

Dominika Kuleszo

**Ocena wybranych zmian molekularnych
w genach kodujących białka szlaku SHH
w guzach germinalnych wieku dziecięcego**

(rozprawa doktorska)

Praca wykonana
w Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki Medycznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotor:
dr hab. Beata S. Lipska-Ziętkiewicz

Gdańsk 2019

Praca wykonana ze środków finansowych Narodowego Centrum Nauki przyznanych na realizację projektu naukowego OPUS nr 04-0155/09/324 p.t. „*Znaczenie szlaku sygnalizacyjnego SHH w patogenezie i progresji guzów germinalnych wieku rozwojowego*” pod kierownictwem prof. dr hab. Ewy Łzyckiej-Świeszewskiej

SPIS TREŚCI

1. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	5
2. STRESZCZENIE	8
2.1. Abstract	10
3. WSTĘP	12
3.1. GUZY GERMINALNE	12
3.1.1. Charakterystyka kliniczna nowotworów germinalnych	12
3.1.2. Typy histologiczne GCTs	15
3.1.3. Patogeneza guzów germinalnych	17
3.1.4. Profil genetyczny guzów germinalnych	18
3.2. SZLAK SYGNALIZACYJNY HEDGEHOG	21
3.2.1. Białka Hedgehog	21
3.2.2. Aktywacja ścieżki sygnałowej Hedgehog	23
3.2.3. Znaczenie ścieżki Hh w rozwoju embrionalnym	26
3.2.4. Aktywacja ścieżki sygnałowej Hh w nowotworzeniu	26
4. CELE PRACY	30
5. MATERIAŁ I METODY	31
5.1. Materiał	31
5.1.1 Charakterystyka grupy badanej	31
5.2. Metody	35
5.2.1. Aparatura	35
5.2.2. Odczynniki	36
5.2.3. Roztwory	37
5.2.4. Izolacja kwasów nukleinowych	37
5.2.5. Ocena ilościowa oraz jakościowa DNA i RNA	41
5.2.6. Technika mikromacierzy CGH	41
5.2.7. Technika sekwencjonowania następnej generacji (NGS)	45
5.2.8. Technika PCR w czasie rzeczywistym	52
5.2.9. Analiza statystyczna	58
6. WYNIKI	60
6.1. Analiza profilu genomowego guzów mrożonych	60
6.1.1. Aberracje liczbowe	62
6.1.2. Aberracje strukturalne	63
6.1.3. Analiza <i>loci</i> genów szlaku Hedgehog	64
6.2. Analiza somatycznych zmian molekularnych techniką NGS	65
6.3. Ocena ekspresji genów w oparciu o łańcuchową reakcję polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR)	75
6.3.1. Porównanie profili ekspresji genów w kontroli pozytywnej i negatywnej	76
6.3.2. Profil ekspresji genów w grupie badanej - analiza w odniesieniu do profilu ekspresji kontroli negatywnej	77
6.3.3. Profil ekspresji genów w grupie badanej - analiza w odniesieniu do profilu ekspresji kontroli pozytywnej	81
6.3.4. Porównanie profili ekspresji genów w zależności od poszczególnych parametrów klinicznych	86
6.3.5. Analiza clustergramów	87
6.4. Porównanie somatycznych zmian molekularnych i stopnia ekspresji genów	90

szlaku Hh w grupie 14 przypadków	
7. DYSKUSJA	92
7.1. Dobór grup badanych	94
7.2. Analiza profili genomowych wewnątrzczaszkowych guzów germinalnych (iGCTs)	95
7.3. Analiza zmian molekularnych w oparciu sekwencjonowanie techniką NGS	98
7.4. Analiza ekspresji genów	103
7.5. Ocena zaangażowania białek szlaku Hedgehog oraz elementów współdziałających w patogenezę GCTs	107
8. WNIOSKI	117
9. PIŚMIENNICTWO	118
10. ZAŁĄCZNIKI	126
10.1. Najważniejsze geny kodujące białka szlaku Hh oraz zespoły genetyczne związane z ich mutacjami germinalnymi	126
10.2. Szczegółowa lista genów badanych techniką qPCR	128
10.3. Szczegółowa analiza profili ekspresji genów w grupach badanych	131
10.4. Spis tabel	142
10.5. Spis rycin	143

1. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

aCGH	porównawcza hybrydyzacja genomowa oparta na mikromacierzach (ang. <i>array comparative genomic hybridization</i>)
AFP	alfa-fetoproteina
AYA	młodzi dorośli (ang. <i>adolescents and young adults</i>)
BCC	rak podstawnokomórkowy (ang. <i>basal cell carcinoma</i>)
β -hCG	podjednostka beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (ang. <i>β-human chorionic gonadotropin</i>)
BCNS; NBCCS	Zespół nabłoniaków znamionowych, zespół Gorlina (ang. <i>basal cell nevus syndrome; nevoid basal cell carcinoma syndrome</i>)
BOC; BOC	Boc homolog (gen; białko)
cDNA	komplementarny DNA (ang. <i>complementary DNA</i>)
CHC	rak kosmówki (ang. <i>choriocarcinoma</i>)
CNV	polimorfizm liczby kopii genu (ang. <i>copy number variation</i>)
Ct	cykl graniczny (ang. <i>threshold cycle</i>)
Cy3	Cyanine 3 - barwnik fluorescencyjny
Cy5	Cyanine 5 - barwnik fluorescencyjny
Cys	cysteina
Da	dalton; kDa – kilodalton
ddH ₂ O	woda podwójnie destylowana
DHH; DHH	desert hedgehog (gen; białko)
DNA	kwask deoksyrybonukleinowy
DSD	zaburzenia rozwoju płci (ang. <i>disorders of sex development</i>)
Dys	rozrodczak (ang. <i>dysgerminoma</i>)
EC	rak zarodkowy (ang. <i>embryonal carcinoma</i>)
EDTA	kwask etylenodiaminotetraoctowy
g	gram
GCNIS	neoplazja komórek zarodkowych in situ (ang. <i>germ cell carcinoma in situ</i>)
GCT	guz germinalny (ang. <i>germ cell tumor</i>)
gDNA	genomowy DNA
GLI1; GLI1	GLI family zinc finger 1 (gen; białko)
GLI2; GLI2	GLI family zinc finger 2 (gen; białko)
GLI3; GLI3	GLI family zinc finger 3 (gen; białko)
Gly	glicyna

godz.	godzina; również: h
GPCR	grupa receptorów sprzężonych z białkami G (ang. <i>G Protein-Coupled Receptor</i>)
h	godzina; również: godz
HHIP; HHIP	<i>hedgehog interacting protein</i> (gen; białko)
IHH; IHH	indian hedgehog (gen, białko)
kpz	kilo par zasad
l	litr, dm ³
LDH	dehydrogenaza mleczanowa (ang. <i>lactate dehydrogenase</i>)
M	stężenie molowe, mol/dm ³ ; mM - stężenie milimolowe
MB	rdzeniak zarodkowy (ang. <i>medulloblastoma</i>)
mg	miligram
min.	minuta
ml	mililitr
Mpz	mega par zasad
mRNA	matrycowy RNA (ang. <i>messenger RNA</i>)
NaCl	chlorek sodu
NaOH	wodorotlenek sodu
ng	nanogram
NSGCTs	nienasieniakowate guzy germinalne (ang. <i>nonseminomatous germ cell tumors</i>)
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
p	poziom istotności statystycznej
PGCs	pierwotne komórki płciowe (ang. <i>primordial germ cells</i>)
pmol	pikomol
PTC lub PTCH; PTC lub PTCH	patched (gen; białko)
qPCR	PCR w czasie rzeczywistym (ang. <i>quantitative PCR</i>)
RNA	kwasy rybonukleinowe (ang. <i>ribonucleic acid</i>)
RNAza	rybonukleaza
rpm	obroty na minutę (ang. <i>revolutions per minute</i>)
RT	temperatura pokojowa (ang. <i>room temperature</i>)
r.ż.	rok życia
SDS	dodecylosiarczan sodu
sek.	sekunda
SHH; SHH	sonic hedgehog (gen; białko)
SMO; SMO	smoothened (gen; białko)
SUFU; SUFU	<i>suppressor of fused</i> (gen; białko)

temp.	temperatura
Ter	potworniak (ang. <i>teratoma</i>); potworniak dojrzały (Ter M, ang. <i>teratoma maturum</i>); potworniak niedojrzały (Ter Im, ang. <i>teratoma immaturum</i>)
TGCTs	guzy germinalne jądra (ang. <i>testicular germ cell tumors</i>)
TRIS	2-amino-2-hydroksymetylo-1,3-propandiol
YST	guz pęcherzyka żółtkowego (ang. <i>yolk sac tumor, endodermal sinus tumor</i>)
VAF	częstość występowania allelu (ang. <i>variant allele frequency</i>)
μg	mikrogram
μl	mikrolitr

2. STRESZCZENIE

Guzy germinalne (ang. *germ cell tumours* – GCTs) stanowią heterogenną grupę nowotworów wywodzących się z pierwotnych komórek płciowych na różnych etapach ich różnicowania. Mogą się rozwinąć w gonadach i pozagonadalnie, w tym, wewnątrzczaszkowo. Patogeneza tych nowotworów, zwłaszcza u dzieci, nie jest dokładnie poznana. Szlak sygnałowy *Sonic Hedgehog* (szlak Hh) odgrywa istotną rolę w regulacji migracji i specyfikacji wielu linii komórkowych w okresie embrionalnym m.in. pierwotnych komórek płciowych. Ma również wpływ na kształtowanie się gonad i różnicowanie płciowe. Po okresie embrionalnym aktywność szlaku Hh jest wyciszana i ogranicza się głównie do oddziaływania na populacje komórek progenitorowych i zapasowych. Mutacje germinalne w genach kodujących elementy szlaku Hh opisano w wielu zespołach rozwojowych, w tym w zespole Gorlina, charakteryzującym się licznymi guzami w obrębie skóry, mózgu i jajników. Nieprawidłową aktywację szlaku Hh oraz somatyczne zmiany molekularne w genach kodujących poszczególne elementy kaskady zaobserwowano również w nowotworach m.in. raku żołądka, płuca, piersi, prostaty, skóry, w glejakach, rdzeniakach czy nowotworach hematologicznych. Rola szlaku sygnałowego Hh w guzach germinalnych nie została dotychczas dokładnie poznana. Jej szczegółowe opracowanie mogłoby stanowić podstawę do włączenia inhibitorów szlaku Hh do protokołów leczenia.

Celem pracy była ocena zmian molekularnych w genach kodujących białka szlaku *Sonic Hedgehog* w guzach germinalnych wieku dziecięcego. Podjęto próbę oceny stanu aktywacji szlaku sygnałowego Hh w guzach germinalnych wieku rozwojowego. W tym celu opracowano szczegółową metodologię umożliwiającą ocenę profilu genomowego, analizę obecności mutacji somatycznych oraz zmian w ekspresji genów.

Materiał badawczy do analizy stanowił kolejno: 1) DNA wyizolowany z fragmentów mrożonej tkanki nowotworowej guzów (n=13) do analizy somatycznych profili genomowych; 2) DNA wyizolowany z fragmentów tkanki nowotworowej guzów zatopionej w parafinie (n=27) do analizy wariantów somatycznych genów szlaku Hh; 3) RNA wyizolowany z fragmentów tkanki nowotworowej guzów zatopionych w parafinie (n=24) do analizy ekspresji genów szlaku Hh. Materiał tkankowy pochodził z zasobów zgromadzonych podczas realizacji projektu NCN 04-0155/09/324 (kierownik: prof. dr hab. E. Iżycka-Świeszewska).

Analizę porównawczą profili genomowych wykonano z wykorzystaniem techniki mikromacierzy-CGH+SNP (aCGH) o rozdzielczości ~80kB. Ocenę zmian somatycznych w genach związanych ze ścieżką Hh przeprowadzono za pomocą techniki sekwencjonowania następnej generacji (NGS) z użyciem specjalnie zaprojektowanego panelu QIAseq (*Qiagen*). Analizę ekspresji genów szlaku Hh wykonano z wykorzystaniem

techniki PCR w czasie rzeczywistym (rtPCR) z użyciem panelu do badania ekspresji 84 kluczowych genów związanych ze szlakiem (*Hedgehog Signaling Pathway RT2 Profiler PCR Array; Qiagen*).

W ponad połowie (62%; 8/13) badanych przypadków wewnątrzczaszkowych GCTs stwierdzono niezrównowagę genomu pod postacią mnogich zmian liczbowych i strukturalnych. Najczęstszymi zmianami liczbowymi były: trisomie chromosomu 21 i 19 oraz monosomie chromosomu 13 i 18. Najczęściej występująca aberracja strukturalna dotyczyła fragmentu krótkiego ramienia chromosomu 12 (3/13; 23% guzów). Najczęstsze zmiany liczby kopii genów szlaku Hh dotyczyły genów *PTCH1* (*locus* 9q22.32) oraz *ZIC2* (*locus* 13q32.3).

Analiza 27 guzów GCTs wykazała obecność 26 zmian molekularnych, tym dziewięć mutacji patogennych, osiem wariantów sekwencyjnych o nieznanym znaczeniu klinicznym oraz dziewięć rzadkich wariantów polimorficznych. Najczęściej zmiany patogene stwierdzono w genie *KIT* (37%) zaś wśród genów związanych ze szlakiem Hh najwięcej wariantów sekwencyjnych stwierdzono w obrębie genu *LRP2*. Spośród genów kodujących kluczowe białka szlaku Hh, opisano jedynie mutację w genie *DISP2* w jednym przypadku mieszanego guza jądra oraz pojedyncze warianty o nieznanym znaczeniu klinicznym w genach *SMO*, *GLI2* i *GLI3*.

Analiza stopnia ekspresji genów wykazała różnice w profilach ekspresji dla kanonicznych białek szlaku Hh pomiędzy poszczególnymi podtypami histologicznymi GCTs. Poziomy ekspresji kluczowych genów szlaku nie były niższe niż poziom stwierdzany w kontrolnej tkance prawidłowej, natomiast dla niektórych z nich stwierdzono istotną nadekspresję w tkance nowotworowej. Porównanie profili ekspresji wykazało również istotne różnice w porównaniu do Shh-aktywnego podtypu *medulloblastoma* co wskazuje na odmienną aktywność szlaku w przebiegu nowotworzenia tych dwóch grup guzów.

Przeprowadzone w niniejszej pracy analizy mają charakter badań pilotażowych, które miały na celu opracowanie szczegółowej metodyki poszczególnych analiz uwzględniającej heterogenność tej grupy guzów. Uzyskane wyniki pozwoliły na wstępną ocenę zaangażowania i zmian molekularnych elementów szlaku Hh w guzach germinalnych u dzieci. Uzyskane dane wskazują na selektywną aktywację pojedynczych elementów, która raczej prowadzi może do dysregulacji fizjologicznych procesów dojrzewania niż być czynnikiem spustowym, który uruchamia proces onkogenezy. Z uwagi na jednostkowy charakter stwierdzanych zmian, przy małej liczbie guzów objętych analizą, kompleksowa ocena roli zaburzeń molekularnych obejmujących *loci* związane ze szlakiem Hh w patogenezie GCT jest jednak na tym etapie niemożliwa. Opracowanie metodologii i wyniki pilotażowe umożliwiły kontynuację i ukierunkowanie dalszych badań w ramach projektu NCN „Znaczenie szlaku sygnalizacyjnego SHH w patogenezie i progresji guzów germinalnych wieku rozwojowego”.

2.1. Abstract

Germ cell tumors (GCTs) are a heterogeneous group of neoplasms originating from primordial germ cells at various stages of their differentiation. GCTs develop in the gonads and extragonadal, including intracranial. The pathogenesis of these tumors, especially in children, is not fully described. The Hedgehog signaling pathway (Hh pathway) plays an important role in migration and specification of many cell lines during the embryo development including primordial germ cells. It also affects gonadal formation and sexual differentiation. After the embryonic period the activity of the Hh pathway is diminished and limited mainly to the progenitor cell populations. Germinal mutations in the Hh pathway genes have been described in many developmental syndromes, including Gorlin syndrome (*PTCH1*), which is characterized by numerous tumors affecting skin, brain and ovaries. Aberrant activation of Hh pathway and somatic mutations have also been observed in many cancers including stomach, lung, breast, prostate, skin, in gliomas, hepatomas or hematological cancers. The role of the Hh signaling pathway in GCTs has not yet been precisely understood. Its detailed scientific description could be the premise for including Hh pathway inhibitors in treatment protocols.

The aim of the study was to assess molecular changes in Hedgehog pathway genes in childhood germ cell tumors. An attempt was made to assess the activation of the Hh signaling pathway in germinal tumors of developmental age. A detailed methodology was developed to investigate genomic profiles, presence of somatic mutations and changes in gene expression.

The research material for the analysis was: 1) aCGH technique: DNA isolated from fragments of frozen tumor tissue (n = 13); 2) NGS technique: DNA isolated from fragments of tumor tissue embedded in paraffin (n = 27); 3) gene expression analysis (rtPCR): RNA isolated from formalin-fixed paraffin-embedded tumor tissues (n=24). The material resources was collected within the frames of the research project 04-0155/09/324 (PI: dr hab. E. Łzycka-Świeszewska) founded by the NCN (National Science Centre).

Genomic profiles analysis was performed using microarray-CGH+SNP (aCGH) technique with a resolution of ~80kB. The mutational analysis of the genes associated with the Hh pathway was performed using the next generation sequencing technique (NGS) with a custom-designed QIAseq Targeted DNA panel (Qiagen). Gene expression analysis of Hedgehog pathway genes was performed using real-time PCR (rtPCR) using an array involving 84 key genes (Hedgehog Signaling Pathway RT2 Profiler PCR Array; Qiagen).

Multiple numerical and structural genomic imbalances were present in more than half (62%; 8/13) of intracranial GCTs. The most common numerical changes included 21 and 19 trisomies and 13 and 18 monosomies. The most common structural aberration concerned the short arm of chromosome 12 (3/13; 23% of tumors). The most commonly observed copy

number changes of the Hh pathway genes covered *PTCH1* (9q22.32) and *ZIC2* (13q32.3) loci.

Mutational analysis of 27 GCTs revealed 26 molecular changes, including: 9 pathogenic mutations, 8 sequence variants of unknown clinical relevance, and 9 rare polymorphic variants. Most often, pathogenic changes were found in the *KIT* gene (37%). Among genes associated with the Hh pathway sequence variants within the *LRP2* gene were most commonly found. Among genes encoding key proteins of the Hh pathway only one probably pathogenic mutation in the *DISP2* gene present in a case of a mixed testicular germ cell tumor and single variants of unknown significance in the *SMO*, *GLI2* and *GLI3* genes have been described.

Gene expression analysis revealed differences in expression profiles for canonical Hh pathway genes between GCTs histological subtypes. Expression levels of key pathway genes were not lower than those found in control (mature normal tissue). For some genes significant overexpression in tumor tissue was found. Comparison of expression profiles showed also significant differences in reference to the Shh-active medulloblastoma. It might indicate that disruption of the Shh pathway differs between those two type of cancers.

This work presents pilot studies, which were primarily aimed at assessing the technical capabilities of individual tests performed on material from such a heterogeneous group of tumors. At the same time, obtained results allowed for an initial evaluation of Hh pathway elements involvement in GCTs pathogenesis. The obtained data suggest presence of a selective activation of individual pathway elements, which may rather lead to dysregulation of physiological maturation processes than be a trigger factor that activates oncogenesis. Due to the individual nature of the changes found and the limited number of tumors studied a comprehensive assessment of the complex molecular changes in Hh pathway loci associated with the GCTs pathogenesis is not possible at present stage of the study. The specific methodology and pilot results enabled the continuation and point the direction of further research in the NCN project titled: 'The importance of the SHH signaling pathway in the pathogenesis and progression of developmental germline tumors'.

3. WSTĘP

3.1. GUZY GERMINALNE

Guzy germinalne (GCTs; ang. *germ cell tumors*) wywodzą się z pierwotnych komórek płciowych (PGCs; ang. *primordial germ cells*) na różnych etapach ich różnicowania. Stanowią grupę nowotworów heterogenną pod względem budowy histologicznej, wieku zachorowania, płci chorego, lokalizacji narządowej, zmian molekularnych oraz rokowania dla pacjenta. GCTs rozwijają się wewnątrz i pozaczaszkowo, gdzie mogą lokalizować się gonadalnie i pozagonadalnie. Guzy pozagonadalne występują głównie w linii środkowej ciała (w okolicy krzyżowo-ogonowej, zaotrzewnowej, śródpiersiu, okolicy głowy i szyi), ale mogą też rosnąć w obrębie narządów mięszzowych.

3.1.1. Charakterystyka kliniczna nowotworów germinalnych

Częstość występowania guzów germinalnych jest różna w poszczególnych grupach wiekowych: u małych dzieci, w wieku dojrzewania i u dorosłych oraz odmienna dla różnych lokalizacji guza. Ogólną zachorowalność na GCTs w populacji europejskiej szacuje się na ~34/1.000.000 z wyraźnymi różnicami występowania u mężczyzn (~64/1.000.000) i u kobiet (~4/1.000.000) [Trama i Berrino, 2017].

U dzieci częstość GCTs szacuje się na 0,5-0,9/100000 dzieci do lat 15 z wyróżnieniem dwóch wyraźnych szczytów zapadalności: 0-3 r.ż. oraz w okresie dojrzewania. U noworodków GCTs stanowią 35-40% wszystkich diagnozowanych guzów w pierwszym miesiącu życia [Cecchetto, 2014; Frazier i wsp., 2012; Pierce i wsp., 2017]. Guzy germinalne stanowią 2-4% wszystkich nowotworów występujących u dzieci w wieku do 15 lat oraz 14% pozagonadalnych guzów u młodych dorosłych w wieku 15-19 lat (ang. *adolescents and young adults*; AYA) [Drożyńska i wsp., 2015; Malogolowkin i wsp., 2003; Zambrano i wsp., 2017]. U dzieci połowa nowotworów zlokalizowana jest pozagonadalnie (~20% wewnątrz-, ~30% pozaczaszkowo), najczęściej w okolicy krzyżowo-ogonowej (20%) i w obrębie centralnego układu nerwowego (20%). U osób dorosłych dominuje umiejscowienie w gonadach (~90%) [Rescorla, 2012].

Histologicznie większość guzów germinalnych u małych dzieci to potworniaki dojrzałe (ang. *mature teratoma*, TM) i rzadziej niedojrzałe (ang. *immature teratoma*). Guzy złośliwe stanowią ok. 20% pediatrycznych GCTs z przewagą rozpoznania guza pęcherzyka żółtkowego (YST, ang. *yolk sac tumor, endodermal sinus tumor*) [Zambrano i wsp., 2017].

U nastolatków od okresu dojrzewania oraz u młodych osób dorosłych (13-24 r.ż.) częstość występowania GCTs istotnie wzrasta do ~60/1000000 u mężczyzn

oraz ~8/1000000 u kobiet z wyraźną przewagą występowania u płci męskiej [Murray i Nicholson, 2009; Calaminus i Joffe, 2016]. W tej grupie wiekowej dominują guzy gonadalne. GCTs u nastolatków (*ang. postpubertal GCT*) występują w postaci nasieniaków (*ang. seminoma*) lub złośliwych guzów nienasieniakowatych (*NSGCTs, ang. non-seminomatous germ cell tumors*). U mężczyzn dominuje typ *seminoma* [Calaminus i Hoffe, 2016].

Guzy zarodkowe jądra (*TGCTs, ang. testicular germ cell tumors*) stanowią 90% pierwotnych nowotworów jąder. Jest to najczęściej występujący nowotwór niehematologiczny u mężczyzn w wieku 15-34 lat. Guzy germinalne jajnika występują częściej u młodych kobiet i dzieci niż u kobiet starszych, stanowiąc nawet do 70% wszystkich guzów jajnika u dziewczynek i nastolatek. U młodych kobiet GCTs jajnika tworzą grupę bardziej jednorodną pod względem histologicznym, podczas gdy u kobiet starszych częściej występują guzy mieszane wykazujące znacznie gorsze rokowania.

Pozagonadalne lokalizacje GCTs obejmują najczęściej śródpiersie, ośrodkowy układ nerwowy oraz okolicę krzyżowo-ogonową. Wewnątrzczaszkowe guzy germinalne występują przede wszystkim u nastolatków płci męskiej stanowiąc 5,4-15,3% guzów centralnego układu nerwowego diagnozowanych u dzieci. Pierwotne ognisko guza zlokalizowane jest zazwyczaj w okolicy nadsiodłowej lub okolicy szyszynki, lecz możliwe jest występowanie GCTs również w podwzgórzu i ścianie III komory [Huang i wsp., 2016].

Guzy germinalne w zależności od lokalizacji ogniska pierwotnego mogą prezentować różnorakie objawy, dlatego też ich rozpoznanie kliniczne może być utrudnione. W diagnostyce stosuje się przede wszystkim metody obrazowe np. ultrasonografię w połączeniu z badaniem biopsyjnym. Większość guzów wydziela substancje takie jak α -fetoproteina (AFP), podjednostka β ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (β -hCG) czy dehydrogenaza mleczanowa (LDH) oznaczalne w surowicy krwi, będące markerami biochemicznymi GCTs (tab. 1). Prawidłowa interpretacja poziomu w.w. markerów może ułatwić diagnostykę, prognozowanie przebiegu choroby, monitorowanie odpowiedzi pacjenta na leczenie czy szybkie wykrycie wznowy. Alfa-fetoproteina nie jest jednak specyficznym markerem guzów germinalnych: fizjologicznie podwyższony poziom AFP występuje u noworodków i młodych niemowląt, jak również przy uszkodzeniach wątroby czy po operacjach przewodu pokarmowego. Ani AFP, ani β -hCG nie przenikają przez barierę krew-mózg, dlatego też u osób z podejrzeniem guza zlokalizowanego wewnątrzczaszkowo konieczne jest również badanie płynu mózgowo-rdzeniowego [Penn i wsp., 2014].

Tabela 1. Wydzielanie markerów biochemicznych przez podtypy GCTs

Zmodyfikowano za: Dufour i wsp. (2014) oraz Murray i Nicholson (2009).

Legenda: „+” - wydzielanie markera; „-” - brak wydzielania markera; „++” - wysoki poziom wydzielania markera

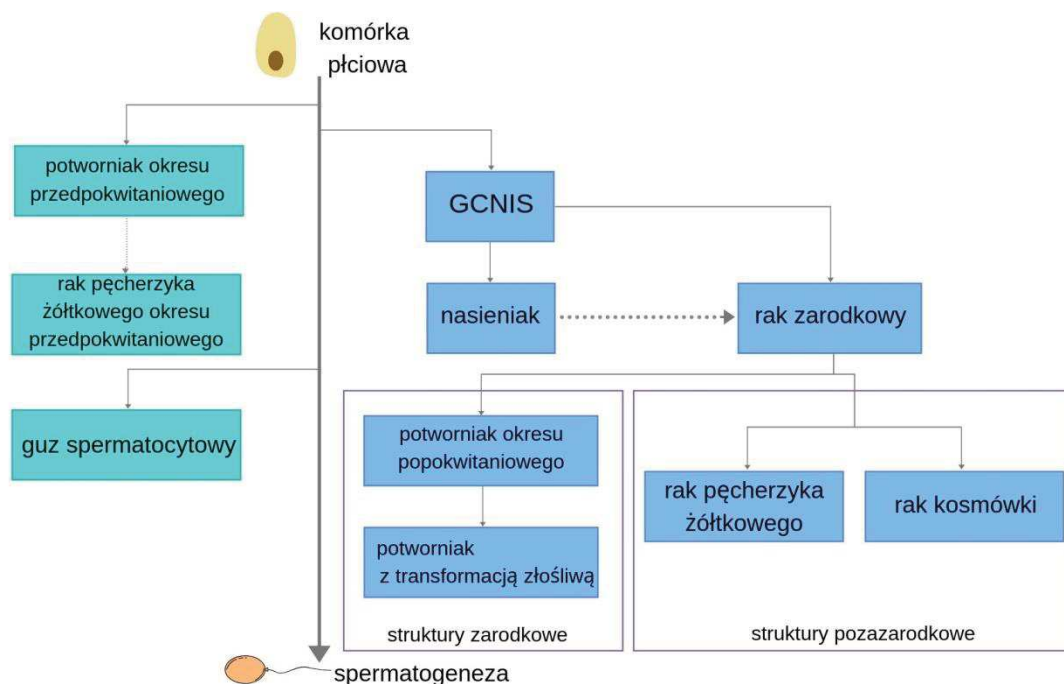
Podtyp histologiczny guza	AFP	β-HCG
rak zarodkowy	+/-	+/-
guz pęcherzyka żółtkowego	++	-
rak kosmówki	-	++
Potworniak	+/-	-
germinoma / dysgerminoma / seminoma	-	+/-

Większość guzów germinalnych przejawia znaczną wrażliwość na chemio- i radioterapię oraz charakteryzuje się wysokim wskaźnikiem wyleczalności nawet przy występowaniu rozległych przerzutów. Dobór odpowiedniej terapii zależy od stadium zaawansowania guza oraz jego lokalizacji i obejmuje chirurgiczną resekcję guza, oraz kombinację radio- i chemioterapii, skutkujące całkowitą remisją choroby u ponad 98% pacjentów we wczesnym stadium choroby oraz u 80% pacjentów w zaawansowanym stadium obejmującym przerzuty [Bagrodia i wsp. 2018]. U znacznego odsetka pacjentów (ok. 10%) możliwe jest jednak wystąpienie chemiooporności, co prowadzi do braku efektywności leczenia i zgonu pacjenta.

Standardowe leczenie farmakologiczne oparte na cisplatynie i cytostatykach alkilujących (np. etopozyd) obarczone jest jednakże poważnymi skutkami ubocznymi, które istotnie wpływają na dalszą jakość życia pacjentów, zwłaszcza pacjentów pediatrycznych. Najczęstsze powikłania po terapii standardowej obejmują zaburzenia płodności, uszkodzenia słuchu i nerek. Chemio- i radioterapia są także znanymi czynnikami ryzyka rozwoju wtórnych chorób nowotworowych takich jak białaczki, chłoniaki, rak pęcherza, okrężnicy, trzustki, nerek, żołądka, tarczycy czy tkanek miękkich. U pacjentów po terapii mogą również wystąpić potencjalne późne objawy toksyczne, takie jak choroba sercowo-naczyniowa, zespół metaboliczny, hipogonadyzm, osteoporoza czy depresja [Taylor-Weiner i wsp., 2016; Kooijmans i wsp., 2019]. Po leczeniu możliwe jest ponadto występowanie zmian resztkowych, które w miarę możliwości powinny być usunięte chirurgicznie. Zalecane jest również usunięcie zaotrzewnowych węzłów chłonnych jako miejsca najszybszego przerzutowania guzów.

Rycina 1. Schematyczne przedstawienie typów guzów zarodkowych

Zmodyfikowano za: Cheng i wsp (2018)



3.1.2. Typy histologiczne GCTs

Obraz histologiczny tej heterogennej grupy nowotworów odzwierciedla potencjał rozwojowy i wielokierunkowość różnicowania się komórek, z których się wywodzą (ryc. 1). Kategorie histologiczne GCTs przedstawiono w Tabeli 2. Na przestrzeni lat powstało wiele różnych klasyfikacji i kryteriów diagnostycznych GCTs. Powszechnie stosowane są wytyczne Światowej Organizacji Zdrowia - WHO - kategoryzujące nowotwory zarodkowe wg lokalizacji w poszczególnych narządach. Najszerzej scharakteryzowane są GCTs w gonadach - guzy jądra i jajnika [Mutter i Prat, 2014; Williamson i wsp, 2016]. Analogicznie klasyfikuje się GCTs pod względem histologii w różnych lokalizacjach pozagonadalnych z uwzględnieniem niewielkich różnic w kryteriach np. złośliwości potworniaków. W diagnostyce GCTs obok oceny morfologicznej stosuje się immunofenotypizację. Znaczny odsetek guzów germinalnych stanowią guzy o mieszanej histologii.

Dodatkowo, z punktu widzenia klinicznego uwzględniającego rokowanie pacjentów i wrażliwość na chemioterapię, GCTs można podzielić na trzy duże grupy: 1) potworniki; 2) guzy nasieniakowate (SGCT; ang. *seminomatous germ cell tumors*), do których należą nasieniak, dysgerminoma i rozrodczak; 3) guzy nie-nasieniakowate (NSGCT; ang. *non-seminomatous germ cell tumors*) obejmujące pozostałe typy nowotworów zarodkowych, w tym również nowotwory o mieszanej histologii.

Tabela 2. Podział histologiczny GCTs

Typ histologiczny		Nazwa angielska
rak zarodkowy		<i>embryonal carcinoma, EC</i>
guz pęcherzyka żółtkowego		<i>yolk sac tumor, YST</i>
rak kosmówki		<i>choriocarcinoma, CHC</i>
potworniak:		<i>teratoma</i>
	potworniak dojrzały	<i>mature teratoma</i>
	potworniak niedojrzały	<i>immature teratoma</i>
	torbiel dermoidalna	<i>dermoid cyst</i>
	potworniak z transformacją złośliwą	<i>teratoma with somatic type malignancy</i>
Grupa:	rozrodczak	<i>Germinoma</i>
	dysgerminoma	<i>Dysgerminoma</i>
	nasieniak	<i>Seminoma</i>
wielozarodkowiak		<i>Polyembryoma</i>
rozrodczak zarodkowy		<i>Gonadoblastoma</i>

Potworniki powstają z wielopotencjalnych komórek zarodkowych dających początek trzem listkom zarodkowym. Potworniki niedojrzałe zbudowane są z komórek i tkanek niedojrzałych histologicznie, przypominających tkankę zarodkową lub płodową. Istotna jest obecność prymitywnego *neuroepithelium*. Potworniki dojrzałe zawierają utkanie zróżnicowanych dojrzałych tkanek reprezentujących pochodne wszystkich listków zarodkowych. Złośliwość kliniczna guzów z grupy *teratoma* zależy od wieku i płci pacjenta, cech histologicznych i molekularnych oraz lokalizacji guza. Potworniki, zarówno dojrzałe i niedojrzałe, mogą również występować z dodatkowym heterologicznym komponentem złośliwym typu raka lub mięsaka.

Najbardziej prymitywną histologicznie jest grupa (tzw. typu *seminoma*) identycznych morfologicznie nowotworów nazywanych zależnie od lokalizacji: rozrodczak - rozwijający się w OUN i pozagonadalnie, dysgerminoma w jajniku oraz nasieniak w jądrze. Nowotwory te zbudowane są z względnie jednorodnych, dużych, okrągłych komórek o jasnej cytoplazmie i hyperchromatycznych dużych okrągłych jądrach. Komórki te przypominają pierwotne gonocyty. Tkanka guzów jest podzielona na słabo odgraniczone zraziki, wykazuje niską aktywność mitotyczną, a w podścielisku obecne są limfocyty.

W guzach jądra rozwijających się u mężczyzn po zakończeniu dojrzewania płciowego jako prekursorowa zmiana dla GCTs występuje neoplazja komórek zarodkowych *in situ* (GCNIS; ang. *germ cell neoplasia in situ*) będąca wspólnym prekursorem zarówno SGCTs jak i NSGCTs. GCNIS stwierdza się w ok. 80-95% przypadków w tkance na obrzeżu guza. W pozostałych lokalizacjach nowotworów germinalnych i przedpokwitaniowych grupach wiekowych rozrostów GCNIS nie obserwuje się [Montironi i wsp., 2016].

Dużą część GCTs stanowią mieszane guzy germinalne składające się z kilku różnych komponentów – tzw. mieszane guzy germinalne. Zazwyczaj zawierają one elementy

potworniaka i raka zarodkowego, rzadko natomiast w okresie przedpokwitaniowym występuje połączenie potworniaka i guza pęcherzyka żółtkowego.

Rak zarodkowy zbudowany jest z prymitywnych niskodojrzałych komórek wykazujących różnicowanie do zarodkowych struktur nabłonkowych. Komórki o wysokim indeksie mitotycznym tworzą układy lite, pęcherzykowe i pseudogruzołowe. W formie czystej rak zarodkowy występuje rzadko, częściej jako komponent guzów mieszanych.

Guz pęcherzyka żółtkowego (ang. *yolk sac tumor, YST*) to złośliwy, prymitywny guz, który różni się od struktur pozaembrionalnych (pęcherzyka żółtkowego, omocznia, mezenchymy pozaembrionalnej). Wykazuje różne wzorce różnicowania endodermalnego, prezentując kilkanaście podtypów utkania histologicznego.

Rak kosmówki to wysoce złośliwy nowotwór występujący w gonadach i pozagonadalnie. Najczęściej jest komponentem guzów mieszanych. Może być też formą choroby trofoblastycznej związanej z ciążą i wtedy jest zlokalizowany w macicy. Histologicznie zawiera nowotworowy cytotrofoblast i syncytiotrofoblast bez tworzenia kosmków. Wykazuje wysoką naczynio-inwazyjność, krwotoczność i skłonność do martwicy.

Wielozarodkowiak jest guzem bardzo rzadkim, wykazuje cechy zarówno guza pęcherzyka żółtkowego jak i niezróżnicowanego potworniaka/raka zarodkowego.

Rozrodczak zarodkowy (ang. *gonadoblastoma*) to nowotwór zawierający elementy zarówno komórek zarodkowych np. duże pierwotne komórki germinalne, niedojrzałe komórki Sertoliego lub komórki ziarniste sznura płciowego, jak i komórki zrębu gonad. Zmiana ta występuje najczęściej w gonadach dysgenetycznych i jest prekursorem inwazyjnych GCTs.

3.1.3. Patogeneza guzów germinalnych

Pierwotne komórki płciowe, zwane też gonocytami, są totipotencjalne tzn. posiadają zdolność różnicowania się we wszystkie tkanki zarodkowe (ektoderma, endoderma i mezoderma) oraz tkanki pozazarodkowe (łożysko i pęcherzyk żółtkowy) organizmu. PGCs migrują dzięki ruchom morfogenetycznym od ok. 3. do 6. tygodnia życia płodowego ze ściany pęcherzyka żółtkowego do grzebieni płciowych gdzie tworzą zawiązki gonad [Richardson i Lehmann, 2010; Murray i Nicholson, 2009]. Proces kształtowania się gonad odbywa się dzięki czasowo-przestrzennej regulacji ekspresji genów kodujących białka wielu szlaków sygnałowych (m.in. WNT, Notch, FGF, PI3K/Akt lub TGFB/E-kadheryny) [Windley i Wilhelm, 2015]. W konsekwencji, większość GCTs jest zlokalizowanych w gonadach. Zakłócenie migracji pierwotnych komórek płciowych prowadzi do ich zasiedlenia wzdłuż linii środkowej ciała. Stąd też guzy wywodzące się z PGCs mogą być zlokalizowane również pozagonadalnie – na „trasie” wędrówki PGCs w trakcie okresu embrionalnego –

wewnątrzczaszkowo i pozaczaszkowo: w śródpiersiu lub zaotrzewnowo [Murray i Nicholson, 2009, Richardson i Lehmann, 2010].

Postulowane hipotezy rozwoju guzów germinalnych oprócz zaburzeń procesu migracji komórek PGCs obejmują również ich powstawanie z miejscowej transformacji pierwotnych komórek płciowych na skutek utrwalenia sygnałów przeżyciowych, które pobudzają proliferację i predestynują do zmian onkogennych, zahamowanie dojrzewania PGCs, zahamowanie procesu apoptozy czy zaburzenia podziału komórkowego mitozy-mejoza. Na poziomie molekularnym zaburzenia te wynikają ze zmian w ekspresji wielu genów, produkcji pewnych klas miRNA, oddziaływania mikrośrodowiska guza oraz deregulacji szlaków sygnałowych aktywnych podczas wczesnego rozwoju embrionalnego [Pierce i wsp., 2018; Lobo i wsp., 2019].

3.1.4. Profil genetyczny guzów germinalnych

Badania cytogenetyczne guzów litych mają na celu identyfikację charakterystycznych markerów zarówno o znaczeniu diagnostycznym jak i potencjalnie terapeutycznym i/lub rokowniczym. Wśród zidentyfikowanych w guzach germinalnych zmian cytogenetycznych (np. genów fuzyjnych) żadna, poza duplikacją/amplifikacją ramion krótkich chromosomu 12p, nie wydaje się być zmianą znamioną. Z drugiej jednak strony należy podkreślić, iż istnieje zwiększone ryzyko rozwoju guzów germinalnych w grupie pacjentów z zaburzeniami różnicowania płci (ang. *disorders of sex development; DSD*). U osób o kariotypach 46,XY oraz mos45,X/46,XY z dysgenezą gonad istnieje 10-50% ryzyko rozwoju GCT w gonadach. Występuje również związek pomiędzy występowaniem zespołu Turnera lub Swyera u kobiet a występowaniem guzów germinalnych jajnika. Ponadto u mężczyzn z zespołem Klinefeltera wykazano zwiększone ryzyko rozwoju GCTs w okolicy śródpiersia oraz, w mniejszym stopniu, innych pozagonadalnych guzów zarodkowych [Hersmus i wsp., 2017; King i Conway, 2014; Looijenga i wsp., 2010; Murray i Nicholson, 2009; Penn i wsp., 2014]. Przyczyny zwiększonego ryzyka zachorowalności na GCTs w w.w. zespołach chorobowych nie są do końca poznane, aczkolwiek najprawdopodobniej wynikają z zaburzeń kontroli hormonalnej nad rozwojem układu płciowego [Looijenga i wsp., 2010]. Podwyższone ryzyko rozwoju TGCTs należy do spektrum objawów również innych chorób wynikających z niezrównoważenia genomu, w tym zespołu Downa [Lutke Holzik i wsp., 2004].

Przeprowadzone dotychczas badania cytogenetyczne GCTs ujawniły różne profile genomowe tych guzów, zależne od lokalizacji anatomicznej (gonadalne / pozagonadalne) oraz wieku pacjenta (zwłaszcza przed- i po-pokwitaniowe). Najszerzej reprezentowaną aberracją chromosomową wśród guzów germinalnych jest występowanie dodatkowych kopii

fragmentów lub całego chromosomu 12, najczęściej pod postacią izochromosomu 12p (i12p). Jest to niemalże uniwersalny marker GCTs jądra u osób dorosłych. i12p występuje również, ale w dużo mniejszym stopniu, w GCTs jajnika u kobiet, natomiast w guzach pediatrycznych występuje rzadziej. Wśród genów zaangażowanych w reorganizację chromosomu 12p są m.in. *NANOG*, *STELLAR*, *GDF3* czy *EDR1* niezbędne do zachowania pluripotencjalności komórek; *CCND2* i *KRAS* powiązanych z proliferacją czy *EK11*, *SOX5* i *DAD-R* hamujących procesy apoptozy [Korkola i wsp., 2006; Oosterhuis i Looijenga, 2017; Pierce i wsp., 2018].

Zmiany w liczbie chromosomów oraz występowanie strukturalnych aberracji chromosomowych w guzach u dzieci <4 r.ż zależne jest od ich utkania histologicznego. W potworniaku, najczęściej występującym podtypie histologicznym u dzieci, nie opisano dotychczas typowych zmian cytogenetycznych. Guzy te w większości przypadków są po prostu diploidalne bez reorganizacji chromosomowych. W guzie pęcherzyka żółtkowego u dzieci opisano natomiast dodatkowy materiał genetyczny w regionach chromosomów: 1q, 3, 3p, 8q24, 12p13, 20q i 22 oraz utratę fragmentów: 1p, 4, 4q, 6q, 16q i 20p [Palmer i wsp., 2007; Oosterhuis i Looijenga, 2017; Pierce i wsp., 2018].

Ponad 90% GCTs diagnozowanych u pacjentów po rozpoczęciu dojrzewania zlokalizowanych jest w jądrze. Guzy te zazwyczaj są około-triploidalne. GCTs w tej samej grupie wiekowej zlokalizowane w jajniku, śródpiersiu czy mózgu mogą być natomiast około-diploidalne lub około-tetraploidalne. Niezależnie od lokalizacji guza za aberrację charakterystyczną dla tego typu GCTs uważa się wspomniane powyżej powielenie kopii krótkiego ramienia chromosomu 12p, zazwyczaj w formie i12p. Ponadto, guzy te, poza nielicznymi wyjątkami, cechują się również dodatkowym materiałem genetycznym z chromosomów X, 7, 8, 13 i 21 oraz utratą chromosomów Y, 1p, 11, 13 i 18. Ważną podgrupę stanowią nowotwory centralnego układu nerwowego, w których dominuje typ histologiczny *germinoma*. Połowa z nich jest około-diploidalna, a pozostała część około-tetraploidalna [Wang i wsp., 2014; Oosterhuis i Looijenga, 2017; Fetcko i Dey, 2018].

Mniej dotychczas poznane i opisane w literaturze są somatyczne defekty pojedynczych genów, zwłaszcza patogenne warianty punktowe (ang. *point mutations*), które w GCTs występują stosunkowo rzadko w porównaniu do innych guzów litych. W zależności od lokalizacji guza, rozpoznania histologicznego i wieku zachorowania pacjenta opisywane są różne zmiany. Najczęściej, mutacje somatyczne stwierdzone są w GCTs wieku pokwitania i u młodych osób dorosłych. Wśród genów, w których zaobserwowano zmiany somatyczne są: *KIT*, *TP53*, *KRAS*, *CDKN2A*, *CBL*, *MTOR*, *PTEN*, *NF1*, *NRAS*, *PTPRB*; jednakże mutacje dotyczą zazwyczaj niewielkiego odsetka z całej puli badanych pacjentów [Oosterhuis i Looijenga, 2017]. Genem, w którym najczęściej występują zmiany patogenne jest gen *KIT*. Mutacje te rzadko występują w guzach nienasieniakowatych, a częściej

w grupie nasieniaków zlokalizowanych w jądrze (30%), jajniku (do 50%), śródpiersiu (38%) oraz w mózgu (powyżej 50%). Mutacje w genach *KRAS* i *NRAS* występują znacznie rzadziej. W guzach germinalnych jądra (TGCTs) zaobserwowano istotny odsetek mutacji w genach *KIT*, *KRAS* oraz *NRAS* [Shen H. i wsp., 2018]. Guzy germinalne ośrodkowego układu nerwowego wykazują ponadto inaktywujące mutacje w genie *CBL* [Wang i wsp., 2014; Oosterhuis i Looijenga, 2017; Phi i wsp., 2018].

3.2. SZLAK SYGNALIZACYJNY HEDGEHOG

3.2.1. Białka Hedgehog

Pod koniec lat 70-tych w prowadzonych na dużą skalę badaniach przesiewowych, podczas których poszukiwano mutacji zakłócających proces embriogenezy larwy muszki owocówki (*łac. Drosophila melanogaster*) wyodrębniono warianty genetyczne powodujące zaburzenia procesu segmentacji larwy. Badania te stały się ważnym krokiem w zrozumieniu wielu podstawowych procesów rozwojowych, a jednym z genów opisanych w 1980 roku przez Christiane Nüsslein-Volhard i Erica F. Weischausa był gen Hedgehog (*HH*) nazwany tak ze względu na specyficzny fenotyp embrionów *D. melanogaster*, które pozbawione genu *HH* pokryte są cienkimi wypustkami, co wzbudziło skojarzenia naukowców z wyglądem jeża [Nüsslein-Volhard i Weischaus, 1980; Rimkus i wsp., 2016]. We wczesnych latach 90. XX w. odkryto homologiczne geny *HH* u kręgowców m.in. u danio pręgowanego, kury domowej, myszy, szczura śniadego oraz u człowieka. Obecnie, geny z rodziny *HH* u ssaków dzieli się na trzy podgrupy: Sonic Hedgehog (*SHH*), Indian Hedgehog (*IHH*) oraz Desert Hedgehog (*DHH*) [Varjosalo i Taipale, 2008].

