

Транслокации с участием генов ALK и ROS1

Тест на наличие транслокации гена ALK показан больным распространенным немелкоклеточным раком легкого с отрицательным статусом EGFR мутации для отбора пациентов на терапию кризотинимом

Транслокация гена ALK – это внутривхромосомная перестройка (парацентрическая инверсия) короткого плеча 2-й хромосомы, ведущая к образованию химерного онкогена EML4/ ALK примерно в 95% случаев. Еще в 5% случаев транслокация возникает с участием других генов, представляя из себя, как правило, истинную реципрокную транслокацию. Иногда образование типичного химерного онкогена сопровождается частичной делецией 3' части гена ALK, биологическое значение этого феномена пока до конца не изучено.

Понимание роли транслокации гена ALK в развитии немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) стало одним из важнейших шагов в дальнейшей расшировке генома этого заболевания и расширении возможностей персонализации его лечения.

Функции ALK в норме и при развитии злокачественных опухолей

ALK является рецепторной тирозинкиназой из семейства инсулинзависимых рецепторов.

В норме протеин ALK активно экспрессируется в нервной ткани только во время эмбриогенеза, регулируя пролиферацию нейронов.

Как и у любой тирозинкиназы, основной функцией этого рецептора является передача сигнала.

Основными сигнальными путями, задействованными в передаче, являются пути PI3K/ERK и RAS/MAPK, то есть те же, что участвуют в передаче сигнала EGFR.

Активация ALK при образовании химерного гена EML4-ALK. (рис.1)

Транслокация EML4-ALK ведёт к активации киназ

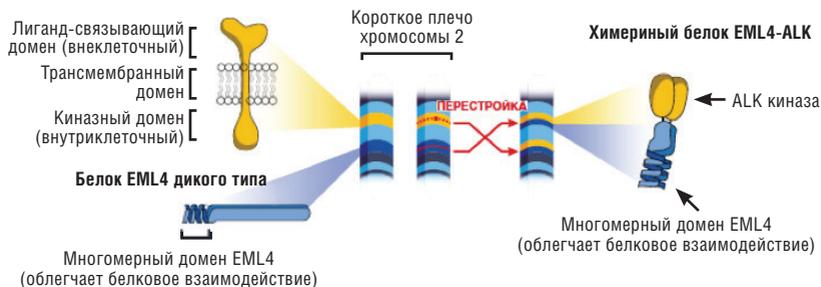


Рисунок 1. Формирование транслокации EML4-ALK.

Таким образом, ALK попадает под влияние регулирующих последовательностей EML4 и переходит в активное состояние, становится независимым от своих лигандов и передает сигнал, постоянно нарушая нормальную дифференцировку и апоптоз клетки.

Зачем определять статус транслокации ALK?

Обнаружение транслокации EML4-ALK при немелкоклеточном раке легкого принципиально для проведения терапии таргетным препаратом кризотиниб, являющимся единственным зарегистрированным ингибитором тирозинкиназы ALK в первой линии.

Кому нужно проводить тестирование?

Частота встречаемости транслокаций с участием ALK при немелкоклеточном раке легких по данным разных авторов колеблется от 3 до 13% в зависимости от особенностей выборки.

Прослеживается четкая ассоциация транслокации EML4-ALK со следующими характеристиками опухоли и больного.

1. Гистологически – аденокарцинома, более 94%.
2. Отсутствие конкурирующих мутаций (EGFR, KRAS, BRAF, PIK3CA)
3. Некурящие, более 67%.

Тем не менее, следует помнить, что все клинические рекомендации (включая рекомендации RUSSCO) рекомендуют направлять на исследование всех пациентов с распространенным неплоскоклеточным НМРЛ, вне зависимости от пола, национальности и статуса курения. Ограничение по этим параметрам может привести к потере до 50% пациентов с транслокацией.

