

# EML4-ALK fúzní gen u pacientů s plicním karcinomem: biologie, diagnostika a cílená terapie

## EML4-ALK Fusion Gene in Patients with Lung Carcinoma: Biology, Diagnostics and Targeted Therapy

Vašíková A.

Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN Brno

### Souhrn

Cílená terapie představuje v současné době jednu z možných léčebných strategií u plicních nádorů. Její vysoká účinnost spočívá ve specifické inhibici cílové struktury, která je abnormálně aktivovaná v nádorové buňce a hraje klíčovou roli v onkogenezi. *EML4-ALK* fúzní gen, který byl poprvé popsán před pěti lety u pacientů s adenokarcinomem plic, má prokazatelně onkogenní potenciál, a je proto vhodným kandidátem pro cílenou léčbu. Tato přestavba vzniká v důsledku paracentrické inverze na krátkém raménku chromozomu 2 a vyskytuje se u 3–5 % pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic. Dále bylo identifikováno několik dalších genů, které mohou do fúze s genem *ALK* vstupovat: *TGF*, *KIF5B* a *KLC1*. Cílená inhibice konstitutivně aktivované *ALK* kinázy zprostředkovaná crizotinibem přinesla u pacientů pozitivních na přestavbu *ALK* genu výraznou léčebnou odpověď (57 %) s minimální toxicitou. Nicméně nedávno byla popsána ztráta odpovědi na léčbu crizotinibem v důsledku vzniku rezistentních mutací (C1156Y a L1196M) v kinázové doméně fúzního proteinu. Tím se otevírá prostor pro nové, vysoce specifické inhibitory, které budou schopné překonat rezistenci mutovaného *EML4-ALK*. Při výběru vhodných pacientů pro cílenou terapii hraje nezastupitelnou roli molekulární diagnostika, která nabízí pro detekci přestaveb genu *ALK* několik různých metodik. S identifikací nových genetických změn asociovaných se vznikem nádoru a vývojem nových molekulárních inhibitorů se léčba onkologických pacientů stále více posouvá k individualizované terapii.

### Klíčová slova

EML4-ALK fúzní protein – nemalobuněčný karcinom plic – molekulární diagnostika – molekulární cílená terapie – inhibitory proteinkináz – crizotinib

### Summary

Targeted therapy currently represents one of possible treatment strategies for lung cancer. High efficacy is achieved by specific inhibition of the target which is abnormally activated in a tumor cell and plays a key role in oncogenesis. *EML4-ALK* fusion gene, first described five years ago in patients with lung adenocarcinoma, undoubtedly has oncogenic potential and represents a promising candidate for targeted therapy. *EML4-ALK* fusion occurs due to paracentric inversion in the short arm of chromosome 2 and is detected in 3–5% of patients with non-small cell lung cancer. Moreover, additional fusion partners of *ALK* gene have been identified: *TGF*, *KIF5B* and *KLC1*. Targeted inhibition of constitutively activated *ALK* kinase mediated by crizotinib in patients positive for *ALK* gene rearrangements resulted in remarkable treatment response (57%) with minimal toxicity. Nevertheless, loss of response during crizotinib treatment was reported recently due to development of two resistant mutations (C1156Y and L1196M) within the kinase domain of the fusion protein. Therefore, novel, highly specific inhibitors able to overcome resistance of mutated *EML4-ALK* are needed. Molecular diagnostics plays an essential role in selection of suitable patients for targeted therapy and offers various methods for detection of *ALK* gene rearrangements. Identification of tumor-associated genetic changes together with development of novel molecular inhibitors shifts the treatment of oncologic patients towards individualized therapy.

### Key words

EML4-ALK fusion protein – non-small cell lung cancer – molecular diagnostics – molecular targeted therapy – protein kinase inhibitors – crizotinib

Autorka deklaruje, že v souvislosti s předmětem studie nemá žádné komerční zájmy.

The author declares she has no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



Mgr. Alžběta Vašíková, Ph.D.  
Centrum molekulární biologie  
a genové terapie  
Interní hematologická a onkologická  
klinika LF MU a FN Brno  
Černopolská 9  
625 00 Brno  
e-mail: alzbeta.vasikova@fnbrno.cz

