

## STRESZCZENIE

Płaskonabłonkowe nowotwory głowy i szyi (LSCC, ang. *Laryngeal Squamous Cell Carcinoma*), stanowią znaczący problem medyczno-społeczny. Pomimo rozwoju medycyny - zarówno w zakresie diagnostyki jak i terapii, zapadalność na ten typ nowotworu oraz śmiertelność utrzymują się od lat na wysokim poziomie. Duże nadzieje pokłada się w badaniach genetycznych prowadzących do identyfikacji potencjalnych markerów nowotworowych oraz wskazania celów molekularnych dla terapii personalizowanej. Liczne badania zmierzające do poznania kontekstu genetycznego LSCC pozwoliły na wytypowanie onkogenów (np. *PIK3CA*, *EGFR*) i genów supresji nowotworowej (np. *TP53*, *RBI*) zaangażowanych w proces kancerogenezy w obrębie tkanek głowy i szyi.

Nowotwory głowy i szyi stanowią złożoną i heterogenną grupę. Pomimo, iż rozwijają się w tym samym regionie organizmu ich biologia i genetyka jest odmienna. Z tego powodu, w niniejszej pracy skupiono się na nowotworach rozwijających się w jednej lokalizacji, a mianowicie krtani. Identyfikacja zmian specyficznych dla kancerogenezy zachodzącej w tym regionie ma znaczenie dla diagnostyki, terapii i określania rokowań dla pacjenta.

W niniejszej rozprawie doktorskiej analizowano udział wybranych genów pod kątem ich potencjału onkogenego lub supresorowego w LSCC. Geny zostały wytypowane na podstawie zmienionego poziomu ich ekspresji w liniach komórkowych raka krtani w stosunku do grupy nienowotworowych prób kontrolnych. Do analizy wybrano 6 genów charakteryzujących się podwyższoną ekspresją: *ATAD2*, *CDK1*, *LPTM4B*, *NETO2*, *SERPINH1*, *SNAI2*, a także 4 geny o obniżonym poziomie ekspresji: *CEACAM6*, *CLCA4*, *FUT3* oraz *SFRP2*. Analiza korelacji obserwowanych zmian profilu ich ekspresji z parametrami histologiczno-klinicznymi nowotworów, z których wyprowadzono linie komórkowe, pozwoliła na wskazanie genów: *ATAD2*, *CDK1*, *CEACAM6*, *CLCA4*, *FUT3* oraz *LPTM4B*, jako potencjalnie zaangażowane w patogenezę płaskonabłonkowego raka krtani w różnych stadiach zaawansowania choroby. Aby potwierdzić udział analizowanych genów w poszczególnych etapach rozwoju choroby, uzyskane w toku niniejszej pracy badania powinny w przyszłości zostać uzupełnione o analizy z wykorzystaniem materiału klinicznego (fragmentów guzów krtani).

W ramach rozprawy podjęto także próbę identyfikacji mechanizmu molekularnego odpowiedzialnego za deregulację ekspresji badanych genów. Przeprowadzono analizę poziomu metylacji DNA regionów promotorowych genów, wykazując hipermetylację genu *CEACAM6* w liniach komórkowych LSCC. Sens biologiczny wyniku potwierdzono poprzez zastosowanie czynnika blokującego metylację DNA (Decytabina), dowodząc, że wraz ze spadkiem poziomu

metylacji DNA przywrócona zostaje ekspresja *CEACAM6*. Na podstawie uzyskanych wyników, gen ten został wytypowany jako potencjalny gen supresji nowotworowej w LSCC. Jednakże w toku badań prowadzonych w niniejszej pracy nie udało się jednoznacznie potwierdzić jego supresorowego charakteru.

Dodatkowo, poprzez analizę *in silico* informacji zebranych w bazie danych cBioPortal wskazano amplifikację genów *ATAD2* i *LAPTM4B* jako potencjalny mechanizm prowadzący do ich nadekspresji. Jednak ocena liczby kopii DNA uzyskana dzięki zastosowaniu mikromacierzy (porównawcza hybrydyzacja genomów) nie potwierdza tej obserwacji. Także dla pozostałych z analizowanych w niniejszej pracy genów nie wykazano zmian liczby kopii DNA. Analiza *in silico* informacji zebranych w bazach danych cBioPortal i COSMIC pozwoliła na wykluczenie mutacji w sekwencji DNA badanych genów jako przyczyny sprawczej zmian. W związku z tym, molekularny mechanizm prowadzący do zmiany poziomu ekspresji analizowanych genów pozostał nieustalony.

Ze względu na podwyższoną ekspresję w liniach komórkowych LSCC oraz funkcje pełnione w komórce, jako potencjalny onkogen wytypowano *CDK1*. Aby poznać znaczenie genu w nowotworze krtani przeanalizowano skutki jego wyciszenia w liniach komórkowych. Pomimo, iż gen ten zaangażowany jest w regulację cyklu komórkowego, nie zaobserwowano obniżenia żywotności i tempa proliferacji komórek. Tym samym nie można potwierdzić onkogennego charakteru genu *CDK1* w rozwoju LSCC. Jako przyczynę braku zmian tych parametrów zaproponowano kompensację niedoboru *CDK1* poprzez inne geny. Jako najbardziej prawdopodobne wytypowano *CDK6*, *CALD1*, *FYN*, ponieważ poziom ich ekspresji został istotnie zwiększony po wyciszeniu *CDK1*.

Reasumując, w niniejszej pracy doktorskiej przeanalizowano grupę genów o zmienionym poziomie ekspresji w LSCC. Wskazano korelację poziomu ich ekspresji ze stopniem zaawansowania nowotworu krtani oraz mechanizmy mogące wpływać na poziom ich ekspresji. Badania zostały przeprowadzone głównie na liniach komórkowych LSCC. Z tego powodu, w celu potwierdzenia wykrytych korelacji niezbędna jest analiza z wykorzystaniem większej liczby guzów nowotworowych uzyskanych bezpośrednio od pacjentów. Ponadto, dla potwierdzenia potencjału onkogennego i supresorowego wytypowanych genów należałoby rozszerzyć badania funkcjonalne o analizy z użyciem nienowotworowej linii komórkowej nabłonka płaskiego lub modelu zwierzęcego.