases, analysis by NGS was successful in 32 (80%): 25 ALK and 7 ROS1. Results could not be assessed in 8 cases owing to insufficient sequencing coverage: 6 of them were small biopsies with low RNA input (<0.02 ng/μL), and 2 were long-term archived FFPE samples. In 6 of the 32 successful samples (2 ALK and 4 ROS1), NGS did not detect any gene fusion leading to 23 ALK and 3 ROS1 rearranged cases. Point out that one out of these six NGS-negative samples had isolated 5' ROS1 signals, considered also negative by both FISH and IHC. Diagrams showing the number of ALK- and ROS1-rearranged patients included in the analysis are shown in Figures 1 and 2. Regarding the ALK fusions detected, 19 (83%) of 23 ALK rearranged corresponded to EML4-ALK inversions on chromosome 2 (variant 1 EML4(13)-ALK(20) in 14 cases; variant 3 EML4(6)-ALK(20) in 4 cases; and variant 5a EML4(2)-ALK(20) in 1 case). In addition, 1 case demonstrated the less common KIF5B(17)-ALK(20) fusion, and 3 were NGS-positive

considering the ≥ 0.0015 3'/5' imbalance value but without detecting a specific fusion partner. The median PFS of the 8 TKI-treated patients with variant 1 EML4(13)-ALK(20) was 18.9 months (95% CI, 10.7-27 months). The low number of patients with the less common EML4-ALK variants did not allow us to compare clinical outcomes. Regarding the 3 ROS1 fusions identified by NGS, 2 cases presented an EZR(10)-ROS1(34) and 1 case a SDC4(2)-ROS1(32) fusion. The unequal distribution of fusion variants owing to the low sample size precluded any statistical association regarding clinicopathologic features. Remarkably, all ALK and ROS1 cases detected by NGS were also positive by IHC.

Concurrent Alterations Detected by NGS

According to hotspot mutations, we only detected a case with an EML4(13)-ALK(20) fusion coexisting with an ALK p.L1196M resistance mutation at 4% of allele frequency in the baseline biopsy. Regarding CNVs, NGS detected 1 EML4(13)-ALK(20) case with

CDK4 amplification (mean, 9.9 gene copies) and an *EML4(6)-ALK(20)* case with *MYC* amplification (mean, 5.3). Remarkably, 1 case presented both *MYC* and *ALK* amplifications (means, 16.6 and 10.6, respectively) at progression biopsy. In addition, a case with *SDC4(2)-ROS1(32)* harbored a *FGFR4* gene amplification (mean, 6.1). Clinical features and outcomes of patients with concurrent alterations are shown in Table 2.

Discordances Between FISH and NGS

The 5 discordant cases between FISH and NGS (2 *ALK* and 3 *ROS1*) are detailed in Table 3. Remarkably, only 1 *ROS1* case had FISH split signals, whereas 2 *ALK* and 2 *ROS1* had isolated 3' signals ($P = .026$). IHC of these 4 cases was in agreement with NGS as illustrated in Figure 3. We confirmed FISH results in a new slide performed after FFPE sectioning for IHC, DNA, and RNA extractions. Clinically, all discordant 3' isolated signal cases were male with a current smoking habit and diagnosed with adenocarcinoma (ADC) except for 1 *ALK* rearranged case that presented a squamous histology. Interestingly, 2 of them had alternative driver alterations and received crizotinib, resulting in different responses (Table 3). The fifth discordant case with *ROS1* split signals was an Asian ethnicity 42-year-old non-smoking woman diagnosed with ADC with a previous detected *EGFR* insertion in exon 20. After gefitinib systemic progression, the patient was rebiopsied and screened for *ROS1* rearrangement. Particularly, this case exhibited *ROS1* tumor heterogeneity, showing 2 distinct FISH areas: 1 with *ROS1* gene deletion without rearrangement and the other with positive *ROS1* split signals. The patient received second-line crizotinib treatment, with a partial response lasting 11 months. Although numbers are small and could not be associated statistically, the median PFS in TKI-treated discordant patients was lower than the median PFS in concordant positive cases: 7.6 (95% CI, 2.2-13) versus 19.4 (95% CI, 10.1-28.6), respectively.

Discussion

Our study demonstrated that, although FISH is an accepted screening test for *ALK* and *ROS1* gene rearrangements, tumors with positive isolated 3' signal patterns should be considered for confirmatory testing either by NGS or IHC. We found that 2 *ALK*- and 2 *ROS1*-positive cases with isolated 3' signals were negative by both NGS and IHC. It is known that *ALK/ROS1* FISH signal patterns may vary from a split signal to complex patterns.¹⁶ The 3' isolated FISH pattern may reflect a gene rearrangement with deletion of the DNA sequences adjacent to the breakpoints and has to be considered positive.^{17,18} However, large deletions and structural variants affecting 5' probe-binding site without an *ALK* or *ROS1* rearrangement may result in an identical FISH pattern that would be a false-positive. A previous study by Gao et al identified 3 (14%) of 21 cases with 3' isolated FISH pattern that were NGS- and IHC-negative. In 2 of them, concurrent alternative driver mutations were described conferring poor response to crizotinib: an *EGFR* p.L858R and a *KRAS* p.Q61L mutations.¹⁹ In our 4 3' isolated discordant cases we saw other molecular alterations in 2 cases: an *ERBB2* amplification concurrent with a *CDK4* p.R24H mutation in a *ROS1*-rearranged patient, and a *MET* low-amplification in an *ALK*-rearranged patient. In their study, patients with 3' isolated signals were older

Table 2 Clinical Details of Patients With Concurrent Alterations Detected by NGS

Case No.	Patient Data			NGS			Clinical Outcome				
	Gender	Age	Smoking Status	Fusion	Hotspot Mutations	CNVs	First-line Treatment	PFS ^a	Second-line Treatment	PFS ^a	OS ^a
1	Male	60	Never	<i>EML4(13)-ALK(20)</i>	<i>ALK</i> p.L1196M	None identified	Cis-Pem	21.8	Crizotinib	21.2	46.5 ⁺
2	Female	83	Never	<i>EML4(13)-ALK(20)</i>	None identified	<i>CDK4</i> 9.9	None ^b	N/A	N/A	N/A	2.3
3	Male	63	Never	<i>EML4(6)-ALK(20)</i>	None identified	<i>MYC</i> 5.3	None ^b	N/A	N/A	N/A	0.7
4	Male	71	Former	<i>EML4(2)-ALK(20)</i>	None identified	<i>ALK</i> 16.6 <i>MYC</i> 10.6 ^c	Crizotinib	1.8	Alectinib	2.1	15.3
5	Female	76	Never	<i>SDC4(2)-ROS1(32)</i>	None identified	<i>FGFR4</i> 6.1	Crizotinib	4.4	N/A	N/A	4.9

Abbreviations: Cis-Pem = cisplatin and pemetrexed; CNVs = copy number variations; N/A = non-applicable; OS = overall survival; PFS = progression-free survival.

^aExpressed in months.

^bBoth patients had poor performance status and died after diagnosis.

^cDetected in a rebiopsy sample after crizotinib progression.

⁺Patients alive.

Table 3 Clinicopathologic Details of the 5 Patients With Discordant ALK or ROS1 Rearrangements Between FISH and NGS

Case No.	FISH ^a	IHC	NGS				Clinical Outcome			
			Fusion	Hotspot Mutations	CNVs	First-line Treatment	PFS ^b	Second-line Treatment	PFS ^b	OS ^b
1	ALK 73% isolated 3'	-	None identified	None identified	MET 4.8	Carbo-Tax	4.4	Crizotinib	0.8	7.3
2	ALK 66% isolated 3'	-	None identified	None identified	None identified	Surgery	N/A	N/A	N/A	78.4+
3	ROS1 46% isolated 3'	-	None identified	None identified	None identified	Surgery	N/A	N/A	N/A	29.9+
4	ROS1 85% isolated 3'	-	None identified	CDK4 p.R24H	ERBB2 7.9	Crizotinib	6.6	N/A	N/A	9.2
5	ROS1 75% split	+	None identified	EGFR p.(D770_N771insNPH) ^c	None identified	Gefitinib	4.3	Crizotinib	11	18

Abbreviations: Carbo-Tax = carboplatin and paclitaxel; CNVs = copy number variations; FISH = fluorescence in situ hybridization; N/A = non-applicable; OS = overall survival; PFS = progression-free survival.

^aGene rearranged, FISH percentage of positive nuclei, and FISH positive pattern.

^bExpressed in months.

^cHotspot mutation detected in previous sample.

⁺Patients alive.

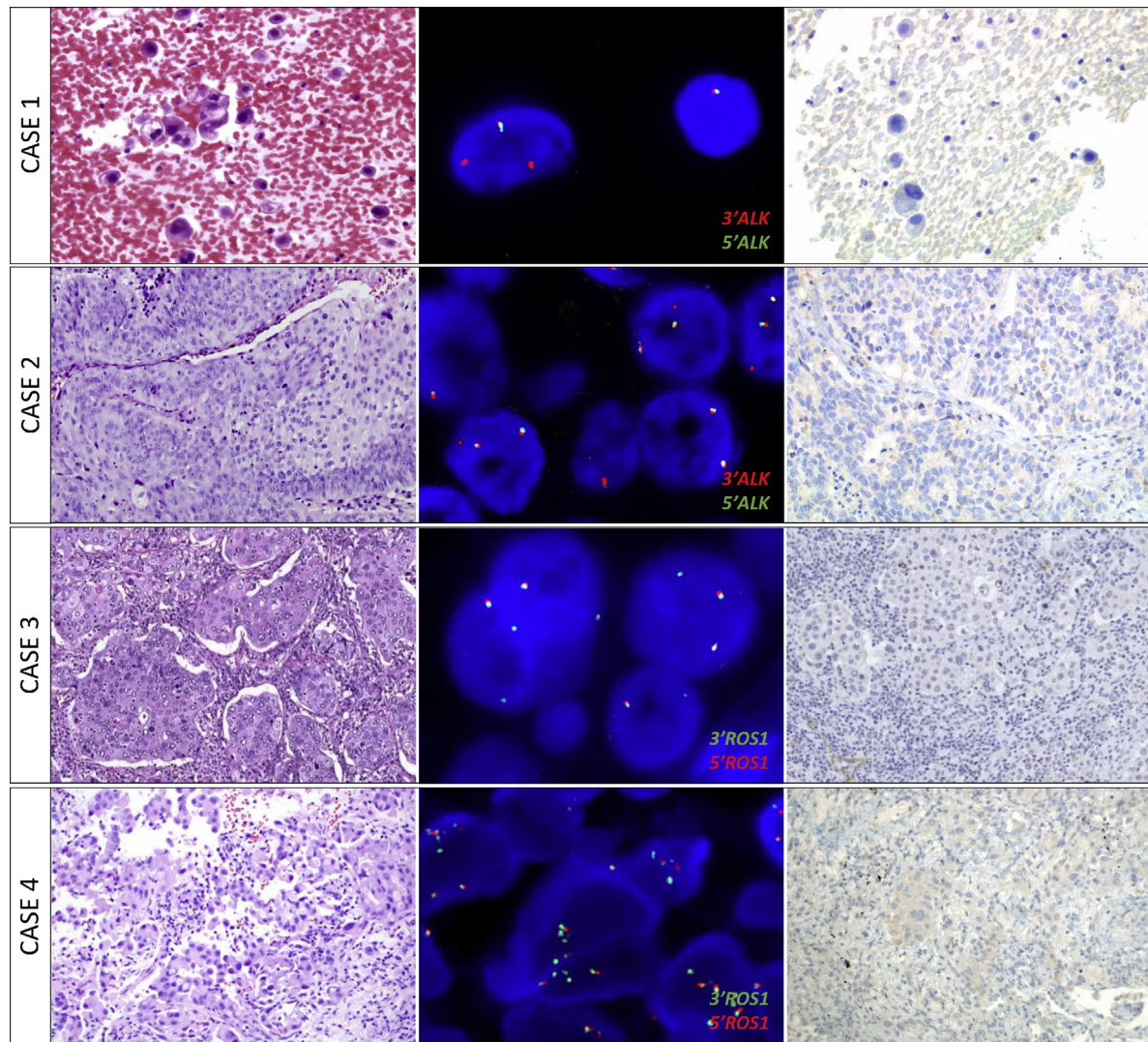
and tended to have more extended smoking histories than those with split signals.¹⁹ We did not find any clinicopathologic feature associated with a specific FISH pattern. Consistent with our results, another recent publication by Dacic et al demonstrated that cases with 3' isolated pattern are more prone to be FISH false-positive, and they also did not find demographic differences between both groups.²⁰ As our 3' isolated FISH discordant cases showed other driver alterations and had lower PFS to TKIs than concordant cases, we might suggest that these were not true ALK/ROS1 rearrangements but cases with structural alterations in the 5' probe-binding site that give rise to FISH false-positives.

We found a fifth discordant case with ROS1-positive split signals that also harbored an EGFR mutation. Patients who have both alterations are extremely rare, and only 6 cases have been reported.²¹ Clinicopathologic characteristics of our patient match with all these 6 described previously: Asian ethnicity non-smoker young woman diagnosed with a lung ADC. As NGS did not detect both alterations in the same sample, we assumed that there was no ROS1-rearranged cells in the FFPE sections used for this analysis. This case could be an example of spatial heterogeneity within the tumor, evidencing that subpopulations of cells with distinct genomic alterations can coexist.²² In this patient, initial diagnosis by NGS would have allowed us to detect both molecular alterations at the same time for better monitoring during the treatment.

In the same way, another patient in our series with concurrent alterations could benefit from better clinical management if NGS would have been applied at diagnosis. The 60-year-old man with an EML4(13)-ALK(20) coexisting with an ALK p.L1196M resistance mutation at diagnosis was second-line treated with crizotinib. Although he obtained a prolonged partial response of 21.2 months, he could have benefited from a more selective TKIs such as alectinib, which has demonstrated better activity against cases with this ALK gatekeeper mutation.²³ Another relevant case with concomitant alterations was the EML4(2)-ALK(20) with both ALK and MYC amplification detected after crizotinib progression. ALK amplification is described to occur less frequently than secondary mutations, but recognized as a cause of acquired resistance to crizotinib.²⁴ A previous report showed that MYC amplification leads to increased expression of EML4-ALK within the cells, causing resistance to ALK inhibitors.²⁵ Moreover, a recent publication in preclinical models demonstrated that reduction of MYC increases sensitivity of TKIs in ALK-rearranged cell lines, and the authors hypothesized that both MYC and ALK could be cooperating in oncogenic signaling deriving in therapy resistance.²⁶ Heterogeneous resistant mechanisms including ALK activating mutations or gene amplifications have been identified in correlation with diverse treatment responses.²⁷ The detection of concurrent alterations by NGS approach at the time of diagnosis would allow us to better evaluate the best therapeutic approach for each patient.

In the present study, we included 2 patients with a negative isolated 5' signal FISH pattern. Although initial recommendations for ALK FISH interpretation considered such cases as negative,¹⁸ there are a few case reports that showed crizotinib response in these patients.^{28,29} In our hands, both cases were IHC-negative, and only 1 case had available NGS data that confirmed the absence of fusion gene. A recent article discussed that these 5' isolated FISH

Figure 3 Representative Images of the 4 Discordant Isolated 3' *ALK* (Cases 1 and 2) and *ROS1* (Cases 3 and 4) Samples. Case 1: Pericardial Effusion Aspirate Sample Showing Metastatic Lung Adenocarcinoma (ADC) Cells. Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) With *ALK* Break-Apart Probe Revealed an Isolated 3' Signal Pattern (1F10 and 1F20) and No Immunoreactivity for *ALK* Protein was Detected by Immunohistochemistry (IHC). Case 2: Right Upper Lobe Lung Resection With a Squamous Cell Carcinoma Showing Isolated 3' Signal FISH Pattern (2F10) With Negative *ALK* IHC. Case 3: Left Upper Lobe Lung Resection Diagnosed as an ADC. FISH Images Showed an Isolated 3' *ROS1* Signal Pattern (2F1G and 1F2G). No Immunoreactivity for *ROS1* Protein Was Detected by IHC. Case 4: Endobronchial Ultrasound Bronchoscopy Sample From Right Upper Lobe Showing Adenocarcinoma Cells Showing Gained Isolated 3' *ROS1* Signal Pattern and Negative IHC. Magnification 20× for Hematoxylin and Eosin and IHC and 100× for FISH Images



cases should be considered to carry a rare genomic event that could lead to protein expression and therefore become TKI-treatable.³⁰ Given the low frequency of such cases, confirmation analysis would be necessary to ensure the diagnosis.

Previous studies that have compared FISH, IHC, and NGS approaches for *ALK* and *ROS1* testing have come to the conclusion that, although concordance between the assays was generally good, many discrepancies were observed. For *ALK* testing is being accepted that screening with IHC followed by a molecular technique to identify the fusion variant is more appropriate than

screening by FISH.^{31,32} McLeer-Florin et al compared RNA sequencing (RNA-seq), IHC, and FISH in 53 samples initially diagnosed as *ALK* rearranged. Similar to our findings, they described 2 discordant cases that were FISH-positive and RNA-seq/IHC-negative, and both cases received crizotinib and experienced progressive disease.³³ For *ROS1* testing, there is currently a wide variety of testing approaches available, each with its interpretative limitations. Davies et al compared NGS DNA and RNA testing approaches with FISH, but none of them achieve 100% in terms of sensitivity.¹⁵

ALK and ROS1 Testing by Next-generation Sequencing

The success rate of NGS technology is closely related to the correct evaluation of the initial amount of tumor tissue, particularly in small biopsies. The main limitation of this retrospective study was the scarce FFPE material that did not allow us a complete characterization of the NGS findings. We were unable to characterize the fusion genes of the 3 positive cases with imbalanced 3'/5' and the putative deletions that generate the 3' isolated false-positive FISH cases. In addition, the correlation between ALK and ROS1 detection techniques requires further studies in larger prospective cohorts.

In conclusion, the identification of ALK and ROS1 rearrangements with 3' isolated signal FISH pattern might suggest a false-positive result. Although this observation had already been described for the ALK gene, to the best of our knowledge, this is the first report showing the same challenge for ROS1 FISH interpretation. NGS seems a reliable technique to assess ALK and ROS1 rearrangement and in complex or rare findings, validation through orthogonal methods should be considered.

Clinical Practice Points

- NGS assays are being used in several diagnostic settings to test for ALK and ROS1 gene fusions. Comparison with widely accepted FISH and IHC testing methodologies is now being reviewed for clinical application.
- Discrepancies between techniques have been found, especially in ALK- and ROS1-rearranged cases with isolated 3' signal FISH pattern. Differences in targeted treatment response and a higher number of concurrent alterations have been identified in these FISH-positive/NGS-negative tumors.
- As the effectiveness of therapies targeting ALK and ROS1 is highly dependent upon appropriate selection of patients, we propose a detailed reporting of positive FISH patterns and validation of samples with isolated 3' signals through orthogonal methods (NGS or IHC).

Acknowledgments

The authors want to thank Dr Javier Gimeno for helping with image acquisition, Dr Anna Puiggros for statistical assistance, and Silvia Menéndez for technical support in immunohistochemistry; all from the Pathology Department at Hospital del Mar, Barcelona, Spain. We want to particularly acknowledge the patients and Xarxa de Bancs de Tumors de Catalunya (XBTC) financed by Pla Director d'Oncologia de Catalunya for their collaboration and MarBiobanc financed by ISCIII (PT17/0015/0011).

This work was partially supported with unrestricted research grants from Pfizer and Roche pharmaceuticals, and grants from Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (2017-SGR-507), and Fondo de Investigación Sanitaria-Instituto de Salud Carlos III/CIBERONC (CB16/12/00241 and PI16/00591).

Disclosure

The authors have stated that they have no conflicts of interest.

References

1. Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007; 448:561-6.

2. Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol* 2012; 30:863-70.
3. Solomon BJ, Mok T, Kim DW, et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2014; 371:2167-77.
4. Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2014; 371:1963-71.
5. 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; 377:829-38.
6. 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; 18:874-86.
7. Lim SM, Kim HR, Lee JS, et al. Open-label, multicenter, phase II study of ceritinib in patients with non-small-cell lung cancer harboring ROS1 rearrangement. *J Clin Oncol* 2017; 35:2613-8.
8. 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; 15:504-35.
9. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn* 2013; 15:415-53.
10. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, et al. Updated molecular testing guideline for the selection of lung cancer patients for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn* 2018; 20:129-59.
11. Cabillic F, Gros A, Dugay F, et al. Parallel FISH and immunohistochemical studies of ALK status in 3244 non-small-cell lung cancers reveal major discordances. *J Thorac Oncol* 2014; 9:295-306.
12. van der Wekken AJ, Pelgrim R, 't Hart N, et al. Dichotomous ALK-IHC is a better predictor for ALK inhibition outcome than traditional ALK-FISH in advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2017; 23:4251-8.
13. Zhao J, Chen X, Zheng J, et al. A genomic and clinicopathological study of non-small-cell lung cancers with discordant ALK gene status by fluorescence in-situ hybridisation and immunohistochemical analysis. *Histopathology* 2018; 73:19-28.
14. Letovanec I, Finn S, Zygoura P, et al. European Thoracic Oncology Platform Lungscape Consortium. Evaluation of NGS and RT-PCR methods for ALK rearrangement in European NSCLC patients: results from the European Thoracic Oncology Platform Lungscape Project. *J Thorac Oncol* 2018; 13:413-25.
15. Davies KD, Le AT, Sheren J, et al. Comparison of molecular testing modalities for detection of ROS1 rearrangements in a cohort of positive patient samples. *J Thorac Oncol* 2018; 13:1474-82.
16. Dai Z, Kelly JC, Meloni-Ehrig A, et al. Incidence and patterns of ALK FISH abnormalities seen in a large unselected series of lung carcinomas. *Mol Cytogenet* 2012; 5:44.
17. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2010; 363:1693-703.
18. Thunnissen E, Bubendorf L, Dietel M, et al. EML4-ALK testing in non-small cell carcinomas of the lung: a review with recommendations. *Virchows Arch* 2012; 461:245-57.
19. Gao X, Sholl LM, Nishino M, et al. Clinical implications of variant ALK FISH rearrangement patterns. *J Thorac Oncol* 2015; 10:1648-52.
20. Dacic S, Villaruz LC, Abberbock S, et al. ALK FISH patterns and the detection of ALK fusions by next generation sequencing in lung adenocarcinoma. *Oncotarget* 2016; 7:82943-52.
21. Zhu YC, Xu CW, Ye XQ, et al. Lung cancer with concurrent EGFR mutation and ROS1 rearrangement: a case report and review of the literature. *Onco Targets Ther* 2016; 9:4301-5.
22. Fisher R, Puztai L, Swanton C. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. *Br J Cancer* 2013; 108:479-85.
23. 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; 6:1118-33.
24. Lin JJ, Riely GJ, Shaw AT. Targeting ALK: precision medicine takes on drug resistance. *Cancer Discov* 2017; 7:137-55.
25. 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.
26. Pilling AB, Kim J, Estrada-Bernal A, et al. ALK is a critical regulator of the MYC-signaling axis in ALK positive lung cancer. *Oncotarget* 2018; 9:8823-35.
27. Kang J, Chen HJ, Zhang XC, et al. Heterogeneous responses and resistant mechanisms to crizotinib in ALK-positive advanced non-small cell lung cancer. *Thorac Cancer* 2018; 9:1093-103.
28. Ren S, Hirsch FR, Varella-Garcia M, et al. Atypical negative ALK break-apart FISH harboring a crizotinib-responsive ALK rearrangement in non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2014; 9:e21-3.
29. Sun JM, Choi YL, Won JK, et al. A dramatic response to crizotinib in a non-small-cell lung cancer patient with IHC-positive and FISH-negative ALK. *J Thorac Oncol* 2012; 7:e36-8.
30. Li W, Zhang J, Guo L, et al. Combinational analysis of FISH and immunohistochemistry reveals rare genomic events in ALK fusion patterns in NSCLC that responds to crizotinib treatment. *J Thorac Oncol* 2017; 12:94-101.

31. Cabillic F, Hofman P, Ilie M, et al. ALK IHC and FISH discordant results in patients with NSCLC and treatment response: for discussion of the question-to treat or not to treat? *ESMO Open* 2018; 3:e000419.
32. Zugazagoitia J, Rueda D, Carrizo N, et al. Prospective clinical integration of an amplicon-based next-generation sequencing method to select advanced non-small cell lung cancer patients for genotype-tailored treatments. *Clin Lung Cancer* 2018; 19:65-73.
33. McLeer-Florin A, Duruisseau M, Pinsolle J, et al. ALK fusion variants detection by targeted RNA-next generation sequencing and clinical responses to crizotinib in ALK-positive non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2018; 116:15-24.

DISCUSSIÓ

PREVALÈNÇA I CARACTERITZACIÓ DELS REORDENAMENTS DE *ROS1*

En el primer article es van analitzar els reordenaments de *ROS1* per FISH en una cohort de 314 pacients amb CPCNP. Del total de mostres que es van hibridar es van valorar 283 i d'aquestes, només cinc van presentar reordenament (1,8%). En estudis anteriors la prevalença dels reordenaments de *ROS1* es va establir amb un rang del 0,8 al 2,5% dels pacients amb CPCNP no seleccionats (Yoshida, 2013; Jin, 2015). Si comparem la nostra sèrie amb cohorts més àmplies trobem discrepàncies entre poblacions segons l'etnicitat. Així, la prevalença de reordenaments de *ROS1* descrita en població asiàtica és del 2,5%, 3,1% i fins al 10% dels pacients amb CPCNP (Jin, 2015; Zhu, 2015; Lee, 2015). Per contra, si ens fixem en estudis amb població caucàsica trobem percentatges reproduïbles, com els publicats per Dugay i col·laboradors, que van estudiar per FISH 713 casos de CPCNP no escamós i n'identifiquen un 2,1% (Dugay, 2017). Altres estudis que agrupen dades de diferents centres també reporten una baixa freqüència, per exemple l'1% que es va descriure en una cohort de 4.064 pacients (Singal, 2019).

A nivell d'associacions clíniques, els casos *ROS1* positius identificats en el nostre anàlisi presenten un perfil de pacient dona no fumadora. Aquestes associacions han estat corroborades en altres publicacions de manera independent (Kim, 2013; Warth, 2014; Jin, 2015) i també en un anàlisi conjunt de 18 publicacions amb gairebé 9.900 pacients que relacionava els reordenaments de *ROS1* amb dones, no fumadors i histologia d'ADC en estadis avançats (Zhu, 2015). Així doncs, el perfil clínic d'aquests pacients *ROS1* positius és similar al dels *ALK* reordenats, incloent-hi característiques fortament definides com el gènere i el tabaquisme (Bergethon, 2012). Si es realitza una selecció clínica prèvia a la determinació molecular amb les característiques anteriorment

descrites, es pot elevar la prevalença de reordenaments de *ROS1* en la població d'interès. Per exemple en un treball de 121 CPCNP amb histologia confirmada d'ADC i negatius tant per *KRAS*, *EGFR* com per *ALK* es van descriure nou casos positius, un 7,4% (Mescam-Mancini, 2014). En qualsevol cas, la recomanació actual és realitzar l'estudi de reordenaments de *ROS1* en tots els pacients CPCNP no escamosos, independentment de les característiques clíniques, ja que aquestes associacions no són absolutes. De fet hi ha casos clínics descrits de pacients amb carcinomes escamosos *ROS1* positius que s'han beneficiat del tractament amb TKIs (Gibelin, 2016; Ju, 2018). Les característiques clíniques d'aquests convergeixen sent pacients joves i no fumadors. Per tant, les guies de cribratge ens indiquen que en els casos en que hi hagi pacients amb carcinomes escamosos però amb característiques clíniques pròpies de reordenament, l'estudi molecular de *ROS1* queda justificat a petició clínica (Tsao, 2016).

