



Akciğer Kanserinde Moleküler Patoloji

Molecular Pathology of Lung Cancer

Emine Bozkurtlar, Handan Kaya

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Öz

Kansere bağlı ölümlerin en sık nedeni akciğer kanseridir. Adenokarsinomlar en sık görülen akciğer kanseri tipidir. Adenokanserlerde mutasyon, gen değişiklikleri, amplifikasyonlar gibi somatik gen değişiklikleri gösterilmiştir. Günümüzde kabul gören kılavuzlarda ileri evre akciğerin küçük hücreli dışı karsinomalarında moleküler testlerin yapılması önerilmektedir. İleri evre akciğer adenokarsinomu hastalarının hepsinde EGFR mutasyonu, ALK ve ROS1 rearranmanlarının test edilmesi önerilmektedir. Zira, EGFR, ALK ve ROS1 mutasyonu ve rearranmanları hedefe yönelik tedavilere yanıtı belirlemektir. Tüm bu moleküler belirteçlere ek olarak, BRAF, ERBB2 mutasyonu ve amplifikasyonu, MET mutasyonu ve amplifikasyonu ve RET rearranmanı gibi hali hazırda hedefe yönelik tedavi uygulamaları ve kazanılmış ilaç direnci konusunda klinik araştırma aşamasında olan moleküler değişiklikler de vardır. PD-1/PD-L1 yolunu hedef alan immünoterapötiklerin akciğerin küçük hücreli dışı kanserinin tedavisinde yer bulması son birkaç yılın en popüler onkolojik gelişmelerindedir. Tümör hücreleri yanı sıra tümörü infiltrate eden immün hücrelerde PD-L1 immünespresyonunun saptanması ile immünoterapi için en uygun hastalar belirlenebilmektedir. Sıvı biyopsi akciğer kanseri hastalarında çoğunlukla periferik kandan alınan örnek olup dolaşan tümör hücreleri ve dolaşan tümör DNA'sı hastalarda tanısal süreçlerde veya moleküler testlerde kullanılabilir. **Anahtar Kelimeler:** Akciğer, kanser, moleküler patoloji

Abstract

Lung cancer is the most common reason of cancer deaths. Many of lung cancer cases are diagnosed at advanced stage. Lung adenocarcinomas are the most frequent type of lung cancer. Somatic genetic alterations, including mutations, rearrangements, amplifications, which are necessary for oncogenesis, are especially frequent in lung adenocarcinoma. According to current practice guidelines, all patients with advanced non-small cell lung cancer should undergo molecular testing. For lung adenocarcinoma, all patients with advanced disease should undergo testing for EGFR mutations, ALK and ROS1 rearrangements, to predict response to EGFR, ALK, or ROS1 targeted inhibitors. In addition to these, some other molecular alterations are under investigation as predictors of response to targeted therapies or predictors of acquired drug resistance including BRAF, ERBB2 mutations or amplification, MET mutations and amplification, and RET gene rearrangements. Immune checkpoint inhibitors of PD-1/PD-L1 pathway having a role in the therapy of pulmonary non-small cell carcinoma are one of the most popular oncological developments in last years. By detecting PD-L1 expression of tumor cells/tumor infiltrating immune cells, the most suitable patients for immunotherapy can be defined. Liquid biopsy is a sample usually taken from peripheral blood of patients with lung cancer. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA obtained from liquid biopsy can be used for patients in diagnostic procedures and molecular tests. **Keywords:** Lung, cancer, molecular pathology

Giriş

Dünya genelinde akciğer kanseri kanser nedenli ölümlerin en sık sebebidir (1). Bu nedenle üzerinde en çok çalışılan kanser tiplerinden biri olan akciğer kanserinde son yıllarda hem patogenezini anlama hem

de tedavi yaklaşımlarını belirlemede büyük gelişmeler yaşanmıştır. Pek çok moleküler değişiklik "driver" mutasyonlar/moleküler değişiklik olarak tanımlanmıştır. "Driver" mutasyonlar/moleküler değişiklikler kanserin başlangıcından ve gelişiminden sorumludur. Özellikle hedefe yönelik tedavi sürecinde son derece etkili

Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Dr. Emine Bozkurtlar, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

E-posta: eminebash@gmail.com ORCID ID: orcid.org/0000-0002-1034-9236

©Telif Hakkı 2018 Türkiye Nükleer Tıp Derneği / Nükleer Tıp Seminerleri, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.

farmakolojik formları da bulunan epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), “anaplastik lenfoma kinaz” (ALK) ve “proto-onkogen tirozin-protein kinaz 1 ROS” (ROS1) gibi moleküler değişiklikler, akciğer kanseri tedavisinde yeni bir devir açmıştır.

Akciğer kanserinde immünoterapi çoğunlukla PD-1/PD-L1 yolağının blokajıyla küçük hücreli dışı akciğer kanserinin tedavisini hedeflemektedir. Tümör hücrelerinde/tümörü infiltre eden immün hücrelerde PD-L1 immünespresyonunun saptanması ile immünoterapi için en uygun hastalar belirlenebilmektedir.

Sıvı biyopsi tüm vücut sıvılarından alınan örnekleri kapsamakla birlikte, günümüzde akciğer kanseri hastalarında çoğunlukla periferal kandan alınmaktadır. Sıvı biyopsiden elde edilen dolaşan tümör hücreleri ve dolaşan tümör DNA’sı hastalarda tanısal süreçlerde veya moleküler incelemelerde kullanılabilir.

EGFR Mutasyonu

EGFR geni kromozom 7p12-13’e lokalize ve hücre membran reseptörleri tirozin kinaz ailesindedir. *EGFR* mutasyonu; bu gen üzerinde aktive edici bir mutasyon olup, gefitinib-erlotinib gibi tirozin kinaz inhibitörlerinin hedef alanıdır (2,3,4). *EGFR* mutasyonu akciğer adenokarsinomlarının yaklaşık %20’sinde tespit edilir (3). Sekanslama veya polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemleriyle tespit edilir. Mutasyonlar genellikle *EGFR* geni üzerinde 18-21. ekzonları arasında saptanmaktadır. En sık izlenen mutasyonlar ekzon 19 ve ekzon 21 üzerinde yer almaktadır (2,4). Ekzon 20 üzerinde saptanan mutasyonlar genellikle tedaviye dirençli değişikliklerdir (5). Bu durumun istisnası ekzon 20 üzerinde pozisyon 768 ve öncesindeki insersiyonlardır (6,7). *EGFR* tirozin kinaz inhibitörleriyle tedavi olan hastaların çok büyük bir kısmında tedavinin bir noktasında ilaca karşı gelişen direnç nedeniyle relaps görülür. Bu direncin büyük kısmı diğer *EGFR* mutasyonlarına ikincil olarak tedavi sürecinde gelişen bir mutasyon olan T790M’den kaynaklanır ve geliştiği noktadan itibaren tedaviye dirençten sorumludur (8). Relaps anında alınan yeni biyopsilerle T790M mutasyonu saptanabilir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bu mutasyon sebebiyle nüks eden hastalarda yeni geliştirilen ilaç formlarıyla yüz güldürücü sonuçlar alındığı ortaya konmuştur (9,10). T790M mutasyonu daha önce tedavi almamış hastalarda tespit edildiği takdirde “germline” mutasyon olarak bulunuyor olabilir, bu durumda herediter kanser sendromuna işaret edebilir, bu hastalarda genetik danışmalık önerilmelidir (11).

