

STRESZCZENIE

Niedokrwistość Fanconi'ego (ang. FA- Fanconi anemia) stanowi niejednorodny zespół zaburzeń genetycznych i fenotypowych i uwrażliwia na czynniki alkilujące, generujących wiązania krzyżowe nici DNA (ICLs- interstrand DNA crosslinks). Pacjenci z FA wykazują wysokie ryzyko zachorowań na płaskonabłonkowe raki głowy i szyi (HNSCC- head and neck squamous cell carcinoma). Co ciekawe, pacjentów z FA i HNSCC nie różnicuje istotnie tło zmian genetycznych, w porównaniu do sporadycznych przypadków HNSCC.

Celem niniejszej pracy było zidentyfikowanie genów ze ścieżki FA/BRCA naprawy DNA zaburzonych w raku krtani, scharakteryzowanie pod względem różnych poziomów molekularnych oraz zweryfikowanie zdolności naprawy DNA po podaniu cisplatyny.

Materiał do badań stanowiło 21 linii komórkowych z raka krtani (ang. LSCC), 101 próbek DNA z pierwotnych guzów LSCC, 55 próbek DNA z histologicznie zdrowych marginesów z obrębu LSCC i 35 próbek RNA z pierwotnych guzów LSCC.

W celu realizacji zadań zastosowano techniki pirosekwencjonowania, mikromacierze DNA liczby kopii DNA (Agilent 44K i 244K) i ekspresji mRNA (Affymetrix U133 plus 2.0), weryfikowany przez ilościowy PCR w czasie rzeczywistym (RT-qPCR), sekwencjonowanie następnej generacji (NGS), mikromacierzy ekspresyjnej miRNA (Agilent 60K), Western immunoblotting oraz test kometowy.

Geny *FANCA*, *FANCB*, *BRCA1* i *BRCA2* charakteryzowały się znacząco zmienionym ($p < 0.05$) poziomem metylacji w liniach komórkowych LSCC w porównaniu do kontroli. Jednakże, jedynie dla *FANCA* wykazano istotne różnice w metylacji w próbkach z guzów pierwotnych LSCC ($p < 0.0001$), określające hipometylację w większości przypadków.

W DNA z marginesów guzów krtani również wykazano znacząco obniżoną ($p < 0.0001$) metylację *FANCA*, co świadczy o podobnym wzorze metylacji w porównaniu do guzów. Co więcej, pacjenci z rakiem krtani przejawiali znacznie lepszy (2-krotnie), całkowity

czas 5-letniego przeżycia, przy porównywaniu kwartyli metylacji, najniższej i najwyższej ($p=0.003$). Pacjenci z metylacją *FANCA* poniżej arbitralnego punktu odcięcia (60%) poziomu metylacji wykazywali podobnie, dwukrotnie dłuższe przeżycie ($p<0.001$). Z kolei, analiza *LINE-1* sugeruje istotną hipometylację, co sugeruje, że metylacja DNA jest ogólnie obniżona w analizowanych próbach z raków krtani.

Dane z mikromacierzy ekspresyjnych sugerują istotną nadekspresję ($p<0.05$) 6 genów szlaku FA/BRCA (*FANCA*, *FANCB*, *BRCA1*, *FANCI*, *FANCL* i *BRIP1*). Wyniki z PCR w czasie rzeczywistym potwierdziły znaczną nadekspresję *FANCA* w obu grupach, liniach komórkowych i guzach pierwotnych ($p<0.005$).

Wyniki z array-CGH wskazują dla loci genów FA nieliczne dysproporcje w liczbie kopii DNA w liniach komórkowych LSCC. Co więcej, wykryto mikroRNA *miR-940*, *-374b*, *-1246* i *-1290* istotnie zmienione ($p<0.05$) w LSCC i nie publikowane w ujęciu z HNSCC.

Na podstawie NGS nie zidentyfikowano mutacji eksonowych (z wyjątkiem SNP) a programy Polyphen2 i SIFT wskazują na SNP (rs17233497) w UT-SCC-22, jako potencjalnie szkodliwy. Wyniki Western blot pozwoliły określić zróżnicowane poziomy białka *FANCA*. Następnie, wyniki Western blot przeciw *FANCD2* wskazały na dwie linie komórkowe (UT-SCC-34 i UT-SCC-50), prezentujące obie formy *FANCD2*, L i S, a pozostałe linie wykazały jedynie formę nieubkwitynowaną *FANCD2-S*. Na podstawie oceny poziomu białka *FANCA* wybrane cztery linie komórkowe poddano badaniu oceny uszkodzenia DNA (test kometowy). Testowane linie komórkowe różnicował stopień migracji DNA z jąder komórkowych, odpowiadający poziomowi uszkodzeń DNA.

Niska metylacja *FANCA* w DNA z guzów była związana z lepszym całkowitym przeżyciem u chorych na LSCC. Wynik ten jest w opozycji do teorii, gdzie niska metylacja przekłada się na większą ekspresję *FANCA*, co powinno pomagać w lepszej odpowiedzi na uszkodzenia DNA (chemioterapia- cisplatyna) i ostatecznie skutkować gorszym rokowaniem z powodu oporności na leczenie. Alternatywnie, nadekspresja *FANCA* mogła zostać

indukowana przez kinazę ATR i jej efektor CHEK1, których nadekspresja została wykazana w liniach komórkowych LSCC. Niemniej brak monoubikwitynowanego FANCD2 oznacza brak aktywności szlaku FA/BRCA w większości analizowanych liniach komórkowych LSCC.

W trakcie badań wykazano nieopisaną wcześniej w HNSCC nadekspresję *miR-940*, który może potencjalnie wpływać na funkcje *FANCA*. Niezależnie, poziom białka *FANCA* wiązał się z potencjałem do naprawy DNA w kilku testowanych liniach komórkowych, traktowanych czynnikiem alkilującym (cisplatyną).

Biorąc pod uwagę, że wykazano iż ścieżka FA/BRCA jest nieaktywna w większości z analizowanych linii komórkowych, białko *FANCA* prawdopodobnie funkcjonuje tutaj z alternatywną i niezależną rolą od pozostałych białek związanych ze ścieżką FA/BRCA.