

## **Ocena znaczenia diagnostycznego wybranych zmian molekularnych genów *FHIT* i *RARβ* (region „hot spot mutation”) w niedrobnokomórkowym raku płuca**

Rak płuca jest najczęstszym nowotworem złośliwym na świecie. Zajmuje pierwsze miejsce pod względem zachorowalności i umieralności u mężczyzn oraz drugie miejsce u kobiet. Podział histopatologiczny wyróżnia dwa główne typy raka płuca - niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC) stanowiącego 75% przypadków z jego podtypami tj. rak płaskonabłonkowy (SCC), rak gruczołowy (AC), rak wielkokomórkowy (LCC) oraz drobnokomórkowego raka płuca (SCLC) stwierdzanego w 20% przypadków.

W procesie karcynogenezy w płucu istotne znaczenie mają zmiany molekularne regionu 3p, powszechnie uznawanego jako tzw. gorące miejsce mutacji („hot spot mutation“). Niestabilność genetyczna/epigenetyczna tego regionu związana jest najczęściej z takimi zmianami molekularnymi jak LOH/MSI (utrata heterozygotyczności /niestabilność mikrosatelitarna), mutacje zmiany sensu w poszczególnych genach TSGs których *loci* znajdują się w obrębie chromosomu 3p, czy z powodu modyfikacji epigenetycznych (głównie zmiana wzoru metylacji sekwencji promotorowych genów TSG). Powyższe zdarzenia molekularne leżą u podstaw utraty funkcji genów supresorowych (TSGs), obniżenia/utraty ich ekspresji lub syntezy białka o zmienionej sekwencji aminokwasowej. Częste występowanie zmian molekularnych w regionie 3p w raku płuca opisuje się dla 90% przypadków SCLC oraz 50-80% NSCLC.

Spośród wielu genów TSG zmapowanych do regionu 3p wymienia się m.in. geny: *FHIT* (3p14.2) i *RARβ* (3p24.2), których zmiany ekspresji są związane z modyfikacjami genetycznymi czy epigenetycznymi w przebiegu procesu nowotworowego w płucu. Do zaburzeń genetycznych często dochodzi w wyniku działania szkodliwych czynników środowiskowych. W raku płuca szczególne znaczenie przypisuje się paleniu tytoniu, które szczególnie sprzyja zaburzeniom genetycznym w krytycznym regionie 3p.

Celem prezentowanej pracy doktorskiej była ocena przydatności badanych zmian genetycznych - poziomów ekspresji i metylacji promotorowej genów *FHIT* i *RARβ* oraz immunoekspresji białka Fhit, jako markerów diagnostycznych i prognostycznych w raku płuca. Ponadto w niniejszej pracy dokonano oceny zależności badanych zmian genetycznych wybranych genów z typem histopatologicznym NSCLC, stopniem rozwoju klinicznego

nowotworu oraz takimi cechami jak wiek i płeć pacjenta oraz ilość wypalanych papierosów (mierzonych w paczkolatach) i status palenia tytoniu. Oceniono również udział metylacji promotorowej w zmianach ekspresji wybranych genów.

Do badań wykorzystano próbki tkanki NSCLC 60 chorych operowanych z powodu niedrobnokomórkowego raka płuca. Grupę kontrolną stanowiła śródoperacyjnie pozyskana tkanka makroskopowo niezmienniona nowotworowo od tych samych pacjentów.

Pierwsza część pracy dotyczyła oceny ekspresji genów *RARβ* i *FHIT* w tkance NSCLC oraz makroskopowo niezmiennionej. U chorych na NSCLC, wykazano obniżenie ekspresji genu *RARβ* w 50% próbek. Częstość obniżonej ekspresji *RARβ* mieściła się w przedziale 38-80%, w zależności od podtypu histopatologicznego. Ta zmienność sugeruje wysoką heterogenność tkanki nowotworowej. Najczęściej spadek ekspresji *RARβ* występował w podtypie LCC (80%), najrzadziej w SCC (38%). W odniesieniu do genu *FHIT* wykazano podwyższenie ekspresji we wszystkich podtypach histopatologicznych NSCLC w porównaniu z tkanką niezmienną nowotworowo. Zwiększone poziomy ekspresji obserwowano również w tkance zdrowej względem kalibratora. Nadekspresję *FHIT* najczęściej obserwowano w podtypie AC oraz istotnie częściej w całej grupie kobiet. W analizie immunоекspresji obserwowano obniżenie poziomu białka Fhit w tkance NSCLC. Wpływ palenia na ekspresję genu *FHIT* jest niejasny. Wykazano wyższe poziomy ekspresji *FHIT* u osób palących powyżej 40 paczolat. Uzyskano liczne rozbieżności wyników immunоекspresji Fhit w poszczególnych typach histopatologicznych NSCLC, co sugeruje nieznaczną jej przydatność w różnicowaniu guza płuca.