ALK Rearranjmanı

ALK genini içeren bir dizi kromozomal değişikliklerdir. Akciğer adenokarsinomlarının yaklaşık %5’inde görülür ve en sık kromozomal bir insersiyon olan EML4-*ALK* füzyon rearranjmanı şeklinde saptanır (12). *ALK* rearranjmanı saptanan hastalar krizotinib gibi tirozin kinaz inhibitörlerine yanıt verirler (13). *ALK* rearranjmanı saptanan hastaların çoğu genç ve sigara kullanmayan ya da hafif sigara içicileridir. Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) yöntemiyle break-apart probolar kullanılarak *ALK* rearranjmanının saptanması günümüzde “altın standart” yöntem olarak gösterilmektedir. *ALK* rearranjmanı FISH yöntemi 5’ ve 3’ uçlarının ilgili gen bölgelerinin floresan işaretleyicilerle işaretlenmesi ve ardından karanlık ortamda immünfloresan mikroskop altında 5’ ve 3’ uçlarının ayrılması veya 5’ ucunun kaybı şeklinde değişikliğin saptanması esasına dayanır. *ALK* rearranjmanının %15 ve üstünde izlenmesi değerlendirmenin pozitif olduğu yani *ALK* rearranjmanının saptandığı anlamına gelir. *ALK* rearranjmanını saptamanın bir diğer yöntemi immünhistokimya’dır. İmmünhistokimyasal olarak *ALK* protein ekspresyonunun artışı gösteren 5A4 veya D5F3 gibi klonlarla oldukça sensitif ve spesifik olarak *ALK* rearranjmanının tespit edilebildiği ortaya konmuştur (14). *ALK* rearranjmanı saptanan hastalarda uygulanan krizotinibe ilk bir yıl içinde çoğunlukla direnç gelişir (15,16). Krizotinibe direnç durumunda ya da krizotinibi tolere edemeyen hastalarda “ceritinib”, “alectinib” veya “brigatinib” gibi daha etkili tirozin kinaz inhibitörleri ile tedaviye devam edilmesi önerilmektedir (17,18).

ROS1 Rearranjmanı

Aynı *ALK* gibi *ROS1* genini içeren bir dizi kromozomal değişikliklerdir. *ROS1* insülin reseptör ailesinden bir tirozin kinaz reseptörüdür. Akciğer adenokarsinomlarının yaklaşık %1-2’sinde görülür ve yine aynı *ALK* gibi *ROS1* rearranjmanı saptanan hastalar bir tirozin kinaz inhibitörü olan krizotinibe yanıt verir (12,19). *ROS1* rearranjmanı gösterebilmek için FISH, PCR, yeni nesil sekanslama gibi pek çok yöntem kullanılabilir (20,21). *ROS1*’de uygulanan FISH yöntemi *ALK* rearranjmanı için uygulanan yöntemle aynı olup, pozitiflik sınır değeri de %15 ve üstü olarak belirlenmiştir. Günümüzde *ROS1* rearranjmanını ortaya koyabilmek için henüz “altın standart” bir yöntem kılavuzlarda yer almamaktadır. İmmünhistokimyasal olarak D4D6 klonuyla yapılan çalışmalarda spesifitenin düşük olması nedeniyle, immünhistokimya yöntemiyle saptanan *ROS1* protein ekspresyonu artışının başka bir yöntemle doğrulanması gerekliliği ortaya konmuştur

(22,23). ROS1 rearranjanmanı *EGFR*, *KRAS* ve *BRAF* diğer onkojenik değişikliklerle bir arada görülebilir (24). ROS1 rearranjanmanı gösteren hasta grubunda da krizotinibe direnç gelişebilir (25,26). Gelişen direncin altında yatan tüm mekanizmalar henüz ortaya konamamış olsa da, kazanılmış ikincil ROS1 mutasyonlarının bir kısım krizotinib direncinden sorumlu olduğu gösterilmiştir (26). Bu hastaların “cabozantinib” gibi birden çok hedefi bulunan tirozin kinaz inhibitörlerine cevap verebildiği saptanmıştır (27).