Obdrženo/Submitted: 16. 4. 2012

Přijato/Accepted: 5. 6. 2012

## Úvod

Přes intenzivní úsilí o zdokonalení léčby a včasnou diagnostiku zůstává karcinom plic v důsledku vysoké incidence spojené s výraznou úmrtností v popředí zájmu nejen onkologů, ale též molekulárních biologů a farmaceutických firem. Snahou nových terapeutických přístupů je prodloužit přežívání pacientů s karcinomem plic, zkvalitnit jejich život a minimalizovat vedlejší účinky léčby. Vedle standardních léčebných protokolů, které se opírají o chemoterapii, radioterapii a chirurgickou resekci, získává stále více prostoru i tzv. cílená (někdy též biologická) léčba. Jak již z názvu vyplývá, tato terapie je zaměřena na konkrétní cílovou strukturu (nukleová kyselina, protein), která hraje klíčovou roli v onkogenezi, růstu nádoru či jeho metastazování. Inhibicí takového cíle může být nádorová buňka vrácena zpět do fyziologického stavu, případně v ní mohou být aktivovány procesy vedoucí k vlastní destrukci, tzv. programované buněčné smrti (apoptóze). Obecně tedy dochází v nádorové buňce k zablokování abnormálně aktivovaných procesů, jako jsou růst a dělení buňky, motilita a vaskularizace, či naopak jsou uvolněny proteiny/geny klíčové pro kontrolu buněčného cyklu a spuštění apoptózy. Podání cílené terapie mimo jiné vyžaduje molekulární diagnostiku pacienta, kdy je nutné potvrdit přítomnost aktivované struktury, která má být inhibována. Molekulární genetik má tedy nezastupitelnou roli nejen při hledání kandidátních genů/proteinů účastnících se onkogeneze, ale také následně při diagnostice a výběru vhodných pacientů pro konkrétní terapii. Proto se v odborné literatuře stále více setkáváme s termínem terapie šitá na míru (tzv. tailored therapy) či individualizovaná léčba.

Cílená léčba je v současné době u plicních nádorů již rutinně používána, a to při inhibici intracelulární kinázové domény receptoru pro epidermální růstový faktor (epidermal growth factor receptor – EGFR) pomocí tyrozinkinázových inhibitorů (TKI) gefitinibu (Iressa, Astra Zeneca, Velká Británie) a erlotinibu (Tarceva, Roche, Švýcarsko) [1–3]. Gefitinib je schválen pro pacienty s pokročilým nemalobuněčným karcino-

mem plic (non-small cell lung cancer – NSCLC), u nichž byla prokázána aktivační mutace v genu *EGFR*, neboť vykazují výraznou léčebnou odpověď v porovnání s pacienty s nemutovanou formou [4–7]. Studie dále potvrdily delší přežívání bez progresu (progression-free survival, PFS) u pacientů s mutovaným *EGFR* léčených v první linii gefitinibem oproti skupině pacientů, kterým byla podána standardní chemoterapie [5,8]. Druhým z TKI působícím na EGFR je erlotinib, který je nyní indikován u pokročilého NSCLC bez ohledu na mutační status *EGFR*. Nicméně nedávné studie prokázaly, že léčba pomocí erlotinibu v první linii přinesla pacientům s mutovaným *EGFR* delší PFS a omezila výskyt toxických účinků oproti standardní chemoterapii, a to jak u asijské [9], tak evropské populace [10]. Do budoucna lze tedy očekávat změnu v podávání erlotinibu, který tak bude určen pro léčbu pokročilého NSCLC v první linii u pacientů s mutovanou formou *EGFR*, podobně jako gefitinib. Vedle TKI zacílených na EGFR je u plicních nádorů dále schválen bevacizumab (Avastin, Roche, Švýcarsko), který tlumí abnormálně exprimovaný vaskulární endotelový růstový faktor (vascular endothelial growth factor – VEGF) [11]. Molekulární inhibitory mohou být podávány jak v monoterapii, tak i v kombinaci se standardní chemoterapií či radioterapií. Stále probíhají klinické studie, které u plicních karcinomů ověřují účinnost řady dalších preparátů z kategorie cílené terapie. Nově je také věnována pozornost vysoce efektivním inhibitorům, které působí na několik různých cílů současně (případně kombinacím několika různých inhibitorů), čímž dochází k utlumení více procesů či signálních kaskád najednou.

## Fúzní gen *EML4-ALK*

V roce 2007 byla japonskými autory poprvé popsána fúze genu *ALK* (anaplastic lymphoma kinase) s genem *EML4* (echinoderm microtubule associated protein like 4) u pacientů s NSCLC [12]. *EML4* gen je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 2 (2p21) a kóduje protein, který je směřován do cytoplazmy, kde hraje důležitou roli při správném uspořádání mikrotubulů. Nezastupitelná

