

Определение перестроек гена ALK в селектированной популяции российских больных немелкоклеточным раком легкого

**И.А. ДЕМИДОВА, Е.О. ЦЕПЕНЩИКОВА, А.А. БАРИНОВ, И.М. ГАГАРИН, Н.А. САВЕЛОВ,
В.Н. ГРИНЕВИЧ, С.А. ТЮЛЯНДИН**

Определение перестроек гена ALK у больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) предложено в качестве обязательной процедуры большинством современных международных рекомендаций по диагностике и лечению онкологических заболеваний. Целью исследования было проведение тестирования методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) транслокаций с участием гена ALK у пациентов, направленных на тестирование мутаций гена EGFR в рамках Программы Общества онкологов-химиотерапевтов «Совершенствование молекулярно-генетической диагностики с целью повышения эффективности противоопухолевого лечения» www.cancergenome.ru. Успешное тестирование проведено 189 из 200 больных НМРЛ без мутаций гена EGFR. Выявлено 12 позитивных случаев (6,3%). Показана зависимость частоты выявления реаранжировок гена ALK от гистологической формы опухоли, статуса курения и возраста пациента. Подтверждена эффективность использования метода FISH для широкого тестирования перестроек гена ALK в группе больных с железистыми гистологическими типами НМРЛ.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого, ген ALK, флуоресцентная гибридизация

Контактная информация:

И. А. Демидова, Е. О. Цепенщикова, А. А. Баринов, И. М. Гагарин — ГБУЗ МГОБ 62 ДЗМ, лаборатория молекулярной диагностики.

Н. А. Савелов, В. Н. Гриневич — ГБУЗ МГОБ 62 ДЗМ, отделение патологической анатомии.

С. А. Тюляндин — ГБУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, отделение клинической фармакологии и химиотерапии.

Введение

Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) является одним из наиболее пристально изучаемых онкологических заболеваний, что неудивительно, учитывая высокую частоту встречаемости этой патологии и более чем скромные успехи стандартной терапии [1]. Результаты исследований с применением современных методов молекулярной биологии позволили коренным образом изменить наши представления об особенностях возникновения разных форм этого заболевания и, соответственно, о тактике лечения и прогнозирования его течения. Стало совершенно очевидным, что с точки зрения генетической структуры опухоли, НМРЛ может быть разделен на принципиально

разные группы, зависящие от ведущих этиологических факторов и типа онкогенеза. К наиболее интенсивно изучаемой группе относятся так называемые «невинные» раки, не связанные с курением, двигателями онкогенеза которых является довольно ограниченное количество генетических нарушений [2]. Типичным примером таких опухолей являются аденокарциномы, ассоциированные с аномалиями генов EGFR, ALK, ROS1, RET. Возможность лекарственного блокирования aberrантных ферментов-тирозинкиназ, кодируемых этими генами, позволяет в большинстве случаев добиться временного возврата опухолевых клеток к подобию нормального развития и, соответственно, их естественной гибели и выраженному уменьшению размера опухоли.

Доказанная в клинических исследованиях I и II фазы высокая эффективность кризотиниба как сочетанного блокатора тирозинкиназ ALK, MET и ROS1 позволила провести процедуру ускоренной регистрации препарата для пациентов с перестройками гена ALK сначала в США, а затем и в остальных странах мира [3]. Более того, последние рекомендации по молекулярно-генетическому тестированию НМРЛ, разработанные Колледжем американских патологов (CAP), Международной ассоциацией по изучению рака легких (IASCL) и Ассоциацией молекулярной патологии (AMP), предлагают обязательное определение перестроек гена ALK при аденокарциноме легкого с диким типом гена EGFR [4]. Таким образом, систематическое направление больных НМРЛ для выявления реаранжировок гена ALK должно быть внедрено в ежедневную практику врача-онколога, так же, как и направление на определение мутаций гена EGFR.

Данное исследование стало первым пилотным проектом тестирования перестроек гена ALK у больных НМРЛ в рамках Программы Общества онкологов-химиотерапевтов «Совершенствование молекулярно-генетической диагностики с целью повышения эффективности противоопухолевого лечения» www.cancergenome.ru.

Основными задачами проекта стали определение частоты встречаемости реаранжировок ALK в группе пациентов, направляемых на исследование мутаций гена EGFR российскими онкологами, и изучение возможности массового проведения данного тестирования методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH).