SHH, *IHH* oraz *DHH* należą do rodziny białek Hedgehog, które aktywują szlak sygnałowy Hedgehog. Białka *HH* kontrolują wiele różnych procesów rozwojowych w tym proliferację, różnicowanie i komunikację międzykomórkową. Pełnią istotną rolę w organogenezie, spermatogenezie oraz podtrzymywaniu populacji komórek macierzystych [Lee i wsp., 2006]. Dane eksperymentalne stanowią przesłanki sugerujące rolę szlaku sygnalizacyjnego *Hh* w regulacji migracji i różnicowania pierwotnych komórek płciowych oraz jego wpływu na procesy kształtowania się gonad i różnicowania płciowego, jednak ta funkcja szlaku Hedgehog u ssaków pozostaje dotychczas nie do końca poznana [Desphande i wsp., 2001; Renault i wsp., 2009].

W zależności od konkretnych warunków białka Hedgehog mogą działać jako: 1) morfogeny, które zależnie od swojego stężenia wpływają na przyszłe losy komórki; 2) mitogeny regulujące proliferację komórek czy jako 3) czynniki indukujące, które kontrolują postać rozwijającego się narządu [Robbins i wsp., 2012]. Przypuszcza się, że wszystkie białka rodziny *HH* u ssaków mają zbliżone efekty fizjologiczne, a różnice w ich roli w rozwoju organizmu wynikają z odmiennych wzorców ekspresji. Różne ligandy *HH* często działają w tych samych tkankach podczas rozwoju i mogą mieć częściowo sprzeczne działania. Ekspresja genu *DHH* jest w dużej mierze ograniczona do gonad, w tym komórek Sertoliego w jądrze oraz komórek ziarnistych jajnika. Ekspresja *IHH* jest specyficzna dla pierwotnej endodermy, jelita oraz chondrocytów w płytkach wzrostu kości [Carballo i wsp., 2018; Varjosalo i Taipale, 2008]. Największą rolę spośród rodziny białek Hedgehog w rozwoju

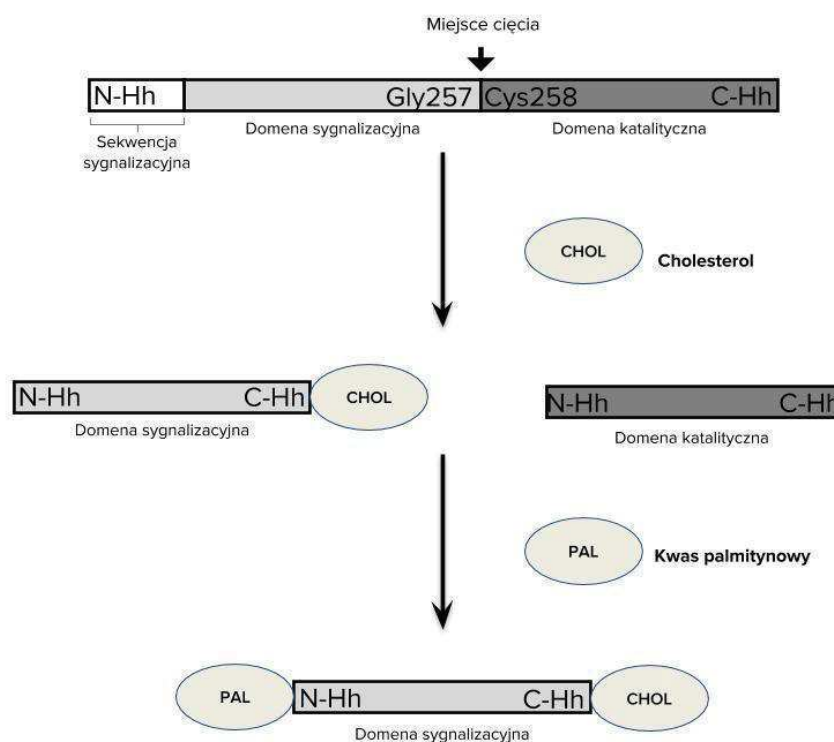
embrionalnym kręgowców przypisuje się białku Sonic hedgehog (SHH), które jest najbardziej rozpowszechnionym ligandem szlaku Hh u kręgowców i przypuszcza się, że może mieć wpływ na rozwój prawie wszystkich organów [Petrova i Joyner, 2014]. Działając jako morfogen bierze udział w tworzeniu integralnej struktury wielu układów podczas embriogenezy, takich jak kresomózgowie środkowe [Rash i Grove, 2011] i grzebienie nerwowe [Bhatt i wsp., 2013]; w tworzeniu osi i kierunkowaniu wzrostu kończyn [Scherz i wsp., 2007], rozwoju twarzy i wyrostka czołowo-nosowego [Xavier i wsp., 2016], jak również kontroluje prawidłowy wzrost i morfogenezę zębów i skóry [Dassule i wsp., 2000]. Najlepiej jednak poznana jest rola, jaką SHH pełni w kształtowaniu ośrodkowego układu nerwowego (OUN) w trakcie rozwoju embrionalnego kręgowców. Znaczna ekspresja *SHH* w tkankach linii pośredniej, w tym w zawiązku układu nerwowego, strunie grzbietowej i blaszce brzusznej określa kształtowanie się lewo-prawej oraz grzbietowo-brzusznej osi zarodka [Varjosalo i Taipale, 2008; Kong i wsp., 2019].

Po okresie embrionalnym działanie szlaku sygnalizacyjnego Hh ogranicza się głównie do utrzymania populacji komórek macierzystych i progenitorowych w licznych narządach i tkankach m.in włosach, skórze, zębach, mózgu, krwi, prostaty, mięśniach, pęcherzu, kościach. Szlak Hh pozostaje również aktywny w sygnalizacji ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego u osób dorosłych [Lum i Beachy, 2004; Petrova i Joyner, 2014].

Białka Hedgehog syntezowane jako prekursor o masie ok. 45 kDa poddawane są serii procesów obróbki potranslacyjnej (ryc. 1). Proces cięcia, katalizowany przez C-końcową część prekursora generuje dwa fragmenty: C-końcowy o masie 25 kDa, którego funkcja ogranicza się do przeprowadzenia samej reakcji cięcia oraz N-końcowy o masie ok. 19 kDa odpowiedzialny za aktywność biologiczną białek HH [Jeong i McMahon, 2002]. Do N-końcowego produktu cięcia dodawana jest cząsteczka cholesterolu. Przyłącza się ona do reszty glicyny znajdującej się na C-końcu fragmentu, co ogranicza przestrzenne rozmieszczanie się dojrzałego sygnału poprzez jego insercję do warstwy lipidowej błony komórkowej [Mann i Beachy, 2004; Porter i wsp., 1996]. Usunięcie krótkiego N-końcowego peptydu sygnałowego ujawnia resztę cysteiny, która ulega drugiej modyfikacji lipidowej - dodaniu kwasu palmitynowego. Białka Hedgehog są jedynymi znanymi dotychczas przykładami cząsteczek sygnałowych modyfikowanych przez cholesterol. Uważa się, że cząsteczka cholesterolu reguluje zdolność białka HH do rozpraszania się w mikrośrodowisku w trakcie embriogenezy oraz odgrywa rolę w sygnalizacji zarówno o dalekim jak i bliskim zasięgu; podczas gdy palmitynacja wzmacnia sygnał [Resh, 2013]. Obie modyfikacje lipidowe znacznie zwiększają hydrofobowość cząsteczek HH [Mann i Beachy, 2004]. Do uwolnienia dojrzałej cząsteczki ligandu z komórki wymagane jest wspólne działanie białek Dispatched (DISP) i Scube2. Transport ligandów odbywa się

w wyniku interakcji z białkami powierzchniowymi LRP2 (ang. *Lipoprotein receptor-related protein-2*) oraz rodziną glikoprotein (podgrupą proteoglikanów heparanosiarczanowych; (GPC1-6)).

Rycina 2. Proces obróbki potranslacyjnej białek z rodziny Hedgehog
Zmodyfikowano za: *Randall K. Mann i Philip A. Beachy (2004) oraz Cohen MM Jr (2010)*

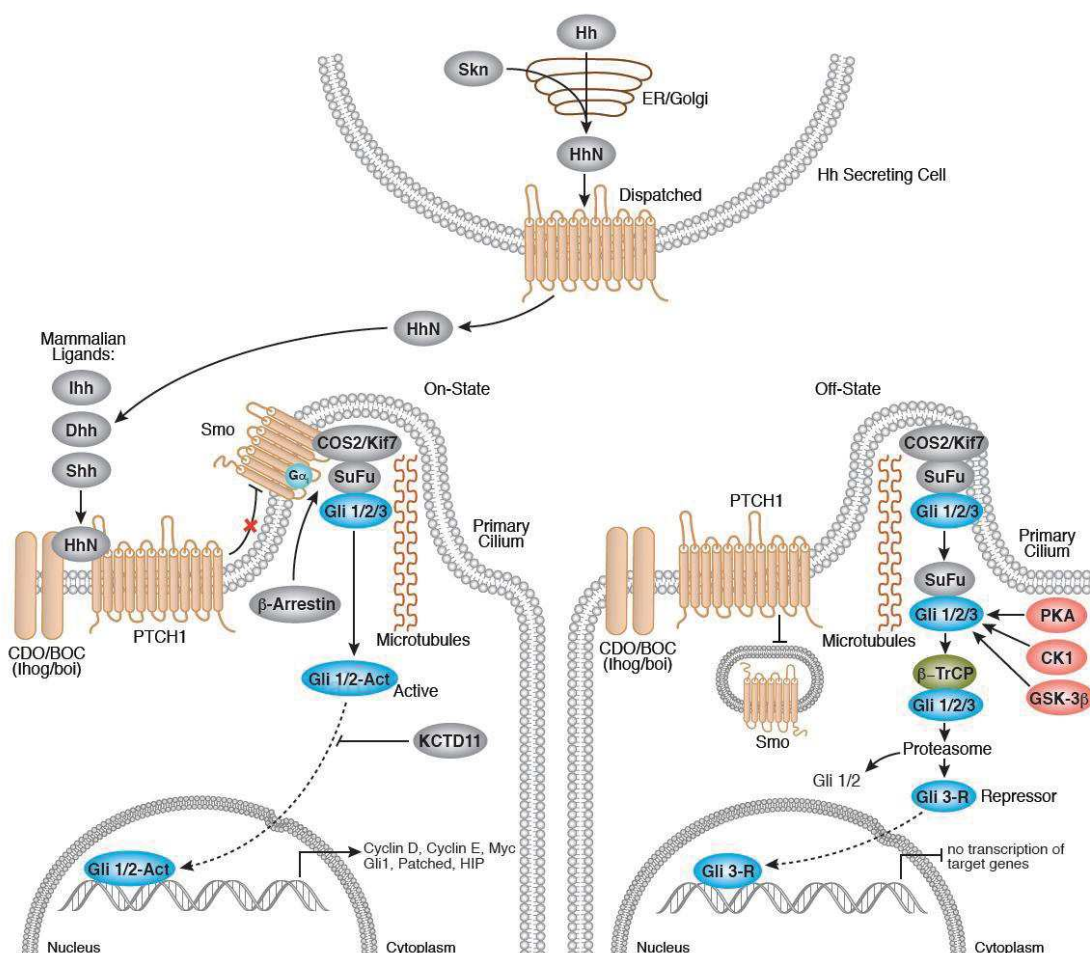


3.2.2. Aktywacja ścieżki sygnałowej Hedgehog

U kręgowców kaskada sygnałowa Hedgehog może być aktywowana na różne sposoby. Pierwszy z nich nazywany kanonicznym/klasycznym wymaga obecności jednego z ligandów należących do rodziny białek Hedgehog (SHH, IHH lub DHH). Niekanoniczna aktywacja sygnalizacji Hh może przebiegać na dwa sposoby: z udziałem komponentów szlaku Hh lub poprzez bezpośrednią stymulację czynników transkrypcyjnych GLI, np. poprzez interakcje elementów szlaku sygnałowego Hedgehog z innymi szlakami molekularnymi [Gonnissen i wsp., 2015; Jenkins, 2009].

Klasyczna droga aktywacji zależna od ligandu

Pierwszy etap aktywacji szlaku sygnałowego Hedgehog wymaga interakcji pomiędzy białkiem z rodziny HH i kompleksem przezłonowych receptorów Patched (PTC, PTCH) i Smoothened (SMO) znajdujących się bezpośrednio w błonie komórki docelowej (ryc. 3).



Rycina 3. Schemat działania szlaku sygnałowego Hedgehog.

Reprodukcja za zgodą Cell Signaling Technology, Inc. /

Illustration reproduced courtesy of Cell Signaling Technology, Inc. (www.cellsignal.com).

Legenda: Active – aktywny; Cytoplasm – cytoplazma; Hh secreting Cell – komórka wydzielająca Hh; Mammalian ligands – ligandy u ssaków; Microtubules – mikrotubule; No transcription of target genes – brak transkrypcji genów docelowych; Nucleus – jądro komórkowe; Off-State – stan nieaktywny; On-State – stan aktywny; Primary Cilium – pierwotne rzęski; Proteasome – proteasom; Repressor – represor

Pierwszy z receptorów, PTC/PTCH, konstytucyjnie hamuje sygnalizację Hedgehog. Oprócz receptora PTC zidentyfikowano inne białka powierzchniowe należące do nadrodziny immunoglobulin/ fibronektyn, które regulują sygnalizację Hedgehog: BOC (Boc homolog) oraz CDON (Cdon). Białka te oddziałują ze sobą fizycznie tworząc kompleks mający wysokie

powinowactwo do ligandu HH. Zarówno CDON jak i BOC są wymagane dla maksymalnej aktywności szlaku Hedgehog [Lum i Beachy, 2004; Varjosalo i Taipale, 2008].

Wiązanie ligandu z receptorem PTCH powoduje jego internalizację i degradację. Skutkuje to usunięciem hamującego wpływu PTC na białko SMO należące do grupy receptorów transbłonowych sprzężonych z białkiem G (GPCR; ang. *G Protein-Coupled Receptor*) [Lum i Beachy, 2004]. W wyniku aktywacji i akumulacji białka SMO dochodzi do oddysocjowania czynników transkrypcyjnych GLI od inhibujących białek SUFU (ang. *Suppressor of fused*), a następnie przemieszczenia do jądra komórkowego i rozpoczęcia transkrypcji genów docelowych, wśród których znajdują się *PTCH1* oraz *GLI1*; regulowane kolejno w ujemnym i dodatnim sprzężeniu zwrotnym; oraz m.in. geny *HOX*, *FGF-4*, *NRP*, *VEGF*, *CAPN1*, *WNT* [Carballo i wsp., 2018; Girardi i wsp., 2019].

U kręgowców istnieją trzy czynniki transkrypcyjne GLI: GLI1, GLI2 oraz GLI3, będące bezpośrednimi efektorami ścieżki sygnałowej Hedgehog. Spośród nich tylko GLI1 jest wyłącznie i w pełni aktywatorem transkrypcji. Zarówno GLI3 jak i, w mniejszym stopniu, GLI2 mogą działać jako aktywatory (GLI^A) lub represory (GLI^R) transkrypcji w zależności od potranskrypcyjnych i potranslacyjnych modyfikacji [Gonnissen i wsp., 2015; Rimkus i wsp., 2016]. Przy braku ligandu HH, GLI2 i GLI3 poddawane są częściowej degradacji co skutkuje usunięciem C-końcowej domeny aktywatora i przekształcenia do represorów transkrypcji. Aktywatory transkrypcji, głównie $GLI2^A$, powstają tylko w odpowiedzi na stymulację ligandem [Petrova i Joyner, 2014].

W literaturze opisano kilka modyfikatorów sygnalizacji Hh, z których kluczowym jest *Suppressor of fused homolog* (SUFU). W przypadku braku ligandu SUFU pełni funkcję negatywnego regulatora szlaku. Działa poprzez bezpośrednie wiązanie się do czynników transkrypcyjnych GLI i zakotwiczenie ich w cytoplazmie, co uniemożliwia transkrypcję genów od nich zależnych [Rimkus i wsp., 2016]. Istotnymi negatywnymi regulatorami ścieżki sygnalizacyjnej Hh są również białka wiążące HHIP (*Hedgehog interacting protein*) oraz GAS1 (*growth arrest-specific 1*), które regulują ilość dostępnego ligandu Hh działając poprzez konkutowanie z PTCH1 o jego wiązanie.

Aktywacja niezależna od ligandu

Ścieżka Hedgehog może być również aktywna przy braku dostępnego ligandu uruchamiającego kaskadę sygnalizacyjną. Pod nieobecność ligandu ścieżka aktywowana jest od poziomu receptorów PTCH (typ I) i/lub SMO (typ II), lecz niezależnie od transkrypcji GLI lub poprzez bezpośrednie stymulowanie czynników transkrypcyjnych GLI niezależnie od PTCH/SMO. Często czynnikiem indukującym sygnalizację Hh niezależną od ligandu są mutacje w genach kodujących poszczególne elementy szlaku, np. poprzez aktywujące

mutacje w genie *SMO*, czy inaktywujące mutacje w genach *PTCH1* czy *SUFU*, co również skutkuje uruchomieniem sygnalizacji Hedgehog w tzw. sposób niekanoniczny. Zjawisko to częściej występuje w procesie nowotworzenia [Gonnissen i wsp., 2015; Sari i wsp., 2018; Skoda i wsp., 2018]. Czynniki transkrypcyjne GLI mogą również ulec aktywacji w wyniku działania onkogennych ścieżek sygnalizacyjnych takich jak mTOR czy RAS/RAF/MEK/ERK [Niewiadomski i wsp., 2019]. Również działanie cząsteczek cytotoskycznych może aktywować lub wzmacniać działanie czynników transkrypcyjnych GLI np. TNF- α i IL-1 β poprzez ścieżkę sygnałową NF- κ B w raku trzustki i piersi czy TGF- β poprzez ścieżkę sygnałową SMAD3 [Girardi i wsp., 2019; Faria i wsp., 2019].

3.2.3. Znaczenie ścieżki Hh w rozwoju embrionalnym

Rozległe badania prowadzone na mysich zarodkach pozwoliły ustalić, że SHH, obok PTCH1 i SMO, jest jednym z kluczowych elementów w rozwoju embrionalnym myszy. Utrata obu kopii genu *SHH* prowadzi do powstania wielu wad rozwojowych ośrodkowego układu nerwowego w tym holoprosencefalii z cyklopią, defektów cewy nerwowej oraz jelita przedniego. Późniejsze defekty obejmują deformacje kończyn, brak kręgow i większości żeber oraz nieprawidłowe rozgałęzianie płuc. Zarodki pozbawione obu kopii genów *SMO* lub *PTCH1* obumierają w rozwoju embrionalnym, pomimo ich przeciwstawnych efektów - delecja *SMO* prowadzi do zablokowania sygnalizacji Hh a utrata *PTCH1* do nadmiernego jej działania [Petrova i Joyner, 2014]. U człowieka zidentyfikowano szereg jednostek chorobowych powiązanych ze zmianami molekularnymi w genach kodujących białka szlaku Hh. W załączniku 10.1 zebrano dotychczas opisane zespoły genetyczne wynikające z konstytucyjnego (germinalnego) uszkodzenia genów powiązanych ze szlakiem Hh. Ponadto, również w procesach patologicznych np. zapaleniu, remodelingu czy regeneracji tkanek obserwuje się dysfunkcję aktywności ścieżki Hh [Shen X. i wsp., 2017].

3.2.4. Aktywacja ścieżki sygnałowej Hh w nowotworzeniu

Sygnalizacja Hedgehog związana jest z rozwojem i progresją wielu typów nowotworów m.in. jest zaangażowana w cały szereg aspektów ich powstawania, w tym w utrzymanie populacji nowotworowych komórek macierzystych (ang. *cancer stem cells*; CSC). Nieprawidłowa aktywacja szlaku Hedgehog po okresie embrionalnym może być spowodowana zmianami patogennymi w genach kodujących jego poszczególne elementy przekaźnikowe (aktywacja niezależna od ligandu) lub przez nadekspresję HH (aktywacja zależna od ligandu). Specyficzny rodzaj aktywacji zależnej od ligandu wykazują guzy, które wydzielają ligand HH w sposób parakryny. Działają w ten sposób na komórki zrębu guza, które w odpowiedzi wysyłają sygnały promujące wzrost lub przeżycie guza [Scales

i de Sauvage, 2009]. Przełom w zrozumieniu roli, jaką sygnalizacja Hh odgrywa w procesie nowotworzenia nastąpił wraz z odkryciem w 1996r. mutacji w genie supresorowym *PTCH1* (MIM *601309), które prowadzą do rozwoju zespołu Gorlina (NBCCS/BCNS; ang. *nevoid basal cell carcinoma syndrome / basal cell nevus syndrome*) predysponującego do rozwoju raka podstawnokomórkowego (ang. *basal cell carcinoma; BCC*), rdzeniaka zarodkowego (ang. *medulloblastoma; MB*) oraz mięśniakomięsaka prążkowanokomórkowego (ang. *rhabdomyosarcoma*) [Evangelista i wsp., 2006; Sari i wsp., 2018]. Oprócz mutacji w genie *PTCH1* BCNS może być też spowodowany mutacjami w genie *PTCH2* (MIM *603673) lub w genie *SUFU* (MIM *607035). W sporadycznych przypadkach raka podstawno-komórkowego oraz w rdzeniaku stwierdza się niekiedy somatyczne mutacje w genie *PTCH2*. W kolejnych latach opisano wiele genów docelowych działania szlaku zaangażowanych w mechanizmy, za pomocą których szlak sygnałowy Hedgehog może brać udział w procesie onkogenezy np. działając poprzez mechanizm sprzężenia zwrotnego (np. *HHIP, PTCH1, GLI1*), wpływając na regulację cyklu komórkowego (np. *CYCLIN D1/D2*), proliferację (np. *PDGFR, MYC*) oraz apoptozę komórek (np. *BCL2*), działając na proces angiogenezy (np. *VEGF, ANG1/2*) oraz transformacji nabłonkowo-mezenchymalnej (ang. *epithelial-mesenchymal transition; EMT*) (np. *MMP9, SNAIL*) czy mając wpływ na samoodnowę komórek (np. *NANOG, SOX2*). Wykazano też, że wiele znanych szlaków onkogennych aktywuje sygnalizację Hedgehog np. PI3K, MAPK, Wnt, NF-κB, TGF-β. Aktywując czynniki transkrypcyjne Gli1/2, szlaki PI3K, MAPK i TGF-β, co najmniej częściowo, indukują działanie sygnalizacji Hh [Gonnissen i wsp., 2015; Rimkus i wsp., 2016; Pietrobono i wsp., 2019].

Nowotwory z aktywną sygnalizacją Hh

W wielu nowotworach m.in. płuca, trzustki, przewodu pokarmowego, prostaty, okrężnicy, jajnika, czy nowotworach hematologicznych takich jak chłoniaki B-komórkowe stwierdzono aktywację szlaku Hedgehog. Oprócz najobszerniej opisanych nowotworów z patologicznie aktywną sygnalizacją Hh jakimi są BCC i MBs, patogenne zmiany w genie *PTCH1* wykryto również w guzach *trichoepithelioma*. Natomiast mutacje w genach *PTCH1* i *SUFU* zidentyfikowano również w mięśniakomięsaku prążkowanym [Skoda i wsp., 2018]. Badania przeprowadzone na myszach lub nowotworowych liniach komórkowych pozwoliły rozróżnić zależny lub niezależny od ligandu sposób patogenicznej aktywacji sygnalizacji Hh w poszczególnych podtypach nowotworów (tab. 3).

Tabela 3. Rodzaj sygnalizacji Hedgehog w nowotworach

Zmodyfikowano za: Ita Novita Sari i wsp (2018) oraz Fujia Wu i wsp (2010)

Rodzaj aktywacji sygnalizacji Hh	Rodzaj nowotworu
Zależna od ligandu	rak prostaty rak jelita grubego rak wątroby rak piersi rak jajnika rak mózgu rak prostaty czerniak przewlekła białaczka szpikowa szpiczak mnogi chłoniaki
Niezależna od ligandu	<i>medulloblastoma</i> rak podstawnokomórkowy skóry <i>rhabdomyosarcoma</i>

Zarówno częsty złośliwy nowotwór mózgu u dzieci (*medulloblastoma*) jak i najczęstszy nowotwór tkanek miękkich u pacjentów pediatrycznych (*rhabdomyosarcoma*) wykazują niezależną od obecności ligandu aktywację sygnalizacji Hh. Również w innych nowotworach dziecięcych takich jak np. *osteosarcoma*, *neuroblastoma* czy mięsak Ewinga podkreśla się występowanie patogenicznej aktywacji sygnalizacji Hedgehog [Arnhold i wsp., 2016].

Deregulacja ścieżki Hh została opisana na różnych etapach rozwoju i progresji nowotworów. W raku trzustki i przełyku aktywację ścieżki Hh opisano we wczesnych stadiach rozwoju nowotworu, jak również w przerzutach, natomiast w nowotworach takich jak rak żołądka i rak gruczołu krokowego, aktywacja szlaku sygnałowego Hh związana jest z inwazją otaczającej tkanki i zwiększonym potencjałem tworzenia ognisk wtórnych [Skoda i wsp., 2018]. W niektórych typach nowotworów aktywacja szlaku ma znaczenie prognostyczne, np. ekspresja komponentów szlaku Hh koreluje z wyższym ryzykiem nawrotu i gorszym rokowaniem u kobiet z rakiem piersi [Pandolfi i Stecca, 2015]. Aktywność szlaku Hh została również powiązana z bardziej agresywnym wzrostem nowotworów m.in. raka jelita grubego, żołądka czy trzustki, co sugeruje gorsze rokowanie i mniejszą przeżywalność pacjentów.

Inhibitory szlaku Hh

W ciągu ostatnich dwóch dekad opracowano szereg cząsteczek, które mogą blokować działanie kaskady sygnalizacyjnej Hedgehog. Część z nich wytypowano jako potencjalne farmaceutyki mające zastosowanie w leczeniu celowanym nowotworów wykazujących nadmierną aktywację ścieżki Hh. Jedną z pierwszych substancji była

cyklopamina, alkaloid rośliny, którego działanie przeciwnowotworowe zostało w 1998r odkryte przy okazji badań nad teratogennym efektem paszy roślinnej u owiec. Pomimo obiecujących wyników badań *in-vitro* lek nie został wprowadzony do praktyki klinicznej z uwagi na trudności w syntezie chemicznej jak i toksyczne działanie w stosunku do innych białek, ze względu na małą selektywność [Sobolewska-Sztychny i Lesiak, 2015; Cooper i wsp., 1998]. W fazie badań klinicznych znajduje się aktualnie szeroka gama inhibitorów szlaku Hedgehog blokujących działanie m.in. SHH, SMO (*vismodegib*, *itakonazol*) czy PTCH (*robotnikin*). Na etapie badań przedklinicznych jest również duża grupa inhibitorów białka GLI1, które mogą mieć potencjalne zastosowanie w leczeniu m.in. raka podstawnokomórkowego, rdzeniaka zarodkowego i niektórych raków przewodu pokarmowego [Sari i wsp., 2018; Xie i wsp., 2019].

4. CELE PRACY

Celem niniejszego opracowania była ocena zmian molekularnych w genach kodujących białka szlaku Hedgehog w guzach germinalnych wieku dziecięcego.

W ramach jego realizacji sformułowano następujące cele szczegółowe:

1. Opracowanie metodologii analizy archiwalnej tkanki guzów GCT uwzględniającej heterogenność badanych guzów w tym jakość materiału tkankowego umożliwiającą ocenę profilu genomowego, analizę obecności mutacji somatycznych oraz zmian w ekspresji genów.
2. Identyfikacja profili genomowych wewnątrzczaszkowych guzów germinalnych wieku dziecięcego ze szczególnym uwzględnieniem elementów szlaku Hh przy zastosowaniu metody mikromacierzy-CGH.
3. Identyfikacja patogennych zmian somatycznych w genach szlaku Hh w GCTs przy użyciu techniki sekwencjonowania następnej generacji (NGS).
4. Ocena stanu aktywacji szlaku Hedgehog w GCTs na podstawie analizy ekspresji genów z wykorzystaniem metody qPCR oraz określenie i porównanie profili ekspresji w podtypach histologicznych guzów.

5. MATERIAŁ I METODY

Na przeprowadzenie badań zrealizowanych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej, będącej częścią projektu nr 04-0155/09/324 p.t. „Znaczenie szlaku sygnalizacyjnego SHH w patogenezie i progresji guzów germinalnych wieku rozwojowego” finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki (kier. prof. dr hab. Ewa Iżycka-Świeszewska, GUMed), uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do spraw badań naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym - nr NKBBN/597/2013.

5.1. Materiał

5.1.1. Charakterystyka grupy badanej

Materiał tkankowy pochodził z zasobów zgromadzonych podczas realizacji projektu NCN 04-0155/09/324. Dane kliniczne pacjentów pediatrycznych z polskich ośrodków onkologii dziecięcej pochodziły z bazy danych klinicznych grantu i Podgrupy Guzów Germinalnych Polskiej Grupy Guzów Litych w ramach PTOiHD prowadzonej przez prof. dr hab. E. Adamkiewicz-Drożyńską. W poniższej pracy badano wyłącznie guzy pediatryczne od pacjentów, którzy w momencie postawienia rozpoznania nie ukończyli 18 lat. Materiał badawczy pochodził od pacjentów leczonych w: Klinice Pediatrii, Hematologii i Onkologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Instytucie Matki i Dziecka w Warszawie; Oddziale Onkologii Dziecięcej Instytutu “Pomnik - Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie; Instytucie Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi; Uniwersyteckim Szpitalu Dziecięcym w Krakowie; Klinice Hematologii, Onkologii i Transplantologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie; Szpitalu Klinicznym im. Karola Jonschera Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu; Katedrze i Klinice Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu oraz Wojewódzkim Specjalistycznym Szpitalu Dziecięcym im. Władysława Buszkowskiego w Kielcach.

Grupa badana techniką porównawczej hybrydyzacji genomowej opartej na mikromacierzach (aCGH)

Do badania techniką mikromacierzy CGH zakwalifikowano 16 guzów śródczaszkowych pochodzących od 16 pacjentów przed wdrożeniem leczenia onkologicznego. W każdym przypadku przeprowadzone było badanie śródoperacyjne, podczas którego zabezpieczono tkanki do analiz molekularnych. W czterech przypadkach głęboko osadzonych guzów wykonano jedynie biopsję stereotaktyczną. Celem potwierdzenia rozpoznania histopatologicznego przeprowadzono barwienia immunohistochemiczne.

Panel użytych przeciwciał obejmował: Oct3, PLAP, AFP, CD30, CD117, cytokeratynę AE1/AE3, cytokeratynę 7, Glipikan 3, EMA, LCA, GFAP. Rozpoznanie histopatologiczne było weryfikowane w Zakładzie Patologii i Neuropatologii GUMed. Mrożone próbki z guzów po zakończonej diagnostyce histopatologicznej materiału, przekazane zostały do Katedry Biologii i Genetyki Medycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Do badania zostały zakwalifikowane próbki o komórkowości nowotworowej przekraczającej 70%.

Dane kliniczne obejmowały wiek pacjenta, typ guza oraz jego wielkość i lokalizację jak i zastosowane w późniejszym okresie leczenie. Analizowana grupa guzów składała się z ośmiu przypadków rozrodzaka, trzech guzów o typie potworniaka dojrzałego, jednego guza pęcherzyka żółtkowego) oraz jednego mieszanego guza germinalnego złożonego z komponenty *germinoma* i *teratoma*. Mediana wieku grupy badanej wynosiła 14 lat (5 miesięcy – 17 lat). Charakterystyka pato-kliniczna w.w. guzów przedstawiona została w Tabeli 4.

Ostatecznie, do przeprowadzenia eksperymentu użyto DNA wyizolowanego z fragmentów głęboko mrożonej tkanki nowotworowej 14 pacjentów. Izolacja DNA z dwóch przypadków nie powiodła się z powodów technicznych. Jako kontrolę zastosowano komercyjnie dostępny DNA referencyjny wyizolowany z ludzkich komórek żeńskich lub męskich (Agilent Technologies).

Grupa badana metodą sekwencjonowania następnej generacji (NGS)

Materiał badawczy do izolacji kwasów nukleinowych stanowiły skrawki tkanek guzów germinalnych utrwalonych w formalinie a następnie zatopionych w parafinie (FFPE; ang. *formalin-fixed paraffin-embedded*).

Wytypowana grupa 30 nowotworów obejmowała 27 guzów należących do sześciu różnych podtypów histologicznych: *teratoma maturum* (n=1), *teratoma immaturum* (n=1), *yolk sac tumor* (n=8), *dysgerminoma* (n=7), *carcinoma embryonale* (n=2), guzy mieszane (n=8). Ponadto przebadano dwa guzy typu *medulloblastoma* i przypadek raka podstawnokomórkowego skóry (BCC; ang. *basal cell carcinoma*) z wykazaną immunohistochemicznie aktywnością szlaku Hh (tab. 4). Mediana wieku badanej grupy 27 GCTs wynosiła 15 lat (2 miesiące – 17 lat i 8 miesięcy).

Grupa badana metodą PCR w czasie rzeczywistym (qPCR)

Do analizy ekspresji genów szlaku Hh użyty został kwas RNA wyizolowany ze skrawków tkanek GCTs FFPE (n=24). Z bazy ponad 100 guzów germinalnych wytypowano 24 przypadki, aby w reprezentatywny sposób pilotażowe badanie uwzględniało różnorodność histologiczną pediatrycznych GCTs. Wybrane guzy należały do sześciu

różnych podtypów histologicznych, z których wybrano po cztery przypadki: potworniak dojrzały, potworniak niedojrzały, guz pęcherzyka żółtkowego, *dysgerminoma*, rak zarodkowy oraz guzy mieszane. 19 z nich zlokalizowanych było w gonadach (11 w jądrach, 8 w jajnikach), 2 guzy były o lokalizacji krzyżowo-guzicznej oraz po jednym guzie zlokalizowanym w okolicy szyjnej, miednicy mniejszej i w śródpiersiu. Mediana wieku grupy badanej wynosiła 13,5 roku (2 tygodnie – 17 lat). Szczegółowa charakterystyka analizowanych przypadków jest przedstawiona w Tabeli 4.

Badanie wykonano również dla tkanek kontrolnych eksperymentu: kontroli pozytywnej, którą stanowiły dwa rdzeniaki zarodkowe (*medulloblastoma*) z potwierdzoną immunohistochemicznie aktywacją szlaku Hedgehog z wykorzystaniem przeciwciał anti-GLI1, anti-YAp1 oraz antiGab1 oraz kontroli negatywnej, którą były prawidłowe węzły chłonne. Tkanki te zostały wybrane na podstawie interpretacji analizy transkryptomicznej zamieszczonej w bazie danych *The Human Protein Atlas* (www.proteinatlas.org) [Uhlén i wsp., 2015].

Tabela 4. Charakterystyka kliniczna i histologiczna grupy badanej.

Legenda: M - płeć męska, K - płeć żeńska; BCC – rak podstawnokomórkowy; MB – rdzeniak zarodkowy; b.d. – brak danych
*przypadki, dla których z przyczyn technicznych nie uzyskano wyników profilu genomowego

** przypadki, dla których wykonano zarówno analizę ekspresji genów (qPCR) jak i analizę zmian molekularnych (NGS)

Przypadek	Wiek	Płeć (m/k)	Rozpoznanie histopatologiczne	Lokalizacja ogniska pierwotnego
guzy mrożone badane metodą aCGH				
#1	12 lat	M	potworniak dojrzały	okolica nadsiodłowa
#2	15 lat	M	rak pęcherzyka żółtkowego	okolica III i IV komory
#3	15 lat	M	rozrodczak	szyszynka
#4	16 lat	M	rozrodczak	okolica nadsiodłowa
#5	5 lat	M	potworniak dojrzały	szyszynka
#6	16 lat	M	rozrodczak	szyszynka
#7	9 lat	M	rozrodczak	okolica nadsiodłowa
#8	14 lat	M	rozrodczak	okolica szyszynki i nadsiodłowa
#9	15 lat	M	rozrodczak	szyszynka
#10	5 miesięcy	M	potworniak	okolica nadsiodłowa (płat czołowy)
#11	11 lat	M	rozrodczak	szyszynka
#12	17 lat	M	rozrodczak	śródmózgowie
#13	7 miesięcy	M	guz mieszany (potworniak/rozrodczak)	szyszynka
#14*	14 lat	K	rozrodczak	okolica nadsiodłowa

#15*	11 lat	M	guz mieszany (potworniak niedojrzały / rak zarodkowy)	okolica szyszynki i nadsiodłowa
#16*	16 lat	M	potworniak dojrzały	III komora
guzy utrwalone w formalinie zatopione w bloczkach parafinowych badane metodą qPCR i/lub NGS				
S01**	17 lat	M	rak zarodkowy	jądro
S02	11 lat	K	rozrodczak	jajnik
S03**	16 lat	K	rozrodczak	jajnik
S04**	16 lat	K	rozrodczak	jajnik
S05**	1 rok i 3 miesiące	M	guz pęcherzyka żółtkowego	jądro
S06**	11 miesięcy	M	guz pęcherzyka żółtkowego	jądro
S09**	12 lat	K	rozrodczak	miednica mniejsza
S10	16 lat	M	guz mieszany	jądro
S11**	17 lat	K	guz pęcherzyka żółtkowego	jajnik
S13	16 lat	K	rozrodczak	jajnik
S14	3 lata	M	guz pęcherzyka żółtkowego	jądro
S15	16 lat	M	guz mieszany	jądro
S16**	16 lat	M	rak zarodkowy	jądro
S17	13 lat	K	rozrodczak	jajnik
S18**	16 lat	M	guz mieszany	jądro
S19	17 lat i 8 miesięcy	M	guz mieszany	jądro
S20**	2 miesiące	M	potworniak niedojrzały	jądro
S21**	12 lat	K	guz pęcherzyka żółtkowego	jajnik
S22**	17 lat	K	guz mieszany	jajnik
S23	9 lat	K	potworniak dojrzały	jajnik
S24**	15 lat	M	guz mieszany	jądro
S25	2 lata	M	guz pęcherzyka żółtkowego	jądro
S26	1 rok i 1 miesiąc	M	guz pęcherzyka żółtkowego	jądro
S27	7 lat	K	rozrodczak	dysgenetyczna gonada
S28	17 lat	K	guz mieszany	jajnik
S29	2 lata	M	guz pęcherzyka żółtkowego	jądro
S30**	17 lat	M	guz mieszany	jądro
S31	16 lat	M	potworniak dojrzały	jądro
S32	1 miesiąc	K	potworniak dojrzały	okolica krzyżowo-ogonowa
S33	4 lata	M	potworniak dojrzały	jądro
S34	17 lat	K	potworniak dojrzały	jajnik
S35	3 lata	M	potworniak niedojrzały	śródpiersie
S36	2 tygodnie	K	potworniak niedojrzały	okolica krzyżowo-ogonowa
S37	19 dni	K	potworniak niedojrzały	szyja
S38	7 lat	K	rak zarodkowy	jajnik
S39	15 lat	M	rak zarodkowy	jądro
S40	11 lat	K	rozrodczak	jajnik
S07	66 lat	K	BCC	skóra
S08	17 lat	K	MB	mózg
S12	b.d.	b.d.	MB	b.d.

5.2. Metody

5.2.1. Aparatura

Tabela 5. Wykaz zastosowanej aparatury

Sprzęt	Producent
Termocykler GeneAmp System 2720	AB Applied Biosystems
Termocykler SimpliAmp	
2100 Bioanalyzer Instrument	Agilent Technologies
2100 Bioanalyzer Laptop	
Piec hybrydacyjny Shel Lab	
Miniwirówka do szkiełek mikromacierzowych	Arrayit Corporation
Termoblok Mini Dry Bath	Benchmark
Aparat do elektroforezy agarozowej PowerPac Basic	BioRad
Waga laboratoryjna	CAS
Aparat do oczyszczania wody PURELAB Classic	ELGA
Pipety automatyczne	Eppendorf
Wirówka laboratoryjna Eppendorf 5810R i 5804R	
Wirówka laboratoryjna Eppendorf 5414R	
Wirówka laboratoryjna MiniSpin	
Worteks Typ TTS2	IKA
Sekwenator NextSeq 550	Illumina
Wirówka próżniowa CENTRIVAP	Labconco
Pipety automatyczne Pipet-Lite XLS	Rainin
Blok grzejny 96-dołkowy	Roche
LightCycler 480 II	
Nanodrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific
Fluorymetr Qubit 2.0	
Cieplarka	
Zestaw do archiwizacji żeli Bio-Doc-It 220	UVP

5.2.2. Odczynniki

Tabela 6. Wykaz odczynników stosowanych w technice aCGH

Genomic DNA Purification Module	Agilent Technologies
Szkiełka mikromacierzowe (SurePrint G3 Cancer CGH+SNP 4x180K)	
Qubit DNA Broad Range Assay	
Zestaw do znakowania (SureTag DNA Labeling Kit)	
Zestaw do hybrydyzacji (Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Hybridization Kit)	
Zestaw do płukania szkiełek (Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1; Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 2)	
Dodecylosiarczan sodu	MP Biomedicals
EDTA	
Chloroform	MERCK
Izopropanol	
Etanol	POCH
Proteinaza K	ROCHE
Chlorek sodu	SERVA
QUBIT dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific

Tabela 7. Wykaz odczynników stosowanych w technice NGS

High Sensitivity DNA Kit Bioanalyzer	Agilent
NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (300 Cycles)	Illumina
PhiX Control Kit v3	
MP Biomedicals	MP Biomedicals
QIAseq 96-Index A set I (96 sample index for 384 samples on Illumina platform)	Qiagen
QIAseq DNA QuantiMIZE Array Kit	
QIAseq Targeted DNA Custom Panel – CDHS-16592Z-1090	
Etanol	POCH
Cobas DNA Sample Preparation Kit	Roche
QUBIT dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific

Tabela 8. Wykaz odczynników stosowanych w technice qPCR

Zestaw do izolacji RNA (RNeasy FFPE Mini Kit)	Qiagen
Zestaw do syntezy cDNA (RT ² Nano PreAmp cDNA Synthesis Kit)	
Zestaw do reakcji preamplifikacji (RT ² Nano PreAmp Primer Mix)	
Ksylen	MP Biomedicals
Etanol	POCH
SYBR Green (RT ² qPCR SYBR Green MasterMix)	Qiagen
Płytki do reakcji qPCR (RT ² Profiler PCR Array Human Hedgehog Signaling Pathway)	

5.2.3. Roztwory

Tabela 9. Wykaz roztworów stosowanych w procedurze izolacji DNA z mrożonej tkanki nowotworowej

75mM NaCl / 1mM EDTA	4,37g NaCl 2ml 0,5M EDTA, pH=8,0 Dopełnić ddH ₂ O do 1 litra. Wyjałowić.
10% SDS, pH=7,2	100g dodecylosiarczanu sodu dopełnić ddH ₂ O do 900 ml. Podgrzać do 68°C do pełnego rozpuszczenia. Ustalić pH=7,2 dodając stężonego NaCl. Dopełnić ddH ₂ O do 1 litra.
6M NaCl	350,64g NaCl dopełnić ddH ₂ O do 1 litra.
20mg/ml Proteinaza K	100mg rozpuścić w 5ml ddH ₂ O. Rozporcjować, przechowywać w -20°C.

5.2.4. Izolacja kwasów nukleinowych

Izolacja DNA z mrożonej tkanki nowotworowej

DNA z mrożonej tkanki nowotworowej izolowano techniką wysalania [Miller S.A. i wsp., 1988] według poniższej procedury:

1. Mrożony fragment tkanki nowotworowej rozdrobiono mechanicznie przy użyciu skalpela, a następnie przenoszono do probówki o pojemności 1,5ml.
2. Do probówki dodawano 500µl roztworu NaCl/EDTA, 50µl roztworu SDS oraz 2,5µl proteinazy K. Całość worteksowano przez 10 sekund.
3. Probówkę inkubowano w termobloku w temperaturze 56°C przez minimum 16h.

4. Po skończonej inkubacji dodawano do próbówki 200µl roztworu NaCl oraz 600µl chloroformu. Całość worteksowano przez 10 sek. oraz mieszano na mieszadle przez 10 min., a następnie wirowano przez 5 minut (20800 x g, RT).
5. Supernatant przenoszono do nowej próbówki o pojemności 1,5 ml. Dodawano 1 objętość zmrożonego izopropanolu. Probówkę mieszano przez kilkakrotne odwracanie, a następnie wirowano przez 10 minut (20800 x g, RT).
6. Usunięto supernatant, a pozostały osad przepłukano dodając 100µl roztworu 70% etanolu. Probówki wirowano przez 1 minutę (430 x g, RT). Płukanie powtórzono.
7. Po dokładnym usunięciu supernatantu osad suszono w termobloku w temperaturze 37°C przez ok. 30 minut do całkowitego odparowania pozostałości alkoholu.
8. Osad zawieszano w ddH₂O, a następnie inkubowano w temperaturze 37°C przez ok. 2 godziny. Mierzono stężenie oraz oceniano parametry jakości wyizolowanego kwasu nukleinowego. Przechowywano w -20°C.

Izolacja DNA z tkanki nowotworowej z bloczków parafinowych

Do uzyskania DNA z fragmentów tkanki nowotworowej zatopionej w parafinie użyto zestawu Cobas DNA Sample Preparation Kit (Roche). Jednorazowo w procesie izolacji DNA użyto 3 skrawków o grubości 4µm. Deparafinizację tkanki przeprowadzono z użyciem ksylenu.

Deparafinizacja tkanki z użyciem ksylenu

1. Do próbówki zawierającej skrawki tkanki dodano 1 ml ksylenu, worteksowano przez 10 sekund a następnie inkubowano przez 5 minut w RT.
2. Po inkubacji dodano 1 ml 96% etanolu, worteksowano próbówki przez 10 sekund, a następnie inkubowano przez 5 minut w RT.
3. Probówkę wirowano przy maksymalnej prędkości wirówki przez 2 minuty. Ostrożnie usunięto supernatant pipetą. Powtórzono punkty 1-3.
4. Do próbówki dodano 1 ml 96% etanolu, worteksowano przez 10 sekund. a następnie wirowano przy maksymalnej prędkości wirówki przez 3 minuty. Ostrożnie usunięto supernatant pipetą. Powtórzono.
5. Otwartą probówkę inkubowano w termobloku w temperaturze 56°C aż do całkowitego odparowania alkoholu.

Izolacja DNA

1. Z wysuszonej peletki wytworzono zawiesinę poprzez dodanie 180µl buforu do lizy tkanek (DNA TLB)
2. Do próbki dodano następnie 70µl uprzednio rozpuszczonego odczynnika PK.
3. Całość wortexowano przez 30 sekund, a następnie inkubowano przez 1h w termobloku o temp. 56°C.
4. Próbkę wortexowano przez 10 sekund, a następnie inkubowano w termobloku o temp. 90°C przez 1h.
5. Po schłodzeniu próbki do temperatury pokojowej, odwirowano ją pulsacyjnie, aby zebrać płyn z zatyczki.
6. Do próbki dodano 200µl odczynnika DNA PBB, całość przepipetowano i inkubowano przez 10 minut w RT.
7. Następnie dodano 100µl izopropanolu, przepipetowano i przenoszono do odpowiednio oznakowanej kolumny FT umieszczonej w próbówce CT. Całość wirowano z przyspieszeniem 8000 x g przez 1 minutę.
8. Każdą kolumnę FT umieszczano na nowej próbówce CT, a starą CT razem z zawartością eluatu odpowiednio utylizowano.
9. Do każdej jednostki FT/CT dodawano 500µl roboczego odczynnika WB I, a następnie wirowano z przyspieszeniem 8000 x g przez 1 minutę. Zawartość CT odpowiednio utylizowano i z powrotem umieszczano FT na tej samej CT.
10. Do każdej jednostki FT/CT dodawano 500µl roboczego odczynnika WB II, a następnie wirowano z przyspieszeniem 8000 x g przez 1 minutę.
11. Zawartość CT wyrzucano do odpadów chemicznych, a FT umieszczano na nowej CT. Całość wirowano przy maksymalnych obrotach wirówki przez 1 minutę.
12. Kolumnę FT umieszczano na próbówce do elucji o pojemności 1.5ml. Na środek membrany kolumny dodawano 100µl odczynnika DNA EB. Całość inkubowano w RT przez 5 minut, a następnie wirowano z przyspieszeniem 8000 x g przez 1 minutę. Mierzono stężenie otrzymanego eluatu DNA. Przechowywano w -20°C.

