

Streszczenie

Płaskonabłonkowe guzy krtani (LSCC) należą do heterogennej grupy nowotworów głowy i szyi (HNSCC). Pomimo rozwoju nauki, nadal brak skutecznych metod spersonalizowanego leczenia molekularnego guzów LSCC a najczęściej stosowana terapia - laryngektomia częściowa lub całkowita - znacząco obniża komfort życia pacjentów. Ponadto diagnoza stawiana jest zwykle w zaawansowanym stadium choroby, co przekłada się na niski współczynnik 5-letniego przeżycia pacjentów wynoszący ok. 50-60%. W związku z tym tak istotne jest poznanie zarówno zmian genetycznych jak również epigenetycznych charakterystycznych dla płaskonabłonkowego raka krtani. Deregulacja ekspresji protoonkogenów i genów supresji nowotworowej poprzez zaburzoną ekspresję mikroRNA jest jednym z mechanizmów epigenetycznych odpowiadającym za proces nowotworzenia.

Niniejsza rozprawa doktorska składająca się z cyklu trzech publikacji miała na celu poszerzenie wiedzy na temat roli mikroRNA w patogenezie LSCC poprzez identyfikację potencjalnie onkogennych mikroRNA.

Pierwszym etapem było zestawienie dotychczasowego stanu wiedzy o deregulowanych cząsteczkach mikroRNA w różnych typach HNSCC, w tym także w LSCC. Podsumowanie zebranych danych jednoznacznie pokazało, iż guzy HNSCC charakteryzują się zmienionym poziomem ekspresji mikroRNA w odniesieniu do kontroli nienowotworowych. Ponadto, podkreślono fakt, że każdy z podtypów HNSCC posiada swój unikalny profil ekspresji mikroRNA, co przekłada się na konieczność prowadzenia badań w obrębie nowotworów pochodzących z poszczególnych lokalizacji. Zwrócono również uwagę, iż cząsteczki mikroRNA, są istotnymi regulatorami procesów kluczowych dla przeżycia komórki nowotworowej i co za tym idzie mają szansę stać się celami nowych terapii antynowotworowych.

Następnie mając na uwadze wnioski z pracy przeglądowej, że każdy z podtypów HNSCC charakteryzuje się swoistymi zmianami poziomu ekspresji mikroRNA, stworzono profile ekspresji mikroRNA LSCC oraz nienowotworowych kontrolach. Pozwoliło to na wyodrębnienie potencjalnych onkogennych mikroRNA, wcześniej nieopisywanych w kontekście raka krtani, a mianowicie hsa-miR-1290, hsa-miR-1246 i hsa-miR-4317. Weryfikacja otrzymanych wyników w niezależnej grupie guzów i kontrolach nienowotworowych potwierdziła nadekspresję hsa-miR-1290 w LSCC. W celu ustalenia biologicznej roli hsa-miR-1290 wytypowano geny

posiadające miejsce wiązania tego mikroRNA w swojej sekwencji 3'UTR, które jednocześnie charakteryzowały się obniżoną ekspresją w liniach komórkowych LSCC. Do dalszych badań wybrano geny *MAF* oraz *ITPR2*, ze względu na ich powtarzającą się obniżoną ekspresję w grupie 20 guzów LSCC jak również opisywaną rolę, jako regulatory apoptozy. Następnie dzięki analizom funkcjonalnym wykazano znaczący wzrost ekspresji białka MAF po zablokowaniu aktywności hsa-miR-1290 w liniach komórkowych LSCC przy użyciu inhibitora mikroRNA.

Kolejny etap miał na celu szersze wyjaśnienie zależności między hsa-miR-1290 a *MAF* oraz ich znaczeniem w LSCC. Przeprowadzone analizy pozwoliły potwierdzić bezpośrednie oddziaływanie hsa-miR-1290 z sekwencją 3'UTR drugiego wariantu genu *MAF* NM_001031804, wskutek czego obserwowana w LSCC nadekspresja badanego mikroRNA bezpośrednio wycisza ekspresję MAF. Ponadto opierając się na uzyskanych wynikach badania immunohistochemicznego wykazano, iż u 51% pacjentów z LSCC MAF zlokalizowany jest jedynie w cytoplazmie, a u 6% całkowity brak białka MAF. Jako, że MAF pełni rolę czynnika transkrypcyjnego, jego obecność w nienowotworowych komórkach nabłonka płaskiego obserwuje się zarówno w jądrze jak i cytoplazmie. Pozwala to wnioskować, iż nawet, jeśli białko MAF, jest obecne w komórkach LSCC to jego aktywność nie jest prawidłowa. W celu wykazania jego funkcji w LSCC, poszukiwano genów mających motyw wiązania MAF w sekwencji regionu około promotorowego oraz charakteryzujących się obniżoną ekspresją w liniach komórkowych LSCC. Dzięki temu wytypowano gen *PRODH*, który według wyników analizy GO oraz danych literaturowych zaangażowany jest w regulację apoptozy. Następnie wykazano, że wzmocnienie nadekspresji hsa-miR-1290 w komórkach LSCC za pomocą wektora ekspresyjnego skutkuje obniżeniem ekspresji *MAF*, co w konsekwencji przekłada się na spadek ekspresji *PRODH*.

Podsumowując, niniejsza rozprawa doktorska wpisuje się w nurt badań nad rolą mikroRNA w LSCC. Profile ekspresji uzyskane w jednorodnej grupie guzów krtani pozwoliły wyłonić wcześniej nieopisywany w LSCC hsa-miR-1290. Ponadto, przeprowadzone badania pozwoliły opisać oś zależności między hsa-miR-1290 a *MAF* i *PRODH*, która może mieć znaczenie w regulacji apoptozy w płaskonabłonkowym raku krtani.