Методы диагностики

Первым методом, использованным во всех регистрационных исследованиях, стал метод флуоресцентной гибридизации in situ (FISH), в настоящее время остающийся «золотым стандартом» прямого определения транслокаций с участием гена ALK. Наиболее широко используется рекомендованная FDA методика с использованием пробы LSI ALK Break Apart Rearrangement Probe (Abbott Molecular, США).

Проба представляет собой два флуоресцентных зонда, конъюгированных с красителями разного цвета (оранжевым и зеленым) и комплементарных расположенным рядом последовательностям гена ALK. В норме обе пробы гибридизуются рядом и при просмотре в флуоресцентный микроскоп формируют сигнал желтого цвета или видны как расположенные вплотную два сигнала красного и зеленого цвета. При перестройке гена и перемещении одной из его последовательности, сигналы расходятся и видны как лежащие раздельно. (рис. 2)

Использование этого набора обладает высокой чувствительностью и специфичностью (до 98-100%), и позволяет правильно определить ALK-статус опухоли более, чем в 90% случаев.

В настоящее время именно ИГХ-метод широко используется для первичного скрининга образцов НМРЛ. Однако наличие артефактов и 5-10% сомнительных случаев требует использования альтернативных методов (как правило, FISH) для точной детекции транслокации. (рис. 3)

Другим, также теоретически универсальным методом является иммуногистохимическое ис-

следование (ИГХ), позволяющее выявить высокую экспрессию химерного протеина в цитоплазме опухолевых клеток.

На текущий момент зарегистрированы и одобрены FDA 2 коммерчески доступных антитела, все более широко использующиеся для определения продукта перестроек гена ALK при НМРЛ. Из них общепризнанный приоритет имеет антитело D3F4, используемое с системой детекции и амплификации VENTANA (Roche Diagnostic) и адаптированного для приборов VENTANA.

Третьим методом, используемым в диагностике реаранжировок ALK, является обратнотранскриптная полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР). Метод обладает высочайшей чувствительностью, позволяет работать с образцами, содержащими крайне низкое количество опухолевых клеток, способен сразу идентифицировать тип перестройки.

Тем не менее, ОТ-ПЦР обладает несколькими весьма существенными недостатками. Во-первых, метод очень требователен к качеству РНК, выделенной из образца, в особенности – из фиксированного в формалине и залитого в парафин. Во-вторых, с помощью ОТ-ПЦР возможно выявить только те типы перестройки гена ALK, к которым подобраны специфические праймеры, что требует мультиплицирования исследования и существенных временных затрат. Очень интересным подходом является метод сравнительной экзонной экспрессии, позволяющий увидеть транслокации с помощью изучения разности экспрессии 3' и 5' концов гена ALK.

Но и этот метод требует высочайшей квалификации специалистов и может выполняться далеко не в любой лаборатории. Пока все методы детекции транслокаций ALK на основе ПЦР не зарегистрированы в РФ.

Тест на наличие транслокации гена ROS1 показан больным распространенным немелкоклеточ-



Рисунок 2. Перестройка гена при немелкоклеточном раке легкого (аденокарцинома). Данные ГБ 62 г. Москва.

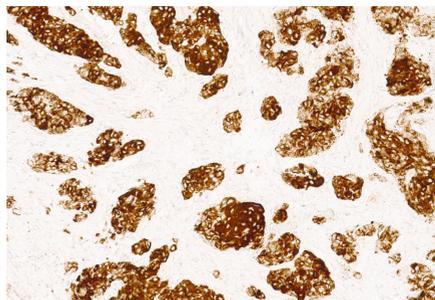


Рисунок 3. ИГХ-позитивное окрашивание образца НМРЛ.