Izolacja RNA z tkanki nowotworowej zatopionej w parafinie

- do uzyskania całkowitego RNA z fragmentów tkanki nowotworowej zatopionej w parafinie użyto zestawu RNeasy FFPE Mini Kit (Qiagen)
- jednorazowo w procesie izolacji RNA użyto 3-5 skrawków o grubości 4µm
- deparafinizację tkanki przeprowadzono z użyciem ksylenu

Deparafinizacja tkanki z użyciem ksylenu

1. Do próbki zawierającej skrawki tkanki dodano 1 ml ksylenu, wortexowano przez 10 sekund a następnie wirowano przy maksymalnej prędkości wirówki. Ostrożnie usunięto supernatant pipetą. Proces powtórzono.
2. Do próbki dodano 1 ml 96% etanolu, zwortexowano, a następnie wirowano przy maksymalnej prędkości wirówki. Ostrożnie usunięto supernatant pipetą. Proces powtórzono.
3. Otwartą próbkę inkubowano w termobloku w temperaturze 37°C aż do całkowitego odparowania alkoholu.

Izolacja RNA

- powierzchnię blatu, pipety, statywy oraz wirówkę wyczyszczono z użyciem RNaseZap

1. Po całkowitym odparowaniu alkoholu do próbki dodawano 150µl buforu PKD. Całość krótko wortexowano.
2. Dodano 10µl proteinazy K, a następnie delikatnie przepipetowano.
3. Próbkę inkubowano w termocyklerze przez 15 min w temp. 56°C, następnie przez 15 minut w temp. 80°C. Próbkę natychmiast przełożono na лёd na 3 minuty. Próbkę wirowano 15 min przy 20,000 x g (13,500 rpm)
4. Supernatant przeniesiono do nowej próbki o pojemności 2ml.
5. Dodawano około 16µl buforu DNase Booster (ekwiwalent 1:10 supernatantu) oraz 10µl DNazy I. Wymieszano przez odwracanie oraz krótko zwirowano.
6. Próbkę inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej,
7. Kolejno dodano 320µl buforu RBC, całość przepipetowano. Dodano 720µl etanolu o stężeniu 96-100% i wymieszano przez pipetowanie.
8. Niezwłocznie przeniesiono 700µl mieszaniny na kolumnę RNeasy MiniElute i wirowano przez 15 sekund przy $\geq 8,000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm). Eluat wyrzucano. Punkt powtarzano, aż do całkowitego przepłynięcia mieszaniny próbki przez złoże kolumny.
9. Na złoże kolumny dodawano 500µl buforu RPE. Całość wirowano 15 sekund przy $\geq 8,000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm). Eluat wyrzucano.
10. Na złoże kolumny dodano 500µl buforu RPE. Całość wirowano 2 minuty przy $\geq 8,000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm). Eluat wyrzucano razem z próbką. Kolumnę przekładano do nowej próbki o pojemności 2ml, którą z otwartym wieczkiem wirowano przy maksymalnej szybkości wirowania przez 5 minut.
11. Kolumnę przekładano do nowej próbki 1.5ml. Na środek złoża kolumny dodawano 25µl wody wolnej od RNaz. Zamykano wieczko próbki i wirowano przez 1 minutę

przy maksymalnej szybkości wirowania. Otrzymywano ok. 22µl eluatu. Przechowywano w -20°C.

5.2.5. Ocena ilościowa oraz jakościowa DNA i RNA

Ocena ilościowa oraz jakościowa DNA

Stężenie wyizolowanego DNA sprawdzano metodą fluorymetryczną z użyciem Qubit 2.0 Fluorometer (wg. protokołu załączonego przez producenta) wykorzystując odczynniki Qubit DNA Broad Range Assay do oceny stężenia DNA wyizolowanego z guzów mrożonych oraz Qubit DNA High Sensitivity Assay do oceny stężenia DNA wyizolowanego ze skrawków FFPE.

Do oceny jakości wyizolowanego DNA użyto metody spektrofotometrycznej z wykorzystaniem NanoDrop ND-100.

Ocena ilościowa oraz jakościowa RNA

Stężenie oraz jakość wyizolowanego RNA sprawdzano metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem NanoDrop ND-100. W celu sprawdzenia integralności RNA wybrane próbki poddano analizie jakości z użyciem Bioanalyzer 2100 (RNA Kit; Roche).

5.2.6. Technika mikromacierzy-CGH

W celu identyfikacji profili genomowych użyto techniki porównawczej hybrydyzacji genomowej opartej na mikromacierzach (Cytosure ISCA UPD 4x180K, Oxford Gene Technology oraz SurePrint G3 Cancer CGH+SNP 4x180k, Agilent Technologies) o rozdzielczości ~125kpz. Pierwsza seria guzów obejmująca przypadki #9-#13 wykonana została pod bezpośrednim nadzorem dr Magdaleny Koczkowskiej z Katedry i Zakładu Biologii i Genetyki GUMed z użyciem szkiełek mikromacierzowych Cytosure ISCA UPD 4x180K (Oxford Gene Technology) wg protokołu producenta kolejne zaś próbki były opracowane samodzielnie w oparciu o poniższy protokół.

Protokół eksperymentu aCGH

- *Znakowanie*
1. Przygotowano rozcieńczenia DNA badanego oraz DNA referencyjnego (500 ng DNA w 20,2 µl wodzie wolnej od nukleaz) w probówkach o objętości 0,2 ml.

2. Do roztworów DNA dodano 5,8 μl mieszaniny enzymów restrykcyjnych (*Digestion Master Mix*) przygotowanej wg poniższej tabeli (tab. 10). Całość kilkakrotnie przepipetowano, a następnie krótko zwirowano. Próbki inkubowano w termocyklerze kolejno w temp. 37°C przez 2 h i w temp. 65°C przez 20 minut. Po skończonej inkubacji próbki natychmiast przełożono na lód.

Tabela 10. Skład mieszaniny enzymów restrykcyjnych

Odczynnik	Ilość w przeliczeniu na 1 reakcję [μl]
Woda wolna od nukleaz	2,0
10x Restriction Enzyme Buffer	2,6
BSA	0,2
Alu I	0,5
Rsa I	0,5

3. Próbki pulsacyjnie zwirowano. Do każdej dodano 5 μl odczynnika Random Primer i przepipetowano kilka razy. Próbki inkubowano w termocyklerze w temp. 98°C przez 3 minuty. Po skończonej inkubacji próbki natychmiast umieszczano na lodzie na 5 minut.
4. Podczas pracy ze znacznikami fluorescencyjnymi unikano światła dziennego. Przygotowano mieszaninę do znakowania próbek (*Labeling Master Mix*) wg kolejności przedstawionej w tabeli (tab. 11). Etap ten wykonywano na lodzie. Do każdej z próbek dodawano po 19 μl mieszaniny reakcyjnej i kilkakrotnie przepipetowano. DNA badane znakowano mieszaniną reakcyjną z użyciem znacznika Cy5. DNA referencyjne znakowano mieszaniną reakcyjną z użyciem znacznika Cy3.

Tabela 11. Skład mieszaniny do znakowania fluorescencyjnego

Odczynnik	Ilość w przeliczeniu na 1 reakcję [μl]
5x Bufor Reakcyjny	10,0
10x dNTPs	5,0
Cyanine 3-UTP lub Cyanine 5-UTP	3,0
Exo (-) Klenow	1,0

5. Próbki inkubowano w termocyklerze przez 2 h w temp. 37°C, a następnie przez 10 temp. 68°C. Po inkubacji próbki natychmiast przełożono na lód.
6. Nadmiar niezwiązanego znacznika fluorescencyjnego oczyszczono na kolumnach *Genomic DNA Purification Module* (Agilent Technologies) wg protokołu producenta.

7. W zależności od objętości próbki uzyskanej po oczyszczeniu dodawano 1xTE (pH=8,0) lub suszono w wirówce próżniowej w temperaturze 45°C (w warunkach braku dostępu światła dziennego) do uzyskania objętości 21μl.
8. W celu zmierzenia stopnia inkorporacji znaczników fluorescencyjnych do DNA badanego i referencyjnego dokonano pomiarów z wykorzystaniem spektrofotometru NanoDrop ND-1000. Uzyskane wartości wykorzystywano do obliczenia stopnia wyznakowania próbki, aktywności specyficznej oraz wydajności reakcji znakowania wg poniższych wzorów (ryc. 4).
9. Na podstawie uzyskanych wartości łączono po 19,5μl DNA badanego i DNA referencyjnego o najbardziej zbliżonych parametrach.

Rycina 4. Wzory użyte do obliczenia stopnia wyznakowania próbki, aktywności specyficznej oraz wydajności reakcji znakowania.

$$\text{Stopień wyznakowania} = \frac{340 \times \frac{\text{pmol}}{\mu\text{l}} \text{znacznika}}{\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \text{gDNA} \times 1000} \times 100\% \qquad \text{Wydajność} = \frac{\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \text{gDNA} \times 21\mu\text{l}}{1000 \frac{\text{ng}}{\mu\text{g}}}$$

$$\text{Aktywność specyficzna} = \frac{\frac{\text{pmol}}{\mu\text{l}} \text{znacznika}}{\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} \text{gDNA}}$$

- *Hybrydyzacja*

- piec hybrydyzacyjny uruchamiano 24h przed planowanym nastawieniem reakcji hybrydyzacji w celu ustabilizowania i utrzymania równomiernej temperatury 67°C

1. Przygotowano mieszaninę hybrydyzacyjną wg poniższej tabeli (tab. 12) i dodano po 71μl do każdej próbki. Całość przepipetowano i zwirowano.

Tabela 12. Skład mieszaniny hybrydyzacyjnej

Odczynnik	Ilość w przeliczeniu na 1 reakcję [μl]
Cot-1 DNA (1,0 mg/mL)	5,0
10x aCGH Blocking Agent	11,0
2x HI-RPM Hybridization Buffer	55

2. Próbkę inkubowano w termocyklerze przez 3 min. w temp. 98°C, a następnie przez 30 minut w temp. 37°C. Po inkubacji próbkę utrzymywano w temp. 37°C aż do nałożenia na szkiełko mikromacierzowe.
3. Szkiełko z nałożonymi próbkami umieszczano w komorze hybrydizacyjnej zgodnie z instrukcją producenta. Komorę szczelnie zamykano i umieszczano w piecu hybrydizacyjnym na 40h.

- *Płukanie*

- bufor płuczący II w 50ml falkonie wstawiano do ciepłarki o temp. 37°C na 24h przed planowanym płukaniem szkiełka mikromacierzowego

- wszystkie czynności wykonywano przy braku dostępu światła dziennego

1. Po wyjęciu komory hybrydizacyjnej z pieca hybrydizacyjnego wyciągano szkiełko mikromacierzowe i demontowano w pojemniku z buforem płuczającym I w temperaturze pokojowej.
2. Następnie szkiełko przenoszono do 50ml falkonu wypełnionego czystym buforem płuczającym I i inkubowano 5 min kilkakrotnie obracając pojemnik.
3. Następnie szkiełko przekładano do uprzednio podgrzanego do 37°C buforu płuczającego II i inkubowano przez 1 min dwukrotnie obracając pojemnik.
4. Po wyjęciu szkiełko mikromacierzowe umieszczano zwrócone powierzchnią z sondami oligonukleotydowymi do góry w miniwirówce (Arrayit) i krótko wirowano, aby osuszyć pozostałości buforu płuczającego.
5. Szkiełko mikromacierzowe skanowano w skanerze MS 200 w ciągu kilku godzin od zakończenia etapu płukania.

- *Skanowanie szkiełka mikromacierzowego i analiza wyników*

Szkiełko skanowano w skanerze MS 200 przy braku dostępu światła dziennego. Skan wykonywano przy standardowych ustawieniach aparatu obejmujących rozdzielczość 2µm oraz najwyższą czułość z autoregulacją wzmocnienia sygnału (*autogain settings*). Wyniki analizowano za pomocą oprogramowania Feature Extraction, CytoGenomics (Agilent Technologies) oraz Nexus Copy Number 8.0 (BioDiscovery).

Ocena w kierunku obecności niezrównoważenia genomu oparta była o analizę średnich wartości sygnału liczonego dla co najmniej dziesięciu zlokalizowanych obok siebie sond oligonukleotydowych. Raportowano jedynie zmiany o wielkości >300kb i >40% VAF (ang. *variant allele frequency*).

Wszystkie zidentyfikowane zmiany genomowe zostały zweryfikowane w internetowej bazie *Database of Genomic Variants* (DGV; <http://dgv.tcag.ca>) oraz lokalnej bazie profili genomowych dla populacji polskiej zawierającej >1000 łagodnych zmian liczby kopii (CNVs; *ang. copy number variations*).

5.2.7. Technika sekwencjonowania następnej generacji (NGS)

Ocena występowania zmian somatycznych w genach szlaku Hh została przeprowadzona w oparciu o sekwencjonowanie nowej generacji (*ang. next generation sequencing*; NGS). W tym celu zaprojektowano panel 25 genów (tab. 13)

Tabela 13. Panel genów badanych techniką NGS.

Geny Szlaku Hh (kanoniczne)	Geny związane ze szlakiem Hh	Geny szlaku KIT/RAS	Geny szlaku mTOR	Inne geny
<i>DHH, IHH, SHH, PTCH1, SMO, SUFU, GLI1, GLI2, GLI3,</i>	<i>DISP2, HHIP, LRP2, PTCH2, PTCHD1, ZIC1, ZIC2</i>	<i>KIT, KRAS, NRAS, HRAS, CBL,</i>	<i>MTOR, PTEN</i>	<i>FGFR3, ERBB4,</i>

Wykorzystana w analizie NGS technika firmy Qiagen umożliwia wykrywanie wariantów przy użyciu zintegrowanych unikalnych wskaźników molekularnych tzw. UMI (*ang. unique molecular indices*). Przed procesem wzbogacenia kierunkowego i tworzeniem bibliotek, każdej oryginalnej, pojedynczej cząsteczce DNA przypisuje się znacznik UMI, co pozwala wyeliminować artefakty na podstawie odczytów sekwencji: te, które mają różne znaczniki UMI reprezentują różne oryginalne cząsteczki, podczas gdy odczyty sekwencji mające te same znaczniki UMI są wynikiem duplikacji PCR z jednej oryginalnej cząsteczki.

W toku prowadzenia eksperymentu wykorzystane zostały specyficzne korekty uwzględniające fakt, iż użyty DNA był izolowany z próbek FFPE, które charakteryzują się słabszą jakością oraz mniejszą długością poszczególnych cząsteczek DNA, w porównaniu do materiału mrożonego. W reakcji tworzenia bibliotek dodano maksymalną zalecaną ilość DNA: 100ng–250ng zależnie od zastosowanej metody pomiaru stężenia DNA. (fluorymetrycznie lub z użyciem QIAseq DNA QuantiMIZE Array wykorzystującego technikę qPCR (metoda rekomendowana przez producenta)). Z tego samego względu zastosowano również krótszy czas fragmentacji enzymatycznej (por. Materiały i metody; tab.15) oraz większą ilość cykli w uniwersalnej reakcji PCR (por. Materiały i metody; tab. 21) niż są zalecane dla dobrej jakości DNA genomowego.

Punktem kontrolnym oceniającym zarówno stężenie gotowych bibliotek, ich jakość oraz zastosowaną kontrolę negatywną wykonywanego eksperymentu (próbki zawierającą wodę wolną od nukleaz zamiast wkładu DNA) procedowaną razem z próbkami zgodnie

z protokołem była analiza elektroforetyczna z użyciem Bioanalyzera 2100 z wykorzystaniem zestawu *High Sensitivity DNA*.

Proces wyboru składu genów dla projektowanego panelu uwzględniał dane literaturowe oraz wyniki własnego pilotażowego badania ekspresji genów ścieżki Hedgehog (por. Wyniki, sekcja 6.3., str. 76). Wytypowane do analizy geny sklasyfikowano do pięciu podgrup. Najliczniejszą grupę stanowiły geny kodujące kanoniczne białka szlaku Hh (n=9). Drugą grupę stanowiły geny związane ze szlakiem Hh, dla których uzyskano najbardziej istotne zmiany ekspresji w co najmniej 4 podtypach histologicznych (n=7). Ponieważ wcześniejsze prace dot. zaburzeń somatycznych w GCTs wykazały dość częstą obecność zaburzeń somatycznych w genach szlaku sygnałowego KIT/KRAS [Lobo i wsp., 2019], do projektowanego panelu dołączono również najważniejsze z nich. Kolejną podgrupę stanowiły geny związane ze ścieżką PI3K/AKT1/MTOR, której aktywacja została również opisana w guzach germinalnych OUN [Wang i wsp., 2015; Vizcaino i Rodriguez, 2017]. Dodatkowo wybrano gen *FGFR3*, którego zarówno ekspresja jak i zmiany molekularne zostały opisane w GCTs jak również we własnych badaniach pilotażowych metodą qPCR (por. Wyniki, sekcja 6.3.2. i 6.3.3.) [Ewen i wsp., 2013; Feldman i wsp., 2014]. Również zmiany ekspresji i mutacje somatyczne genu *ERBB4* (*HER4*) zostały opisane w wielu nowotworach, m.in. czerniaku, raku piersi, prostaty, płuca czy rdzeniaku zarodkowym, jak i którego zmiana ekspresji została zaobserwowana w badaniach pilotażowych w niniejszej pracy (por. Wyniki, sekcja 6.3.2. i 6.3.3.) [Di Marcotullio i wsp., 2006; Soung i wsp., 2006]

Protokół NGS

- każdorazowo w reakcji użyto największą dostępną ilość DNA
- wszystkie etapy reakcji przygotowywano na lodzie
- żadnego z odczynników nie worteksowano

- *Fragmentacja DNA, naprawa (ang. end-repair) oraz dołączenie ogona poli-A*

1. Dokonano pomiarów stężenia DNA z użyciem kitu dsDNA HS (ThermoFisher) metodą fluorymetryczną z wykorzystaniem Qubit Fluorometer (ThermoFisher). Dodatkowo, losowo wybrane próbki poddano ocenie jakości przy użyciu techniki qPCR z wykorzystaniem zestawu QIAseq DNA Quantimize Array (Qiagen). Przygotowano odpowiednie rozcieńczenia próbek DNA (tab. 14). Wyliczoną ilość DNA oraz wody wolnej od nukleaz dodano do odpowiednio oznaczonych próbek, przepipetowano i zwirowano pulsacyjnie.

Tabela 14. Schemat rozcieńczania DNA

DNA	do 100ng
woda wolna od nukleaz	dopełnić do objętości 16,75 μ l

2. Przygotowano mieszaninę reakcyjną wg poniższej tabeli (tab. 15), przepipetowano i zwirowano pulsacyjnie. Dodano po 3,75 μ l do odpowiednio oznaczonej nowej probówki o objętości 0,2ml.

Tabela 15. Skład mieszaniny reakcyjnej – fragmentacja DNA

Odczynnik	Ilość w przeliczeniu na jedną próbkę
Fragmentation Buffer, 10x	2,5 μ l
FERA solution	0,75 μ l

3. Do każdej reakcji oddzielnie dodano 5 μ l odczynnika *Fragmentation Enzyme Mix*, probówki zwirowano pulsacyjnie, całość przepipetowano 10-15 razy i ponownie krótko zwirowano.

4. Probówki inkubowano w termocyklerze schłodzonym uprzednio do temp 4°C wedle poniższego programu (tab. 16). Po skończeniu reakcji probówki natychmiast przełożono na lód.

Tabela 16. Program inkubacji I w termocyklerze

	Czas	Temperatura
1	1 min	4°C
2	14 min	32°C
3	30 min	72°C
4	∞	4°C

- *Przyłączanie adapterów*

1. Przygotowano mieszaninę reakcyjną wg poniższej tabeli (tab. 17), przepipetowano i zwirowano. Dodano po 15 μ l do każdej probówki, całość przepipetowano i zwirowano pulsacyjnie.

Tabela 17. Skład mieszaniny reakcyjnej – przyłączanie adapterów

Odczynnik	Ilość w przeliczeniu na jedną próbkę
Produkt reakcji z pkt. „Fragmentacja DNA, naprawa (ang. end-repair) oraz dołączenie ogona poli-A”	25 μ l
Ligation Buffer, 5x	10 μ l
DNA Ligase	5 μ l

2. Do każdej reakcji dodano 2,8 μ l adaptera IL-N7##. Tylko jeden adapter o określonym

numery (IL-N701 do IL-N707; IL-N710 do IL-N712; IL-N714; IL-N715) powinien być użyty do jednej probówki reakcyjnej.

3. Do każdej reakcji oddzielnie dodano 7,2 μl odczynnika *Ligation Solution*, zwirowano pulsacyjnie a następnie przepipetowano. Probówki inkubowano przez 15 minut w termobloku w temperaturze 20°C. Po skończonej inkubacji probówki natychmiast przekładano na lód.

4. Następnie przeprowadzono oczyszczanie otrzymanych produktów przy użyciu QIAseq Beads (Qiagen) wg protokołu producenta.

- *Wzbogacanie kierunkowe (ang. target enrichment)*

1. Przygotowano mieszaninę reakcyjną wg poniższej tabeli (tab. 18), przepipetowano i zwirowano. Dodano po 10,6 μl do każdej probówki, przepipetowano i zwirowano pulsacyjnie.

2. Probówki inkubowano w termocyklerze wg poniższego programu (tab. 19).

Tabela 18. Skład mieszaniny reakcyjnej – wzbogacanie kierunkowe

Odczynnik	Ilość w przeliczeniu na jedną próbkę
Oczyszczony produkt reakcji z pkt. „Przyłączanie adapterów”	9,4 μl
TEPCR buffer, 5x	4 μl
QIAseq Targeted DNA Panel	5 μl
IL-forward primer	0,8 μl
HotStarTaq DNA Polymerase	0,8 μl

Tabela 19. Program inkubacji II w termocyklerze

Ilość cykli	Czas	Temperatura
1	13 min	95°C
	2 min	98°C
8	15 sek	98°C
	10 min	68°C
1	5 min	72°C
	5 min	4°C
	∞	4°C

3. Po skończonej reakcji przechodzono do oczyszczania produktu przy użyciu QIAseq Beads (Qiagen) wg protokołu producenta.

- *Reakcja PCR*

1. Przygotowano mieszaninę reakcyjną wg poniższej tabeli (tab. 20), przepipetowano i pulsacyjnie zwirowano. Dodano po 6,6 μl do każdej probówki z oczyszczonym produktem reakcji wzbogacania kierunkowego, przepipetowano i krótko zwirowano.

Tabela 20. Skład mieszaniny reakcji PCR

Odczynnik	Ilość w przeliczeniu na jedną próbkę
UPCR buffer, 5x	4 μ l
HotStarTaq DNA Polymerase	1 μ l
Woda wolna od nukleaz	1,6 μ l

2. Każdą z reakcji nanoszono oddzielnie bezpośrednio na płytkę z liofilizowanymi indeksami (IL-S502-S510) do odpowiedniego dołka, tak aby uzyskać różne kombinacje indeksów IL-7## i IL-5## dla każdej z próbek badanych w jednej puli sekwencjonowania. Całość przepipetowano i zwirowano pulsacyjnie, a następnie inkubowano w termocyklerze wg poniższego programu (tab. 21).

Tabela 21. Program inkubacji III w termocyklerze

Ilość cykli	Czas	Temperatura
1	13 min	95°C
	2 min	98°C
24	15 sek	98°C
	2 min	60°C
1	5 min	72°C
	5 min	4°C
	∞	4°C

3. Po skończonej reakcji przechodzono do oczyszczania produktu przy użyciu QIAseq Beads (Qiagen) wg protokołu producenta.

- *Ocena bibliotek NGS*

Do oceny jakości i wielkości fragmentów otrzymanych bibliotek wykorzystano 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) używając zestawu High Sensitivity DNA postępując wg protokołu producenta. Użyto rozcieńczeń bibliotek (1:5) przygotowanych w wodzie wolnej od nukleaz.

Stężenia bibliotek określono na podstawie pomiarów fluorymetrycznych przy użyciu Qubit Fluorometer (ThermoFisher) z wykorzystaniem zestawu dsDNA High Sensitivity (ThermoFisher). Dodatkowo, losowo wybrane próbki poddano ocenie przy użyciu techniki qPCR z wykorzystaniem zestawu QIAseq Library Quant System (Qiagen).

- *Sekwencjonowanie na platformie NextSeq*

Biblioteki przygotowano do sekwencjonowania na platformie NextSeq Illumina

wg aktualizacji protokołu producenta z grudnia 2018r. (Illumina). Użyto rozcieńczeń wyjściowych o stężeniu 4nM. Zgodnie z wytycznymi producenta użytego panelu QIAseq Targeted DNA Custom Panel – CDHS-16592Z-1090 (Qiagen) dodano na kartridż 2ml 0,3μM rozcieńczenia *QIAseq A Read 1 Primer*.

Arkusze sekwencjonowania skonfigurowano na platformie BaseSpace (Illumina) wg parametrów NextSeq 550 System Guide (#15069765-02) oraz zaleceń producenta panelu QIAseq Targeted DNA Custom Panel – CDHS-16592Z-1090 (Qiagen):

Tabela 22. Ustawienia parametrów reakcji sekwencjonowania

Parametr	Ustawienia
Category	Select Other
Select Application	Check FASTQ Only
Sample Prep Kit	Select Nextera XT v2
Index Reads	Select 2
Read Type	Select Paired End Read
Cycles for both Read 1 and 2	Select 151
Important	Check Custom Primer for Read 1
Important	Check Use Adapter Trimming

- *Opracowanie bioinformatyczne uzyskanych wyników sekwencjonowania*

Uzyskane wyniki poddano w pierwszej kolejności obróbce technicznej (ryc. 5), która polegała na identyfikacji i usunięciu adapterów, usunięciu odczytów słabej jakości (definiowanej jako fragment o pokryciu <20x, częstości występowania zmienionego allelu <1%) oraz usunięciu artefaktów, które mogły powstać podczas ligacji. Po przeprowadzeniu mapowania do sekwencji referencyjnej (organizm: *Homo sapiens*; źródło: RefSeq; numer bazy danych: GRCh37.p13) otrzymano pierwotną, „surową” listę stwierdzonych wariantów. W kolejnym etapie uzyskane wyniki przefiltrowano kolejno do 1) zmian niesynonimicznych 2) o pokryciu $\geq 100x$ oraz 3) o częstości występowania zmienionego allelu $\geq 5\%$. Kolejnym etapem było filtrowanie uzyskanych danych pod kątem ograniczenia raportowania wyników fałszywie pozytywnych. Wykorzystano w tym celu dwa parametry: 1) *BaseQRankSum* porównujący jakość odczytów dla allelu zmienionego i referencyjnego na podstawie testu U Manna-Whitney’a (przy czym ujemna wartość tego parametru wskazuje wariant zmieniony o niższej jakości niż wariant referencyjny); oraz 2) QUAL będący miarą znaczenia danego wariantu tj. prezentujący ujęcie ilościowe materiału dowodowego (liczby odczytów) wspierającego wariant, w odniesieniu do uzyskanego pokrycia i tego, czego można oczekiwać przez przypadek biorąc pod uwagę poziomy błędów w danych. Matematyczna wartość QUAL jest obliczana jako $-10\log_{10}(1-p)$, gdzie „p” oznacza prawdopodobieństwo

Rycina 5. Schemat procesowania danych NGS.



istnienia danego wariantu w próbce. Za wartości odcięcia dla w.w. parametrów przyjęto kolejno: 1) wartość -2,0 wskazującą, że zaobserwowane jakości dla wariantu są o dwa standardowe odchylenia poniżej tego, czego można by oczekiwać, gdyby została wylosowana z tego samego rozkładu co jakości alleli referencyjnych; 2) wartość 100 wskazującą 1 na 10^{10} szans, że raportowany wariant jest fałszywie pozytywny. Odrzucono także warianty znajdujące się w sekwencjach repetytywnych >3 nt (tzw. homopolimerach). W procesie analizy uwzględniono również filtr mający na celu poszukiwanie odczytów, które mogły w rzeczywistości pochodzić od pseudogenów, w szczególności pseudogenu *PTENP1*. Ponadto odrzucono warianty znajdujące się w bazie dbSNP_Common [Sherry i wsp., 2001]. Dodatkowo sprawdzono i potwierdzono występowanie ostatecznie raportowanych wariantów przy użyciu oprogramowania Integrative Genomics Viewer (IGV) [Robinson i wsp., 2017].

W końcowym etapie przeprowadzono analizę znaczenia patogenicznego wyselekcjonowanych wariantów wykorzystując szereg parametrów opisujących m.in. częstości występowania danej zmiany w populacji (GnomAD), występowanie w bazach mutacji germinalnych i somatycznych (dbSNP, COSMIC), związków między występującym wariantem a fenotypem (ClinVar), *in-silico* predyktorów patogeniczności danej zmiany (DANN, CADD, SIFT, PolyPhen, Mutation Taster) oraz interpretację kliniczną wariantów sekwencji somatycznych (*My Cancer Genome*). Ważnym czynnikiem determinującym znaczenie kliniczne wariantów były wytyczne *Association for Molecular Pathology*, *American Society of Clinical Oncology* i *College of American Pathologists* [Richards i wsp., 2015] klasyfikujące somatyczne zmiany molekularne na 4 grupy (ang. *tier*): poziom I - obejmujący warianty o dużym znaczeniu klinicznym; poziom II obejmujący warianty o potencjalnym znaczeniu klinicznym; poziom III obejmujący warianty o nieznanym znaczeniu klinicznym i poziom IV zawierający warianty uznane za łagodne lub prawdopodobnie łagodne.

5.2.8. Technika PCR w czasie rzeczywistym

Analiza ekspresji genów związanych ze szlakiem sygnałowym Hedgehog została wykonana z wykorzystaniem techniki PCR w czasie rzeczywistym (rtPCR; qPCR). Użyto panelu do badania ekspresji 84 kluczowych genów (tab. 23; ryc. 6) zaangażowanych w ekspresję szlaku Hedgehog, różnicowanie komórek oraz rozwój organizmu (*Hedgehog Signaling Pathway RT² Profiler PCR Array*, Qiagen). Zestaw obejmował geny kodujące zarówno ligandy, regulatory, receptory i kofaktory ścieżki sygnałowej Hedgehog, jak i geny docelowego jej działania czy też geny istotne dla ścieżek współdziałających m.in. ścieżki sygnałowej WNT, TGF β /BMP czy HIPPO (tab. 23). 96-dołkowa płytko obejmowała również 5 genów referencyjnych: *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *HPRT1* oraz *RPLP0*, kontrolę kontaminacji

próbki badanej DNA genomowym, kontrolę przebiegu reakcji odwrotnej transkrypcji oraz kontrolę jakości reakcji qPCR (ryc. 6).

Tabela 23. Geny badane przy pomocy techniki qPCR.

Szczegółowa charakterystyka genów dostępna w załączniku nr 10.2

Grupa	Geny
Ligandy i regulatory	<i>BOC, CDON, DHH, GAS1, HHIP, IHH, SHH</i>
Receptory i kofaktory	<i>LRP2, PTCH1, PTCH2, PTCHD1, PTCHD2, PTCHD3, RAB23, SMO</i>
Czynniki transkrypcyjne i regulatory	<i>BTRC (bTrCP), CSNK1A1, CSNK1E, FBXW11, GLI1, GLI2, GLI3, GSK3B, PRKACA, PRKACB, STK36, SUFU, ZIC1, ZIC2</i>
Sygnalizacja Hedgehog; inne	<i>DISP1, DISP2, FGF9, FKBP8, HHAT, IFT52, KCTD11, OTX2, NPC1, FGFR3, RUNX2, ERBB4, FOXE1, MAPK1 (ERK2), NUMB, TP53 (p53)</i>
Geny docelowego działania sygnalizacji Hedgehog	<i>BCL2, BMP2, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8B, MTSS1, PTCH1, PTCH2, WNT1, WNT10A, WNT10B, WNT11, WNT16, WNT2, WNT2B, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9B, VEGFA.</i>
Geny kodujące białka ze ścieżek współdziałających ze szlakiem Hedgehog	<i>BMP2, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8B, GREM1, SFRP1, BTRC (bTrCP), CTNNB1, FBXW11, FGF9, GSK3B, LATS1, LATS2, WIF1, WNT1, WNT10A, WNT10B, WNT11, WNT16, WNT2, WNT2B, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9, FAT4, FRMD6, LATS1, LATS2, MOB1B, NF2, STK3</i>

Rycina 6. Układ genów badanych techniką PCR w czasie rzeczywistym na płycie 96-dółkowej

Legenda: Rząd A-G, dolki (1-12) – geny badane; rząd H, dolki (1-5) – geny referencyjne; rząd H, dołek (5) – kontrola kontaminacji DNA genomowym; rząd H, dolki (7-9) – kontrola reakcji odwrotnej transkrypcji; rząd H, dolki (10-12) – kontrola jakości reakcji qPCR.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BCL2	BMP2	BMP4	BMP5	BMP6	BMP7	BMP8B	BOC	BTRC	CDON	CSNK1A1	CSNK1E
B	CTNNB1	DHH	DISP1	DISP2	ERBB4	FAT4	FBXW11	FGF9	FGFR3	FKBP8	FOXE1	FRMD6
C	GAS1	GLI1	GLI2	GLI3	GREM1	GSK3B	HHAT	HHIP	IFT52	IHH	KCTD11	LATS1
D	LATS2	LRP2	MAPK1	MOBKLT1A	MTSS1	NF2	NPC1	NUMB	OTX2	PRKACA	PRKACB	PTCH1
E	PTCH2	PTCHD1	PTCHD2	PTCHD3	RAB23	RUNX2	SFRP1	SHH	SMO	STK3	STK36	SUFU
F	TP53	VEGFA	WIF1	WNT1	WNT10A	WNT10B	WNT11	WNT16	WNT2	WNT2B	WNT3	WNT3A
G	WNT4	WNT5A	WNT5B	WNT6	WNT7A	WNT7B	WNT8A	WNT8B	WNT9A	WNT9B	ZIC1	ZIC2
H	ACTB	B2M	GAPDH	HPRT1	RPLP0	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

- *Synteza cDNA*

Do syntezy cDNA użyto zestawu RT² PreAMP cDNA Synthesis Kit (Qiagen) jednorazowo w reakcji używając 500ng RNA.

1. Dla każdej z próbek, oddzielnie, w probówce 0,2ml, przygotowano mieszaninę eliminującą genomowe DNA z próbki wg poniższej tabeli (tab. 24). Całość przepipetowano i krótko zwirowano.

Tabela 24. Skład mieszaniny reakcyjnej – eliminacja genomowego DNA

Komponent	Ilość w przeliczeniu na jedną próbkę
RNA	500ng (max. 8µl)
Bufor GE	2µl
Woda wolna od RNaz	Uzupełnić do 10µl

2. Mieszaninę inkubowano w termocyklerze w temperaturze 42°C przez 5 min po czym natychmiast przełożono na lód na minimum 1 minutę.

3. Przygotowano mieszaninę do przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji wg poniższej tabeli (tab. 25). Dodano po 10µl mieszaniny do próbki z punktu 2 zawierającej RNA i bufor eliminujący gDNA. Probówki delikatnie przepipetowano i krótko zwirowano. Inkubowano w termocyklerze przez 30 min w temperaturze 42°C oraz następnie 5 minut w temp. 95°C. Po inkubacji próbki przełożono na lód i natychmiast przechodzono do reakcji preamplifikacji.

Tabela 25. Skład mieszaniny reakcyjnej – reakcja odwrotnej syntezy

Komponent	Ilość w przeliczeniu na jedną próbkę
Bufor 5xBC3	4µl
Control P2	1µl
cDNA Synthesis Enzyme Mix	1µl
Inhibitor RNaz	1µl
Woda wolna od RNaz	3µl

Reakcja preamplifikacji

- Wstępną amplifikację wykonano za pomocą zestawu RT² PreAMP Primer Mix (Qiagen) odpowiedniego dla badanego gatunku i ścieżki sygnałowej Hedgehog.
- Zastosowano odpowiednie korekty uzyskanych wyników podczas procedury analizy danych.

1. Odczynniki RT² PreAMP PCR Mastermix i RT² PreAMP Pathway Primer Mix wyjmowano z zamrażarki (-20°C) aby osiągnęły temperaturę pokojową.
2. Przygotowano mieszaninę preamplifikacyjną wg poniższej tabeli (tab. 26).

Tabela 26. Skład mieszaniny reakcji preamplifikacji

Komponent	Ilość [μl] w przeliczeniu na jedną próbkę
RT ² PreAMP PCR Mastermix	12,5 μl
RT ² PreAMP Pathway Primer Mix	7,5 μl

3. Do odpowiednio oznakowanej próbki o pojemności 0,2ml dodawano 5μl cDNA oraz 20μl mieszaniny preamplifikacyjnej. Całość przepipetowano i krótko zwirowano. Dla każdej próbki cDNA wykonywano reakcję preamplifikacji jednorazowo w trzech powtórzeniach.
4. Probówki inkubowano w termocyklerze wg poniższego programu (tab. 27)

Tabela 27. Program inkubacji I w termocyklerze

Cykl	Czas	Temperatura
1	10 min	95°C
8	15 sek	95°C
	2 min	60°C
		4°C

5. Po skończonej inkubacji próbki umieszczano na lodzie. Do każdej dodawano 2μl odczynnika *Side Reaction Reducer*. Całość przepipetowano, krótko zwirowano i inkubowano w termocyklerze przez 15 minut w 37°C, a następnie przez 5 min. w 95°C.
6. Do każdej z probówek natychmiast po skończeniu inkubacji dodawano 84μl wody wolnej od RNaz i dokładnie wymieszano przez pipetowanie.

Następnie przechodzono do reakcji qPCR lub zamrażano próbki w -20°C.

- *Reakcja PCR w czasie rzeczywistym*
 - reakcje qPCR wykonano przy użyciu zestawu RT² Profiler PCR Arrays (Qiagen)
 - RT² SYBR Green Mastermix wyjmowano z zamrażarki (-20°C) do temperatury pokojowej na 10 min. przed rozpoczęciem przygotowywania reakcji. W przypadku widocznych precypitatów Mastermix umieszczano w termobloku o temperaturze 42°C na 1 min, a następnie delikatnie wortexowano. Proces w razie potrzeby

powtarzano aż do całkowitego rozpuszczenia precipitatów.

reakcję nastawiano w warunkach braku dostępu światła dziennego w temperaturze pokojowej. Ze względu na obecność lotnych liofilizowanych starterów na płytce mieszaninę reakcyjną nakładano na płytkę przy braku nawiewu komory laminarnej.

1. W probówce o pojemności 5ml przygotowano mieszaninę reakcyjną wg poniższej tabeli (tab. 28). Całość mieszano przez odwracanie i delikatnie zwirowano mieszaninę ze ścianek i wieczka.

Tabela 28. Skład mieszaniny reakcji PCR w czasie rzeczywistym

Odczynnik	Ilość w przeliczeniu na jedną próbkę
2x RT ² SYBR Green Mastermix	1275 µl
cDNA po reakcji preamplifikacji	102 µl
woda wolna od nukleaz	1173 µl

2. Rozpipetowano po 25µl mieszaniny reakcyjnej do 96-dołkowej płytki, zaklejono dokładnie folią i wirowano przez 1 min przy 1000 x g
3. Płytkę inkubowano w termocyklerze LightCycler II 480 (Roche) wg poniższego programu (tab. 29).

Tabela 29. Program reakcji qPCR

Temperatura (°C)	Odczyt	Czas	Szybkość zmiany temperatury (°C/s)	
95	Brak	00:10:00	4.8	Termiczna aktywacja
95	Brak	00:00:15	1.5	50 cykli
60	Jednostkowy	00:01:00	1.5	
60	Brak	00:00:15	4.8	Krzywa topnienia
95	Ciągły		0.03	

- *Parametry kontrolne zastosowane w reakcji qPCR*

W toku eksperymentu PCR opracowano trzy punkty kontrolne mające na celu zapewnienie jak najwyższej jakości otrzymanych wyników: kontrola kontaminacji genomowym DNA, która mierzy potencjalny udział genomowego DNA w surowych wartościach Ct; kontrola reakcji odwrotnej transkrypcji, która mierzy względną wydajność

odwrotnej transkrypcji; oraz pozytywna kontrola PCR, która mierzy, jak dobrze przebiegała reakcja qPCR.

1. Kontrola kontaminacji genomowym DNA (HGDC; ang. *human genomic DNA contamination control*) zastosowana w eksperymencie opiera się na unikalnym regionie niekodującym w genomie zlokalizowanym daleko od miejsc startu transkrypcji. W przypadku obecności DNA genomowego w badanej próbce cDNA, ulega on powieleniu w reakcji qPCR i może wpływać na otrzymane wartości Ct całego eksperymentu (gdy $Ct < 33$).

2. Kontrola odwrotnej transkrypcji (RTC; ang. *reverse transcription control*) wykorzystuje wprowadzony w buforze podczas reakcji odwrotnej transkrypcji sztucznie zsyntezowany mRNA z ogonem poli-A, który nie jest homologiczny do żadnej sekwencji w genomie ssaków czy bakterii. Fragment ten jest poddawany RT, a następnie kolejnym etapom eksperymentu, razem z badanym mRNA w próbce. RTC wykrywająca tę sekwencję w reakcji qPCR określa, czy wydajność odwrotnej transkrypcji była podobna dla wszystkich próbek badanych i pomaga określić, czy dane ze wszystkich próbek mRNA mogą być porównywane.

3. Pozytywna kontrola PCR (PPC; ang. *positive PCR control*) zawiera niewielką ilość sztucznej sekwencji DNA (niehomologiczną do wykorzystanej w RTC) oraz startery zaprojektowane do amplifikacji tej sekwencji. PPC określa dokładność manualnego wykonania reakcji.

5.2.9. Analiza statystyczna

Analiza opisowa przedstawia proporcje odsetkowe dla zmiennych kategoryzowanych oraz medianę i zakres dla zmiennych ciągłych. Uzyskane rozkłady wyników porównano z użyciem dokładnego testu Fishera. Zmienne ciągłe porównano nieparametrycznym testem U Manna-Whitney'a. Analizy wykonano w programie STATISTICA (StatSoft Inc.) oraz GeneGlobe Data Analysis Center (Qiagen) Analizę różnic w stopniu ekspresji genów przeprowadzono w oparciu o test t-Studenta dla wartości powtórzeń $2^{-\Delta Ct}$ dla każdego genu w grupach badanych oraz kontrolach. Jako poziom istotności przyjęto wartość $p < 0,05$. Dla uproszczenia prezentacji uzyskanych wyników wartości p podano w 3 kategoriach: $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$.

Przedstawione w tabelach (Tab. 41 i tab. 42) wyniki dotyczą poszczególnych genów, dla których znormalizowana różnica ekspresji względem zastosowanej w danej analizie kontroli wynosiła $>4x$ a poziom istotności statystycznej wynosił $p < 0,05$. Dokładne, nieprzetworzone dane przedstawione zostały pod postacią rycin *Heat Maps* oraz w tabelach w załączniku 10.3. Adnotacja „A”, „B” lub „C”, odnosi się do zastrzeżeń dot. interpretacji uzyskanego wyniku (tab. 30), w zależności od uzyskanych wartości dla grupy badanej i kontrolnej.

Tabela 30. Objaśnienie komentarzy do wyników reakcji qPCR

Adnotacja	Objaśnienie
[brak adnotacji]	Ekspresja genu jest relatywnie wysoka zarówno w grupie badanej jak i grupie kontrolnej (Ct <30).
"A"	Ekspresja genu jest relatywnie niska lub niewykrywalna w grupie badanej lub w grupie kontrolnej (średnia wartość Ct >30). Ponieważ wykrycie ekspresji genu może być ograniczone przez wyjściową ilość mRNA, rzeczywista wartość zmiany ekspresji jest co najmniej tak duża jak otrzymana wartość. Wynik może również mieć wahania wartości p (> 0,05), dlatego ważne jest posiadanie wystarczającej liczby biologicznych powtórzeń, aby zweryfikować wyniki ekspresji dla tego genu.
"B"	Względny poziom ekspresji genu jest na niskim poziomie zarówno w grupie kontrolnej jak i grupie badanej (Ct>30). Wartość p jest wysoka lub niemożliwa do określenia. Wynik krotności ekspresji może wykazywać wahania, dlatego ważne jest posiadanie wystarczającej liczby biologicznych powtórzeń, aby zweryfikować wyniki ekspresji dla tego genu.
"C"	Ekspresja genu nie jest wykryta ani w grupie badanej ani w grupie kontrolnej (Ct nieokreślona lub większa niż założona wartość odcięcia).

6. WYNIKI

6.1. Analiza profilu genomowego guzów mrożonych

Wyniki analizy profili genomowych wewnątrzczaszkowych guzów germinalnych zostały opublikowane w dwóch pracach: pilotażowej obejmującej pierwszych 6 przypadków [Kuleszo i wsp., 2017] oraz kompleksowej, obejmującej całą serię n=16 guzów [Kuleszo i wsp., 2019]. Ze względu na niskie parametry ilości oraz jakości wyizolowanego DNA zmierzonych metodami spektrofotometrycznymi i fluorymetrycznymi, dwa preparaty zostały na wstępie zdyskwalifikowane z dalszej analizy (tab. 4. - przypadki #15, #16). 13 z 14 przypadków przebadanych techniką porównawczej hybrydyzacji genomowej (array-CGH) zostało następnie zakwalifikowanych do etapu analizy porównawczej uzyskanych profili genomowych. Jeden przypadek został wykluczony z końcowych analiz ze względu na wysoki rozrzut wyników pomiaru (ang. *derivative log ratio spread DLRS*).

W ponad połowie badanych przypadków stwierdzono występowanie niezrównoważenia genomu (62%; 8/13) pod postacią zarówno zmian liczbowych jak i strukturalnych. Dla pozostałych 5 przypadków (38%; 5/13) uzyskano wynik wskazujący na obecność prawidłowego profilu genomowego. W każdym z 13 guzów stwierdzono ponadto kilka małej wielkości (<300 kpz) powtarzających się zmian liczby kopii (ang. *copy number variations; CNVs*), które na podstawie danych z międzynarodowych internetowych baz danych oraz lokalnej bazy profili genomowych dla populacji polskiej zakwalifikowano jako zmiany o charakterze łagodnym. Szczegółowe profile genomowe wszystkich przebadanych guzów podano w Tabeli 31.

Tabela 31. Niezrównoważone aberracje chromosomowe wykryte techniką aCGH w grupie 13 wewnątrzczaszkowych guzów germinalnych.