úloha *EML4* proteinu při mitotickém dělení byla potvrzena *in vitro* experimenty, v nichž byl *EML4* gen vyřazen z funkce pomocí siRNA inhibice, což ve výsledku vedlo k celkovému poklesu počtu buněk a nižšímu proliferačnímu indexu [13]. *ALK* gen se nachází na 2p23 a kóduje transmembránový receptor s tyrozinkinázovou aktivitou, který patří do superrodiny receptorů pro inzulin. Za fyziologických podmínek je *ALK* exprimován v neuronech specifických oblastí mozku (thalamus, střední mozek, čichový bulbus). Funkce tohoto proteinu u člověka není dosud známa, avšak předpokládá se jeho účast při diferenciaci nervových buněk vzhledem k jeho vysoké expresi v časně embryogenezi v nervovém systému [14]. Dále bylo prokázáno, že aktivace *ALK* kinázy, ať už v důsledku navázání ligandu, nebo patologické fúze, vede ke snížení apoptózy. Fúze genu *ALK* byla poprvé popsána u anaplastického velkobuněčného lymfomu (anaplastic large-cell lymphoma – ALCL), kde byl jako fúzní partner detekován gen *NPM* (nukleofosmin) [15]. Přestavby *ALK* genu jsou dále uváděny v souvislosti s inflamatorním myofibroblastickým tumorem [16], difúzním velkobuněčným B lymfomem [17] a nověji také u některých epiteliálních nádorů, jako jsou karcinomy ledviny [18], prsu a tlustého střeva [19] či NSCLC [12]. Nedávno byly u neuroblastomu detekovány amplifikace genu *ALK* či missence mutace v kinázové doméně vedoucí ke zvýšení kinázové aktivity proteinu [20]. Výše uvedené příklady poukazují na důležitou roli mutovaného genu *ALK* v onkogenezi solidních nádorů.

Geny *EML4* a *ALK* jsou shodně lokalizovány na 2p, avšak leží v opačné orientaci a vzdálenost mezi nimi činí 12 megabází (Mb). Fúzní gen *EML4-ALK* je proto důsledkem malé paracentrické inverze *inv(2)(p21p23)*. Ačkoli mohou vznikat různé varianty, vždy je součástí fúzního proteinu intracelulární kinázová doména proteinu *ALK* (tedy gen *ALK* je přítomen v rozsahu exonů 20–29). Naopak transmembránová a extracelulární doména pochází z genu *EML4*. Jeho amino-terminální zásaditá (basic) doména (izoelektrický bod při pH 10,2), obsažená ve všech fúzních variantách,

**Tab. 1. Přehled jednotlivých variant fúzního genu *EML4-ALK* u pacientů s NSCLC. Názvosloví označuje písmenem E gen *EML4*, písmenem A gen *ALK*, jednotlivá čísla za těmito písmeny odpovídají příslušným exonům. Upraveno podle [21].**

<i>EML4-ALK</i> varianty u NSCLC		Frekvence varianty
E13; A20	E13; A20 (varianta 1), E13; ins69 A20	33
E6; A20	E6a/b; A20 (varianta 3a/b)	29
E20; A20	E20; A20 (varianta 2), E20; ins18A20	9
E14; A20	E14; ins11del49A20 (varianta 4'), E14; del12A20 (varianta 7)	3
E18; A20	E18; A20 (varianta 5')	3
E15; A20	E15del19; del20A20 (varianta 4)	2
E2; A20	E2; A20 a E2; ins117A20 (varianta 5a/b)	2
E17; A20	E17; ins 68A20	1
dosud neznámé		19

poskytuje dle *in vitro* experimentů nově vzniklému proteinu dostatečný onkogenní potenciál [12]. Předpokládá se, že hraje důležitou roli při dimerizaci proteinu, a umožňuje tak autofosforylaci kinázových domén. *EML4* bývá přítomen v různé délce, přičemž dosud detekované zlomy nastávají za exony 2, 6, 13, 14, 15, 17, 18 a 20 [12,21–24]. Přehledný výčet jednotlivých variant *EML4-ALK* proteinu včetně jejich poměrového zastoupení u NSCLC uvádí tab. 1. Varianta E13;A20 (písmena symbolizují názvy fúzujících genů, čísla označují příslušné exony), známá též pod názvem varianta 1, patří spolu s variantou E6a/b;A20 (varianta 3a/b) mezi nejčastěji detekované (33 % a 29 %) [23]. Gen *EML4* není jediným fúzním partnerem *ALK*, který byl dosud u NSCLC popsán. V roce 2007 byla identifikována přestavba s genem *TGF* (transforming growth factor) [25], o dva roky později pak fúze s *KIF5B* (kinesin family member 5B) [26]. Nedávno byla u NSCLC objevena nová přestavba genu *ALK*, tentokrát s genem *KLC1* (kinesin light chain 1) [27]. Existence různých variant fúzního genu *EML4-ALK* i různých partnerských genů, které mohou do fúze vstupovat, klade vysoké požadavky na detekční techniky. Tato problematika bude dále v textu detailně řešena.

Přestavba genu je jedním z hlavních mechanismů, kterým buňka získá onkogenní charakter. Na základě *in vitro* a *in vivo* experimentů bylo opakovaně potvrzeno, že výše popsané genetické aberace na 2p, které postihují gen *ALK*, mají transformační potenciál [12,21,24].

Soda et al pokračovali dále v průkazu onkogenní transformace buněk vlivem *EML4-ALK* kinázy a připravili transgenní myši, které exprimují *EML4-ALK* fúzní gen přímo v epiteliálních buňkách plic, nikoli však v ostatních tkáních. U všech testovaných jedinců byla krátce po narození během několika týdnů potvrzena přítomnost adenokarcinomu v plicích na obou stranách [28].