Pel que fa a la caracterització dels gens de fusió, dels cinc pacients positius, es va identificar com a parella de reordenament el gen *CD74* en dos casos i *SLC34A2* en un. El baix nombre de casos positius ens va impedir poder extreure correlacions clinicopatològiques en funció del gen de fusió, malgrat que si va permetre fer una descripció histològica d'aquests casos. S'accepta que la parella de reordenament no influeix en el tractament amb TKIs, fet que va ser determinat des d'un inici en l'estudi d'eficàcia i seguretat de crizotinib en pacients CPCNP *ROS1* positius (Shaw, 2014). Del total dels 50 pacients de l'estudi van obtenir suficient material per analitzar les parelles de fusió en 25 i la que van identificar com a més prevalent va ser *CD74* en 11 de casos, seguit de *SDC4* i *EZR* en quatre casos cadascun i *SLC34A2* en tres. Cap d'aquestes

determinava un major temps de resposta al tractament. Més recentment trobem publicacions que, amb l'adveniment de la tecnologia de NGS, han estudiat en series més amplies les diferències clinicopatològiques segons les parelles de fusió. Li i col·laboradors van publicar a mitjans del 2018 una sèrie retrospectiva de 36 pacients *ROS1* reordenats i van corroborar que *CD74* és la parella més freqüent, present en 19 casos. Van comparar-los amb els 17 casos restants, dels quals destacaven set casos amb *EZR* com a gen de fusió de *ROS1*, i l'única associació que hi van trobar va ser una major predisposició a metàstasis cerebrals en els casos fusionats amb *CD74* (Li, 2018). Per poder fer aquest anàlisi, els autors van haver d'ajuntar en un sol grup casos amb diferents parelles de reordenament, presentant una forta limitació pel que fa a l'estudi de seguiment de l'efecte del tractament amb TKIs.

És determinant la quantitat de material tumoral disponible en les mostres, dificultat que vam trobar-nos en el segon estudi que es presenta en aquesta tesi. Dels 12 pacients *ROS1* reordenats detectats per FISH seleccionats retrospectivament, vam obtenir material de set casos i resultat de NGS només en tres d'aquests: dos fusionats amb *EZR* i un amb *SDC4*. Són necessàries sèries àmplies de caracterització molecular que, amb l'extensió de la NGS a la pràctica diagnòstica habitual, permetran fer estudis dels efectes de les parelles de reordenament sobre el curs clínic dels pacients.

CARACTERITZACIÓ DE LES ALTERACIONS DE NÚMERO DE CÒPIES DE *ROS1*

L'anàlisi de les CNAs de *ROS1* en el primer article es va realitzar tenint en compte els 278 casos no reordenats amb informació valorable de la tècnica de FISH. Els guanys,

definitos com tres còpies o més del gen *ROS1* en més d'un 40% dels nuclis tumorals analitzats, es van observar en 96 casos (34%) sense tenir cap impacte en el desenvolupament clínic dels pacients. L'única publicació prèvia al nostre article trobava un percentatge menor de casos, un 4,8%, i associava a una menor PFS i supervivència global (OS) (Jin, 2015). El criteri que van utilitzar per a definir els guanys de *ROS1* va ser de més de quatre còpies per nucli, mentre que nosaltres vam definir-lo en més de tres còpies. En el nostre estudi, les CNAs de *ROS1* es van avaluar en teixit pulmonar normal establint el criteri de guany en més de tres còpies en més d'un 40% de nuclis, ja que aquest valor discriminava els artefactes propis de les seccions FFPE utilitzades per a FISH. A més, la diferència entre cohorts també podria explicar la discrepància del percentatge de casos amb guanys, ja que en la publicació de Jin la majoria de mostres eren CPCNP en estadis inicials i la població era d'ètnia asiàtica. A més, els guanys de *ROS1* que van identificar estaven associats a pacients homes i amb histologia escamosa. En el nostre estudi, per contra, la majoria dels pacients tenien un estadi avançat de la malaltia amb una baixa representació d'histologia escamosa.

Articles més recents han descrit una freqüència de guanys de còpies similar a la nostra. L'article de Dugay i col·laboradors de 2017 va definir que en la cohort *ROS1* no reordenada es troben guanys de tres a sis còpies en un 49% de casos. També van descriure un 7% de pèrdues i un 0,1% d'amplificació, sense efecte en l'expressió de la proteïna (Dugay, 2017). En el nostre article es va identificar una prevalença tant de pèrdues com d'amplificacions més elevada, amb un 25% i un 4%, respectivament. Les amplificacions es van definir com a clústers de senyals de *ROS1* o bé polisomies altes de més de 6 còpies que implicaven també el centròmer del cromosoma 6. L'expressió

de la proteïna ROS1 tampoc es va detectar en cap d'aquests casos, el que suggereix que l'amplificació no és un esdeveniment biològicament rellevant ni prediu resposta al tractament TKIs.

Notablement, el nostre estudi va ser el primer en informar d'una alta prevalença de pèrdues de *ROS1* degudes tant a la deleció de la regió 6q on es troba el locus de *ROS1*, com a la pèrdua d'un dels cromosomes 6. El punt de tall per a considerar un cas amb pèrdua de *ROS1* es va calcular en els teixits pulmonars sans inclosos en els *arrays* de teixit com a una còpia en més d'un 30% de nuclis tumorals. En estudis citogenètics anteriors es va demostrar que la pèrdua de 6q és una de les aberracions cromosòmiques més freqüents en els ADC pulmonars (Shen, 2008; Zhu, 2014). Les altres pèrdues cromosòmiques més prevalents en aquests tumors són a les regions 3p, 9p i 17p (Berrieman, 2004). El significat biològic d'aquestes alteracions recau en els canvis genòmics que es produeixen a diferents nivells en els tumors sòlids, des de mutacions en un o pocs nucleòtids fins a guanys o pèrdues de cromosomes sencers. En qualsevol cas, la inestabilitat cromosòmica genera canvis en regions que codifiquen gens supressors o de reparació del DNA, i pot estar associada directament amb la patogènesi del càncer (Mitelman, 1997). D'aquesta manera, les pèrdues de 6q havien estat prèviament associades al fenotip metastàtic dels ADC de pulmó (Goeze, 2002) fet que no es va analitzar en la nostra sèrie de casos amb pèrdues de *ROS1*. També és destacable que dels cinc casos *ROS1* reordenats, tres presentaven pèrdua de l'al·lel no reordenat de manera que en el nucli contratenyit amb DAPI no s'observaven senyals de fusió. Aquests casos no presentaven cap peculiaritat clinicopatològica i a data d'avui no hem trobat cap implicació clínica en pacients positius amb pèrdues de *ROS1*.

Tant en els casos amb guanys/amplificacions com amb delecions, l'avaluació d'aquestes CNAs va ser heterogènia entre les diferents àrees histològiques contingudes en els *arrays* de teixit. L'heterogeneïtat té implicacions diagnòstiques potencials ja que en la pràctica clínica es valoren biòpsies i citologies que contenen una part representativa del tumor i amb la que s'han de prendre decisions de tractament. Un cas heterogeni rellevant que es va estudiar en ambdós treballs és el d'una pacient asiàtica que presentava una àrea amb reordenament de *ROS1* i una altre sense però amb delecio de *ROS1*, analitzat en el primer article per FISH. Al analitzar el cas per NGS en el segon article es va identificar que la mostra restant ja no presentava el reordenament sinó que s'hi identificava una mutació de sensibilitat d'*EGFR*. Com que la tècnica de NGS no va detectar ambdues alteracions en la mateixa mostra, es va hipotetitzar que no hi havia presència de la clona *ROS1* reordenada que si es detectava per FISH en el primer article. Aquest cas pot ser considerat un exemple d'heterogeneïtat espacial dins del tumor, evidenciant que poden coexistir subpoblacions de cèl·lules amb alteracions genòmiques diferents (Fisher, 2013). En altres publicacions del nostre grup també hem pogut constatar que el CPCNP es heterogeni i que depenent de les àrees on estiguem fent les determinacions moleculars podem observar discrepàncies de resultats. Així, en un article que es presenta com a annex d'aquesta tesi, es van estudiar les diferències entre la determinació de l'amplificació de *MET* per FISH i la sobreexpressió per IHQ, i es van detectar discrepàncies entre àrees histològiques que arribaven fins al 40% dels casos (Casadevall, 2015). L'heterogeneïtat del tumor fa referència a l'existència de subpoblacions de cèl·lules amb diferents genotips que poden desenvolupar inclús comportaments biològics divergents. Aquestes diferents subpoblacions s'originen per

evolució clonal: les cèl·lules genèticament inestables acumulen alteracions i les pressions selectives afavoreixen el creixement i la supervivència de subpoblacions variants que presenten avantatges biològics (Nowell, 1976). Aquest model d'evolució clonal, en col·laboració amb els mecanismes d'inestabilitat genòmica del càncer, contribueixen a la presència d'heterogeneïtat molecular dins dels tumors.

COMPARACIÓ DE TÈCNiques PER A LA DETECCIÓ DELS REORDENAMENTS D'ALK I ROS1

Com s'ha assenyalat a la introducció, la tècnica de FISH va ser acceptada com a estàndard de referència en l'avaluació dels reordenaments d'ALK i ROS1, i inicialment va ser validada i aprovada per a la selecció de pacients a rebre crizotinib (Kwak, 2010; Shaw, 2014). L'estratègia amb sondes de trencament permet detectar els reordenaments independentment del gen de fusió amb el que faci de parella tant ALK com ROS1 i es considera suficientment robusta com per realitzar-la en mostres FFPE d'arxiu. No obstant això l'assaig requereix de l'avaluació al microscopi d'un mínim de 50 cèl·lules tumorals morfològicament ben preservades, que en un percentatge de casos no s'arriben a detectar fàcilment, i de la necessitat d'equipament i formació especialitzada per a interpretar els resultats. A partir de l'any 2015 es considera validada l'expressió de la proteïna ALK detectada per tècnica d'IHQ com a prova de diagnòstic per a la selecció de pacients a rebre TKIs (Takeuchi, 2016; van der Wekken, 2017). Paral·lelament als estudis de comparació de tècniques, l'aprovació dels inhibidors de segona generació d'ALK, ceritinib i alectinib, va ser condicionada als resultats dels estudis fase II en els que la tècnica per a la selecció de pacients va ser la

IHQ (Shaw, 2016; Soria, 2017). Per *ROS1* en canvi, la IHQ ha estat utilitzada en l'estudi fase II de ceritinib però sense ser la tècnica estàndard ja que la selecció dels pacients es va fer en base als resultats de FISH (Lim, 2017). En aquesta publicació es va realitzar IHQ de *ROS1* utilitzant l'anticòs D4D6 en 29 dels 32 pacients amb resultats positius per FISH. D'aquests 29, 25 van ser considerats positius i quatre negatius, sense expressió detectable de *ROS1*, amb una taxa de concordança del 86,2%. Per tant, malgrat en el cas d'*ALK* la tècnica de IHQ és considerada un estàndard equiparable al FISH per a la selecció de pacients, en el cas de *ROS1* es continua necessitant d'un resultat FISH positiu per a rebre tractament TKIs.

En el primer article es va realitzar IHQ per *ROS1* en quatre de les cinc mostres positives per FISH: tres van presentar un patró de tinció citoplasmàtic mentre que només un cas va presentar un patró predominant de membrana. Contràriament, totes les mostres no reordenades van ser negatives. Cal destacar que els guanys/amplificacions de *ROS1* dels casos no reordenats no van tenir un augment d'expressió de la proteïna malgrat que en alguns d'ells es va detectar una tinció citoplasmàtica lleugera i difusa. Per tal de fer un càlcul comparatiu entre tècniques, es van considerar positius els casos amb una valoració de 3+ i es va calcular que la IHQ de *ROS1* és sensible al 100% i específica al 87,5%. Aquesta inespecificitat en alguns casos anava associada a tinció en pneumòcits de tipus II benignes. En estudis anteriors es va descriure una bona correlació FISH i IHQ, tot i que els diferents autors assenyalaven que calia establir unes condicions preanalítiques òptimes per a la correcta valoració de la IHQ (Yoshida, 2014; Warth, 2014). L'especificitat del test està condicionada a l'expressió de *ROS1* en cèl·lules sense reordenament. Sholl i col·laboradors van identificar intensitats baixes d'expressió de

ROS1 en proliferacions epitelials reactives, incloses àrees d'hiperplàsia pneumocítica de tipus II, de la mateixa manera que els casos del nostre article (Sholl, 2013). Aquests casos falsos positius es detecten en cohorts més recents, com les que descriuen Selinger i col·laboradors que identifiquen 19 casos immunoreactius per ROS1 dels quals 12 tenen reordenament detectat per FISH (Selinger, 2017). Els autors van associar la prevalença de falsos positius a l'alta sensibilitat de l'anticòs D4D6 utilitzat i per això recomanen el cribratge per IHQ seguit de la validació dels casos per FISH o NGS. Consistent amb els nostres resultats, els casos reordenats detectats per FISH presenten tincions per IHQ més intenses que els negatius. Actualment es troben en desenvolupament altres clons anti-ROS1 per augmentar l'especificitat del test sense comprometre la sensibilitat (Hofman, 2019; Conde, 2019). L'interès en la validació d'anticossos IHQ recau en que aquesta tècnica es troba disponible a tots els laboratoris d'anatomia patològica, sense necessitat de formació i equipament complementaris, assegurant l'accés dels pacients d'una manera més fàcil a aquestes determinacions. A més, l'assaig és relativament econòmic, és aplicable a les mostres FFPE i requereix d'un nombre petit de cèl·lules tumorals per a detectar la presència de la proteïna de fusió.

En el segon estudi d'aquesta tesi es va ampliar la caracterització dels casos *ROS1* reordenats i també es van inspeccionar els casos *ALK* positius per FISH, seguit del test d'expressió per IHQ i per NGS. Es van seleccionar retrospectivament 33 mostres *ALK* i set *ROS1* reordenades d'una base de dades de 2.580 casos testats pels reordenaments d'*ALK* i 1.370 pels de *ROS1*. Pel que fa als resultats de concordança entre FISH, IHQ i NGS, excepte quatre casos amb senyals positives de FISH extra 3'*ALK* o 3'*ROS1* i un cas amb senyals positives de trencament *ROS1*, tots els casos reordenats van presentar

expressió per IHQ i detecció dels amplicons de fusió per NGS. Aquests cinc casos representen un 16% de discordants en la nostre sèrie. En una publicació recent es descriuen set casos *ALK* discordants entre les tres tècniques: tots amb patrons de positivitat per FISH mixtes de senyals de trencament i 3' extres (Scattone, 2019). A més, dos dels casos que presenten tenien un percentatge de positivitat proper al 15% que contrasta amb els casos positius analitzats en el nostre article els quals tenien un rang de nuclis positius del 40 al 90%. De forma consistent amb les nostres observacions però, els set pacients van rebre crizotinib i cap d'ells va respondre, amb valors de PFS inferiors als 2 mesos. Altres estudis que han comparat les tres tècniques per a la detecció de reordenaments en CPCNP han arribat a la conclusió que, tot i que la concordança entre els assajos és generalment bona, s'observen discrepàncies. Per a les proves del gen *ALK* s'accepta que la detecció de la sobreexpressió amb IHQ seguit d'una tècnica molecular com la NGS per a identificar la variant de fusió és més adequat per a fer el cribratge dels pacients que utilitzar la tècnica de FISH (Cabillic, 2018; Zugazagoitia, 2018). En un treball recent, McLeer-Florin i col·laboradors van comparar la NGS, IHQ i FISH en 53 mostres inicialment diagnosticades com a *ALK* positives. De la mateixa manera que en el nostre estudi, van descriure dos casos discordants que eren FISH positius però NGS i IHQ negatius, sense especificar si el criteri de positivitat per FISH dels dos casos era el de senyals 3' extra. En els dos pacients es va iniciar tractament amb crizotinib i van experimentar progressió a la seva malaltia (McLeer-Florin, 2018).

Altres publicacions que interroguen reordenaments del gen *ALK* per les tres tècniques coincideixen en que les tècniques d'IHQ i de NGS tenen una major concordança entre

elles que comparant-les amb la de FISH (Lin, 2019; Scattone, 2019). Ali i col·laboradors van publicar resultats de 1.070 casos de CPCNP estudiats per NGS i van identificar 47 pacients amb reordenaments d'*ALK* (4,4%). D'aquests, 28 mostres van tenir suficient material per a ser testats per FISH. Van detectar nou casos discordants (32%) dels quals cinc van respondre a crizotinib. Sense especificar el tipus de patró de FISH ni aprofundir en altres mecanismes moleculars que expliquin aquesta discordança, conclouen que el cribratge per FISH es el menys acurat i pot fer que es perdin pacients candidats a tractament amb TKIs (Ali, 2014). Pekar-Zlotin i col·laboradors també van identificar discrepàncies en la detecció d'*ALK* per les tres tècniques i van arribar a una conclusió similar que la resta d'articles: el cribratge per FISH amb sondes de tractament pot donar falsos negatius en pacients que són positius per IHQ i NGS i es beneficiarien del tractament amb TKIs (Pekar-Zlotin, 2015).

Per a les proves del gen *ROS1* actualment hi ha una gran varietat d'aproximacions disponibles, cadascuna amb les seves limitacions interpretatives. Un article recent que compara les tres tècniques identifica una bona majoria de casos concordants malgrat cap de les tècniques aconsegueix el 100% en termes de sensibilitat (Davies, 2018). En aquest estudi es van analitzar comparativament 18 mostres *ROS1* positives per FISH i NGS. Dos dels casos detectats per NGS van ser negatius per FISH, un dels quals corresponia al reordenament *GOPC(4)-ROS1(36)*. El locus de *GOPC* es troba molt a prop del de *ROS1*, a la regió 6q22, i la fusió és creada per una deleció entre introns dels dos gens, amb una separació de només 134 kb. És important destacar que aquesta petita deleció no afecta a la unió de les sondes de FISH i, per tant, s'interpreten com un nucli amb patró de FISH no reordenat. Depenent de la sonda de FISH de *ROS1* que

s'utilitzi, es pot subestimar la prevalença de fusions pel resultat fals negatiu dels casos *GOPC-ROS1* (Suehara, 2012). Pel que fa a la NGS, tres mostres van ser negatives malgrat tenir resultats per FISH clarament positius. Després d'analitzar aquests tres casos discordants alternativament per un altre assaig de NGS però basat en DNA, van concloure que no estaven davant de casos fals negatius sinó de casos no informatius per mala qualitat del RNA de les mostres FFPE. El baix percentatge de casos *ROS1* reordenats impedeix fer estudis comparatius ja que en la majoria de mostres s'esgota el material amb les proves moleculars bàsiques de cribratge.

IMPLICACIONS DELS PATRONS DE POSITIVITAT PER FISH

En el segon article es van comparar els patrons de positivitat del FISH amb les tècniques ortogonals de detecció de reordenaments, IHQ i NGS, en 40 casos reordenats. Es va demostrar que, tot i que la tècnica de FISH va ser la primera en ser acceptada pel cribratge de reordenaments dels gens *ALK* i *ROS1*, el patró de positivitat de senyals extra 3' pot representar un resultat fals positiu i requereix de confirmació per un altre mètode. La incidència dels diferents patrons de FISH en la nostra població va ser estudiada prèviament pel nostre grup i es presenta com a annex d'aquesta tesi (Vidal, 2014). En sis de les 32 mostres avaluable per NGS, dos *ALK* i quatre *ROS1* reordenats, el panell de NGS no va detectar cap fusió. En un d'aquests casos ja era esperable donat que era un patró de FISH considerat variant negatiu, amb senyals extra 5'*ROS1* que també havia estat negatiu per IHQ. Els casos FISH variants negatius amb senyals 5' extres representen un percentatge baix dels casos que s'identifiquen per FISH i la seva interpretació és actualment confosa donant que hi ha reportats casos

de pacients que han respost a tractament inhibidor (Sun, 2012; Ren, 2014). Recentment s'han publicat tres casos clínics amb aquest patró de FISH i, tractats amb crizotinib, tots tres pacients van presentar respostes objectives amb una durada d'entre 10 i 31 mesos (Guyard, 2019). Per tant, els casos amb senyals 5' extra podrien ser considerats com a no conclouents i necessitar d'un test ortogonal per IHQ o NGS per tal de discriminar si el pacient podria beneficiar-se d'un tractament amb TKIs.

Les altres cinc mostres identificades com a negatives per NGS van ser considerades doncs discordants: quatre casos amb senyals extra 3' *ALK* i 3' *ROS1* i un cas *ROS1* positiu amb senyals de trencament. Aquest últim cas *ROS1* reordenat correspon al ja comentat anteriorment com a exemple de cas amb heterogeneïtat intratumoral ja que coexistia amb una mutació sensibilitzadora del gen *EGFR*. Els pacients que presenten ambdues alteracions són extremadament rars i només s'han reportat sis casos prèviament en la literatura (Zhu, 2016). Les característiques clinicopatològiques de la nostra pacient coincideixen amb les descrites en aquests sis casos: pacient jove, d'ètnia asiàtica, no fumadora i diagnosticada d'un ADC de pulmó. Aquesta pacient va ser tractada de forma seqüencial amb inhibidors d'*ALK* i d'*EGFR* presentant resposta parcial en ambdós i amb una OS de 18 mesos.

Els quatre casos discordants restants entre la tècnica de FISH i les d'IHQ i NGS van ser dos 3' *ALK* i dos 3' *ROS1* extra. Els patrons de senyals de FISH utilitzant sondes de trencament poden variar des de senyals 3' i 5' separades a altres patrons més complexos. Per això, les grans delecions i variants estructurals que afectin el lloc d'unió de les sondes de FISH sense que hi hagi un reordenament, poden resultar en un patró de FISH idèntic que s'interpretaria com a fals positiu. Seguint amb aquesta hipòtesi, al

tractar-se la tècnica de FISH d'una avaluació subrogada del reordenament, es podria donar el cas d'interpretació de patrons de FISH com a positius en nuclis amb alteracions cromosòmiques sense reordenament del gen interrogat. Un estudi previ que en fa referència és el de Gao i col·laboradors l'any 2015. Els autors van reunir retrospectivament la informació de la determinació d'*ALK* per FISH en 1.614 pacients amb CPCNP. D'aquests van informar 82 (5,1%) com a positius: 30 (37%) amb senyals típiques de trencament i 25 (30%) amb senyals atípiques extra 3'*ALK*. No van tenir accés a la informació del patró de positivitat per FISH dels 27 pacients restants. En analitzar les mostres per IHQ van veure que tots els casos FISH positius amb senyals de trencament tenien expressió d'*ALK*, mentre que en tres de les 21 mostres positives extra 3'*ALK* amb material suficient la IHQ va ser negativa (Gao, 2015). En dos d'aquestes els autors van realitzar un panell de NGS i van identificar alteracions concurrents: una mutació p.L858R del gen *EGFR* i una p.Q61L de *KRAS*. En els nostres quatre casos discordants amb senyals extra 3'*ALK* i 3'*ROS1* es van identificar simultàniament la mutació p.R24H de *CDK4* en un pacient *ROS1* i una amplificació de *MET* en un pacient *ALK*. L'altre article previ al nostre, que explora les discordances entre tècniques en aquest patró de FISH positiu, és una publicació més recent que va descriure que els casos amb un patró FISH positiu de senyals extra 3'*ALK* presenten una probabilitat més elevada a ser falsos positius (Dacic, 2016). Dacic i col·laboradors van publicar un estudi comparatiu amb 28 casos *ALK* positius analitzats per FISH als que van realitzar IHQ i NGS. Dels 10 casos que van identificar per FISH amb patró extra 3'*ALK*, sis van ser negatius per NGS i quatre d'aquests també ho van ser per IHQ. L'anàlisi per NGS d'aquests casos discordants també va ser útil ja que en tres d'aquests casos els autors van identificar mutacions dels gens *KRAS*, *BRAF* i *EGFR*. En referència a

la resposta a tractament TKIs dels casos discordants 3' *ALK* i 3' *ROS1* del nostre article, tot i que no es van poder fer associacions estadísticament significatives degut al baix número de casos amb informació del tractament, la PFS va ser inferior a la dels casos positius concordants: 7,6 (95% CI; 2,2-13) vs. 19,4 mesos (95% CI; 10,1-28,6). En els articles de Gao i Dacic es descriu la mateixa situació: els casos 3' *ALK* discordants van tenir major nombre d'alteracions concomitants en gens considerats oncogènics i pitjor resposta a tractament amb TKIs anti-*ALK* (Gao, 2015; Dacic, 2016). De forma remarcable, el nostre article va ser el primer en identificar casos *ROS1* reordenats amb el patró fals positiu de FISH de senyals extra 3'.

CARACTERITZACIÓ DE LES ALTERACIONS CONCURRENTS DELS CASOS REORDENATS

La tècnica de NGS permet tant la caracterització del reordenament com la identificació d'altres alteracions moleculars acompanyants. En els casos positius analitzats en el segon article es va detectar només un cas amb una fusió *EML4(13)-ALK(20)* que coexistia amb una mutació de resistència *ALK* p.L1196M al 4% de la freqüència al·lèlica. Pel que fa a les CNVs acompanyants detectades per NGS, es va identificar un cas amb reordenament *EML4(13)-ALK(20)* i amplificació de *CDK4* i un cas *EML4(6)-ALK(20)* amb amplificació de *MYC*. Es va destacar un cas amb reordenament *EML4(2)-ALK(20)* identificat a la biòpsia diagnòstica que va presentar amplificació dels gens *ALK* i *MYC* a la biòpsia de progressió. Finalment, un últim cas *SDC4(2)-ROS1(32)* presentava una amplificació del gen *FGFR4*. El primer cas es tractava d'un pacient home de 60 anys en el que conèixer la mutació de resistència p.L1196M des d'un inici hauria permès opcions terapèutiques teòricament més beneficioses. Aquesta mutació puntual,

anàloga a l'alteració p.T790M de resistència a tractament anti-EGFR, va ser la primera en descriure's en casos *ALK* reordenats que progressaven a crizotinib (Choi, 2010). La mutació p.L1196M altera un residu de la butxaca d'unió a l'ATP del domini RTK d'*ALK* de manera que en disminueix l'afinitat amb el crizotinib (Katayama, 2011). Aquestes mutacions puntuals provoquen canvis estructurals que modifiquen l'afinitat dels RTKs per l'ATP i les molècules inhibidores, que entren en competició perdent activitat enzimàtica. Per poder avançar en el tractament d'aquests pacients resistents s'han de conèixer les diferències estructurals entre els TKIs disponibles ja que cadascun d'ells s'associarà a un perfil específic de mutacions de resistència. El pacient del nostre article va ser tractat amb crizotinib en segona línia i, tot i que va obtenir una resposta parcial prolongada de 21,2 mesos, es podria haver beneficiat d'un tractament TKIs més selectiu, com alectinib, que ha demostrat una millor activitat en pacients amb aquesta mutació (Gainor, 2016).