Legenda: *pogrubioną czcionką zaznaczono amplifikację wybranych fragmentów chromosomów w kolumnie "Duplikacja/amplifikacja" oraz nullisomię w kolumnie "Delecja"

#	Rodzaj guza	Duplikacja/amplifikacja*	Delecja*
1	<i>teratoma maturum</i>	12p13.33-p11.1 trisomia 21	monosomia 4 6p22.3-p11.2 6q12-q27 monosomia 9 monosomia 13 monosomia 15 monosomia 18
2	<i>yolk sac tumor</i>	2q11.1-q37.3 17p12 17q25.3 XXXY	2p25.3-p24.3 monosomia 4 monosomia 5 monosomia 6

			8p23.3-p11.1 8q11.1-q21.1 8q21.2-q24.3 9p22.2-p12 9q21.11-q34.4 11p15.5-p11.12 11q11-q13.14 11q13.14-q25 monosomia 13 monosomia 15 monosomia 16 17p13.3-p12 monosomia 18 monosomia 22
3	<i>germinoma</i>	-	1p35.3-p21.1 1p21.3-p31.1 6q12-q27 7p22.3-p11.2 10q22.2-q26.3 22q11.22-q13.33
4	<i>germinoma</i>	1q21.1-q44 trisomia 5 trisomia 6 trisomia 8 trisomia 9 10p15.3-p11.1 trisomia 13 trisomia 14 trisomia 19 trisomia 20	-
5	<i>teratoma maturum</i>	trisomia 21	-
6	<i>germinoma</i>	-	-
7	<i>germinoma</i>	-	-
8	<i>germinoma</i>	-	-
9	<i>germinoma</i>	-	-
10	<i>teratoma maturum</i>	-	-
11	<i>germinoma</i>	trisomia 1 trisomia 2 trisomia 6 trisomia 7 trisomia 8 12p13.33p11.1 12q11-q24.33 trisomia 14 trisomia 15 16p13.3-p11.1 16q12.2.-q24.3 17q11.1q25.3 trisomia 19	9q21.11q34.3 11q13.5q25 16q11.2q12.2

		trisomia 20 trisomia 21 trisomia 22	
12	<i>germinoma</i>	12p13.33p11.1 17q11.1q25.3 trisomia 19	9p24.2p11.2 10p15.3p11.1 11p15.4p11.12 18q11.2q23
13	guz mieszany	trisomia 21	monosomia 13 monosomia 18

Równoczesne występowanie duplikacji i/lub amplifikacji oraz delecji fragmentów chromosomów zaobserwowano w 5 przypadkach (38%). Wyłączne występowanie dodatkowych kopii materiału genetycznego wykryto w dwóch guzach (15%), podczas gdy w jednym z przypadków zaobserwowano występowanie jedynie utraty materiału genetycznego (tab. 32).

Tabela 32. Duże rearanżacje genomowe zidentyfikowane w badanej serii guzów.

Rodzaj aberracji chromosomowych	Liczba guzów
Wyłącznie duplikacje/amplifikacje	2
Wyłącznie delecje	1
Jednoczesne występowanie duplikacji i delecji różnych chromosomów	5

W badanej grupie, dodatkowy materiał genetyczny zaobserwowano w chromosomach 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 13, 14, 15, 19, 20, 21, 22, X i Y, natomiast jego utratę zanotowano w chromosomach 4, 5, 6, 9, 13, 15, 16, 18 i 22. Jedynym chromosomem, który w żadnym z badanych guzów nie uległ aberracji był chromosom 3. Dwa przypadki #4 i #11 zostały sklasyfikowane jako około-triploidalne. Występowanie wyłącznie dodatkowego materiału genetycznego zaobserwowano w chromosomach 14, 19, 20 i 21, podczas gdy jego wyłączną utratę odnotowano w przypadku chromosomów 4 i 11.

6.1.1. Aberracje liczbowe

Najczęstszymi zmianami liczbowymi wykrytymi w badanej grupie guzów były: trisomie chromosomu 21 i 19 oraz monosomie chromosomu 13 i 18.

Trisomia 21 występowała w 31% przypadków obejmujących dwa guzy typu *teratoma maturum* (#1 i #5), jeden guz typu *germinoma* (#11) oraz jeden mieszany guz germinalny (#13). W dwóch guzach była to jedyna zaobserwowana dodatkowa kopia całego chromosomu (#5, #13), oraz jedyna zmiana zaobserwowana w guzie #5. Na podstawie

danych klinicznych potwierdzono występowanie zespołu Downa u pacjenta #1. Drugą pod względem częstości występowania zmianą o charakterze dodatkowej kopii chromosomu była trisomia 19 odnotowana w 23% przypadków (3/13). Powyższa zmiana została zaobserwowana jedynie w guzach typu germinoma i występowała w 3/4 przypadkach wszystkich badanych guzów o tym rozpoznaniu histologicznym, w których zaobserwowano nieprawidłowości kariotypu. Najczęściej obserwowanymi zmianami o charakterze delecji całego chromosomu były monosomie chromosomów 13 i 18 występujące jednocześnie w trzech przypadkach o różnych podtypach histologicznych guzów: potworniak dojrzały (#1), guz pęcherzyka żółtkowego (#2) oraz guz mieszany (#13). Dodatkowo utrata długiego ramienia chromosomu 18q występowała w jednym przypadku (#12).

6.1.2. Aberracje strukturalne

Aberracje strukturalne obejmujące fragmenty chromosomów 1, 2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 17 i 22 zostały opisane w 5/13 guzach. Tylko sześć regionów chromosomowych uległo rearanzacji w więcej niż jednym badanym przypadku: duplikacja fragmentów chromosomów 12p i 17q oraz delecja fragmentów chromosomów 6q, 9q oraz 11p i 11q. Najczęściej występująca (3/13; 23% guzów) aberracja strukturalna dotyczyła fragmentu krótkiego ramienia chromosomu 12. Amplifikację 12p13.33p11.1 zaobserwowano w dwóch guzach: *teratoma maturum* (#1) i *germinoma* (#11), podczas gdy w kolejnym guzie *germinoma* (#12) zidentyfikowano duplikację w.w. regionu. W dwóch guzach *germinoma* (#11 i #12) zaobserwowano duplikację długiego ramienia chromosomu 17. Minimalny wspólny region duplikacji stanowił fragment 17q11.1q25.3 o wielkości ok. 55,4 Mpz. Duplikację mniejszego fragmentu chromosomu 17 (17q25.3) o wielkości ok. 51,9 Mpz zanotowano w guzie typu *yolk sac* (#2). Wśród zidentyfikowanych zmian o charakterze delecji żadna nie powtórzyła się więcej niż w dwóch badanych przypadkach. Zaobserwowano utratę fragmentu chromosomu 6 (6q12-q27) o minimalnym regionie wspólnym wielkości ok. 103,8 Mpz. Zmiana ta została wykryta w dwóch guzach: jednym przypadku o typie *teratoma maturum* (#1) oraz jednym o typie *germinoma* (#3). Kolejną z wykrytych zmian była częściowa delecja długiego ramienia chromosomu 9 (9q21.11-q34.4) wykryta w guzie pęcherzyka żółtkowego (#2) oraz guzie typu *germinoma* zlokalizowanym w szyszynce (#11). Zanotowano również dwie zmiany o charakterze utraty fragmentu chromosomu 11: delecję regionu krótkiego ramienia 11p (minimalny wspólny region 11p15.5-p11.12) w guzach typu: *yolk sac* (#2) oraz *germinoma* zlokalizowanym w śródmózgowiu (#12) oraz nullisomię i delecję fragmentu 11q (minimalny wspólny region 11q13.5-q25) odpowiednio w guzach #2 i #11.

6.1.3. Analiza *loci* genów szlaku Hedgehog

Przeprowadzono analizę *loci* genów kodujących ligandy, receptory, regulatory oraz geny docelowego działania szlaku Hedgehog oraz powiązanych z nim szlaków WNT, TGF β , BMP oraz Hippo (tab. 23). Najczęstsze zmiany liczby kopii dotyczyły genów *PTCH1* (*locus* 9q22.32) oraz *ZIC2* (*locus* 13q32.3). Ich utratę, w połączeniu z delecją genu *HHIP* (*locus* 4q31.21), odnotowano w dwóch przypadkach: *teratoma maturum* (#1) i guzie pęcherzyka żółtkowego (#2). Ponadto, zaobserwowano pojedyncze utraty genu *PTCH1* w guzie typu *germinoma* zlokalizowanego w szyszynce (#11) oraz genu *ZIC2* w mieszanym guzie germinalnym (#13), z kolei w guzie typu *germinoma* (#4) zanotowano dodatkowe kopie obu genów. Jednocześnie duplikację genów *GLI2* (*locus* 2q14.2) oraz *IHH* (*locus* 2q35), obu zlokalizowanych na chromosomie 2, zaobserwowano w dwóch guzach: *yolk sac tumor* (#2) i *germinoma* (#11).

W sześciu guzach zanotowano dodatkowo zmiany w liczbie kopii genów ścieżki sygnałowej WNT. Najwięcej zmian zaobserwowano w guzie typu *germinoma* (#11) zlokalizowanym w szyszynce: dodatkowe kopie genów *WNT2B*, *WNT4*, *WNT3A*, *WNT9A*, *WNT10A*, *WNT6*, *WNT16*, *WNT2*, *WNT5B*, *WNT1*, *WNT10B*, *WNT9B*, *WNT3*, *WNT7B* oraz utratę jednej kopii genu *WNT11*. Duplikację genu *WNT5B* (12p13.33) łącznie zaobserwowano w trzech guzach należących do dwóch różnych grup histologicznych: *teratoma maturum* (#1) oraz *germinoma* (#11, #12). Pozostałe powtarzające się zmiany dotyczyły duplikacji genów *WNT3* (#11, #12), *WNT3A* (#4, #11), *WNT6* (#2, #11), *WNT9B* (#11, #12), *WNT10A* (#2, #11) oraz utraty kopii genu *WNT11* (#2, #11). W przypadku guza pęcherzyka żółtkowego (#2) utracie uległy obie kopie genu *WNT11* (11q13.14-q25). Dodatkowo powtarzającą się zmianą była delecja genu *WNT7B* zaobserwowana w guzie pęcherzyka żółtkowego (#2) oraz guzie typu *germinoma* zlokalizowanym w szyszynce (#3) (tab. 33).

Tabela 33. Zmiany liczby kopii genów ścieżki sygnałowej WNT.

Przypadek	Duplikacja/amplifikacja	Delecja
#1	<i>WNT5B</i>	-
#2	<i>WNT10A</i> , <i>WNT6</i>	<i>WNT8A</i> , <i>WNT11</i> , <i>WNT7B</i>
#3	-	<i>WNT7B</i>
#4	<i>WNT3A</i> , <i>WNT8A</i> ,	-
#11	<i>WNT2B</i> , <i>WNT4</i> , <i>WNT3A</i> , <i>WNT9A</i> , <i>WNT10A</i> , <i>WNT6</i> , <i>WNT16</i> , <i>WNT2</i> , <i>WNT5B</i> , <i>WNT1</i> , <i>WNT10B</i> , <i>WNT9B</i> , <i>WNT3</i> , <i>WNT7B</i>	<i>WNT11</i>
#12	<i>WNT5B</i> , <i>WNT9B</i> , <i>WNT3</i>	-

6.2. Analiza somatycznych zmian molekularnych techniką NGS

Wyniki sekwencjonowania następnej generacji uzyskano dla wszystkich próbek badanych tzn. dla 27 guzów germinalnych, oraz dwóch przypadków rdzeniaka zarodkowego i jednego raka podstawnocomórkowego skóry.

Dla każdej z badanych próbek przeprowadzono skrupulatną ocenę jakości uzyskanych odczytów na podstawie parametrów zebranych w tabeli 34. Analizie poddano wszystkie 397 regionów objętych sekwencjonowaniem. Dla 23 próbek uzyskano ilość sczytań powyżej 10 mln, a dla wszystkich powyżej 5 mln (średnia=11,228,673; mediana=11,335,284; 5,526,192-15,707,100). Procent mapowania odczytów do sekwencji referencyjnej, również odczytów mapowanych poza regionami docelowymi, wynosił dla wszystkich próbek $\geq 97\%$ (średnia=97,88%; mediana=97,90%; 96,78%-98,68%). Średnie pokrycie powyżej 500x uzyskano dla 19, a powyżej 100x dla wszystkich próbek badanych (średnia=831,24; mediana=803; 176,1-2239,1). Wartości średniej jakości wartości odczytu (ang. *Average Q Input Reads*) oraz średniej jakości odczytu UMI (ang. *Average Q UMI Reads*) wynosiły odpowiednio ~ 34 oraz ~ 47 .

Wszystkie badanie próbki przeszły założone punkty kontroli jakości, a tym samym zakwalifikowały się do drugiego etapu analizy – filtrowania danych pod względem ich częstości i znaczenia klinicznego. Analizę surowych danych sekwencjonowania przeprowadzono z użyciem programu CLC Genomic Workbench 12.0 (Qiagen) wykorzystując spersonalizowany algorytm filtrujący raportowane warianty (ryc. 5).

Po zastosowaniu odpowiednich filtrów oraz parametrów oceny in-silico otrzymano listę 30 wariantów obecnych w 21/30 (70%) przypadków (tab. 35), które sklasyfikowano w oparciu o kryteria ACMG (*American College of Medical Genetics and Genomics*, Richards i wsp., 2015) oraz kryteria definiujące w/w poziomy (ang. tier) I-IV. Warianty przydzielono do jednej z następujących kategorii: 1) patogenny / potencjalnie patogenny (tab. 36); 2) o nieznanym znaczeniu (VUS, ang. *variant of uncertain (unknown) significance*; tab. 37); 3) łagodny / prawdopodobnie łagodny (tab. 38). Wszelkie zapisy zmian w sekwencji nukleotydowej oraz białkowej użyte w niniejszej pracy są zgodne z rekomendacjami Human Genome Variation Society (HGVS) [den Dunnen i wsp., 2016].

Tabela 34. Parametry jakości sekwencjonowanych próbek

Nr	Ilość sczytań	Procent zmapowanych sczytań	Odsetek niesparowanych odczytów (<i>ang.</i> <i>broken pairs</i>)	Ilość grup	Ilość indywidualnych odczytów (<i>ang.</i> <i>singleton groups</i>)	Średnia ilość odczytów dla grup UMI	Średnia jakość odczytów	Średnia jakość odczytów dla grup UMI	Średnie pokrycie	Ilość fragmentów z niepełnym pokryciem (<i><85x</i>)
S01	14698672	97,24%	2,27%	3005474	1478906	2,43	33,64	45,85	1166,3	85
S02	10857380	98,33%	1,70%	1783935	853875	3,04	33,32	46,2	1051,8	55
S03	10662822	98,03%	1,81%	1967947	895333	2,7	33,53	46,7	988,3	25
S04	11014300	97,41%	2,51%	1352494	599804	4,07	33,35	46,81	482,9	325
S05	15707100	98,39%	1,67%	2005041	913226	3,92	33,29	46,74	1264,6	40
S06	14010536	97,91%	2,72%	2307443	1104637	3,06	33,32	46,14	1038,8	54
S07	12705468	98,68%	1,53%	2766642	1406679	2,3	33,15	45,29	2239,1	4
S08	10726316	98,53%	2,43%	856861	288121	6,32	33,16	49,72	519,6	49
S09	10300098	97,89%	2,28%	868044	323576	5,94	33,37	48,64	362,2	312
S10	15155532	98,06%	1,80%	2107042	916983	3,59	33,52	47,26	966,5	39
S11	12470546	97,82%	2,80%	2792408	1652492	2,25	33,07	43,04	1516,3	6
S12	11379190	97,61%	2,72%	1869881	952120	3,05	33,19	45,13	803	129
S13	11480750	97,88%	2,99%	1745638	824217	3,32	33,08	46,14	1009,6	23
S14	12432788	98,52%	1,87%	2444109	1219905	2,55	33,14	45,59	1833,3	5
S15	8195076	97,71%	2,56%	917392	402684	4,48	33,35	47,06	403,2	288
S16	14228122	98,25%	1,32%	1702376	615815	4,16	33,81	49,35	685,3	139
S17	11291378	97,61%	1,73%	1033319	357754	5,43	33,68	49,44	281,1	377
S18	10106702	97,35%	2,48%	1128468	428039	4,47	33,41	48,49	429,8	274
S19	12792262	97,93%	1,59%	993012	314934	6,41	33,48	50,09	364,4	338
S20	7224340	97,29%	2,04%	754197	274819	4,76	33,49	48,86	240,4	382
S21	12986036	98,04%	2,00%	1705563	723913	3,81	33,4	47,53	814	41
S22	13225548	97,86%	1,74%	1841123	753489	3,58	33,63	47,97	633,6	210
S23	7716874	98,03%	1,89%	698257	247344	5,52	33,33	49,09	280,8	347
S24	12244834	97,81%	2,18%	2119481	888635	2,89	33,47	47,62	973,5	26
S25	6986940	96,78%	3,04%	1007883	438592	3,46	33,25	46,98	386,7	320
S26	5526192	97,41%	2,56%	746133	300333	3,7	33,36	47,92	287,7	343
S27	12207832	98,42%	1,57%	2240321	980298	2,72	33,13	47,01	1294,3	7
S28	10127798	98,04%	2,06%	2138373	1080039	2,37	33,35	45,41	1127	9
S29	8768304	97,99%	2,95%	1344142	577671	3,29	33,06	47,22	766,9	21
S30	9630466	97,61%	1,67%	722168	250936	6,62	33,65	49,25	176,1	392

Jako warianty o znaczeniu patogennym lub prawdopodobnie patogennym sklasyfikowano łącznie 11 zmian w czterech genach: *DISP2*, *KIT*, *KRAS* oraz *PTCH1* zidentyfikowanych w 14 różnych przypadkach badanych (tab. 36). Wśród nich stwierdzono obecność ultrazadkiego wariantu (opisanego jako singleton z częstością <1:100,000 alleli w bazie GnomAD Exomes) w genie *DISP2* *c.2212C>T* (*p.Gln738**) w jednym przypadku *germinoma* oraz dwóch nowych, dotychczas nieopisanych w populacji ogólnej wariantów w genie *PTCH1*: *c.391G>T* (*p.Glu131**) oraz *c.2773del* (*p.Ala925fs*) w guzach kontrolnych (odpowiednio rdzeniaku zarodkowym oraz raku podstawnokomórkowym skóry). Ponadto w badanym materiale stwierdzono obecność n=6 znanych zmian patogennych w genie *KIT* w ośmiu guzach GCTs oraz jednej w genie *KRAS*. Warianty genu *KIT* zlokalizowane były typowo, w tzw. regionach krytycznych genu (tzw. *ang. hot-spot*) tzn. w eksonie 9, 13 i 17. Dodatkowa celowana re-analiza tych *loci* w guzach, które z powodu pokrycia <100x dla regionów genu *KIT* nie były objęte automatycznie analizą (por. ryc. 5; filtrowanie danych NGS), umożliwiła wykrycie znanych mutacji w dwóch dodatkowych guzach: S04 i S17.

Do drugiej kategorii zaliczono warianty o nieznanym znaczeniu klinicznym. Łącznie grupa obejmowała dziewięć zmian molekularnych w sześciu genach: *SMO*, *GLI2*, *GLI3*, *LRP2*, *FGFR3* oraz *KIT* zidentyfikowanych u ośmiu różnych pacjentów i w jednej próbce kontrolnej BCC (S07) (tab. 37). Trzecia kategoria: warianty łagodne i prawdopodobnie łagodne obejmuje 10 różnych wariantów niepatogennych i/lub prawdopodobnie niepatogennych w sześciu genach, zidentyfikowanych w siedmiu GCTs oraz raku podstawkonokórkowym skóry (tab. 38). Większość z wariantów zaliczonych do tych grup została już opisana w populacji kontrolnej; ponadto część z nich została już zaraportowana jako zmiana łagodna lub o niepewnym znaczeniu w bazie ClinVar oraz COSMIC. Dla produktów genów szlaku Hh nie określono jeszcze struktury cząsteczki białka, dlatego też ocena wpływu stwierdzanych substytucji na budowę i funkcję białka jest jedynie hipotetyczna i opiera się o wyniki analiz *in-silico* zebranych w Tabeli 37 i 38.

W żadnym z analizowanych przypadków nie stwierdzono zmian molekularnych dla 13 spośród analizowanych genów: *DHH*, *IHH*, *SHH*, *GLI1*, *HHIP*, *PTCH2*, *PTCHD1*, *ZIC1*, *ZIC2*, *NRAS*, *HRAS*, *CBL* oraz *PTEN*.

Tabela 35. Ogół wariantów sekwencyjnych obecnych w guzach germinalnych analizowanych techniką NGS w oparciu o autorski panel genów.

Legenda: k – kobieta; m- mężczyzna; BCC – rak podstawnomórkowy; MB – rdzeniak zarodkowy; b.d. – brak danych

Nr	Rozpoznanie	Lokalizacja	Płeć	Wiek zachorowania	Warianty sekwencyjne stwierdzone w badaniu techniką NGS
S01	rak zarodkowy	jądro	m	17 lat	-
S02	dysgerminoma	jajnik	k	11 lat	SMO: c.2011C>T KIT: c.2446G>T KIT: c.2826C>A LRP2: c.4351G>T
S03	dysgerminoma	jajnik	k	16 lat	KIT: c.1965T>G
S04	dysgerminoma	jajnik	k	16 lat	KIT: c.2446G>C FGFR3: c.1150T>C
S05	guz pęcherzyka żółtkowego	jądro	m	1 rok i 3 miesiące	SUFU: c.37A>C ERBB4: c.473C>A
S06	guz pęcherzyka żółtkowego	jądro	m	11 miesięcy	MTOR: c.*416G>A MTOR: c.4941T>G
S09	dysgerminoma	miednica mniejsza	k	12 lat	GLI3: c.341G>A GLI3: c.3083_3084delinsTT KIT: c.2446G>C
S10	guz mieszany	jądro	m	16 lat	KIT: c.1965T>G
S11	guz pęcherzyka żółtkowego	jajnik	k	17 lat	-
S13	dysgerminoma	jajnik	k	16 lat	KIT: c.1965T>G
S14	guz pęcherzyka żółtkowego	jądro	m	3 lata	GLI3: c.341G>A
S15	guz mieszany	jądro	m	16 lat	FGFR3: c.358C>A
S16	rak zarodkowy	jądro	m	16 lat	-
S17	dysgerminoma	jajnik	k	13 lat	KIT: c.2447A>T
S18	guz mieszany	jądro	m	16 lat	KIT :c.1427G>T KRAS: c.35G>T LRP2: c.4351G>T
S19	guz mieszany	jądro	m	17 lat i 8 miesięcy	DISP2: c.2212C>T
S20	potwornik niedojrzały	jądro	m	2 miesiące	-
S21	guz pęcherzyka żółtkowego	jajnik	k	12 lat	FGFR3: c.358C>A
S22	guz mieszany	jajnik	k	17 lat	LRP2: c.11395C>T
S23	potwornik dojrzały	jajnik	k	9 lat	-
S24	guz mieszany	jądro	m	15 lat	-
S25	guz pęcherzyka żółtkowego	jądro	m	2 lata	GLI2: c.4332_4333delinsAT
S26	guz pęcherzyka żółtkowego	jądro	m	1 rok i 1 miesiąc	-
S27	dysgerminoma	dysgenetyczna gonada	k	7 lat	KIT: c.2466T>A
S28	guz mieszany	jajnik	k	17 lat	KIT: c.2446G>T LRP2: c.3263A>G LRP2: c.11328G>T
S29	guz pęcherzyka żółtkowego	jądro	m	2 lata	-
S30	guz mieszany	jądro	m	17 lat	LRP2: c.10937G>A
S07	BCC	skóra	k	66 lat	PTCH1: c.2773del LRP2; c.12580C>T LRP2: c.12725A>G
S08	MB	mózg	k	17 lat	PTCH1: c.391G>T
S12	MB	b.d.	b.d.	b.d.	-

Tabela 36. Patogenne lub prawdopodobnie patogenne warianty sekwencyjne obecne w guzach germinalnych analizowanych techniką NGS w oparciu o autorski panel genów.

Legenda: germ. – pochodzenie germinalne; som. – pochodzenie somatyczne; wyst. – występowanie; dbSNP – Database of Single Nucleotide Polymorphisms (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>; stan na: 30.06.2019) [Sherry i wsp., 2001]; COSMIC – Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (cancer.sanger.ac.uk; stan na: 30.06.2019) [Tate i wsp., 2019]; ClinVar – [Landrum i wsp., 2018]; Grupa predyktorów in silico: GERP – Genomic Evolutionary Rate Profiling [Cooper i wsp., 2005]; DANN - [Quang i wsp., 2015]; CADD – Combined annotation-dependent depletion [Rentzsch I wsp., 2019]; SIFT - sorts intolerant from tolerant [Ng i Heinkoff, 2003]; MutationTaster – [Schwarz i wsp., 2014]; PolyPhen – [Adzhubei I wsp., 2013] ACMG – [Richards i wsp., 2015; Kalia i wsp., 2017]; TIER – [Li i wsp., 2017]

* Liczba sczytań dla danego wariantu / pokrycie (częstość wyst. wariantu w %)

** Szacowana częstość wyst. allelu na podstawie Gnomad Exomes

nr	Zmiana na poziomie cDNA	Zmiana na poziomie białka	Odsetek allelu w badanej próbce (VAF)*	db SNP ID COSMIC ID	ClinVar	Szacowana częstość występowania allelu w populacji**	GERP	DANN	CADD	SIFT	Mutation Taster	Poly Phen	ACMG	TIER
DISP2 (OMIM*607503) NM_033510.2 NP_277045.1														
S19	c.2212C>T	p.Gln738*	24/101 23,77%	rs1294639078	-	1:230000 - 1:104000	4.82	1	-	-	patogeny	-	PVS1 PP3	III
KIT (OMIM*164920) NM_000222.2 NP_000213.1														
S18	c.1427G>T	p.Ser476Ile	84/598 14,05%	COSM219784	-	-	6.02	1	-	0.001	patogeny	1	PM1 PM2 PP3 PP5	I
S03	c.1965T>G	p.Asn655Lys	610/1908 31,97%	rs1057519708 COSM235682	Znaczenie niepewne (germ.: RCV000549644; som.: RCV000428319)	-	6,06	1	23	0	patogeny	1	PM1 PM2 PP3 PP5	I
S10			449/1916 23,43%											
S13			2600/3654 71,15%											
S09	c.2446G>C	p.Asp816His	16/123 13,01%	rs121913506 COSM1310	Patogeny (germ.: RCV000379347; som.: RCV000418294, RCV000505647, RCV000439677, RCV000428990, RCV000014877)	-	5,62	0.99	26	0.025	patogeny	0,894	PM1 PM2 PP3 PP5	I
S28	c.2446G>T	p.Asp816Tyr	81/531 15,25%	rs121913506 COSM1310	Patogeny / prawdopodobnie patogeny (som: RCV000422812, RCV000429574, RCV000014874, RCV000422151, RCV000663344)	-	5,62	1	32	0.001	patogeny	0.97	PM1 PM2 PM5 PP3 PP5	I
S02			175/727 24,07%											
S27	c.2466T>A	p.Asn822Lys	88/607 14,50%	rs121913514	Znaczenie niepewne (germ.: RCV000549644,	-	5.47	1	25	0	patogeny	1	PS1 PM1	I

					RCV000428319; som.: RCV000428319, RCV000429954; RCV000436687) (germ. i som.: RCV000419670									PM2 PP3 PP5	
Pokrycie <100x przy VAF% >10%															
S04	c.2446G>C	p.Asp816His	72/88 81,82%	rs121913506 COSM1310	Patogenny (germ.: RCV000379347; som.: RCV000418294, RCV000505647, RCV000439677, RCV000428990, RCV000014877)	-	5,62	1	26	0.025	patogenny	0,894	PM1 PM2 PP3 PP5	I	
S17	c.2447A>T	p.Asp816Val	11/72 15,28%	rs121913507 COSM1314	Patogenny/ Prawdopodobnie patogenny / Znaczenie niepewne (germ. i som.: RCV000431704; som.: RCV000443179, RCV000505554, RCV000444150, RCV000014864, RCV000656673, RCV000656674, RCV000656675, RCV000656676	-	5.62	1	31	0	patogenny	0,975	PM1 PM2 PM5 PP3	I	
KRAS (OMIM*190070) NM_033360.3 NP_203524.1															
S18	c.35G>T	p.Gly12Val	32/145 22,07%	rs121913529 COSM520 COSM1140133	Patogenny (germ.: RCV000157944; som.: RCV000585801, RCV000154262, RCV000439101, RCV000417765, RCV000428010, RCV000439750, RCV000029216, RCV000013413, RCV000150895)	-	5.68	1	25	0.008	patogenny	0.972	PM1 PM2 PM5 PP2 PP3 PP5	I	
PTCH1 (OMIM*601309) NM_000264.3 NP_000255.2															
BCC S07	c.2773del	p.Ala925fs	740/2774 28,68%	-	-	-	5.1399	-	-	-	-	-	PVS1 PM2 PP3	II	
MB S08	c.391G>T	p.Glu131*	741/772 95,98%	-	-	-	4.67	1	-	-	patogenny		PVS1 PM2 PP3	II	

Tabela 37. Warianty sekwencyjne o nieznanym znaczeniu klinicznym (VUS) obecne w guzach germinalnych analizowanych techniką NGS w oparciu o autorski panel genów.

Legenda: germ. – pochodzenie germinalne; som. – pochodzenie somatyczne; wyst. – występowanie; dbSNP – Database of Single Nucleotide Polymorphisms (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>; stan na: 30.06.2019) [Sherry i wsp., 2001]; COSMIC – Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (cancer.sanger.ac.uk; stan na: 30.06.2019) [Tate i wsp., 2019]; ClinVar – [Landrum i wsp., 2018]; Grupa predyktorów in silico: GERP – Genomic Evolutionary Rate Profiling [Cooper i wsp., 2005]; DANN - [Quang i wsp., 2015]; CADD – Combined annotation-dependent depletion [Rentzsch I wsp., 2019]; SIFT - sorts intolerant from tolerant [Ng i Heinkoff, 2003]; MutationTaster – [Schwarz i wsp., 2014]; PolyPhen – [Adzhubei I wsp., 2013]; ACMG – [Richards i wsp., 2015; Kalia i wsp., 2017]; TIER – [Li i wsp., 2017]

* Liczba sczytań dla danego wariantu / pokrycie (częstość wyst. wariantu w %)

** Szacowana częstość wyst. allelu na podstawie Gnomad Exomes

nr	Zmiana na poziomie cDNA	Zmiana na poziomie białka	Odsetek allelu w badanej próbce (VAF)*	db SNP ID COSMIC ID	ClinVar	Szacowana częstość występowania allelu w populacji**	GERP	DANN	CADD	SIFT	Mutation Taster	Poly Phen	ACMG	TIER
FGFR3 (OMIM*134934) NM_000142.4 NP_000133.1														
S15	c.358C>A	p.His120Asn	107/419 25,54%	rs771188160	-	-	3.45	0.92	5	0.85, 0.27, 0.70, 0.44	polimorfizm	0	PS4 PM2 BP4	III
S21			116/898 12,92%											
GLI2 (OMIM*165230) NM_005270.4 NP_005261.2														
S25	c.4332_4333 delinsAT	p.Met1444_Leu1445 delinsIlePhe	365/840 43,45%	-	Łagodny (RCV000538090)	-	4.57	-	-	-	-	-	PM2 PM5 BP6	III
GLI3 (OMIM*165240) NM_000168.5 NP_000159.3														
S09	c.341G>A	p.Arg114Lys	70/168 41,67%	rs146458902	Łagodny / prawdopodobnie łagodny (RCV000634037; RCV000501667; RCV000513753; RCV000270860; RCV000307311; RCV000370048)	1:400 1:300 (ASJ) 1:200	5.83	1	23	0	patogeny	0.978	PS4 PP3 BS1 BP6	IV
S14			620/1172 52,90%											
KIT (OMIM*164920) NM_000222.2 NP_000213.1														
S02	c.2826C>A	p.Cys942*	637/2109 30,20%	-	-	-	5,72	0.99	-	-	patogeny	-	PVS1 PM2 PP3	II/III
LRP2 (OMIM*600073) NM_004525.2 NP_004516.2														
S28	c.3263A>G	p.Lys1088Arg	110/272 40,44%	-	-	-	6.06	0.83	-	0.67, 0.48	polimorfizm	0.004	PM2 BP4	III

6. WYNIKI

S28	c.11328G>T	p.Trp3776Cys	540/1042 51,82%	rs758068621	-	1:27000 1:31000 (SAS) 1:14000	5.86	0.99	27	0.001	patogeny	1	PM2 PP3	III
S22	c.11395C>T	p.His3799Tyr	15/229 6,55%	-	-	-	6.17	1	-	0.03	patogeny	0,996	PM2 PP3	III
BCC (S07)	c.12580C>T	p.Pro4194Ser	290/1214 23,89%	COSM1722196	-	-	5.65	1	-	0.002	patogeny	1	PM2 PP3	III
SMO (OMIM*601500) NM_005631.4 NP_005622.1														
S02	c.2011C>T	p.Arg671Trp	37/135 49,63%	rs768907770 COSM4884365	-	1:13000 1:2700 (LAT) 1:42000	5.38	1	21	0.025	polimorfizm		PP3 BS1	II/III

Tabela 38. Niepatogenne lub prawdopodobnie niepatogenne warianty sekwencyjne obecne w guzach germinalnych analizowanych techniką NGS w oparciu o autorski panel genów.

Legenda: germ. – pochodzenie germinalne; som. – pochodzenie somatyczne; wyst. – występowanie; b.d. – brak danych; dbSNP – Database of Single Nucleotide Polymorphisms (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>; stan na: 30.06.2019) [Sherry i wsp., 2001]; COSMIC – Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (cancer.sanger.ac.uk; stan na: 30.06.2019) [Tate i wsp., 2019]; ClinVar – [Landrum i wsp., 2018];

Grupa predyktorów in silico: GERP – Genomic Evolutionary Rate Profiling [Cooper i wsp., 2005]; DANN – [Quang i wsp., 2015]; CADD – Combined annotation-dependent depletion [Rentzsch I wsp., 2019]; SIFT – sorts intolerant from tolerant [Ng i Heinkoff, 2003]; MutationTaster – [Schwarz i wsp., 2014]; PolyPhen – [Adzhubei I wsp., 2013]

ACMG – [Richards i wsp., 2015; Kalia i wsp., 2017]; TIER – [Li i wsp., 2017]

* Liczba szczytów dla danego wariantu / pokrycie (częstość wyst. wariantu w %)

** Szacowana częstość wyst. allelu na podstawie Gnomad Exomes

nr	Zmiana na poziomie cDNA	Zmiana na poziomie białka	Odsetek allelu w badanej próbce (VAF)*	db SNP ID COSMIC ID	ClinVar	Szacowana częstość występowania allelu w populacji**	GERP	DANN	CADD	SIFT	Mutation Taster	Poly Phen	ACMG	TIER
ERBB4 (OMIM*600543) NM_005235.2 NP_005226.1														
S05	c.473C>A	p.Ala158Glu	1940/3980 48,74%	rs370840578; COSM5369855 (oznaczony jako SNP); COSM5369854	-	1:4000 1:650 (SAS) 1:22000	5.32	0.99	24	0.28, 0.07	patogeny	1	BS1 BP6	III
FGFR3 (OMIM*134934) NM_000142.4 NP_000133.1														
S04	c.1150T>C	p.Phe384Leu	119/1112 37,68%	rs17881656; COSM6166952 (oznaczony jako SNP); COSM724	Łagodny / prawdopodobnie łagodny (RCV000442867; RCV000557832; RCV000121079)	1:300 - 1:170	4.68	0.96	18	0.37, 0.24, 0.37	polimorfizm	0.007	BS1 BS3 BP4 BP6	III
GLI3 (OMIM*165240) NM_000168.5 NP_000159.3														
S09	c.3083_3084delinsTT	p.Ser1028Ile	294/564 52,13%	rs886043721	Łagodny (RCV000544497; RCV000332595;	1:73 - 1:46	5.33	-	19	-	-	0.042	PM2 BP6	III
LRP2 (OMIM*600073) NM_004525.2 NP_004516.2														
S02	c.4351G>T	p.Val1451Phe	1031/2087 49,62%	rs146289506; COSM5020558 (oznaczony jako SNP)	Znaczenie niepewne (RCV000366184; RCV000194393)	1:500 1:200 (ASJ) 1:350	5,13	0.7	21	0.21	patogeny	0.109	BS1 BS4	IV
S18	c.10937G>A	p.Arg3646His	317/789 40,18%	rs142549310; COSM145593	Znaczenie niepewne (RCV000624161)	1:400 1:90 (FIN) 1:350	5.31	0.97	19	0.11	patogeny	0.061	PP3 BS1	IV
BCC	c.12725A>G	p.Asp4242Gly	1321/2726	rs35942532	Znaczenie niepewne	1:500	5.71	0.99	25	0.15	patogeny	0.471	BS1	IV

S07			48,46%		(RCV000766599; RCV000387234; RCV000195081)	1:200(FIN) 1:300								PP3	
S30	c.10937G>A	p.Arg3646His	259/474 54,64%	rs142549310; COSM145593	Znaczenie niepewne (RCV000624161)	1:400 1:90 (FIN) 1:350	5.31	0.96	19	0.11	patogenny	0.061	BS1	IV	
MTOR (OMIM*601231) NM_004958.3															
S06	c.*416G>A	-	187/267 70,04%	rs566776855	-	1:12000 - 1:6000	4.68	0.73	-	-	-	-	BP4	III	
S06	c.4941T>G	p.His1647Gln	575/ 779 73,83%	rs144984370	Znaczenie niepewne (RCV000471835)	1:6000 - 1:3000	5.91	0.81	15	1	patogenny	0.978	BP1 BP4	IV	
SUFU (OMIM*607035) NM_016169.3 NP_057253.2															
S05	c.37A>C	p.Thr13Pro	20/216 9,26%	rs1456048322; COSM6387609	-	b.d.	4.4	0.68	19	0.22, 0.12, 0.23	polimorfizm	0.001	PM2 BP1 BP4	III	

6.3. Ocena ekspresji genów w oparciu o łańcuchową reakcja polimerazy (PCR) w czasie rzeczywistym

Dla każdego przypadku badanie ekspresji genów metodą PCR w czasie rzeczywistym wykonano w trzech powtórzeniach. Analizowano wartości Ct (ang. *threshold cycle*; również Cp) opisujące moment wejścia reakcji w fazę logarytmicznego przyrostu produktu, w którym sygnał fluorescencji przekracza wartość graniczną umożliwiającą jego wykrycie. Jako wartość odcięcia odczytu przyjęto 35 cykl. Podczas procedury analizy danych zastosowano odpowiednie korekty otrzymanych wartości Ct w związku z przeprowadzeniem reakcji selektywnej preamplifikacji cDNA w toku eksperymentu. Wszystkie próbki pomyślnie przeszły przyjęte punkty kontrolne: braku kontaminacji DNA genomowym, kontrolę wydajności reakcji odwrotnej transkrypcji oraz jakości reakcji qPCR. Uzyskane wartości Ct poddano normalizacji względem poziomu ekspresji genu referencyjnego *HPRT1* (ang. *Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1*). Gen ten wybrano spośród pięciu badanych genów referencyjnych, które zostały wstępnie uwzględnione przy projektowaniu eksperymentu qPCR, ponieważ uzyskano dla niego najstabilniejszą ekspresję we wszystkich badanych podgrupach. Wyniki średniej arytmetycznej wartości ekspresji genu *HPRT1* w poszczególnych grupach badanych i grupach kontrolnych przedstawiono w tab. 39.

Tabela 39. Porównanie średniej arytmetycznej wartości Ct odzwierciedlającej stopień ekspresji genu referencyjnego *HPRT1* w badanych podgrupach

Grupa	Średnia arytmetyczna wartości Ct dla genu referencyjnego <i>HPRT1</i>
kontrola pozytywna	29,54
kontrolna negatywna	29,16
<i>teratoma maturum</i>	30,54
<i>teratoma immaturum</i>	31,41
guzy mieszane	30,73
<i>yolk sac tumor</i>	30,61
<i>dysgerminoma</i>	29,80
<i>carcinoma embryonale</i>	30,74

Wykonano dwie równocenne analizy wyników mające na celu porównanie znormalizowanych wartości ekspresji badanych genów w sześciu grupach histologicznych względem zaobserwowanego w kontroli pozytywnej i negatywnej eksperymentu. Przeprowadzono również zestawienie różnic w poziomach ekspresji genów badanych oraz referencyjnych w obu zastosowanych kontrolach.

6.3.1. Porównanie profili ekspresji kontroli pozytywnej i negatywnej.

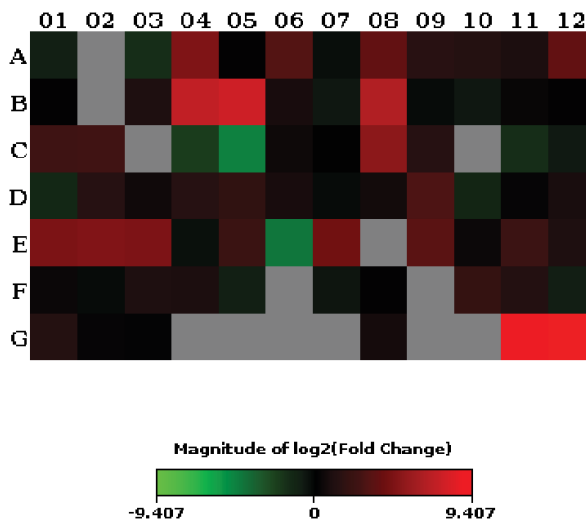
Porównanie profili ekspresji tkanki rdzeniaka z podgrupy molekularnej SHH-aktywnej (dalej: kontrola pozytywna) względem tkanek normotypowego węzła chłonego (dalej: kontrola negatywna) wykazało znacząco (>100-krotnie) wyższą ekspresję czynników transkrypcyjnych *ZIC1* i *ZIC2* oraz genów *ERBB4* i *DISP2* w przypadku *medulloblastoma* (odpowiednio: 679x, 601x, 203x i 151x; $p < 0.001$). Istotnie wyższa ekspresja dotyczyła również genów *FGF9*, *HHIP*, *PTCHD1*, *BMP5*, *PTCHD2*, *PTCH2*, *SFRP1*, *BOC*, *CSNK1E* oraz *SMO* (tab. 40). Obniżoną ekspresją natomiast wyróżniły się dwa geny: *GREM1* oraz *RUNX2* (tab.40).

Tabela 40. Geny o zmienionej ekspresji w kontroli pozytywnej względem kontroli negatywnej (krotność >10)

Legenda: *Pozycja opisująca umieszczenie genu na rycinie Heat Map (ryc. 7)

Geny o zmienionej ekspresji w kontroli pozytywnej względem kontroli negatywnej (krotność >10)				
Pozycja*	Gen	Krotność	Wartość p	Adnotacja
G12	ZIC2	679	<0.001	A
G11	ZIC1	600	<0.001	A
B05	ERBB4	204	<0.001	A
B04	DISP2	151	<0.001	A
B08	FGF9	100	<0.001	A
C08	HHIP	37	<0.001	A
E02	PTCHD1	29	<0.05	-
A04	BMP5	28	<0.001	A
E03	PTCHD2	26	<0.001	-
E01	PTCH2	25	<0.001	A
E07	SFRP1	20	<0.001	A
A08	BOC	14	<0.01	-
A12	CSNK1E	13	<0.001	-
E09	SMO	11	<0.001	A
C05	GREM1	-28	<0,01	A
E06	RUNX2	-20	<0.001	-

Rycina 7. *Heat Map* przedstawiająca wizualizację zmian krotności ekspresji dla każdego genu badanego w macierzy między kontrolą negatywną i pozytywną.
 Legenda: kolor zielony – obniżenie ekspresji; kolor czerwony – wzrost ekspresji; kolor czarny – średnia wielkość ekspresji genu; kolor szary – geny, w których w obu kontrolach $Ct > 35$



6.3.2. Profil ekspresji genów w grupie badanej - analiza w odniesieniu do profilu ekspresji kontroli negatywnej

Analizowano profile ekspresji genów zaangażowanych w sygnalizację Hedgehog w sześciu podtypach histologicznych GCTs. Na rycinach *Heat Map* (ryc. 6) przedstawiono wizualizację zmiany krotności ekspresji wszystkich genów badanych w każdej podgrupie histologicznej względem zastosowanej kontroli negatywnej.

Podtyp histologiczny: potworniak dojrzały

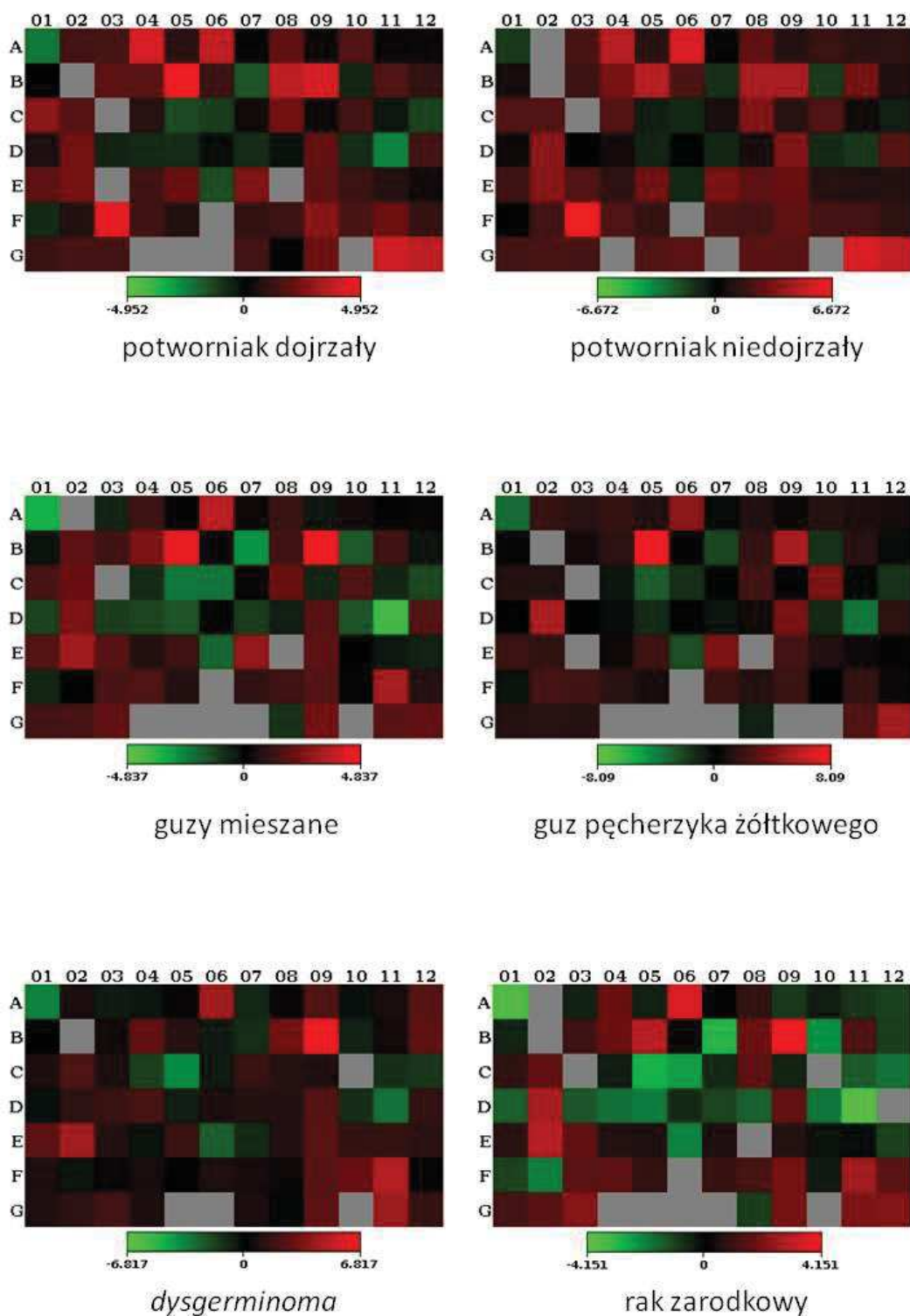
Zaobserwowano istotnie zwiększoną ekspresję trzech genów: *ZIC2*, *FGF9* oraz *ERBB4* (odpowiednio: 13x, 13x, 31x; $p < 0,05$). Zmniejszoną ekspresję wykazały natomiast dwa geny: *BCL2* kodujący regulator apoptozy oraz *PRKACB* kodujący zależną od cAMP katalityczną podjednostkę beta kinazy (odpowiednio -5x, -6x; $p < 0,001$).