Транспокции с участием генов ALK и ROS1

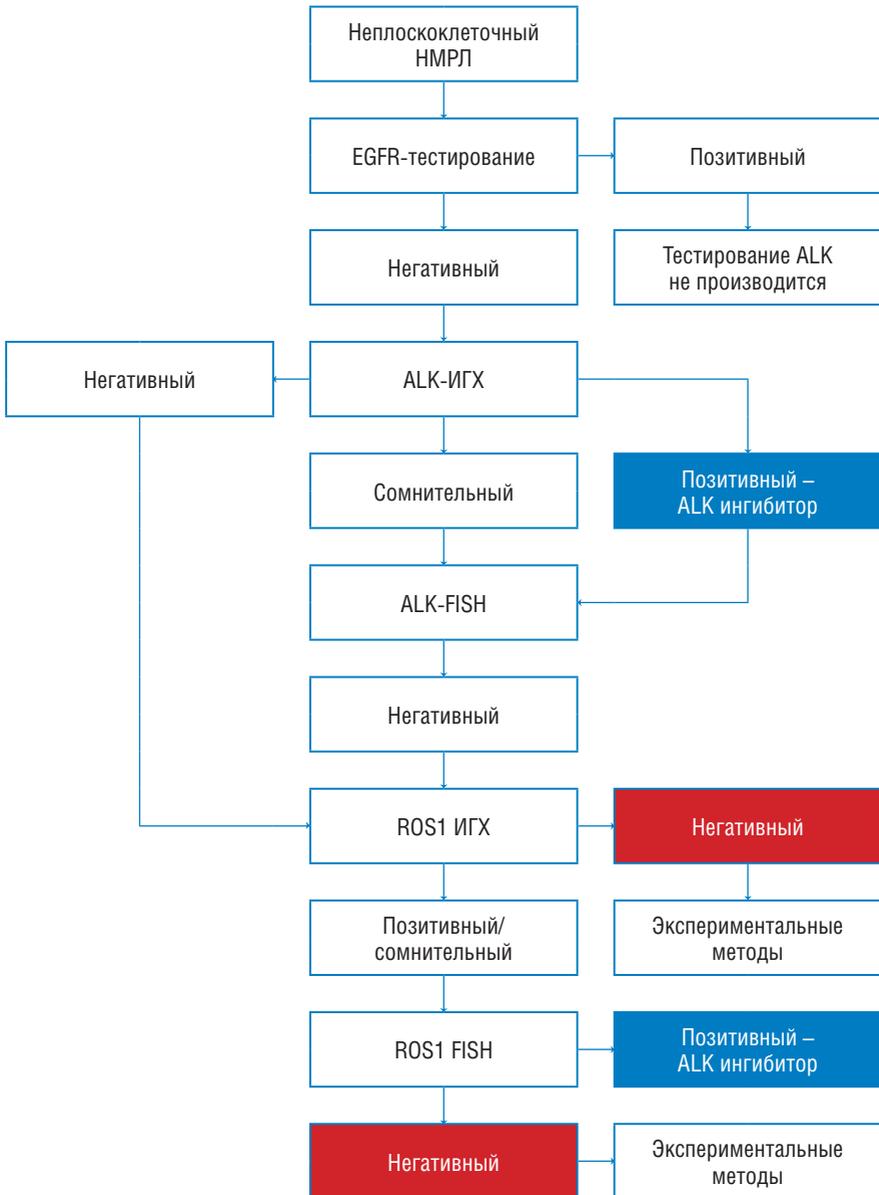


Рисунок 5. Алгоритм тестирования.

Полученная в результате слияния тирозинкиназа ROS1 активируются конститутивно и обуславливает клеточную трансформацию.

Зачем определять статус транслокации ROS1?

Обнаружение транслокации ROS1 при немелкоклеточном раке легкого принципиально для проведения терапии таргетным препаратом кризотиниб, являющимся единственным зарегистрированным ингибитором тирозинкиназы ROS1.

Кому нужно проводить тестирование?

Рearанжировки ROS1 развиваются примерно у 1-2% пациентов с НМРЛ. Как и реаранжировки ALK, реаранжировки ROS1 чаще выявляются у пациентов, которые никогда не курили или у которых в анамнезе имеется курение в небольших количествах, и отмечаются гистологические признаки аденокарциномы.