Материалы и методы

В исследование были включены 200 пациентов с НМРЛ, направленных на определение мутаций гена EGFR в рамках проекта www.cancergenome.ru с мая по сентябрь 2013 года. Основным критерием отбора пациентов было отсутствие мутаций EGFR, другие критерии (гистологический тип НМРЛ, пол, возраст, статус курения) не учитывались. В качестве материала для исследования присылался биопсийный материал, фиксированный в формалине и залитый в парафин, окрашенные

и неокрашенные цитологические препараты, плевральный выпот, окрашенные гистологические препараты. Исследование проводилось только в случае наличия опухолевых клеток в образце в достаточном количестве (не менее 50 в препарате), подтвержденном квалифицированным патоморфологом или цитологом.

В качестве метода исследования проводилась FISH с использованием Vysis LSI ALK Break Apart Rearrangement Probe Kit (Abbott Molecular, США) по методике, предложенной производителем. Основные этапы методики несколько отличались для разного материала. Из препаратов, фиксированных в формалине и залитых в парафин, приготавливались гистологические срезы толщиной 3-4 микрона, которые подвергались выдержке в термостате при температуре 56°C, дальнейшей депарафинизации и предварительной обработке раствором тиоцианата натрия. Цитологические препараты при необходимости отмывались от окрашивающего состава и выдерживались в фиксирующем растворе. Из плеврального выпота приготавливался клеточный осадок в фиксирующем растворе. Далее проводилась обработка материала протеазой и проведение гибридизации с флуоресцентным зондом в программируемом термостате Dako (Dako, Дания) или Thermobrite (Abbott Molecular, США) в температурном режиме, рекомендуемом производителем. По завершении гибридизации проводилась отмывка несвязавшейся пробы и окрашивание препаратов 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) для визуализации ядер клеток. Просмотр готовых препаратов и оценка результатов гибридизации приводились с использованием флуоресцентного микроскопа Axioimager A2 (Karl Zeiss, Германия), изображение фиксировалось при помощи программы ISIS (Metasystems, Германия). Гибридизация считалась успешной в тех случаях, когда ядра не менее чем 80% опухолевых клеток имели непрерывные границы, уровень аутофлуоресценции позволял отчетливо различать зеленые флуоресцентные сигналы, внутри ядер выявлялись четкие сигналы красного, зеленого или желтого цветов. Для оценки результатов подсчета использовались критерии, предложенные группой экспертов Европейского общества патологов (ESP) в 2012 г. [5]. Подсчитывались сигналы не менее чем в 50 ядрах опухолевых клеток в 4 зонах

опухоли. Перестройка гена ALK считалась доказанной, если более чем в 15% ядер, кроме одного и более слитных сигналов, соответствующих неперестроенной 2 хромосоме, выявлялось расхождение красного и зеленого сигналов на расстояние, соответствующее двойному размеру наибольшего (красного) сигнала и подтверждающее произошедшую реаранжировку гена. Кроме того, перестроенными считались случаи, когда, кроме одного и более слитных сигналов, в ядрах выявлялись один и более одиночных красных сигналов. Такой тип распределения сигналов встречается при сочетании транслокации и частичной делеции гена ALK. В тех случаях, когда количество ядер опухолевых клеток с признаками перестройки сигнала составляло более 15%, но менее 50%, согласно рекомендациям ESP, препарат обязательно просматривался вторым специалистом.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием метода вычисления критерия χ^2 Пирсона или точного критерия Фишера путем анализа таблиц сопряженности с вычислением статистик связи.

Результаты

Провести анализ удалось в 189 случаях из 200, взятых в исследование (94,5%). Демографические и клинические характеристики больных представлены в таблице 1.

В 11 случаях гибридизация флуоресцентной пробы не была удачной. Причинами неудачи были нарушения обработки препарата на преаналитическом этапе. Выявлялись признаки либо избыточно длительной фиксации (возможно в кислом формалине), приводящей к повреждению ДНК за счет образования устойчивых нековалентных связей и дезаминации, либо слишком короткой фиксации, ведущей к образованию неравномерных коагулятов, содержащих протеины и ДНК, и продолжающемуся аутолизу внутри препарата [6;7].

Наиболее частым генетическим событием, обнаруженным при просмотре препаратов, было увеличение копийности гена ALK (от 3 до 15 копий, в среднем — 6 копий на клетку). Зависимости увеличения копийности от гистологического типа НМРЛ и статуса курения пациентов выявлено не было.