RET Rearranjanmanı

ALK ve *ROS1* gibi *RET* genini içeren bir dizi kromozomal değişikliklerdir. Akciğer adenokarsinomlarının yaklaşık %1-2'sinde görülür ve yine sıklıkla sigara kullanmamış hastalarda saptanır (28,29,30). *RET* gen değişiklikleri FISH yöntemiyle saptanabilir, ayrıca sekanslama veya PCR yöntemlerinin daha faydalı olacağı düşünülmektedir (31). İmmünohistokimyasal yöntemlerin henüz *RET* rearranjanmanı tespitinde net bir yeri yoktur. *RET* gen değişikliklerinin en sık rastlanan formunun KIF5B-*RET* füzyonu olduğu gösterilmiştir (30,32). Günümüze kadar yapılmış klinik çalışmalar, birden çok hedefli kinaz inhibitörlerine *RET* rearranjanmanı izlenen hastalarda sınırlı yanıt alındığı ve bu konuda yeni hedefe yönelik etki gösteren ilaçların geliştirilmesi gerekliliğini göstermiştir (30).

KRAS Mutasyonu

Kirsten sıçan sarkomaviral onkogen (*KRAS*) mutasyonu akciğer adenokarsinomlarında izlenen en sık (%20-30) onkojenik değişikliklerden biridir (33). *KRAS* mutasyonu PCR veya sekanslama yöntemleriyle tespit edilebilir. *KRAS* mutasyonu genellikle sigara kullananlarda saptanır ve *KRAS* mutasyonuna sahip tümörler çoğu zaman *EGFR* ve *ALK* gibi diğer onkojenik değişiklikleri içermezler (34,35,36). Ancak son yıllarda tüm bu onkojenik değişiklikleri bir arada gösteren hastaların varlığı ortaya çıkmaya başlamıştır. Bu tür hastalarda hangi onkojenik değişikliğin “driver” onkojenik değişiklik olduğunu ortaya koymak çoğunlukla hastanın hedefe yönelik tedaviye yanıtı ile gösterilebilmektedir (37). *KRAS* mutasyonu için henüz geliştirilmiş bir hedefe yönelik tedavi ajanı bulunmamaktadır.

BRAF Mutasyonu

Akciğer adenokarsinomlarının yaklaşık %5'inde saptanır, bu mutasyon grubunun yaklaşık %50'sini V600E mutasyonu oluşturur (38). v-Raf murin sarkomu

viral onkogen homologu B (*BRAF*) mutasyonu PCR veya sekanslama yöntemleriyle tespit edilebilir. Akciğer tümörlerinde immünohistokimyasal yöntemle *BRAF* mutasyonunu göstermek henüz yeterli sensitiviteye ve spesifiteye sahip olmadığı için önerilmemektedir. *BRAF* mutasyonu saptanan hastalarda hedefe yönelik bir ajan olan “dabrafenibin” MEK inhibitörleriyle beraber kullanımında yüz güldürücü sonuçların alındığı klinik ilaç çalışmaları yayınlanmıştır (39).

MET Mutasyonu ve Amplifikasyonu

Mezenkimal epitelyal geçiş geni (*MET*) amplifikasyonu FISH ve yeni nesil sekanslama yöntemleriyle gösterilebilirken, *MET* mutasyonu sekanslama ve PCR yöntemleriyle gösterilebilir. *MET* mutasyonu sıklıkla DNA bazlı sekanslama yöntemiyle tespit edilir ve mutasyonlar çoğunlukla ekzon 14 çevresinde yerleşirler. Ekzon 14 delesyonu ise RNA bazlı ters transkriptaz PCR yöntemiyle tespit edilebilir. Ekzon 14 bölgesinde kayıba sahip hastalarda *MET* inhibitörlerine yanıt alındığını gösteren çalışmalar ortaya konmuştur (40,41). *EGFR* inhibitörlerine direnç mekanizmalarından biri de kazanılmış *MET* amplifikasyonudur (42). *De novo* *MET* amplifikasyonuna sahip hastada ise artmış krizotinib yanıtı olabileceği gösterilmiştir (43). *MET* amplifikasyonu-Met mutasyonu birbirini dışlayan onkojenik değişiklikler değildir, *MET* amplifikasyonu olan hastalarda eş zamanlı *MET* mutasyonu olan ekzon 14 kaybı da izlenebilmektedir.