L'altre cas d'interès pel que fa a les concomitàncies que s'hi van detectar per NGS va ser la biòpsia a la progressió a crizotinib que presentava amplificació dels gens *ALK* i *MYC*. L'amplificació d'*ALK* ocorre amb menys freqüència que les mutacions secundàries però es reconeix com a causa de la resistència adquirida (Lin, 2017). En una sèrie de 15 casos CPCNP *ALK* reordenats resistents a TKIs es van identificar amplificacions del gen en un dels casos (6,7%), sense que tingués cap mutació acompanyant (Katayama, 2012). En una altra sèrie similar van trobar un augment de les còpies del gen *ALK*, considerades amplificacions, en dos dels 11 casos post-crizotinib (18,2%), tot i que un d'aquests també va tenir una mutació puntual de resistència al gen *ALK* (Doebele, 2012). En el nostre article no es van seleccionar els

casos en funció de les progressions a TKIs si bé aquest cas corresponia a una rebiòpsia d'un pacient que en la mostra inicial no presentava aquesta amplificació d'*ALK*.

En la mateixa mostra a la progressió comentada en el paràgraf anterior i, en un altre cas *EML4(6)-ALK(20)*, es va identificar amplificació del gen *MYC*. L'augment de còpies de *MYC* està relacionada amb una major expressió d'*EML4-ALK* dins de les cèl·lules, fet que pot ser considerat com un mecanisme de resistència als inhibidors d'*ALK* (Alidousty, 2018). En una publicació recent amb models preclínic, van demostrar que la pèrdua de la proteïna cMYC augmenta la sensibilitat dels TKIs en línies cel·lulars *ALK* reordenades, ja que tant cMYC com *ALK* cooperen en la senyalització oncogènica derivada de la resistència a la teràpia (Pilling, 2018). Clínicament, el pacient amb ambdues amplificacions a la progressió va ser tractat en primera línia amb crizotinib amb una duració de tractament d'1,8 mesos i posteriorment va rebre alectinib durant 2,1 mesos, amb el que tampoc va obtenir resposta. En el segon pacient en el que vam detectar només l'amplificació de *MYC* no es va arribar a iniciar tractament específic anti-*ALK* ja que el pacient va ser diagnosticat en un estat molt deteriorat, sent èxitus a les dos setmanes del diagnòstic.

Les alteracions de *CDK4* s'han relacionat amb les d'*ALK* però com a possible teràpia combinada amb TKIs contra ambdós molècules en una entitat tumoral diferent (Wood, 2017). En aquest estudi de combinació de fàrmacs sobre línies cel·lulars derivades de neuroblastoma van destacar la sinergia entre ceritinib i ribociclib, un inhibidor dual de les ciclins *CDK4* i *CDK6*. Pel que fa a l'amplificació de *FGFR4* identificada en un cas amb fusió de *ROS1*, tampoc hi ha casos previs descrits en els que es pugui relacionar com a mecanisme de resistència. *FGFR4* però, com a RTK, pot representar un possible

mecanisme bypass de resistència i es podria arribar a dissenyar una estratègia de tractament per a fer-ne una inhibició combinada juntament amb un fàrmac anti-ROS1 (Tang, 2018). El seguiment clínic d'aquests casos permetrà observar si aquestes alteracions poden ser considerades mecanismes de resistència o bé formen part de les alteracions moleculars que des d'un inici ja eren present en ambdós tumors.

Com s'ha observat en els casos *ALK* i *ROS1* positius estudiats en aquests articles, els pacients generen mecanismes de resistència als tractaments que impliquen la progressió de la malaltia. Un dels principals reptes en la gestió clínica dels pacients amb CPCNP portadors d'alteracions moleculars tractables és comprendre el motiu pel qual es desenvolupen aquests mecanismes de resistència per tal de superar-los i fins i tot prevenir-los. Tot i que s'estan fent grans esforços per augmentar la freqüència de les biòpsies per a l'anàlisi molecular dels tumors resistents, aquestes presenten un risc per a la seguretat del pacient. A més, el mostreig del tumor per biòpsia està esbiaixat inherentment ja que es subestima l'heterogeneïtat intratumoral present (Gerlinger, 2012). L'anàlisi de DNA circulant en plasma permet detectar amb èxit els possibles mecanismes heterogenis de resistència a les teràpies dirigides d'una manera no invasiva (Crowley, 2013). La biòpsia líquida s'afegeix així com a metodologia de gestió dels pacients CPCNP tenint un fort impacte a tres nivells diferents: en el cribratge inicial dels reordenaments d'*ALK* i *ROS1*; en la identificació de mecanismes de resistència en pacients que reben teràpies dirigides; i en el seguiment de la resposta a la teràpia i la predicció del resultat clínic (Mezquita, 2018; Zhang, 2018; Ding, 2019; Park, 2019). Pel moment, només trobem considerada la biòpsia líquida en les guies clíniques per a la interrogació de la mutació p.T790M del gen *EGFR* en els pacients amb

CPCNP que han progressat a tractament anti-EGFR de primera i segona generació (Lindeman, 2018). És d'esperar que en un futur proper, les recomanacions pel diagnòstic i el seguiment dels pacients amb CPCNP *ALK* i *ROS1* reordenats integrin la biòpsia líquida com a mètode essencial del maneig clínic.

CONCLUSIONS

Les conclusions d'aquesta tesi són:

1. Els reordenaments de *ROS1* són alteracions moleculars poc freqüents en la població caucàsica que es poden considerar esdeveniments moleculars rars. Les parelles de reordenament del gen *ROS1* són variables i la seva identificació queda condicionada a l'ús de les tècniques de NGS com a mètode de cribratge dels pacients.
2. Les alteracions de número de còpies del gen *ROS1* són freqüents i es presenten de forma heterogènia entre diferents àrees histològiques del tumor. Malgrat destaquí l'alta prevalença tant de guanys/amplificacions com de delecions de *ROS1* en els casos no reordenats, aquestes alteracions no afecten l'expressió de *ROS1* ni presenten implicacions clíniques en quan a supervivència.
3. Els resultats de la tècnica de NGS són fiables clínicament per a l'avaluació dels reordenaments d'*ALK* i *ROS1*, oferint l'avantatge sobre la IHQ de permetre la caracterització de la parella de reordenament així com la detecció d'altres alteracions moleculars amb possibles implicacions terapèutiques.
4. El patró positiu de senyals extra 3' utilitzant sondes de trencament per a l'avaluació de reordenaments d'*ALK* i *ROS1* per FISH podria suggerir un resultat fals positiu. Els pacients amb aquests resultats discordants tenen diferències en els temps de resposta a TKIs, així com un major nombre d'alteracions concurrents. Quan s'utilitza la tècnica de FISH com a mètode de selecció pel tractament amb TKIs s'hauria de considerar detallar el patró de positivitat i estudiar aquests casos per un mètode ortogonal.

5. Els pacients amb reordenaments dels gens *ALK* i *ROS1* presenten alteracions concurrents diverses, detectades al moment del diagnòstic, que podrien esdevenir mecanismes de resistència als tractaments inhibidors. El diagnòstic molecular inicial i el seguiment per tècnica de NGS permet detectar aquestes alteracions genòmiques concurrents que tenen efecte en el maneig clínic dels pacients.

BIBLIOGRAFIA

Abo RP, Ducar M, Garcia EP, *et al.* Breakmer: detection of structural variation in targeted massively parallel sequencing data using kmers. *Nucleic Acids Res.* 2015;43:e19.

Acquaviva J, Wong R, Charest A. The multifaceted roles of the receptor tyrosine kinase ROS in development and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1795:37-52.

Alamgeer M, Ganju V, Watkins DN. Novel therapeutic targets in non-small cell lung cancer. *Curr Opin Pharmacol.* 2013;13:394-401.

Ali SM, Ou S-HI, He J, *et al.* Identifying ALK rearrangements that are not detected by FISH with targeted next-generation sequencing of lung carcinoma. *J Clin Oncol.* 2014;32(suppl):8049a.

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.

ALK Break-Apart FISH Evaluation Guide for NSCLC Tissue Specimens, Abbott Molecular.

Awad MM, Katayama R, McTigue M, *et al.* Acquired resistance to crizotinib from a mutation in CD74-ROS1. *N Engl J Med.* 2013;368:2395-401.

Babic A, Loftin IR, Stanislaw S, *et al.* The impact of pre-analytical processing on staining quality for H&E, dual hapten, dual color in situ hybridization and fluorescent in situ hybridization assays. *Methods.* 2010;52:287-300.

Beadling C, Wald AI, Warrick A, *et al.* A Multiplexed Amplicon Approach for Detecting Gene Fusions by Next-Generation Sequencing. *J Mol Diagn.* 2016;18:165-75.

Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, *et al.* ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol.* 2012;30:863-70.

Berrieman HK, Ashman JN, Cowen ME, *et al.* Chromosomal analysis of non-small-cell lung cancer by multicolour fluorescent in situ hybridisation. *Br J Cancer.* 2004;90:900-5.

Birchmeier C, Sharma S, Wigler M, *et al.* Expression and rearrangement of the ROS1 gene in human glioblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:9270-4.

Blind C, Koepfenik A, Pacyna-Gengelbach M, *et al.* Antigenicity testing by immunohistochemistry after tissue oxidation. *J Clin Pathol.* 2008;61:79-83.

Bonin S, Hlubek F, Benhattar J, *et al.* Multicentre validation study of nucleic acids extraction from FFPE tissues. *Virchows Arch.* 2010;457:309-17.

Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, *et al.* Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015;373:1627-39.

Boyle TA, Masago K, Ellison KE, *et al.* ROS1 immunohistochemistry among major genotypes of non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer.* 2015;16:106-11.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68:394-424.

Bubendorf L, Büttner R, Al-Dayel F, *et al.* Testing for ROS1 in non-small cell lung cancer: a review with recommendations. *Virchows Arch.* 2016;469:489-503.

Cabillic F, Gros A, Dugay F, *et al.* Parallel FISH and immunohistochemical studies of ALK status in 3244 non-small-cell lung cancers reveal major discordances. *J Thorac Oncol.* 2014;9:295-306.

Cabillic F, Hofman P, Ilie M, *et al.* ALK IHC and FISH discordant results in patients with NSCLC and treatment response: for discussion of the question-to treat or not to treat? *ESMO Open.* 2018;3:e000419.

Camidge DR, Kim HR, Ahn MJ, *et al.* Brigatinib versus Crizotinib in ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2018;379:2027-39.

Camidge DR, Kono SA, Flacco A, *et al.* Optimizing the detection of lung cancer patients harboring anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangements potentially suitable for ALK inhibitor treatment. *Clin Cancer Res.* 2010;16:5581-90.

Camidge DR, Theodoro M, Maxson DA, *et al.* Correlations between the percentage of tumor cells showing an anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangement, ALK

signal copy number, and response to crizotinib therapy in ALK fluorescence in situ hybridization-positive nonsmall cell lung cancer. *Cancer*. 2012;118:4486-94.

Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*. 2014;511:543-50.

Casadevall D, Gimeno J, Clavé S, *et al*. MET expression and copy number heterogeneity in nonsquamous non-small cell lung cancer (nsNSCLC). *Oncotarget*. 2015;6:16215-26.

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;363:1734–9.

Clavé S, Gimeno J, Muñoz-Mármol AM, *et al*. ROS1 copy number alterations are frequent in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2016;7:8019-28.

Clavé S, Pijuan L, Casadevall D, *et al*. CD274 (PDL1) and JAK2 genomic amplifications in pulmonary squamous-cell and adenocarcinoma patients. *Histopathology*. 2018;72:259-69.

Clavé S, Rodon N, Pijuan L, *et al*. Next-generation Sequencing for ALK and ROS1 Rearrangement Detection in Patients With Non-small-cell Lung Cancer: Implications of FISH-positive Patterns. *Clin Lung Cancer*. 2019;20:e421-9.

Conde E, Hernandez S, Martinez R, *et al*. Assessment of a New ROS1 Immunohistochemistry Clone (SP384) for the Identification of ROS1 Rearrangements in Non-Small Cell Lung Carcinoma Patients: the ROSING Study. *J Thorac Oncol*. 2019; pii: S1556-0864(19)30562-3.

Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, *et al*. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013;10:472-84.

Cutz JC, Craddock KJ, Torlakovic E, *et al*. Canadian anaplastic lymphoma kinase study: a model for multicenter standardization and optimization of ALK testing in lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2014;9:1255-63.

Dacic S, Villaruz LC, Abberbock S, *et al.* ALK FISH patterns and the detection of ALK fusions by next generation sequencing in lung adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2016;7:82943-52.

Dai Z, Kelly JC, Meloni-Ehrig A, *et al.* Incidence and patterns of ALK FISH abnormalities seen in a large unselected series of lung carcinomas. *Mol Cytogenet*. 2012;5:44.

Davies KD, Doebele RC. Molecular pathways: ROS1 fusion proteins in cancer. *Clin Cancer Res*. 2013;19:4040-5.

Davies KD, Le AT, Sheren J, *et al.* Comparison of Molecular Testing Modalities for Detection of ROS1 Rearrangements in a Cohort of Positive Patient Samples. *J Thorac Oncol*. 2018;13:1474-82.

Davies KD, Le AT, Theodoro MF, *et al.* Identifying and targeting ROS1 gene fusions in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18:4570-9.

Davies KD, Mahale S, Astling DP, Aisner DL, *et al.* Resistance to ROS1 inhibition mediated by EGFR pathway activation in non-small cell lung cancer. *PLoS One*. 2013;8:e82236.

Demidova I, Grinevich V, Avdalian A, *et al.* Detection of ALK rearrangements in 4002 Russian patients: The utility of different diagnostic approaches. *Lung Cancer*. 2017;103:17-23.

Dietel M, Bubendorf L, Dingemans AM, *et al.* Diagnostic procedures for non-small-cell lung cancer (NSCLC): recommendations of the European Expert Group. *Thorax*. 2016;71:177-84.

Ding M, Deng L, Yu R, *et al.* Case Report: Temporal Heterogeneity of ALK Activating Mutations in Sequential ALK TKI-Treated Non-Small-Cell Lung Cancer Revealed Using NGS-Based Liquid Biopsy. *Clin Lung Cancer*. 2019;20:e229-32.

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;18:1472-82.

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;7:400-9.

Du X, Shao Y, Qin HF, *et al.* ALK-rearrangement in non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Thorac Cancer.* 2018;9:423-30.

Dugay F, Llamas-Gutierrez F, Gournay M, *et al.* Clinicopathological characteristics of ROS1- and RET-rearranged NSCLC in caucasian patients: Data from a cohort of 713 non-squamous NSCLC lacking KRAS/EGFR/HER2/BRAF/PIK3CA/ALK alterations. *Oncotarget.* 2017;8:53336-51.

Dziadziuszko R, Le AT, Wrona A, *et al.* An Activating KIT Mutation Induces Crizotinib Resistance in ROS1-Positive Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2016;11:1273-81.

Eichenmuller B, Everley P, Palange J, *et al.* The human EMAP-like protein-70 (ELP70) is a microtubule destabilizer that localizes to the mitotic apparatus. *J Biol Chem.* 2002;277:1301-9.

Facchinetti F, Tiseo M, Di Maio M, *et al.* Tackling ALK in non-small cell lung cancer: the role of novel inhibitors. *Transl Lung Cancer Res.* 2016;5:301-21.

Felip E, Concha Á, de Castro J, *et al.* Biomarker testing in advanced non-small-cell lung cancer: a National Consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clin Transl Oncol.* 2015;17:103-12.

Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M, *et al.* Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet.* 2016;387:1837-46.

Fisher R, Puztai L, Swanton C. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. *Br J Cancer.* 2013;108:479-85.

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;31:1023-31.

Friboulet L, Li N, Katayama R, *et al.* The ALK inhibitor ceritinib overcomes crizotinib resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Discov.* 2014;4:662-73.

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;6:1118-33.

Gainor JF, Tseng D, Yoda S, *et al.* Patterns of Metastatic Spread and Mechanisms of Resistance to Crizotinib in ROS1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *JCO Precis Oncol.* 2017;2017.

Gao X, Sholl LM, Nishino M, *et al.* Clinical Implications of Variant ALK FISH Rearrangement Patterns. *J Thorac Oncol.* 2015;10:1648-52.

Garon EB, Rizvi NA, Hui R, *et al.* Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2015;372:2018-28.

Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, *et al.* Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med.* 2012;366:883-92.

Gibelin C, Avrillon V, De La Fouchardiere A, *et al.* Clinical relevance of ROS1 rearrangements detection in advanced squamous cell carcinomas. *Lung Cancer.* 2016;102:42-3.

Goeze A, Schlüns K, Wolf G, *et al.* Chromosomal imbalances of primary and metastatic lung adenocarcinomas. *J Pathol.* 2002 Jan;196:8-16.

Goswami RS, Luthra R, Singh RR, *et al.* Identification of Factors Affecting the Success of Next-Generation Sequencing Testing in Solid Tumors. *Am J Clin Pathol.* 2016;145:222-37.

Gouji T, Takashi S, Mitsuhiro T, *et al.* Crizotinib can overcome acquired resistance to CH5424802: is amplification of the MET gene a key factor? *J Thorac Oncol.* 2014;9:e27-8.

Griffin CA, Hawkins AL, Dvorak C, *et al.* Recurrent involvement of 2p23 in inflammatory myofibroblastic tumors. *Cancer Res.* 1999;59:2776-80.

Guyard A, Charpy C, Théou-Anton N, *et al.* Isolated 5' Signals Are an Atypical Pattern To Be Considered as Positive for ALK Rearrangement: A Brief Report of Three Cases and Review of the Literature. *Transl Oncol.* 2019;12:784-7.

Hofman V, Rouquette I, Long-Mira E, *et al.* Multicenter Evaluation of a Novel ROS1 Immunohistochemistry Assay (SP384) for Detection of ROS1 Rearrangements in a Large Cohort of Lung Adenocarcinoma Patients. *J Thorac Oncol.* 2019;14:1204-12.

Horn L, Infante JR, Reckamp KL, *et al.* Ensartinib (X-396) in ALK-Positive Non-Small Cell Lung Cancer: Results from a First-in-Human Phase I/II, Multicenter Study. *Clin Cancer Res.* 2018;24:2771-9.

Hovelson DH, McDaniel AS, Cani AK, *et al.* Development and validation of a scalable next-generation sequencing system for assessing relevant somatic variants in solid tumors. *Neoplasia.* 2015;17:385-99.

Hrustanovic G, Olivas V, Pazarentzos E, *et al.* RAS-MAPK dependence underlies a rational polytherapy strategy in EML4-ALK-positive lung cancer. *Nat Med.* 2015;21:1038-47.

Ibrahim M, Parry S, Wilkinson D, *et al.* ALK Immunohistochemistry in NSCLC: Discordant Staining Can Impact Patient Treatment Regimen. *J Thorac Oncol.* 2016;11:2241-7.

Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, *et al.* Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagn.* 2017;19:341-65.

Jiang L, Yang H, He P, *et al.* Improving Selection Criteria for ALK Inhibitor Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer: A Pooled-Data Analysis on Diagnostic Operating Characteristics of Immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol.* 2016;40:697-703.

Jin Y, Sun PL, Kim H, *et al.* ROS1 gene rearrangement and copy number gain in non-small cell lung cancer. *Virchows Arch.* 2015;466:45-52.

Ju L, Han M, Su J, *et al.* A lung squamous carcinoma patient with ROS1 rearrangement sensitive to crizotinib. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2018;82:561-4.

Kanagal-Shamanna R, Portier BP, Singh RR, *et al.* Next-generation sequencing-based multi-gene mutation profiling of solid tumors using fine needle aspiration samples: promises and challenges for routine clinical diagnostics. *Mod Pathol.* 2014;27:314-27.

Katayama R, Khan TM, Benes C, *et al.* Therapeutic strategies to overcome crizotinib resistance in non-small cell lung cancers harboring the fusion oncogene EML4-ALK. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:7535-40.

Katayama R, Shaw AT, Khan TM, *et al.* Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung Cancers. *Sci Transl Med.* 2012;4:120ra17.

Kerr KM, Bubendorf L, Edelman MJ, *et al.* Second ESMO consensus conference on lung cancer: pathology and molecular biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2014;25:1681-90.

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;4:149-55.

Kim H, Xu X, Yoo SB, *et al.* Discordance between anaplastic lymphoma kinase status in primary non-small-cell lung cancers and their corresponding metastases. *Histopathology.* 2013;62:305-14.

Kim HR, Lim SM, Kim HJ, *et al.* The frequency and impact of ROS1 rearrangement on clinical outcomes in never smokers with lung adenocarcinoma. *Ann Oncol.* 2013;24:2364-70.

Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, *et al.* Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2010;363:1693-703.

Lamant L, Meggetto F, al Saati T, *et al.* High incidence of the t(2;5)(p23;q35) translocation in anaplastic large cell lymphoma and its lack of detection in Hodgkin's

disease. Comparison of cytogenetic analysis, reverse transcriptase-polymerase chain reaction, and P-80 immunostaining. *Blood*. 1996;87:284-91.

Lantuejoul S, Rouquette I, Blons H, *et al*. French multicentric validation of ALK rearrangement diagnostic in 547 lung adenocarcinomas. *Eur Respir J*. 2015;46:207-18.

Lee SE, Lee B, Hong M, *et al*. Comprehensive analysis of RET and ROS1 rearrangement in lung adenocarcinoma. *Mod Pathol*. 2015;28:468-79.

Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2010;141:1117-34.

Letovanec I, Finn S, Zygoura P, *et al*. Evaluation of NGS and RT-PCR Methods for ALK Rearrangement in European NSCLC Patients: Results from the European Thoracic Oncology Platform Lungscape Project. *J Thorac Oncol*. 2018;13:413-25.

Li Z, Shen L, Ding D, *et al*. Efficacy of Crizotinib among Different Types of ROS1 Fusion Partners in Patients with ROS1-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2018;13:987-95.

Lim AS, Lim TH. Fluorescence In Situ Hybridization on Tissue Sections. *Methods Mol Biol*. 2017;1541:119-125.

Lim SM, Kim HR, Lee JS, *et al*. Open-Label, Multicenter, Phase II Study of Ceritinib in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring ROS1 Rearrangement. *J Clin Oncol*. 2017;35:2613-8.

Lin C, Shi X, Yang S, *et al*. Comparison of ALK detection by FISH, IHC and NGS to predict benefit from crizotinib in advanced non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2019;131:62-8.

Lin JJ, Riely GJ, Shaw AT. Targeting ALK: Precision Medicine Takes on Drug Resistance. *Cancer Discov*. 2017;7:137-55.

Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, *et al*. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase

Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol.* 2018;13:323-58.

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;350:2129-39.

Marchetti A, Di Lorito A, Pace MV, *et al.* ALK Protein Analysis by IHC Staining after Recent Regulatory Changes: A Comparison of Two Widely Used Approaches, Revision of the Literature, and a New Testing Algorithm. *J Thorac Oncol.* 2016;11:487-95.

McDermott U, Iafrate AJ, Gray NS, *et al.* Genomic alterations of anaplastic lymphoma kinase may sensitize tumors to anaplastic lymphoma kinase inhibitors. *Cancer Res.* 2008;68:3389-95.

McLeer-Florin A, Duruisseaux M, Pinsolle J, *et al.* ALK fusion variants detection by targeted RNA-next generation sequencing and clinical responses to crizotinib in ALK-positive non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2018;116:15-24.

Mescam-Mancini L, Lantuéjoul S, Moro-Sibilot D, *et al.* On the relevance of a testing algorithm for the detection of ROS1-rearranged lung adenocarcinomas. *Lung Cancer.* 2014;83:168-73.

Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010;11:31-46.

Mezquita L, Jovelet C, Lacroix L, *et al.* An amplicon-based liquid biopsy for detecting ALK and ROS1 fusions and resistance mutations in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. *J Clin Oncol.* 2018;36:15_suppl.9095.

Mino-Kenudson M. Immunohistochemistry for predictive biomarkers in non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res.* 2017;6:570-87.

Mino-Kenudson M, Chirieac LR, Law K, *et al.* A novel, highly sensitive antibody allows for the routine detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas by standard immunohistochemistry. *Clin Cancer Res.* 2010;16:1561-71.

Mitelman F, Mertens F, Johansson B. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat Genet.* 1997;15 Spec No:417-74.

Molina JR, Yang P, Cassivi SD, *et al.* Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc.* 2008;83:584-94.

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;263:1281-4.

Nakamura H, Tsuta K, Yoshida A, *et al.* Aberrant anaplastic lymphoma kinase expression in high-grade pulmonary neuroendocrine carcinoma. *J Clin Pathol.* 2013;66:705-7.

Neel DS, Allegakoen DV, Olivas V, *et al.* Differential Subcellular Localization Regulates Oncogenic Signaling by ROS1 Kinase Fusion Proteins. *Cancer Res.* 2019;79:546-56.

Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 1976;194:23-8.

Ou SH, 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.* 2016;34:661-8.

Ou SH, Azada M, Hsiang DJ, *et al.* Next-generation sequencing reveals a Novel NSCLC ALK F1174V mutation and confirms ALK G1202R mutation confers high-level resistance to alectinib (CH5424802/RO5424802) in ALK-rearranged NSCLC patients who progressed on crizotinib. *J Thorac Oncol.* 2014;9:549-53.

Ou SH, Tan J, Yen Y, *et al.* ROS1 as a 'druggable' receptor tyrosine kinase: lessons learned from inhibiting the ALK pathway. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2012;12:447-56.

Park CK, Kim JE, Kim MS, *et al.* Feasibility of liquid biopsy using plasma and platelets for detection of anaplastic lymphoma kinase rearrangements in non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2019;145:2071-82.

Park S, Ahn BC, Lim SW, *et al.* Characteristics and Outcome of ROS1-Positive Non-Small Cell Lung Cancer Patients in Routine Clinical Practice. *J Thorac Oncol.* 2018;13:1373-82.

Pekar-Zlotin M, Hirsch FR, Soussan-Gutman L, *et al.* Fluorescence In Situ Hybridization, Immunohistochemistry, and Next-Generation Sequencing for Detection of EML4-ALK Rearrangement in Lung Cancer. *Oncologist.* 2015;20: 316–22.

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;377:829-38.

Pfarr N, Stenzinger A, Penzel R, *et al.* High-throughput diagnostic profiling of clinically actionable gene fusions in lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2016;55:30-44.

Pilling AB, Kim J, Estrada-Bernal A, *et al.* ALK is a critical regulator of the MYC-signaling axis in ALK positive lung cancer. *Oncotarget.* 2018;9:8823-35.

Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83:2934-8.

Planchard D, Kim TM, Mazieres J, *et al.* Dabrafenib in patients with BRAF(V600E)-positive advanced non-small-cell lung cancer: a single-arm, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2016;17:642-50.

Pulford K, Lamant L, Morris SW, *et al.* Detection of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and nucleolar protein nucleophosmin (NPM)-ALK proteins in normal and neoplastic cells with the monoclonal antibody ALK1. *Blood.* 1997;89:1394-404.

Pulford K, Morris SW, Turturro F. Anaplastic lymphoma kinase proteins in growth control and cancer. *J Cell Physiol.* 2004;199:330-58.

Ren S, Hirsch FR, Varella-Garcia M, *et al.* Atypical negative ALK break-apart FISH harboring a crizotinib-responsive ALK rearrangement in non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2014;9:e21-3.

Rikova K, Guo A, Zeng Q, *et al.* Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell.* 2007;131:1190-203.

Rimkunas VM, Crosby KE, Li D, *et al.* Analysis of receptor tyrosine kinase ROS1-positive tumors in non-small cell lung cancer: identification of a FIG-ROS1 fusion. *Clin Cancer Res.* 2012;18:4449-57.

Rodig SJ, Mino-Kenudson M, Dacic S, *et al.* Unique clinicopathologic features characterize ALK-rearranged lung adenocarcinoma in the western population. *Clin Cancer Res.* 2009;15:5216-23.