Таблица 1. Характеристика всей группы обследованных пациентов

Параметр	Значение
Общее число пациентов	189
Возраст (г)	
Медиана	60
Разброс значений	22–85
Пол (п/%)	
Мужчины	103 (54%)
Женщины	86 (46%)
Статус курения(п/%)	
Некурящие	74 (39,2%)
Курящие или когда-либо курившие	82 (43,3%)
Статус курения неизвестен	33 (17,5%)
Гистологический тип опухоли (п/%)	
Аденокарцинома	165 (87,4%)
Железисто-плоскоклеточный рак	2 (1%)
Плоскоклеточный рак	14 (7,4%)
Крупноклеточный	2 (1%)
Другое (низкодифференцированный и прочее)	6 (3,2%)
Тип исследуемого материала	
Гистологический препарат, фиксированный в формалине и залитый в парафин (парафиновый блок)	164 (86,8%)
Цитологический препарат (окрашенный или неокрашенный)	21 (11,1%)
Плевральный выпот	3 (1,6%)
Окрашенный гистологический препарат	1 (0,5%)

Всего в группе из 189 больных, которым удалось выполнить анализ, было выявлено 12 пациентов с перестройкой гена ALK (6,3%). Среднее количество клеток с признаками перестройки составило 62,4% (41–90%). Более чем в половине случаев (7 из 12), определялась реаранжировка с частичной делецией гена, на что указывала потеря зеленого сигнала на перестроенной хромосоме. Увеличение копийности как нормальной, так и перестроенной хромосомы обнаруживалось в 5 образцах. Клинические, демографические и генетические характеристики всех пациентов с реаранжировкой гена ALK представлены в таблице №2. В остальных 179 случаях количество клеток с отдельно лежащими сигналами не пре-

Таблица 2. Характеристика пациентов с перестройками гена ALK

№	№№	Пол	Возраст	Гистологическая форма	Статус курения	Вид материала	Количество сигналов	% клеток с перестройкой гена ALK
1	F5	ж	51	аденокарцинома	не курит	парафиновый блок	2-3F;1-2R	90
2	F22	ж	22	аденокарцинома	не курит	парафиновый блок	1-7F;1-2Spl.	60
3	F25	ж	40	аденокарцинома	не курит	цитологический препарат	1-2F;1-2R	90
4	F34	ж	47	аденокарцинома	бывший курильщик	Окрашенный гистологический препарат	1-2F;2R	73
5	F46	ж	41	аденокарцинома	не курит	парафиновый блок	1-5F;1R	50
6	F53	ж	47	аденокарцинома	не курит	парафиновый блок	1-12F;1-3Spl.	95
7	F73	ж	58	аденокарцинома	не курит	парафиновый блок	1-2F;1Spl.	41
8	F92	ж	52	аденокарцинома	не курит	парафиновый блок	1-4F;1-4R	92
9	F117	м	61	аденокарцинома	курит	парафиновый блок	1-3F;1-2R	80
10	F159	ж	58	аденокарцинома	не курит	парафиновый блок	1-2F;1-2R	78
11	F174	ж	52	аденокарцинома	неизвестно	парафиновый блок	2-4F1-2Spl.	62.4
12	F184	ж	51	аденокарцинома	не курит	парафиновый блок	1-2F;1Spl.	73.5

Примечания: F- слитный сигнал (fused), Spl – расщепленный сигнал (split), R – одиночный красный сигнал (red) с потерей зеленого.

вышло 4,5% (от 1% до 13%), что было ниже порогового значения в 15% и позволило отнести эти случаи к неперестроенным.

При оценке факторов, ассоциирующихся с наличием транслокаций с участием гена ALK, в обследованной группе больных было обнаружено, что данное генетическое нарушение встречается исключительно у больных с железистой дифференцировкой НМРЛ (12 случаев из 167 или 7,2%). Ни в одном случае с другими гистологическими формами НМРЛ перестроек ALK не обнаружено (0 из 22), хотя статистической достоверности при данном размере и составе выборки получено не было (OR=1.1424; ДИ95%=0.8067–0.8067; p=0.4048).

Вторым фактором, существенно влияющим на частоту встречаемости реаранжировок гена ALK, стал статус курения. У некурящих пациентов перестройки встречались достоверно чаще, чем у когда-либо куривших или больных с неизвестным статусом курения. Из 74 некурящих пациентов у 9 выявлены транслокации ALK (12,2%), в то время как среди 115 больных, куривших или с неизвестным статусом курения, обнаружено всего 3 случая (2,7%) с перестройкой (OR=2.0428; ДИ95%=1.1285–2.6280; p=0.0207).