ERBB2 (HER2) Mutasyonu ve Amplifikasyonu

“İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2” (*ERBB2*) bir tirozin kinaz reseptörüdür. On yedinci kromozom üzerinde yerleşmiştir. *ERBB2* amplifikasyonu FISH ve gümüş bazlı *in situ* hibridizasyon (*SISH*) yöntemleriyle *ERBB2/CEP 17* oranı değerlendirilerek saptanırken, *ERBB2* mutasyonu PCR ve sekanslama yöntemleriyle tespit edilir. Akciğer adenokarsinomlarında *ERBB2* amplifikasyonu yaklaşık %10-20 oranında bulunurken, *ERBB2* mutasyonları yaklaşık %2-4 oranında saptanmaktadır (44,45). *ERBB2* aşırı ekspresyonu veya gen amplifikasyonu saptanan tümörlerde *EGFR* ve *KRAS* mutasyonları gibi diğer “driver” onkojenik değişiklikler de izlenebilir (46). Bu durum *ERBB2* değişikliklerinin “driver” onkojenik değişikliklerden çok, kanser progresyonu ve kazanılmış ilaç dirençleri ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (47,48).

İmmünoterapi (PD1/PD-L1)

PD1/PD-L1 (programmed cell death 1/programmed death- ligand 1) yolağı tümör hücrelerinin immün sistem tarafından tanınmasını engelleyerek tümörün gelişimine neden olan mekanizmalardan biridir. Hedefe yönelik tedavilerin çağında PD1/PD-L1 yolağının blokajı temeline dayanan immünoterapiler onkoloji tedavi dünyasında son birkaç yılın en önemli tartışma konularından biridir. Yakın zamanda küçük hücreli dışı karsinomlarda anti PD1 ve PD-L1 ajanların tümöre karşı son derece etkili olduğunu ve immünoterapinin kemoterapi ajanlarıyla tedavilerle karşılaştırıldığında genel sağkalımı belirgin olarak uzattığını gösteren pek çok çalışma literatürde yerini almıştır (49,50,51,52). Özellikle hücre membranında ve sitoplazmasında eksprese olan PD-L1'in immünohistokimyasal yolla boyanarak saptanmasıyla immünoterapi için en uygun hasta adayları belirlenir. PD-L1 immünoekspresyonu gösteren hastaların belirgin olarak immünoterapötiklerden fayda gördüğü gösterilmiştir (53). Ticari olarak DAKO ve Ventana markaları altında yer alan beş adet PD-L1 immünohistokimya antikoruna (22C3, 28-8, SP 142, SP 263 ve 73-10) ve platformunun her biri farklı bir immünoterapötik ajan (pembrolizumab, nivolumab, atezolizumab, durvalumab ve avelumab) için geliştirilmiş olup, her bir antikorun değerlendirmedeki sınır değerler ve yöntemleri (sadece tümör hücreleri veya tümör hücreleri ve tümörü infiltre eden immün hücreler) farklılık göstermektedir. Bu antikorlara laboratuvarlarda geliştirilen ve herhangi bir ticari immünoterapötik ile ilişkilendirilmemiş PD-L1 antikor testleri de eklenince PD-L1 değerlendirmesi daha da karışık bir hal almaktadır. Tanısal biyopsi materyallerinin küçüldüğü günümüzde birden çok antikorla aynı belirtecin taranması fikri hem işgücü hem para kaybına sebep olmakta, pek çok hastada da biyopsi materyalinin sonunu getirmektedir. Son yıllarda yapılan pek çok PD-L1 immünohistokimya uzlaşma çalışması da bu karışıklığı çözmeye yönelik adım atmaya hedeflemektedir (54). Tümör hücrelerinde izlenen PD-L1 immünohistokimyasal pozitifliğinin, sigara kullanımı, artmış somatik mutasyonlar ve yeni antijen ekspresyonlarıyla karakterize TP53 ve KRAS gibi mutasyonlarla birlikteliği, yüksek mutasyon oranına sahip tümörlerde immünoterapinin daha etkili olacağı düşüncesini desteklemektedir (55,56).