Rogers TM, Russell PA, Wright G, *et al.* Comparison of methods in the detection of ALK and ROS1 rearrangements in lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2015;10:611-8.

Roys A, Chang X, Liu Y, *et al.* Resistance mechanisms and potent-targeted therapies of ROS1-positive lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2019. doi: 10.1007/s00280-019-03902-6.

Sabir SR, Yeoh S, Jackson G, *et al.* EML4-ALK Variants: Biological and Molecular Properties, and the Implications for Patients. *Cancers (Basel).* 2017;9.

Salido M, Pijuan L, Galván AB, *et al.* ALK status in a primary lung tumour and metachronous metastases. *Histopathology.* 2012;60:843-5.

Salido M, Pijuan L, Martínez-Avilés L, *et al.* Increased ALK gene copy number and amplification are frequent in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2011;6:21-7.

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;71:6051-60.

Sasaki T, Rodig SJ, Chirieac LR, *et al.* The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer.* 2010;46:1773-80.

Scattone A, Catino A, Schirosi L, *et al.* Discordance between FISH, IHC, and NGS Analysis of ALK Status in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): a Brief Report of 7 Cases. *Transl Oncol.* 2019;12:389-95.

Schröder J, Kumar A, Wong SQ. Overview of Fusion Detection Strategies Using Next-Generation Sequencing. *Methods Mol Biol.* 2019;1908:125-38.

Sehgal K, Patell R, Rangachari D, *et al.* Targeting ROS1 rearrangements in non-small cell lung cancer with crizotinib and other kinase inhibitors. *Transl Cancer Res.* 2018;7:S779-S86.

Selinger CI, Li BT, Pavlakis N, *et al.* Screening for ROS1 gene rearrangements in non-small-cell lung cancers using immunohistochemistry with FISH confirmation is an effective method to identify this rare target. *Histopathology.* 2017;70:402-11.

Shaw AT, Felip E, Bauer TM, *et al.* Lorlatinib in non-small-cell lung cancer with ALK or ROS1 rearrangement: an international, multicentre, open-label, single-arm first-in-man phase 1 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18:1590-9.

Shaw AT, Gandhi L, Gadgeel S, *et al.* Alectinib in ALK-positive, crizotinib-resistant, non-small-cell lung cancer: a single-group, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2016;17:234-42.

Shaw AT, Kim DW, Mehra R, *et al.* Ceritinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2014;370:1189-97.

Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, *et al.* Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2014;371:1963-71.

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;27:4247-53.

Shen H, Zhu Y, Wu YJ, *et al.* Genomic alterations in lung adenocarcinomas detected by multicolor fluorescence in situ hybridization and comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet.* 2008;181:100-7.

Shen Q, Wang X, Yu B, *et al.* Comparing four different ALK antibodies with manual immunohistochemistry (IHC) to screen for ALK-rearranged non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer.* 2015;90:492-8.

Sholl LM, Sun H, Butaney M, *et al.* ROS1 immunohistochemistry for detection of ROS1-rearranged lung adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2013;37:1441-9.

Shukla S, Pandey RK, Kant S, *et al.* Detection of Anaplastic Lymphoma Kinase Gene Re-Arrangement in Non-Small Cell Lung Carcinoma in the Indian Population: Comparison of Techniques and Immunohistochemistry Clones. *Turk Patoloji Derg.* 2019;35:36-45.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018;68:7-30.

Singal G, Miller PG, Agarwala V, *et al.* Association of Patient Characteristics and Tumor Genomics With Clinical Outcomes Among Patients With Non-Small Cell Lung Cancer Using a Clinicogenomic Database. *JAMA.* 2019;321:1391-9.

Smith TF, Gaitatzes C, Saxena K, *et al.* The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci.* 1999;24:181-5.

Soda M, Choi YL, Enomoto M, *et al.* Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature.* 2007;448:561-6.

Soda M, Isoke K, Inoue A, *et al.* A prospective PCR-based screening for the EML4-ALK oncogene in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2012;18:5682-9.

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;19:1654-67.

Solomon BJ, Mok T, Kim DW, *et al.* First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med.* 2014;371:2167-77.

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;389:917-29.

Suehara Y, Arcila M, Wang L, *et al.* Identification of KIF5B-RET and GOPC-ROS1 fusions in lung adenocarcinomas through a comprehensive mRNA-based screen for tyrosine kinase fusions. *Clin Cancer Res.* 2012;18:6599-608.

Sun JM, Choi YL, Won JK, *et al.* A dramatic response to crizotinib in a non-small cell lung cancer patient with IHC-positive and FISH-negative ALK. *J Thorac Oncol.* 2012;7:e36-8.

Sun Y, Ruivenkamp CA, Hoffer MJ, *et al.* Next-generation diagnostics: gene panel, exome, or whole genome? *Hum Mutat.* 2015;36:648-55.

Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, *et al.* KIF5B-ALK, a novel fusion oncokinase identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15:3143-9.

Takeuchi K, Togashi Y, Kamihara Y, *et al.* Prospective and clinical validation of ALK immunohistochemistry: results from the phase I/II study of alectinib for ALK-positive lung cancer (AF-001JP study). *Ann Oncol.* 2016;27:185-92.

Tang S, Hao Y, Yuan Y, *et al.* Role of fibroblast growth factor receptor 4 in cancer. *Cancer Sci.* 2018;109:3024-31.

Tanizaki J, Okamoto I, Okabe T, *et al.* Activation of HER family signaling as a mechanism of acquired resistance to ALK inhibitors in EML4-ALK-positive non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2012;18:6219-26.

Thorne-Nuzzo T, Williams C, Catallini A, *et al.* A Sensitive ALK Immunohistochemistry Companion Diagnostic Test Identifies Patients Eligible for Treatment with Crizotinib. *J Thorac Oncol.* 2017;12:804-13.

Thunnissen E, Bubendorf L, Dietel M, *et al.* EML4-ALK testing in non-small cell carcinomas of the lung: a review with recommendations. *Virchows Arch.* 2012;461:245-57.

Thunnissen E, van der Oord K, den Bakker M, *et al.* Prognostic and predictive biomarkers in lung cancer. A review. *Virchows Arch.* 2014;464:347-58.

Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, *et al.* The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol.* 2015;10:1243-60.

Tsao MS, Hirsch FR, Yatabe Y (Eds.) *IASLC Atlas of ALK and ROS1 Testing in Lung Cancer.* 2nd ed. Editorial Rx Press, Orange Park, FL; 2016

Uruga H, Mino-Kenudson M. ALK (D5F3) CDx: an immunohistochemistry assay to identify ALK-positive NSCLC patients. *Pharmacogenomics Pers Med*. 2018;11:147-155.

van der Wekken AJ, Pelgrim R, 't Hart N, *et al*. Dichotomous ALK-IHC Is a Better Predictor for ALK Inhibition Outcome than Traditional ALK-FISH in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2017;23:4251-8.

Vendrell JA, Taviaux S, Béganton B, *et al*. Detection of known and novel ALK fusion transcripts in lung cancer patients using next-generation sequencing approaches. *Sci Rep*. 2017;7:12510.

Vidal J, Clavé S, de Muga S, *et al*. Assessment of ALK status by FISH on 1000 Spanish non-small cell lung cancer patients. *J Thorac Oncol*. 2014;9:1816-20.

von Laffert M, Stenzinger A, Hummel M, *et al*. ALK-FISH borderline cases in non-small cell lung cancer: Implications for diagnostics and clinical decision making. *Lung Cancer*. 2015;90:465-71.

Warth A, Muley T, Dienemann H, *et al*. ROS1 expression and translocations in non-small-cell lung cancer: clinicopathological analysis of 1478 cases. *Histopathology*. 2014;65:187-94.

Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, *et al*. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2013;31:3997-4013.

Wood AC, Krytska K, Ryles HT, *et al*. Dual ALK and CDK4/6 Inhibition Demonstrates Synergy against Neuroblastoma. *Clin Cancer Res*. 2017;23:2856-68.

Yoshida A, Kohno T, Tsuta K, *et al*. ROS1-rearranged lung cancer: a clinicopathologic and molecular study of 15 surgical cases. *Am J Surg Pathol*. 2013;37:554-62.

Yoshida A, Tsuta K, Wakai S, *et al*. Immunohistochemical detection of ROS1 is useful for identifying ROS1 rearrangements in lung cancers. *Mod Pathol*. 2014;27:711-20.

Zhang I, Zaorsky NG, Palmer JD, *et al.* Targeting brain metastases in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol.* 2015;16:e510-21.

Zhang L, Li Y, Zhang S, *et al.* Primary resistance to crizotinib treatment in a non-small cell lung cancer patient with an EML4-ALK rearrangement: a case report. *Cancer Biol Med.* 2018;15:178-81.

Zhu H, Wong MP, Tin V. High-resolution detection of recurrent aberrations in lung adenocarcinomas by array comparative genomic hybridization and expression analysis of selective genes by quantitative PCR. *Int J Oncol.* 2014;44:2068-76.

Zhu Q, Zhan P, Zhang X, *et al.* Clinicopathologic characteristics of patients with ROS1 fusion gene in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Transl Lung Cancer Res.* 2015;4:300-9.

Zhu YC, Xu CW, Ye XQ, *et al.* Lung cancer with concurrent EGFR mutation and ROS1 rearrangement: a case report and review of the literature. *Onco Targets Ther.* 2016;9:4301-5.

Zugazagoitia J, Rueda D, Carrizo N, *et al.* Prospective Clinical Integration of an Amplicon-Based Next-Generation Sequencing Method to Select Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Patients for Genotype-Tailored Treatments. *Clin Lung Cancer.* 2018;19:65-73.

ANNEXOS

Articles publicats pel doctorant inclosos com a annexos d'aquesta memòria de tesi doctoral que són fruit de l'estudi de biomarcadors en mostres de pacients amb CPCNP.

ARTICLE 3: Vidal J i Clavé S, *et al.* Assessment of *ALK* status by FISH on 1000 Spanish non-small cell lung cancer patients. *Journal of Thoracic Oncology*. 2014;9:1816-20.

doi: 10.1097/JTO.0000000000000361. PMID: 25393795

Índexs de qualitat: IF2016 = 5,282; 1er quartil en la categoria *Oncology i Respiratory System*

ARTICLE 4: Casadevall D, Gimeno J i Clavé S, *et al.* *MET* expression and copy number heterogeneity in nonsquamous non-small cell lung cancer (nsNSCLC). *Oncotarget*. 2015;6:16215-26.

doi: 10.18632/oncotarget.3976. PMID: 26041880

Índexs de qualitat: IF2016 = 5,168; 1er quartil en la categoria *Oncology*

ARTICLE 5: Clavé S, *et al.* *CD274 (PDL1) and JAK2* genomic amplifications in pulmonary squamous-cell and adenocarcinoma patients. *Histopathology*. 2018;72:259-69.

doi: 10.1111/his.13339. PMID: 28795418

Índexs de qualitat: IF2016 = 3,523; 1er quartil en les categories *Histology i Pathology*

ARTICLE 3

**ASSESSMENT OF ALK STATUS BY FISH ON 1000 SPANISH NON-SMALL CELL LUNG
CANCER PATIENTS**

Joana Vidal^{1,*}, **Sergi Clavé**^{2,3,*}, Silvia de Muga⁴, Iria González¹, Lara Pijuan⁵, Javier Gimeno⁵, Jordi Remón⁶, Noemí Reguart⁷, Núria Viñolas⁷, Regina Gironés⁸, Laia Bernet⁸, Margarita Majem⁹, Joaquim Bosch-Barrera¹⁰, Rut Porta¹⁰, Nieves Alonso¹¹, Ramón Palmero¹², Álvaro Taus¹, Joan Albanell^{1,2}, Blanca Espinet^{2,3}, Marta Salido^{2,3}, i Edurne Arriola^{1,2}.

¹ Servei d'Oncologia Mèdica, Hospital del Mar, Barcelona; ² Laboratori de Citogenètica Molecular, Hospital del Mar, Barcelona; ³ Programa de Recerca en Càncer, Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM), Barcelona; ⁴ Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona; ⁵ Servei de Patologia, Hospital del Mar, Barcelona; Departament d'Oncologia Mèdica, ⁶ Hospital de Mataró, Mataró; ⁷ Servei d'Oncologia Mèdica, Institut Clínic de Malalties Hematològiques i Oncològiques (ICMHO), Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona; ⁸ Departament de Patologia, Hospital Lluís Alcanyís de Xàtiva, Xàtiva; ⁹ Departament d'Oncologia Mèdica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona; ¹⁰ Servei d'Oncologia Mèdica, Institut Català d'Oncologia (ICO), Hospital Dr. Josep Trueta, Girona; ¹¹ Departamento de Patología, Hospital Universitario de León, León; ¹² Departament d'Oncologia Mèdica, Institut Català d'Oncologia (ICO), Hospital Duran i Reynals, L'Hospitalet de Llobregat. * Ambdós autors han de ser considerats com a primer autor de l'article.

Aquesta publicació va ser un anàlisi retrospectiu dels casos testats entre els anys 2010 i 2014, en el que es van avaluar 1.092 mostres de CPCNP per al cribratge de reordenaments del gen *ALK* mitjançant la tècnica FISH. Aquestes mostres procedien del propi centre i d'altres d'externs pels quals el Laboratori de Citogenètica Molecular de l'Hospital del Mar en feia de proveïdor de referència per a aquestes determinacions. En total, el material remés procedia de 927 mostres histològiques de tipus biòpsia o resecció quirúrgica, i de 165 mostres citològiques de tipus bloc cel·lular o extensió sobre portaobjectes. Es va avaluar la correlació dels resultats amb la informació clínica i patològica disponible per tal d'estudiar la prevalença del gen *ALK* en la nostra població i fer una descripció pràctica dels diferents patrons de FISH al utilitzar l'aproximació per sondes de trencament.

Es van identificar reordenaments del gen *ALK* en 35 pacients (3,2%), la majoria dones, pacients no fumadors i en estadis avançats. La prevalença del reordenament d'*ALK* i les característiques associades a aquests pacients van ser similars a les que s'havien informant anteriorment. Segons el tipus de mostra, les citologies van ser no valorables amb una major freqüència ($p < 0,001$). D'aquesta manera es va concloure que, tot i que els reordenaments d'*ALK* es poden avaluar en mostres citològiques, es prefereix treballar amb biòpsies de teixit per a realitzar la tècnica de FISH.

Journal of Thoracic Oncology. 2014;9:1816-20. doi: 10.1097/JTO.0000000000000361.

Acceptat: 26 d'agost de 2014

Assessment of *ALK* Status by FISH on 1000 Spanish Non-Small Cell Lung Cancer Patients

Joana Vidal, MD,* Sergi Clavé, MSc,†‡ Silvia de Muga, PhD,§|| Iria González, MD,* Lara Pijuan, MD, PhD,|| Javier Gimeno, MD,|| Jordi Remón, MD,¶ Noemí Reguart, MD, PhD,# Nuria Viñolas, MD,# Regina Gironés, MD, PhD,** Laia Bernet, MD,** Margarita Majem, MD,†† Joaquim Bosch-Barrera, MD, PhD,‡‡ Rut Porta, MD, PhD,‡‡§§ Nieves Alonso, MD,|| || Ramón Palmero, MD,¶¶ Álvaro Taus, MD,* Joan Albanell, MD, PhD,*‡ Blanca Espinet, PhD,†‡ Marta Salido, PhD,†‡ and Edurne Arriola, MD, PhD,*‡

Introduction: Patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) harboring anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) rearrangement selectively respond to *ALK* inhibitors. Thus, identification of *ALK* rearrangements has become a standard diagnostic test in advanced NSCLC patients. Our institution has been a referral center in Spain for *ALK* determination by Fluorescent in situ hybridization (FISH). The aim of our study was to assess the feasibility and the FISH patterns of the *ALK* gene and to evaluate the clinical and pathological features of patients with *ALK* alterations.

Methods: Between 2010 and 2014, 1092 samples were evaluated for *ALK* using FISH technique (927 histological samples, 165 cytological samples). Correlation with available clinical-pathological information was assessed.

Results: *ALK* rearrangement was found in 35 patients (3.2%). Cytological samples (using either direct smears or cell blocks), were more frequently non-assessable than histological samples (69% versus 89%, respectively) ($p < 0.001$). Within the *ALK*-rearranged cases the majority were female, non-smokers, and stage IV.

Conclusions: Although assessable in cytological samples, biopsies are preferred when available for *ALK* evaluation by FISH. The *ALK* translocation prevalence and the associated clinico-pathological features in Spanish NSCLC patients are similar to those previously reported.

Key Words: *ALK*, FISH, Non-small cell lung cancer, Biopsy, Cytology.

(*J Thorac Oncol.* 2014;9: 1816–1820)

Lung cancer remains the leading cause of cancer related deaths in western countries.¹ Over the last decade there have been important advances in understanding the biology of non-small cell lung cancer (NSCLC), by the identification of oncogene-driven subtypes of tumors.^{2–4}

In 2007 Soda et al.⁵ identified a new oncogene in NSCLC, a fusion gene resulting from the paracentric inversion of the short arm of chromosome 2 fusing the anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) gene, at 2p23 and the echinoderm microtubule-associated protein-like 4 (*EML4*) gene at 2p21. *EML4-ALK* is an aberrant fusion gene that encodes a cytoplasmic chimerical protein with a constitutive tyrosine kinase activity and subsequently several downstream signaling pathways.⁶

Since then, several variants of the rearranged gene and different *ALK* partners such as *KIF5B* at 10p11.22,⁷ *TFG* at 3q12.2,⁸ *HIP1* at 7q11.23⁹ and *TPR* at 1q25¹⁰ have been identified. Moreover, oncogenic properties have also been described for atypical rearrangements with 5' *ALK* deletion with unknown partners.¹¹

ALK rearrangement is found in 3 to 5% of all NSCLCs.¹¹ In 2011 the FDA approved the use of crizotinib (Xalkori®, Pfizer), an oral ATP-competitive selective inhibitor of the *ALK* and c-MET tyrosine kinase, with the encouraging results from a phase I trial with an overall response rate (ORR) of 60.8% and a progression free survival (PFS) of 9.7 months.¹² Moreover, recent phase I and II studies with new generation *ALK* tyrosine kinase inhibitors show promising response rates in patients with progression or naïve to crizotinib. Globally, these efficacy results have prompted detection of *ALK* rearrangements as a routine test in every newly diagnosed NSCLC patient.

*Servei d'Oncologia Mèdica, Hospital del Mar, Barcelona, Spain; †Laboratori de Citogenètica Molecular, Departament de Patologia, Hospital del Mar, Barcelona, Spain; ‡Cancer Research Program, IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute), Barcelona, Spain; §Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain; ||Departament de Patologia, Hospital del Mar, Barcelona, Spain; ¶Medical Oncology Department, Hospital de Mataró, Barcelona, Spain; #Medical Oncology Service, iCMHO, Hospital Clínic Barcelona, Barcelona, Spain; **Pathology Department, Hospital Lluís Alcanyis, Xàtiva, Spain; ††Medical Oncology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain; ‡‡ Medical Oncology Department, Institut Català d'Oncologia (ICO), Hospital Universitari Dr. Josep Trueta, Girona, Spain; §§Department of Medical Sciences, University of Girona, Spain; |||Pathology Department, Complejo Asistencial de Leon, Castilla y Leon, Spain; and ¶¶ Medical Oncology Department, Institut Català d'Oncologia (ICO), Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.

Dr. Vidal and Clavé equally contributed to this work.

Disclosure: The authors declare no conflict of interest.

Address for correspondence: Joana Vidal Barrull, MD, Medical Oncology Department, Hospital del Mar, Passeig Marítim 25-29 08003 Barcelona, Spain. E-mail: jvidal@parcdesalutmar.cat

DOI: 10.1097/JTO.0000000000000361

Copyright © 2014 by the International Association for the Study of Lung Cancer
ISSN: 1556-0864/14/0912-1816

A variety of methods are available to test for the *ALK* rearrangement including FISH (fluorescence in situ hybridization), IHC (immunohistochemistry), and RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction). Currently, fluorescence in-situ hybridization (FISH) using break-apart probes remains the gold standard method for screening *ALK* rearrangements in lung clinical trials¹³ but the assay can be technically challenging. FISH technique relies mostly on the tumor sample quality, enough tumor cell representation and expertise in the assessment.

Here we present data on the experience in *ALK* rearrangement detection by FISH in over 1000 samples in a single referral center with routine diagnostic specimens (biopsies and cytological samples).

MATERIAL AND METHODS

Samples

Our institution was appointed as a referral center in Spain for *ALK* rearrangement detection. A total of 1092 NSCLC samples referred from 69 Spanish hospitals were examined between 2010 and 2014. Samples were received as paraffin-embedded (FFPE) biopsies or cytological specimens as stained smears or cell blocks. We requested paraffin blocks to be sent to our center, then 3–4-microm section were cut for FISH testing according to our protocol. Adequacy of samples for *ALK* testing was reviewed by the referring pathologists but histology was not reviewed centrally.

ALK FISH

ALK FISH was conducted on formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue as previously described¹⁴ using a commercially available dual-color break-apart probe specific to the *ALK* locus (Abbott Molecular Inc, Des Plaines IL,) according to manufacturer's instructions. Fifty non-overlapping cells with hybridization signals were examined for each case with a fluorescence microscope (Olympus, Barcelona, Spain) with the Cytovision software (Applied Imaging, Santa Clara, CA). Samples were considered positive if more than 15% of cells showed split *ALK* 5' and 3' probe signals or isolated 3' signals. Isolated 5' signals are considered as negative. The distance between two separated signals was estimated using twice the size of the biggest signal size. The use of break apart probes does not allow distinguishing between an inversion or translocation, without performing additional techniques. Thus we have used hereon the term translocation for simplicity. *ALK* copy number gains (CNG) and amplifications were classified following the criteria adopted by Salido et al.¹¹ We considered that the FISH test had failed when the sample was not assessable. There are numerous preanalytical factors affecting the outcome of FISH on FFPE tissue: heterogeneous fixation conditions, age of the section degree of fibrosis, the use of mercurial solutions to decalcify bone biopsies, among others. Also, the most important process in FFPE FISH protocol is the pretreatment and consequently the protease digest times should be tailored for each individual sample.

Clinical and Pathological Information

We retrospectively collected into a database the clinicopathological characteristics of the external and in-house samples tested. Referring physicians were asked to fill in an on-line/paper form with clinicopathological queries. The series included samples from our institution, from which we had complete clinical information. Data were obtained from 60% of the patients.

Statistical Analysis

Statistical associations were assessed using Pearson's χ^2 test or Fisher's exact test. All statistical tests were conducted at the two-sided 0.05 alpha level of significance. Statistical analysis was carried out with SPSS version 18 (SPSS Inc, Chicago, IL).

RESULTS

ALK Assessment

From the 1092 samples, 927 (85%) were biopsy specimens (including surgical samples) and 165 (15%) cytological samples. Among them 827 biopsy samples (89.2%) and 114 cytological specimens (69.1%) could be tested by FISH. In the other 153 (14%) cases, a FISH result was not obtained due to insufficient tumor material ($n = 58$) or assay failure ($n = 95$). We observed a significant association ($p < 0.0001$) between the type of sample tested and the ability to succeed in the FISH evaluation (89.2% biopsies versus 69.1% cytologies).

Within the 394 samples with complete information, 330 (89%) were obtained from the lung primary tumor.

ALK Rearrangement

ALK FISH patterns are illustrated in Figure 1. *ALK* rearrangement was found in 35 cases (3.2%). From *ALK* positive cases, 23 (66%) showed a typical translocation pattern and 12 (34%) an atypical translocation pattern with isolated 3'*ALK* signals (Fig. 2). The mean percentage of positive cells was 61% (range: 21–99%). The coexistence of copy number gains with both patterns of *ALK* rearrangements was frequent (69%). One case presented an atypical FISH pattern showing an extra 5'*ALK* signal. It has been reported that a patient with multiple single copies of the 5' *ALK* signal plus additional 5' doublets combined with 3' signal (suggesting a complex rearrangement) responded to *ALK* inhibition.¹⁵ This is different from our case that presented 86% of the nucleus with an isolated extra green signal without detection of 3' signals, so we considered it negative.

ALK Copy Number Changes

Copy number gains (CNG) were observed in up to 710 cases (65%). In the majority of them, gains were seen in a high proportion of cells (ranging from 40% to 95%) (Fig. 2). FISH analysis identified 43 cases (3.9%) with *ALK* amplification in less than 10% of cells, 21 of them presented *ALK* signal clusters and 22 had six or more *ALK* gene copies per cell. The percentage of amplified cells ranged between 15% and 60% and in all 43 amplified cases, CNG was observed (ranging from 30% to 85%). In addition, nine cases (0.8%) had one *ALK* gene copy per cell, suggesting a monosomy of chromosome 2.








3'orange and 5'green signal are overlapped or separated by less than twice the size of an isolated signal.		Negative
3'orange and 5'green signal are separated by more than twice the size of an isolated signal.		Positive
Single 5'green signal without a corresponding 3'orange signal, along with a fusion signal, indicates loss of 3'orange fragment.		Negative
Single 3'orange signal without a corresponding 5'green signal, along with a fusion signal, indicates loss of 5'green fragment.		Positive
Same nuclei with several fusion signals and/or separated signals.		Negative
		Positive
Nuclei with one isolated signal.		Uninformative

FIGURE 1. Schematic diagram of the different cellular positive (split or single red) and negative (fused or single green) patterns for *ALK* status testing with fluorescence in situ hybridization.

Association with Clinicopathological Information

Patient's characteristics are summarized in Table 1. Among the 1092 patients tested for *ALK*, the majority were male (69%), with advanced stage at diagnosis (54.5%). The majority (75%) had history of smoking, either current or former, with a median cumulative index of 52 packs/year. The predominant histology was adenocarcinoma (79.6%), with a limited representation of other histological subtypes: squamous cell carcinoma (SCC) in 5.7%, large cell carcinoma (LCC) in 5.8% and not otherwise specified (NOS) in 7.6%.

Clinicopathological differences between *ALK*-positive and *ALK*-negative patients are shown in Table 2. We observed a significant association between *ALK* translocation and female sex ($p < 0.001$), non-smoking history ($p < 0.001$) and advanced stage ($p = 0.004$). No differences were observed by histology although non-ADC samples were scarce. Among *ALK* positive patients, the majority were ADC ($n = 28$) although it is worth mention that two positive cases were detected in LCC. Within adenocarcinoma samples, information on growth pattern was not available. No concomitant *EGFR* mutations were found in our series.

ALK amplification was not associated with any particular clinicopathological pattern. Two out of 43 cases with *ALK* amplification presented also an *EGFR* mutation detected in the diagnostic biopsy. One of them was treated with surgery alone and the other was a stage IV adenocarcinoma with a mutation in exon 18 who responded to gefitinib for 6 months before progression. The implication of *ALK* amplification in *EGFR* mutant cases remains unknown.

DISCUSSION

ALK assessment has become a routine test in patients with advanced NSCLC. Here we present the largest cohort of Spanish cases evaluated by FISH in a single institution. We have observed different FISH positivity patterns and evidenced the real limitations of cytological samples for *ALK* testing in routine clinical practice.¹⁶

We confirm the low frequency of *ALK* rearrangements (3%) in Caucasian population, and its association with female gender, non-smoking habit, and advanced stage.