V rozporu s výše uvedenými experimenty je hypotéza publikovaná ve studii Perner et al, která nepokládá přestavbu genu *ALK* za počáteční událost vedoucí k nádorové transformaci buňky [29]. Tento názor je podpořen výsledky cytogenetických analýz, kdy u pozitivních vzorků nebyl fúzní gen *EML4-ALK* (případně amplifikace *ALK* či *EML4*) detekován vždy ve všech nádorových buňkách, ale byl přítomen u 50–100 % nádorových buněk. Druhým, více pravděpodobným vysvětlením může být vlastní heterogenita nádoru, a tedy současná přítomnost několika různých klonů.

Dále bylo testováno, zda je *EML4-ALK* fúzní gen specifický pouze pro NSCLC, či zda je přítomen také u jiných nádorových onemocnění (akutní myeloidní leukemie, kolorektální karcinom, gastrointestinální karcinom, karcinom prsu, malobuněčný karcinom plic, non-Hodgkinovy lymfomy aj.). Ačkoli několik nezávislých studií potvrdilo, že *EML4-ALK* je vysoce specifický pro NSCLC [12,21,30], nedávno publikované výsledky dokládají, že se tento fúzní gen vyskytuje u karcinomů ledvin [18], kolo- rekta i prsu [19].

### Klinicko-patologické charakteristiky pacientů s fúzním genem *EML4-ALK*

Přítomnost fúzního genu *EML4-ALK* byla poprvé popsána u 6,7 % (5/75) pacientů s NSCLC z Japonska [12]. Obdobné frekvence bylo dosaženo i v dalších studiích, v nichž byl fúzní gen detekován u < 8 % pacientů s NSCLC [22,29,31–34]. Tato z molekulárně-genetického hlediska jasně vymezená skupina má i své klinické charakteristiky: adenokarcinom [21,22,31] a absence kouření, případně slabé kouření v minulosti ( $\leq 10$  balíčků cigaret/rok a ukončené kouření před  $\geq 1$  rokem) [12,23]. Výše uvedená kritéria však charakterizují také pacienty, kteří ve svém genomu nesou aktivační mutace v genu *EGFR* a jsou vhodnými kandidáty pro terapii gefitinibem. Nicméně studie Shaw et al poukázala na zjevný věkový rozdíl mezi skupinou pacientů s přestavbou *ALK* a pacientů s aktivačními mutacemi v *EGFR* (věkový průměr 52 let vs 66 let) [35]. Dále bylo pozorováno, že přítomnost fúzního genu *EML4-ALK* se vylučuje s aktivačními mutacemi v genech *EGFR* a *KRAS*, čímž vzniká v rámci NSCLC nová, samostatná podskupina pacientů [12,31,33,35]. Nicméně byly popsány i výjimky, které jsou v rozporu s výše uvedenými klinickými charakteristikami: skvamózní bronchio-alveolární karcinom [12,35], pacient silný kuřák ve věku 76 let [33] či současný výskyt fúzního genu s aktivační mutací v *KRAS* (G12C) [32] nebo v *EGFR* (2235-2249 del15 v exonu 19) [36]. Některé práce pak upozorňují na další kritéria, jako jsou vyšší stadium onemocnění

a histologický nálezn solidního karcinomu s prstenčitými buňkami (signet-ring cells) [33,35].

### Diagnostické testy pro detekci přestavby genu *ALK*

Ačkoli jsou přestavby genu *ALK* známy již několik let, nebyla dosud stanovena žádná diagnostická metoda, která by sloužila jako zlatý standard. Přehled v současné době nejvíce používaných metodických postupů používaných u NSCLC nabízejí následující odstavce.

#### FISH

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) využívá pro detekci inv(2)(p21p23) tzv. break-apart sondy. Ty jsou navrženy do 3'konce *ALK* a jeho centromerické oblasti a jsou značeny odlišnými fluorescenčními barvami (červenou a zelenou). V případě, že je ve vyšetřovaném materiálu gen *ALK* neporušen, je v mikroskopu patrný žlutý signál, neboť obě próby se nacházejí v těsné blízkosti a jejich fluorescence se překrývá. Pokud však nastal zlom v genu *ALK* a v důsledku inverze došlo k prostorovému rozdělení genu, tedy i míst pro hybridizaci sond, bude signál z každé próby detekován samostatně (zvláště červený a zelený) [33,35,37,38]. Další, méně používanou variantu FISH (tzv. fusion assay) představuje hybridizace fluorescenčně značených prób v podobě umělých bakteriálních chromozomů (bacterial artificial chromosomes – BAC), které obsahují DNA sekvence odpovídající genům *ALK* a *EML4* [22,24]. I v tomto případě jsou próby značeny fluorescenčními barvami s odlišným emisním spektrem: *ALK* (červená barva), *EML4* (zelená barva). Jsou-li barevné signály v mikroskopu separované, jedná se o nemutovaný vzorek, neboť za fyziologických podmínek leží mezi oběma geny 12Mb DNA. Pokud však dochází k jejich překryvu, je zřejmé, že nastala paracentrická inverze vedoucí ke vzniku *EML4-ALK*. Pozitivita *ALK+* na základě FISH je stanovena, pokud je ve vyšetřovaném vzorku detekováno >15 % pozitivních nádorových buněk ze všech hodnocených (zpravidla ze 100 buněk) [33,35,37,38]. Výsledky FISH analýz opakovaně potvrdily, že kromě přestavby genu *ALK* dochází také

k nárůstu počtu kopií genů *ALK* a *EML4* či k amplifikaci celé oblasti zahrnující 2p21 a 2p23 [29,37].