Sıvı Biyopsi (Likit Biyopsi)

Sıvı biyopsi (likit biyopsi) genellikle kanser hastalarının periferik kan örneğidir. Dolaşan tümör hücreleri, dolaşan tümör DNA'sı, ekzozomlar, mikro RNA veya plateletler

gibi pek çok materyal bu örneklemeden elde edilebilir. Dolaşan tümör hücreleri kabaca immünoçekim bazlı (EpCAM hedefli) ya da boyut bazlı-dansite bazlı yöntemlerle kan örneğinden elde edilir. Dolaşan tümör hücrelerinde tanısal işlemler ve moleküler incelemeler yapılabilmektedir. *EGFR* mutasyonu, tedavi sonrası gelişen dirençten sorumlu *EGFR* T790M mutasyonu ve *ALK* rearanjmanı taramasının uygulanabildiği gösterilmiştir (57,58,59). Dolaşan tümör DNA'sı ise hücre içermeyen, tümör kaynaklı, kısa DNA fragmanlarıdır. Dolaşan tümör DNA'sı farklı tekniklerle çoğunlukla kolayca tespit edilir ve PCR bazlı veya yeni nesil sekanslama gibi yöntemlerle kolayca işlenir. *EGFR* mutasyonu ve tedaviye dirençten sorumlu *EGFR* T790M mutasyonu dolaşan tümör DNA'sında değerlendirilebilir (60,61,62). Dolaşan tümör DNA'sı günümüzde klinik uygulamalarda yerini bulmuş ve kendini kanıtlamışken, dolaşan tümör hücresi için standardizasyon sorunlarının aşılması gerekmektedir. Her iki yöntemin birbirine üstünlükleri ve her yöntemin kendi içinde bazı zayıflıkları mevcut olup, gelecekte birbirlerinin tamamlayıcısı uygulamalar olabilecekleri düşünülebilir.

Klinik uygulama öncelikle tanısal biyopsi uygulanamayan, moleküler inceleme için yeni biyopsi yapılması gereken ama yapılamayan ya da tedavi sırasında hedefe yönelik ajana dirençten şüphelenilen akciğer kanseri hastalarında uygulanmaktadır.

Sonuç

Akciğer kanseri hedefe yönelik tedaviler açısından son yıllarda başarı kazanılmış olan bir solid tümördür. Her geçen gün yeni bir hedefe yönelik tedavi ajanının ortaya atıldığı bu dönemde doğru hastaya doğru tedavinin uygulanabilmesi için moleküler testler daha da önem kazanmaktadır. Moleküler testler sadece tedavi sürecinin belirlenmesinde değil, aynı zamanda tedavi direnç mekanizmalarının anlaşılmasında ve çözümünde, hastalıkların prognozunun tahmininde ve daha da önemlisi kanserin patogenezinin anlaşılmasında rol almaktadır. Dolaşan tümör hücreleri ve dolaşan DNA üzerinden de yapılmaya başlanan moleküler testler moleküler patolojinin çok yakında daha neler yapabileceğinin habercisi gibidir. Diğer yandan immünoterapinin özellikle PD-L1 immünoekspresyonu izlenen hastalarda gösterdiği başarılı sonuçlar da başta akciğer kanseri olmak üzere pek çok tümör için umut vericidir.

