

Gdański Uniwersytet Medyczny

Wydział Lekarski

Adam Gorczyński

**OCENA CZĘSTOŚCI WYSTĘPOWANIA
NADEKSPRESJI ALK W WYBRANYCH
NOWOTWORACH I JEJ PODŁOŻE MOLEKULARNE**

Praca doktorska

Pracę wykonano pod kierunkiem prof. dr. hab. Wojciecha Biernata
w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

GDĄŃSK 2020

Składam serdeczne podziękowania

*Mojemu Promotorowi Panu Prof. dr. hab. Wojciechowi Biernatowi
za ogromne wsparcie merytoryczne i stworzenie możliwości do rozwoju naukowego*

*Panu Dr. Piotrowi Czapiewskiemu
za nieocenioną pomoc w stawianiu pierwszych kroków naukowych i wsparcie merytoryczne*

*Zespołowi Katedry i Zakładu Patomorfologii GUMed
za współpracę w milej atmosferze i wsparcie w rozwoju zawodowym*

*Mojej Rodzinie i Najbliższym,
których nieustające wsparcie i ogromna cierpliwość umożliwiły powstanie pracy*

Rodzicom

STRESZCZENIE

Celem niniejszej pracy była odpowiedź na pytanie o potencjalne znaczenie nieprawidłowej ekspresji kinazy chłoniaka anaplastycznego (*anaplastic lymphoma kinase*, ALK) w rakach nerek i ślinianek w populacji polskiej, oraz próba określenia zaburzeń molekularnych, które ją powodują.

ALK jest białkiem posiadającym aktywność kinazy tyrozynowej, które należy do nadrodziny receptorów insulinowych. Jest ono kodowane przez gen *ALK* zlokalizowany na chromosomie 2p23. Będąc regulatorem licznych szlaków komórkowych, takich jak PI3K/AKT, MAPK czy JAK/STAT, których aktywacja prowadzi do proliferacji komórek, zwiększa ich przeżycie oraz zdolność migracji, a także wpływa na ich morfologię. Do nadmiernej ekspresji ALK może dochodzić w wyniku różnych mechanizmów, m.in. poprzez amplifikacje genu oraz jego translokacje obejmujące fragment kodujący domenę kinazową białka.

Znaczenie ALK w patogenezie nowotworów określono po raz pierwszy w 1994 r. w chłoniaku anaplastycznym wielkokomórkowym. W kolejnych latach zaburzenia w obrębie genu *ALK* wykryto w licznych nowotworach łagodnych i złośliwych, m.in. chłoniaku rozlanym z dużych komórek B, zapalnym guzie miofibroblastycznym oraz nerwiaku zarodkowym. Do najistotniejszych z punktu widzenia epidemiologicznego i klinicznego należało stwierdzenie translokacji obejmujących *ALK* w około 7% przypadków gruczolakoraka płuca. Jej identyfikacja pozwoliła na zsyntetyzowanie kryzotyningu, specyficznego inhibitora ALK, który w 2011 roku dopuszczono jako skuteczny lek celowany w translokacyjnych rakach niedrobnokomórkowych płuc (NSCLC). Obecnie trwają liczne badania kliniczne dotyczące zastosowania terapii celowanej w innych nowotworach wykazujących zaburzenia w obrębie genu *ALK*.

Artykuł otwierający mój cykl publikacji zawiera szczegółowy przegląd piśmiennictwa dotyczącego nowotworów, które wykazują nadmierną ekspresję ALK (tzw. nowotworów ALK-dodatnich). W tej pracy poddano analizie 135 publikacji, w tym 38 pochodzących z 3 lat poprzedzających ukazanie się artykułu (2014). Omówiono w nim fizjologiczną rolę ALK, jego udział w procesie nowotworzenia i determinujące go mechanizmy molekularne, jak również poszczególne typy nowotworów ALK-dodatnich i ich charakterystykę patokliniczną wraz z nowoczesnymi metodami terapii celowanej wykorzystywanymi w ich leczeniu. Praca zawiera również podsumowanie 25 badań klinicznych z wykorzystaniem inhibitorów ALK prowadzonych w momencie przyjęcia jej do druku. Do zadań doktoranta jako pierwszego autora publikacji należało dokonanie analizy piśmiennictwa oraz przygotowanie głównej części ostatecznego manuskryptu.

Pierwszą z przygotowanych prac oryginalnych stanowi analiza częstości występowania ALK-dodatnich raków nerek w populacji polskiej. W badaniu tym oceniono ekspresję ALK metodą immunohistochemiczną w 1019 rakach nerek w wykonanych uprzednio mikromacierzach tkankowych. Praca miała charakter dwuośrodkowy; wykorzystano w niej zasoby archiwów Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku (UCK) oraz Zakładu Patologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Była to największa przebadana pod tym kątem grupa raków nerek na świecie. W wyselekcjonowanych guzach przeprowadzono dodatkową analizę metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH), nie stwierdzając w żadnym z nich translokacji *ALK*. Przeprowadzona analiza pozwoliła stwierdzić, że w populacji polskiej ALK-

dodatnie raki nerek występują statystycznie rzadziej, niż w innych dotąd przeanalizowanych grupach chorych. Praca zawiera również podsumowanie aktualnej wiedzy dotyczącej tej grupy nowotworów. Doktorant jako kierownik projektu był odpowiedzialny za selekcję i przygotowanie materiału tkankowego, ocenę barwień immunohistochemicznych, analizę metodą FISH oraz przygotowanie ostatecznej wersji manuskryptu.