Výhodou FISH při použití break-apart prób je schopnost detekovat všechny možné přestavby genu *ALK*, tedy nejen ty, do nichž vstupuje jako partner *EML4*. Na druhou stranu však nedokáže rozlišit mezi jednotlivými variantami daného fúzního genu či určit konkrétního fúzního partnera. Dále FISH umožňuje pracovat s archivními vzorky ve formě parafinových bločků, v nichž je tkáň fixována formalinem (formaline fixed paraffin embedded – FFPE). Tento materiál není naopak příliš vhodný pro jiné metody, které jsou citlivé na kvalitu nukleových kyselin. V důsledku fixace formalinem jsou totiž vodíkové vazby v nukleových kyselinách narušeny, dochází k dezintegraci dvouvláknových struktur, čímž je celkově snížena jejich stabilita, a mohou vznikat kovalentní vazby mezi bázemi nukleových kyselin a formaldehydem. Za účelem standardizace protokolu je jistě výhodou i komerční dostupnost *ALK* break-apart prób v podobě diagnostických souprav (Vysis *ALK* Break Apart FISH ProbeKit, Abbott Molecular, USA). Úskalí FISH při detekci *EML4-ALK* fúze spočívá v jejím hodnocení, neboť inverze postihuje relativně krátký úsek DNA (12Mb) a separace fluorescenčních signálů sond nemusí být vždy zcela zřetelná. Vzorek může být pak chybně označen jako negativní, ačkoli jiné metody poskytnou jednoznačně pozitivní výsledek [33].

#### RT-PCR a jiné PCR techniky

Reverzní transkripce (RT) s následnou amplifikací pomocí polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction – PCR) představuje rychlou a velmi citlivou metodu pro detekci fúzních genů. Templátem pro RT je RNA, která je reverzní transkriptázou přepisována do komplementární DNA (cDNA), a ta posléze slouží jako vstupní materiál pro vlastní amplifikaci. cDNA oproti DNA neobsahuje introny, ale pouze kódující sekvence (exony), a tak celý fúzní gen dosahuje velikosti pouze několika set bází, a proto může být pomocí této metody testován. Jelikož se geny *EML4* a *ALK* nacházejí na 2p v opačné orientaci, je

zřejmé, že primery navržené pro RT-PCR neposkytnou žádný specifický produkt, bude-li templátem RNA bez fúzního genu. Jak bylo zmíněno výše, *EML4-ALK* existuje v několika různých variantách, proto musí PCR probíhat jako multiplex, tj. s několika sadami vhodných párů primerů, nebo v několika samostatných reakcích, tak aby byly všechny varianty potenciálně zachytitelné [21,22,34]. Maximální efektivnosti lze pak dosáhnout metodou skenování exonů (exon scanning), kdy pro prvních 22 exonů genu *EML4*, které mohou vstupovat do fúze, je navržen vždy jeden primer, přičemž druhý primer lokalizovaný v genu *ALK* je pro všechny reakce univerzální [39]. Pro vlastní detekci amplifikovaných fragmentů slouží gelová elektroforéza, ať už v podobě agarózových gelů, nebo s využitím přístroje Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, USA). Je-li jeden z primerů značen fluorescenční barvou, lze produkty amplifikace separovat s vyšší přesností pomocí kapilární elektroforézy [39]. Na základě velikosti PCR produktů je dále možné rozlišit jednotlivé varianty fúzního genu, případně detekovat nové, dosud nepublikované varianty. Vzhledem k možnosti kontaminace je nutné pozitivní výsledek vždy potvrdit nezávislou metodou, např. přímým sekvenováním.

Nevýhodou RT-PCR je skutečnost, že vycházíme z předem navržených krátkých sekvencí DNA (oligonukleotidových primerů), které vymezují úsek RNA/cDNA pro vlastní analýzu fúzního genu. Další úskalí této metody představuje vlastní manipulace s RNA, která s sebou přináší vysoké nároky na kvalitu materiálu a jeho zpracování (RNA snáze podléhá degradaci v porovnání s DNA). Tento problém je obzvláště těžko řešitelný, neboť většina bioptických vzorků se uchovává ve formě FFPE. RNA extrahovaná z fixovaného materiálu je silně degradovaná v porovnání s RNA izolovanou z nativní tkáně (tyto materiály jsou v analýze proto více upřednostňovány). Oproti ostatním technikám dosahuje RT-PCR vysoké citlivosti, a proto je vhodná i v situacích, kdy je v materiálu nízké zastoupení nádorových buněk nebo klon nesoucí přestavbu genu *ALK* představuje v nádoru minoritní popu-

laci. V současné době lze diagnostikovat *EML4-ALK* fúzní varianty na bázi RT-PCR pomocí komerčního setu vyvinutého společností Response Genetics (USA).