Finansal Destek: Yazarlar tarafından finansal destek alınmadığı bildirilmiştir

Kaynaklar

1. Cancer fact sheet No. 297. Accessed date: 2017 February.
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. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012;13:239-246.
4. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004;304:1497-1500.
5. Uramoto H, Uchiyama T, Izumi H, et al. A new mechanism for primary resistance to gefitinib in lung adenocarcinoma: the role of a novel G796A mutation in exon 20 of EGFR. *Anticancer Res* 2007;27:2297-2303.
6. Masago K, Fujita S, Iwama K, et al. Good clinical response to gefitinib in a non-small cell lung cancer patient harboring a rare somatic epidermal growth factor gene point mutation; codon 768 AGC > ATC in exon 20 (S768I). *Jpn J Clin Oncol* 2010;40:1105-1109.
7. Improta G, Pettinato A, Gieri S, et al. Epidermal growth factor receptor exon 20 p.S768I mutation in non-small cell lung carcinoma: A case report combined with a review of the literature and investigation of clinical significance. *Oncol Lett* 2016;11:393-398.
8. Pao W, Miller VA, Politi KA, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* 2005;2:e73.
9. Jänne PA, Yang JC, Kim DW, et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015;372:1689-1699.
10. Sequist LV, Rolfe L, Allen AR. Rociletinib in EGFR-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2015;373:578-579.
11. Yu HA, Arcila ME, Harlan Fleischut M, et al. Germline EGFR T790M mutation found in multiple members of a familial cohort. *Cancer* 2014;9:554-558.
12. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med* 2012;18:378-381.
13. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2013;368:2385-2394.
14. 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. *Cancer* 2014;9:1255-1263.
15. 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.
16. Katayama R, Shaw AT, Khan TM, et al. Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung Cancers. *Sci Transl Med* 2012;4:120ra117.
17. Jain RK, Chen H. Spotlight on brigatinib and its potential in the treatment of patients with metastatic ALK-positive non-small cell lung cancer who are resistant or intolerant to crizotinib. *Lung Cancer (Auckl)* 2017;8:169-177.
18. Muller IB, de Langen AJ, Giovannetti E, Peters GJ. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in metastatic non-small cell lung cancer: clinical impact of alectinib. *Onco Targets Ther* 2017;10:4535-4541.
19. Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2014;371:1963-1971.
20. Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol* 2012;30:863-870.
21. Mehrad M, Roy S, Bittar HT, Dacic S. Next-Generation Sequencing Approach to Non-Small Cell Lung Carcinoma Yields More Actionable Alterations. *Arch Pathol Lab Med* 2017.
22. Sholl LM, Sun H, Butaney M, et al. ROS1 immunohistochemistry for detection of ROS1-rearranged lung adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol* 2013;37:1441-1449.
23. 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;83:168-173.
24. 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;65:187-194.
25. Mazières J, Zalcmán G, Crinò L, et al. Crizotinib therapy for advanced lung adenocarcinoma and a ROS1 rearrangement: results from the EUROS1 cohort. *J Clin Oncol* 2015;33:992-999.
26. Song A, Kim TM, Kim DW, et al. Molecular Changes Associated with Acquired Resistance to Crizotinib in ROS1-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2015;21:2379-2387.
27. Drilon A, Somwar R, Wagner JP, et al. A Novel Crizotinib-Resistant Solvent-Front Mutation Responsive to Cabozantinib Therapy in a Patient with ROS1-Rearranged Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2016;22:2351-2358.
28. Wang R, Hu H, Pan Y, et al. RET fusions define a unique molecular and clinicopathologic subtype of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2012;30:4352-4359.
29. Tsuta K, Kohno T, Yoshida A, et al. RET-rearranged non-small-cell lung carcinoma: a clinicopathological and molecular analysis. *Br J Cancer* 2014;110:1571-1578.
30. Gautschi O, Milia J, Filleron T, et al. Targeting RET in Patients With RET-Rearranged Lung Cancers: Results From the Global, Multicenter RET Registry. *J Clin Oncol* 2017;35:1403-1410.
31. Go H, Jung YJ, Kang HW, et al. Diagnostic method for the detection of KIF5B-RET transformation in lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* 2013;82:44-50.
32. Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, et al. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nat Med* 2012;18:375-377.