FISH using *ALK* break-apart probe is considered the gold standard method for screening *ALK*-rearrangements, but results depend on preanalytical and analytical factors that may affect the quality of the specimen and the quantity of tumor cell representation.¹⁷ In our study, cytological samples

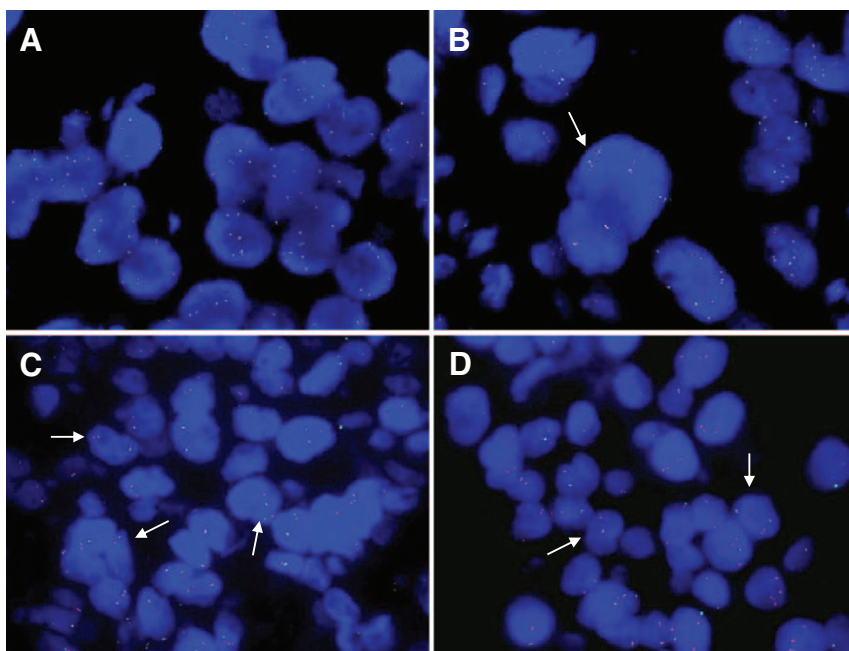


FIGURE 2. Four tumors samples exhibiting different *ALK* break-apart FISH signal patterns. *A*, *ALK* negative polysomic nuclei showing between five and nine fused signals per cell. *B*, *ALK* negative amplification nuclei (arrow) showing clusters of fused signals. *C*, *ALK* positive nuclei showing split signals (arrows) and fused signal gains. *D*, *ALK* positive nuclei showing isolated single red signals (arrows).

TABLE 1. Demographic and Clinical-Pathological Patient's Characteristics

Characteristics	Total Cases
N	1092
Age	62.48
Gender	
Male	713 (68.9%)
Female	322 (31.1%)
Unknown	57
Smoking habit	
Never	167 (24.9%)
Smoker	505 (75.1%)
Unknown	420
Histology	
ADC	859 (79.6%)
SSC	61 (5.7%)
LCC	63 (5.8%)
NOS	82 (7.6%)
Others	14 (1.3%)
Unknown	13
Stage	
I-III	305 (45.5%)
IV	365 (54.5%)
Unknown	422

ADC, adenocarcinoma; SSC, squamous cell carcinoma; LCC, large cell carcinoma; NOS, carcinoma not otherwise specified

(using either direct smears or cell blocks), had lower rate of successful evaluation than histological samples (69% versus 89%, respectively) ($p < 0.001$). The main reasons for assay failure were different fixation conditions in biopsies whereas in cytological smears it could be attributable to the duration of the archival (age of the section) or prior Papanicolaou staining. Although technical limitations were more frequently observed in cytological specimens, the percentage of inadequate or insufficient cases in our study was slightly lower than reported in other series including cytological smears.² This type of samples should be reserved solely when material from small biopsies or cytological cell blocks are not available. In cases with high probability of *ALK* translocation (young age, no smoking history or adenocarcinoma histology with signet-ring cells) it would be advisable to obtain additional samples if the cytology *ALK* report has been not assessable or unclear. This stresses the relevance of reviewing the sample that is being assessed before performing FISH to select the tumor areas and to ensure that there is enough material for adequate FISH analysis.

Regarding FISH patterns in *ALK* positive patients, similarly to previously reported,¹⁸ the majority of patients showed a typical pattern of rearrangement and less frequently an atypical pattern with 5'*ALK* deletion. As expected, CNG was a frequent event as previously reported by our group¹¹ probably reflecting a wide-genomic instability.

Several clinicopathological patterns have been associated to *ALK* positivity such as young age, light smoking

TABLE 2. Clinical-Pathological Differences Between *ALK* Positive and Negative Patients

Characteristics	<i>ALK</i> -Negative	<i>ALK</i> -Positive	<i>p</i>
N	1057	35	
Age	62.48	61	0.581
Gender			
Male	604	13	<0.001
Female	260	19	
Unknown		3	
Smoking habit			
Never	140	16	<0.001
Smoker	451	10	
Unknown		9	
Histology			
ADC	730	28	0.388
SSC	55	0	
LCC	47	2	
NOS	58	1	
Others	12	1	
Unknown		3	
Stage			
I-III	308	5	0.004
IV	282	21	
Unknown		9	
EGFR			
Wild type	306	6	1
Mutated	29	0	
Unknown		29	

ADC, adenocarcinoma; SSC, squamous cell carcinoma; LCC, large cell carcinoma; NOS, carcinoma not otherwise specified; EGFR, endothelial growing factor receptor

habit and adenocarcinoma histology, enriching the chances of positivity up to 35% following those criteria.¹⁹ As previously reported, our study observed a higher incidence of *ALK* rearrangements in adenocarcinomas and light or never smokers. However, in our series, *ALK* rearrangements were more common in female patients. Initial reports described an association of *ALK* rearrangements with male gender²⁰ but recent data from prospective clinical trials with crizotinib suggest no association with gender. In agreement with our results, there is a recent large population-based study performed in France, which describes a higher incidence in females,²¹ suggesting a real association in Caucasian population.

One of the limitations of our study is the lack of *ALK* immunohistochemical information about the samples analyzed. Being a large-scale study, we had to select one from both methods due to funding restrictions. FISH was chosen due to the expertise of our cytogenetics department and because FISH was the gold standard technique in clinical trials at the time of study initiation. There is increasing evidence suggesting a relatively high discordance rate between both techniques,²¹ so our data may underestimate the prevalence of *ALK* activated tumors in the studied population. From the data we have so far,²¹⁻²³ we believe that positive cases obtained by either technique even though negative by a complimentary

test, should be challenged with an *ALK* inhibitor, recommending an early assessment to rule out the possibility of a false negative determination.

In summary, *ALK* translocations incidence in Spanish population (3%) is in the same average than the reported in Caucasian population and seem to be more frequent in patients with light smoking history and female gender. Although assessable in cytological samples, biopsies are preferred for *ALK* evaluation by FISH in routine clinical practice.

ACKNOWLEDGMENTS

Eduarne Arriola is supported by RD12/0036/0051, 2014 SGR 740 and FIS-ISCIII, PI13/00140 and Fundació Marató de TV3. Ref. 666/C/2013.

REFERENCES

1. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014;64:9–29.
2. 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;350:2129–2139.
3. Davies KD, Le AT, Theodoro MF, et al. Identifying and targeting ROS1 gene fusions in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2012;18:4570–4579.
4. Slebos RJ, Kibbelaar RE, Dalesio O, et al. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med* 1990;323:561–565.
5. 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.
6. Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, Piva R, Inghirami G. The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8:11–23.
7. Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, et al. KIF5B-ALK, a novel fusion onco-kinase identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:3143–3149.
8. Rikova K, Guo A, Zeng Q, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* 2007;131:1190–1203.
9. Hong M, Kim RN, Song JY, et al. HIP1-ALK, a novel fusion protein identified in lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2014;9:419–422.
10. Choi YL, Lira ME, Hong M, et al. A novel fusion of TPR and ALK in lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2014;9:563–566.
11. Salido M, Pijuan L, Martínez-Avilés L, et al. Increased ALK gene copy number and amplification are frequent in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2011;6:21–27.
12. Camidge DR, Bang YJ, Kwak EL, et al. Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from a phase 1 study. *Lancet Oncol* 2012;13:1011–1019.
13. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2010;363:1693–1703.
14. Riccio A, Li Y, Moon J, et al. Essential role for TRPC5 in amygdala function and fear-related behavior. *Cell* 2009;137:761–772.
15. Ren S, Hirsch FR, Varella-Garcia M, et al. Atypical negative ALK break-apart FISH harboring a crizotinib-responsive ALK rearrangement in non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2014;9:e21–e23.
16. Savic S, Bubendorf L. Role of fluorescence in situ hybridization in lung cancer cytology. *Acta Cytol* 2012;56:611–621.
17. Schiller JH, Harrington D, Belani CP, et al.; Eastern Cooperative Oncology Group. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2002;346:92–98.
18. Thunnissen E, Bubendorf L, Dietel M, et al. EML4-ALK testing in non-small cell carcinomas of the lung: a review with recommendations. *Virchows Arch* 2012;461:245–257.
19. Yang J, Bielenberg DR, Rodig SJ, Doiron R, Clifton MC, Kung AL, et al. Lipocalin 2 promotes breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009;106:3913–3918.
20. 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;27:4247–4253.
21. Cabillic F, Gros A, Dugay F, et al. Parallel FISH and immunohistochemical studies of ALK status in 3244 non-small-cell lung cancers reveal major discordances. *J Thorac Oncol* 2014;9:295–306.
22. Rodig SJ, Mino-Kenudson M, Dacic S, et al. Unique clinicopathologic features characterize ALK-rearranged lung adenocarcinoma in the western population. *Clin Cancer Res* 2009;15:5216–5223.
23. Wallander ML, Geiersbach KB, Tripp SR, Layfield LJ. Comparison of reverse transcription-polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and fluorescence in situ hybridization methodologies for detection of echinoderm microtubule-associated proteinlike 4-anaplastic lymphoma kinase fusion-positive non-small cell lung carcinoma: implications for optimal clinical testing. *Arch Pathol Lab Med* 2012;136:796–803.

ARTICLE 4

MET EXPRESSION AND COPY NUMBER HETEROGENEITY IN NONSQUAMOUS NON-SMALL CELL LUNG CANCER (NSNSCLC)

David Casadevall^{1,2,*}, Javier Gimeno^{3,*}, **Sergi Clavé**^{3,4,*}, Álvaro Taus¹, Lara Pijuan³, Míriam Arumí¹, Marta Lorenzo^{3,4}, Silvia Menéndez^{3,4}, Israel Cañadas⁴, Joan Albanell^{1,4}, Sergio Serrano³, Blanca Espinet^{3,4}, Marta Salido^{3,4}, Edurne Arriola^{1,4}.

¹ Servei d'Oncologia Mèdica, Hospital del Mar, Barcelona; ² Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra; ³ Servei de Patologia, Hospital del Mar, Barcelona; ⁴ Programa de Recerca en Càncer, Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM), Barcelona. * Els tres autors han de ser considerats com a primer autor de l'article.

En aquest treball es va avaluar l'heterogeneïtat intratumoral en la determinació de les alteracions del gen *MET* i el seu possible impacte com a biomarcador predictiu en la selecció de pacients. Es van incloure 120 pacients CPCNP no escamós, dels quals 47 van ser incorporats en *arrays* de teixit. En aquests 47, es van seleccionar quatre àrees tumorals histològicament diferents per avaluar l'heterogeneïtat de *MET*. Es va estudiar l'expressió de cMET per IHQ, definida com a positiva pel valor del *H-score* i per la intensitat de tinció en les cèl·lules tumorals segons els criteris de l'estudi Metmab. També es van valorar els casos per FISH fent servir sondes pel locus de *MET* i pel centròmer del cromosoma 7 (sonda control). Es va investigar la relació entre els patrons de tinció de cMET (citoplasmàtic vs. membranós) i la determinació per IHQ de biomarcadors mesenquimals com a subrogats de l'activació de cMET.

Dels 120 pacients inclosos en l'estudi, el valor d'expressió mig per IHQ *H-score* va ser de 140 (rang 0-400) i el 47,8% dels pacients van ser considerats com a cMET positius segons els criteris de tinció de l'estudi Metmab. Per contra, només vuit casos (6,8%) van ser positius per FISH i aquests es van associar a un valor *H-score* més elevat ($p= 0,021$). Pel que fa als estudis d'heterogeneïtat fets amb els *arrays* de teixit, fins un 40% dels casos van tenir resultats discordants per IHQ entre les diferents àrees tumorals. Les valoracions de l'estat de *MET* per FISH també van presentar heterogeneïtat en un 25-50%. L'expressió citoplasmàtica de cMET i la positivitat de la vimentina com a possibles biomarcador subrogats, van predir una baixa supervivència ($p= 0,042$ i $0,047$, respectivament). Les conclusions d'aquest treball van ser que l'estat de *MET*, tant la seva expressió com les variacions de número de còpies del gen, és molt heterogeni entre les diferents àrees tumorals. Destaca doncs la dificultat en la selecció adequada dels pacients per a rebre teràpies orientades a la inhibició de cMET. Finalment, la tinció citoplasmàtica de cMET i la vimentina podrien representar biomarcadors de substitució per mesurar el grau d'activació de *MET*.

Oncotarget. 2015;6:16215-26. doi: 10.18632/oncotarget.3976.

Acceptat: 5 de maig de 2015

MET expression and copy number heterogeneity in nonsquamous non-small cell lung cancer (nsNSCLC)

David Casadevall^{1,6,*}, Javier Gimeno^{2,*}, Sergi Clavé^{3,4,*}, Álvaro Taus¹, Lara Pijuan², Miriam Arumí¹, Marta Lorenzo⁴, Silvia Menéndez⁴, Israel Cañadas⁴, Joan Albanell^{1,4,5}, Sergio Serrano², Blanca Espinet^{3,4}, Marta Salido^{3,4}, Edurne Arriola^{1,4,#}

¹Servei d'Oncologia Mèdica, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

²Servei de Patologia, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

³Laboratori de Citogenètica Molecular, Servei de Patologia, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

⁴Cancer Research Program, IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute), Barcelona, Spain

⁵Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain

⁶Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

#Cancer Sciences Unit, University of Southampton, Southampton, UK

*These authors have contributed equally to this work

Correspondence to:

David Casadevall, e-mail: dcasadevall@parcdesalutmar.cat

Keywords: c-MET, immunohistochemistry, FISH, non-small-cell lung cancer, heterogeneity

Received: February 25, 2015

Accepted: May 05, 2015

Published: May 15, 2015

ABSTRACT

Objective: We aimed to assess MET intratumoral heterogeneity and its potential impact on biomarker-based patient selection as well as potential surrogate biomarkers of MET activation.

Methods: Our study included 120 patients with non-squamous Non-small-cell Lung Cancer (nsNSCLC), of which 47 were incorporated in tissue microarrays (TMA). Four morphologically distinct tumor areas were selected to assess MET heterogeneity. MET positivity by immunohistochemistry (IHC) was defined as an above-median H-score and by +2/+3 staining intensity in >50% of tumor cells (Metmab criteria). MET FISH positivity was defined by MET/CEP7 ratio ≥ 2.0 and/or MET ≥ 5.0 . MET staining pattern (cytoplasmic vs. membranous) and mesenchymal markers were investigated as surrogates of MET activation.

Results: Median MET H-score was 140 (range 0–400) and 47.8% of patients were MET positive by Metmab criteria. Eight cases (6.8%) were MET FISH positive and showed higher H-scores ($p = 0.021$). MET positivity by IHC changed in up to 40% of cases among different tumor areas, and MET amplification in 25–50%. Cytoplasmic MET staining and positivity for vimentin predicted poor survival ($p = 0.042$ and 0.047 , respectively).

Conclusions: MET status is highly heterogeneous among different nsNSCLC tumor areas, hindering adequate patient selection for MET-targeted therapies. MET cytoplasmic staining and vimentin might represent surrogate markers for MET activation.

INTRODUCTION

Despite significant advances in diagnosis and treatment, lung cancer remains the leading cause of cancer death worldwide [1]. Non-small cell lung cancer

(NSCLC) accounts for up to 85% of lung cancers, of which 40% are adenocarcinomas [2]. During the last decade, considerable progress has been made in the knowledge of NSCLC biology. Several molecular alterations, such as mutations in the epidermal growth factor receptor (*EGFR*)

[3] or anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) and ROS proto-oncogene 1 (*ROS1*) rearrangements [4] predict response to specific targeted therapies. These developments have greatly impacted on patients' outcome and quality of life [5–7].

MET was first identified in the late '80s, it is located on chromosome band 7q31 and encodes a heterodimeric transmembrane receptor with tyrosine kinase activity (RTK) [8, 9]. Activation of *MET* initiates a cascade of cellular signaling processes that ultimately lead to proliferation, reduced apoptosis, epithelial to mesenchymal transition (EMT) and an increased invasiveness and metastatic potential [10, 11]. *MET* pathway activation has been explained by different mechanisms such as genetic point mutations, gene amplification, post-translational activation, as well as in a ligand-dependent manner [12, 13].

The presence of *MET* protein overexpression and *MET* gene amplification in NSCLC are globally considered as adverse prognostic factors [14–17]. Consequently, many efforts have been made to develop *MET*-targeted agents [18, 19]. Clinical benefit was initially reported in patients with high serum levels of circulating HGF [20] or whose tumors harbored *MET* gene amplification [21]. In the MARQUEE [22] and the MetLung trials [23], patients were selected based on non-squamous histology and on *MET* immunohistochemical expression, respectively. Both trials failed to meet their primary endpoints, highlighting the need for predictive biomarkers for *Met*-directed treatment.

During the past few years, next-generation sequencing studies have revealed remarkable genetic and phenotypic differences among individual solid tumors [24] and also among different tumor areas and their metastases [25, 26]. This heterogeneity can interfere with biomarker-based treatment decisions, particularly when these are made based on material from small tumor biopsies.

Finally, a recent report in patients with gastric adenocarcinoma has suggested that *MET* staining pattern can predict *MET* gene amplification [27]. Moreover, in previous experiences with SCLC patients, we have observed that total *MET* protein expression does not always translate pathway activation and that signaling through *MET* can trigger EMT [28]. Thus, we hypothesized that the presence of a mesenchymal phenotype could translate *MET* pathway activation.

The primary aim of this study was to evaluate the potential impact of intra-tumor heterogeneity on *MET* evaluation and classification using different techniques and criteria. Furthermore, we sought to assess the correlation of *MET* status with other pathological and molecular characteristics. Finally and with exploratory purposes, we investigated potential surrogate markers of *MET* activity, such as *MET* staining pattern and the presence of mesenchymal markers by immunohistochemistry.

MATERIALS AND METHODS

Study population

Criteria for patient selection were non-squamous non-small cell lung carcinoma (nsNSCLC) histology and availability of tissue for the studies. A total of 124 tumor specimens from 120 patients diagnosed of nsNSCLC at our institution between 2009 and 2013 were included. Four of the 120 patients presented two different tumors, thus providing one extra specimen each. Material was available either from surgical resections, core-needle biopsies or cytological cell-blocks. Clinical data were extracted from medical records and included age, sex, smoking history, tumor disease stage and clinical follow-up information.

Tissue microarray construction

Based on tissue availability, 47 of the patients were selected to construct tissue microarrays (TMAs) as outlined by Kononen *et al.* [29]. First, original Hematoxylin–Eosin (H&E) stained-sections were reviewed from each patient to identify different malignant areas and benign lung tissue. A total of six tissue cores with a 2 mm of diameter were obtained from each patient, four of them containing different histological areas of the carcinoma (named A, B, C and D) and two of them containing benign lung parenchyma. Two of the 47 patients presented two different tumors, thus providing eight tumor cores each. This led to a final number of 196 tumor cores divided into six TMAs.

Fluorescence *in situ* hybridization

MET fluorescence *in situ* hybridization (FISH) evaluation was performed on unstained formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue sections from the whole tumor and the TMA samples, as previously described [30], using a *MET*/CEP7 probe cocktail (#06N05-020, Abbott Molecular Inc, Des Plaines, IL) according to manufacturer's instructions. A minimum of fifty non-overlapping cells with hybridization signals were examined for each case with a BX51 fluorescence microscope (Olympus, Tokyo, Japan) and using the Cytovision software (Applied Imaging, Grand Rapids MI). Tumors with *MET*/CEP7 ratio ≥ 2.0 (named "truly amplified") and/or *MET* ≥ 5.0 copies (named "high polysomy") were considered *MET* FISH positive [15, 31]. *MET* gains -defined as a mean copy number ≥ 2.5 copies in at least 10% of analysed nuclei- were also recorded.

Immunohistochemical assays

MET immunohistochemistry (IHC) evaluation was performed using anti-total c-MET (SP44) Rabbit Monoclonal as a primary antibody (#7904430, Ventana

Medical Systems, Tucson, AZ) and revealed using an Anti-RbOmniMap DAB Detection Kit (#760149, Ventana Medical Systems). The staining was carried out according to the manufacturer's protocol on a Discovery XT platform (Ventana Medical Systems). The primary antibody was incubated for 60 minutes. IHC staining was evaluated by one pathologist using two different methods. The first one was an H-score, as initially described to evaluate EGFR expression [32]. Briefly, this score ranges from 0 to 400 and results from the combination of the staining intensity (0–4) and the percentage of positive tumoral cells (0–100%) in each sample. Tumor samples were considered positive if their H-score was above median. The second one was the method described by Spigel and collaborators [33], which divides tumors into two different categories: MET high for cases presenting strong MET staining (+2 or +3) in more than 50% of tumoral cells and MET low for cases not fulfilling the former criteria. Met staining pattern, i.e. predominantly membranous vs. cytoplasmic, was assessed as described elsewhere [27].

E-cadherin and vimentin as EMT immunohistochemical markers were evaluated semiquantitatively [34]. Anti-human E-cadherin (NCH-38) mouse monoclonal primary antibody (#IR059, Dako, Carpinteria, CA) and anti-Vimentin (V9) mouse monoclonal primary antibody (#IR630, Dako) were evaluated. Both were revealed using the EnVision Flex visualization system (#K8010, Dako) and carried out according to the manufacturer's protocol using DakoAutostainer Plus. E-cadherin expression was evaluated as positive or "normal" when more than 50% of tumoral cells showed either membranous or cytoplasmic staining. Vimentin expression was evaluated as positive or "acquired" when more than 5% of tumoral cells presented strong staining. For analysis purposes, samples showing positive E-cadherin expression were considered as having an epithelial phenotype, whereas samples showing acquired Vimentin staining were considered mesenchymal.

Statistical analysis

All 196 TMA cores were considered and analysed as individual cases to study the association between MET IHC and *MET* FISH with histopathological variables. These associations were analysed using Chi-square or two-sample *T*-tests as necessary. Heterogeneity between different cores (A, B, C and D) was assessed using Kappa agreement index for categorical variables (i.e. FISH categories) and intraclass correlation coefficient for continuous variables (i.e. MET H-score).

Survival analyses were only performed in those patients included in the TMAs as this was a more homogeneous population, being all surgically treated patients with early stage disease. Survival curves were obtained with the Kaplan-Meier method and significance of the differences in outcome was evaluated with the Cox

regression test. Statistical analysis was carried out with SPSS version 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Data and statistical analysis reported are fully compliant with the REMARK guidelines [35].

RESULTS

Clinical and pathological characteristics of the study population

Patients' median age was 66 years, 69% were males and 52% were current smokers. Forty percent of the study population had stage I disease and 85% were adenocarcinomas (Table 1). Most of the samples showed moderate or poor histological differentiation (Grades 2–3). The predominant histological patterns in adenocarcinomas were acinar or solid with mucin production, whereas lepidic and micropapillary patterns were less common.

Mutational data was available for more than 90% of the cases. *KRAS* and *EGFR* mutations were found in 21% and 12% of the samples, respectively, whereas 2% of the cases presented *ALK* rearrangements. Patients included in the TMA study had similar characteristics, but with a higher proportion of patients with stage I disease (60%) and *EGFR* mutated cases (21%).

MET FISH analysis

MET status by FISH was evaluable in 117 out of 124 tumors (94.4%). We found eight *MET* positive cases (6.8%; 8/117). Four of these cases exhibited a *MET/CEP7* ratio ≥ 2 (truly amplified) and the remaining four had five or more copies of the *MET* gene (high polysomy). *MET* gain was identified in 73 cases (62.4%), being most of them polysomic for chromosome 7 ($n = 60$) (Table 2). *MET* gains were more prevalent in adenocarcinomas with a predominantly solid histological pattern ($p = 0.011$) (data not shown). Different FISH patterns are illustrated in Supplementary Figure 1.

MET IHC

MET IHC was assessable in 115 out of 124 tumors (92.7%). According to MetMab criteria, 55 cases (47.8%; 55/115) were classified as MET high, and 60 cases (52.2%; 60/115) as MET low (Table 2). Median H-score was 140 (range 0–400). According to H-score, 56 tumors were classified as positive (H-score > 140) and 59 as negative (H-score ≤ 140). Comparing both scoring methods, three cases were classified differently, one case with an H-score of 140 was classified as MET high and two cases with H-scores of 160 and 180, respectively, were classified as MET low. MET membranous staining was generally coarser than cytoplasmic staining (Supplementary Figure 2).

Table 1: Global study population and TMA patients' characteristics

	Global population ¹ (n = 120)	TMA population ² (n = 47)
Age (yr)		
Median	66	66
Range	41–92	41–80
Sex, n (%)		
Male	83 (69)	29 (62)
Female	37 (31)	18 (38)
Smoking status, n (%)		
Never smoker	20 (17)	12 (25)
Former smoker	37 (31)	14 (30)
Current smoker	63 (52)	21 (45)
Stage, n (%)		
I ³	50 (40)	29 (60)
II	19 (15)	8 (16)
III	20 (17)	10 (20)
IV	35 (28)	2 (4)
Histology, n (%)		
Adenocarcinoma	106 (85)	44 (90)
NOS	18 (15)	5 (10)
Histological Grade ⁴ , n (%)		
1	16 (20)	12 (30)
2	33 (42)	17 (42)
3	30 (38)	11 (28)
Not assessable	27	4
KRAS, n (%)		
Wild-type	90 (79)	38 (83)
Mutated	24 (21)	8 (17)
Not Assessable	10	3
EGFR, n (%)		
Wild-type	101 (88)	38 (79)
Mutated	14 (12)	10 (21)
Not assessable	9	1
ALK, n (%)		
Not rearranged	106 (98)	39 (95)
Rearranged	2 (2)	2 (5)
Not assessable	16	8

¹Includes 4 patients who had two different tumors (n = 124 tumors).

²Includes 2 patients who had two different tumors (n = 49 tumors).

³Includes 4 stage 0 patients.

⁴Only n = 106 adenocarcinomas. TMA, Tissue microarray; NOS, Not otherwise specified.

Heterogeneity assessment

Heterogeneity studies were focused on the TMA population, in which 171 out of 196 cores (87.2%) were

assessable for histology, 176 (89.8%) for grade, 184 (93.9%) for MET IHC and 180 (91.8%) for MET FISH. As expected, histological pattern and grade showed a highly heterogeneous distribution among different cores

Table 2: MET IHC and MET FISH status among biopsy (left) and TMA (right) specimens

	Global population ¹ (n = 115)	TMA population (n = 49)
MET H-score		
Median	140	90
Range	0–400	0–400
Metmab score, n (%)		
MET high	55 (48)	17 (35)
MET low	60 (52)	32 (65)
	Global population ¹ (n = 117)	TMA population (n = 49)
MET FISH negative		
MET disomic	36 (30.8)	11 (23)
MET gain	73 (62.4)	35 (71)
MET FISH positive ²		
High polysomy	4 (3.4)	2 (4)
Truly Amplified	4 (3.4)	1 (2)

¹For FISH analysis, the core with the highest gene copy number value was selected. For IHC, H-score and Metmab score was calculated using all 4 cores (see Materials and Methods).