Vedle běžné PCR, která navazuje na RT, je možné pro detekci genu *EML4-ALK* použít amplifikaci v reálném čase (tzv. real-time PCR) s využitím specifických fluorescenčních sond pro detekci. Technologii real-time PCR využívá např. AmoyDx *EML4-ALK* fusion gene detection kit (Amoy Diagnostics, Čína) či firmy Applied Biosystems Life Technologies (USA) a Lab21 (USA).

PCR techniky s následnou sekvenací mají svou nezastupitelnou roli při hledání konkrétních zlomových míst v intronech fúzovaných genů nebo při identifikaci nových fúzních variant. Dále je lze využít pro určení fúzních partnerů genu *ALK* v situacích, kdy FISH či imunohistochemie prokážou pozitivitu, avšak RT-PCR navržená pro *EML4-ALK* fúzi podá negativní výsledek. RT-PCR je pro tyto účely, kdy známe pro amplifikaci pouze část sekvence pocházející z genu *ALK*, modifikována a probíhá jako RACE-PCR (rapid amplification of cDNA ends) [18,27,36] nebo inverzní PCR [26].

### IHC

Imunohistochemie (IHC) je rutinně používanou technikou v laboratorních ústavů patologie, a proto by mohla být vhodnou screeningovou metodou pro detekci *EML4-ALK* proteinu. Princip IHC spočívá v detekci cílového proteinu na FFPE řezech pomocí specifické protilátky. Základním předpokladem je fakt, že v buňkách karcinomu plic je detekovatelná exprese kinázy *ALK* pouze v případě, že dochází k přestavbě genu *ALK*. Ačkoli je na trhu k dispozici několik IHC testů pro stanovení *ALK+* u ALCL, jejich použití se ukázalo jako nevhodné pro vzorky NSCLC. Srovnávací analýza 10 *ALK+* vzorků identifikovaných na základě FISH poukázala na nedostatečnou citlivost (4/10 pozitivních) použité protilátky ALK1 (Dako, Glostrup, Dánsko). Ani modifikace protokolu ve smyslu amplifikace signálu, která přinesla jisté zlepšení, nebyla však dostačující (8/10 pozitivních) [33]. Další porovnání metodik FISH a IHC (opět s protilátkou ALK1) ukázalo obdobné výsledky: senzitivita 90 %

a specifita 97,8 % [38]. Důvodem tohoto neúspěchu je nižší hladina exprese proteinu *ALK* u plicních nádorů pozitivních na přestavbu genu *ALK* v porovnání s úrovní exprese *ALK* u ALCL [40]. Nicméně nedávno publikovaná studie, která používá novou monoklonální protilátku D5F3 (Cell Signaling Technology, Inc., USA) vážící se s vysokou specificitou na *ALK*, dokládá, že IHC může být u NSCLC vysoce citlivou metodou rutinně užívanou pro diagnostiku přestaveb genu *ALK* [40]. Ve sporných případech, kdy je barvení slabé či lokální, by jako konfirmační metoda mohla posloužit FISH či RT-PCR.

### ALK cílená terapie

Řada experimentů prokázala, že kináza *EML4-ALK* působí u NSCLC onkogenně, a proto představuje vhodnou strukturu pro cílenou léčbu pomocí kinázových inhibitorů na bázi malých molekul. Účinnost *ALK* inhibitorů (WHI-P154, TAE684, PF-02341066) byla v první řadě ověřena pokusy *in vitro*, přičemž došlo k omezení růstu buněk exprimujících *EML4-ALK* a poklesu úrovně fosforylace kinázy *ALK* [12,22,41]. Navazující *in vivo* testy prokázaly jednoznačný léčebný efekt *ALK* inhibitorů, neboť u *EML4-ALK* transgenních myší došlo k omezení růstu nádoru, a dokonce i k jeho regresii [22,28,41].

Dosud postoupil do klinických studií jediný preparát, a tím je crizotinib (PF-02341066, Pfizer, USA). Jedná se o kompetitivní kinázový inhibitor, který se váže do ATP vazebného místa kinázy *ALK*. Tím je znemožněna vazba ATP, a proto nemůže dojít k autofosforylaci kinázových domén. Crizotinib byl původně představen jako inhibitor kinázy MET, teprve dodatečně byla zjištěna také jeho účinnost při tlumení kinázové aktivity *ALK*. První klinická studie u pacientů s NSCLC pozitivních na přestavbu genu *ALK* přinesla velmi povzbudivé výsledky: z 82 pacientů vykázalo 57 % částečnou nebo kompletní léčebnou odpověď a u dalších 33 % pacientů bylo onemocnění vyhodnoceno jako stabilní [42]. Crizotinib (při dávce 250 mg 2× denně) byl dobře tolerován s minimem vedlejších účinků, které, pokud se vyskytly, byly převážně gastrointestinální povahy.