Кроме того, реаранжировки гена ALK чаще обнаруживались у людей относительно молодого

возраста. Среди 84 пациентов младше 60 лет было выявлено 11 больных с транслокациями ALK (13%), в то время как в старшей возрастной группе из 105 человек лишь в 1 случае обнаруживалось данное генетическое нарушение (OR=2,2231; ДИ95%=1.4020–2.4464, p=0.0028).

Сочетание указанных факторов, при ожидаемом сужении исследуемой группы, привело к существенному росту шансов выявления реаранжировок гена ALK. Так, в группе молодых некурящих пациентов с аденокарциномой без мутаций гена EGFR, частота встречаемости транслокаций составила 25%. В таблице №3 представлено влияние указанных факторов на частоту выявления перестроек гена ALK при последовательном отборе пациентов.

Обсуждение

Необходимость выявления пациентов с транслокациями гена ALK среди больных НМРЛ доказана клиническими исследованиями и не подлежит сомнению [8; 9]. Алгоритм обследования пациентов может быть различным, однако, в нашем исследовании мы придерживались рекомендаций CAP-IASCL-AMP, предлагающим выполнять поиск перестроек гена ALK у пациентов после предварительного определения мутаций гена EGFR [4]. Дополнительное

Таблица 3. Последовательное влияние факторов селекции пациентов на выявление перестроек гена ALK

Группа больных	Количество тестируемых пациентов (процент от общей популяции)	Количество (процент) позитивных случаев в исследуемой группе	Количество пропущенных ALK+ пациентов (процент от всех позитивных случаев)
Все пациенты с НМРЛ без мутаций гена EGFR	189 (100%)	12 (6,3%)	0
Больные с аденокарциномой	167 (88,4%)	12 (7,2%)	0
Некурящие больные с аденокарциномой	70 (37%)	9 (12,9%)	3 (25%)
Некурящие больные с аденокарциномой младше 60 лет	36 (19%)	9 (25%)	3 (25%)

тестирование для выявления пациентов с другими, потенциально исключающими перестройки ALK, генетическими нарушениями (например, мутациями гена KRAS) не проводилось, хотя, возможно, это позволило бы дополнительно сузить группу обследуемых больных.

В настоящее время хорошо известны клинические и демографические признаки группы пациентов, для которых характерны перестройки гена ALK. В целом они идентичны признакам, типичным для группы с мутациями гена EGFR.

В первую очередь, имеет значение гистологическая форма опухоли. Практически все случаи реаранжировок гена ALK обнаруживаются у больных с аденокарциномой, хотя встречаются единичные сообщения о выявлении перестроек в опухолях с гистологическими признаками плоскоклеточного и крупноклеточного рака [10]. В нашем исследовании были получены схожие результаты, перестройки гена ALK встречались только в образцах с железистыми формами НМРЛ, частота встречаемости среди аденокарцином составила 7,2%. Ни в одном случае плоскоклеточного и крупноклеточного рака транслокации с участием ALK выявлены не были. Известным фактом является высокая частота встречаемости перестроек при аденокарциноме с перстневидными клетками [11]. В группе больных с транслокациями, выявленной в нашем исследовании, только в 3 случаях из 12 обнаруживалась эта форма аденокарциномы, хотя ранее нами также отмечалась подобная закономерность [12]. Возможно, определенное влияние на редкую встречаемость аденокарциномы с перстневидными клетками в нашей выборке оказал тот факт, что почти в половине случаев для анализа предоставлялся материал из мета-

статических очагов, где опухоль может иметь несколько другую морфологическую структуру. В связи с этим необходимо отметить, что в настоящее время большинство исследователей придерживается мнения, что морфологические подтипы аденокарциномы не должны влиять на выбор пациентов, направляемых на тестирование перестроек гена ALK [13]. Практически любая форма аденокарциномы может сопровождаться реаранжировками гена ALK.