33. Lohinai Z, Klikovits T, Moldvay J, et al. KRAS-mutation incidence and prognostic value are metastatic site-specific in lung adenocarcinoma: poor prognosis in patients with KRAS mutation and bone metastasis. *Sci Rep* 2017;7:39721.
34. Tam IY, Chung LP, Suen WS, et al. Distinct epidermal growth factor receptor and KRAS mutation patterns in non-small cell lung cancer patients with different tobacco exposure and clinicopathologic features. *Clin Cancer Res* 2006;12:1647-1653.
35. Pao W, Wang TY, Riely GJ, et al. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med* 2005;2:e17.
36. Wong DW, Leung EL, So KK, et al. The EML4-ALK fusion gene is involved in various histologic types of lung cancers from nonsmokers with wild-type EGFR and KRAS. *Cancer* 2009;115:1723-1733.
37. Ju L, Han M, Zhao C, Li X. EGFR, KRAS and ROS1 variants coexist in a lung adenocarcinoma patient. *Lung Cancer* 2016;95:94-97.
38. Cardarella S, Ogino A, Nishino M, et al. Clinical, pathologic, and biologic features associated with BRAF mutations in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2013;19:4532-4540.
39. Planchard D, Besse B, Groen HJM, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAF(V600E)-mutant metastatic non-small cell lung cancer: an open-label, multicentre phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2016;17:984-993.
40. Paik PK, Drilon A, Fan PD, et al. Response to MET inhibitors in patients with stage IV lung adenocarcinomas harboring MET mutations causing exon 14 skipping. *Cancer Discov* 2015;5:842-849.
41. Frampton GM, Ali SM, Rosenzweig M, et al. Activation of MET via diverse exon 14 splicing alterations occurs in multiple tumor types and confers clinical sensitivity to MET inhibitors. *Cancer Discov* 2015;5:850-859.
42. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 2007;316:1039-1043.
43. Rabeau A, Rouquette I, Vantelon JM, Taranchon-Clermont E, Mazieres J. [Interest of crizotinib in a lung cancer patient with de novo amplification of MET]. *Rev Mal Respir* 2017;34:57-60.
44. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Franklin WA, et al. Evaluation of HER-2/neu gene amplification and protein expression in non-small cell lung carcinomas. *Br J Cancer* 2002;86:1449-1456.
45. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 2014;511:543-550.
46. Kim EK, Kim KA, Lee CY, Shim HS. The frequency and clinical impact of HER2 alterations in lung adenocarcinoma. *PLoS One* 2017;12:e0171280.
47. Planchard D, Loriot Y, André F, et al. EGFR-independent mechanisms of acquired resistance to AZD9291 in EGFR T790M-positive NSCLC patients. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2015;26:2073-2078.
48. 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;18:6219-6226.
49. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 2014;515:563-567.
50. 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.
51. 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.
52. Herbst RS, Baas P, Kim DW, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet* 2016;387:1540-1550.
53. Aguiar PN Jr, De Mello RA, Hall P, Tadokoro H, Lima Lopes G. PD-L1 expression as a predictive biomarker in advanced non-small-cell lung cancer: updated survival data. *Immunotherapy* 2017;9:499-506.
54. Hirsch FR, McElhinny A, Stanforth D, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project. *J Thorac Oncol* 2017;12:208-222.
55. Scheel AH, Ansén S, Schultheis AM, et al. PD-L1 expression in non-small cell lung cancer: Correlations with genetic alterations. *Oncoimmunology* 2016;5:e1131379.
56. Dong ZY, Zhong WZ, Zhang XC, et al. Potential Predictive Value of TP53 and KRAS Mutation Status for Response to PD-1 Blockade Immunotherapy in Lung Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2017;23:3012-3024.
57. Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med* 2008;359:366-377.
58. Marchetti A, Del Grammasio M, Felicioni L, et al. Assessment of EGFR mutations in circulating tumor cell preparations from NSCLC patients by next generation sequencing: toward a real-time liquid biopsy for treatment. *PLoS One* 2014;9:e103883.
59. Pailler E, Adam J, Barthélémy A, et al. Detection of circulating tumor cells harboring a unique ALK rearrangement in ALK-positive non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2013;31:2273-2281.
60. Taniguchi K, Uchida J, Nishino K, et al. Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 2011;17:7808-7815.
61. Thress KS, Brant R, Carr TH, et al. EGFR mutation detection in ctDNA from NSCLC patient plasma: A cross-platform comparison of leading technologies to support the clinical development of AZD9291. *Lung Cancer* 2015;90:509-515.
62. Karachaliou N, Mayo-de las Casas C, Queralt C, et al. Association of EGFR L858R Mutation in Circulating Free DNA With Survival in the EURTAC Trial. *JAMA Oncol* 2015;1:149-157.