V současné době probíhá randomizovaná klinická studie třetí fáze, v níž je porovnávána účinnost a bezpečnost léčby crizotinibem s konvenční chemoterapií (pemetrexed či docetaxel). Bezpečnost a protinádorová aktivita u pacientů s pokročilým NSCLC bude dále hodnocena v připravované klinické studii druhé fáze.

Ačkoli byla zaznamenána výrazná léčebná odpověď na podávání crizotinibu u *EML4-ALK* pozitivních pacientů, úspěšnost léčby nemusí mít trvalý charakter. Podobně jako při užití TKI cílených na EGFR [43], může se i v tomto případě vyvinout rezistence [44]. Po úspěšné pětiměsíční terapii crizotinibem byl u *EML4-ALK* pozitivního pacienta s plicním adenokarcinomem pozorován opětovný růst nádoru a zmnožení pleurálního výpotku. Molekulární analýza odhalila přítomnost dvou *de novo* mutací v genu *ALK*, které jsou příčinou vzniku substitucí C1156Y a L1196M lokalizovaných v kinázové doméně. *In vitro* experimenty jednoznačně prokázaly vliv obou mutací na pokles citlivosti vůči crizotinibu. Leucin v pozici 1196 utváří za fyziologických podmínek dno ATP vazebného místa, a proto záměna za metionin s objemným postranním řetězcem (při mutaci L1196M) může přímo bránit ve vazbě *ALK* inhibitoru. Substituce L1196M koresponduje pozičně se záměnou T790M v EGFR u pacientů s NSCLC způsobující obdobně rezistenci vůči erlotinibu či gefitinibu. Proto byly v preklinických studiích představeny nové preparáty cílené na *ALK* kinázu (NVP-TAE684, AP26113 [45] a CH5424802 [46]), které dokážou překonat rezistenci na podkladě mutace L1196M.

### Závěr

*EML4-ALK* fúzní gen reprezentuje u NSCLC další z genetických markerů, a definuje tak konkrétní skupinu pacientů vhodných pro léčbu pomocí inhibitorů *ALK* kinázy. Jelikož jsou přestavby genu *ALK* u NSCLC relativně vzácné (cca 3–5 %), je možné pacienty selektovat na základě klinicko-patologických charakteristik (adenokarcinom, lehký kuřák či nekuřák), a obohatit tak vyšetřovaný vzorek pacientů před vlastním diagnostickým testem. Vzhledem k absenci mutací v genech *EGFR* a *KRAS* je dále možné

vyšetřovat fúze ALK genu pouze u pacientů s nemutovanou variantou genů EGFR a KRAS. Úspěšná identifikace onkogenních příčin plicního karcinomu spolu s vývojem cílených inhibitorů umožňuje individualizovaný přístup v léčbě spojený s výrazným zlepšením kvality života a delším přežíváním pacientů.

### Poděkování

Ráda bych poděkovala paní Ing. Daně Dvořákové, CSc., za kritické přečtení textu a cenné připomínky.