Методы диагностики

Методика диагностики реаранжировки ROS1 полностью соответствует алгоритму выявления реаранжировки ALK и на сегодняшний день производится с использованием метода FISH, ИГХ и ОТ-ПЦР. Важно помнить, что на генетическом уровне, реаранжировки ALK и ROS1 редко развиваются в одной и той же опухоли, и каждая из них определяет уникальную подгруппу НМРЛ.21.

В рамках Программы алгоритм диагностики по выявлению транслокации ALK и ROS1 у пациентов с немелкоклеточным раком легкого представлен на рис. 5.

Список литературы:

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(7153): 561–566.
2. Iwahara, T., Fujimoto, J., Wen, D et al. (1997) Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene* 14, 439–449.
3. Stoica, G. E., Kuo, A., Aigner, A., et al. Identification of anaplastic lymphoma kinase as a receptor for the growth factor pleiotrophin. *J. Biol. Chem.*2001; 276:16772–16779
4. Bai, R. Y., Ouyang, T., Miething, C et al. Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase associated with anaplastic large-cell lymphoma activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt antiapoptotic signaling pathway. *Blood* 2000 96:4319–4327.
5. Marzec, M., Kasprzycka, M., Liu, X. et al. Oncogenic tyrosine kinase NPM/ALK induces activation of the rapamycin-sensitive mTOR signaling pathway. *Oncogene* 2007; 26:5606–5614.
6. Medves S, Demoulin JB. Tyrosine kinase gene fusions in cancer: translating mechanisms into targeted therapies. *J. Cell. Mol. Med.* 2012; 16 (2): 237-248.
7. Crystal AS, Show AT. Variants on a Theme: A Biomarker of Crizotinib Response in ALK-Positive Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2012; 18(17): 4479-81.
8. Horn L, Pao W. EML4-ALK: Honing In on a New Target in Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 2009, 27(26): 4232-4235.

9. Camidge DR 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.
10. Kim et al., Updated Results of a Global Phase II Study with Crizotinib in Advanced ALK-positive Non-small Cell Lung Cancer. *ESMO* 2012; Abstract 1230PD.
11. Food and Drug Administration (2011) Summary review (application number: 202570Orig1s000). Food and Drug Administration, Silver Spring.
12. Camidge DR, Hirsch FR, Varella-Garcia M, Franklin WA. Finding ALK- positive lung cancer: what are we really looking for?// *J Thorac Oncol.*- 2011 - 6(3) - P411-3.
13. Meno-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 – Vol.1, N16(5) – P.1561-71.
14. Sanders HR, Li HR, Bruey JM.et al. Exon scanning by reverse transcriptase-polymerase chain reaction for detection of known and novel EML4-ALK fusion variants in non-small cell lung cancer.// *Cancer Genet.* – 2011 – Vol.204 N1 – P.45-52.
15. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, Chitale DA, Dacic S, Giaccone G, Jenkins RB, Kwiatkowski DJ, Saldivar JS, Squire J, Thunnissen E, Ladanyi M 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 Jul;15(4):415-53. doi: 10.1016/j.jmoldx. 2013.03.001. Epub 2013 Apr 4. - P. 21-24.
16. 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.
17. Charest A, Lane K, McMahon K, et al. Fusion of FIG to the receptor tyrosine kinase ROS in a glioblastoma with an interstitial del(6)(q21q21). *Genes Chromosomes Cancer* 2003;37:58-71.
18. Rikova K, Guo A, Zeng Q, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* 2007;131:1190-203
19. Gu TL, Deng X, Huang F, et al. Survey of tyrosine kinase signaling reveals ROS kinase fusions in human cholangiocarcinoma. *PLoS One* 2011;6(1):e15640
20. Davies KD, Doebele RC. Molecular pathways: ROS1 fusion proteins in cancer. *Clin Cancer Res* 2013;19:4040-5.
21. Gainor JF, Shaw AT. Novel targets in non-small cell lung cancer: ROS1 and RET fusions. *Oncologist* 2013;18:865-75.