²FISH positivity was defined as the average number of *MET* copies ≥ 5 or a *MET*/CEP7 ratio ≥ 2 .
IHC, immunohistochemistry; TMA, Tissue microarray; FISH, fluorescence *in situ* hybridization.

(Kappa agreement index of 0.10 and 0.18, respectively, comparing A-B cores). When MET IHC status was analyzed considering the H-score as a continuous variable, intraclass correlation coefficient (ICC) was 0.47 between cores A and B. When all four cores (A to D) were included in the analysis, ICC was 0.57. When cases were classified using MetMab criteria and divided into MET high and Met low, comparison of core A with the remaining three cores (B to D) revealed differences in classification in approximately 20–40% of the cases (Figure 1).

Regarding *MET* FISH analysis, when evaluated as a categorical variable (*MET* disomic, *MET* gain, *MET* positive), Kappa agreement index between cores A and B was 0.35. Regarding *MET* gain as a continuous variable, ICC between the four cores was 0.58. Among the three *MET* FISH positive cases found in the TMA population, four out of the 12 cores represented were FISH negative. Moreover, none of the cases was considered positive in all four cores (Figure 2). Intra-tumor heterogeneity of *MET* by both IHC and FISH is illustrated in Figure 3.

Association between IHC and FISH

MET FISH positive cases had higher H-score values ($p = 0.021$) (Supplementary Figure 3). Among these, the four truly amplified cases had higher H-score values than those categorized as high polysomy 7, although these difference was not statistically significant (data not shown). However, no significant association

was found between *MET* mean copy number and MET H-score considered as continuous variables (Supplementary Table 1). Applying the criteria recently proposed by Camidge *et al.* [36], only the four cases categorized as truly amplified would be considered *MET* positive tumors. Of these, one case had high-level *MET* amplification (*MET*/CEP7 ratio ≥ 5) with an H-score of 400 and MET high by MetMab criteria, whereas the remaining three cases had an intermediate-level of *MET* amplification (*MET*/CEP7 ratio ≥ 2.2 - < 5), of which one was classified as MET high and the remaining two as MET low by IHC. Discordance between IHC and FISH is illustrated in Figure 4.

MET staining pattern and mesenchymal markers

MET staining pattern was assessable in 132 cores. Out of these, only 14 (10.6%; 14/132) corresponding to 11 patients showed a predominantly cytoplasmic staining. Heterogeneity of MET staining pattern among different tumor cores was also observed (Figure 5). Three patients had predominantly cytoplasmic MET in two cores. The remaining 8 patients showed cytoplasmic staining in only one of the four cores. No patient had cytoplasmic MET in all four cores and none of the cores with cytoplasmic MET was FISH positive (Supplementary Figure 4). Interestingly, predominant cytoplasmic MET staining correlated with lower MET H-scores ($p = 0.003$), whereas non-smoking was associated with a membranous staining pattern ($p = 0.042$) (Table 3).

		CORE B		CORE C		CORE D	
		High	Low	High	Low	High	Low
CORE A	MET high	13	9	14	9	11	12
	MET Low	4	17	2	23	6	15
Percent change		30.2% (13/43)		22.9% (11/48)		40.1% (18/44)	

Figure 1: Metmab status discordance among different tumor cores. Differences in MET IHC classification among different areas represented in each core. The highest variability was observed between cores A and D and the lowest between A and C.

	CASE 1		CASE 2		CASE 3	
	<i>MET</i> avg.	<i>MET/CEP7</i>	<i>MET</i> avg.	<i>MET/CEP7</i>	<i>MET</i> avg.	<i>MET/CEP7</i>
CORE A	5.7	1.14	5.3	1.16	9.1	2.57
CORE B	3.96	1.07	6.8	1.01	8.02	2.41
CORE C	6.02	1.00	3.02	1.06	4.18	1.12
CORE D	5.7	1.06	2.38	1.00	9.52	2.82

Figure 2: *MET* FISH discordance among different cores in FISH positive cases. Eight out of twelve cores are FISH positive. None of the cases shows FISH positivity in all four cores.

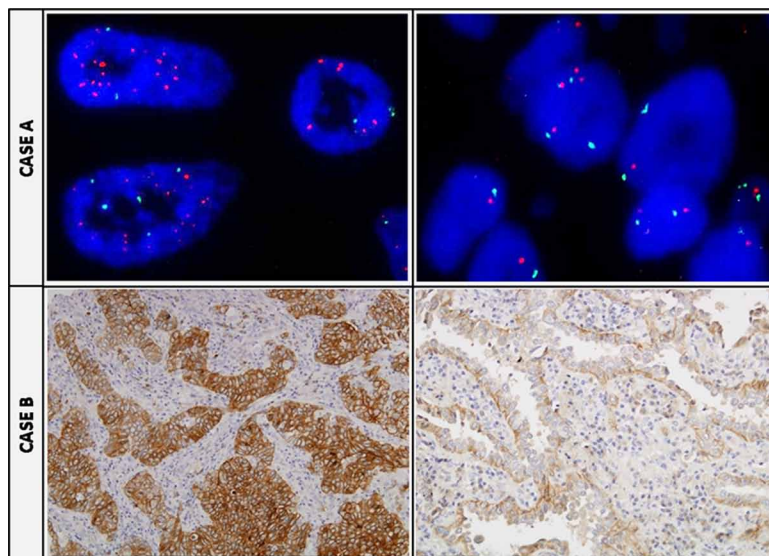


Figure 3: Tumor heterogeneity regarding MET status. CASE A. Two TMA cores of the same tumor sample with opposite FISH *MET* results: in the left a positive core showing a *MET/CEP7* ratio ≥ 2 , and in the right a *MET* negative disomic case. CASE B. Two TMA cores of the same tumor sample with opposite MET IHC results: at the left a positive +4 area, and at the right a completely negative area of the same tumor.

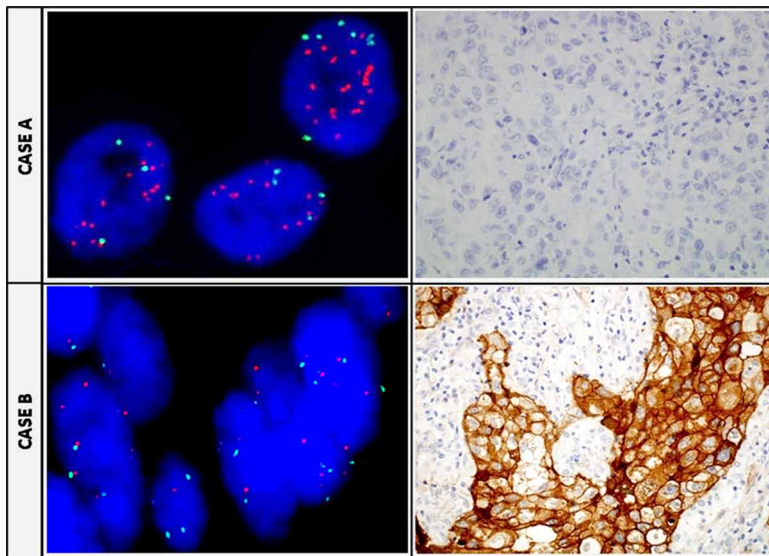


Figure 4: Discordance between FISH and IHC in individual tumors. CASE A. *MET* FISH positive case showing a *MET*/*CEP7* ratio ≥ 2 (left) and, the same case assessed by IHC showing negative staining (right). CASE B. *MET* FISH negative sample (left) with a high positive score by IHC (strong +4 membranous predominant staining) in the same sample (right).

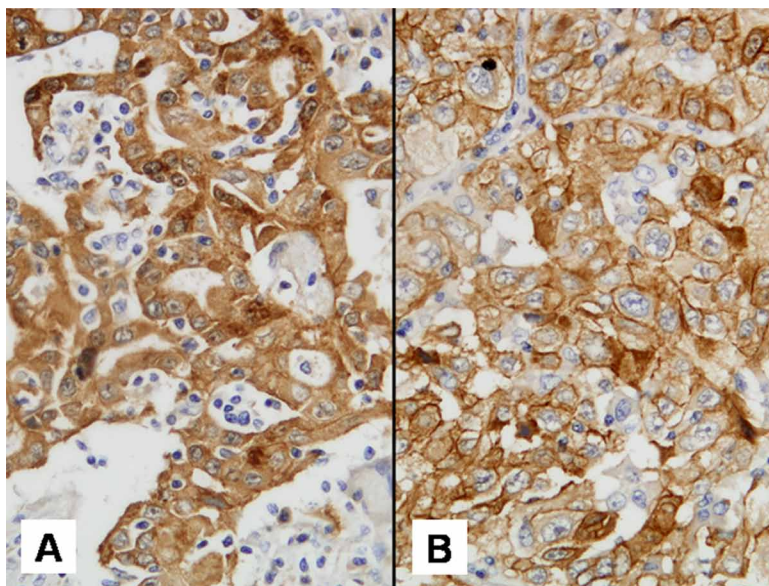


Figure 5: Met IHC staining pattern discordance. A. and B. show different tumor cores from the same patient. A: predominantly cytoplasmic staining and B: predominantly membranous staining.

Vimentin staining was assessable in 184 cores and E-cadherin in 181. A total of 19 cores corresponding to eight different patients (10.3%; 19/184) showed a mesenchymal phenotype (strong vimentin staining). All of these patients had a smoking history (five of them were current smokers and the remaining three were former smokers). Interestingly, the presence of a mesenchymal phenotype was associated with a predominantly cytoplasmic *MET* staining ($p = 0.042$). Also, tumors showing mesenchymal features had significantly lower H-scores ($p = 0.027$), whereas the

opposite occurred for E-cadherin positive tumors, which had significantly higher H-scores ($p = 0.003$) (Table 3).

Survival analysis (TMA cohort)

Median follow-up time was 73.2 months and median survival time was not reached. One-, two- and three-year survival rates were 93.7%, 80.6% and 73.1%, respectively. Patients whose tumor *Met* H-score values were below the median had shorter

Table 3: Association of MET IHC with other histopathological features in TMA samples (n = 196 cores)

	MET H-score med [P_{25} - P_{75}]	p-value
Histological pattern		
Acinar	35 [0-280]	0.033
Lepidic	400 [300-400]	
Solid	30 [0-400]	
Papillary	25 [0-78.5]	
Histological grade		
1	360 [97.5-400]	0.010
2	60 [0-200]	
3	30 [0-383]	
Staining pattern		
Cytoplasmic	20 [7.25-160]	0.003
Membranous	240 [40-400]	
Vimentin		
Positive	0 [0-150]	0.027
Negative	80 [50-340]	
E-cadherin		
Positive	80 [1-350]	0.003
Negative	0 [0-20]	

TMA, Tissue microarray; IHC, immunohistochemistry

survival times when compared with patients with above-median values, but this was not statistically significant ($p = 0.175$). Interestingly, patients with tumors showing either a predominantly cytoplasmic Met staining or expression of mesenchymal features (i.e. vimentin positivity) had shorter survival times, and these differences were statistically significant ($p = 0.042$ and $p = 0.047$, respectively). Survival curves are illustrated in Figure 6.

DISCUSSION

Lung adenocarcinoma is a morphologically heterogeneous disease. Multiple histological patterns can be identified when surgical samples are evaluated [37]. This may be due to underlying genetic heterogeneity as described for other neoplasms [38, 39] as well as for NSCLC [40, 41]. In routine clinical practice, we use biopsy or cytology samples, which contain only a small fraction of tumor, to make treatment decisions and select patients for clinical trials. In our study, patient classification by IHC could vary in up to 40% among different tumor areas.

We also corroborated that *de novo* MET amplification is a rare event, in the range of other genetic alterations such as *ROS* or *ALK* rearrangements [42]. Furthermore, although FISH positive cases showed significantly higher MET H-score values, correlation between MET gains and total MET protein expression was

poor. We also identified cases with evident discordance between MET IHC and FISH, for which the underlying mechanism is not clear. However, it is consistent with findings from other studies [43].

The difficulty of finding the correct predictive biomarker for MET-targeted therapies may explain, at least in part, the lack of success of the two largest trials testing MET inhibitors combined with Erlotinib in NSCLC patients. The MARQUEE trial [22] selected patients with nsNSCLC histology based on data of a phase II with Tivantinib [44]. The MetLung trial [23, 33], also based on phase II data with Onartuzumab [33], performed a more restrictive selection, including only patients with +2/+3 staining in at least 50% of tumor cells. Interestingly, a molecular-based post-hoc analysis was conducted on approximately 40% of the patients (based on tissue availability) participating in the MARQUEE trial. This analysis revealed a survival benefit in those patients with high MET protein expression determined by MetMab criteria (HR 0.7; $p = 0.03$) [45].

Another strategy for the development of MET inhibitors in NSCLC relies on patient selection based on MET gains or gene amplification. In the MARQUEE study, no statistically significant differences were observed in overall survival between MET amplified and non-amplified cases (HR 0.83; $p = 0.34$) [45]. Conversely, a subgroup analysis of the phase II study with Onartuzumab revealed a survival benefit for EGFR wild-type and MET FISH positive [15] patients receiving the combined

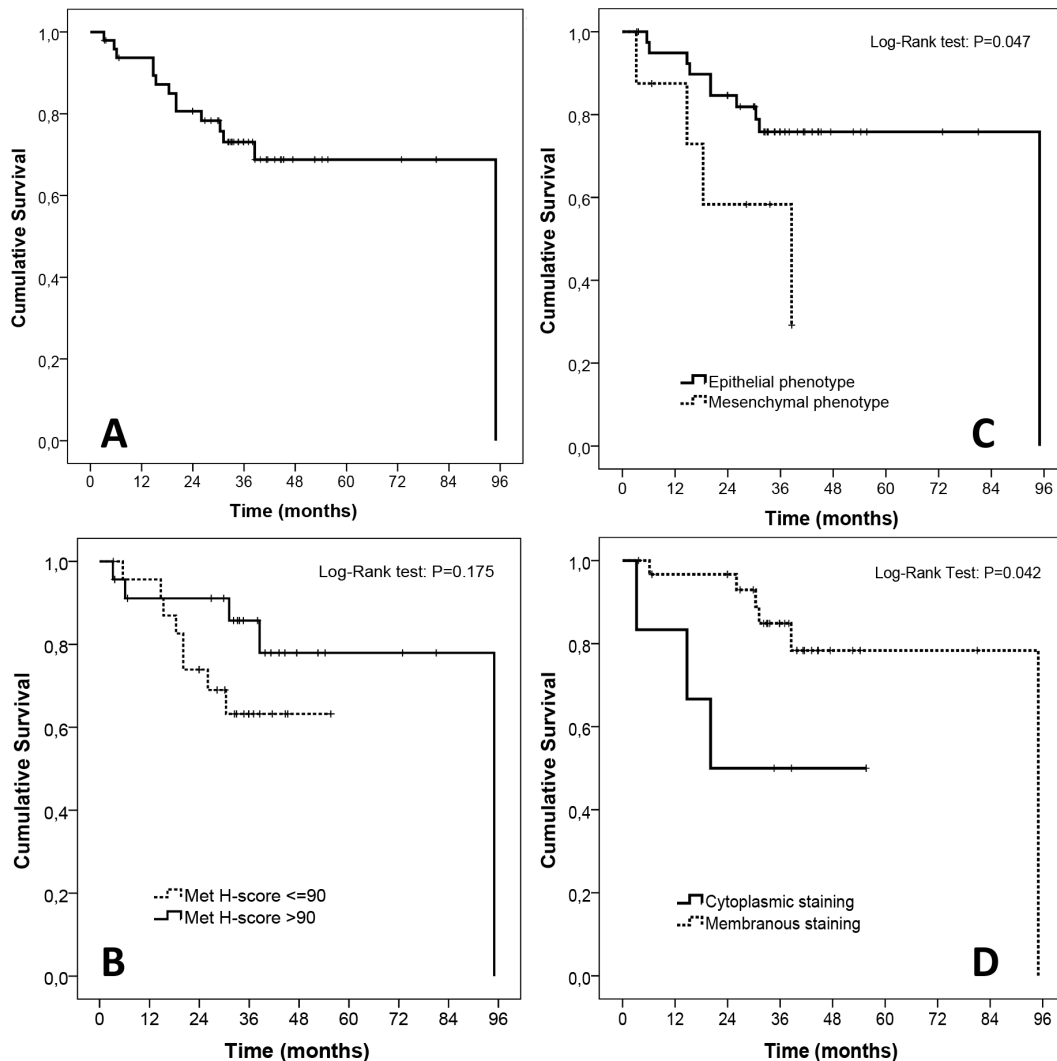


Figure 6: Exploratory survival analyses in the TMA cohort. **A.** Overall survival of the whole cohort ($n = 47$ patients, median overall survival not reached). **B.** Survival according to MetMab status. **C.** Survival according to MET staining pattern. **D.** Survival according to epithelial or mesenchymal phenotype.

treatment with Onartuzumab plus Erlotinib (HR 0.3; $p = 0.06$) [46]. Recently, data from a phase I/II trial with Crizotinib reported significant clinical responses in patients with *MET* amplification. Those patients with a *MET*/CEP7 ratio of ≥ 5.0 showed significantly better outcomes [36]. Although these results need to be confirmed in larger clinical trials, FISH-based criteria appear to be more adequate for patient selection. If *MET* status by FISH is less heterogeneous than MET IHC remains to be determined, as small numbers in our study (only three FISH positive cases in the TMA cohort) prevent us from drawing any robust conclusions.

Classically, it has been accepted that, after activation at the cell membrane, tyrosine-kinasereceptors (RTK) are internalized and degraded or recycled back to the membrane. However, during the last decade, preclinical evidence has emerged that highlights the role of receptor endocytosis and intracellular trafficking in RTK-mediated signaling

[47–49]. In a preclinical model with immortalized bronchial cells, sustained stimulation with HGF caused a gradual displacement of c-MET receptor from the membrane to the cytoplasm [50]. Also, recent studies have associated the presence of cytoplasmic Met determined by IHC with tumor progression in patients with resected bladder cancer [51] and with poor outcome in patients with gastric adenocarcinoma [27] and mesothelioma [50]. Also, the presence of a mesenchymal phenotype, which can be an early event in NSCLC [52], has been linked to poor prognosis and metastasis development in surgically resected NSCLC [53].

Finally, our evaluation of potential surrogate markers for MET activation revealed interesting findings. Predominant cytoplasmic staining, which may translate MET pathway activation, was associated with a mesenchymal phenotype, which in turn can also be derived from MET HGF-dependent activation [34]. Although only hypothesis-generating, these results would

be concordant with these patients presenting a worse prognosis, as observed in our limited series and harbor a potential predictive value for MET inhibitor benefit.

In conclusion, our study shows that MET status is highly heterogeneous within nsNSCLC tumors. This notion challenges current techniques and criteria for selecting patients for MET-targeted therapies. Further studies are needed to accurately detect patients with MET-driven tumors.

FINANCIAL SUPPORT

This work was supported by RD12/0036/0051/FEDER, PI13/00140/FEDER, a grant from Fundacio Marato de TV3. Ref.666/C/2013 and 2014 SGR 740. the “Xarxa de Bancs de tumors sponsored by Pla Director d’Oncologia de Catalunya (XBTC).” JA is recipient of intensification programme ISCIII.

REFERENCES

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011; 61:69–90.
2. Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer. *N Engl J Med.* 2008; 359:1367–80.
3. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, Sunpaweravong P, Han B, Margono B, Ichinose Y, Nishiwaki Y, Ohe Y, Yang JJ, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med.* 2009; 361:947–57.
4. Scagliotti G, Stahel RA, Rosell R, Thatcher N, Soria JC. ALK translocation and crizotinib in non-small cell lung cancer: an evolving paradigm in oncology drug development. *Eur J Cancer.* 2012; 48:961–73.
5. Camidge DR, Bang YJ, Kwak EL, Iafrate AJ, Varella-Garcia M, Fox SB, Riely GJ, Solomon B, Ou SH, Kim DW, Salgia R, Fidias P, Engelman JA, et al. Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from a phase 1 study. *Lancet Oncol.* 2012; 13:1011–9.
6. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, Palmero R, Garcia-Gomez R, Pallares C, Sanchez JM, Porta R, Cobo M, Garrido P, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EORTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012; 13:239–46.
7. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, 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; 350:2129–39.
8. Park M, Dean M, Kaul K, Braun MJ, Gonda MA, Vande Woude G. Sequence of MET protooncogene cDNA has features characteristic of the tyrosine kinase family of growth-factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84:6379–83.
9. Giordano S, Ponzetto C, Di Renzo MF, Cooper CS, Comoglio PM. Tyrosine kinase receptor indistinguishable from the c-met protein. *Nature.* 1989; 339:155–6.
10. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009; 139:871–90.
11. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4:915–25.
12. Gherardi E, Birchmeier W, Birchmeier C, Vande Woude G. Targeting MET in cancer: rationale and progress. *Nat Rev Cancer.* 2012; 12:89–103.
13. Ma PC, Jagadeeswaran R, Jagadeesh S, Tretiakova MS, Nallasura V, Fox EA, Hansen M, Schaefer E, Naoki K, Lader A, Richards W, Sugarbaker D, Husain AN, et al. Functional expression and mutations of c-Met and its therapeutic inhibition with SU11274 and small interfering RNA in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2005; 65:1479–88.
14. Takanami I, Tanana F, Hashizume T, Kikuchi K, Yamamoto Y, Yamamoto T, Kodaira S. Hepatocyte growth factor and c-Met/hepatocyte growth factor receptor in pulmonary adenocarcinomas: an evaluation of their expression as prognostic markers. *Oncology.* 1996; 53:392–7.
15. Cappuzzo F, Marchetti A, Skokan M, Rossi E, Gajapathy S, Felicioni L, Del Grammasio M, Sciarrotta MG, Buttitta F, Incarbone M, Toschi L, Finocchiaro G, Destro A, et al. Increased MET gene copy number negatively affects survival of surgically resected non-small-cell lung cancer patients. *J Clin Oncol.* 2009; 27:1667–74.
16. Dziadziuszko R, Wynes MW, Singh S, Asuncion BR, Ranger-Moore J, Konopa K, Rzyman W, Szostakiewicz B, Jassem J, Hirsch FR. Correlation between MET gene copy number by silver *in situ* hybridization and protein expression by immunohistochemistry in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2012; 7:340–7.
17. Park S, Choi YL, Sung CO, An J, Seo J, Ahn MJ, Ahn JS, Park K, Shin YK, Erkin OC, Song K, Kim J, Shim YM, et al. High MET copy number and MET overexpression: poor outcome in non-small cell lung cancer patients. *Histol Histopathol.* 2012; 27:197–207.
18. Martens T, Schmidt NO, Eckerich C, Fillbrandt R, Merchant M, Schwall R, Westphal M, Lamszus K. A novel one-armed anti-c-Met antibody inhibits glioblastoma growth *in vivo*. *Clin Cancer Res.* 2006; 12:6144–52.
19. Christensen JG, Burrows J, Salgia R. c-Met as a target for human cancer and characterization of inhibitors for therapeutic intervention. *Cancer Lett.* 2005; 225:1–26.

20. Catenacci DV, Henderson L, Xiao SY, Patel P, Yauch RL, Hegde P, Zha J, Pandita A, Peterson A, Salgia R. Durable complete response of metastatic gastric cancer with anti-Met therapy followed by resistance at recurrence. *Cancer Discov.* 2011; 1:573–9.
21. Ou SH, Bazhenova L, Camidge DR, Solomon BJ, Herman J, Kain T, Bang YJ, Kwak EL, Shaw AT, Salgia R, Maki RG, Clark JW, Wilner KD, et al. Rapid and dramatic radiographic and clinical response to an ALK inhibitor (crizotinib, PF02341066) in an ALK translocation-positive patient with non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2010; 5:2044–6.
22. Scagliotti GV, Novello S, Schiller JH, Hirsh V, Sequist LV, Soria JC, von Pawel J, Schwartz B, Von Roemeling R, Sandler AB. Rationale and design of MARQUEE: a phase III, randomized, double-blind study of tivantinib plus erlotinib versus placebo plus erlotinib in previously treated patients with locally advanced or metastatic, nonsquamous, non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer.* 2012; 13:391–5.
23. Spigel DR, Edelman MJ, Mok T, O'Byrne K, Paz-Ares L, Yu W, Rittweger K, Thurm H. Treatment Rationale Study Design for the MetLung Trial: A Randomized, Double-Blind Phase III Study of Onartuzumab (MetMAB) in Combination With Erlotinib Versus Erlotinib Alone in Patients Who Have Received Standard Chemotherapy for Stage IIIB or IV Met-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer.* 2012; 13:500–4.
24. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivari A, McLendon R, Rasheed BA, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 2008; 321:1807–12.
25. Tao Y, Ruan J, Yeh SH, Lu X, Wang Y, Zhai W, Cai J, Ling S, Gong Q, Chong Z, Qu Z, Li Q, Liu J, et al. Rapid growth of a hepatocellular carcinoma and the driving mutations revealed by cell-population genetic analysis of whole-genome data. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108:12042–7.
26. Gerlinger M, Quezada SA, Peggs KS, Furness AJ, Fisher R, Marafioti T, Shende VH, McGranahan N, Rowan AJ, Hazell S, Hamm D, Robins HS, Pickering L, et al. Ultra-deep T cell receptor sequencing reveals the complexity and intratumour heterogeneity of T cell clones in renal cell carcinomas. *J Pathol.* 2013; 231:424–32.
27. Ha SY, Lee J, Kang SY, Do IG, Ahn S, Park JO, Kang WK, Choi MG, Sohn TS, Bae JM, Kim S, Kim M, Kim S, et al. MET overexpression assessed by new interpretation method predicts gene amplification and poor survival in advanced gastric carcinomas. *Mod Pathol.* 2013; 26:1632–41.
28. Arriola E, Canadas I, Arumi-Uria M, Domine M, Lopez-Vilarino JA, Arpi O, Salido M, Menendez S, Grande E, Hirsch FR, Serrano S, Bellosillo B, Rojo F, et al. MET phosphorylation predicts poor outcome in small cell lung carcinoma and its inhibition blocks HGF-induced effects in MET mutant cell lines. *Br J Cancer.* 2011; 105:814–23.
29. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.* 1998; 4:844–7.
30. Salido M, Tusquets I, Corominas JM, Suarez M, Espinet B, Corzo C, Bellet M, Fabregat X, Serrano S, Sole F. Polysomy of chromosome 1 in breast cancer tumors showing an overexpression of ERBB2: a study of 15 cases using fluorescence *in situ* hybridization and immunohistochemistry. *Breast Cancer Res.* 2005; 7:R267–73.
31. Camidge DR, Kono SA, Flacco A, Tan AC, Doebele RC, Zhou Q, Crino L, Franklin WA, Varella-Garcia M. Optimizing the detection of lung cancer patients harboring anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangements potentially suitable for ALK inhibitor treatment. *Clin Cancer Res.* 2010; 16:5581–90.
32. Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L, Haney J, Witts S, Danenberg K, Domenichini I, Ludovini V, Magrini E, Gregorc V, et al. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97:643–55.
33. Spigel DR, Ervin TJ, Ramlaou RA, Daniel DB, Goldschmidt JH Jr, Blumenschein GR Jr, Krzakowski MJ, Robinet G, Godbert B, Barlesi F, Govindan R, Patel T, Orlov SV, et al. Randomized phase II trial of Onartuzumab in combination with erlotinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2013; 31:4105–14.
34. Canadas I, Rojo F, Taus A, Arpi O, Arumi-Uria M, Pijuan L, Menendez S, Zazo S, Domine M, Salido M, Mojal S, Garcia de Herreros A, Rovira A, et al. Targeting Epithelial-to-Mesenchymal Transition with Met Inhibitors Reverts Chemoresistance in Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 2014; 20:938–50.
35. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. Statistics Subcommittee of the NCI EWGoCD. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK). *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97:1180–4.
36. Camidge DR, Ou S-HI, Shapiro G, Otterson GA, Villaruz LC, Villalona-Calero MA, Iafrate AJ, Varella-Garcia M, Dacic S, Cardarella S, Zhao W, Tye L, Stephenson P, et al. Efficacy and safety of crizotinib in patients with advanced c-MET-amplified non-small cell lung cancer (NSCLC). *ASCO Meeting Abstracts.* 2014; 32:8001.
37. Travis WD, Brambilla E, Riely GJ. New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol.* 2013; 31:992–1001.
38. Fisher R, Larkin J, Swanton C. Inter and intratumour heterogeneity: a barrier to individualized medical therapy in renal cell carcinoma? *Front Oncol.* 2012; 2:49.
39. Yachida S, Jones S, Bozic I, Antal T, Leary R, Fu B, Kamiyama M, Hruban RH, Eshleman JR, Nowak MA, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, et al. Distant

- metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature*. 2010; 467:1114–7.
40. Cancer Genome Atlas Research N: Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*. 2014; 511:543–50.
 41. Chen Z, Fillmore CM, Hammerman PS, Kim CF, Wong KK. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nat Rev Cancer*. 2014; 14:535–46.
 42. Guo B, Cen H, Tan X, Liu W, Ke Q. Prognostic value of MET gene copy number and protein expression in patients with surgically resected non-small cell lung cancer: a meta-analysis of published literatures. *PLoS One*. 2014; 9:e99399.
 43. Xiu J, Feldman R, Bender RP, Salgia R. Tumor biomarker evaluation of 6, 785 patients for combination treatment strategies in NSCLC. *ASCO Meeting Abstracts*. 2014; 32:e19012.
 44. Sequist LV, von Pawel J, Garney EG, Akerley WL, Brugger W, Ferrari D, Chen Y, Costa DB, Gerber DE, Orlov S, Ramlau R, Arthur S, Gorbachevsky I, et al. Randomized phase II study of erlotinib plus tivantinib versus erlotinib plus placebo in previously treated non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2011; 29:3307–15.
 45. Novello S, Scagliotti GV, Ramlau R, Barlesi F, Sandler AB, Von Roemeling R. Efficacy Analysis for Molecular Subgroups in MARQUEE: a Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Phase 3 Trial of Tivantinib (ARQ 197) Plus Erlotinib versus Placebo plus Erlotinib in Previously Treated Patients with Locally Advanced or Metastatic, Non-squamous, Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC). Poster presented at: World Congress on Lung Cancer; 2013 27–31; Sidney, Australia.
 46. Koeppen H, Yu W, Zha J, Pandita A, Penuel E, Rangell L, Raja R, Mohan S, Patel R, Desai R, Fu L, Do A, Parab V, et al. Biomarker Analyses from a Placebo-Controlled Phase II Study Evaluating Erlotinib +/- Onartuzumab in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: MET Expression Levels Are Predictive of Patient Benefit. *Clin Cancer Res*. 2014; 20:4488–98.
 47. Joffre C, Barrow R, Menard L, Calleja V, Hart IR, Kermorgant S. A direct role for Met endocytosis in tumorigenesis. *Nat Cell Biol*. 2011; 13:827–37.
 48. Barrow R, Joffre C, Menard L, Kermorgant S. Measuring the role for Met endosomal signaling in tumorigenesis. *Methods Enzymol*. 2014; 535:121–40.
 49. von Zastrow M, Sorokin A. Signaling on the endocytic pathway. *Curr Opin Cell Biol*. 2007; 19:436–45.
 50. Levallet G, Vaisse-Lesteven M, Le Stang N, Ilg AG, Brochard P, Astoul P, Pairon JC, Bergot E, Zalcman G, Galateau-Salle F. Plasma cell membrane localization of c-MET predicts longer survival in patients with malignant mesothelioma: a series of 15 cases from the MESOPATH Group. *J Thorac Oncol*. 2012; 7:599–606.
 51. Kluth M, Reynolds K, Rink M, Chun F, Dahlem R, Fisch M, Hoppner W, Wagner W, Doh O, Terracciano L, Simon R, Sauter G, Minner S. Reduced membranous MET expression is linked to bladder cancer progression. *Cancer Genet*. 2014; 207:147–52.
 52. Prudkin L, Liu DD, Ozburn NC, Sun M, Behrens C, Tang X, Brown KC, Bekele BN, Moran C, Wistuba II. Epithelial-to-mesenchymal transition in the development and progression of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Mod Pathol*. 2009; 22:668–78.
 53. Soltermann A, Tischler V, Arbogast S, Braun J, Probst-Hensch N, Weder W, Moch H, Kristiansen G. Prognostic significance of epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transition protein expression in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2008; 14:7430–7.

ARTICLE 5

CD274 (PDL1) AND JAK2 GENOMIC AMPLIFICATIONS IN PULMONARY SQUAMOUS-CELL AND ADENOCARCINOMA PATIENTS

Sergi Clavé^{1,2}, Lara Pijuan³, David Casadevall⁴, Álvaro Taus⁴, Javier Gimeno³, Sílvia Hernández-Llodrà⁵, María Rodríguez-Rivera^{1,2}, Marta Lorenzo^{2,3}, Sílvia Menéndez^{2,4}, Joan Albanell^{2,4}, Blanca Espinet^{1,2}, Edurne Arriola^{2,4}, Marta Salido^{1,2}.

¹ Laboratori de Citogenètica Molecular, Servei de Patologia, Hospital del Mar, Barcelona;

² Programa de Recerca en Càncer, Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM), Barcelona; ³ Servei de Patologia, Hospital del Mar, Barcelona; ⁴ Servei d'Oncologia Mèdica, Hospital del Mar, Barcelona; ⁵ Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona.

En aquest article es van explorar les amplificacions dels gens *CD274 (PDL1)* i *JAK2*, i la pèrdua de *PTEN* com a mecanismes genòmics de regulació de l'expressió de PD-L1 en els pacients amb CPCNP. Es van estudiar tant l'expressió de PD-L1 com la de *PTEN* per IHQ i les alteracions de número de còpies dels gens *CD274*, *JAK2* i *PTEN* per FISH en 171 mostres de teixit tumoral parafinat incloses en *arrays* de teixits (2 *cores* tumorals per pacient).


Es van detectar un 23% de pacients amb sobreexpressió de PD-L1 i un 9% de casos (n= 14) amb amplificació del gen *CD274*. Dotze dels 14 casos amplificats també van presentar sobreexpressió de PD-L1 demostrant una concordança significativa entre ambdues tècniques ($p= 0,0001$). De la mateixa manera, els casos amb amplificació del gen *JAK2* (6%) també presentaven una associació significativa amb l'expressió de PD-L1

($p= 0,0006$). A més, sis dels set casos tenien la coamplificació d'ambdós gens, *JAK2* i *CD274* (amplificació genòmica de la regió 9p24.1). No es va observar cap correlació estadística entre la pèrdua de *PTEN* i l'expressió de *PD-L1*.

Histopathology. 2018;72:259-69. doi: 10.1111/his.13339.

Acceptat: 5 d'agost de 2017

CD274 (PDL1) and JAK2 genomic amplifications in pulmonary squamous-cell and adenocarcinoma patients

Sergi Clavé,^{1,2}  Lara Pijuan,^{2,3} David Casadevall,^{2,4} Álvaro Taus,^{2,4} Javier Gimeno,^{2,3} Silvia Hernández-Llodrà,⁵ María Rodríguez-Rivera,^{1,2} Marta Lorenzo,^{2,3} Silvia Menéndez,^{2,4} Joan Albanell,^{2,4} Blanca Espinet,^{1,2} Edurne Arriola^{2,4} & Marta Salido^{1,2}

¹Laboratori de Citogenètica Molecular, Servei de Patologia, Hospital del Mar, ²Programa de Recerca en Càncer, IMIM (Institut Mar d'Investigacions Mèdiques), ³Servei de Patologia, Hospital del Mar, ⁴Servei d'Oncologia Mèdica, Hospital del Mar, and ⁵Department of Health and Experimental Sciences, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain

Date of submission 21 October 2016

Accepted for publication 5 August 2017

Published online Article Accepted 10 August 2017

Clavé S, Pijuan L, Casadevall D, Taus Á, Gimeno J, Hernández-Llodrà S, Rodríguez-Rivera M, Lorenzo M, Menéndez S, Albanell J, Espinet B, Arriola E & Salido M

(2018) *Histopathology* 72, 259–269. <https://doi.org/10.1111/his.13339>

CD274 (PDL1) and JAK2 genomic amplifications in pulmonary squamous-cell and adenocarcinoma patients

Aims: CD274 (PDL1) and JAK2 (9p24.1) gene amplifications have been recently described in pulmonary carcinomas in association with programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression. Furthermore, PTEN loss has been explored preclinically in relation to PD-L1 expression. Our aim was to determine whether these genomic alterations affect PD-L1 expression levels in non-small-cell lung cancer.

Methods and results: PD-L1 and PTEN expression determined by immunohistochemistry (IHC), and CD274, JAK2 and PTEN copy number alterations (CNAs) determined by fluorescence *in-situ* hybridisation, were studied in 171 pulmonary carcinoma specimens. PD-L1 expression was positive in 40 cases (23.3%), and CD274 amplification was present in 14

tumours (8.8%). Concordance between both events was found in 12 of 14 amplified cases ($P = 0.0001$). We found nine JAK2-amplified cases (5.7%), seven with PD-L1 expression ($P = 0.0006$). Moreover, six of the seven cases had JAK2 and CD274 coamplification (9p24.1 genomic amplification). Remarkably, the average PD-L1 IHC score was higher in these amplified cases (230 versus 80; $P = 0.001$). Non-statistical associations were observed between PD-L1 expression and PTEN loss and PTEN deletions.

Conclusions: We describe a subset of patients (8.2%) who had 9p24.1 amplifications resulting in high expression of PD-L1. Our results provide evidence for genomic up-regulation of PD-L1 expression in non-small-cell lung cancer.

Keywords: biomarkers, DNA copy number variations, fluorescence *in-situ* hybridisation, immunohistochemistry, immunotherapy

Introduction

The immune system is able to recognise neoantigens generated by tumour cells, and potentially activate

control responses.¹ However, these immune responses might be ineffective, because cancer cells can develop multiple escape mechanisms.^{2,3} Immune checkpoints, which are inhibitory signalling pathways that can down-modulate T-cell responses, constitute one of the key mechanisms of tumour evasion. The best-characterised immune checkpoints are cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 and programmed death receptor 1

Address for correspondence: M Salido PhD, Servei de Patologia, Hospital del Mar, Passeig Marítim 25–29, 08003 Barcelona, Spain. e-mails: msalido@parcdesalutmar.cat; sclave@imim.es

(PD-1), and their modulation through inhibitory antibodies has represented a major breakthrough in the treatment of melanoma and lung cancer, among other malignant tumours.⁴

Currently, there are three available PD-1/programmed death-ligand 1 (PD-L1) inhibitors for squamous non-small-cell lung cancer (NSCLC) and non-squamous NSCLC patients: nivolumab, pembrolizumab, and atezolizumab.^{5–8} PD-L1 expression on tumour and/or tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) detected by immunohistochemistry (IHC), as performed in the clinical trials, is the most widely accepted predictive biomarker. However, the identification of PD-L1-negative patients who respond to therapy,^{9,10} and show long-term benefit from nivolumab and pembrolizumab,^{11,12} as well as PD-L1-positive patients who do not respond as expected, calls into question the reliability of PD-L1 expression as a sole predictive biomarker.

Biologically, PD-L1 expression can be induced by interferon (IFN)- γ secreted from TILs, which suggests an adaptive feedback response to immune attack.^{13,14} However, in some settings, expression of PD-L1 is innate, and it is neither associated with TILs nor induced by IFN- γ .¹⁵ Constitutive tumour alterations, mostly associated with gene amplification and/or up-regulation of carcinogenetic-related pathways, are known to modulate PD-L1 expression.^{15,16} It has been shown that NSCLCs harbouring activating epidermal growth factor receptor (*EGFR*) mutations and *ALK* fusions have increased PD-L1 expression via STAT3, phosphoinositide 3-kinase (PI3K) or extracellular signal-regulated kinase transcript activation.^{17,18} In addition, as the PI3K–AKT signalling pathway is negatively regulated by PTEN, it is feasible that PTEN loss triggers an increase in PD-L1 expression, as shown in pre-clinical studies.^{19,20} Another mechanism, as previously seen in Hodgkin and mediastinal large B-cell lymphomas, is selective amplification of the 9p24.1 chromosomal region, which contains *CD274* (*PDL1*), *PDCD1LG2* (*PDL2*), and *JAK2*.²¹ In addition, recent studies have revealed that there is a subgroup of NSCLC patients with simultaneous amplification of *CD274* and *JAK2* in association with PD-L1 expression, but the prevalence and significance of this alteration remain to be elucidated.^{22,23}

Our study aimed to analyse 9p24.1 genomic alterations (*CD274* and *JAK2*) and PTEN losses in correlation with PD-L1 expression in a pulmonary adenocarcinoma (ADC) and squamous-cell carcinoma (SCC) western population.

Materials and methods

PATIENT SELECTION

This retrospective study was conducted in a surgical cohort of 143 pulmonary carcinoma patients—93 ADCs and 50 SCCs—constructed in eight tissue microarrays (TMAs).²⁴ Between 2009 and 2015, we selected all pulmonary ADC and SCC patients with availability of additional tumour tissue from the same tumour sample previously used for histological and molecular diagnosis. A total of six tissue cores with diameters of 2 mm were obtained from each patient, four of them containing different histological areas of the carcinoma (named A, B, C, and D), and two of them containing benign lung parenchyma. In the present study, we analysed only two tumour cores (A and B). We extracted from medical records the molecular data concerning routinely analysed alterations: *KRAS* and *EGFR* mutations and *ALK* rearrangements in ADC samples, and *FGFR1* amplifications in SCC samples. In addition to this TMAs cases, we selected 28 whole-tissue sections of ADC patients with advanced-stage disease to enrich for *KRAS*, *EGFR* and *ALK* molecular alterations not well represented in the TMAs. After this selection, we reached a 28%, 19% and 2% of *KRAS*, *EGFR* and *ALK* alterations, respectively. All biological samples were obtained from Parc de Salut MAR Biobank (MARBiobanc), Barcelona. This project was approved by the local ethics committee (ID: 2015/6336/I), and all patients provided written informed consent.

PD-L1 EXPRESSION DETERMINED BY IHC IN TUMOUR CELLS

IHC was performed with the commercially available PD-L1 SP142 rabbit monoclonal antibody (Ventana, Tucson, AZ, USA) on unstained 4- μ m formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue sections from TMAs and whole-tissue samples, on an automated Benchmark XT immunostainer (Ventana). Antigen retrieval was performed for 32 min with CC1, and the antibody was applied manually for 80 min at 37°C. Signal visualisation was achieved with the Optiview DAB IHC Detection and Amplification kits (Ventana). IHC slides were evaluated independently by two well-experienced pathologists (L.P. and J.G.) without any prior information on the clinicopathological features of the patient samples. Percentages of PD-L1-positive tumour cells and staining intensity were evaluated for each sample. The cut-off for positivity was set at $\geq 1\%$.⁸ Moreover, a semiquantitative IHC approach

was used to generate a score from 0 to 300. Briefly, staining intensity was scored as follows: 0, negative or trace; 1, weak; 2, moderate, and 3, high. The percentage of stained cells (0–100%) was multiplied by the dominant intensity pattern.²⁵

CD274 (PDL1), JAK2 AND PTEN COPY NUMBER ALTERATIONS (CNAs) DETERMINED BY FLUORESCENCE IN-SITU HYBRIDISATION (FISH)

FISH was conducted on unstained FFPE 4- μ m tissue sections of TMAs and whole-tissue samples, with the following probes: the ZytoLight SPEC CD274, PDCD1LG2/CEP9 Dual Color Probe (ZytoVision, Bremerhaven, Germany) for CD274, RP11-154E21 and RP11-192B11 clones from the Human 32K BAC Re-Array Library (BACPAC Resource Center, Oakland, CA, USA) labelled with spectrum red and cohybridized with Vysis CEP9 spectrum aqua (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA) for JAK2, and the Vysis PTEN/CEP10 FISH Probe Kit (Abbott Molecular) for PTEN. The mean signal value of each gene (CD274, JAK2, and PTEN) and the mean of the respective centromere control probe signals, as well as the mean gene/mean centromere ratios, were calculated. For CD274 and JAK2 analysis, gene amplification was defined as a mean gene/mean centromere ratio of ≥ 2.0 , and for PTEN analysis, gene deletion was defined as a mean gene/mean centromere ratio of ≤ 0.8 . To precisely characterize gene CNAs in CD274 and JAK2 non-amplified, and PTEN non-deleted samples, we defined gene gains as mean gene ≥ 2.5 , and high gains as mean gene ≥ 4.0 .

PTEN PROTEIN LOSS DETERMINED BY IHC

Immunohistochemical analysis of PTEN was carried out on unstained FFPE 4- μ m tissue sections of TMAs and whole-tissue samples, with the primary anti-PTEN Dako monoclonal mouse clone 6H2.1 and the Dako Envision+ System-HRP (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The following scoring system was applied: 0, loss of expression; 1+, low homogeneous expression; and 2+, intense homogeneous expression. Adjacent normal tissue was used as an internal reference point for intensity scoring.

TILs EVALUATION

Histopathological assessment of TILs was performed qualitatively (intense/non-intense) on representative haematoxylin and eosin (H&E)-stained sections of the TMAs and the whole-tissue biopsies, according to

criteria published recently by Brambilla *et al.* TILs were evaluated within the tumour cell nests or in direct contact with the tumour cells (including the invasive borders).²⁶ Areas of *in-situ* carcinomas, necrosis and crush artefacts were not included.

STATISTICAL ANALYSIS

The whole series of cases was analysed in order to characterise clinicopathological associations. The average value between the two scoring pathologist was used for analysis, and the intraclass correlation coefficient (ICC) was calculated to show their interobserver concordance. Moreover, for TMA cases, the average value between the two cores was calculated. Statistical associations were assessed with Pearson's χ^2 test or Fisher's exact test, depending on the sample size, and the Kruskal–Wallis test. All statistical tests were conducted at the two-sided 0.05 alpha level of significance. The receiver operating characteristic (ROC) curve was drawn to compare IHC and FISH results. Correlation between PTEN loss of expression and PTEN deletions was performed by use of the kappa agreement index. All statistical analyses were carried out with SPSS STATISTICS (SPSS, Chicago, IL, USA).

Results

CLINICAL AND PATHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE STUDY POPULATION

Samples from 171 pulmonary carcinoma patients were analysed (Table 1). Most of the samples showed moderate or poor histological differentiation (grades 2–3). The predominant histological patterns in ADCs were acinar or solid with mucin production, whereas lepidic and micropapillary patterns were less common.

PD-L1 IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION IN TUMOUR CELLS

With the current Ventana antibody PD-L1 IHC cut-off ($\geq 1\%$ at any intensity), 40 of 171 cases were positive (23.3%), with an average semiquantitative IHC score of 177. There were no discordant PD-L1 IHC-positive cases between both evaluating pathologists, and the ICC was 0.969. According to histology, there were no significant differences in expression between ADCs (29/121, 24%; average IHC score, 142) and SCCs (11/50, 22%; average IHC score, 102). PD-L1 positivity showed significant associations with an ADC solid

Table 1. Clinical, histopathological and molecular characteristics of lung adenocarcinoma (ADC) and squamous-cell carcinoma (SCC) patients; statistical associations between the programmed death-ligand 1 (PD-L1) immunohistochemistry (IHC)-positive group ($n = 29$ ADCs and $n = 11$ SCCs) and the PD-L1 IHC-negative group

Feature	ADC ($n = 121$)	SCC ($n = 50$)	PD-L1-positive ($n = 40$)	<i>P</i> -value
Age (years), median (range)	65 (36–84)	68 (45–79)	67 (45–78)	0.903
Gender, n (%)				
Male	65 (54)	43 (86)	24 (60)	0.709
Female	56 (46)	7 (14)	16 (40)	
Smoking status, n (%)				
Non-smoker	22 (18)	1 (2)	2 (5)	0.031
Former smoker	39 (32)	23 (46)	11 (28)	
Current smoker	60 (50)	26 (52)	27 (67)	
Stage, n (%)				
Early stage (I–II)	73 (60)	43 (86)	23 (57)	0.099
Advanced stage (III–IV)	48 (40)	7 (14)	17 (43)	
ADC histological subtype ($n = 86$)* ($n = 18$), n (%)				
Acinar	42 (49)	NA	6 (33)	0.012
Solid	25 (29)	NA	10 (56)	
Papillary	10 (12)	NA	2 (11)	
Lepidic	9 (10)	NA	0	
TILs presence ($n = 116$) ($n = 50$) ($n = 36$), n (%)				
Non-intense	71 (61)	37 (74)	9 (25)	0.001
Intense	45 (49)	13 (26)	27 (75)	
ADC: <i>KRAS</i> ($n = 115$) ($n = 29$), n (%)				
Wild-type	81 (70)	NA	12 (41)	0.001
Mutated	34 (30)	NA	17 (59)	
ADC: <i>EGFR</i> ($n = 119$) ($n = 29$), n (%)				
Wild-type	96 (81)	NA	27 (93)	0.060
Mutated	23 (19)	NA	2 (7)	
ADC: <i>ALK</i> ($n = 88$) ($n = 18$), n (%)				
Non-rearranged	86 (98)	NA	17 (94)	0.184
Rearranged	2 (2)	NA	1 (6)	
SCC: <i>FGFR1</i> ($n = 42$) ($n = 11$), n (%)				
Non-amplified	NA	27 (64)	6 (55)	0.579
Amplified	NA	15 (36)	5 (45)	

EGFR, epidermal growth factor receptor; NA, not applicable; TILs, tumour-infiltrating lymphocytes.

*Numbers in parentheses represent the specific populations (first parentheses, the ADC population; second, the SCC population; and third, the PD-L1-positive population) with available histological and molecular information.

histological pattern ($P = 0.012$), ADC *KRAS* mutations ($P = 0.001$), the presence of TILs ($P = 0.001$), and active smoking status ($P = 0.031$) (Table 1).

CD274 (PDL1) CNAs DETERMINED BY FISH

FISH results were evaluable in 159 of 171 cases (92.9%), as 12 cases were non-assessable because of FISH assay failure (absence or inconclusive hybridisation probe signals). We found 14 tumours with *CD274* amplification (8.8%), with a mean of 6.7 gene copies (range 5–10) and a mean *CD274*/CEP9 ratio of 2.7 (range 2–4). Eleven of these 14 amplified tumours were ADCs (9%), and three were SCCs (6%). Moreover, 54 cases (34%) showed copy number gains

owing to chromosome 9 polysomy, with a mean *CD274*/CEP9 ratio of <2: 21 tumours (13%) had high gene gains, and 33 (20.8%) had gains (Figure 1). *CD274*-amplified tumours showed significant associations with ADC *KRAS* mutations ($P = 0.029$) and the presence of TILs ($P = 0.002$).

CORRELATION BETWEEN PD-L1 ASSESSMENT BY IHC AND FISH

CD274 amplification was associated with PD-L1 expression ($P = 0.0001$). Validation of FISH assessment according to the ROC curve revealed an area under the curve of 0.779. Taking PD-L1 IHC as the reference method, 12 of 40 positive cases also showed

Figure 1. Representative images of *CD274* (*PDL1*) copy number alterations detected by fluorescence *in-situ* hybridisation. Formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections were hybridised with the ZytoLight SPEC *CD274*, *PDCD1LG2*/CEP9 Dual Color Probe (ZytoVision). Amplification was considered to be present when the mean *CD274*/mean CEP9 ratio was ≥ 2.0 .

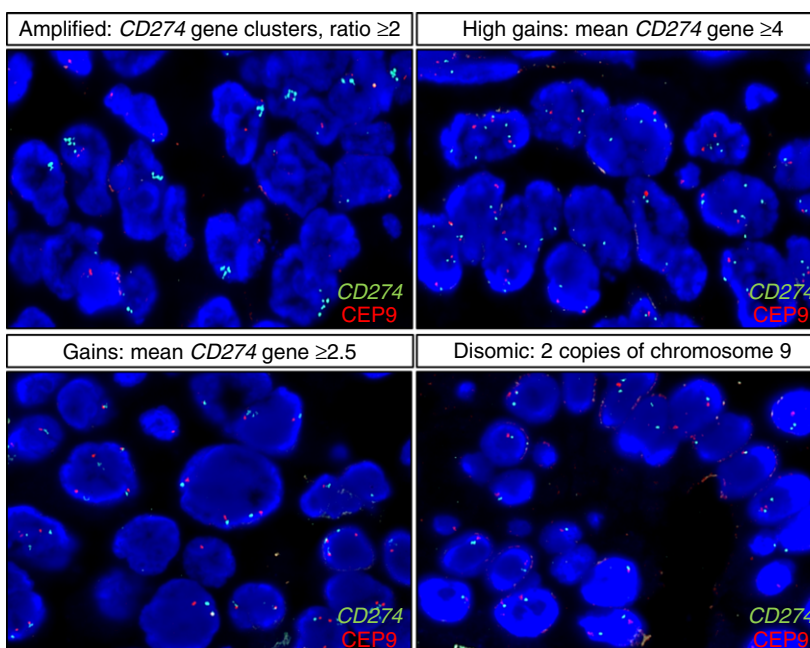


Table 2. Correlation between programmed death-ligand 1 (PD-L1) immunohistochemical expression and *CD274* (*PDL1*) copy number alterations as assessed by fluorescence *in-situ* hybridisation (FISH); almost 90% of *CD274*-amplified cases had PD-L1 expression, with a statistical association ($P = 0.0001$)

	<i>CD274</i> copy number alterations determined by FISH					Total
	<i>CD274</i> amplification (ratio ≥ 2.0), <i>n</i> (%)	<i>CD274</i> high gains (mean ≥ 4.0), <i>n</i> (%)	<i>CD274</i> gains (mean ≥ 2.5), <i>n</i> (%)	<i>CD274</i> disomic (mean < 2.5), <i>n</i> (%)	Non-assessable, <i>n</i> (%)	
IHC						
Positive PD-L1 expression ($\geq 1\%$)	12 (86)	7 (33)	9 (27)	9 (10)	3 (25)	40
Negative PD-L1 expression ($< 1\%$)	2 (14)	14 (67)	24 (73)	82 (90)	9 (75)	131
Total	14	21	33	91	12	171

IHC, immunohistochemistry.