W drugiej części pracy dokonano oceny poziomu metylacji promotorowej genów *FHIT* i *RARβ*. Obecność przynajmniej jednego zmetylowanego allelu *RARβ* zaobserwowano w 84% próbek NSCLC, podczas gdy obydwa zmetylowane allele stwierdzono w 19% przypadków. W poszczególnych typach histopatologicznych poziom metylacji promotorowej *RARβ* nie różnił się istotnie. Najczęściej metylację promotorową *RARβ* stwierdzono w podtypie gruczolakoraka (74% próbek), co sugeruje udział tego zjawiska w jego rozwoju. Metylację promotorową przynajmniej jednego allelu *FHIT* obserwowano w 95% próbek, natomiast obydwa allele zmetylowane występowały w 12% próbek. W obecnej pracy hipermetylację *FHIT* istotnie częściej obserwowano w podtypie gruczolakoraka.

Nie stwierdzono wzajemnych powiązań pomiędzy stopniem ekspresji, metylacji *FHIT* i immunоекspresji Fhit z ekspresją i metylacją promotorową *RARβ*. Sugeruje to udział innych mechanizmów genetycznych i epigenetycznych w zaburzeniu funkcji wybranych genów w

## NSCLC.

Uzyskane wyniki pozwalają sformułować następujące wnioski:

1. Obniżenie ekspresji genu *RARβ* oraz nadekspresja genu *FHIT* w tkance NSCLC wydają się mieć potencjał różnicujący podtypy NSCLC co czyni te zjawiska potencjalnymi markerami diagnostycznymi NSCLC.
2. Różnice nadekspresji genu *FHIT* w poszczególnych stadiach zajęcia węzłów chłonnych mogą mieć istotne znaczenie w transformacji nowotworowej, co sugeruje potencjał prognostyczny tego genu w NSCLC.
3. Obniżenie ekspresji genu *RARβ* w NSCLC nie ma wartości prognostycznej.
4. Hipermetylacja regionów promotorowych genów *FHIT* i *RARβ* choć ma istotne znaczenie w rozwoju NSCLC, nie jest użytecznym markerem diagnostycznym i prognostycznym w NSCLC.
5. Brak korelacji pomiędzy poziomem ekspresji i metylacji promotorowej genów *FHIT* i *RARβ* wskazuje na istnienie innych, złożonych mechanizmów molekularnych regulujących poziom ekspresji tych genów w NSCLC.
6. Brak korelacji nadekspresji *FHIT* z obniżoną immunoekspresją białka Fhit sugeruje inny mechanizm wpływający na translację tego białka w NSCLC.

## **The significance of diagnostic molecular changes assesment of *FHIT* and *RARβ* genes ("hot spot mutation" site) in NSCLC**

Lung cancer is the most common malignancy in the world. It is one of the first cause of death among man and second among woman in terms of cancer related death. On the basis of the histopathological classification, lung cancer is divided into two main groups: (1) small cell lung cancer (SCLC), representing about 20% of cases and (2) non-small cell lung cancer (NSCLC), which consists of approximately 75% of all lung tumor diagnoses. Histologically, NSCLC is divided into the following subtypes - squamous cell carcinoma (SCC), adenocarcinoma (AC) and large cell carcinoma (LCC).

In the process of lung carcinogenesis the important molecular changes affect 3p region, widely recognized as common chromosome fragile site (so called "hot spot mutation" site). Genetic/epigenetic instability of this region is mostly associated with such molecular alterations like loss of heterozygosity/microsatellite instability (LOH/MSI), missense mutations in specific tumor supressor genes (TSGs) which *loci* are located in chromosome 3p or because of epigenetic modifications (mostly methylation of TSGs promoter sequences). These molecular events underly the loss of function, reduction/loss of expression of tumor suppressor genes (TSGs) or translation of proteins with altered amino acid sequence. The occurrence of the molecular changes in 3p region in lung cancer described for 90% of SCLC and 50-80% of NSCLC cases.