Podtyp histologiczny: potworniak niedojrzały

Zanotowano zwiększoną ekspresję siedemnastu genów, wśród których znajdują się geny *ERBB4* i *FGF9* opisywane wcześniej w podtypie *teratoma maturum* (odpowiednio: 29x oraz 23x; $p < 0,05$). Dodatkowo nadekspresji uległy trzy geny białek morfogenetycznych kości: *BMP7*, *BMP5* i *BMP4* (odpowiednio: 56x, 30x oraz 4x; $p < 0,05$), gen kodujący receptor

Rycina 8. *Heat Map* przedstawiający wizualizację zmian krotności ekspresji dla każdego genu badanego w macierzy w poszczególnych podtypach histologicznych GCTs względem kontroli negatywnej.

Legenda: kolor zielony – obniżenie ekspresji; kolor czerwony – wzrost ekspresji; kolor czarny – średnia wielkość ekspresji genu; kolor szary – geny, w których w obu kontrolach $Ct > 35$



wzrostu fibroblastów 3 - *FGFR3* (22x; $p < 0,01$) gen kodujący czynnik transkrypcyjny *FOXE1* (8x; $p < 0,05$), czynnik zatrzymania wzrostu *GAS1* (*growth agrest specific 1*) (5x; $p < 0,05$), gen kodujący białko o niskiej gęstości receptora lipoproteinowego 2 *LRP2* (13x; $p < 0,05$), *OTX* (ang. *Orthodenticle homeobox 2*) (11x; $p < 0,05$) oraz gen kodujący zaangażowane w przekaz sygnalizacji WNT białko *SFRP1* (9x; $p < 0,05$). Geny kodujące białka bezpośrednio należące do ścieżki sygnalizacyjnej Hedgehog uległy nadekspresji w mniejszym stopniu. Istotnie wyższa ekspresja dotyczyła genów kodujących: receptory *PTCHD1* i *SMO* (odpowiednio: 12x; $p < 0,05$ oraz 7x; $p < 0,01$) oraz białka: *HHIP* (11x; $p < 0,01$), *RAB23* (9x, $p < 0,05$) - negatywny regulator ścieżki, *DISP2* (9x; $p < 0,05$) uczestniczący w parakrynej sygnalizacji Hedgehog oraz białko receptorowe *BOC* (6x; $p < 0,05$). Żaden z genów badanych w grupie guzów o podtypie histologicznym *teratoma immaturum* nie wykazał istotnie obniżonej ekspresji względem kontroli negatywnej.

Podtyp histologiczny: guzy mieszane

W analizie ekspresji podgrupy guzów mieszanych zaobserwowano istotnie zwiększoną ekspresję trzech genów, wśród których znajdują się dwa podwyższone również w podtypie *teratoma immaturum*: *FGFR3* (29x; $p < 0,01$) oraz *PTCHD1* (8x; $p < 0,05$), jak również gen *GLI1* kodujący jeden z istotnych dla sygnalizacji Hh czynników transkrypcyjnych (4x; $p < 0,05$). Obniżoną ekspresję zanotowano natomiast dla pięciu genów, w tym podobnie jak w grupie *teratoma maturum* *PRKACB* (-16x; $p < 0,01$) oraz *BCL2* (-11x; $p < 0,001$), jak również *FBXW11*, *GREM1* oraz *GSK3B* (odpowiednio: -7x $p < 0,01$; -5x $p < 0,05$; -5x $p < 0,01$). Żaden z tych genów nie koduje kluczowych elementów szlaku Hh.

Podtyp histologiczny: guz pęcherzyka żółtkowego

Guzy o podtypie histologicznym guza pęcherzyka żółtkowego wykazały zwiększoną ekspresję ośmiu genów, które były już powyżej wymienione w analizach poprzednich grup histologicznych: *ERBB4* (272x; $p < 0,001$), *LRP2* (46x; $p < 0,05$), *SFRP1* (16x; $p < 0,01$), *OTX2* (15x; $p < 0,01$), *ZIC1* (7x; $p < 0,05$). Wśród genów o zwiększonej ekspresji znajdowały się również cztery geny kodujące białka bezpośrednio należące do ścieżki Hh: ligand *IHH* (17x; $p < 0,05$), receptor *SMO* (5x; $p < 0,05$), inhibitor ścieżki Hh *HHIP* (5x; $p < 0,05$) oraz regulator *RAB23* (4x; $p < 0,01$). Zmniejszoną ekspresję zaobserwowano dla sześciu genów, w tym raportowanych w poprzednich grupach: *PRKACB*, *BCL2*, *GREM1*, *FBXW11* (-14x, -11x; -7x, -5x; $p < 0,001$) oraz dodatkowo genu *RUNX2* (-5x; $p < 0,001$).

Podtyp histologiczny: dysgerminoma

Zwiększoną ekspresję wykazano dla szesnastu genów, wśród których znaczą grupę stanowiły geny szlaku sygnalizacyjnego WNT: *WNT3*, *WNT2B*, *WNT9A*, *WNT2* (30x, 8x, 6x, 5x; $p < 0,05$). Największy wzrost ekspresji zaobserwowano dla genu *FGFR3* (113x; $p < 0,005$). *BMP7*, *FGF9*, *FRMD6* (20x, 9x, 6x; $p < 0,05$), *CSNK1E* (5x; $p < 0,001$), *BTRC* (5x; $p < 0,05$), *MOB1B* (4x; $p < 0,05$). Ponadto odnotowano zwiększoną ekspresję dwóch genów kodujących receptory z domeną Patched: *PTCHD1*, *PTCH2* (21x, 6x; $p < 0,001$), receptor *SMO* (6x; $p < 0,05$) oraz genu *DISP2* (7x $p < 0,05$). Obniżenie ekspresji zaobserwowano z kolei dla czterech genów raportowanych również w poprzednich badanych grupach histologicznych: *GREM1*, *BCL2*, *PRKACB*, *RUNX2* (kolejno: -14x, -11x, -8x, -6x; $p < 0,001$).

Podtyp histologiczny: rak zarodkowy

W grupie guzów raka embrionalnego zanotowano zwiększoną ekspresję czterech genów: *ERBB4* (8x; $p < 0,05$) i *PTCHD1* (8x; $p < 0,01$) oraz dwóch genów kodujących elementy ścieżki sygnalizacyjnej WNT: *WNT3* i *WNT5B* (kolejno: 6x, 5x; $p < 0,05$). Obniżenie ekspresji zaobserwowano dla ośmiu genów, z których wszystkie były raportowane we wcześniej opisywanych podgrupach histologicznych: *PRKACB*, *BCL2* (-14x, -13x; $p < 0,001$) oraz *FBXW11*, *GREM1*, *GSK3B*, *FKBP8*, *RUNX2*, *MTSS1* (-9x, -8x, -6x, -5x, -4x, -4x; $p < 0,001$).

Podsumowanie

W przeprowadzonej analizie ekspresji genów w poszczególnych podtypach histologicznych guzów germinalnych względem ekspresji zaobserwowanej w kontroli negatywnej, tkanki normotypowych węzłów, bez aktywacji SHH) zanotowano istotne różnice w ekspresji dziesięciu genów występujące w minimum połowie podtypów histologicznych. Stwierdzono wzrost ekspresji genów: *ERBB4*, *FGF9*, *FGFR3*, *PTCHD1* i *SMO* oraz spadek ekspresji genów *BCL2*, *FBWXW11*, *GREM1*, *PRKACB* i *RUNX2* (tab. 41).

Najczęściej wzrost ekspresji dotyczył dwóch genów, które były istotnie podwyższone w czterech podtypach histologicznych GCTs: *ERBB4* (*yolk sac* (272x; $p < 0,001$); *teratoma maturum* (31x; $p < 0,05$); *teratoma immaturum* (29x; $p < 0,05$); *carcinoma embryonale* (8x; $p < 0,05$)) oraz *PTCHD1* (*teratoma immaturum* (12x; $p < 0,05$); *dysgerminoma* (21x; $p < 0,001$); guzy mieszane (8x; $p < 0,05$); *carcinoma embryonale* (8x; $p < 0,01$)). Najczęściej obserwowane obniżenie ekspresji występowało jednocześnie w pięciu podtypach histologicznych GCTs i dotyczyło dwóch genów: *BCL2* (*carcinoma embryonale* (-13; $p < 0,001$); guzy mieszane (-11x; $p < 0,001$); *yolk sac* (-11x; $p < 0,001$); *dysgerminoma* (-11x; $p < 0,001$); *teratoma*

maturum (-5x; $p < 0,001$)) oraz *PRKACB* (guzy mieszane (-16x; $p < 0,001$); *carcinoma embryonale* (-14x; $p < 0,001$); *yolk sac* (-13x; $p < 0,001$); *dysgerminoma* (-8x; $p < 0,001$); *teratoma maturum* (-6x; $p < 0,001$)).

Tabela 41. Podsumowanie ekspresji badanych genów z uwzględnieniem wyłącznie genów o zmienionej ekspresji w ≥ 3 podtypach histologicznych.

Legenda: Kolor szary – brak zmiany ekspresji $\geq 4x$

*Pozycja genu na płycie badanej oraz rycinach Heat Map (ryc.6)

Podtyp histologiczny		Teratoma maturum	Teratoma immaturum	Guzy mieszane	Yolk sac tumor	Dysgerminoma	Carcinoma embryonale
Pozycja*	Gen	Poziom krotności zmiany ekspresji (zaokrąglony do jedności)					
A01	<i>BCL2</i>	-5		-11	-11	-11	-13
B05	<i>ERBB4</i>	31	29		272		8
B07	<i>FBXW11</i>				-5	-5	-4
B08	<i>FGF9</i>	13	22			9	
B09	<i>FGFR3</i>		22	29		113	
C05	<i>GREM1</i>			-5	-7	-13	-8
D11	<i>PRKACB</i>	-6		-16	-13	-8	-14
E02	<i>PTCHD1</i>		12	8		21	8
E06	<i>RUNX2</i>				-5	-5	-4
E09	<i>SMO</i>		7		5	6	

6.3.3. Profil ekspresji genów w grupie badanej w odniesieniu do wyników kontroli pozytywnej

Na rycinach *Heat Map* (ryc. 9) przedstawiono wizualizację zmiany krotności ekspresji wszystkich genów badanych w każdej podgrupie histologicznej względem zastosowanej kontroli pozytywnej (*medulloblastoma*).

Podtyp histologiczny: potworniak dojrzały

W analizie ekspresji genów w grupie guzów potworniaka dojrzałego nie zaobserwowano genów o zwiększonej ekspresji względem kontroli pozytywnej. Obniżonej ekspresji uległo 11 genów. Największą różnicę ekspresji odnotowano dla czynników transkrypcyjnych *ZIC2* oraz *ZIC1* (kolejno: -51x, -35x; $p < 0,001$). Ponadto zmniejszonej ekspresji uległy geny: *CSNK1E*, *FGF9*, *ERBB4*, *PRKACB* (-11x, -8x, -7x, -7x; $p < 0,001$). *MTSS1* (-6x; $p < 0,05$) oraz *MOB1B* (-5x; $p < 0,01$) oraz trzy z genów kodujących kluczowe elementy szlaku Hh: *DISP2* (-42x; $p < 0,001$), *HHIP* (-8; $p < 0,05$) oraz *PTCH2* (-7x; $p < 0,001$).

Podtyp histologiczny: potworniak niedojrzały

W podgrupie guzów *teratoma immaturum* zaobserwowano zwiększenie ekspresji siedmiu genów badanych w tym dwóch białek morfogenetycznych kości: *BMP4* i *BMP7* (12x, 6x; $p < 0,01$) oraz *FGFR3* (25x; $p < 0,01$), *RUNX2* (10x; $p < 0,01$), *FOXE1* (7x; $p < 0,05$), *KCTD11* (4x; $p < 0,05$) i *VEGFA* (4x; $p < 0,05$). Ekspresja dziewięciu genów uległa natomiast obniżeniu. Największy spadek ekspresji w tej grupie guzów zanotowano dla genu *ZIC2* (-19x; $p < 0,001$) oraz kolejno dla genów *ZIC1*, *ERBB4*, *MTSS1*, *CSNK1E*, *FGF9* (-11x, -7x, -6x, -6x, -4x; $p < 0,001$) w tym dla trzech genów kodujących kluczowe elementy sygnalizacji Hh: *DISP2*, *PTCH2*, *PTCHD2* (odpowiednio: -16x, -7x, -5x; $p < 0,001$).

Podtyp histologiczny: guzy mieszane

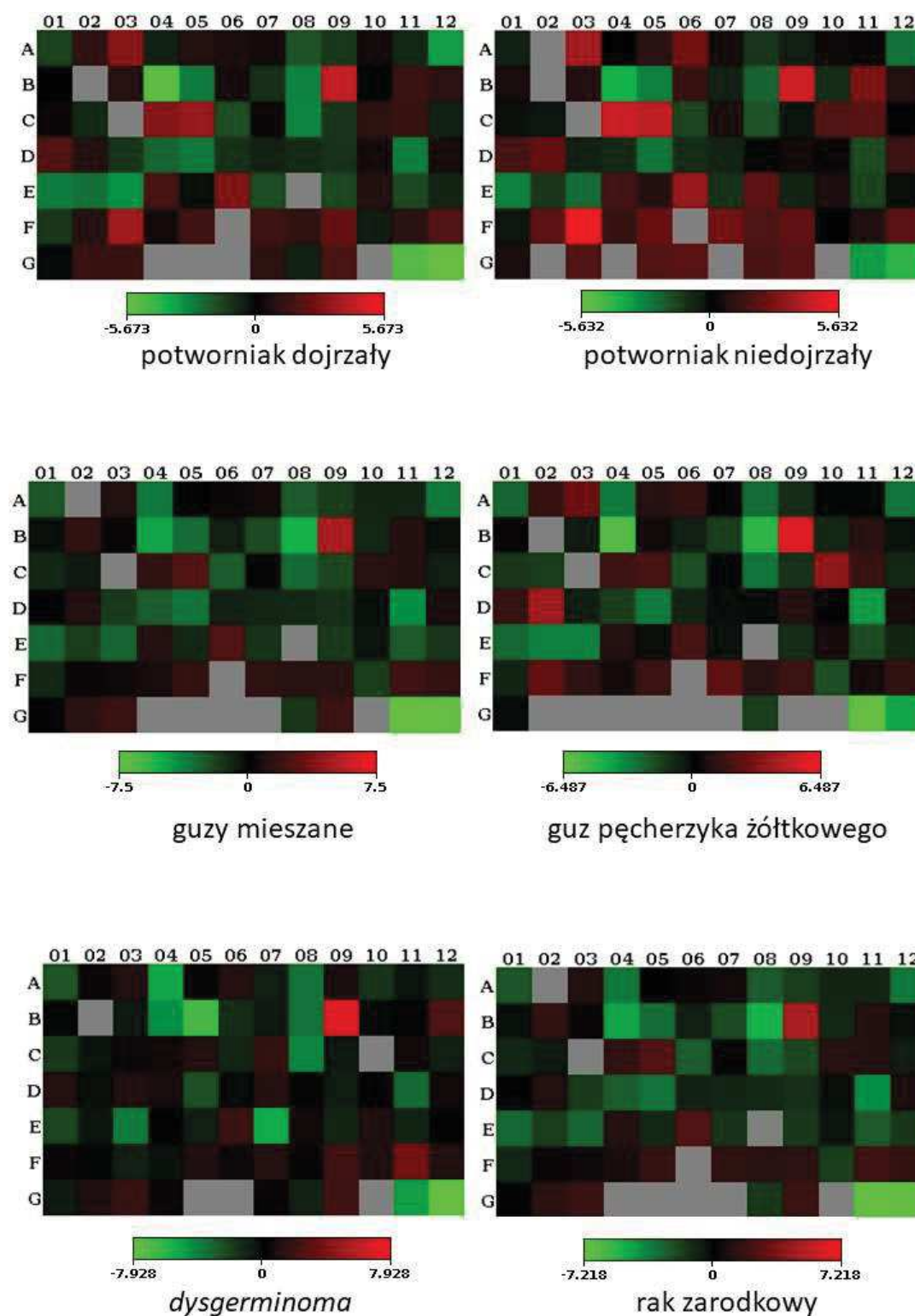
W grupie guzów mieszanych jedynie dwa geny uległy nadekspresji: *FGFR3* (32x; $p < 0,01$) oraz *RUNX2* (5x; $p < 0,05$) podczas gdy spadek ekspresji względem zaobserwowanej w kontroli pozytywnej wykazano dla 16 genów. Największą różnicę odnotowano dla genów *ZIC1* i *ZIC2* (-181x, -178x; $p < 0,001$) oraz kolejno dla genów: *FGF9*, *PRKACB*, *BMP5*, *CSNK1E*, *MTSS1* (odpowiednio: -40x; -19x, -12x, -12x, -11x; $p < 0,001$) oraz *GSK3B*, *MOB1B*, *STK36*, *BCL2*, *FBXW11* (-7x, -7x, -6x, -6x, -5x; $p < 0,001$) i *IFT52* (-4x $p < 0,005$). Obniżoną ekspresję, podobnie jak w grupie *teratoma immaturum*, zanotowano również dla trzech genów kodujących kluczowe elementy sygnalizacji Hh: *DISP2*, *PTCH2*, *PTCHD2* (-29x, -8x, -8x; $p < 0,001$) jak również *HHIP* i *BOC* (-9x, -6x; $p < 0,001$).

Podtyp histologiczny: guz pęcherzyka żółtkowego

W grupie guzów pęcherzyka żółtkowego zaobserwowano zwiększoną ekspresję 4 genów w tym *IHH* (13x; $p < 0,05$) będącego ligandem ścieżki Hh; oraz *LRP2* (17x; $p < 0,05$), *BMP4* (7x; $p < 0,05$) i *WNT11* (6x; $p < 0,01$). 14 genów natomiast wykazało ekspresję obniżoną względem kontroli pozytywnej eksperymentu: *ZIC1*, *FGF9*, *ZIC2*, *PRKACB*, *BMP5*, *MTSS1*, *CSNK1E*, *BCL2* (odpowiednio: -90x, -31x, -19x, -16x, -9x, -9x, -8x, -6x,; $p < 0,001$). Podobnie jak w poprzednich grupach zaobserwowano zmniejszoną ekspresję genów *DISP2*, *PTCHD1*, *PTCHD2*, *HHIP*, *BOC* i *PTCH2* (-58x, -10x, -9x, -8x, -7x, -6x; $p < 0,001$).

Rycina 9. Heat Map przedstawiający wizualizację zmian krotności ekspresji dla każdego genu badanego w macierzy w poszczególnych podtypach histologicznych GCTs względem kontroli pozytywnej.

Legenda: kolor zielony – obniżenie ekspresji; kolor czerwony – wzrost ekspresji; kolor czarny – średnia wielkość ekspresji genu; kolor szary – geny, w których w obu kontrolach Ct>35



Podtyp histologiczny: dysgerminoma

Wśród guzów typu *dysgerminoma* nadekspresji uległo 5 genów w tym trzy kodujące elementy szlaku WNT: *WNT3*, *WNT9A* i *WNT2* (odpowiednio: 13x, 5x, 4x; $p < 0,05$) oraz *FGFR3* (129x; $p < 0,005$) i *FRMD6* (6x; $p < 0,05$). Obniżoną ekspresję zanotowano dla 14 genów badanych, wśród których największą krotność spadku poziomu ekspresji, na poziomie -243, zaobserwowano dla genu *ZIC2* ($p < 0,001$). Wśród pozostałych genów o obniżonej ekspresji było 5 genów kodujących elementy szlaku sygnalizacyjnego Hedgehog: *DISP2*, *HHIP*, *PTCHD2*, *BOC* oraz *PTCH2* (-22x, -18x, -14x, -12x, -4x; $p < 0,001$). Dodatkowo mniejszą ekspresję zanotowano dla genów: *ERBB4*, *SFRP1*, *BMP5*, *ZIC1*, *FGF9*, *PRKACB*, *BCL2*, *MTSS1* (-99x, -41x, -37x, -31x, -12x, -10x, -6x, -5x; $p < 0,001$).

Podtyp histologiczny: rak zarodkowy

W grupie *carcinoma embryonale* nadekspresję na podobnym poziomie zaobserwowano dla dwóch genów: *RUNX2* oraz *WNT5B* (5x, 4x; $p < 0,05$). Odnotowano również 24 geny o obniżonej względem badanej w kontroli pozytywnej ekspresji. Największy spadek ekspresji zanotowano dla dwóch genów kodujących motywy palców cynkowych: *ZIC2* oraz *ZIC1* (-149x, -144x;) oraz kolejno dla genów: *FGF9*, *CSNK1E*, *ERBB4*, *PRKACB*, *MTSS1*, *SFRP1*, *MOB1B* (odpowiednio: -28x, -28x, -24, -17x, -14x, -14x, -10x; $p < 0,001$), *BMP5*, *GSK3B*, *BCL2*, *FBXW11*, *STK36*, *WNT2B* oraz (-8x, -8x, -7x, -6x, -5x, -5x; $p < 0,001$) oraz *BTRC* i *NUMB* (-5x, -5x; $p < 0,005$). W podgrupie *carcinoma embryonale* zaobserwowano różnicę w ekspresji aż siedmiu genów Hh: *DISP2*, *PTCH2*, *HHIP*, *PTCHD2*, *SMO*, *BOC* (-43x, -16x, -12x, -8x, -7x, -7x; $p < 0,001$) oraz *SUFU* (-4x; $p < 0,05$).

Podsumowanie

Istotnie statystycznie różnice stopnia ekspresji występujące w minimum połowie podtypów histologicznych badanych guzów zaobserwowano w odniesieniu do 17/84 (20%) genów (tab. 42). Wzrost ekspresji stwierdzono dla dwóch genów: *FGFR3* kodującego receptor dla FGF oraz *RUNX2*, kluczowego regulatora wzrostu i proliferacji osteoblastów. Zwiększenie ekspresji obu genów zaobserwowano w dwóch podtypach histologicznych: *teratoma immaturum* (odpowiednio: 25x; $p < 0,005$ i 10x; $p < 0,05$) i guzy mieszane (odpowiednio: 33x, 5x; $p < 0,05$). Zwiększoną ekspresję *FGFR3* odnotowano dodatkowo w podtypie *dysgerminoma* (129x; $p < 0,005$), a genu *RUNX2* w podtypie *carcinoma embryonale* (5x; $p < 0,05$). Obniżenie ekspresji zaobserwowano dla piętnastu genów: *BCL2*, *BMP5*, *BOC*, *CSNK1E*, *DISP2*, *ERBB4*, *FGF9*, *HHIP*, *MOB1B*, *MTSS1*, *PRKACB*, *PTCH2*, *PTCHD2*, *ZIC1* oraz *ZIC2* w tym dla sześciu z nich we wszystkich badanych podtypach

histologicznych: *DISP2* (*teratoma maturum*: -42x; *teratoma immaturum*: -16x; guzy mieszane: -29x; YST: -57x, *dysgerminoma*: -22x; *carcinoma embryonale*: -43x; p<0,001), *FGF9* (*teratoma maturum*: -8x; *teratoma immaturum*: -4x; guzy mieszane: -40x; YST: -31x, *dysgerminoma*: -12x; *carcinoma embryonale*: -28x; p<0,001), *MTSS1* (*teratoma maturum*: -6x, p<0,05 oraz *teratoma immaturum*: -6x; guzy mieszane: -11x; YST: -9x, *dysgerminoma*: -5x; *carcinoma embryonale*: -14x; p<0,001), *PTCH2* (*teratoma maturum*: -7x; *teratoma immaturum*: -5x; guzy mieszane: -8x; YST: -9x, *dysgerminoma*: -14x; *carcinoma embryonale*: -16x; p<0,001), *ZIC1* (*teratoma maturum*: -35x; *teratoma immaturum*: -11x; guzy mieszane: -181x; YST: -90x, *dysgerminoma*: -31x; *carcinoma embryonale*: -144x; p<0,001), oraz *ZIC2* (*teratoma maturum*: -51x; *teratoma immaturum*: -19x; guzy mieszane: -178x; YST: -19x, *dysgerminoma*: -243x; *carcinoma embryonale*: -149x; p<0,001).

Tabela 42. Podsumowanie ekspresji badanych genów z uwzględnieniem wyłącznie genów o zmienionej ekspresji w ≥ 3 podtypach histologicznych.

Legenda: Kolor szary – brak zmiany ekspresji $\geq 4x$

*Pozycja genu na płycie badanej oraz rycinach Heat Map (ryc.6)

Podtyp histologiczny		Teratoma maturum	Teratoma immaturum	Guzy mieszane	Yolk sac tumor	Dysgerminoma	Carcinoma embryonale
Pozycja	Gen	Poziom krotności zmiany ekspresji (zaokrąglony do jedności)					
A01	<i>BCL2</i>			-6	-6	-6	-7
A04	<i>BMP5</i>			-12	-9	-37	-8
A08	<i>BOC</i>			-6	-7	-12	-7
A12	<i>CSNK1E</i>	-11	-6	-12	-8		-28
B04	<i>DISP2</i>	-42	-16	-29	-57	-22	-43
B05	<i>ERBB4</i>	-7	-7			-99	-24
B08	<i>FGF9</i>	-8	-4	-40	-31	-12	-28
B09	<i>FGFR3</i>		25	33		129	
C08	<i>HHIP</i>	-8		-9	-8	-18	-12
D04	<i>MOB1B</i>	-5		-7			-9
D05	<i>MTSS1</i>	-6	-6	-11	-9	-5	-14
D11	<i>PRKACB</i>	-7		-19	-16	-10	-17
E01	<i>PTCH2</i>	-7	-7	-8	-6	-4	-16
E03	<i>PTCHD2</i>		-5	-8	-10	-14	-8
E06	<i>RUNX2</i>		10	5			5
G11	<i>ZIC1</i>	-35	-11	-181	-90	-31	-144
G12	<i>ZIC2</i>	-51	-19	-178	-19	-243	-149

6.3.4 Porównanie profili ekspresji genów w zależności od poszczególnych parametrów klinicznych

Przeprowadzono również analizę profili ekspresji genów względem poszczególnych parametrów klinicznych takich jak: płeć, wiek, lokalizacja guza, występowanie przed i po okresie pokwitania (tab. 43). Porównano również poszczególne podtypy histologiczne pomiędzy sobą; z uwagi na ograniczoną liczebność zastosowano podział dichotomiczny wyodrębniając do analiz guzy typu *teratoma*.

Tabela 43. Liczebność przypadków w poszczególnych podgrupach GCTs, w których analizowano profil ekspresji genów szlaku Hh wyodrębnionych na podstawie poszczególnych parametrów klinicznych.

Płeć	
dziewczynki, n=12	chłopcy, n=12
Wiek	
<10r.ż., n=9	>10r.ż., n=15
Lokalizacja	
guzy gonadalne, n=19	guzy pozagonadalne, n=5
guzy zlokalizowane w jądrze, n=11	guzy o odmiennej lokalizacji, n=13
Wiek zachorowania	
przed okresem pokwitania, n=9	po okresie pokwitania, n=16
Podtypy histologiczne	
<i>teratomata</i> , n=8	pozostałe guzy, n=16

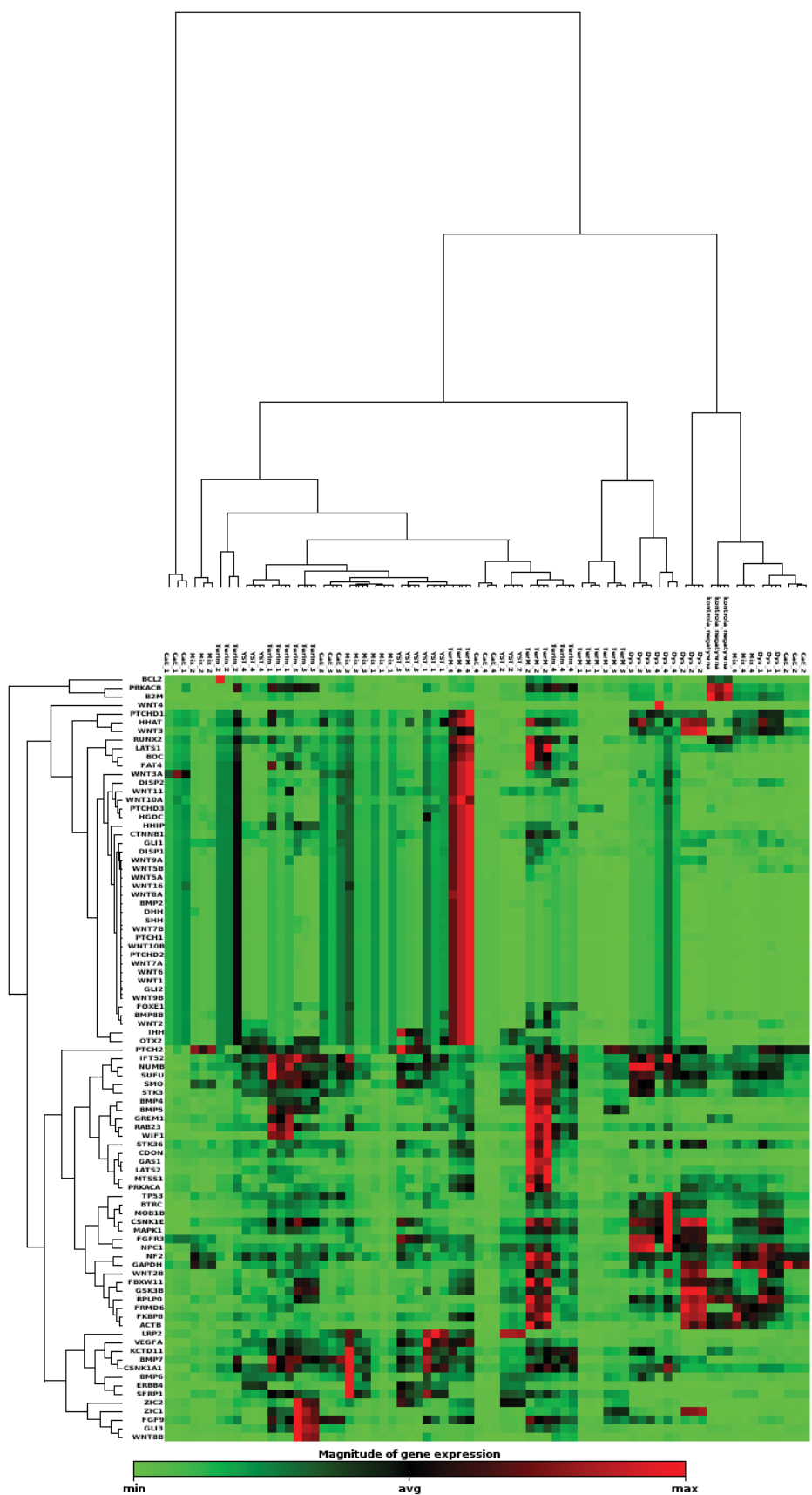
Nie wykazano istotnych różnic w ekspresji badanych genów pomiędzy dziewczynkami a chłopcami oraz pomiędzy guzami zlokalizowanymi w jądrze i innymi pozagonadalnymi lokalizacjami. W grupie guzów pochodzących od pacjentów mających ukończone co najmniej 10 r.ż. w momencie rozpoznania choroby w porównaniu do dzieci młodszych wykazano jedynie zmniejszoną ekspresję 10 genów: *WIF1*, *BMP5*, *SFRP1*, *VEGFA*, *FGF9*, *BMP7*, *GLI3* (-15x, -11x, -5x, -5x, -5x, -4x, -4x; $p < 0,001$) oraz *ZIC2*, *ZIC1*, *WNT8B* (-6x, -5x, -4x; $p < 0,01$). W guzach zlokalizowanych w gonadach w porównaniu do guzów z lokalizacji pozagonadalnych zaobserwowano zmniejszoną ekspresję pięciu genów: *WIF1*, *BMP5*, *GREM1*, *FGF9* i *BCL2* (-21x, -6x, -5.5x, -4x, -4; $p < 0,001$). Nie zanotowano wzrostu ekspresji żadnego z genów. W grupie guzów wywodzących się z neoplazji komórek zarodkowych in situ (GCNiS) zaobserwowano względem guzów typu *teratoma* i *yolk sac* okresu przedpokwitaniowego zmniejszoną ekspresję siedmiu genów: *WIF1*, *BMP5*, *ZIC2*, *SFRP1*, *BMP4*, (-16x, -10x, -8x, -6x, -5x; $p < 0,001$) oraz *ZIC1* i *VEGFA* (-5x, -5x; $p < 0,01$).

Porównano również kolejno poszczególne podtypy histologiczne względem pozostałej grupy guzów (n=20) oraz dodatkowo dychotomicznie wybierając podgrupę potworniaków dojrzałych jak i niedojrzałych (n=8). Badana grupa guzów typu *teratomata* wykazała jedynie zwiększoną ekspresję 6 genów w odniesieniu do pozostałych podtypów histologicznych: *WIF1*, *BMP5*, *GLI3*, *ZIC1*, *FGF9* i *WNT8B* (-19x, -11x, -5x, -5x, -4x, p<0,001; -4x, p<0,005).

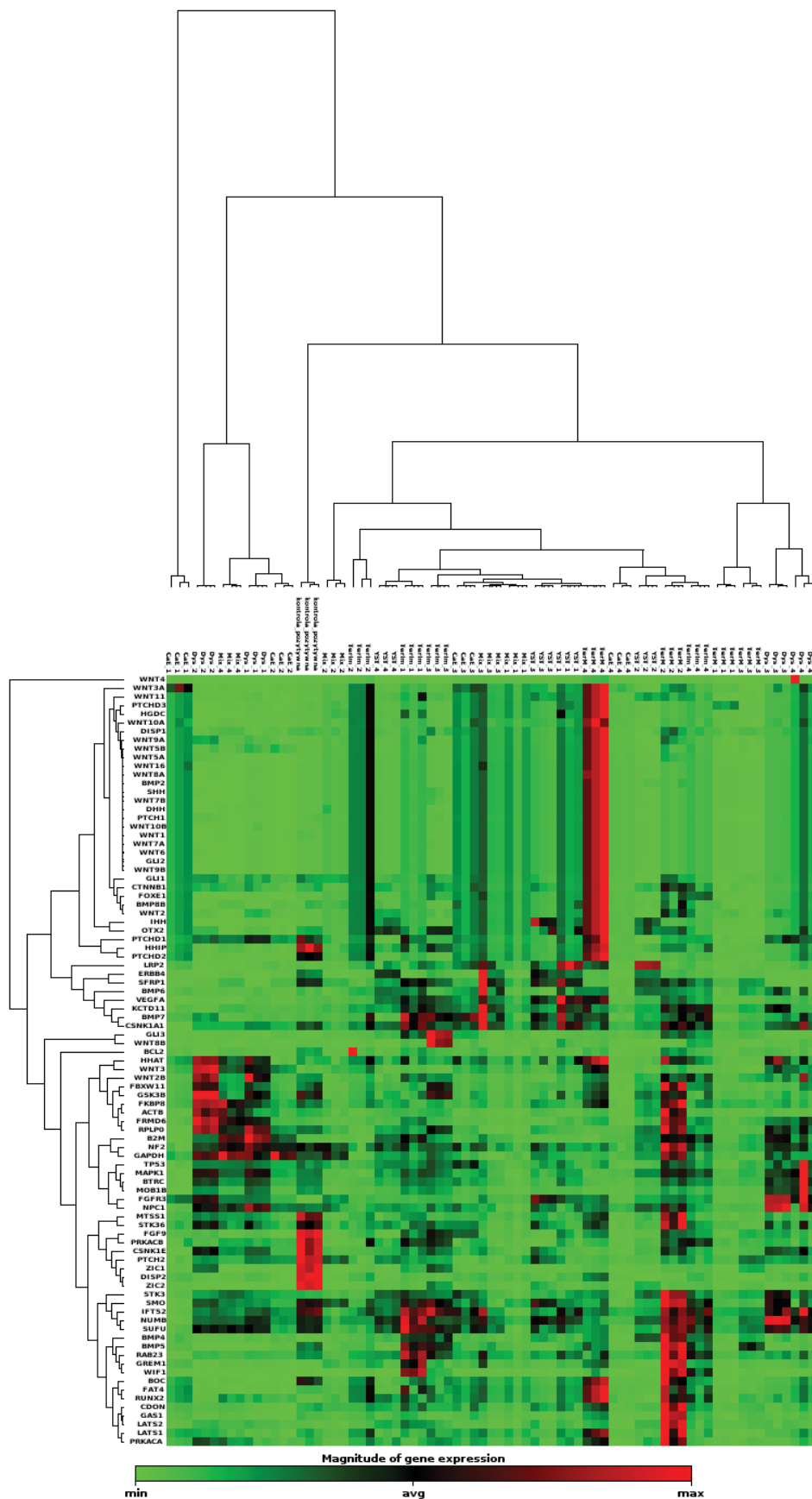
6.3.5. Analiza clustergramów

Przeprowadzono hierarchiczną i nienadzorowaną analizę porównawczą profili ekspresji celem oceny, czy poszczególne podtypy histologiczne mają wyróżniające się wzorce ekspresji. Analizę wykonano zarówno w odniesieniu do kontroli pozytywnej jak i negatywnej eksperymentu (ryc. 10 i ryc. 11). Clustergramy umożliwiają rozróżnienie i pogrupowanie poszczególnych typów histopatologicznych GCTs, jednakże nie wszystkie przypadki danego typu wykazują spójny profil ekspresji badanych genów. Ponieważ wyniki przedstawione na rycinach 10 i 11 zostały pobrane z pliku wyjściowego oprogramowania Gene Globe do analizy wyników qPCR (Qiagen) mają one niską jakość wizualną. Nie przeprowadzono obróbki graficznej uzyskanych wyników.

Rycina 10. Clustergram przedstawiający zmiany ekspresji 84 genów dla wszystkich przypadków badanych (w trzech powtórzeniach) względem kontroli negatywnej



Rycina 11. Clustergram przedstawiający zmiany ekspresji 84 genów dla wszystkich przypadków badanych (w trzech powtórzeniach) względem kontroli pozytywnej



6.4. Porównanie somatycznych zmian molekularnych i stopnia ekspresji genów szlaku Hh w grupie 14 przypadków

Dla 14 z 24 przypadków, które poddano ocenie ekspresji genów szlaku Hedgehog przeprowadzono również za pomocą metody NGS identyfikację potencjalnych zmian molekularnych w oparciu o zaprojektowany panel genów (tab. 44) (por. Materiały i metody, sekcja 5.2.7., tab. 13, str. 43). Nie zaobserwowano zmian molekularnych w genach kodujących kluczowe elementy szlaku Hedgehog mogących być przyczyną zmienionej ekspresji elementów szlaku. Nie stwierdzono również korelacji pomiędzy występowaniem mutacji somatycznych w guzie a zmianą ekspresji danego genu. W 5/14 badanych przypadków nie zidentyfikowano żadnych wariantów patogennych.

Tabela 44. Porównanie wyników analizy ekspresji genów szlaku Hedgehog (krotność zmiany $\geq 4x$) i zmian molekularnych zidentyfikowanych metodą NGS w 14 przypadkach.

Legenda: *czcionka pogrubiona* – *krotność zmiany ≥ 10*

Rozpoznanie histologiczne	#	Wiek	Płeć	Lokalizacja	Wynik NGS	Wyniki qPCR			
						względem kontroli negatywnej		względem kontroli pozytywnej	
						geny ulegające nadekspresji	geny o obniżonej ekspresji	geny ulegające nadekspresji	geny o obniżonej ekspresji
dysgerminoma	S03	16 lat	k	jajnik	KIT c.1965T>G				
	S04	16 lat	k	jajnik	FGFR3 c.1150T>C	FGFR3, WNT3, PTCHD1, BMP7, FGF9, WNT2B, DISP2, FRMD6, WNT9A, PTCH2, SMO, WNT2, CSNK1E, BTRC, GLI1, MOB1B	GREM1, BCL2, PRKACB, RUNX2	FGFR3, WNT3, FRMD6, WNT9A, WNT2	ZIC2, ERBB4, SFRP1, BMP5, ZIC1, DISP2, HHIP, PTCHD2, BOC, FGF9, PRKACB, BCL2, MTSS1, PTCH2
	S09	12 lat	k	miednica mniejsza	KIT c.2446G>C GLI3 c.341G>A GLI3 c.3083_3084delinsTT				
guz pęcherzyka żółtkowego	S05	1 rok 3 m-ce	m	jądro	ERBB4 c.473C>A SUFU c.37A>C	ERBB4, LRP2, IHH, SFRP1, OTX2, ZIC1, SMO, HHIP, RAB23	PRKACB, BCL2, GREM1, RUNX2, FBXW11	LRP2, IHH, BMP4, WNT11	ZIC1, DISP2, FGF9, ZIC2, PRKACB, PTCHD1, PTCHD2, BMP5, MTSS1, CSNK1E, HHIP, BOC, PTCH2, BCL2
	S06	11 m-cy	m	jądro	MTOR c.*416G>A MTOR c.4941T>G				
	S11	17 lat	k	jajnik	-				
	S21	12 lat	k	jajnik	FGFR3 c.358C>A				
rak zarodkowy	S01	17 lat	m	jądro	-	ERBB4, PTCHD1, WNT3, WNT5B	PRKACB, BCL2, FBXW11, GREM1, GSK3B, FKBP8, RUNX2, MTSS1	RUNX2, WNT5B	ZIC2, ZIC1, DISP2, FGF9, CSNK1E, ERBB4, PRKACB, PTCH2, MTSS1, SFRP1, HHIP, MOB1B, BMP5, GSK3B, PTCHD2, BOC, SMO, BCL2, FBXW11, STK36, BTRC, WNT2B, NUMB, SUFU
	S16	16 lat	m	jądro	-				
potworniak niedojrzały	S20	2 m-ce	m	jądro	-	BMP7, BMP5, ERBB4, FGF9, FGFR3, LRP2, PTCHD1, OTX2, HHIP, DISP2, SFRP1, RAB23, FOXE1, SMO, BOC, GAS1, BMP4	-	FGFR3, BMP4, RUNX2, FOXE1, BMP7, VEGFA, KCTD11	ZIC2, DISP2, ZIC1, PTCH2, ERBB4, MTSS1, CSNK1E, PTCHD2, FGF9
guz mieszany	S18	16 lat	m	jądro	KIT c.1427G>T KRAS c.35G>T LRP2 c.10937G>A	FGFR3, PTCHD1, GLI1	PRKACB, BCL2, FBXW11, GREM1, GSK3B	FGFR3, RUNX2	ZIC1, ZIC2, FGF9, DISP2, PRKACB, BMP5, CSNK1E, MTSS1, HHIP, PTCH2, PTCHD2, GSK3B, MOB1B, BOC, STK36, BCL2, FBXW11, IFT52
	S22	17 lat	k	jajnik	LRP2 c.11395C>T				
	S24	15 lat	m	jądro	-				
	S30	17 lat	m	jądro	LRP2 c.10937G>A				

7. DYSKUSJA

Coraz więcej dowodów wskazuje na to, że procesy embriogenezy i kancerogenezy mają wiele cech wspólnych. Podkreśla się rolę analogicznych szlaków sygnałowych w obu tych procesach [Aiello i Stanger, 2016; Manzo, 2019]. Jednym z nich jest szlak Hedgehog, fizjologicznie odpowiedzialny za regulację procesów różnicowania i dojrzewania wielu tkanek i organów. Jednocześnie, jego nieprawidłowa aktywacja została opisana w procesach nowotworzenia, progresji oraz oporności na leczenie wielu podtypów guzów złośliwych [Sari i wsp., 2018; Skoda i wsp., 2018; Katoh, 2019]. Sieć sygnalizacyjna Hh stanowi od kilku lat obszar intensywnych badań w onkologii i biologii różnych nowotworów sporadycznych. Sposób, w jaki nieprawidłowo aktywny szlak Hh przyczynia się do powstawania, wzrostu czy progresji nowotworów nie jest wciąż jednak do końca poznany. Aktywacja sygnalizacji Hedgehog została najszerszej opisana w guzach typu *medulloblastoma*, które są najczęściej występującymi złośliwymi embrionalnymi guzami mózgu u dzieci. Nieprawidłowa aktywacja ścieżki Hh dotyczy ok. 30% wszystkich sporadycznych przypadków MBs (tzw. podtyp SHH-aktywny). Najczęściej opisywane zmiany molekularne dotyczą genów *PTCH1* i *SUFU*. Stwierdza się również amplifikację *MYCN* i *GLI2* [Wang i wsp., 2018]. Istnieją również pojedyncze doniesienia o aktywacji i ekspresji genów sygnalizacji Hh w raku jajnika czy nowotworach jądra jak również w nerwiaku zarodkowym (*neuroblastoma*), raku podstawnokomórkowym, raku trzustki, piersi, jelita grubego, jajnika, wątroby i płuca [Chen i wsp., 2013; 2017; Sari i wsp. 2018; Katoh i Katoh, 2019].

Jednym z procesów fizjologicznych regulowanych czasowo i przestrzennie poprzez odpowiednią aktywację poszczególnych elementów szlaku Hh jest rozwój i dojrzewanie układu płciowego. Aktywacja szlaku Hh odgrywa fundamentalną rolę w prawidłowej migracji pierwotnych komórek płciowych i różnicowaniu płciowym w trakcie embriogenezy a następnie w utrzymaniu homeostazy komórkowej. Zaburzenia tego procesu mogą prowadzić nie tylko do zaburzeń różnicowania płci, ale również skutkować niekontrolowanym rozrostem pierwotnych komórek płciowych stając się zaczynem procesu nowotworzenia w kierunku GCTs. Dotychczas nie przeprowadzono badań dotyczących zaangażowania szlaku Hh i/lub dysregulacji jego poszczególnych elementów w nowotworach germinalnych. Ocena zmian aktywności szlaku Hh jest ważna dla lepszego poznania biologii tych guzów, zwłaszcza nakładających się w ich obrębie procesów embriogenezy i karcynogenezy oraz zaburzonego różnicowania i dojrzewania. W przyszłości umożliwi to być może opracowanie nowych schematów leczniczych, w tym terapii spersonalizowanej. Dla guzów germinalnych, zwłaszcza w grupie pediatrycznej, istnieje potrzeba opracowania nowych,

celowanych strategii leczenia, które nie tylko poprawią wyleczalność, ale i pozwolą równocześnie zmniejszyć ryzyko występowania skutków ubocznych terapii. Ważnym jest również ewentualna możliwość wykorzystanie inhibitorów szlaku Hh u pacjentów z guzami opornymi na standardowe leczenie, dla których obecnie nie ma alternatywnych opcji leczniczych.

