

## STRESZCZENIE

Płaskonabłonkowy rak krtani (LSCC) jest najczęściej występującym nowotworem spośród HNSCC. Wskaźnik 5-letnich przeżyć dla LSCC utrzymuje się od kilkudziesięciu lat na niskim poziomie (ok. 50%), co jest związane głównie z częstymi przerzutami do węzłów chłonnych, drugimi pierwotnymi nowotworami i nawrotami. Obecnie dąży się do poznania specyficznych dla choroby markerów molekularnych dla wczesnej diagnostyki, prognozowania przebiegu oraz opracowania terapii celowanej LSCC. Stwierdzono także, że pomimo dominującego wpływu czynników środowiskowych oraz stylu życia na występowanie raka krtani, obserwuje się również zróżnicowane predyspozycje genetyczne do rozwoju tego typu nowotworu.

Ze względu na istotną rolę zjawiska przerzutowania w tym nowotworze za cel rozprawy przyjęto określenie znaczenia genów *DIAPH2*, *DIAPH3* oraz *PCDH17* w patogenezie LSCC i przerzutowaniu do węzłów chłonnych. Analizy prowadzone w ramach niniejszej pracy obejmowały ustalenie mechanizmów inaktywacji powyższych genów w przebiegu choroby.

Do wykonania badań zastosowano szereg technik molekularnych (mikromacierze DNA i ekspresyjna, pirosekwencjonowanie, sekwencjonowanie metodą Sangera oraz celowane sekwencjonowanie następnej generacji - NGS), a także metodę immunohistochemiczną. Przeprowadzono również analizy funkcjonalne *in vitro* z zastosowaniem decytabiny w celu inhibicji metylacji DNA w liniach LSCC. W badaniach wykorzystano 18 linii komórkowych wyprowadzonych z LSCC oraz ich przerzutów do węzłów chłonnych, materiał DNA ze 108 guzów nowotworowych oraz 125 skrawków guzów zatopionych w bloczkach parafinowych. Jako kontrole, w zależności od eksperymentu, wykorzystano materiał DNA pozyskany z krwi obwodowej lub wymazów z jamy ustnej od zdrowych dawców, DNA demetylowany i zmetylowany, WGA oraz inne kontrole scharakteryzowane w głównej części rozprawy.

Wyboru trzech genów (*DIAPH2*, *DIAPH3* i *PCDH17*) do szczegółowych badań dokonano na podstawie wyników analiz mikromacierzowych oraz doniesień literaturowych, wskazujących na ich potencjalny wpływ na proces przerzutowania oraz rolę w supresji różnych typów nowotworów. W badaniach prowadzonych w Instytucie Genetyki Człowieka w Poznaniu obserwowano powtarzające się delecje powyższych genów lub istotne obniżenie ich ekspresji w liniach LSCC względem kontroli nienowotworowych. Następnie przystąpiono do analizy częstości uszkodzeń badanych genów w LSCC, jak i identyfikacji mechanizmów ich uszkodzenia.

W pierwszym etapie zidentyfikowano hipermetylację regionu okołopromotorowego genu *PCDH17* we wszystkich liniach LSCC ( $p < 0,0001$ ) oraz podwyższoną metylację w większości guzów

( $p < 0,0001$ ). Sugeruje to, że zmiany te mają znaczenie dla wyciszenia *PCDH17* w raku krtani. Zależności takiej nie stwierdzono dla *DIAPH2*, w związku z czym dalsze badania w przypadku tego genu skupiały się głównie na analizie zmian genetycznych.

Następnie, przystąpiono do poszukiwania zmian sekwencji DNA badanych genów poprzez sekwencjonowanie DNA techniką Sangera w liniach komórkowych LSCC. Do najciekawszych zidentyfikowanych zmian należy delecja eksonu 23 genu *DIAPH2* z jednoczesną insercją fragmentu intronu 23 w linii UT-SCC-17 (NM\_006729:c.3116\_3240delinsGTACTGTTGAGCCATGTTCTTAACAAAAAGCTAC), a w przypadku genu *DIAPH3* warianty o szkodliwym wpływie na strukturę i funkcję białka: rs36084898 i rs200345616.

Ze względu na interesujące wyniki sekwencjonowania dalszą analizę zmian genetycznych (*DIAPH2* i *DIAPH3*) w próbach DNA od 95 pacjentów przeprowadzono metodą celowanego NGS. Wykryto 4 hemizygotyczne warianty sekwencji genu *DIAPH2*, głównie w guzach przerzutujących do węzłów chłonnych - N+ (3/42). Analiza statystyczna przeprowadzona dla badanej grupy pacjentów wraz z danymi sekwencyjnymi pozyskanymi z bazy cBioPortal wskazała na większą częstość zmian sekwencji DNA genu *DIAPH2* w guzach przerzutujących w porównaniu z nieprzerzutującymi ( $p = 0,036$ ; test  $\chi^2$ ). W przypadku genu *DIAPH3*, podobnie jak w *DIAPH2*, większość ze zmian (5/6) jest zlokalizowana w regionach genu kodujących domeny funkcyjne danego białka, przy czym dwie z nich (rs111260336 i rs150023947) są uznawane za związane z procesem nowotworzenia (FATHMM). Wskazano również na większą częstość genotypu A|A rs111260336 w populacji polskiej w stosunku do europejskiej populacji kaukaskiej.

Doświadczenie *in vitro* na liniach LSCC z zastosowaniem decytabiny potwierdziło, że inhibicja metylacji DNA powoduje przywrócenie transkrypcji genu *PCDH17*. Wskazuje to na mechanizm metylacji DNA jako istotny dla inaktywacji tego genu obserwowanej w LSCC.

Wykazano również istotnie podwyższoną ekspresję miRNA potencjalnie regulujących ekspresję *DIAPH2* i *PCDH17*. Co więcej, stwierdzono silną ujemną korelację pomiędzy ekspresją miRNA hsa-miR-15b-5p, -16-2-3p i -30a-3p a ekspresją genu *PCDH17* w LSCC.

Reasumując, wyniki uzyskane w ramach badań do niniejszej pracy doktorskiej pozwoliły na lepsze poznanie podłoża molekularnego LSCC, w tym procesu przerzutowania, zarówno w aspekcie genetycznym, jak i epigenetycznym. Co więcej, wyniki te mogą przyczynić się do poprawy diagnostyki LSCC poprzez włączenie nowych biomarkerów kancerogenezy i przerzutowania oraz opracowania innowacyjnych terapii celowanych dla tego typu nowotworu.