### Literatura

- Heneberg P. Zpřesněme indikaci podávání inhibitorů kinázové aktivity EGFR. *Klin Onkol* 2010; 24(2): 87–93.
- Skríčková J, Babičková L, Tomášková M et al. Biologická léčba nemalobuněčného karcinomu plic. *Interní Med* 2011; 13(7,8): 292–295.
- Zatloukal P. Biologická léčba nemalobuněčného karcinomu plic. *Onkologie* 2009; 3(5): 292–296.
- Paez JG, Jänne PA, Lee JC et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004; 304(5676): 1497–1500.
- Mok TS, Wu YL, Thongprasert S et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009; 361(10): 947–957.
- Fukuoka M, Wu YL, Thongprasert S et al. Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung cancer in Asia (IPASS). *J Clin Oncol* 2011; 29(21): 2866–2874.
- Zemanová M. Gefitinib v monoterapii u nemocných s pokročilým NSCLC nesoucím aktivující mutaci EGFR zlepšuje významně léčebné výsledky oproti standardní chemoterapii – aktualita z klinické praxe. *Klin Onkol* 2010; 23(5): 365–366.
- Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010; 11(2): 121–128.
- Zhou C, Wu YL, Chen G et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol* 2011; 12(8): 735–742.
- 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(3): 239–246.
- Cohen MH, Gootenberg J, Keegan P et al. FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) plus Carboplatin and Paclitaxel as first-line treatment of advanced/metastatic recurrent nonsquamous non-small cell lung cancer. *Oncologist* 2007; 12(6): 713–718.
- 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.
- Pollmann M, Parwaresch R, Adam-Klages S et al. Human EML4, a novel member of the EMAP family, is essential for microtubule formation. *Exp Cell Res* 2006; 312(17): 3241–3251.
- Iwahara T, Fujimoto J, Wen D et al. Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene* 1997; 14(4): 439–449.
- Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 1994; 263(5151): 1281–1284.
- Griffin CA, Hawkins AL, Dvorak C et al. Recurrent involvement of 2p23 in inflammatory myofibroblastic tumors. *Cancer Res* 1999; 59(12): 2776–2780.
- Arber DA, Sun LH, Weiss LM. Detection of the t(2;5)(p23;q35) chromosomal translocation in large B-cell lymphomas other than anaplastic large cell lymphoma. *Hum Pathol* 1996; 27(6): 590–594.
- Sugawara E, Togashi Y, Kuroda N et al. Identification of anaplastic lymphoma kinase fusions in renal cancer: Large-scale immunohistochemical screening by the intercalated antibody-enhanced polymer method. *Cancer* 2012; 118(18): 4427–4436.
- Lin E, Li L, Guan Y et al. Exon array profiling detects EML4-ALK fusion in breast, colorectal, and non-small cell lung cancers. *Mol Cancer Res* 2009; 7(9): 1466–1476.
- Chen Y, Takita J, Choi YL et al. Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature* 2008; 455(7215): 971–974.
- Takeuchi K, Choi YL, Soda M et al. Multiplex reverse transcription-PCR screening for EML4-ALK fusion transcripts. *Clin Cancer Res* 2008; 14(20): 6618–6624.
- Koivunen JP, Mermal C, Zejnulahu K et al. EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14(13): 4275–4283.
- 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(10): 1773–1780.
- Choi YL, Takeuchi K, Soda M et al. Identification of novel isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2008; 68(13): 4971–4976.
- Rikova K, Guo A, Zeng Q et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* 2007; 131(6): 1190–1203.
- Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y et al. KIF5B-ALK, a novel fusion oncogene identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15(9): 3143–3149.
- Togashi Y, Soda M, Sakata S et al. KLC1-ALK: a novel fusion in lung cancer identified using a formalin-fixed paraffin-embedded tissue only. *PLoS One* 2012; 7(2): e31323.
- Soda M, Takada S, Takeuchi K et al. A mouse model for EML4-ALK-positive lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(50): 19893–19897.
- Perner S, Wagner PL, Demichelis F et al. EML4-ALK fusion lung cancer: a rare acquired event. *Neoplasia* 2008; 10(3): 298–302.
- Fukuyoshi Y, Inoue H, Kita Y et al. EML4-ALK fusion transcript is not found in gastrointestinal and breast cancers. *Br J Cancer* 2008; 98(9): 1536–1539.
- Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y et al. EML4-ALK fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers. *J Thorac Oncol* 2008; 3(1): 13–17.
- Martelli MP, Sozzi G, Hernandez L et al. EML4-ALK rearrangement in non-small cell lung cancer and non-tumor lung tissues. *Am J Pathol* 2009; 174(2): 661–670.
- 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(16): 5216–5223.
- Jin G, Jeon HS, Lee EB et al. EML4-ALK fusion gene in Korean non-small cell lung cancer. *J Korean Med Sci* 2012; 27(2): 228–230.
- Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol* 2009; 27(26): 4247–4253.
- Zhang X, Zhang S, Yang X et al. Fusion of EML4 and ALK is associated with development of lung adenocarcinomas lacking EGFR and KRAS mutations and is correlated with ALK expression. *Mol Cancer* 2010; 9: 188.
- 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(22): 5581–5590.
- Yi ES, Boland JM, Maleszewski JJ et al. Correlation of IHC and FISH for ALK gene rearrangement in non-small cell lung carcinoma: IHC score algorithm for FISH. *J Thorac Oncol* 2011; 6(3): 459–465.
- 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; 204(1): 45–52.
- 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(5): 1561–1571.
- Li Y, Ye X, Liu J et al. Evaluation of EML4-ALK fusion proteins in non-small cell lung cancer using small molecule inhibitors. *Neoplasia* 2011; 13(1): 1–11.
- Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small cell lung cancer. *N Engl J Med* 2010; 363(18): 1693–1703.
- Balak MN, Gong Y, Riely GJ et al. Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors. *Clin Cancer Res* 2006; 12(21): 6494–6501.
- Choi YL, Soda M, Yamashita Y et al. EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *N Engl J Med* 2010; 363(18): 1734–1739.
- 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 USA* 2011; 108(18): 7535–7540.
- Sakamoto H, Tsukaguchi T, Hiroshima S et al. CH5424802, a selective ALK inhibitor capable of blocking the resistant gatekeeper mutant. *Cancer Cell* 2011; 19(5): 679–690.