Niniejsza praca doktorska prezentuje wyniki pilotażowych badań oceniających aktywność oraz zmiany molekularne w poszczególnych elementach szlaku Hh w guzach germinalnych. Przedstawione wyniki stanowią integralną część projektu naukowego finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki w Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (nr 04-0155/09/324 p.t. „*Znaczenie szlaku sygnalizacyjnego SHH w patogenezie i progresji guzów germinalnych wieku rozwojowego*” pod kierownictwem prof. dr hab. Ewy Łzyckiej-Świeszewskiej), którego celem jest zbadanie stanu aktywacji szlaku Hh w GCTs wieku rozwojowego z uwzględnieniem zmian molekularnych i ekspresji genów oraz wyłonienie nowych czynników prognostycznych i predykcyjnych w oparciu o analizę związków molekularno- pato-klinicznych. Robocza hipoteza projektu zakłada, że nieprawidłowo aktywny szlak HH odgrywa auto- i parakrynną rolę w patogenezie i przebiegu GCTs u dzieci i młodzieży, a przypuszczalnym mechanizmem tej aktywacji mogą być zmiany molekularne w kluczowych genach szlaku. Postuluje się także, że istnieje podtyp molekularny guzów germinalnych zależny od patologicznej sygnalizacji Hedgehog. Oprócz przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej wyników analiz molekularnych w projekcie zbierane są szczegółowe dane kliniczne dotyczące chorych z GCTs (wiek, płeć, lokalizacja guza, stadium choroby, markery w surowicy, stosowane leczenie, odpowiedź na leczenie, okres wolny od wznowy, długość przeżycia), które w późniejszych etapach zostaną wykorzystane do wykonania analiz pato-klinicznych. Równolegle wykonywana jest również analiza immuno-histochemiczna w oparciu o przeciwciała monoklonalne. Łącznie, badania te będą pierwszym kompleksowym opracowaniem dotyczącym szlaku *Sonic Hedgehog* w GCTs wieku rozwojowego.

Rozmaitość zastosowanych metod oraz niejednorodność analizowanych przypadków obejmujących zarówno preparaty mrożone jak i zatopione w parafinie miało na celu jak najszerszą ocenę różnych aspektów i poziomów działania szlaku Hh w GCTs. Istotnym ograniczeniem pracy był dostęp do odpowiednio liczebnych grup przypadków GCTs reprezentatywnych dla poszczególnych podgrup wiekowych, histopatologicznych jak i o odmiennych lokalizacjach. W trakcie realizacji projektu NCN zgromadzono próbki GCTs poddane różnym procesom archiwizacji, o niejednorodnej jakości zastosowanych odczynników oraz czasie archiwizacji. Przeprowadzone w niniejszej pracy analizy mają charakter badań pilotażowych, które przede wszystkim miały na celu wysondowanie możliwości technicznych wykonania poszczególnych testów w tak heterogenicznej grupie.

W trakcie prac laboratoryjnych przetestowano wiele poprawek do metodyki badań mających na celu przezwycięzenie trudności związanych z jakością badanego materiału. Opracowano odpowiednie korekty do protokołów i procedur eksperymentalnych. Równocześnie, uzyskane wyniki pozwoliły na wytypowanie genów, których mutacje i/lub stopień ekspresji może potencjalnie mieć znaczenie w GCTs. Umożliwi to kontynuację badań w formie zawężonych, celowanych analiz obejmujących większą liczbę przypadków konkretnych podtypów guzów germinalnych, które są przewidziane w kolejnych etapach realizowanego projektu naukowego.

7.1. Dobór grup badanych

Dzięki wielośrodkowej współpracy koordynowanej przez prof. dr hab. Ewę Łżycką-Świeszewską i prof. dr hab. Elżbietę Adamkiewicz-Drożyńską (koordynator Grupy roboczej Guzów Germinalnych przy Polskiej Grupie Guzów Litych PTOiHD) obejmującej ośrodki onkologii dziecięcej z Gdańska, Warszawy (IPCZD, IMiD), Kielc, Lublina, Wrocławia, Katowic i Poznania zebrano reprezentatywną grupę pediatrycznych guzów germinalnych. Łącznie w okresie 2013-2018 zebrano 18 mrożonych guzów germinalnych oraz 137 tkanek GCTs utrwalonych w formalinie i zatopionych w bloczkach parafinowych od pacjentów pediatrycznych.

Rutynowo wykonywaną preparatyką do oceny histopatologicznej nowotworów jest utrwalanie wycinków tkankowych w formalinie i zatapianie w bloczkach parafinowych. O ile metoda ta bardzo dobrze zachowuje morfologię tkanek oraz budowę epitopów wykorzystywanych w badaniach immunohistochemicznych i immunofluorescencyjnych znacząco wpływa jednak na stopień degradacji cząsteczek DNA i RNA. Duże pofragmentowanie kwasów nukleinowych ma znacząco negatywny wpływ na jakość eksperymentów w oparciu o techniki biologii molekularnej, dlatego też istotny jest odpowiedni wybór preparatów m.in. okres archiwizacji, jakość i rodzaj odczynników użytych do stworzenia preparatu FFPE, a także sama procedura. Kolejnymi kryteriami wyboru konkretnego preparatu do analiz przeprowadzonych w niniejszej rozprawie były jego typ histologiczny, komórkowość oraz charakterystyka kliniczna. W ocenie somatycznych zmian patogennych przy użyciu techniki NGS oraz określeniu profili ekspresji genów badania przeprowadzono na reprezentatywnych wycinkach tkankowych FFPE należących do sześciu różnych podtypów histologicznych GCTs. Dobrano również odpowiednie kontrole: trzy guzy o potwierdzonym badaniem histopatologicznym aktywnym statusie ekspresji szlaku Hh (dwa guzy *medulloblastoma* oraz jeden guz BCC) jak również fragment normotypowego węzła chłonnoego jako kontrolę negatywną. Zespół patomorfologów i klinicystów realizujących projekt, dokonał wyboru poszczególnych przypadków badawczych w oparciu o reprezentatywność i ilość materiału tkankowego GCTs oraz kontrolnych tkanek.

Materiał mrożony pochodził jedynie z guzów OUN, z zasobów ICZD w Warszawie i ICMP w Łodzi. Materiał mrożony z GCTs jest bardzo trudny do uzyskania ze względu na heterogenność grupy i różnorodną prezentację kliniczną, rzadkość występowania oraz często niespodziewane, zwłaszcza w guzach pozagonadalnych, przez klinicystów rozpoznanie. Dopiero archiwizowane fragmenty materiału mrożonego o ograniczonej ilości i komórkowości mogą być przeznaczone do badań molekularnych.

W dotychczas opublikowanej literaturze dominują opisy GCTs w gonadach u osób dorosłych ze szczególnym uwzględnieniem guzów jąder u mężczyzn, gdyż są one najczęściej występującym typem tego nowotworu. Znacznie słabiej natomiast poznana jest patogeneza i biologia GCTs u dzieci (0-18 lat), ponieważ guzy te stanowią wyjątkowo zróżnicowaną grupę nowotworów ze znaczną heterogenicznością wieku występowania, miejsca rozwoju guza, przebiegu klinicznego i budowy histologicznej. Konieczna jest jednak analiza homogennych grup histologicznych, gdyż GCTs stanowią niezwykle grupę guzów różnych kierunkach i potencjale różnicowania co przekłada się także na różnorodność molekularną poszczególnych podtypów w różnym wieku. Dodatkowym utrudnieniem jest fakt odmienności GCTs w różnych grupach wiekowych i lokalizacjach oraz częsta komponenta mieszana guzów. W niniejszej pracy przeprowadzono pilotażowe analizy dla wyselekcjonowanych przypadków reprezentatywnych dla poszczególnych podtypów GCTs. Badania są kontynuowane w ramach projektu naukowego NCN, a stwierdzone zależności weryfikowane innymi metodami, w tym technikami immunohistochemicznymi w oparciu o mikromacierze tkankowe.

7.2. Analiza profili genomowych wewnątrzczaszkowych guzów germinalnych (iGCTs)

Analiza niezrównoważenia genomowego została przeprowadzona na nieselekcjonowanych (ang. *consecutive*) guzach OUN o zróżnicowanych rozpoznaniach histologicznych, z czego połowę stanowiły guzy typu germinoma (n=8/16; tab. 4). Uzyskane w ramach niniejszego projektu wyniki badań techniką mikromacierzy CGH zostały zaprezentowane w formie doniesień zjazdowych oraz publikacji [Kuleszo i wsp., 2016 (1); Kuleszo i wsp., 2017 (2),(3)]. Germinoma jest najczęstszym typem histologicznym stanowiącym około połowy wszystkich iGCTs. Podobne odsetki rozpoznań *germinoma* opisano w dwóch dotychczas najszerzej zakrojonych wielośrodkowych badaniach profili genomowych GCTs: 63% (39/62) u Terashima i wsp. (2014) oraz 47% (29/62) u Wang i wsp. (2014). W badaniach GCTs OUN wykonanych klasyczną metodą CGH odsetki te wynosiły: 53% (8/15) [Rickert i wsp., 2000]; 26% (5/19) [Schneider i wsp., 2006] oraz 47% (7/15) u Wang Hsei-Wei i wsp. (2010). Również w pracy obejmującej pediatryczne guzy germinalne

(do 16 r.ż.) badanych klasyczną metodą CGH odsetek guzów typu *germinomatous* wynosił 32% (11/34) [Palmer i wsp., 2007].

W analizowanej serii pediatrycznych iGCTs nieprawidłowy profil genomowy opisano w 62% przypadków (8/13), co w porównaniu do dotychczas przeprowadzonych badań jest stosunkowo niskim odsetkiem zidentyfikowanych zmian. Wcześniejsze prace raportowały nieznaczne odsetki zmian w ok. 90% przypadków (90% u Schneider i wsp., 2006; 92,5% u Schulte i wsp., 2016; 87% u Rickert i wsp., 2000). Obserwowane różnice mogą być wypadkową następujących czynników: 1) doboru grupy badanej - w niniejszej pracy badano wyłącznie populację pediatryczną (<18 r.ż.) - podczas gdy odsetek osób w wieku 0-18 w innych badaniach stanowił ok. 60-75% [Schneider i wsp., 2006; Schulte i wsp., 2016; Terashima i wsp., 2014, Rickert i wsp., 2000; Wang L. i wsp., 2014]; 2) mozaicyzmu wynikającego z różnic w odsetku komórek nowotworowych w badanych przypadkach; 3) użytej metodologii i doboru kryteriów, w tym progów detekcji, do oceny uzyskanych wyników.

Prawidłowy profil genomowy niektórych analizowanych przypadków może być również wynikiem obecności nacieków limfocytarnych zrębu oraz raportowaniem jedynie zmian o wielkości >300kb i >30% VAF (ang. *variant allele frequency*).

W niniejszym badaniu zaobserwowano szereg pojedynczych nieznacznych aberracji genomowych GCTs jednak tylko kilka powtarzających się. W $\geq 20\%$ przypadkach zaobserwowano cztery aberracje liczbowe: trisomię 21 (31%), trisomię 19 (23%) oraz monosomię 13 (23%) i monosomię 18 (23%) jak również jedną aberrację strukturalną obejmującą fragment ramion krótkich chromosomu 12: duplikację/amplifikację 12p13.33p11.1 (23%). We wcześniejszych pracach przedstawiających profile genomowe iGCTs opisano obecność dodatkowych kopii chromosomów 12p, 1q, 8, 21 oraz chromosomu X jak i utratę 11q, 18q oraz chromosomu 13 [Schneider i wsp., 2006]. Badania Wanga i wsp. (rok) uzupełniły profil genomowy iGCTs o występowanie duplikacji 14q oraz utraty fragmentów chromosomów 10q i 17p, natomiast kompleksowa analiza z użyciem mikromacierzy SNP przeprowadzona przez Terashimę i wsp. (2014) znacznie poszerzyła katalog stwierdzanych zmian zarówno liczbowych jak i strukturalnych. W prezentowanych wynikach połowa z powtarzających się wykrytych aberracji pokrywa się z opisanymi już w literaturze regionami. Są to: duplikacja 12p, duplikacja 21 oraz delecja 9q i delecja 13 [Terashima i wsp., 2014; Wang i wsp., 2014; Schneider i wsp., 2006].

Duplikację/amplifikację ramion krótkich chromosomu 12p uważa się za cechę charakterystyczną GCTs, która określana jest jako swoisty marker, głównie jednak w nowotworach zarodkowych zlokalizowanych w gonadach zdiagnozowanych u pacjentów dorosłych. W niektórych przypadkach region ulegający duplikacji/amplifikacji może być ograniczony do 12p11.2–12.1 lub 12p13 [Oosterhuis i Looijenga, 2017]. Dodatkowy fragment

chromosomu 12p, jeżeli występuje w GCTs pediatrycznych - występuje incydentalnie. Obecność dodatkowych kopii fragmentu chromosomu 12p odnotowano również w iGCTs, lecz w mniejszym odsetku guzów (20-59%) i na ogół pod postacią duplikacji/amplifikacji całych krótkich ramion chromosomu 12 [Phi i wsp., 2018] lub w połączeniu z różnymi złożonymi nieprawidłowościami strukturalnymi [Terashima i wsp., 2014]. Podobnie, w niniejszej analizie częstość zwielokrotnienia ramienia 12p wyniosła 23%. Wartość ta jest znacznie niższa niż opisywane w innych lokalizacjach wskazując na odmienność biologii i przebiegu procesu nowotworzenia pediatrycznych iGCTs wobec guzów o lokalizacji pozagonadalnej czy, najlepiej opisanych, TGCTs u osób dorosłych. Jedynie Schulte i wsp. (2016) zaobserwowali wysoką częstość występowania dodatkowych kopii 12p (83%) lecz może to być spowodowane specyficznym doбором grupy badanej (wyłącznie guzy typu germinoma) i/lub wysoką czułością użytej metody MIP, która wykrywa nawet niewielkiego stopnia mozaicyzm.

W serii badanych guzów mrożonych przeprowadzona została również szczegółowa ocena *loci* genów kodujących zarówno ligandy, regulatory, receptory i kofaktory ścieżki sygnałowej Hedgehog, jak i geny docelowego jej działania oraz geny istotne dla ścieżek współdziałających m.in. WNT, TGF β /BMP czy HIPPO. Analiza ujawniła zmiany liczby kopii wśród genów kodujących elementy sieci Hedgehog: *PTCH1* (4/13 w tym delecja w 3, duplikacja w 1), *ZIC2* (delecja: 3/13; duplikacja: 1/14), *GLI2* (duplikacja: 2/13), *HHIP* (delecja: 2/13), *IHH* (duplikacja: 2/13) oraz liczne zmiany liczby kopii genów szlaku WNT. Dodatkowo zaobserwowano pojedyncze zmiany liczby kopii genów: *GLI1*, *GLI3*, *DHH*, *SHH*, *SMO* i *PTCH2*. Nasze wyniki po raz pierwszy podkreślają obecność zmian genomowych związanych z genami szlaku sygnałowego Hh w pediatrycznych GCTs ośrodkowego układu nerwowego. Analiza niezrównoważenia genomu w prezentowanej serii nowotworów wskazuje na kilka genów szlaku Hh jako przypuszczalnych kandydatów zaangażowanych w patogenezę wewnątrzczaszkowych GCTs: w szczególności *PTCH1*, *ZIC2* i *GLI1-3* (por. 7.5). Ponieważ analizowana seria nowotworów jest ograniczona w liczebności i niejednorodna, stwierdzane zmiany mają często charakter jednostkowy. Ocena roli zaburzeń genomowych obejmujących *loci* związanych ze szlakiem Hh w patogenezie GCTs wymaga weryfikacji na większych grupach. Grupy te powinny uwzględniać nie tylko podtypy histologiczne GCTs ale i nie być ograniczone jedynie do lokalizacji wewnątrzczaszkowej. Niestety, ograniczeniem jest dostęp do odpowiedniej liczby preparatów mrożonych, gdyż dla innych lokalizacji rutynowym jest archiwizacja materiału w formie bloczków parafinowych, nieadekwatnym do analizy w oparciu o technikę mikromacierzy CGH.

7.3. Analiza zmian molekularnych w oparciu o sekwencjonowanie techniką NGS

Komercyjnie dostępne „nowotworowe” panele genowe wykorzystujące technikę NGS do oceny obecności wariantów sekwencyjnych zarówno związanych z ewentualną predyspozycją dziedziczną do rozwoju nowotworów jak i celem wykrycia klinicznie istotnych zmian somatycznych w tkance guza nie obejmują większości genów szlaku Hh. Świadczy to o wciąż ograniczonej wiedzy o roli sygnalizacji Hh w patogenezie nowotworów. Panele NGS przeznaczone do badania ogólnej predyspozycji genetycznej do rozwoju nowotworu, jak również panele ukierunkowane na diagnostykę nowotworów wieku dziecięcego, obejmują jedynie badanie genów *PTCH1* oraz *SUFU*. Spośród kluczowych (kanonicznych) genów szlaku Hh komercyjne panele nowotworowe przeznaczone do profilowania somatycznego nowotworów uwzględniają jedynie trzy geny: *SMO*, *SUFU* i *PTCH1*. Ponadto, spośród genów kodujących białka szlaków współdziałających z sygnalizacją Hh panele te zawierają najczęściej: *ERBB4*, *FGFR3*, *HRAS*, *KIT*, *KRAS*, *PTEN*, *MTOR* oraz *NRAS*. Geny te należą do onkogenów lub genów supresorowych zaangażowanych w patogenezę wielu chorób onkologicznych, o dość dobrze scharakteryzowanym mechanizmie działania i możliwości terapii personalizowanych. Rzadziej wykorzystywane w rutynowej praktyce klinicznej diagnostyczne badania całego eksomu/genomu (ang. *whole exome sequencing*, *WES*; *whole genome sequencing*, *WGS*) na etapie automatycznego filtrowania danych surowych z reguły zawężają analizę wyników do oceny obecności zmian w genach powiązanych z fenotypem pacjenta co może prowadzić do przeoczenia potencjalnie istotnych zmian w innych genach.

Z uwagi na powyższe, w celu oszacowania udziału zmian molekularnych w genach kodujących komponenty szlaku Hh w GCTs dla potrzeb niniejszego badania zaprojektowano własny autorski panel 25 genów (por. tab. 13). W ramach panelu analizą objęto całą sekwencję kodującą wraz z flankującymi sekwencjami intronowymi 12 genów kodujących kluczowe jak i pomocnicze elementy szlaku Hedgehog, tzn. geny kodujące ligandy (*SHH*, *IHH*, *DHH*), receptory/koreceptory (*PTCH1*, *PTCH2*, *SMO*, *LRP2*), regulatory (*SUFU*, *HHIP*) oraz czynniki transkrypcyjne (*GLI1*, *GLI2*, *GLI3*). Ponadto, do panelu włączono kolejnych 7 genów wytypowanych na podstawie wyników analiz ekspresji (por. Wyniki 6.3): *PTCHD1*, *DISP2*, *ZIC1*, *ZIC2* potencjalnie związanych z poprawnym funkcjonowaniem ścieżki jak również niepowiązanych bezpośrednio, ale współdziałających z Hh produktami genów *ERBB4* oraz *FGFR3*. Ponadto, na podstawie przeglądu danych literaturowych opisujących zmiany somatyczne w GCTs do panelu dołączono również sekwencje kodujące genów: *KIT*, *KRAS*, *NRAS*, *HRAS*, *CBL*, *MTOR*, *PTEN*.

Do sekwencjonowania techniką NGS użyto DNA wyizolowanego z tkanek zatopionych w parafinie utrwalonych w formalinie, które z uwagi na sposób procesowania

preparatów FFPE jest zawsze w pewnym stopniu pofragmentowane. Dlatego też, celem uniknięcia raportowania wyników fałszywie dodatnich będących wypadkową słabej jakości wykorzystanego do badania DNA, w analizie zastosowano restrykcyjne punkty odcięcia w raportowaniu znalezionych wariantów. Raportowano jedynie warianty o pokryciu $>100x$ dla danego regionu oraz o częstości występowania zmienionego allelu (VAF) $>5\%$. Jedynym odstępstwem od tej reguły była reanaliza regionów *hot-spot* w genie *KIT*, w celu oceny obecności znanych wariantów patogennych w obrębie fragmentów o pokryciu $<100x$ (przy ilości sczytań dla analizowanego allelu >10). Przy ocenie wariantów mozaikowych, jako minimalne ustalono spełnienie co najmniej jednego z następujących kryteriów: obecność co najmniej 10 sczytań dla analizowanego wariantu lub jego częstość $\geq 10\%$ VAF. Pomimo zastosowanych wygórowanych kryteriów, osiągnięte wyniki są nadal obarczone niewielkim stopniem niepewności, gdyż nie przeprowadzono weryfikacji obecności wykrytego wariantu sekwencyjnego drugą metodą (np. sekwencjonowaniem Sangerowskim) ani nie wykluczono jego germinalnego pochodzenia. W pierwszym wypadku dla większości zmian mozaikowych klasyczna metoda sekwencjonowania Sangera mogłaby okazać się metodą niewystarczająco czułą; w odniesieniu zaś do drugiego zastrzeżenia w ramach niniejszego badania nie dysponowano wystarczającą ilością prawidłowej tkanki (np. z obrzeża guza lub krwi obwodowej pacjenta) aby przeprowadzić takie porównanie.

Analiza 27 guzów GCTs wykazała obecność 26 zmian molekularnych, tym dziewięć mutacji patogennych, osiem wariantów sekwencyjnych o nieznanym znaczeniu klinicznym oraz dziewięć rzadkich wariantów polimorficznych. Zmiany molekularne obecne były w 19/27 (70%) badanych przypadków, przede wszystkim w podgrupach dysgerminoma (7/7) oraz w guzach mieszanych zawierających komponentę dysgerminoma (7/8). Najczęściej zmiany patogene stwierdzono w genie *KIT* (37%; por. niżej) zaś wśród genów związanych ze szlakiem Hh najwięcej wariantów sekwencyjnych opisano w obrębie genu *LRP2*.

Spośród wariantów sekwencyjnych stwierdzonych w genach szlaku Hh (por. tab. 13; tab. 36) do zmian zakwalifikowanych jako patogene zaliczono jedynie ultraradki wariant (opisany jako *singleton* z częstością $<1:100,000$ alleli w bazie GnomAD Exomes) w genie *DISP2* c.2212C>T (p.Gln738*). Zmiana ta prowadzi do powstania przedwczesnego kodonu STOP, co najprawdopodobniej skutkuje zniszczeniem powstałego transkryptu w mechanizmie NMD (ang. *nonsense mediated decay*). Aktualny stan wiedzy dot. roli białka DISP2 w procesach fizjologicznych jak i nowotworzenia nie pozwala na ocenę znaczenia klinicznego stwierdzanej mutacji [por. 7.5; Tukachinsky i wsp., 2012; Stewart i wsp., 2018].

Do drugiej kategorii zaliczono warianty o nieznanym znaczeniu klinicznym, w tym spośród genów szlaku Hh pojedyncze, prawdopodobnie germinalne, warianty w obrębie sekwencji *GLI2*, *GLI3* oraz *SMO*. Substytucja pojedynczego nukleotydu c.2011C>T (p.Arg671Trp) w genie *SMO* została opisana z $\sim 50\%$ VAF; w populacji kontrolnej wariant ten

występuje z częstością 0,008%. Nie został on dotychczas opisany w bazie ClinVar, a predyktory *in-silico* sprzeczne klasyfikują jego charakter. Kolejne dwie mutacje typu *missense* w genach kodujących czynniki transkrypcyjne *GLI2* oraz *GLI3* (obecną w dwóch przypadkach GCTs) były już uprzednio raportowane w bazie ClinVar jako zmiany łagodne/prawdopodobnie łagodne. Wartości VAF wskazują również na ich prawdopodobnie konstytucyjny charakter. Z uwagi na wyniki analiz *in-silico* nie można jednak wykluczyć ich modyfikującego wpływu na funkcję białka. Substytucja c.341G>A w genie *GLI3* skutkuje zamianą konserwowanej u kręgowców reszty argininy na lizynę we fragmencie N-końcowym białka o nieznannej strukturze i funkcji. Druga z mutacji, substytucja dwóch nukleotydów pod koniec sekwencji kodującej gen *GLI2*, może prowadzić do pojawienia się nowego miejsca splicingu (wg. algorytmu *NNsplice* prawdopodobieństwo wzrasta z 0.32 dla sekwencji prawidłowej do 0.90 dla sekwencji z mutacją).

Najwięcej zmian: n=8, w tym trzy dotychczas nieopisane w populacji kontrolnej, zaobserwowano w genie *LRP2*, będącego najdłuższym badanym genem (15657nt). Mają one charakter substytucji powodującej zmianę pojedynczej reszty aminokwasowej w białku (ang. *missense*). Analogicznie do wyżej wymienionych elementów szlaku Hh, również dla produktu genu *LRP2* nie określono jeszcze struktury cząsteczki białka. Dlatego też ocena wpływu stwierdzanych substytucji na funkcję białka jest jedynie hipotetyczna i opiera się o wyniki analiz *in-silico* zebranych w tabeli 37 i 38. Wszystkie z opisanych wariantów dotyczą substytucji reszt aminokwasowych w obrębie repetytywnych motywów typu receptora-LDL klasy A lub B. Żaden z nich, jednakże, nie przypada w obrębie motywów o zdefiniowanej funkcjonalności oddziaływania z czynnikami regulatorowymi. Uważa się, że ekspresja białek z rodziny LRP jest częstym zjawiskiem w guzach litych i może stanowić czynnik prognostyczny przeżycia pacjentów [Gonias i wsp., 2017].

Do trzeciej kategorii zaliczono warianty, które w świetle oceny ich częstości w populacji kontrolnej, obecnej klasyfikację w bazie ClinVar oraz COSMIC jak również wyniki analiz *in-silico* mają najprawdopodobniej łagodny charakter (por. tab. 38) W tej grupie znalazła się jeszcze jedna zmiana w genie *GLI3* o wartości VAF 52% wskazującej na jej konstytucyjne pochodzenie oraz wariant c.37A>C (p.Thr13Pro) w eksonie pierwszym genu *SUFU* kodującym negatywny regulator ścieżki Hh. Region, w którym znajduje się ten wariant jest fragmentem, którego sekwencja jest bogata w powtórzenia GC co sprawia trudności w analizie techniką NGS. Średnie pokrycie tego fragmentu w bazie ExAC wynosi <10x; dla porównania średnie pokrycie dla całej sekwencji kodującej genu *SUFU* wynosi 73.4x. Tak więc raportowane w tym regionie substytucje, zwłaszcza o niskim VAF, mogą w rzeczywistości być artefaktami powstałymi w trakcie reakcji PCR.

Znane warianty patogenne o znaczeniu klinicznym (geny: *KIT*, *KRAS*)

Szacuje się, że somatyczne zmiany molekularne w genie *KIT* dotyczą ~4% wszystkich nowotworów, a największa częstość tych zmian dotyczy nowotworów tkanki łącznej i miękkiej, niedrobnokomórkowego raka płuc, czerniaka, glejaka złośliwego i gruczolakoraka jelita grubego [The AACR Project GENIE Consortium, 2017]. Protoonkogen *KIT* (*alias* SCFR; C-Kit; CD117) koduje receptor dla cytokin KITLG/SCF i jest kluczowym elementem ścieżki sygnalizacyjnej KIT, która odgrywa rolę w regulacji produkcji erytrocytów, proliferacji limfocytów, rozwoju i funkcji komórek tucznych, tworzeniu melaniny i procesie gametogenezy. Badania wskazują, że również ~66% komórek zarodkowych i plemników wykazuje ekspresję receptora c-kit, stąd też, jego ekspresja została również wykazana w ok. 30%-50% guzów germinalnych m.in., nasieniaka, *dysgerminoma* jajników czy śródpiercia oraz wewnątrzczaszkowych GCTs [Coffey i wsp., 2008; Oosterhuis i Looijenga, 2017]. Najczęściej obserwowaną zmianą w genie *KIT* w nowotworach germinalnych, dot. jądra i struktur pozagonadalnych, są substytucje o charakterze mutacji aktywujących w eksonie 17, głównie w kodonie 816. Również zmiany w eksonach 13, 11 i 9 należą do dość często występujących [Kemmer i wsp., 2014; Hoi-Hansen i wsp., 2007; Cheng i wsp., 2011; van Nieuwenhuysen i wsp., 2018].

W niniejszej pracy zidentyfikowano 6 zmian patogennych w genie *KIT*. Warianty patogenne były obecne w 10/27 (37%) guzów GCTs. Większość (4/6) zidentyfikowanych w pracy mutacji zlokalizowana była w eksonie 17 (6/10; 60% *KIT*-dodatnich GCTs), w tym 3/4 w kodonie 816. Ponadto stwierdzono obecność nowego, dotychczas nieopisanego wariantu w genie *KIT* wprowadzającego przedwczesny kodon STOP w pozycji 942. Z uwagi na fakt, iż zmiana ta znajduje się tuż przed prawidłowym końcem translacji przypadającym w pozycji 977, jej wpływ na strukturę i funkcję białka może jednak nie być znaczący dlatego też wariant ten został zakwalifikowany do kategorii wariantów o niepewnym znaczeniu klinicznym.

Patogenne warianty w genie *KIT* zidentyfikowano we wszystkich badanych guzach typu *dysgerminoma*, nie badano guzów typu *seminoma*. Sześć z siedmiu badanych przypadków to dziewczynki powyżej 7 r.ż. Wszystkie poza jednym guzem zlokalizowanym w miednicy mniejszej były guzami gonadalnymi, w tym jeden występował w gonadzie dysgenetycznej (6/7, 86%). Pozostałe przypadki, w których występowały zmiany w genie *KIT* to trzy mieszane guzy germinalne o dominującym rozpoznaniu (1) *seminoma*; (2) potworniak dojrzwały i rak zarodkowy; oraz (3) rak zarodkowy również o lokalizacji gonadalnej, występujące u dwóch chłopców (16 lat) oraz 17-letniej dziewczynki. Zmian w genie *KIT* nie zaobserwowano w innych badanych podtypach histologicznych. Wyższa niż dotychczas opisywane częstość występowania wariantów patogennych w genie *KIT* w badanej grupie

wymaga potwierdzenia na większej liczbie przypadków, zwłaszcza o podtypie histologicznym dysgerminoma/germinoma/seminoma, gdyż uzyskane wartości mogą okazać się jedynie wypadkową ograniczonej liczebności badanej grupy lub istotnie niższym wiekiem zachorowania w badanej grupie względem wcześniejszych raportów opisujących przede wszystkim wyniki analiz guzów wieku dorosłego.

Zmiany w genie *KIT* zostały powiązane z zaawansowanym stadium ok. 1/3 guzów typu dysgerminoma [Cheng i wsp., 2011]. Informacja o obecności zmian molekularnych w eksonach 17, 13, 11 i 9 genu *KIT* może być przesłanką do wdrożenia leczenia celowanego m.in. *imatinibem* czy *sunitinibem*, leków obecnie rutynowo już stosowanych między innymi w leczeniu guza podścieliska przewodu pokarmowego i czerniaka. Również w GCTs podjęto próby wykorzystania *imatinibu* i *sunitinibu*, jednakże zazwyczaj wykorzystywane one były w połączeniu ze standardową terapią cisplatyną jedynie w ramach badań klinicznych I-II fazy (*ClinicalTrials.gov*; stan na 30.08.2019). Istnieją natomiast doniesienia o skuteczności leczenia *sunitinibem* np. opornego na cisplatynę guza *choriocarcinoma* jak również o braku skuteczności w hamowaniu wzrostu guzów, w których stwierdza się obecność mutacji w eksonie 17 przez *imatinib* [Sánchez-Muñoz i wsp., 2012]. Z drugiej strony, Pedersini i wsp. (2007) opisali pacjenta z opornym na leczenie nasieniakiem z potwierdzoną immunohistochemicznie ekspresją c-kit leczonego wyłącznie *imatinibem*, u którego nastąpiła całkowita remisja choroby, lecz status mutacji genu *KIT* w tym guzie nie został określony [Pedersini i wsp., 2007].

W jednym z analizowanych przypadków mieszanego guza GCT oprócz patogennej zmiany w eksonie 9 genu *KIT* (VAF 14%) stwierdzono również obecność znanej mutacji w genie *KRAS* (VAF 22%). Obecność mutacji w obu genach w obrębie tego samego guza jest nietypowa i świadczyć może o poliklonalnym pochodzeniu zmiany. Co do zasady, mutacje w genach *KIT* i *KRAS* wzajemnie się wykluczają; co więcej, związana z aktywacją białka *KRAS* amplifikacja chromosomu 12p obejmująca *locus* genu *KRAS* również nie jest zwykle stwierdzana w guzach *KIT*-dodatnich [Oosterhuis i Looijenga, 2017]. Gen *KRAS* koduje białko o charakterze GTPazy, które ma kluczowe znaczenie w regulacji procesów proliferacji, przeżycia i różnicowania komórek, jak również bierze udział w procesie onkogenezy, m.in. niedrobnokomórkowego raka płuc i raka jelita grubego. Obecność zmian patogennych w genie *KRAS* jest wskazaniem do zastosowania celowanego leczenia m.in. *cetuksymabem*, *panitumumabem*, *afatynibem*, *dakomitynibem*, *erlotynibem*, *gefitynibem* czy *osimertynibem*. Stwierdzona w niniejszym badaniu zmiana pojedynczego nukleotydu w pozycji c.35G>T (p.Gly12Val) jest często stwierdzanym somatycznym wariantem sekwencyjnym w genie *KRAS*. Opisana ona została w ok. 4,6% przypadków nowotworów w tym gruczolakoraku jelita grubego, niedrobnokomórkowym raku płuc, zewnątrzwydzielniczym nowotworze trzustki, nowotworze trzonu macicy oraz jajnika [The

AACR Project GENIE Consortium. 2017]. Istnieją terapie celowane zatwierdzone przez Agencję Żywności i Leków (FDA; ang. *Food and Drug Administration*) oraz wytyczne National Comprehensive Cancer Network (NCCN) o stosowaniu terapii przeciwnowotworowej opartej o występowanie mutacji p.G12V w genie *KRAS* m.in. w przypadkach niedrobnokomórkowego raka płuca czy raka jelita grubego. Dotychczas nie podjęto jednak prób leczenia celowanego *KRAS*-zależnych guzów GCTs.

W obrębie sekwencji pozostałych genów, które nie należą do szlaku Hh a zostały włączone panelu genów NGS z powodu na ich potencjalne znaczenie terapeutyczne (por. tab. 13), stwierdzono jedynie obecność dwóch zmian o charakterze substytucji pojedynczego nukleotydu: c.*416G>A znajdującą się w regionie 3' UTR oraz c.4941T>G (p.His1647Gln) genu *MTOR*. Z uwagi na ich dość wysoką częstość w populacji kontrolnej oraz wartości predyktorów *in-silico* warianty te zakwalifikowano do grupy zmian najprawdopodobniej łagodnych (por. tab. 38). Ponadto jako zmianę o niepewnej patogenności opisano ultrazadką (dotychczas opisaną jako *singleton*) substytucję w eksonie trzecim genu *FGFR3*: c.358C>A występującą w dwóch guzach o odmiennej histologii. W jej wyniku dochodzi do zamiany konserwowanej u kręgowców reszty histydyliny przez asparaginę w pierwszej od N-końca domenie o strukturze immunoglobulinowej typu C2. Pomimo, że rozwiązano już strukturę receptora *FGFR3* w kompleksie z *FGF* (PDB:1RY7), obszar obejmujący pozycję 120 nie jest widoczny w gęstości elektronowej, nie można więc określić strukturalnych konsekwencji stwierdzanej substytucji. Rola receptora w patogenezie GCTs jest kontrowersyjna, natomiast postuluje się jego udział w fizjologicznym procesie spermatogenezy [Ewen i wsp., 2013].

7.4. Analiza ekspresji genów

W niniejszej pracy po raz pierwszy przeprowadzono ocenę stopnia ekspresji genów szlaku Hh w guzach germinalnych wieku dziecięcego. Badaniem objęto łącznie 84 geny, co umożliwia kompleksową ocenę potencjalnych interakcji nie tylko w obrębie samego szlaku sygnalizacyjnego Hh (tzw. „kanonicznych”) ale również współdziałających ścieżek (por. Wstęp, str. 22). Wyzwaniem niniejszej pracy było jednak uchwycenie potencjalnie dyskretnych różnic w oparciu o badanie mało licznych podgrup histologicznych. Interpretacja uzyskanych wyników musi być więc ostrożna, gdyż przede wszystkim stanowią one punkt wyjścia umożliwiającą ukierunkowanie dalszych badań.

Analizując uzyskane wyniki ocenę poziomu zaangażowania białek szlaku Hh w patogenezie GCTs wyrażonej profilem ekspresji ich mRNA przeprowadzono na czterech poziomach: 1) względem tkanki prawidłowej, 2) względem tkanki wykazującej stan aktywacji

szlaku Hh związany z procesem nowotworzenia 3) względem poszczególnych typów histologicznych badanej grupy GCTs oraz 4) względem wybranych parametrów klinicznych.

W pierwszym etapie porównano uzyskany profil ekspresji do wartości stwierdzonej w kontroli negatywnej w celu określenia, które z badanych genów wykazują nadmierną ekspresję. Poziomy ekspresji genów kanonicznych szlaku Hh w żadnym z analizowanych podtypów histologicznych nie były niższe niż poziom stwierdzony w dojrzałej tkance prawidłowej, natomiast jedynie wybiórcze geny szlaku Hh uległy nadekspresji. Stwierdzono istotne różnice w ekspresji dziesięciu genów występujące w minimum połowie podtypów histologicznych w tym wzrost ekspresji dwóch genów należących do grupy kanonicznych dla szlaku: *PTCHD1* w *teratoma immaturum*, *mixed tumor*, *dysgerminoma* oraz *carcinoma embrionale* oraz *SMO* w *teratoma immaturum*, *mixed tumor* (3.5x), *yolk sac tumor* oraz *dysgerminoma* (por. tab. 41). Obniżoną ekspresję stwierdzono jedynie w stosunku do pięciu genów kodujących czynniki współpracujące ze szlakiem.

W drugim etapie porównano uzyskane profile do wartości uzyskanej dla grupy kontroli pozytywnej celem ustalenia, czy obserwowana nadmierna ekspresja wybranych białek szlaku Hh jest analogiczna tej, która odgrywa rolę w patogenezie Shh-aktywnego podtypu *medulloblastoma*. Dla wszystkich badanych podgrup histologicznych wykazano obecność istotnych statystycznie różnic. Wszystkie badane podtypy histologiczne GCTs wykazywały spójne obniżenie ekspresji genów: *DISP2*, *PTCH2* oraz *PTCHD2* i *HHIP* względem poziomu stwierdzanego w *medulloblastoma*. Największą zmianą krotności ekspresji wyróżnił się *DISP2*, którego ekspresja względem kontroli pozytywnej uległa obniżeniu w każdym podtypie histologicznym co najmniej 15x (-16 do -57; śr. 35x). Należy jednak podkreślić, że w badanych guzach nie stwierdzono równoległego obniżenia ekspresji genów *PTCHD1* oraz *SMO*; przeciwnie ich poziom był analogiczny do obserwowanego w *medulloblastoma* (z wyjątkiem *carcinoma embrionale*, w którym poziom *SMO* był niski oraz *yolk sac tumor*, w którym poziom *PTCHD1* był niski, w obu wypadkach odpowiadający poziomowi stwierdzanemu w kontroli negatywnej). Ponadto, poza potworniakami (zarówno dojrzałymi jak i niedojrzałymi) wszystkie podtypy histologiczne wykazały istotne obniżenie ekspresji genu *BOC* kodującego białko błonowe wymagane do maksymalnej aktywności szlaku Hh. Uzyskane dane wskazują na selektywną aktywację pojedynczych białek należących do grupy kanonicznych elementów szlaku Hh w patogenezie GCTs, która raczej prowadzić może do dysregulacji fizjologicznych procesów dojrzewania niż być czynnikiem spustowym, który uruchamia proces onkogenezy.

Kolejną ważną grupą genów, dla których stwierdzono istotną zmianę stopnia ekspresji, tym razem spójne jej obniżenie we wszystkich analizowanych grupach w porównaniu do kontroli pozytywnej była rodzina tkankowo-specyficznych czynników transkrypcyjnych a charakterze palca cynkowego C2H2: *ZIC1* i *ZIC2*. Białka te pełnią ważną

rolę we wczesnej fazie organogenezy OUN, zwłaszcza struktur mózdzku i rdzenia kręgowego. Jedną z ich funkcji biologicznych jest przetrzymywanie białek z rodziny GLI w cytoplazmie i/lub jądrze komórkowym, wpływając na regulowaną przez nie aktywację translacji [Chan i wsp., 2011]. Pomimo, iż badania dot. roli białek rodziny ZIC w onkogenezie są nadal ograniczone, wydaje się że uzyskany w niniejszym badaniu wynik odzwierciedla raczej ich aktywację w *medulloblastoma* (i innych tkankach neurogennych) a nie dezaktywację w GCTs [Aruga i Millen, 2018; The UniProt Consortium, 2019].

W trzecim etapie analizy danych qPCR porównano uzyskane profile pomiędzy poszczególnymi typami histologicznymi w celu wytypowania ewentualnych markerów związanych z konkretnym podtypem o potencjalnym znaczeniu diagnostycznym. Jak już wspomniano powyżej, profile ekspresji dla kanonicznych białek szlaku Hh różniły się pomiędzy poszczególnymi podtypami histologicznymi. Profil dojrzałego potworniaka, który zbudowany jest z wysokozróżnicowanych tkanek, nie wykazywał wielu zmian aktywujących, przypominając najbardziej profil uzyskany dla kontroli negatywnej. Wyjątkową cechą *yolk sac tumor* była niska ekspresja genu *PTCHD1*, natomiast rak embrionalny wykazał niski poziom ekspresji genów *SMO* i *SUFU* względem poziomu stwierdzanego w kontroli pozytywnej. Klika genów z rodziny WNT miało podwyższoną ekspresję w *dysgerminoma* i raku embrionalnym, natomiast geny z rodziny BMP miały podwyższoną ekspresję w potworniaku niedojrzałym.

Przedstawione na clustergramach (ryc.10 i 11) pogrupowane poszczególne podtypy histologiczne względem ich profili ekspresji genów wydają się być dobrze wytypowane, jednakże nie wszystkie próbki danego typu wykazują spójny profil ekspresji badanych genów. Wydaje się, że wyniki te odzwierciedlają heterogenność grupy badanej jaką są guzy germinalne. Podobnie, guzy typu *medulloblastoma* wykazują znacząco niejednorodność profili transkryptomicznych zarówno pomiędzy poszczególnymi podgrupami jak i wśród MBs z aktywną sygnalizacją Hh (ok. 30% przypadków) [Huang i Yang, 2015; Cavalli i wsp, 2017; Morrissy i wsp, 2017]. Oznacza to również, że uśrednione wartości zmiany ekspresji genów opisane dla każdego z podtypów histologicznych mogą w rzeczywistości być zaniżone, gdyż w obliczeniach uwzględniono zarówno wartości uzyskane dla guzów wykazujących aktywację poszczególnych białek szlaku jak i guzów tego samego typu histologicznego, w których tej aktywacji nie zaobserwowano.

Przeprowadzone w ramach czwartego etapu analizy porównanie profili ekspresji genów w zależności od poszczególnych parametrów klinicznych nie wykazało istotnych różnic w poziomie ekspresji kanonicznych genów kodujących białka szlaku Hh ze względu na płeć, wiek, lokalizację guza, występowanie przed i po okresie pokwitania oraz obecność struktur embrionalnych lub ich brak. Zaobserwowano jednak istotne różnice w stopniu ekspresji kilku elementów szlaku WNT.

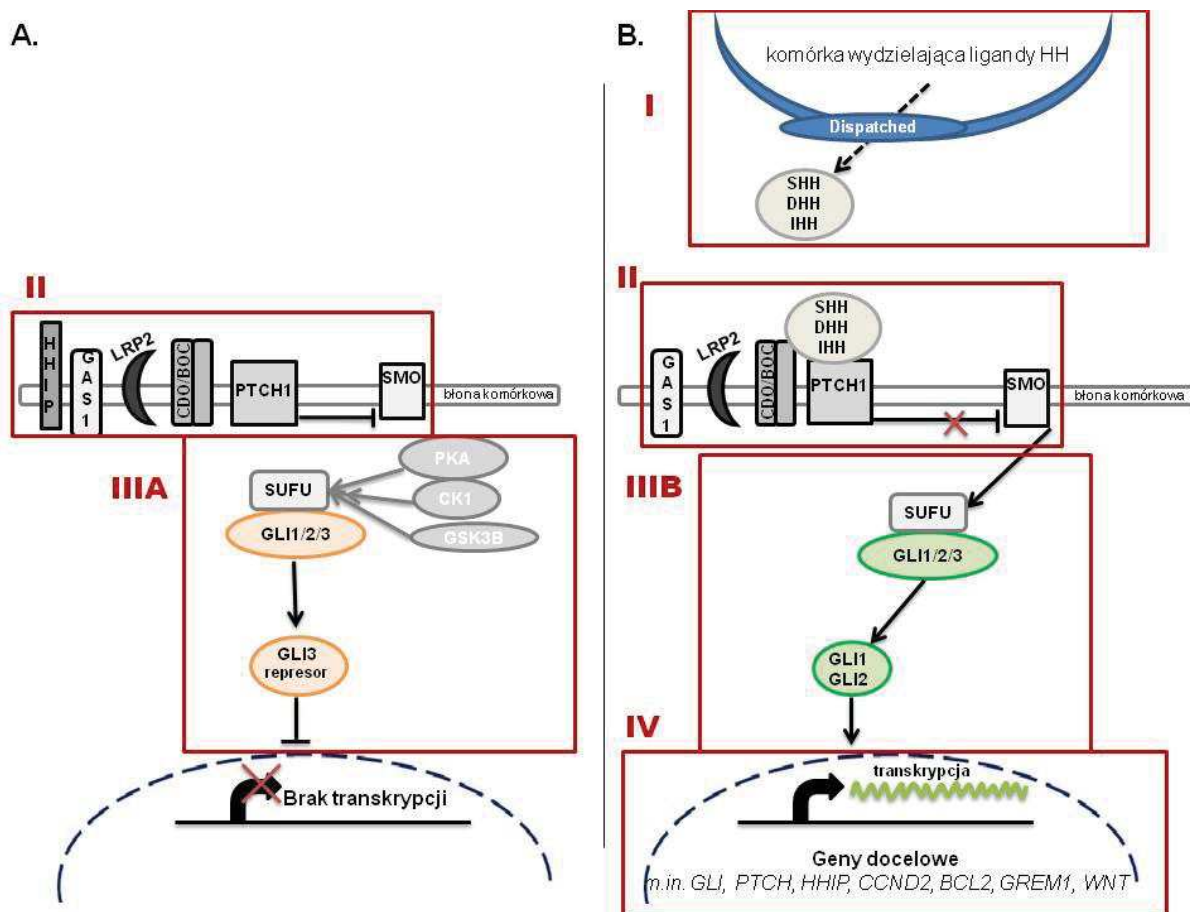
Z uwagi na pilotażowy charakter badań wymagane jest przeprowadzenie analizy ekspresji na większej liczbie przypadków i/lub wykonanie celowanej analizy ekspresji wybranych genów o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym lub rokowniczym. Na podstawie przeprowadzonych analiz wytypowano 12 genów: *DISP2*, *HHIP*, *GLI1*, *GLI3*, *IHH*, *PTCH2*, *PTCHD1*, *SHH*, *SMO*, *SUFU* oraz *ZIC1*, *ZIC2*, których ocena na dalszych etapach realizacji projektu badawczego NCN powinna pozwolić ocenić kierunki i potencjał różnicowania w tej grupie guzów (por. 7.5). Analiza ich ekspresji na większej grupie przypadków może również dostarczyć danych odnośnie ew. możliwości terapii spersonalizowanej.