По данным литературы, частота встречаемости перестроек ALK у больных аденокарциномой легкого довольно широко варьирует — от 3% до 14% в зависимости от выборки [14]. Такие существенные различия связаны, в первую очередь, со следующим важным фактором — статусом курения пациента. Согласно опубликованным данным, частота выявления перестроек ALK у некурящих больных НМРЛ составляет от 13,7% до 20% [15; 16]. В нашем исследовании транслокации ALK выявлялись у 12,2% некурящих пациентов. Относительно невысокая частота встречаемости реаранжировок в группе некурящих была связана с тем, что в эту группу попали пациенты не только с аденокарциномой, но и с другими гистологическими типами НМРЛ. В подгруппе некурящих больных с железистыми формами НМРЛ перестройки ALK обнаруживались в 12,9% случаев, что также несколько ниже данных других исследователей. В целом, среди пациентов с транслокациями ALK 9 из 12 человек (75%) никогда не курили. Тем не менее, курение не является фактором, абсолютно исключающим наличие этой генетической аномалии у больных НМРЛ, что подтверждается данными литературы. В публикации Weickhardt и Camidge упомина-

ется, что среди больных с перестройками ALK число когда-либо куривших может превышать 40% [17]. В нашем исследовании 2,7% всех курильщиков, или 3% курильщиков с аденокарциномой оказались носителями транслокаций. Эти пациенты составили 25% от всей группы с перестройками гена ALK.

Еще одним фактором, влияющим на частоту встречаемости этого генетического нарушения, является возраст пациентов. Подавляющее большинство исследователей указывает на то, что реаранжировки гена ALK достоверно чаще встречаются у относительно молодых больных НМРЛ, чей возраст не превышает 60 лет [18,19,20,21]. В нашем исследовании в молодой группе пациентов (до 60 лет) было выявлено 12 позитивных случаев (13%). Средний возраст пациентов с перестройками гена ALK составил 48 лет, лишь одному больному на момент исследования исполнился 61 год (8,3% от всей позитивной группы). Тем не менее, по данным некоторых исследований, в число больных с перестройками ALK могут входить до 30% пациентов старшего возраста [22].

Учитывая известную сложность и дороговизну FISH исследования, весьма привлекательной кажется возможность сужения исследуемой группы за счет отбора пациентов без мутаций гена EGFR по критериям, ассоциирующимся с высокой частотой встречаемости перестроек гена ALK. Мы попытались определить, насколько подобная селекция больных отразится на выявлении транслокаций и приведет ли это к тому, что часть ALK-позитивных случаев будет пропущена. Оказалось, что сужение тестируемой группы путем исключения пациентов с любыми гистологическими формами НМРЛ, кроме железистых, уменьшило группу обследуемых почти на 12% без потерь больных с перестройкой гена ALK. Попытка максимально сузить группу, включив в нее только молодых некурящих больных с аденокарциномой, привела к тому, что тестирование, проведенное в 19% всей популяции, позволило выявить 75% всех ALK-позитивных случаев. Однако 25% больных с транслокациями было пропущено, что, безусловно, является неприемлемым. Эти результаты подтверждаются литературными данными. Селекция выборки по всем перечисленным критериям, а также по статусу гена KRAS, позволяет увеличить возмож-

ность выявления транслокаций ALK до 45%, однако, ценой такой селекции будет потеря почти 50% позитивных случаев [16]. В связи с этим, общепринятым подходом к выбору пациентов, направляемых на определение перестроек гена ALK, является отбор больных с гистологически доказанной аденокарциномой. Правомерность такого подхода подтверждается не только результатами клинических исследований, но и фармакоэкономическими расчетами [16]. Эти критерии отбора заявлены также в большинстве рекомендаций по проведению тестирования [4;5].

Выбор оптимального метода выявления перестроек гена ALK является до сих пор определенной проблемой. Метод FISH, потенциально универсальный и общепризнанный как «золотой стандарт» клинических исследований, достаточно дорог и требователен к качеству материала. Нам удалось выполнить исследование в большинстве случаев (94,5%), однако некоторые исследователи отмечают до 40% (!) неудач [23]. Надо также отметить, что использование метода FISH привело к удлинению срока исследования каждого образца в среднем на 3 дня, хотя, как правило, оба теста: определение мутаций гена EGFR и перестроек гена ALK — удавалось выполнить в течение 10 рабочих дней. Такие сроки исследования считаются допустимыми в большинстве существующих рекомендаций [4;5;24]. Таким образом, FISH в настоящее время остается наиболее приемлемым методом выявления реаранжировок гена ALK, так как другие методы, такие как иммуногистохимическое исследование и полимеразная цепная реакция пока требуют дополнительной валидации и усовершенствования. Тем не менее, развитие этих методик, возможно, позволит в будущем существенно удешевить и ускорить процесс тестирования в рутинной практике.

Проведение пилотного проекта по определению перестроек гена ALK в программе www.cancergenome.ru показало возможность широкомасштабного определения генетических нарушений у больных НМРЛ с использованием налаженной системы логистики и имеющейся базы данных. Остается надеяться, что дальнейшее привлечение к сотрудничеству российских онкологов позволит сделать доступным подобное тестирование для большинства пациентов, нуждающихся в проведении таргетной терапии.