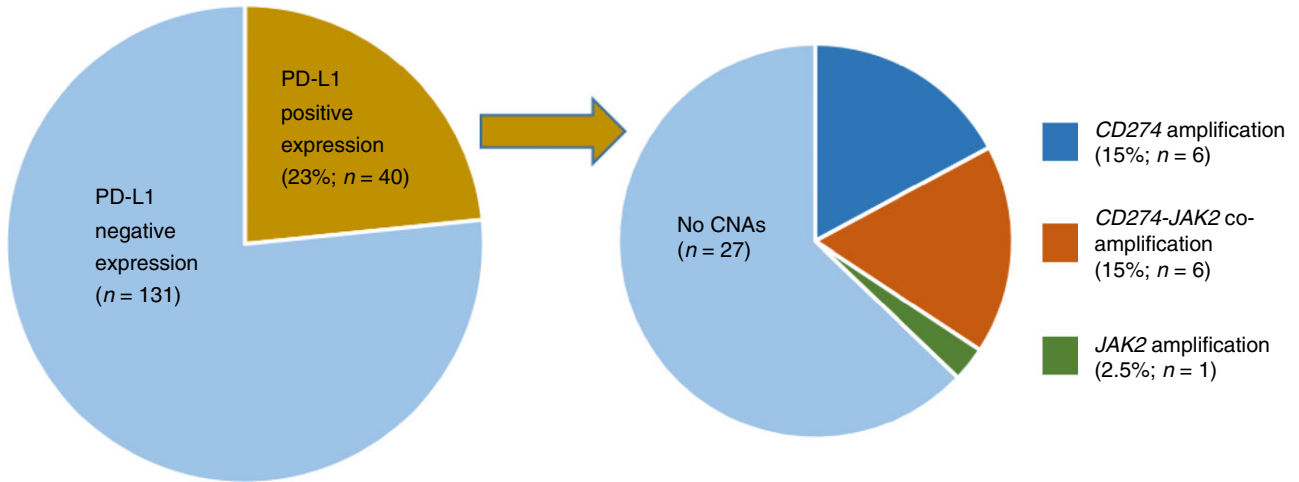


Figure 2. *CD274* (*PDL1*) and *JAK2* copy number alterations (CNAs) in the programmed death-ligand 1 (PD-L1) immunohistochemistry (IHC)-positive subset ($n = 40$). The first pie chart shows IHC results, and the second shows fluorescence *in-situ* hybridisation CNA results. Thirty per cent of PD-L1-positive cases ($n = 12$) were found to have *CD274* amplification (mean *CD274*/mean CEP9 ratio of ≥ 2.0).

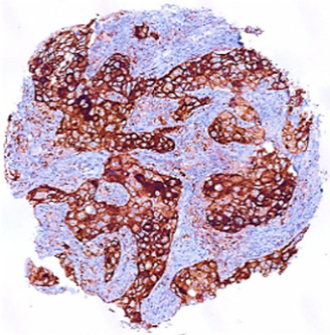
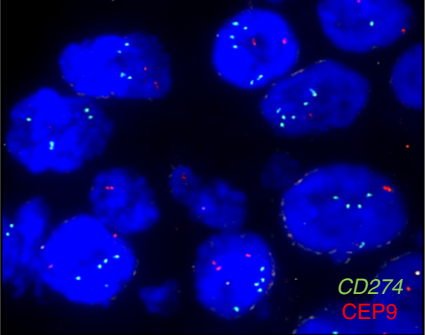
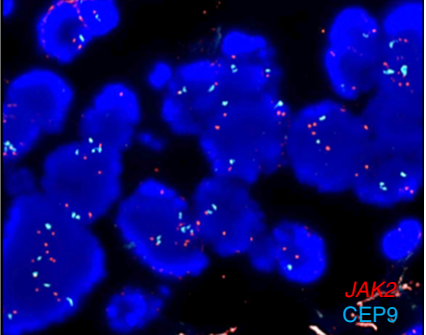
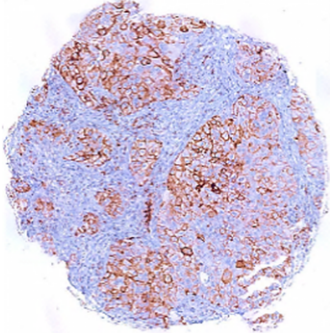
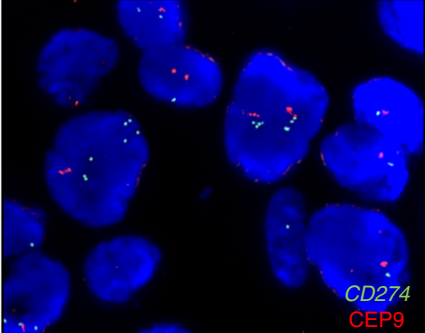
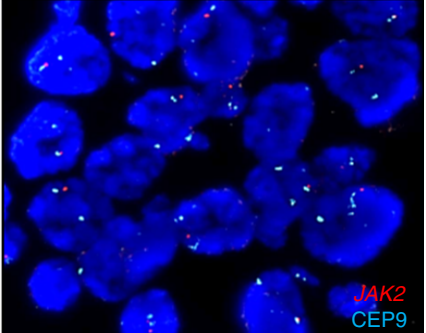
Case A: PD-L1 expression with <i>CD274</i> and <i>JAK2</i> gene co-amplification (PDJ amplicon)		
Positive PD-L1 IHC	<i>CD274</i> amplification	<i>JAK2</i> amplification
		
Case B: PD-L1 expression with <i>CD274</i> amplification alone		
Positive PD-L1 IHC	<i>CD274</i> amplification	<i>JAK2</i> disomic
		

Figure 3. Examples of programmed death-ligand 1 expression in cases harbouring *CD274* (*PDL1*) amplification. Case A showed selective amplification of 9p24.1, which contains *CD274* and *JAK2* (PDJ amplicon). Case B had only *CD274* amplification with disomic *JAK2*.

CD274 amplification, and 16 had *CD274* gains or high gains (Table 2). Regarding FISH analysis, 12 of 14 amplified cases had positive PD-L1 expression.

Thus, *CD274* amplification detected by FISH predicted a positive PD-L1 IHC result with a sensitivity of 31.6% and a specificity of 98.6%.

Table 3. Clinical features of *CD274* and *CD274-JAK2* amplified cases in PD-L1 positive subset of patients. Both groups had a higher PD-L1 IHC expression score than tumours without copy number alteration (CNAs) ($P = 0.001$)

Feature	PD-L1 IHC positive ($n = 39$)*		
	<i>CD274</i> amplified ($n = 6$)	<i>CD274-JAK2</i> co-amplified ($n = 6$)	No CNAs detected ($n = 27$)
PD-L1 IHC (mean IHC score)	213	240	98
Median Age: years (range)	61 (53–74)	64 (60–72)	67 (45–78)
Gender			
Male	4 (67)	4 (67)	16 (59)
Female	2 (33)	2 (33)	11 (41)
Smoking status			
Non smoker	0	0	2 (7)
Former smoker	3 (50)	0	7 (26)
Current smoker	3 (50)	6 (100)	18 (67)
Stage			
Early stage (I–II)	4 (67)	4 (67)	14 (52)
Advanced stage (III–IV)	2 (33)	2 (33)	13 (48)
Histology			
ADC	5 (83)	4 (67)	20 (74)
SCC	1 (17)	2 (33)	7 (26)
TILs presence			
Non-intense	0	1 (17)	8 (30)
Intense	6 (100)	5 (83)	15 (55)
Non-assessable	0	0	4 (15)
ADC: <i>KRAS</i>			
Wild-type	2 (33)	1 (17)	9 (33)
Mutated	3 (50)	3 (50)	11 (41)
Non-assessable	1 (17)	2 (33)	7 (26)

ADC, Adenocarcinoma; SCC, Squamous-cell carcinoma; TILs, Tumour-infiltrating lymphocytes.

*Positive PD-L1 IHC case with *JAK2* amplification but without *CD274* amplification is not shown in this table.

JAK2 CHARACTERIZATION ACCORDING TO PD-L1 EXPRESSION

We examined *JAK2* CNAs in all cases to determine the prevalence of amplifications in relation to PD-L1 expression. We found nine *JAK2*-amplified cases (9/159; 5.7%), seven with PD-L1 expression ($P = 0.0006$). Six of the seven cases had *JAK2* and *CD274* coamplification (9p24.1 amplification), and only one case showed *JAK2* amplification alone (2.5%) (Figures 2 and 3). Globally, 13 of 159 FISH-evaluable cases (8.2%) had gene amplifications resulting in high expression of PD-L1. In the clinical setting, no significant differences were observed between cases with *CD274* amplification alone and coamplified cases (Table 3). However, tumours with *CD274* and/or *JAK2* amplification had a three-fold increase in PD-L1 expression as compared with cases lacking amplifications of 9p24.1 (average IHC score: 230 versus 80; $P = 0.001$).

PTEN CHARACTERIZATION ACCORDING TO PD-L1 EXPRESSION

PTEN IHC results were evaluable in 158 of 171 cases (92.4%). Loss of PTEN expression was found in 50 cases (50/158; 31.6%), 16 of them with PD-L1 expression, without a statistical association ($P = 0.06$). We further analysed *PTEN* CNAs by FISH in the whole series, with 119 assessable samples (69.6%). We identified 20 *PTEN*-deleted cases, all with heterozygous deletion (20/119; 16.8%), and eight of them with PD-L1 expression ($P = 0.074$) (Table 4). There was no correlation between loss of PTEN expression and heterozygous *PTEN* deletion ($k = 0.289$) (Table 5). Examples of PTEN IHC scoring and CNA FISH patterns in PD-L1-positive cases are shown in Figure 4.

Discussion

We report associations between PD-L1 expression and *CD274* (*PDL1*) and *JAK2* amplifications in pulmonary SCC and ADC patients. We describe a subset of patients (8.2%) who had 9p24.1 amplifications resulting in high expression of PD-L1. Our results provide evidence for genomic up-regulation of PD-L1 expression in NSCLC.

Patient's clinical characteristics and tumour biology are known to affect the PD-1/PD-L1 immune checkpoint. Parsa *et al.* reported that PD-L1 expression is up-regulated by key oncogenic pathways, such as the PI3K–AKT and RAS–RAF–mitogen-activated protein kinase pathways.²⁷ We found that PD-L1

Table 4. PTEN expression and gene copy number alterations (CNAs) according to programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression; no statistical associations were observed between PD-L1 expression and PTEN loss ($P = 0.06$) and *PTEN* deletions ($P = 0.074$)

	PTEN expression determined by IHC, <i>n</i> (%)				<i>PTEN</i> CNAs determined by FISH, <i>n</i> (%)			
	Intense PTEN expression	Low PTEN expression	PTEN loss of expression	Non-assessable	<i>PTEN</i> gains	Disomic <i>PTEN</i>	<i>PTEN</i> deletions	Non-assessable
PD-L1-positive (<i>n</i> = 40)	13 (33)	7 (17)	16 (40)	4 (10)	15 (38)	6 (15)	8 (20)	11 (27)
PD-L1-negative (<i>n</i> = 131)	76 (58)	12 (9)	34 (26)	9 (7)	53 (41)	25 (19)	12 (9)	41 (31)

Table 5. Correlation between PTEN immunohistochemical expression and *PTEN* copy number alterations assessed by fluorescence *in-situ* hybridisation (FISH); only 45% of cases with *PTEN* deletions had loss of protein expression ($k = 0.289$)

IHC	<i>PTEN</i> gene copy number alterations determined by FISH, <i>n</i> (%)				Total
	<i>PTEN</i> gains (mean ≥ 2.5)	Disomic <i>PTEN</i> (mean < 2.5)	<i>PTEN</i> deletions (ratio ≤ 0.8)	Non-assessable	
Intense PTEN expression	55 (81)	20 (65)	7 (35)	7 (14)	89
Low PTEN expression	5 (7)	2 (6)	3 (15)	9 (17)	19
PTEN loss of expression	8 (12)	7 (23)	9 (45)	26 (50)	50
Non-assessable	0	2 (6)	1 (5)	10 (19)	13
Total	68	31	20	52	171

IHC, immunohistochemistry.

expression was significantly more prevalent in *KRAS*-mutated ADCs, as previously described.^{28,29} We also found increased PD-L1 expression in current and former smokers, as smoking-associated lung cancers have been described as having a higher mutational load, resulting in the generation of more tumour neoantigens and increasing immunogenicity.^{30,31} Finally, we found that stromal TIL infiltration was also significantly associated with PD-L1 expression, in agreement with previous reports.^{32,33}

Previous studies investigating *CD274* CNAs have found that there is a subgroup of patients with primary NSCLC who harbour gene amplifications. First, Ikeda *et al.* found five of 94 (5.3%) surgically resected NSCLCs (pooling together both SCCs and ADCs) with *CD274* amplification, by using real-time polymerase chain reaction as a screening method. They did not find any correlation between PD-L1 expression level and gene amplification, although the *in-vitro* assays suggested that the induction of PD-L1 expression by inflammatory cytokines was more efficient in cancer cells harbouring *CD274* amplifications.²² Later, Goldmann *et al.* analysed *CD274* CNAs by FISH, and found 11 of 221 cases (4.9%) with amplification, all

of them with positive PD-L1 immunohistochemical expression.³⁴ The FISH criterion for amplified cases (named 'copy number gains' in their publication) was the same as we have presented here (mean *CD274*/*CEP9* ratio of ≥ 2.0). Recently, Inoue *et al.* reported a larger series (*n* = 654) of surgically treated NSCLC (SCC and ADC) patients in whom *CD274* and *PDCD1LG2* (*PDL2*) were analysed by FISH. They found 20 of 654 cases (3.1%) with *CD274* amplification, and 84 (13.2%) with chromosome 9 polysomy, reporting that the increase in *CD274* copy number was associated with PD-L1 expression.²³ The definition of gene amplification in this publication was also in accordance with ours. Although we used the same method and criterion as Inoue *et al.*, our higher prevalence rates of *CD274* amplification (8.8% versus 3.1%) and polysomy/gains (34% versus 13.2%) may be attributable to differences in ethnic and molecular characteristics between the patient cohorts.

Analysis of *JAK2* amplifications revealed that patients with 9p24.1 amplification (involving both *CD274* and *JAK2*) had almost three-fold increased PD-L1 expression as compared with patients with PD-L1 expression without amplification. These results

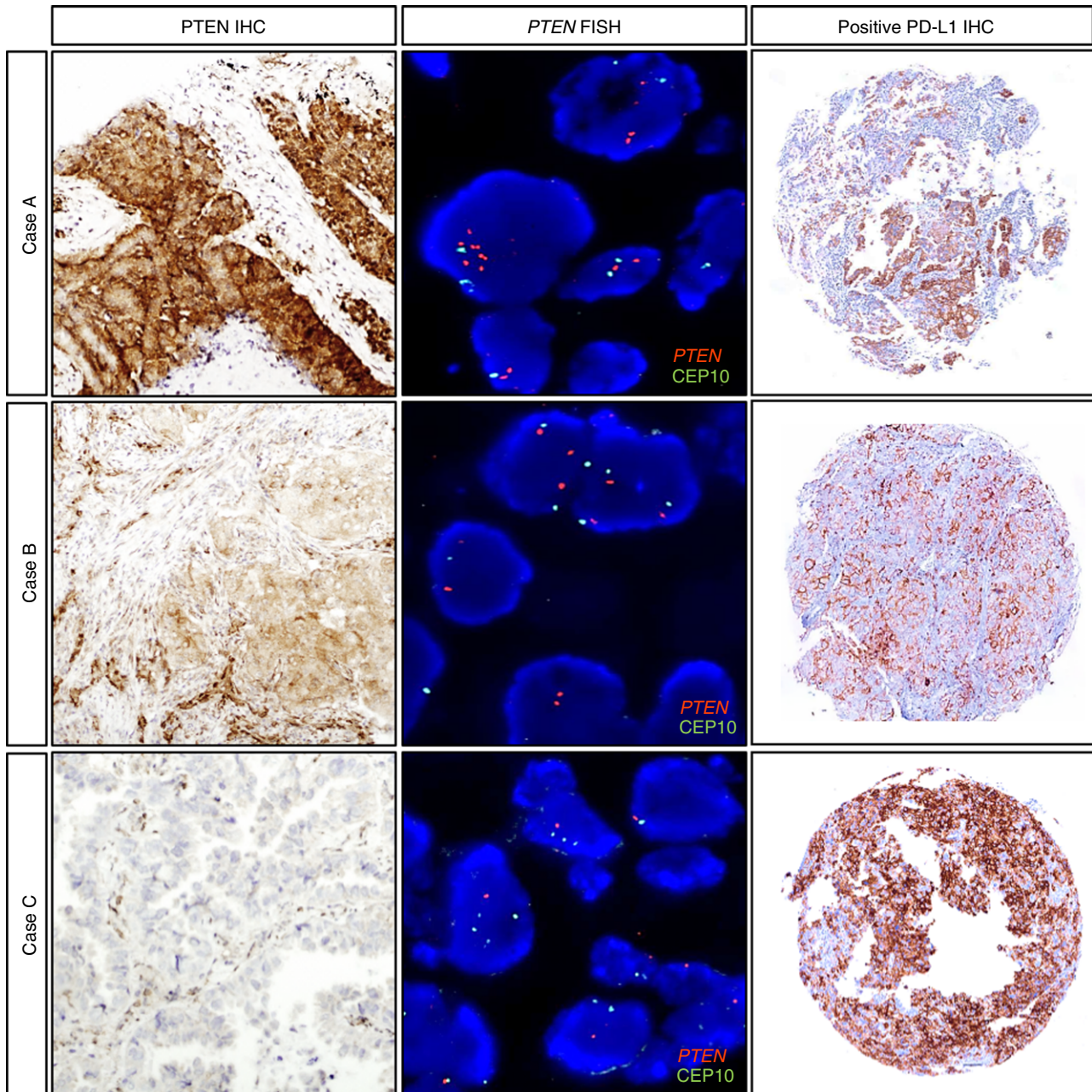


Figure 4. Examples of PTEN expression by immunohistochemistry and its correlation with gene copy number alterations determined by fluorescence *in-situ* hybridisation in programmed death-ligand 1-positive lung carcinomas. Case A: adenocarcinoma (ADC) with intense PTEN expression and gene gains (three to six *PTEN* copies per nucleus). Case B: ADC with a solid pattern showing low PTEN expression and gene gains (chromosome 10 trisomy). Case C: ADC without PTEN expression in correlation with FISH result in which heterozygous *PTEN* gene deletion was detected (one *PTEN* copy per nucleus).

might suggest that enhancement of JAK–STAT signalling through *JAK2* amplification, in addition to amplification of *CD274* itself, further increases PD-L1 expression.^{21,22} As there are different patterns of 9q24.1 amplification, involving or not involving *CD274* and *JAK2*, resulting in different PD-L1

expression levels, copy number gene analysis might complement PD-L1 IHC studies. Even so, three cases in our PD-L1-negative cohort had 9p24.1 amplification (*CD274* and/or *JAK2*). This discrepancy may be attributable to PD-L1 up-regulation mechanisms being multifactorial and not mutually exclusive.³⁵

The heterogeneity of PD-L1 expression within the tumours may also have contributed to the discrepancy.³⁶

Loss of PTEN expression is a frequent event in NSCLC, although genetic alterations in *PTEN* are rare in this setting.³⁷ None of the cases with loss of PTEN expression in our series showed consequent homozygous deletion, which suggests that PTEN inactivation may be explained by other genetic or epigenetic changes. Moreover, we could not find any correlation between the expression levels of PD-L1 and PTEN in our cohort, in accordance with recent analyses of PTEN–PI3K pathways in malignant pleural mesothelioma.³⁸

In summary, *CD274* (*PDL1*) CNAs are present in SCC and ADC western populations, and gene amplification is associated with PD-L1 expression. Moreover, *JAK2* is frequently coamplified with *CD274*, and this defines a subset of patients who had 9p24.1 amplifications resulting in higher expression of PD-L1. These CNAs could give us information about tumour biology in PD-L1 positive patients. Further clinical studies in *CD274* amplified patients treated with immunotherapy might be considered.

Conflicts of interest

All authors declare no conflict of interest.

Author contributions

S. Clavé, L. Pijuan, M. Salido and E. Arriola designed and performed the research study, analysed the data, and wrote the paper. D. Casadevall, B. Espinet, J. Gimeno, A. Taus and J. Albanell performed the research study, collected patient data, and contributed essential reagents and laboratory equipment. M. Rodríguez-Rivera, S. Menéndez, S. Hernández-Llodrà and M. Lorenzo performed research experiments and analysed supplementary data.

Acknowledgements

We thank Carme Melero from Servei de Patologia at Hospital del Mar Barcelona for her technical support with non-commercial probe preparation for FISH and TMA construction. This work received funding from: Fundació La Marató de TV3 (666/C/2013), Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (2014-SGR-740), Instituto de Salud Carlos III/FEDER (PI13/00140, PT13/0010/0005, CB16/12/00241, and

PI16/00591), and Xarxa de Bancs de Tumors by Pla Director d'Oncologia de Catalunya.

References

1. Topalian SL, Weiner GJ, Pardoll DM. Cancer immunotherapy comes of age. *J. Clin. Oncol.* 2011; **29**: 4828–4836.
2. Drake CG, Jaffee E, Pardoll DM. Mechanisms of immune evasion by tumors. *Adv. Immunol.* 2006; **90**: 51–81.
3. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 2011; **480**: 480–489.
4. Intlekofer AM, Thompson CB. At the bench: preclinical rationale for CTLA-4 and PD-1 blockade as cancer immunotherapy. *J. Leukoc. Biol.* 2013; **94**: 25–39.
5. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P *et al.* Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 2015; **373**: 123–135.
6. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L *et al.* Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 2015; **373**: 1627–1639.
7. Garon EB, Rizvi NA, Hui R *et al.* Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 2015; **372**: 2018–2028.
8. Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M *et al.* Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet* 2016; **387**: 1837–1846.
9. Patel SP, Kurzrock R. PD-L1 expression as a predictive biomarker in cancer immunotherapy. *Mol. Cancer Ther.* 2015; **14**: 847–856.
10. Kerr KM, Tsao MS, Nicholson AG, Yatabe Y, Wistuba II, Hirsch FR. Programmed death-ligand 1 immunohistochemistry in lung cancer: in what state is this art? *J. Thorac. Oncol.* 2015; **10**: 985–989.
11. Robert C, Long GV, Brady B *et al.* Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N. Engl. J. Med.* 2015; **372**: 320–330.
12. Robert C, Schachter J, Long GV *et al.* Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2015; **372**: 2521–2532.
13. Dong H, Strome SE, Salomao DR *et al.* Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.* 2002; **8**: 793–800.
14. Gowrishankar K, Gunatilake D, Gallagher SJ, Tiffen J, Rizos H, Hersey P. Inducible but not constitutive expression of PD-L1 in human melanoma cells is dependent on activation of NF- κ B. *PLoS ONE* 2015; **10**: e0123410.
15. Dong ZY, Wu SP, Liao RQ, Huang SM, Wu YL. Potential biomarker for checkpoint blockade immunotherapy and treatment strategy. *Tumour Biol.* 2016; **37**: 4251–4261.
16. Koh J, Go H, Keam B *et al.* Clinicopathologic analysis of programmed cell death-1 and programmed cell death-ligand 1 and 2 expressions in pulmonary adenocarcinoma: comparison with histology and driver oncogenic alteration status. *Mod. Pathol.* 2015; **28**: 1154–1166.
17. Chen N, Fang W, Zhan J *et al.* Upregulation of PD-L1 by EGFR activation mediates the immune escape in EGFR-driven NSCLC: implication for optional immune targeted therapy for NSCLC patients with EGFR mutation. *J. Thorac. Oncol.* 2015; **10**: 910–923.
18. Koh J, Jang JY, Keam B *et al.* EML4–ALK enhances programmed cell death-ligand 1 expression in pulmonary

- adenocarcinoma via hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and STAT3. *Oncoimmunology* 2016; **5**: e1108514.
19. Peng W, Chen JQ, Liu C *et al.* Loss of PTEN promotes resistance to T cell-mediated immunotherapy. *Cancer Discov.* 2016; **6**: 202–216.
 20. Xu C, Fillmore CM, Koyama S *et al.* Loss of Lkb1 and Pten leads to lung squamous cell carcinoma with elevated PD-L1 expression. *Cancer Cell* 2014; **25**: 590–604.
 21. Green MR, Monti S, Rodig SJ *et al.* Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* 2010; **116**: 3268–3277.
 22. Ikeda S, Okamoto T, Okano S *et al.* PD-L1 is upregulated by simultaneous amplification of the PD-L1 and JAK2 genes in non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* 2016; **11**: 62–71.
 23. Inoue Y, Yoshimura K, Mori K *et al.* Clinical significance of PDL1 and PDL2 copy number gains in non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 2016; **7**: 32113–32128.
 24. Casadevall D, Gimeno J, Clave S *et al.* MET expression and copy number heterogeneity in nonsquamous non-small cell lung cancer (nsNSCLC). *Oncotarget* 2015; **6**: 16215–16226.
 25. D'Incecco A, Andreozzi M, Ludovini V *et al.* PD-1 and PD-L1 expression in molecularly selected non-small-cell lung cancer patients. *Br. J. Cancer* 2015; **112**: 95–102.
 26. Brambilla E, Le Teuff G, Marguet S *et al.* Prognostic effect of tumor lymphocytic infiltration in resectable non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 2016; **34**: 1223–1230.
 27. Parsa AT, Waldron JS, Panner A *et al.* Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat. Med.* 2007; **13**: 84–88.
 28. Song Z, Yu X, Cheng G, Zhang Y. Programmed death-ligand 1 expression associated with molecular characteristics in surgically resected lung adenocarcinoma. *J. Transl. Med.* 2016; **14**: 188.
 29. Davar D, Socinski MA, Dacic S, Burns TF. Near complete response after single dose of nivolumab in patient with advanced heavily pre-treated KRAS mutant pulmonary adenocarcinoma. *Experimental Hematology & Oncology* 2015; **4**: 34.
 30. Chen DS, Irving BA, Hodi FS. Molecular pathways: next-generation immunotherapy—inhibiting programmed death-ligand 1 and programmed death-1. *Clin. Cancer Res.* 2012; **18**: 6580–6587.
 31. Soo RA. Shedding light on the molecular determinants of response to anti-PD-1 therapy. *Translational Lung Cancer Research* 2015; **4**: 816–819.
 32. Parra ER, Behrens C, Rodriguez-Canales J *et al.* Image analysis-based assessment of PD-L1 and tumor-associated immune cells density supports distinct intratumoral microenvironment groups in non-small cell lung carcinoma patients. *Clin. Cancer Res.* 2016; **22**: 6278–6289.
 33. McLaughlin J, Han G, Schalper KA *et al.* Quantitative assessment of the heterogeneity of PD-L1 expression in non-small-cell lung cancer. *JAMA Oncology* 2016; **2**: 46–54.
 34. Goldmann T, Kugler C, Reinmuth N, Vollmer E, Reck M. PD-L1 copy number gain in nonsmall-cell lung cancer defines a new subset of patients for anti PD-L1 therapy. *Ann. Oncol.* 2016; **27**: 206–207.
 35. Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 2016; **16**: 275–287.
 36. Casadevall D, Clavé S, Taus Á *et al.* Heterogeneity of tumor and immune cell PD-L1 expression and lymphocyte counts in surgical NSCLC samples. *Clin. Lung Cancer* 2017; pii: S1525-S7304: 30134-1.
 37. Soria JC, Lee HY, Lee JI *et al.* Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation. *Clin. Cancer Res.* 2002; **8**: 1178–1184.
 38. Cedrés S, Ponce-Aix S, Pardo-Aranda N *et al.* Analysis of expression of PTEN/PI3K pathway and programmed cell death ligand 1 (PD-L1) in malignant pleural mesothelioma (MPM). *Lung Cancer* 2016; **96**: 1–6.