Ograniczenia metody qPCR

Wszystkie badane próbki uzyskały pozytywny wynik zastosowanych w toku eksperymentu PCR kontroli jakości procesowania, co świadczy o dobrej jakości technicznej otrzymanych wyników. Pomimo dobrych wyników parametrów kontrolnych różnica pomiędzy średnią arytmetyczną wartości Ct dla genu referencyjnego *HPRT1* pomiędzy grupami badanymi a grupą kontrolną wynosiła ok. 2 jednostek (por. tab. 39). Może to nieznacznie wpływać na precyzję uzyskanych znormalizowanych wartości Ct, dlatego też w niniejszym opracowaniu ustalono rygorystyczne progi dla analiz porównawczych (por. Materiał i metody: 5.2.7.4. oraz 5.2.8.). Stwierdzona różnica w wartościach Ct najprawdopodobniej wynika z różnic procesowania materiału FFPE, starzenia się długo archiwizowanego materiału oraz dużego pofragmentowania uzyskiwanego w procesie izolacji z bloczków parafinowych mRNA.

7.5. Ocena zaangażowania białek szlaku Hedgehog oraz elementów współdziałających w patogenezę GCTs

Rycina 12. Schemat szlaku Hh (panel A: hamowanie szlaku; panel B: klasyczna droga w oparciu o aktywację ligandem) – szczegółowy opis poszczególnych etapów w tekście poniżej.



Etap pierwszy – uwalnianie ligandu

Pierwszym etapem klasycznie aktywowanej sygnalizacji Hedgehog jest produkcja oraz uwolnienie przez komórkę funkcjonalnego ligandu HH (rycina 12, panel B, etap I). Klasyczna, zależna od ligandu, aktywacja ma jednak miejsce głównie w procesie embriogenezy (por. Wstęp, sekcja 3.2.2., str. 20) a rzadziej w procesach nowotworzenia (Pietrobono i wsp., 2019). W niniejszej pracy analizą objęto pięć genów kodujących białka uczestniczące w tym etapie aktywacji szlaku tj. trzy geny kodujące ligandy HH (*SHH*, *DHH*, *IHH*) oraz dwa geny z rodziny *dispatched* (*DISP1* oraz *DISP2*). Analiza w kierunku obecności wariantów sekwencyjnych w genach *DHH*, *IHH* oraz *SHH* nie wykazała zmian o charakterze

patogennym i potencjalnie patogennym. W dwóch (2/13, 15%) guzach analizowanych techniką aCGH: *yolk sac tumor* (#2) i *germinoma* (#11) zanotowano dodatkową kopię genu *IHH* (*locus* 2q35; por. Wyniki, Sekcja 6.1.3., str. 60). Germinalne duplikacje regionu 2q35 zostały opisane u pacjentów z syndaktylią typu I (OMIM#185900). Klopocki i wsp. (2011) wykazała, że duplikacje tego regionu prowadzą do zaburzenia regulacji ekspresji genu *IHH* poprzez tzw. efekt pozycji – przesunięcie lokalizacji enhancera.

Rolą białek dispatched jest uwalnianie ligandu HH do mikrośrodowiska (przestrzeni międzykomórkowej). W genie *DISP2* kodującym ludzki homolog 2 genu *dispatched* stwierdzono potencjalnie patogenną zmianę typu *nonsense* (NM_033510.2:c.2212C>T) najprawdopodobniej powodującą przedwczesną terminację translacji białka w ok. połowie jego długości (738/1401 a.a.). Stwierdzono ją w materiale z guza jądra pobranego od 18 letniego mężczyzny z rozpoznaniem histologicznym mieszanego guza germinalnego z przewagą niedojrzałego potworniaka oraz niewielkim odsetkiem zmian o charakterze guza pęcherzyka żółtkowego i raka zarodkowego. Poza mutacją w genie *DISP2* w materiale nie stwierdzono innych zmian somatycznych; z powodów technicznych nie wykonano badania ekspresji szlaku Hh techniką qPCR. Dotychczas nie opisano mutacji patogennych w genie *DISP2* zarówno na poziomie konstytucyjnym jak i somatycznym, a i jego rola zarówno w procesach fizjologicznych jak i nowotworzenia jest mało poznana [Stewart i wsp., 2018]. Ekspresję genu *DISP2* opisano jedynie w kilku przypadkach nowotworów m.in. chłoniakach nieziarnicznych, czerniaku, raku trzustki, raku urotelialnym czy raku jelita grubego [*The Human Protein Atlas*; Uhlén i wsp., 2015]. Ze względu na przynależność do rodziny *dispatched* uszkodzenie genu *DISP2* może potencjalnie prowadzić do zaburzenia uwalniania funkcjonalnego ligandu HH z komórki. W chwili obecnej stwierdzany wariant sklasyfikowany został więc jako zmiana o nieznanym znaczeniu klinicznym. Obecność zmiany w układzie heterozygotycznym przy jej charakterze: utrata funkcji (*loss-of-function*) raczej nie będzie jednak mieć istotnego znaczenia dla procesów wewnątrzkomórkowych, gdyż *DISP2* nie należy do genów wrażliwych na dawkę (pLI=0.02). Nie można jednak wykluczyć klonalnego charakteru zmiany tzn. jej występowania w układzie homozygotycznym w niewielkim odsetku badanych komórek co prowadziłoby do braku jego ekspresji, więc i potencjalnie zaburzeń procesu uwalniania ligandu.

Etap drugi – interakcja ligandu z receptorami

Drugi etap klasycznej sygnalizacji Hedgehog (ryc. 12, Panel A i B, etap II) będący zarazem punktem początkowym dla alternatywnej aktywacji szlaku typowej dla procesów nowotworzenia (por. Wstęp, sekcja 3.2.2., str. 22) obejmuje interakcje ligandu z receptorami i ko-receptorami znajdującymi się na powierzchni i/lub w błonie komórki docelowego

działania Hh. Wśród głównych receptorów o dobrze poznanej funkcji możemy wyróżnić *PTCH1* oraz *SMO*.

W 4/13 przypadków GCTs stwierdzono zmiany liczby kopii genu *PTCH1* (*locus* 9q22.32; por. Wyniki, tab. 31, str. 56). Delecję jednej kopii genu *PTCH1* stwierdzono w guzie typu *germinoma* oraz współwystępującą równocześnie z utratą genu *HHIP* (*locus* 4q31.21 w dwóch przypadkach: *teratoma maturum* i guzie pęcherzyka żółtkowego (por. Wyniki, tab. 31, str. 56). W kolejnym guzie typu *germinoma* zaobserwowano obecność dodatkowej kopii genu *PTCH1*. *PTCH1* jest genem supresorowym, którego mutacje o charakterze utraty funkcji zostały opisane w nowotworach, a także, w przypadku zmian konstytucyjnych, w grupie rzadkich dziedzicznych chorób genetycznych t.j. zespole Gorlina, holoprosencefalii czy zespole mnogich BCC. Potwierdzeniem zaangażowania genu *PTCH1* w nowotworzenie jest fakt, że analiza techniką NGS wykazała patogenne warianty w dwóch z trzech guzów kontrolnych pochodzenia niegerminalnego o wykazanej immunohistochemicznie aktywności szlaku Hh (por. Wyniki, sekcja 6.2., str. 66). Jednakże podobnych zmian nie stwierdzono w żadnym z 27 przebadanych guzów GCTs. Zmian ekspresji genu *PTCH1* nie zaobserwowano w żadnym z badanych podtypów histologicznych. Niezrównoważenie genomu obejmujące *locus PTCH1* stwierdzono jedynie w guzach, w których równocześnie występowały liczne inne zmiany liczbowe i strukturalne w tym w dwóch z trzech przypadków amplifikacji ramion krótkich chromosomu 12p. Obecność złożonych aberracji chromosomowych przemawia za ich wtórnym charakterem będącym raczej pochodną niestabilności genomowej związanej z (zaawansowanym) procesem nowotworowym.

Wspominany powyżej gen *HHIP*, którego *locus* uległo delecji w dwóch guzach iGCTs, jest istotnym elementem aktywności szlaku Hh. Pełni on funkcję wysoce konserwowanego ewolucyjnie inhibitora sygnalizacji *Hedgehog*, który może wejść w interakcję ze wszystkimi trzema ligandami: IHH, SHH i DHH. Jest on szczególnie aktywny w kilku typach komórek m.in. mózgu i płuc. Chociaż rola *HHIP* w procesie nowotworzenia jest słabo poznana opisano m.in., delecję genu *HHIP* w komórkach podścieliska, która sprzyja proliferacji komórek białaczkowych [Agrawal i wsp., 2017]. Ponadto, obniżoną ekspresję genu *HHIP* opisano w literaturze w kilku typach nowotworów, natomiast w niniejszej pracy opisano jego podwyższoną ekspresję w tkance Shh-aktywnych *medulloblastoma* w stosunku do normalnej tkanki węzła chłonnego.

Drugim z kluczowych receptorów szlaku Hh jest produkt genu *SMO*. W jednym guzie typu *germinoma* (#11) stwierdzono trisomię chromosomu 7 obejmującą *locus* genu *SMO* (7q32.1). W żadnym z pozostałych badanych guzów nie zaobserwowano niezrównoważenia genomowego obejmującego jego *locus*. Ponadto, w 1/27 GCTs przebadanych techniką NGS stwierdzono substytucję pojedynczego nukleotydu typu *missense* powodującą zmianę reszty aminokwasowej p.Arg671Trp o nieznanym znaczeniu klinicznym (VUS). Tang i wsp. (2016)

opisali analogiczną zmianę w jednym z 186 analizowanych guzów GIST; częstość nieprawidłowego allelu wynosiła również ~50%. Wskazuje to na jej prawdopodobne germinalne pochodzenie. Allel został opisany w populacji kontrolnej z częstością 0,008% nie figuruje zaś w bazach ClinVar oraz COSMIC a predyktory *in-silico* sprzeczne klasyfikują jego charakter. Dotychczas nie określono struktury białka SMO, dlatego też nie jest możliwa ocena wpływu stwierdzonej substytucji na kształt cząsteczki, jednakże nie można wykluczyć istotnego nań efektu z uwagi na charakter chemiczny reszt aminokwasowych objętych zamianą. W miejsce dodatnio naładowanej reszty argininy w wyniku mutacji podstawiona jest hydrofobowa reszta tryptofanu. Substytucja dotyczy pierwszego z ciągu dziesięciu konserwowanych ewolucyjnie dodatnio naładowanych reszt lizyn i arginin w obrębie C-końcowego fragmentu domeny cytozolowej receptora. Analogicznie do w.w. przypadku GIST, również w analizowanym przypadku mutacja w genie *SMO* współwystępowała ze znaną patogenną mutacją w genie *KIT*. Wskazuje to na jej raczej łagodny, konstytucyjny charakter; nie można jednak wykluczyć jej znaczenia jako czynnika modyfikującego przebieg choroby. Kilka innych wariantów typu *missense* w genie *SMO* ma udowodnioną oporność na inhibitory szlaku Hh [Pricl i wsp., 2015]. Do póki struktura białka SMO pozostaje nieznaną, nie ma jednak możliwości jednoznacznej oceny *ex-vivo* potencjału patogennego stwierdzonej substytucji.

W niniejszej pracy zaobserwowano podwyższoną ekspresję genu *SMO* w trzech podtypach histologicznych GCTs: potworniaku dojrzałym, guzie pęcherzyka żółtkowego i *dysgerminoma*. Fizjologicznie, najwyższa ekspresja genu *SMO* stwierdzana jest w jajniku i endometrium. Wzmożoną ekspresję *SMO* wykazano również w kilku typach nowotworów m.in. raku trzustki, okrężnicy czy potrójnie negatywnym raku piersi [Sari i wsp., 2018; Niyaz, 2019]. Podwyższona ekspresja *SMO* stanowi potencjalny cel inhibitorów wykorzystywanych w terapii przeciwnowotworowej (por. Wstęp, sekcja 3.2.4., str. 25). Efektywność terapii z użyciem *vismodegibu*, stosowanego zarówno samodzielnie jak i w złożonych schematach leczniczych jest aktualnie weryfikowana w badaniach klinicznych obejmujących różne typy nowotworów m.in. rdzeniaka zarodkowego, drobnokomórkowego raka płuca, raka trzustki, oponiaka śródczaszkowego, glejaka i ostrą białaczkę szpikową [Rimkus i wsp., 2016]. Z uwagi na potencjalne znaczenie kliniczne, w ramach dalszych etapów realizowanego projektu naukowego finansowanego ze środków NCN planuje się ocenę stopnia ekspresji *SMO* na większej liczbie przypadków uwzględniających wszystkie podtypy histologiczne.

Największą ilość aberracji genomowych (4/13; 31%) zaobserwowano dla fragmentów chromosomu 9 obejmujących *locus* genu *GAS1* kodującego specyficzne białko hamujące wzrost komórki. Poprzez współdziałanie z receptorem PTCH1 białko *GAS1* uczestniczy w zapewnieniu odpowiedniej modyfikacji gradientu stężenia ligandu HH tak aby zapewnić jego aktywność morfogenetyczną [Martinelli i Fan, 2015]. Zmiany w *locus* genomowym

GAS1 zostały stwierdzone w 4 guzach o odmiennej histologii: potworniaku dojrzałym, guzie pęcherzyka żółtkowego oraz w dwóch przypadkach *germinoma*. Ponadto, stwierdzono zwiększoną ekspresję genu współwystępującą z podobnym wzrostem ekspresji trzech genów białek morfogenetycznych kości: *BMP7*, *BMP5* i *BMP4* oraz genu kodującego receptor wzrostu fibroblastów 3 - *FGFR3* w potworniaku niedojrzałym. Z uwagi na rolę, jaką białko GAS1 odgrywa w regulacji ilości dostępnego ligandu Hh poprzez konkutowanie z PTCH1 o jego wiązanie, zaburzenia mające wpływ na jego ilość mogą potencjalnie przekładać się na dysregulację procesów morfogenezy a tym samym prowadzić do nowotworzenia.

W pozostałych genach kodujących produkty białkowe biorące udział w drugim etapie sygnalizacji Hh (*CDON*, *HHIP*, *LRP2*, *PTCHD1*, *PTCHD2*, *PTCHD3*) w niniejszej analizie stwierdzono pojedyncze zmiany liczby kopii, jednakże żadna z nich nie powtórzyła się w więcej niż dwa razy. Ponadto, stwierdzono je w guzach charakteryzujących się licznymi, złożonymi zaburzeniami genomu, dlatego też najbardziej prawdopodobnym jest, że są one zdarzeniami incydentalnymi będącymi pochodną niestabilności genomu. Nie zaobserwowano żadnej zmiany liczby kopii genu *BOC* (*locus* 3q13.2), gdyż chromosom 3 nie uległ aberracji w żadnym z badanych guzów. Zaobserwowano jednak obniżoną ekspresję tego genu w czterech badanych podtypach histologicznych GCTs (poza potworniakami) w porównaniu do ekspresji stwierdzanej w Shh-aktywnych *medulloblastoma*. Gen ten jest jednym z koreceptorów prawdopodobnie wymaganych do poprawnego działania PTCH1. Ponadto, Mille i wsp. (2014) wykazali jego nadekspresję w grupie SHH-aktywnych guzów *medulloblastoma* związaną z progresją choroby.

Również geny zawierające podjednostkę *patched* (*PTCHD1*, *PTCHD2*, *PTCHD3*) wykazywały odmienny wzorzec ekspresji w poszczególnych podtypach histologicznych. Podwyższoną ekspresję wykazano dla genu *PTCHD1* w czterech grupach GCTs: potworniaku niedojrzałym, *dysgerminoma*, raku zarodkowym oraz w guzach mieszanych jak również w Shh-aktywnym *medulloblastoma*. Ekspresja genu *PTCHD1* obejmuje wiele tkanek i organów przy czym najszerszej obejmuje mózdzek. W literaturze są również doniesienia, o zaangażowaniu białka PTCHD1 w sygnalizację *Hedgehog*, poprzez hamowanie zależnej od GLI transkrypcji genów w podobny sposób jak homologiczne białka PTCH1 i PTCH2 [Noor i wsp, 2010]. Ekspresję kolejnego genu zawierającego podjednostkę Patched - *PTCHD2* *alias* *DIPS3* – zaobserwowano do tej pory w kilku nowotworach, m.in. raku piersi, prostaty, płuca, wątroby czy raku jelita grubego jak również w analizowanej w niniejszej pracy podgrupie kontrolnej Shh-aktywnych *medulloblastoma* [The Human Protein Atlas; Uhlén i wsp., 2015]. Istnieją również doniesienia o ektopowej ekspresji *DISP3*, która sprzyja proliferacji komórek oraz zmienia ekspresję genów zaangażowanych w procesy nowotworzenia [Zíková i wsp., 2014]. *PTCHD2* miał istotnie niższy poziom ekspresji w GCTs

w porównaniu z *medulloblastoma*. Przeciwnie, poziom aktywacji *PTCHD1* w rdzeniaku zarodkowym był porównywalny z guzami germinalnymi. Z uwagi na liczebność analizowanych przypadków nie jest możliwa na obecnym etapie ocena nie tylko znaczenia ale i pochodzenia tej rozbieżności. Nie można jednak wykluczyć, że wynika ona z tkankowospecyficzných różnic w ekspresji.

W dwóch guzach o złożonych profilach genomowych zaobserwowano duplikację fragmentu chromosomu 2 obejmującego *locus* genu *LRP2* (*locus* 2q31.1). *LRP2* koduje białko-2 związane z receptorem lipoproteinowym (in. megalinę) będące istotnym czynnikiem dla ponownego wychwytu wielu ligandów w tym białek HH. Badanie sekwencji kodującej genu *LRP2*, będącego największym badanym genem w panelu NGS, wykazało szereg zmian o charakterze substytucji powodującej zmianę pojedynczego aminokwasu. Żadna z opisanych zmian, na podstawie zastosowanych predyktorów *in silico*, nie została sklasyfikowana jako patogenna lub potencjalnie patogenna. Opisano dotychczas prawdopodobne znaczenie polimorfizmów genu *LRP2* jako modyfikatorów przebiegu choroby m.in. w raku prostaty, sugerując, że mogą one zwiększać aktywność megaliny a tym samym zwiększać wychwyt androgenów przyczyniających się do wzrostu guza [Holt i wsp., 2008]. Analiza stopnia ekspresji genu *LRP2* nie wykazała istotnych zmian w poszczególnych grupach badanych.

Etap trzeci – aktywacja kaskady sygnalizacyjnej szlaku Hh

Trzeci etap kaskady transmisji sygnału szlakiem Hh obejmuje dwa stany: (A) braku aktywacji kaskady sygnalizacyjnej Hh, a w konsekwencji braku transkrypcji genów docelowych (ryc. 12; panel 1, sekcja IIIA) oraz (B) stan aktywacji kaskady sygnalizacyjnej *Hedgehog* skutkujący transkrypcją genów w jądrze komórkowym (ryc. 12; panel 2, sekcja IIIB).

Wspólnym elementem obu w.w. stanów jest białko SUFU, negatywny regulator sygnalizacji *Hedgehog*. Delecję fragmentu genomu (10q22.2-.26.3) obejmującą *locus* tego genu zaobserwowano w jednym iGCT typu *germinoma*. Utrata heterozygotyczności (LOH; ang. *loss of heterozygosity*) w tym regionie (10q24) jest zjawiskiem często obserwowanym w *medulloblastoma* [Bayani i wsp., 2000]. Ponadto, analiza sekwencji nukleotydowej techniką NGS wskazała na obecność substytucji pojedynczego nukleotydu w eksonie pierwszym, opisaną już w raku tarczycy (COSMIC ID nr COSM6387609). W świetle przeprowadzonej analizy *in-silico* wariant ten został zakwalifikowany jako potencjalnie łagodny. Zamiana niekonserwowanej ewolucyjnie treoniny na prolinę na samym N-początku białka SUFU przypada na fragment nieuporządkowanej struktury bogatej w proliny (PDB:4KMD), nie można więc wnioskować o wpływie substytucji na budowę cząsteczki

białka. Ponadto, z uwagi na trudności techniczne związane z sekwencjonowaniem tego regionu genomu (por. 7.3.), nie można wykluczyć że stwierdzana zmiana jest jedynie artefaktem reakcji PCR.

Aktywny stan szlaku sygnałowego Hedgehog skutkuje indukcją ekspresji szeregu genów, z których najważniejszymi są czynniki transkrypcyjne z rodziny GLI. W dwóch z trzech zastosowanych w niniejszej pracy technikach: aCGH i NGS zaobserwowano zmiany dotyczące genów kodujących czynniki transkrypcyjne GLI2 i GLI3. W przypadkach dwóch GCTs, guzie pęcherzyka żółtkowego oraz germinoma, zanotowano niezrównoważenie genomu skutkujące między innymi obecnością dodatkowej kopii genu kodującego czynnik transkrypcyjny GLI2. Natomiast analiza sekwencji nukleotydowej techniką NGS wykazała obecność czterech wariantów sekwencyjnych o nieznanym znaczeniu klinicznym w genach *GLI2* oraz *GLI3*. Obecna w guzach pochodzących od dwóch nastoletnich kobiet: dysgerminoma miednicy mniejszej i guzie pęcherzyka żółtkowego zlokalizowanym w jajniku substytucja c.341G>A w genie *GLI3* skutkuje zamianą konserwowanej u kręgowców reszty argininy na lizynę we fragmencie N-końcowym białka o nieznanym strukturze i funkcji. Druga z mutacji, substytucja dwóch nukleotydów pod koniec sekwencji kodującej gen *GLI2*, może prowadzić do pojawienia się nowego miejsca splicingu (wg. algorytmu *NNsplice* prawdopodobieństwo wzrasta z 0.32 dla sekwencji prawidłowej do 0.90 dla sekwencji z mutacją). Trzeci wariant, podwójna substytucja c.3083_3084delinsTT w genie *GLI3*, najprawdopodobniej skutkujący substytucją reszty seryny na izoleucynę w pozycji 1028, z uwagi na wysoką częstość w populacji kontrolnej oraz wartości predyktorów *in-silico* została zakwalifikowana do grupy zmian najprawdopodobniej łagodnych. We wszystkich w/w wariantach częstość nieprawidłowego allelu (VAF) wynosiła ~50%, co wskazuje na ich prawdopodobne germinalne pochodzenie. Allele zostały również już opisane w populacji kontrolnej, zaś w bazach ClinVar oraz COSMIC figurują jako zmiany łagodne.

Do grupy konserwowanych ewolucyjnie kinaz zaangażowanych w regulację przekształcania czynników transkrypcyjnych GLI z form aktywatora do represora są kinazy kazeinowe (CK; ang. *casein kinase*) 1 α i 1 ϵ , kinaza syntazy glikogenu 3 β (GSK3 β ; ang. *glycogen synthase kinase-3*) i kinaza białkowa A zależna od CAMP (PKA; ang. *protein kinase A; CAMP; cyclic AMP*) [Varjosalo i Taipalle, 2008]. Zarówno PKA jak i CKI regulują również akumulację SMO na powierzchni komórki oraz jego działanie w odpowiedzi na sygnał ligandów. W niniejszej pracy badano wybrane geny kodujące elementy w/w kompleksów białkowych. Analizą objęto geny: *CSNK1A1* (ang. *casein kinase I isoform alpha*) oraz *CSNK1E* (ang. *casein kinase I isoform epsilon*) kodujące poszczególne kinazy kazeinowe oraz dwa geny *PRKACA* (kodującego podjednostkę alfa białkowej kinazy aktywowanej c-AMP, ang. *protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha*) oraz *PRKACB*

(kodującego podjednostkę beta białkowej kinazy aktywowanej c-AMP, ang. *protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, beta*) kodujące katalityczne podjednostki alfa i beta PKA.

W niniejszym badaniu stwierdzono pojedyncze zmiany liczby kopii w genach *CSNK1A1*, *CSNK1E* oraz *PRKACB*, jednakże żadna z nich nie powtórzyła się więcej niż dwa razy. Natomiast trisomia chromosomu 19 obecna w trzech guzach typu *germinoma* obejmowała *locus* genu *PRKACA*. Gen *CSNK1A1* jest przypuszczalnie genem supresorowym, kontrolującym proliferację dzięki swojej funkcji głównego regulatora aktywności β -kateniny m.in. w raku jelita grubego i czerniaku [Elyada et al., 2011; Sinnberg et al., 2010]. Badanie qCPR wykazało wzrost ekspresji mRNA genu *CSNK1E* we wszystkich podtypach histologicznych względem Shh-aktywnych *medulloblastoma*. Zmiany w ekspresji i aktywności CK1 ϵ , a także występowanie patogennych zmian zaobserwowano w różnych nowotworach m.in. w raku piersi i jajnika [Lopez-Guerra i wsp., 2015]. Istnieją również doniesienia o lepszych rezultatach leczenia u pacjentów z wyższą ekspresją CK1 ϵ np. w raku płaskonabłonkowym jamy ustnej, raku piersi i raku jelita grubego [Chen i wsp., 2018]. W niniejszym badaniu wykazano również wykazało spadek ekspresji genu *PRKACB* we wszystkich badanych podtypach histologicznych (oprócz potworniaka niedojrzałego). Ekspresja genu *PRKACB* została powiązana z różnym przeżyciem pacjentów onkologicznych. Zwiększona ekspresja genu *PRKACB* (ang. *protein kinase cAMP-activated catalytic subunit beta*) jest korzystnym markerem prognostycznym przeżycia pacjentów z rakiem nerki jak również czynnikiem niekorzystnym u pacjentów z rakiem wątroby [The Human Protein Atlas; Uhlén i wsp., 2015]. Obniżenie ekspresji *PRKACB* wykazano dotychczas w niedrobnokomórkowym raku płuca [Chen i wsp., 2013].

Etap czwarty – interakcja ligandu z receptorami transkrypcja genów docelowych

IV etap obejmuje transkrypcję genów docelowych, z których najważniejsze: *GLI1*, *PTCH1*, *PTCH2* i *HHIP1* zostały już omówione powyżej. Ich działanie obejmuje regulację szlaku Hh w oparciu o mechanizm dodatniego sprzężenia zwrotnego za pośrednictwem *GLI1* oraz ujemnego sprzężenia zwrotnego za pośrednictwem *PTCH1*, *PTCH2* i *HHIP1* [Katoh i Katoh, 2009]. Ważną grupę stanowią również geny współpracującego szlaku WNT, których liczne zmiany liczby kopii (por. Wyniki, sekcja 6.1.3., tab. 33) oraz zmiany ekspresji zostały opisane w niniejszej pracy (por. Wyniki, sekcja 6.3.2. i 6.3.3., str. 78 i 81). Wykazano również zmniejszoną ekspresję genu *BCL2* względem obu zastosowanych kontroli. Nieprawidłową ekspresję tego genu kodującego regulator apoptozy zaobserwowano w guzach litych, takich jak rak gruczołu krokowego, piersi czy rak płuc [Frenzel i wsp., 2009]. Liczne badania wykazały, że wysoki poziom ekspresji genu *BCL2* jest negatywnym czynnikiem rokowniczym u pacjentów z rakiem tarczycy, czerniakiem, rakiem piersi, prostaty, drobnokomórkowym rakiem płuc, rakiem jelita grubego czy pęcherza moczowego [Thomas i wsp., 2013; The

Human Protein Atlas; Uhlén i wsp., 2015]. Z drugiej strony, podwyższona ekspresja genu *BCL2* jest korzystnym czynnikiem przeżyciowym u pacjentów z rakiem nerki i rakiem szyjki macicy [The Human Protein Atlas; Uhlén i wsp., 2015].

Uwagi końcowe

Przedstawione w niniejszej rozprawie wyniki analiz zmian molekularnych w genach szlaku Hedgehog mają charakter badań pilotażowych, które miały na celu opracowanie szczegółowej metodyki poszczególnych analiz uwzględniającej heterogenność tej grupy guzów. Po raz pierwszy podjęto się oceny zarówno aktywności jak i zmian molekularnych w poszczególnych elementach szlaku Hh w guzach germinalnych. Z uwagi na trudności związane z jakością archiwalnego materiału tkankowego uzyskane wyniki należy interpretować z ostrożnością. Stanowią one punkt wyjściowy do dalszych analiz w ramach realizowanego projektu naukowego NCN, nie tylko poprzez wskazanie elementów szlaku, które powinny zostać uwzględnione w dalszych analizach ale również wskazując na konieczność poszukiwania nowych rozwiązań technicznych służących do oceny ich zmian molekularnych. Negatywnie oceniono praktyczne aspekty wykonywalności analiz w oparciu o qPCR, który okazał się techniką nieodpowiednią do analizowanego materiału. Mimo modyfikacji metody w oparciu o preamplifikację uzyskane wartości Ct były na granicy dopuszczalności do interpretacji. Równocześnie zdobyte doświadczenie w przeprowadzaniu analiz techniką NGS z wykorzystaniem unikalnych znaczników molekularnych tzw. UMI pozwala na zaproponowanie alternatywnego rozwiązania. Na dalszych etapach realizacji projektu badawczego planuje się przeprowadzić jednoczasową ocenę zmian molekularnych i stopnia ekspresji genów szlaku w oparciu o sekwencjonowanie RNA (RNA-seq).

8. WNIOSKI

1. Spośród testowanych technik molekularnych negatywną ocenę uzyskała analiza ekspresji w oparciu o qPCR, która pomimo wprowadzenia modyfikacji metodologii wymagała znacznej powściągliwości przy interpretacji wyników.
2. Niezrównoważenie genomu jest zjawiskiem częstym w pediatrycznych wewnątrzczaszkowych GCTs, nie obserwuje się zaś zmian patognomicznych. Niestabilność obejmująca *loci* niektórych genów szlaku, w tym *PTCH1*, *ZIC2* oraz *GLI1-3* występuje w niewielkim odsetku guzów.
3. Rzadkość występowania wariantów sekwencyjnych o charakterze patogennym w obrębie genów kodujących białka związanych ze szlakiem Hh wskazuje, że nie odgrywają one istotnej roli w patogenezie GCTs.
4. Profil ekspresji genów związanych z sygnalizacją Hh wskazuje na selektywną aktywację pojedynczych elementów, która prowadzić może do dysregulacji fizjologicznych procesów dojrzewania lub apoptozy.
5. Konieczna jest kontynuacja badań na większej grupie guzów, z analizą ekspresji wytypowanych genów uzupełnioną o badanie immunohistochemiczne oraz ocenę korelacji pato-klinicznych.

9. PIŚMIENICTWO

1. Adzhubei I., Jordan D.M., Sunyaev S.R.: Predicting Functional Effect of Human Missense Mutations Using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet.* 2013; 0 7: Unit7.20
2. Agrawal V., Kim D.Y., Kwon Y.G.: Hhip regulates tumor-stroma-mediated upregulation of tumor angiogenesis. *Exp Mol Med.* 2017; 49(1):e289.
3. Aiello NM, Stanger BZ. Echoes of the embryo: using the developmental biology toolkit to study cancer. *Dis Model Mech.* 2016; 9(2):105-14.
4. Arnhold V., Boos J., Lanvers-Kaminsky C.: Targeting hedgehog signaling pathway in pediatric tumors: in vitro evaluation of SMO and GLI inhibitors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2016; 77(3): 495–505.
5. Aruga J., Millen K.J.: ZIC1 Function in Normal Cerebellar Development and Human Developmental Pathology. In: Aruga J. (eds) Zic family. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2018; vol 1046. Springer, Singapore
6. Bagrodia A., Albany C., Masterson T.A.: Germ Cell Tumors: Updates on Epidemiology, Biology, and Treatment Considerations. *Adv Urol.* 2018; 2018: 4821084.
7. Bayani J., Zielenska M., Marrano P., Kwan Ng Y., Taylor M.D., Jay V., Rutka J.T., Squire J J. A.: Molecular cytogenetic analysis of medulloblastomas and supratentorial primitive neuroectodermal tumors by using conventional banding, comparative genomic hybridization, and spectral karyotyping. *Neurosurg.* 2000; 93(3): 437–448.
8. Bhatt S., Diaz R., Trainor P.A.: Signals and switches in Mammalian neural crest cell differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013; 5:a008326.
9. Calaminus G., Joffe J.: Germ Cell Tumors in Adolescents and Young Adults. *Prog Tumor Res.* 2016; 43: 115–127
10. Carballo G.B., Honorato J.R., de Lopes G.P.F., Spohr T.C.L.S.E.: A highlight on Sonic hedgehog pathway. *Cell Commun Signal.* 2018; 16:11.
11. Cavalli F.M.G., Remke M., Rampasek L., Peacock J., Shih D.J.H., Luu B., Garzia L., Torchia J., Nor C., Morrissy A.S., et al.: Intertumoral Heterogeneity within Medulloblastoma Subgroups. *Cancer Cell.* 2017; 31(6):737-754.e6.
12. Cecchetto G.: Gonadal germ cell tumors in children and adolescents. *J Indian Assoc Pediatr Surg.* 2014; 19: 189-94
13. Chan D.W., Liu V.W., Leung L.Y., Yao K.M., Chan K.K., Cheung A.N., Ngan H.Y.: Zic2 synergistically enhances Hedgehog signalling through nuclear retention of Gli1 in cervical cancer cells. *J Pathol.* 2011; 225(4): 525-34.
14. Chen S., Wang Q., Wang L., Chen H., Gao X., Gong D., Ma J., Kubra S., Yao X., Li X., Li L., Zhai W., Zheng J.: REGγ deficiency suppresses tumor progression via stabilizing CK1ε in renal cell carcinoma. *Cell Death Dis.* 2018; 9(6):627.
15. Chen Y., Gao Y., Tian Y., Tian D.L.: PRKACB is downregulated in non-small cell lung cancer and exogenous PRKACB inhibits proliferation and invasion of LTP-A2 cells. *Oncol Lett.* 2013; 5(6):1803-1808.
16. Cheng L., Albers P., Berney D.M., Feldman D.R., Daugaard G., Gilligan T., Looijenga L.H.: Testicular cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 2018; 4(1): 29.
17. Coffey J., Linger R., Pugh J., Dudakia D., Sokal M., Easton D.F., et al.: Somatic KIT mutations occur predominantly in seminoma germ cell tumors and are not predictive of bilateral disease: report of 220 tumors and review of literature. *Genes, chromosomes & cancer.* 2008;47(1):34–42
18. Cohen M.M. Jr: Hedgehog signaling update. *Am J Med Genet A.* 2010; 152A: 1875–1914.
19. Cooper G.M., Stone E.A., Asimenos G., NISC Comparative Sequencing Program, Green E.D., Batzoglou S., Sidow A.: Distribution and intensity of constraint in mammalian genomic sequence. *Genome Res.* 2005; 15(7): 901–913

20. Cooper M.K., Porter J.A., Young K.E., Beachy P.A.: Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling *Science* 1998; 280(5369): 1603-7.
21. Dassule H.R., Lewis P., Bei M., Maas R., McMahon A.P.: Sonic hedgehog regulates growth and morphogenesis of the tooth. *Development*. 2000; 127: 4775–4785.
22. den Dunnen J.T., Dalgleish R., Maglott D.R., Hart R.K., Greenblatt M.S., McGowan-Jordan J., Roux A-F., Smith T., Antonarakis S.E., Taschner P.E.M.: HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat*. 2016; 37(6): 564–569.
23. Deshpande G., Swanhart L., Chiang P., Schedl P. Hedgehog signaling in germ cell migration. *Cell*. 2001; 106: 759–769.
24. Di Marcotullio L., Ferretti E., De Smaele E., Screpanti I., Gulino A.: Suppressors of hedgehog signaling: Linking aberrant development of neural progenitors and tumorigenesis. *Mol Neurobiol*. 2006; 34(3): 193–204.
25. Drożyńska E., Bień E., Połczyńska K., Stefanowicz J., Zalewska-Szewczyk B., Iżycka-Świeszewska E., Płoszyńska A., Krawczyk M., Karpinsky G.: A need for cautious interpretation of elevated serum germ cell tumor markers in children. Review and own experiences. *Biomark Med*. 2015; 9: 923-32.
26. Dufour C., Guerrini-Rousseau L., Grill J.: Central nervous system germ cell tumors: an update. *Curr Opin Oncol*. 2014; 26(6): 622–626.
27. Elyada E., Pribluda A., Goldstein R.E., Morgenstern Y., Brachya G., Cojocar G., Snir-Alkalay I., Burstain I., Haffner-Krausz R., Jung S., Wiener Z., Alitalo K., Oren M., Pikarsky E., Ben-Neriah Y.: CK1 α ablation highlights a critical role for p53 in invasiveness control. *Nature*. 2011; 470(7334):409-13.
28. Evangelista M, Tian H., de Sauvage F.J.: The hedgehog signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res*. 2006; 12 (20 Pt 1): 5924–5928.
29. Ewen K.A., Olesen I.A., Winge S.B., Nielsen A.R., Nielsen J.E., Graem N., Juul A., Rajpert-De Meyts E.: Expression of FGFR3 during human testis development and in germ cell-derived tumours of young adults. *Int J Dev Biol*. 2013;57(2-4):141-51.
30. Faria A.V.S., Akyala A.I., Parikh K., Brüggemann L.W., Spek C.A., Cao W., Bruno M.J., Bijlsma M.F., Fuhler G.M., Peppelenbosch M.P.: Smoothed-dependent and -independent pathways in mammalian noncanonical Hedgehog signaling. *J Biol Chem*. 2019; 294(25):9787-9798.
31. Feldman D.R., Iyer G., Van Alstine L., Patil S., Al-Ahmadie H., Reuter V.E., Bosl G.J., Chaganti R.S., Solit D.B.: Presence of somatic mutations within PIK3CA, AKT, RAS, and FGFR3 but not BRAF in cisplatin-resistant germ cell tumors. *Clin Cancer Res*. 2014; 20(14):3712-20
32. Fetcko K., Dey M.: Primary Central Nervous System Germ Cell Tumors: A Review and Update. *Med Res Arch*. 2018; 6(3): 1719.
33. Frenzel A., Grespi F., Chmielewski W., Villunger A.: Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. *Apoptosis*. 2009; 14(4): 584-96.
34. Girardi D., Barrichello A., Fernandes G., Pereira A.: Targeting the Hedgehog Pathway in Cancer: Current Evidence and Future Perspectives. *Cells*. 2019; 8(2):153.
35. Gonias S.L., Karimi-Mostowfi N., Murray S.S., Mantuano E., Gilder A.S.. Expression of LDL receptor-related proteins (LRPs) in common solid malignancies correlates with patient survival. *PLoS One*. 2017; 12(10): e0186649.
36. Gonnissen A, Isebaert S, Haustermans K. Targeting the Hedgehog signaling pathway in cancer: beyond Smoothed. *Oncotarget*. 2015;6(16):13899-913.
37. Hersmus R., van Bever Y., Wolffenbuttel K.P., Biermann K., Cools M., Looijenga L.H.: The biology of germ cell tumors in disorders of sex development. *Clin Genet*. 2017; 91: 292-301.
38. Høei-Hansen C.E., Kraggerud S.M., Abeler V.M., Kaern J., Rajpert-De Meyts E., Lothe R.A.: Ovarian dysgerminomas are characterised by frequent KIT mutations and abundant expression of pluripotency markers. *Mol Cancer*. 2007; 6:12.

39. Holt S.K., Karyadi D.M., Kwon E.M., Stanford J.L., Nelson P.S., Ostrander E.A.: Association of megalin genetic polymorphisms with prostate cancer risk and prognosis. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(12):3823-31.
40. Huang S.Y., Yang J.Y.: Targeting the Hedgehog Pathway in Pediatric Medulloblastoma. *Cancers (Basel).* 2015; 7(4):2110-23.
41. Huang X., Zhang R., Mao Y., Zhou L.-F., Zhang C.: Recent advances in molecular biology and treatment strategies for intracranial germ cell tumors. *World J Pediatr.* 2016; 12: 275–282.
42. Jenkins D.: Hedgehog signalling: emerging evidence for non-canonical pathways. *Cell Signal.* 2009; 21: 1023–1034.
43. Jeong J, McMahon AP. Cholesterol modification of Hedgehog family proteins. *J Clin Invest.* 2002;110(5):591-6.
44. Kalia S.S., Adelman K., Bale S.J., Chung W.K., Eng C., Evans J.P., Herman G.E., Hufnagel S.B., Klein T.E., Korf B.R., McKelvey K.D., Ormond K.E., Richards C.S., Vlangos C.N., Watson M., Martin C.L., Miller D.T.: Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2.0): a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med.* 2017; 19(2):249-255
45. Katoh M.: Genomic testing, tumor microenvironment and targeted therapy of Hedgehog-related human cancers. *Clin Sci (Lond).* 2019; 133(8):953-970.
46. Katoh Y., Katoh M.: Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. *Curr Mol Med.* 2009; 9(7): 873–886.
47. Kemmer K., Corless C.L., Fletcher J.A., McGreevey L., Haley A., Griffith D., Cummings O.W., Wait C., Town A., Heinrich M.C.: KIT mutations are common in testicular seminomas. *Am J Pathol.* 2004; 164(1):305-13.
48. King T.F.; Conway G.S.: Swyer syndrome. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2014; 21: 504–510.
49. Klopocki E., Lohan S., Brancati F., Koll R., Brehm A., Seemann P., Dathe K., Stricker S., Hecht J., Bosse K., Betz R.C., Garaci F.G., Dallapiccola B., Jain M., Muenke M., Ng V.C., Chan W., Chan D., Mundlos S.: Copy-number variations involving the IHH locus are associated with syndactyly and craniosynostosis. *Am J Hum Genet.* 2011; 88(1):70-5.
50. Kong J.H., Siebold C., Rohatgi R.: Biochemical mechanisms of vertebrate hedgehog signaling *Development.* 2019; 146(10).
51. Kooijmans E.C., Bökenkamp A., Tjahjadi N.S., Tettero J.M., van Dulmen-den Broeder E., van der Pal H.J., Veening M.A.: Early and late adverse renal effects after potentially nephrotoxic treatment for childhood cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019; 3:CD008944.
52. Korkola J.E., Houldsworth J., Chadalavada R.S.V., Olshen A.B., Dobrzynski D., JReuter V.E., Bosl G.J., Chaganti R.S.K.: Down-regulation of stem cell genes, including those in a 200-kb gene cluster at 12p13.31, is associated with in vivo differentiation of human male germ cell tumors. *Cancer Res.* 2006; 66(2): 820–827.
53. Kuleszo D., Koczkowska M., Lipska-Ziętkiewicz B.S., Grajkowska W., Adamkiewicz-Drożyńska E., Dembowska-Bagińska B., Ciołkowski M., Iżycka-Świeszewska E.: Comparative genomic analysis of intracranial germ cell tumors – the preliminary study focused on Sonic Hedgehog signaling pathway. *Contemp Oncol.* 2017; 21(4): 279-284.
54. Kuleszo D., Lipska-Ziętkiewicz B.S., Koczkowska M., Zakrzewski K., Grajkowska W., Roszkowski M., Dembowska-Bagińska B., Czarnota K., Adamkiewicz-Drożyńska E., Iżycka-Świeszewska E.: Hedgehog signaling network gene status analysis in pediatric intracranial germ cell tumors. *Folia Neuropathol.* 2019; w druku
55. (1) Kuleszo D., Koczkowska M., Grajkowska W., Adamkiewicz-Drożyńska E., Dembowska-Bagińska B., Lipska-Ziętkiewicz B.S., Czarnota K., Iżycka-Świeszewska E.: Analiza porównawcza profili genomowych wewnątrzczaszkowych guzów germinalnych: wyniki wstępne. W: Szóste Sympozjum Sekcji Neuroonkologii PTNCH, Zamość, 9-10 grudnia 2016 : streszczenia 45.
56. (2) Kuleszo D., Koczkowska M., Lipska-Ziętkiewicz B.S., Grajkowska W., Adamkiewicz-Drożyńska E., Dembowska-Bagińska B., Ciołkowski M., Iżycka-Świeszewska E.. Comparative

- genomic analysis of intracranial germ cell tumor : the preliminary study focused on Sonic Hedgehog signaling pathway. *Współcz. Onkol.* 2017; vol. 21, nr 4, s. 279-284, bibliogr. 40 poz., streszcz. ang. 46.
57. (3) Kuleszo D., Koczkowska M., Grajkowska W., Adamkiewicz-Drożyńska E., Dembowska-Bagińska B., Lipska-Ziętkiewicz B.S., Roszkowski M., Czarnota K., Iżycka-Świeszewska E.: Comparative genomic analysis of intracranial germ cell tumor - preliminary results focused on SHH pathway elements. *Współcz. Onkol.* 2017; vol. 21, supl. 1, s. 22
58. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown GR, Chao C, Chitipiralla S, Gu B, Hart J, Hoffman D, Jang W, Karapetyan K, Katz K, Liu C, Maddipatla Z, Malheiro A, McDaniel K, Ovetsky M, Riley G, Zhou G, Holmes JB, Kattman BL, Maglott DR. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res* . 2018.
59. Lee K., Jeong J., Kwak I., Yu C.T., Lanske B., Soegiarto D.W., Toftgard R., Tsai M.J., Tsai S., Lydon J.P., DeMayo F.J.: Indian hedgehog is a major mediator of progesterone signaling in the mouse uterus. *Nat Genet.* 2006; 38: 1204–1209.
60. Li M.M., Datto M., Duncavage E.J., Kulkarni S., Lindeman N.I., Roy S., Tsimberidou A.M., Vnencak-Jones C.L., Wolff D.J., Younes A., Nikiforova M.N.: Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn.* 2017; 19(1):4-23.
61. Lobo, J., Gillis, A., Jerónimo, C., Henrique, R., Looijenga, L.: Human Germ Cell Tumors are Developmental Cancers: Impact of Epigenetics on Pathobiology and Clinic. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(2): 258.
62. Looijenga L.H., Hersmus R., de Leeuw B.H., Stoop H., Cools M., Oosterhuis J.W., Drop S.L., Wolffenbuttel K.P.: Gonadal tumours and DSD. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2010; 24: 291–310.
63. Lopez-Guerra J.L., Verdugo-Sivianes E.M., Otero-Albiol D., Vieites B., Ortiz-Gordillo M.J., De León J.M., Praena-Fernandez J.M., Marin J.J., Carnero A.: High casein kinase 1 epsilon levels are correlated with better prognosis in subsets of patients with breast cancer. *Oncotarget.* 2015; 6(30):30343-56.
64. Lum L., Beachy P.A.: The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers. *Science.* 2004; 304: 1755–1759.
65. Lutke Holzik M.F., Rapley E.A., Hoekstra H.J., Sleijfer D., Nolte I.M., Sijmons R.H.: Genetic predisposition to testicular germ-cell tumours. *Lancet Oncol.* 2004; 5(6): 363–371
66. Malogolowkin M.H., Monforte H.L., Kovanlikaya A., Siegel S.E.: Pediatric germ cell tumors. W: *Germ Cell Tumors.* Raghavan D (Ed.). BC Decker, Londyn, Wielka Brytania. 2003; 265–286.
67. Mann R.K., Beachy P.A.: Novel lipid modifications of secreted protein signals. *Annu Rev Biochem.* 2004; 73: 891–923.
68. Manzo G.: Similarities Between Embryo Development and Cancer Process Suggest New Strategies for Research and Therapy of Tumors: A New Point of View. *Front Cell Dev Biol.* 2019; 7:20.
69. Martinelli D.C., Fan C.M.: The role of Gas1 in embryonic development and its implications for human disease. *Cell Cycle.* 2007; 6(21): 2650–2655.
70. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F.: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
71. Montironi R., Cheng L., Scarpelli M., Lopez-Beltran A.: Pathology and Genetics: Tumours of the Urinary System and Male Genital System. *European Urology.* 2016; (1):70: 120-123
72. Morrissy A.S., Cavalli F.M.G., Remke M., Ramaswamy V., Shih D.J.H., Holgado B.L., Farooq H., Donovan L.K., Garzia L., Agnihotri S., et al.: Spatial heterogeneity in medulloblastoma. *Nat Genet.* 2017 May;49(5):780-788.
73. Murray M.J., Nicholson J.C.: Germ cell tumours in children and adolescents. *Paediatr. Child Health.* 2009; 20(3): 109-116
74. Mutter G.L., Prat J.: Pathology of the female reproductive tract. Edinburg: *Churchill Livingstone Elsevier*, 2014.