Ostatnia z publikacji była poświęcona ocenie występowania zaburzeń ALK w rakach ślinianek. W jej ramach zbadano metodą immunohistochemiczną ekspresję ALK w 182 przypadkach raków pochodzących od chorych leczonych w Klinice Otolaryngologii UCK. W 8 przypadkach potwierdzonej nadekspresji tego białka analizę poszerzono o metody molekularne – FISH oraz sekwencjonowanie nowej generacji. W jednym z guzów posiadających morfologię raka wewnątrzprzewodowego stwierdzono występowanie translokacji *MYO18A-ALK*, która może stanowić potencjalny cel terapeutyczny, a wcześniej nie była opisana. Dodatkowo w badaniach molekularnych pozostałych guzów wykazano amplifikację genów *ALK* i *ERBB2*, jak również mutacje inaktywujące geny *BRAF* i *TP53*. Do zadań doktoranta jako jednego z pomysłodawców projektu należało opracowanie metodologii badawczej, przeprowadzenie analizy immunohistochemicznej, brał również udział w przygotowaniu manuskryptu.

Podsumowując, w ramach poniższej pracy wykazano istotnie rzadsze występowanie ALK-dodatnich raków nerek w populacji polskiej, wykryto nieopisywaną wcześniej translokację obejmującą gen *ALK* w raku wewnątrzprzewodowym ślinianki oraz dokonano szczegółowego przeglądu piśmiennictwa dotyczącego raków ALK-dodatnich, ze szczególnym uwzględnieniem ALK-dodatnich raków nerek.

SUMMARY

The aim of this study was to establish the incidence of anaplastic lymphoma kinase (ALK) aberrant expression in kidney and salivary gland carcinomas in Polish population and to analyze the underlying molecular abnormalities.

ALK is a tyrosine kinase belonging to the insulin receptor superfamily. It is encoded by the *ALK* gene located at chromosome 2p23. It acts as a regulator of multiple intracellular pathways, such as PI3K / AKT, MAPK or JAK / STAT, activation of which promotes the proliferation and survival of cells as well as increases their migration capacity and influences their morphology. ALK overexpression can occur as a result of various mechanisms, including gene amplification and translocations involving the kinase domain.

The role of ALK in pathogenesis of cancer was originally described in anaplastic large cell lymphoma in 1994. In the following years, *ALK* aberrations have been detected in numerous benign and malignant neoplasms, e.g. diffuse large B-cell lymphoma, inflammatory myofibroblastic tumor, and neuroblastoma. The most important from the epidemiological and clinical perspective was the identification of *ALK* translocations in about 7% of lung adenocarcinomas. It stimulated synthesis of crizotinib, a specific ALK inhibitor, which in 2011 was approved as an effective drug targeting non-small cell lung cancer (NSCLC) with *ALK* translocation. Currently, numerous clinical trials are underway on the use of targeted therapy in other cancers with *ALK* abnormalities.

The first publication in the series provides a detailed review of the literature on neoplasms overexpressing ALK (so-called ALK-positive neoplasms). In this paper, 135 publications were analyzed, including 38 from the 3 years preceding the publication of the article (2014). The role of ALK in physiological processes and tumors was discussed and the underlying molecular mechanisms. It provided examples of ALK-positive neoplasms and their distinctive pathoclinical characteristics. Modern methods of targeted therapy used in the tumor treatment were also reviewed including 25 clinical trials with ALK inhibitors conducted at the time of publication. PhD student's input as the first author of the publication was to analyze the literature and prepare the main part of the final manuscript.

In the first of the original papers the incidence of ALK-positive kidney cancers in the Polish population was determined. ALK expression was assessed by immunohistochemistry in 1019 kidney carcinomas by means of tissue microarrays. In this two-center study the archives of the Departments of Pathology of the Medical University of Gdańsk and the Jagiellonian University were searched. It was the largest cohort of kidney cancers in the world investigated for *ALK* abnormalities. In selected tumors, additional evaluation was performed using the fluorescence in situ hybridization (FISH) method, and no ALK translocation was found in any of them. The analysis allowed to conclude that in the Polish population ALK-positive kidney cancers are statistically less frequent than in other previously evaluated cohorts of patients. The paper also summarizes the current knowledge on this group of cancers. The PhD student as the project manager was responsible for the selection and preparation of the tissue material, evaluation of immunohistochemical staining, FISH analysis and preparation of the final version of the manuscript.

The last publication concerned the assessment of ALK alterations in salivary gland carcinomas. The expression of ALK was examined by immunohistochemistry in 182 cases

of cancers from patients treated in the Department of Otolaryngology, University Clinical Center in Gdańsk. In 8 cases with confirmed overexpression of ALK, the analysis was extended to molecular methods - FISH and next-generation sequencing. One intra-ductal carcinoma revealed the MYO18A-ALK translocation, which may be a potential therapeutic target, and has not been described in the literature before. In addition, molecular tests of the remaining tumors showed the amplification of the *ALK* and *ERBB2* genes, as well as inactivating mutations of *BRAF* and *TP53*. The tasks of the PhD student included developing a research methodology, carrying out an immunohistochemical analysis, and participation in the preparation of the manuscript.

In conclusion, there are the following findings in the presented dissertation: a significantly lower incidence of ALK-positive kidney carcinomas in the Polish population, a previously unknown *ALK* translocation in intraductal salivary gland carcinoma, with some other molecular aberrations in salivary gland carcinomas. Additionally, it contains an exhaustive review of the literature on ALK-positive carcinomas, with particular emphasis on ALK-positive kidney tumors.

SŁOWA KLUCZOWE

Kinaza chłoniaka anaplastycznego, ALK, raki nerki, RCC, raki ślinianek