Литература

- American Cancer Society, Cancer Facts & Figures 2012, <http://www.cancer.org/Research/CancerFactsFigures/2013>
- Couraud S, Zalcman G, Milleron B, Morin F, Souquet PJ. Lung cancer in never smokers — A review. *Eur. J. Cancer.* 2012;48 (9):1299-1311.
- Food and Drug Administration (2011) Summary review (application number: 202570Orig1s000). Food and Drug Administration, Silver Spring.
- Lindeman LI, Gagle 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. *Arch Pathol Lab Med.* 2013; 137 (6):828-60.
- Thunnissen E, Bubbendorf L, Dietel M et al. EML4-ALK testing in non-small cell carcinomas of the lung: a review with recommendations. *Virchows Arch.* 2012;461 (3):245-57.
- John A. Kiernan, Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do. *Microscopy Today* 2000; 00-1 pp. 8-12.
- Yan F, Wu X, Crawford M et al. The search for an optimal DNA, RNA, and protein detection by in situ hybridization, immunohistochemistry, and solution-based methods. *Methods.* 2010; 52 (4):281-6.
- Camidge DR, Bang Y, Kwak EL, et al. Progression-free survival (PFS) from a phase I study of crizotinib (PF-02341066) in patients with ALK-positive non-small cell lung cancer (NSCLC) [abstract 2501]. *J. Clin Oncol.* 2011; 29 (suppl): 165s.
- Crino L, Kim D-W, Riely G, et al. Initial phase 2 results with crizotinib in advanced ALK-positive non-small cell lung cancer (NSCLC): PROFILE 1005 [abstract 7514]. *J Clin Oncol.* 2011;29 (suppl): 479s.
- An SJ, Chen ZH, Su J, Zhang XC, Zhong WZ, Yang JJ, et al. Identification of enriched driver gene alterations in subgroups of non-small cell lung cancer patients based on histology and smoking status. *PLoS ONE* 2012;7: e40109.
- Sasaki T, Rodig SJ, Chirieac LR, Janne PA. The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 2010; 46:1773-80.
- Demidova I., Savelov N., Barinov A, et al. Immunohistochemistry, Fluorescence in Situ Hybridization and Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction for the Detection of Anaplastic Lymphoma Kinase Gene Rearrangements in Non-Small Cell Lung Cancer Patients: Potential Advantages and Methodological Pitfalls. *Arch Pathol Lab Med* 2013, in press.
- Nishino M, Klepeis V, Yeap B, et al. Histologic and cytomorphic features of ALK-rearranged lung adenocarcinomas. *Mod Pathol.*2012; 25 (11):1462-72.
- 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.
- Rodig S, 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.
- Atherly A, Camidge R. The cost-effectiveness of screening lung cancer patients for targeted drug sensitivity markers. *British Journal of Cancer* (2012) 106, 1100-1106.
- Weickhardt AJ, Camidge DR. The therapeutic potential of anaplastic lymphoma kinase inhibitors in lung cancer: rationale and clinical evidence. *Clin Invest* 2011; 1 (8): 1119-1126.
- Show 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): 4248-4253.
- Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, et al: EML4-ALK lung cancers are characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset. *Mod Pathol* 22:508-515, 2009.
- 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* 115:1723-1733, 2009.
- Paik HJ, Choi CM, Kim H et al. Clinicopathologic implication of ALK rearrangement in surgically resected lung cancer. A proposal of diagnostic algorithm for ALK-rearranged adenocarcinoma. *Lung Cancer* 2012; 76:403-409.
- Paik HJ, Choi CM, Kim H et al. Screening of Anaplastic Lymphoma Kinase Rearrangement by Immunohistochemistry in Non-small Cell Lung Cancer. *J Thor Oncol* 2011; 6 (3) 266-472.
- Just P-A, Cazes A, Audebourg A, et al. Histologic subtypes, immunohistochemistry, FISH or molecular screening for the accurate diagnosis of ALK-rearrangement in lung cancer: A comprehensive study of Caucasian non-smokers. *Lung Cancer* 2011, 76 (3):309-315.
- Garrido P, de Castro J, Coucha A, et al. Guidelines for biomarker testing in advanced non-small-cell lung cancer. A national consensus of the Spanish Society of Medical Oncology (SEOM) and the Spanish Society of Pathology (SEAP). *Clin Transl Oncol* 2012; 14:338-349.