75. Ng P.C., Henikoff S.: SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31(13): 3812–3814.
76. Niewiadomski P., Niedziółka S.M., Markiewicz Ł., Uśpieński T., Baran B., Chojnowska K.: Gli Proteins: Regulation in Development and Cancer. *Cells.* 2019; 8(2):147.
77. Niyaz M., Khan M.S., Mudassar S.: Hedgehog Signaling: An Achilles' Heel in Cancer. *Transl Oncol.* 2019; 12(10):1334-1344.
78. Noor A., Whibley A., Marshall C.R., Gianakopoulos P.J., Piton A., Carson A.R., Orlic-Milacic M., Lionel A.C., Sato D., Pinto D., Drmic I., et al.: Disruption at the PTCHD1 Locus on Xp22.11 in Autism spectrum disorder and intellectual disability. *Sci Transl Med.* 2010; 2(49):49ra68.
79. Nusslein-Volhard C., Weischaus E.F.: Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature.* 1980; 287: 795–801.
80. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD), Available online: <https://omim.org/> (accessed on 20.05.2019)
81. Oosterhuis J.W., Looijenga L.H.: Germ Cell Tumors from a Developmental Perspective: Cells of Origin, Pathogenesis, and Molecular Biology (Emerging Patterns). W: Nogales F., Jimenez R. (Eds) Pathology and Biology of Human Germ Cell Tumors. 2017: 23-129. Springer, Berlin, Heidelberg.
82. Quang D., Chen Y., Xie X. DANN: a deep learning approach for annotating the pathogenicity of genetic variants. *Bioinformatics.* 2015; 31(5): 761–763.
83. Palmer R.D., Foster N.A., Vowler S.L., Roberts I., Thornton C.M., Hale J.P., Schneider D.T., Nicholson J.C., Coleman N. Malignant germ cell tumours of childhood: new associations of genomic imbalance. *Br J Cancer.* 2007; 96(4): 667–676.
84. Pandolfi S, Stecca B. Cooperative integration between HEDGEHOG-GLI signalling and other oncogenic pathways: implications for cancer therapy. *Expert Rev Mol Med.* 2015;17:e5.
85. Pedersini R., Vattemi E., Mazzoleni G., Graiff C.: Complete response after treatment with imatinib in pretreated disseminated testicular seminoma with overexpression of c-KIT. *Lancet Oncol.* 2007 Nov; 8(11): 1039–1040.
86. Pietrobono S., Gagliardi S., Stecca B.: Non-canonical Hedgehog Signaling Pathway in Cancer: Activation of GLI Transcription Factors Beyond Smoothed. *Front Genet.* 2019; 10:556.
87. Penn A., Jenney M.E.M., Nicholson J.C.: Germ cell tumours in children and adolescents. *Paediatr. Child Health.* 2014; 28(4): 169-176
88. Petrova R., Joyner A.L.: Roles for Hedgehog signaling in adult organ homeostasis and repair. *Development.* 2014; 141: 3445-57.
89. Phi J.H., Wang K.C., Kim S.K.: Intracranial Germ Cell Tumor in the Molecular Era. *J Korean Neurosurg Soc.* 2018; 61: 333-342.
90. Pierce J.L., Frazier A.L., Amatruda J.F.: Pediatric Germ Cell Tumors: A Developmental Perspective. *Adv Urol.* 2018; 9059382.
91. Porter J.A., Young K.E., Beachy P.A.: Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science.* 1996; 274: 255–259.
92. Pricl S., Cortelazzi B., Dal Col V., Marson D., Laurini E., Fermeglia M., Licitra L., Pilotti S., Bossi P., Perrone F.: Smoothed (SMO) receptor mutations dictate resistance to vismodegib in basal cell carcinoma. *Mol Oncol.* 2015; 9(2):389-97.
93. Rash B.G, Grove E.A.: Shh and Gli3 regulate formation of the telencephalic-diencephalic junction and suppress an isthmus-like signaling source in the forebrain. *Dev Biol.* 2011; 359:242-50.
94. Rescorla F.J.: Pediatric germ cell tumors. *Semin Pediatr Surg.* 2012; 21(1): 51–60.
95. Resh M.D.: Covalent lipid modifications of proteins. *Curr Biol.* 2013; 23: R431-5.
96. Renault A.D., Ricardo S., Kunwar P.S., Santos A., Starz-Gaiano M., Stein J.A., Lehmann R.: Hedgehog does not guide migrating *Drosophila* germ cells. *Developmental biology.* 2009; 328: 355-62.

97. Rentzsch P., Witten D., Cooper G.M., Shendure J., Kircher M.: CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47(D1):D886-D894.
98. Richards S., Aziz N., Bale S., Bick D., Das S., Gastier-Foster J., Grody W.W., Hegde M., Lyon E., Spector E., Voelkerding K., Rehm H.L.: ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015; 17(5): 405-24.
99. Richardson B.E., Lehmann R.: Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010; 11(1): 37-49.
100. Rickert C.H., Simon R., Bergmann M., Dockhorn-Dworniczak B., Paulus W.: Comparative genomic hybridization in pineal germ cell tumors. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2000; 59: 815–821.
101. Rimkus T.K., Carpenter R.L., Qasem S., Chan M., Lo H.W.: Targeting the Sonic Hedgehog Signaling Pathway: Review of Smoothed and GLI Inhibitors. *Cancers (Basel).* 2016; 8: 22.
102. Robbins D.J., Fei D.L., Riobo N.A.: The Hedgehog signal transduction network. *Sci Signal.* 2012; 5: re6.
103. Robinson J.T., Thorvaldsdóttir H., Wenger A.M., Zehir A., Mesirov J.P. Variant Review with the Integrative Genomics Viewer. *Cancer research*, 2017; 77(21): e31–e34.
104. Sánchez-Muñoz A., Jiménez-Rodríguez B., Navarro-Pérez V., Medina-Rodríguez L., Llácer C., Vicioso L., Machuca J., Alba E.: Targeted therapies in the treatment of germ cell tumors: the need for new approaches against "orphan" tumors. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2012; 83(3):444-51
105. Sari IN, Phi LTH, Jun N, Wijaya YT, Lee S, Kwon HY. Hedgehog Signaling in Cancer: A Prospective Therapeutic Target for Eradicating Cancer Stem Cells. *Cells.* 2018;7(11):208.
106. Scales S.J., de Sauvage F.J. Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 2009; 30(6): 303–312. doi: 10.1016/j.tips.2009.03.007
107. Scherz, P.J., McGlenn, E., Nissim, S., and Tabin, C.J. (2007). Extended exposure to Sonic hedgehog is required for patterning the posterior digits of the vertebrate limb. *Dev. Biol.* 308, 343–354.
108. Schwarz J.M., Cooper D.N., Schuelke M., Seelow D.: MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods.* 2014; 11(4):361-2.
109. Shen H., Shih J., Hollern D. P., Wang L., Bowlby R., Tickoo S. K., Thorsson V., Mungall A. J., Newton Y., Hegde A. M., Armenia J., Sánchez-Vega F., Pluta J., Pyle L. C., Mehra R., Reuter V. E., Godoy G., Jones J., Shelley C. S., Feldman D. R., Vidal D. O., Lessel D., Kulis T., Cárcano F. M., Leraas K. M., Lichtenberg T. M., Brooks D., Chorniack A. D., Cho J., Heiman D. I., Kasaian K., Liu M., Noble M. S., Xi L., Zhang H., Zhou W., Zenklusen J. C., Hutter C. M., Felau I., Zhang J., Schultz N., Getz G., Meyerson M., Stuart J. M., Cancer Genome Atlas Research Network, Akbani R., Wheeler D. A., Laird P. W., Nathanson K. L., Cortessis V. K., Hoadley K. A.: Integrated Molecular Characterization of Testicular Germ Cell Tumors. *Cell reports.* 2018; 23: 3392-3406.
110. Shen X., Peng Y., Li H.: The Injury-Related Activation of Hedgehog Signaling Pathway Modulates the Repair-Associated Inflammation in Liver Fibrosis. *Front Immunol.* 2017; 8: 1450.
111. Schneider D.T., Zahn S., Sievers S., Alemazkour K., Reifenberger G., Wiestler O.D., Calaminus G., Göbel U., Perlman E.J.: Molecular genetic analysis of central nervous system germ cell tumors with comparative genomic hybridization. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* 2006; 19(6): 864–873.
112. Schulte S.L., Waha A., Steiger B., Denkhau D., Dörner E., Calaminus G., Leuschner I., Pietsch T.: CNS germinomas are characterized by global demethylation, chromosomal instability and mutational activation of the Kit-, Ras/Raf/Erk- and Akt-pathways. *Oncotarget.* 2016; 7(34): 55026–55042.
113. Sherry S.T., Ward M.H., Kholodov M., Baker J., Phan L., Smigielski E.M., Sirotkin K. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(1):308-11.
114. Sinnberg T., Menzel M., Kaesler S., Biedermann T., Sauer B., Nahnsen S. et al.: Suppression of casein kinase 1alpha in melanoma cells induces a switch in beta-catenin signaling to promote metastasis. *Cancer Res.* 2010;70:6999–7009

115. Skoda AM, Simovic D, Karin V, Kardum V, Vranic S, Serman L. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. *Bosn J Basic Med Sci.* 2018;18(1):8-20.
116. Sobolewska-Sztychny D., Lesiak A.: Charakterystyka raków podstawnokomórkowych skóry oraz związek ich rozwoju ze szlakiem transdukcji sygnału wewnątrzkomórkowego sonic Hedgehog. *Forum Dermatologicum* 2015; 1(1): 1-5.
117. Soung Y.H., Lee J.W., Kim S.Y., Wang Y.P., Jo K.H., Moon S.W., Park W.S., Nam S.W., Lee J.Y., Yoo N.J., Lee S.H.: Somatic mutations of the ERBB4 kinase domain in human cancers. *Int J Cancer.* 2006; 118(6): 1426–1429
118. Stewart DP, Marada S, Bodeen WJ, Truong A, Sakurada SM, Pandit T, Pruett-Miller SM, Ogden SK. Cleavage activates dispatched for Sonic Hedgehog ligand release. *Elife.* 2018; 7: e31678.
119. Tang C.M., Lee T.E., Syed S.A., Burgoyne A.M., Leonard S.Y., Gao F., Chan J.C., Shi E., Chmielecki J., Morosini D., Wang K., Ross J.S., Kendrick M.L., Bardsley M.R., Siena M., Mao J., Harismendy O., Ordog T., Sicklick J.K.. Hedgehog pathway dysregulation contributes to the pathogenesis of human gastrointestinal stromal tumors via GLI-mediated activation of KIT expression. *Oncotarget.* 2016; 7(48):78226-78241.
120. Tate J.G., Bamford S., Jubb H.C., Sondka Z., Beare D.M., Bindal N., Boutselakis H., Cole C.G., Creatore C., Dawson E., Fish P., Harsha B., Hathaway C., Jupe S.C., Kok C.Y., Noble K., Ponting L., Ramshaw C.C., Rye C.E., Speedy H.E., Stefancsik R., Thompson S.L., Wang S., Ward S., Campbell P.J., Forbes S.A.: COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jan 8; 47(Database issue): D941–D947
121. Taylor-Weiner A., Zack T., O'Donnell E., Guerriero J.L., Bernard B., Reddy A., Han G.C., AIDubayan S., Amin-Mansour A., Schumacher S.E., Litchfield K., Turnbull C., Gabriel S., Beroukhim R., Getz G., Carter S.L., Hirsch M.S., Letai A., Sweeney C., Van Allen E.M.: Genomic evolution and chemoresistance in germ-cell tumours. *Nature*, 2016; 540(7631): 114-118.
122. Terashima K., Yu A., Chow W., Hsu W.C., Chen P., Wong S., Hung Y.S., Suzuki T., Nishikawa R., Matsutani M., Nakamura H., Ng H.K., Allen J.C., Aldape K.D., Su J.M., Adesina A.M., Leung H.C., Man T.K., Lau C.C.: Genome-wide analysis of DNA copy number alterations and loss of heterozygosity in intracranial germ cell tumors. *Pediatr Blood Cancer.* 2014; 61: 593-600.
123. Thomas S., Quinn B.A., Das S.K., Dash R., Emdad L., Dasgupta S., Wang X.Y., Dent P., Reed J.C., Pellicchia M., Sarkar D., Fisher P.B.: Targeting the Bcl-2 family for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets.* 2013; 17(1):61-75.
124. The AACR Project GENIE Consortium. AACR Project GENIE: powering precision medicine through an international consortium. *Cancer Discovery.* 2017; 7(8): 818-831. Dataset Version 5.
125. The UniProt Consortium.: UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47: D506-515
126. Trama A., Berrino F. (2017) The Epidemiology of Malignant Germ Cell Tumors: The EURO CARE Study. W: Nogales F., Jimenez R. (Eds) Pathology and Biology of Human Germ Cell Tumors. 2017; 11-21. Springer, Berlin, Heidelberg.
127. Tukachinsky H., Kuzmickas R.P., Jao C.Y., Liu J., Salic A.: Dispatched and Scube mediate the efficient secretion of the cholesterol-modified hedgehog ligand. *Cell Rep.* 2012; 2(2): 308-20.
128. Uhlén M., Fagerberg L., Hallström B.M., Lindskog C., Oksvold P., Mardinoglu A., Sivertsson A., Kampf C., Sjöstedt E., Asplund A, et al.: Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science.* 2015; 347(6220): 1260419.
129. Varjosalo M., Taipale J.: Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev.* 2008; 22: 2454–2472.
130. Van Nieuwenhuysen E., Busschaert P., Neven P., Han S.N., Moerman P., Lontos M., Paspaspirou M., Kupryjanczyk J., Hogdall C., Hogdall E., Oaknin A., Garcia A., Mahner S., Trillsch F., Cibula D., Heitz F., Concin N., Speiser P., Salvesen H., Sehouli J., Lambrechts D., Vergote I.: The genetic landscape of 87 ovarian germ cell tumors. *Gynecol Oncol.* 2018; 151(1):61-68.
131. Vizcaine M.A., Rodriguez F.J.: Central nervous system germ cell tumors. W: Nogales F., Jimenez R. (Eds) Pathology and Biology of Human Germ Cell Tumors. 2017: 23-129. Springer, Berlin, Heidelberg.

132. Wang H.W., Wu Y.H., Hsieh J.Y., Liang M.L., Chao M.E., Liu D.J., Hsu M.T., Wong T.T.: Pediatric primary central nervous system germ cell tumors of different prognosis groups show characteristic miRNome traits and chromosome copy number variations. *BMC Genomics*. 2010; 11:132.
133. Wang L., Yamaguchi S., Burstein M.D., Terashima K., Chang K., Ng H.K., Nakamura H., He Z., Doddapaneni H., Lewis L., Wang M., Suzuki T., Nishikawa R., Natsume A., Terasaka S., Dauser R., Whitehead W., Adekunle A., Sun J., Qiao Y., Marth G., Muzny D.M., Gibbs R.A., Leal S.M., Wheeler D.A., Lau C.C.: Novel somatic and germline mutations in intracranial germ cell tumours. *Nature*, 2014; 511: 241-5.
134. Williamson S.R, Delahunt B., Magi-Galluzzi C., Algaba F., Egevad L., Ulbright T.M., Tickoo S.K., Srigley J.R., Epstein J.I., Berney D.M.; Members of the ISUP Testicular Tumour Panel.: The World Health Organization 2016 classification of testicular germ cell tumours: a review and update from the International Society of Urological Pathology Testis Consultation Panel. *Histopathology*. 2017; 70(3): 335-346.
135. Windley S.P., Wilhelm D.: Signaling Pathways Involved in Mammalian Sex Determination and Gonad Development. *Sex Dev*. 2015; 9: 297–315.
136. Xavier G.M., Seppala M., Barrell W., Birjandi A.A., Geoghegan F., Cobourne M.T.: Hedgehog receptor function during craniofacial development. *Dev Biol*. 2016; 415(2): 198–215.
137. Xie H., Paradise B.D., Ma W.W., Fernandez-Zapico M.E.: Recent Advances in the Clinical Targeting of Hedgehog/GLI Signaling in Cancer. *Cells*. 2019;8(5).
138. Zambrano E., Vargas De Stefano D., Reyes-Múgica M.: Pediatric Germ Cell Tumors. W: Nogales F., Jimenez R. (Eds) Pathology and Biology of Human Germ Cell Tumors. 2017; 381-395. Springer, Berlin, Heidelberg.
139. Zíková M., Koníová J., Ditrychová K., Corlett A., Kolá M., Bartůněk P.: DISP3 promotes proliferation and delays differentiation of neural progenitor cells. *FEBS Lett*. 2014; 588(21): 4071–4077.

10. ZAŁĄCZNIKI

10.1. Najważniejsze geny kodujące białka szlaku Hh oraz zespoły genetyczne związane z ich mutacjami germinalnymi [OMIM, NCBI, UniProt, GHR].

Gen	Lokalizacja	MIM *	Funkcja	Powiązana jednostka chorobowa	MIM #
<i>BOC</i>	3q13.2	608708	receptor	-	-
<i>CDON</i>	11q24.2	608707	receptor	Holoprosencefalia typ 11	614226
<i>DHH</i>	12q13.12	605423	ligand	Częściowa dysgeneza gonad z neuropatią	607080
				46,XY odwrócenie płci typ 7	233420
<i>GLI1</i>	12q13.3	165220	czynnik transkrypcyjny efektor	Glioblastoma	-
<i>GLI2</i>	2q14.2	165230	czynnik transkrypcyjny efektor	Zespół Culler-Jones'a	615849
				Holoprosencefalia typ 9	
<i>GLI3</i>	7p14.1	165240	czynnik transkrypcyjny efektor	Zespół Greiga	175700
				Zespół Pallistera-Halla	146510
				polidaktylia A1, B, IV	174200, 174700
<i>GPC3</i>	Xq26.2	300037	regulator	Zespół Simpsona-Golabi-Behmela typ 1	312870
<i>HHIP</i>	4q31.21	606178	regulator	-	-
<i>IHH</i>	2q35	600726		Brachydaktylia A1	112500
				Dysplazja kończyn i głowy kości udowej	607778
<i>PTCH1</i>	9q22.32	601309	receptor	Zespół Gorlina-Goltza (Zespół znamion podstawnokomórkowych)	109400
				Holoprosencefalia	610828
<i>SHH</i>	7q36.3	600725	ligand	Holoprosencefalia typ 3	142945

				Małocze z rozszczepem tęczy	611638
				Schizencefalia	-
<i>SMO</i>	7q32.1	601500	receptor	Zespół Curry-Jones'a	601707
<i>SUFU</i>	10q24.32	607035	regulator	Zespół Gorlina-Goltza (Zespół znamion podstawnocomórkowych)	109400
				Rdzeniak zarodkowy	155255
				Oponiak	607174
<i>RAB23</i>	6p12.1-11.2	606144	regulator	Zespół Carpentera	201000

10.2. Szczegółowa lista genów badanych techniką qPCR

Pozycja	Symbol genu	Opis	Chromosom
A01	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	18
A02	BMP2	Bone morphogenetic protein 2	20p12.3
A03	BMP4	Bone morphogenetic protein 4	14q22.2
A04	BMP5	Bone morphogenetic protein 5	6p12.1
A05	BMP6	Bone morphogenetic protein 6	6p24.3
A06	BMP7	Bone morphogenetic protein 7	20q13.31
A07	BMP8B	Bone morphogenetic protein 8b	1p34.2
A08	BOC	Boc homolog (mouse)	3q13.2
A09	BTRC	Beta-transducin repeat containing	10q24.32
A10	CDON	Cdon homolog (mouse)	11q24.2
A11	CSNK1A1	Casein kinase 1, alpha 1	5q32
A12	CSNK1E	Casein kinase 1, epsilon	22q13.1
B01	CTNNB1	Catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa	3p22.1
B02	DHH	Desert hedgehog	12q13.12
B03	DISP1	Dispatched homolog 1 (Drosophila)	1q41
B04	DISP2	Dispatched homolog 2 (Drosophila)	15q15.1
B05	ERBB4	V-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (avian)	2q34
B06	FAT4	FAT tumor suppressor homolog 4 (Drosophila)	4q28.1
B07	FBXW11	F-box and WD repeat domain containing 11	5q35.1
B08	FGF9	Fibroblast growth factor 9 (glia-activating factor)	13q12.11
B09	FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3	4p16.3
B10	FKBP8	FK506 binding protein 8, 38kDa	19p13.11
B11	FOXE1	Forkhead box E1 (thyroid transcription factor 2)	9q22.33
B12	FRMD6	FERM domain containing 6	14q22.1
C01	GAS1	Growth arrest-specific 1	9q21.33
C02	GLI1	GLI family zinc finger 1	12q13.3
C03	GLI2	GLI family zinc finger 2	2q14.2
C04	GLI3	GLI family zinc finger 3	7p14.1
C05	GREM1	Gremlin 1	15q13.3
C06	GSK3B	Glycogen synthase kinase 3 beta	3q13.3
C07	HHAT	Hedgehog acyltransferase	1q32.2
C08	HHIP	Hedgehog interacting protein	4q31.21
C09	IFT52	Intraflagellar transport 52 homolog (Chlamydomonas)	20q13.12
C10	IHH	Indian hedgehog	2q35
C11	KCTD11	Potassium channel tetramerisation domain containing 11	17p13.1
C12	LATS1	LATS, large tumor suppressor, homolog 1 (Drosophila)	6q25.1
D01	LATS2	LATS, large tumor suppressor, homolog 2 (Drosophila)	13q12.11

D02	LRP2	Low density lipoprotein receptor-related protein 2	2q31.1
D03	MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1	22q11.22
D04	MOBK1A	MOB1, Mps One Binder kinase activator-like 1A (yeast)	4q13.3
D05	MTSS1	Metastasis suppressor 1	8q24.13
D06	NF2	Neurofibromin 2 (merlin)	22q12.2
D07	NPC1	Niemann-Pick disease, type C1	18q11.2
D08	NUMB	Numb homolog (Drosophila)	14
D09	OTX2	Orthodenticle homeobox 2	14q22.3
D10	PRKACA	Protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha	19p13.12
D11	PRKACB	Protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, beta	1p31.1
D12	PTCH1	Patched 1	9q22.32
E01	PTCH2	Patched 2	1p34.1
E02	PTCHD1	Patched domain containing 1	Xp22.11
E03	PTCHD2	Patched domain containing 2	1p36.22
E04	PTCHD3	Patched domain containing 3	10p12.1
E05	RAB23	RAB23, member RAS oncogene family	1p36.22
E06	RUNX2	Runt-related transcription factor 2	6p21.1
E07	SFRP1	Secreted frizzled-related protein 1	8p11.21
E08	SHH	Sonic hedgehog	7q36.3
E09	SMO	Smoothed, frizzled family receptor	7q32.1
E10	STK3	Serine/threonine kinase 3	8q22.2
E11	STK36	Serine/threonine kinase 36	2q35
E12	SUFU	Suppressor of fused homolog (Drosophila)	10q24.32
F01	TP53	Tumor protein p53	17p13.1
F02	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	6p21.1
F03	WIF1	WNT inhibitory factor 1	12q14.3
F04	WNT1	Wingless-type MMTV integration site family, member 1	12q13.12
F05	WNT10A	Wingless-type MMTV integration site family, member 10A	2q35
F06	WNT10B	Wingless-type MMTV integration site family, member 10B	12q13.12
F07	WNT11	Wingless-type MMTV integration site family, member 11	11q13.5
F08	WNT16	Wingless-type MMTV integration site family, member 16	7q31.31
F09	WNT2	Wingless-type MMTV integration site family member 2	7q31.2
F10	WNT2B	Wingless-type MMTV integration site family, member 2B	1p13.2
F11	WNT3	Wingless-type MMTV integration site family, member 3	17
F12	WNT3A	Wingless-type MMTV integration site family, member 3A	1q42.13
G01	WNT4	Wingless-type MMTV integration site family, member 4	1p36.12
G02	WNT5A	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A	3p14.3
G03	WNT5B	Wingless-type MMTV integration site family, member 5B	12p13.33
G04	WNT6	Wingless-type MMTV integration site family, member 6	2q35

G05	WNT7A	Wingless-type MMTV integration site family, member 7A	3p25.1
G06	WNT7B	Wingless-type MMTV integration site family, member 7B	22q13.31
G07	WNT8A	Wingless-type MMTV integration site family, member 8A	5q31.2
G08	WNT8B	Wingless-type MMTV integration site family, member 8B	10q24.31
G09	WNT9A	Wingless-type MMTV integration site family, member 9A	1q42.13
G10	WNT9B	Wingless-type MMTV integration site family, member 9B	17q21.32
G11	ZIC1	Zic family member 1	3q24
G12	ZIC2	Zic family member 2	13q32.2
H01	ACTB	Actin, beta	-
H02	B2M	Beta-2-microglobulin	-
H03	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-
H04	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	-
H05	RPLP0	Ribosomal protein, large, P0	-
H06	HGDC	Human Genomic DNA Contamination	-
H07	RTC	Reverse Transcription Control	-
H08	RTC	Reverse Transcription Control	-
H09	RTC	Reverse Transcription Control	-
H10	PPC	Positive PCR Control	-
H11	PPC	Positive PCR Control	-
H12	PPC	Positive PCR Control	-

10.3. Szczegółowa analiza profili ekspresji genów w grupach badanych

Analiza w odniesieniu do profilu ekspresji kontroli negatywnej

Podtyp histologiczny: *Teratoma maturum*

Geny o zwiększonej ekspresji					Geny o obniżonej ekspresji				
Pozycja	Nazwa Genu	Krotność	Wartość p	Adnotacja	Pozycja	Nazwa Genu	Krotność	Wartość p	Adnotacja
B05	<i>ERBB4</i>	30,96	0,015857	-	A01	<i>BCL2</i>	-5,05	0,000309	A
B08	<i>FGF9</i>	13,10	0,034237	-	D11	<i>PRKACB</i>	-5,87	0,000008	A
G12	<i>ZIC2</i>	13,31	0,36717	-					

Podtyp histologiczny: *Teratoma immaturum*

Geny o zwiększonej ekspresji					Geny o obniżonej ekspresji				
Pozycja	Nazwa Genu	Krotność	Wartość p	Adnotacja	Pozycja	Nazwa Genu	Krotność	Wartość p	Adnotacja
A03	<i>BMP4</i>	4.10	0.017121	-	Brak genów o obniżonej ekspresji				
A05	<i>BMP5</i>	29.77	0.019574	-					
A06	<i>BMP7</i>	55.72	0.003282	-					
A08	<i>BOC</i>	6.03	0.007637	-					
B04	<i>DISP2</i>	9.38	0.020929	-					
B05	<i>ERBB4</i>	28.82	0.039098	-					
B08	<i>FGF9</i>	22.46	0.013624	-					
B09	<i>FGFR3</i>	21.81	0.001130	A					
B11	<i>FOXE1</i>	8.43	0.018879	-					

C01	<i>GAS1</i>	4.77	0.034852	-
C08	<i>HHIP</i>	10.58	0.006356	-
D02	<i>LRP2</i>	13.15	0.030706	-
D09	<i>OTX2</i>	10.67	0.026125	-
E02	<i>PTCHD1</i>	12.37	0.022763	-
E05	<i>RAB23</i>	8.62	0.016014	-
E07	<i>SFRP1</i>	9.36	0.022482	A
E09	<i>SMO</i>	7.18	0.004571	-

Podtyp histologiczny: *guzy mieszane*

Geny o zwiększonej ekspresji					Geny o obniżonej ekspresji				
Pozycja	Nazwa Genu	Krotność	Wartość p	Adnotacja	Pozycja	Nazwa Genu	Krotność	Wartość p	Adnotacja
B09	<i>FGFR3</i>	28.57	0.008654	A	A01	<i>BCL2</i>	-10.83	0.000000	A
C02	<i>GLI1</i>	4.17	0.015119	-	B07	<i>FBXW11</i>	-6.98	0.000001	A
E02	<i>PTCHD1</i>	8.43	0.015479	-	C05	<i>GREM1</i>	-4.82	0.015992	A
					C06	<i>GSK3B</i>	-4.72	0.000015	A
					D11	<i>PRKACB</i>	-16.20	0.000000	A

Podtyp histologiczny: *yolk sac tumor*

Geny o zwiększonej ekspresji					Geny o obniżonej ekspresji				
Pozycja	Nazwa Genu	Krotność	Wartość p	Adnotacja	Pozycja	Nazwa Genu	Krotność	Wartość p	Adnotacja
B05	<i>ERBB4</i>	272.48	0.000014	A	A01	<i>BCL2</i>	-10.71	0.000000	A

C08	<i>HHIP</i>	4.85	0.017014		B07	<i>FBXW11</i>	-4.63	0.000000	A
C10	<i>IHH</i>	16.54	0.011224		C05	<i>GREM1</i>	-7.44	0.000007	A
D02	<i>LRP2</i>	45.86	0.030959		D11	<i>PRKACB</i>	-13.42	0.000000	A
D09	<i>OTX2</i>	15.12	0.003962		E06	<i>RUNX2</i>	-5.39	0.000045	
E05	<i>RAB23</i>	4.28	0.003694						
E07	<i>SFRP1</i>	15.92	0.004470	A					
E09	<i>SMO</i>	5.14	0.020315						
G11	<i>ZIC1</i>	6.70	0.014837						

Podtyp histologiczny: *dysgerminoma*

Geny o zwiększonej ekspresji					Geny o obniżonej ekspresji				
Pozycja	Nazwa Genu	Krotność	Wartość p	Adnotacja	Pozycja	Nazwa Genu	Krotność	Wartość p	Adnotacja
A06	<i>BMP7</i>	19.97	0.019979	-	A01	<i>BCL2</i>	-11.12	0.000000	A
A09	<i>BTRC</i>	4.68	0.007085	-	C05	<i>GREM1</i>	-13.45	0.000000	A
A12	<i>CSNK1E</i>	5.35	0.000174	-	D11	<i>PRKACB</i>	-8.30	0.000000	A
B04	<i>DISP2</i>	6.75	0.027061	-	E06	<i>RUNX2</i>	-5.40	0.000002	-
B08	<i>FGF9</i>	8.60	0.022282	-					
B09	<i>FGFR3</i>	112.73	0.001868	A					
B12	<i>FRMD6</i>	6.12	0.019674	A					
C02	<i>GLI1</i>	4.54	0.004357	-					
D04	<i>MOB1B</i>	4.31	0.039525	-					
E01	<i>PTCH2</i>	5.83	0.000004	A					

E02	<i>PTCHD1</i>	21.26	0.000014	-
E09	<i>SMO</i>	5.56	0.010783	A
F09	<i>WNT2</i>	5.39	0.027753	-
F10	<i>WNT2B</i>	7.50	0.026316	A
F11	<i>WNT3</i>	29.93	0.015325	-
G09	<i>WNT9A</i>	6.00	0.019247	-

Podtyp histologiczny: *carcinoma embryonale*

Geny o zwiększonej ekspresji					Geny o obniżonej ekspresji				
Pozycja	Nazwa Genu	Krotność	Wartość p	Adnotacja	Pozycja	Nazwa Genu	Krotność	Wartość p	Adnotacja
B05	<i>ERBB4</i>	8.40	0.039771	-	A01	<i>BCL2</i>	-12.96	0.000000	A
E02	<i>PTCHD1</i>	8.00	0.009156	-	B07	<i>FBXW11</i>	-8.63	0.000000	A
F11	<i>WNT3</i>	6.32	0.042602	-	B10	<i>FKBP8</i>	-5.25	0.000000	A
G03	<i>WNT5B</i>	4.59	0.038599	-	C05	<i>GREM1</i>	-7.75	0.000001	A
					C06	<i>GSK3B</i>	-5.93	0.000000	A
					D05	<i>MTSS1</i>	-4.01	0.000049	
					D11	<i>PRKACB</i>	-14.48	0.000000	A
					E06	<i>RUNX2</i>	-4.39	0.000004	-

Analiza w odniesieniu do profilu ekspresji kontroli pozytywnej

Podtyp histologiczny: *Teratoma maturum*

Geny o zwiększonej ekspresji					Geny o obniżonej ekspresji				
Pozycja	Nazwa Genu	Krotność	Wartość p	Adnotacja	Pozycja	Nazwa Genu	Krotność	Wartość p	Adnotacja
Brak genów o obniżonej ekspresji					A12	<i>CSNK1E</i>	-11.26	0.000003	
					B04	<i>DISP2</i>	-42.03	0.000000	A
					B05	<i>ERBB4</i>	-6.58	0.000000	A
					B08	<i>FGF9</i>	-7.59	0.000000	A
					C08	<i>HHIP</i>	-7.82	0.012020	A
					D04	<i>MOB1B</i>	-4.65	0.002793	
					D05	<i>MTSS1</i>	-6.31	0.042903	A
					D11	<i>PRKACB</i>	-6.92	0.000001	A
					E01	<i>PTCH2</i>	-6.79	0.000000	A
					G11	<i>ZIC1</i>	-34.90	0.000000	A
					G12	<i>ZIC2</i>	-51.00	0.000000	A

Podtyp histologiczny: *Teratoma immaturum*

Geny o zwiększonej ekspresji					Geny o obniżonej ekspresji				
Pozycja	Nazwa Genu	Krotność	Wartość p	Adnotacja	Pozycja	Nazwa Genu	Krotność	Wartość p	Adnotacja
A03	<i>BMP4</i>	12.36	0.006739		A12	<i>CSNK1E</i>	-5.71	0.000000	
A06	<i>BMP7</i>	5.87	0.008118		B04	<i>DISP2</i>	-16.08	0.000000	A
B09	<i>FGFR3</i>	24.88	0.001084	A	B05	<i>ERBB4</i>	-7.07	0.000000	A

B11	<i>FOXE1</i>	6.83	0.021342		B08	<i>FGF9</i>	-4.43	0.000002	A
C11	<i>KCTD11</i>	4.13	0.004656		D05	<i>MTSS1</i>	-6.18	0.000000	A
E06	<i>RUNX2</i>	10.02	0.005936		E01	<i>PTCH2</i>	-7.34	0.000000	A
F02	<i>VEGFA</i>	4.35	0.034256		E03	<i>PTCHD2</i>	-5.27	0.000756	
					G11	<i>ZIC1</i>	-10.87	0.000000	A
					G12	<i>ZIC2</i>	-19.48	0.000000	A

Podtyp histologiczny: guzy mieszane

Geny o zwiększonej ekspresji					Geny o obniżonej ekspresji				
Pozycja	Nazwa Genu	Krotność	Wartość p	Adnotacja	Pozycja	Nazwa Genu	Krotność	Wartość p	Adnotacja
B09	<i>FGFR3</i>	32.60	0.008470	A	A01	<i>BCL2</i>	-5.89	0.000006	A
E06	<i>RUNX2</i>	5.45	0.016516		A04	<i>BMP5</i>	-11.74	0.000021	A
					A08	<i>BOC</i>	-6.22	0.000023	
					A12	<i>CSNK1E</i>	-11.64	0.000000	A
					B04	<i>DISP2</i>	-28.71	0.000000	A
					B07	<i>FBXW11</i>	-4.53	0.000288	
					B08	<i>FGF9</i>	-40.15	0.000000	A
					C06	<i>GSK3B</i>	-6.61	0.000002	A
					C08	<i>HHIP</i>	-8.75	0.000000	A
					C09	<i>IFT52</i>	-4.15	0.003438	A
					D04	<i>MOB1B</i>	-6.57	0.000003	A
					D05	<i>MTSS1</i>	-10.57	0.000000	A

D11	<i>PRKACB</i>	-19.09	0.000000	A
E01	<i>PTCH2</i>	-7.91	0.000000	A
E03	<i>PTCHD2</i>	-7.79	0.000012	
E11	<i>STK36</i>	-6.12	0.000000	A

Podtyp histologiczny: *yolk sac tumor*

Geny o zwiększonej ekspresji					Geny o obniżonej ekspresji				
Pozycja	Nazwa Genu	Krotność	Wartość p	Adnotacja	Pozycja	Nazwa Genu	Krotność	Wartość p	Adnotacja
A03	<i>BMP4</i>	7.21	0.040996		A01	<i>BCL2</i>	-5.82	0.000000	A
C10	<i>IHH</i>	12.71	0.012369		A04	<i>BMP5</i>	-8.74	0.000003	A
D02	<i>LRP2</i>	17.22	0.035752		A08	<i>BOC</i>	-6.65	0.000005	
F07	<i>WNT11</i>	5.63	0.009299		A12	<i>CSNK1E</i>	-8.06	0.000000	
					B04	<i>DISP2</i>	-57.28	0.000000	A
					B08	<i>FGF9</i>	-30.71	0.000000	A
					C08	<i>HHIP</i>	-7.65	0.000000	A
					D05	<i>MTSS1</i>	-8.51	0.000000	A
					D11	<i>PRKACB</i>	-15.82	0.000000	A
					E01	<i>PTCH2</i>	-6.12	0.000000	A
					E02	<i>PTCHD1</i>	-9.54	0.000155	
					E03	<i>PTCHD2</i>	-9.47	0.000002	
					G11	<i>ZIC1</i>	-89.68	0.000000	A
					G12	<i>ZIC2</i>	-18.51	0.000000	A

Podtyp histologiczny: *dysgerminoma*

Geny o zwiększonej ekspresji					Geny o obniżonej ekspresji				
Pozycja	Nazwa Genu	Krotność	Wartość p	Adnotacja	Pozycja	Nazwa Genu	Krotność	Wartość p	Adnotacja
B09	<i>FGFR3</i>	128.59	0.001855	A	A01	<i>BCL2</i>	-6.04	0.000002	A
B12	<i>FRMD6</i>	5.95	0.020498	A	A04	<i>BMP5</i>	-36.72	0.000000	A
F09	<i>WNT2</i>	4.14	0.035707		A08	<i>BOC</i>	-11.65	0.000005	
F11	<i>WNT3</i>	12.76	0.019873		B04	<i>DISP2</i>	-22.33	0.000000	A
G09	<i>WNT9A</i>	4.61	0.024909		B05	<i>ERBB4</i>	-98.53	0.000000	A
					B08	<i>FGF9</i>	-11.57	0.000000	A
					C08	<i>HHIP</i>	-18.22	0.000000	A
					D05	<i>MTSS1</i>	-5.28	0.000000	A
					D11	<i>PRKACB</i>	-9.78	0.000000	A
					E01	<i>PTCH2</i>	-4.36	0.000000	
					E03	<i>PTCHD2</i>	-13.94	0.000001	
					E07	<i>SFRP1</i>	-40.62	0.000000	A
					G11	<i>ZIC1</i>	-31.07	0.000000	A
					G12	<i>ZIC2</i>	-243.45	0.000000	A

Podtyp histologiczny: *carcinoma embryonale*

Geny o zwiększonej ekspresji					Geny o obniżonej ekspresji				
Pozycja	Nazwa Genu	Krotność	Wartość p	Adnotacja	Pozycja	Nazwa Genu	Krotność	Wartość p	Adnotacja
E06	<i>RUNX2</i>	4.62	0.029328		A01	<i>BCL2</i>	-7.04	0.000000	A
G03	<i>WNT5B</i>	4.23	0.041454		A04	<i>BMP5</i>	-8.34	0.000001	A
					A08	<i>BOC</i>	-7.49	0.000027	
					A09	<i>BTRC</i>	-5.35	0.004203	
					A12	<i>CSNK1E</i>	-27.65	0.000000	A
					B04	<i>DISP2</i>	-43.06	0.000000	A
					B05	<i>ERBB4</i>	-24.24	0.000000	A
					B07	<i>FBXW11</i>	-5.60	0.000001	
					B08	<i>FGF9</i>	-28.08	0.000000	A
					C06	<i>GSK3B</i>	-8.31	0.000000	A
					C08	<i>HHIP</i>	-12.26	0.000000	A
					D04	<i>MOB1B</i>	-9.48	0.000000	A
					D05	<i>MTSS1</i>	-14.22	0.000000	A
					D08	<i>NUMB</i>	-4.76	0.005568	A
					D11	<i>PRKACB</i>	-17.06	0.000000	A
					E01	<i>PTCH2</i>	-15.73	0.000000	A
					E03	<i>PTCHD2</i>	-8.22	0.000011	
					E07	<i>SFRP1</i>	-13.91	0.000000	A
					E09	<i>SMO</i>	-7.41	0.000004	A

E11	<i>STK36</i>	-5.40	0.000001	A
E12	<i>SUFU</i>	-4.25	0.006647	A
F10	<i>WNT2B</i>	-4.91	0.000000	
G11	<i>ZIC1</i>	-143.92	0.000000	A
G12	<i>ZIC2</i>	-148.83	0.000000	A

10.4. Spis Tabel

Nazwa	Tytuł	Strona
Tabela 1.	Wydzielanie markerów biochemicznych przez podtypy GCTs	14
Tabela 2.	Podział histologiczny GCTs	16
Tabela 3.	Rodzaj sygnalizacji Hedgehog w nowotworach	28
Tabela 4.	Charakterystyka kliniczna i histologiczna grupy badanej.	33
Tabela 5.	Wykaz zastosowanej aparatury	35
Tabela 6.	Wykaz odczynników stosowanych w technice aCGH	36
Tabela 7.	Wykaz odczynników stosowanych w technice NGS	36
Tabela 8.	Wykaz odczynników stosowanych w technice qPCR	37
Tabela 9.	Wykaz roztworów stosowanych w procedurze izolacji DNA z mrożonej tkanki nowotworowej	37
Tabela 10.	Skład mieszaniny enzymów restrykcyjnych	42
Tabela 11.	Skład mieszaniny do znakowania fluorescencyjnego	42
Tabela 12.	Skład mieszaniny hybrydizacyjnej	43
Tabela 13.	Panel genów badanych techniką NGS.	45
Tabela 14.	Schemat rozcieńczania DNA	47
Tabela 15.	Skład mieszaniny reakcyjnej – fragmentacja DNA	47
Tabela 16.	Program inkubacji I w termocyklerze	47
Tabela 17.	Skład mieszaniny reakcyjnej – przyłączanie adapterów	47
Tabela 18.	Skład mieszaniny reakcyjnej – wzbogacanie kierunkowe	48
Tabela 19.	Program inkubacji II w termocyklerze	48
Tabela 20.	Skład mieszaniny reakcji PCR	49
Tabela 21.	Program inkubacji III w termocyklerze	49
Tabela 22.	Ustawienia parametrów reakcji sekwencjonowania	50
Tabela 23.	Geny badane przy pomocy techniki qPCR.	53
Tabela 24.	Skład mieszaniny reakcyjnej – eliminacja genomowego DNA	55
Tabela 25.	Skład mieszaniny reakcyjnej – reakcja odwrotnej syntezy	55
Tabela 26.	Skład mieszaniny reakcji preamplifikacji	56
Tabela 27.	Program inkubacji I w termocyklerze	56
Tabela 28.	Skład mieszaniny reakcji PCR w czasie rzeczywistym	57
Tabela 29.	Program reakcji qPCR	57
Tabela 30.	Objaśnienie komentarzy do wyników reakcji qPCR	59
Tabela 31.	Nie zrównoważone aberracje chromosomowe wykryte techniką aCGH w grupie 13 wewnątrzczaszkowych guzów germinalnych.	60
Tabela 32.	Duże rearanżacje genomowe zidentyfikowane w badanej serii guzów.	62
Tabela 33.	Zmiany liczby kopii genów ścieżki sygnałowej WNT.	64
Tabela 34.	Parametry jakości sekwencjonowanych próbek	66
Tabela 35.	Ogół wariantów sekwencyjnych obecnych w guzach germinalnych analizowanych techniką NGS w oparciu o autorski panel genów	68
Tabela 36.	Zmiany sklasyfikowane jako patogenne lub prawdopodobnie patogenne zidentyfikowane w tkance guza.	69
Tabela 37.	Zmiany o nieznanym znaczeniu klinicznym (VUS) zidentyfikowane w tkance guza.	71
Tabela 38.	Zmiany sklasyfikowane jako niepatogenne lub prawdopodobnie niepatogenne zidentyfikowane w tkance guza	73
Tabela 39.	Porównanie średniej arytmetycznej wartości Ct odzwierciedlającej	75

	stopień ekspresji genu referencyjnego <i>HPRT1</i> w badanych podgrupach	
Tabela 40.	Geny o zmienionej ekspresji w kontroli pozytywnej względem kontroli negatywnej (krotność >10)	76
Tabela 41.	Podsumowanie ekspresji badanych genów z uwzględnieniem wyłącznie genów o zmienionej ekspresji w ≥ 3 podtypach histologicznych.	81
Tabela 42.	Podsumowanie ekspresji badanych genów z uwzględnieniem wyłącznie genów o zmienionej ekspresji w ≥ 3 podtypach histologicznych.	85
Tabela 43.	Liczebność przypadków w poszczególnych podgrupach GCTs, w których analizowano profil ekspresji genów szlaku Hh wydrębianych na podstawie poszczególnych parametrów klinicznych	86
Tabela 44.	Porównanie wyników analizy ekspresji genów szlaku Hedgehog i zmian molekularnych zidentyfikowanych metodą NGS w 14 przypadkach.	91

10.5. Spis rycin

Nazwa	Tytuł	Strona
Rycina 1.	Schematyczne przedstawienie typów guzów zarodkowych	15
Rycina 2.	Proces obróbki potranslacyjnej białek z rodziny Hedgehog	23
Rycina 3.	Schemat działania szlaku sygnalizacyjnego Hedgehog	24
Rycina 4.	Wzory użyte do obliczenia stopnia wyznakowania próbki, aktywności specyficznej oraz wydajności reakcji znakowania.	43
Rycina 5.	Schemat procesowania danych NGS	51
Rycina 6.	Układ genów badanych techniką PCR w czasie rzeczywistym na płytce 96-dołkowej	54
Rycina 7.	<i>Heat Map</i> przedstawiający wizualizację zmian krotności ekspresji dla każdego genu badanego w macierzy między kontrolą negatywną i pozytywną.	77
Rycina 8.	<i>Heat Map</i> przedstawiający wizualizację zmian krotności ekspresji dla każdego genu badanego w macierzy w poszczególnych podtypach histologicznych GCTs względem kontroli negatywnej.	78
Rycina 9.	<i>Heat Map</i> przedstawiający wizualizację zmian krotności ekspresji dla każdego genu badanego w macierzy w poszczególnych podtypach histologicznych GCTs względem kontroli pozytywnej.	83
Rycina 10.	Clustergram vs kontrola negatywna	88
Rycina 11.	Clustergram vs kontrola pozytywna	89
Rycina 12.	Schemat szlaku Hh (panel A: hamowanie szlaku; panel B: klasyczna droga w oparciu o aktywację ligandem;)	107

Chciałabym podziękować

Pani Promotor, dr hab. n med. Beacie S. Lipskiej-Ziętkiewicz za opiekę, zaangażowanie, cierpliwość i wyrozumiałość, cenne uwagi i wskazówki okazane podczas lat pracy naukowej oraz nieoceniony wkład w pisanie niniejszej pracy.

Pani prof. dr hab. n med. Ewie Iżyckiej-Świeszewskiej za wyrozumiałość, motywację do pracy naukowej, konsultacje przy doborze grupy badanej oraz udostępniony materiał do badań. a także za pomoc w pisaniu niniejszej pracy.

Kierownikowi dr hab. n med. Bartoszowi Wasągowi oraz wszystkim Pracownikom Katedry i Zakładu Biologii i Genetyki Medycznej GUMed za życzliwość, wyrozumiałość oraz okazaną pomoc i wsparcie.

Panu prof. dr. hab. n. med. Januszowi Limonowi za możliwość rozpoczęcia pracy naukowej.

Chciałabym również podziękować mojej Rodzinie: Mamie, Tacie, Mężowi i Siostrze oraz Przyjaciołom za motywację, wsparcie i cierpliwość.