Among many TSGs mapped to the 3p region there are *FHIT* (3p14.2) and *RARβ* (3p24.2) genes, which expression changes are associated with genetic and epigenetic modifications in lung cancer. The genetic disorders often occur in response to environmental factors. The specific contribution to the lung cancer development has cigarette smoking, which promotes genetic disorders in the critical region of 3p.

The aim of this dissertation was to evaluate the usefulness of the tested genetic changes - the expression and promoter methylation level of *FHIT* and *RARβ* genes and Fhit protein immunoexpression level as diagnostic and prognostic markers in lung cancer. Additionally, I analyzed the correlations between examined genetic changes with the clinical features of patients, tobacco addiction, histopathological and clinicopathological status characteristics of NSCLC samples. The correlation status of promoter methylation and expression level of selected genes was also analysed.

The study group comprised of 60 tumor samples from patients operated for NSCLC. The control group was macroscopically unchanged cancerous tissue from the same patients.

The first part of the dissertation study concerned the assessment of gene expression of *RARβ* and *FHIT* genes in NSCLC and macroscopically unchanged tissue. In patients with NSCLC the reduction of *RARβ* gene expression was revealed in 50% samples. The reduced *RARβ* expression was between 38-80%, depending on the histological subtype. This frequency variation suggests a high heterogeneity of cancerous tissue. The most frequent decrease in *RARβ* expression appeared in LCC (80%) subtype, the rarest in SCC (38%). The analysis of *FHIT* gene expression has shown the increased expression in all histological subtypes of NSCLC compared with unchanged non-cancerous tissue. Increased levels of expression were also observed in the healthy lung tissue relatively to the calibrator. *FHIT* overexpression was mostly observed in AC subtype and significantly higher in the whole group of women. The Fhit immunoexpression level was reduced in NSCLC samples. The smoking effect on *FHIT* gene expression remains unclear. The analysis has shown higher levels of *FHIT* expression in smokers with the smoking history of more than 40 packyears. The obtained Fhit immunoexpression results showed numerous discrepancies according to different histological NSCLC types, suggesting low usefulness in the differentiating of lung cancer.

In the second part of the assessment the methylation status of *RARβ* and *FHIT* promoter regions was performed. The presence of at least one *RARβ* methylated allele was observed in 84% of NSCLC samples, while both methylated alleles were found in 19% of cases. In particular histopathological types methylation status of *RARβ* gene did not differ significantly. Mostly *RARβ* hypermethylation was found in adenocarcinomas (74% of samples), suggesting its involvement in AC development. Promoter methylation of *FHIT* gene in at least one allele was observed in 95%, while both methylated alleles were present in 12% of samples. In the present work *FHIT* hypermethylation was also observed more frequently in adenocarcinoma subtype.

There was no correlation between the expression, methylation levels of *FHIT* and *RARβ* genes and Fhit immunoexpression. This suggests the involvement of other combined genetic and epigenetic mechanisms in impaired function of selected TSGs in NSCLC.

The obtained results allow for the following conclusions:

1. The reduction of *RARβ* gene expression and *FHIT* gene overexpression in NSCLC appear to have a potential in differentiating of particular subtypes of NSCLC making these events as potential diagnostic markers in NSCLC.

2. Differences in *FHIT* gene overexpression levels in particular stages of lymph node involvement may be important in neoplastic transformation, which suggests a potential prognostic value of this gene in NSCLC.
3. Reduction of *RAR $\beta$*  gene expression in NSCLC has no predictive value.
4. Although hypermethylation of promoter regions of *FHIT* and *RAR $\beta$*  genes plays role in the development of NSCLC, it is not useful diagnostic and prognostic marker in NSCLC.
5. Lack of correlation between the expression and promoter methylation levels of *FHIT* and *RAR $\beta$*  genes indicates the existence of other combined molecular mechanisms regulating the expression level of these genes in NSCLC.
6. Lack of *FHIT* overexpression correlation with reduced Fhit immunoexpression level suggests another mechanism that affects the translation of this protein in NSCLC.