

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY



**Patogenetyczne i kliniczne znaczenie wybranych polimorfizmów genów
STAT3, IL-6, FOXP3, CTLA-4 oraz ocena ekspresji białek
STAT3, STAT5A, STAT5B, STAT6 w raku podstawnokomórkowym skóry**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Martyna Sławińska

Promotor: dr hab. n. med. Michał Sobjanek

Katedra i Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

GDAŃSK 2020

Wydano za zgodą

Dziekan Wydziału Lekarskiego

Praca wykonana w Katedrze i Klinice Dermatologii, Wenerologii i Alergologii
oraz Katedrze i Zakładzie Patomorfologii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Praca zrealizowana w ramach badań statutowych Katedry i Kliniki Dermatologii,
Wenerologii i Alergologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
(numer projektu: 02-0066/07/253)

Pragnę serdecznie podziękować

Mojemu Promotorowi i Mistrzowi dr hab. Michałowi Sobjankowi za inspirację naukową, motywację i pomoc na każdym etapie realizacji pracy doktorskiej, wprowadzenie mnie w fascynujący świat dermoskopii oraz przekazane umiejętności z zakresu dermatochirurgii.

Kierownikowi Katedry i Kliniki Dermatologii, Wenerologii i Alergologii, Prof. dr hab. Romanowi J. Nowickiemu za życzliwość oraz doskonałe warunki rozwoju naukowego.

Kierownikowi Katedry i Zakładu Patomorfologii, Prof. dr hab. Wojciechowi Biernatowi, za wsparcie merytoryczne oraz możliwość realizacji części prac eksperymentalnych w Laboratorium Patomorfologii.

Pani dr Monice Zablotnej za poświęcony czas, pomoc w części pracy poświęconej znaczeniu polimorfizmów genetycznych oraz w opracowaniu statystycznym.

Pani dr Joannie Lakomy za poświęcony czas, pomoc w interpretacji wyników oraz cenne wskazówki w trakcie realizacji części pracy poświęconej ekspresji białek STAT w raku podstawnocomórkowym skóry.

Pani mgr Aleksandrze Wysockiej za pomoc w korekcie językowej manuskryptów.

Zespołowi Kliniki Dermatologii, Wenerologii i Alergologii oraz Zakładu Patomorfologii za życzliwość i pomoc podczas realizacji pracy doktorskiej.

Moim Bliskim, a szczególnie mojemu mężowi Grzesiowi, za wiarę w moje możliwości, ogromną cierpliwość oraz wyrozumiałość i wsparcie.

SPIS TREŚCI:

| | |
|---|----|
| 1. Wykaz zastosowanych skrótów..... | 5 |
| 2. Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy..... | 7 |
| 3. Wstęp..... | 8 |
| 4. Cele pracy..... | 11 |
| 5. Materiał i metody..... | 12 |
| 6. Omówienie wyników publikacji wchodzących w skład rozprawy..... | 14 |
| 7. Wnioski..... | 19 |
| 8. Streszczenie pracy w języku polskim..... | 20 |
| 9. Streszczenie pracy w języku angielskim..... | 23 |
| 10. Piśmiennictwo..... | 26 |
| 11. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej..... | 33 |

1. Wykaz zastosowanych skrótów

W rozprawie symbole genów zapisane są czcionką pochyloną, natomiast białek czcionką prostą [1].

| | |
|----------|--|
| ASIP | białko sygnałowe agouti (<i>ang. agouti signaling protein</i>) |
| BCC | rak podstawnocomórkowy skóry (<i>ang. basal cell carcinoma</i>) |
| CTLA-4 | antygen 4 limfocytów T cytotoksycznych (<i>ang. cytotoxic lymphocyte-associated antigen-4</i>) |
| ELISA | test immunoenzymatyczny (<i>ang. enzyme-linked immunosorbent assay</i>) |
| FOXP3 | czynnik transkrypcyjny FOXP3 (<i>ang. forkhead box P3</i>) |
| HLA-B | ludzki antygen leukocytarny B (<i>ang. human leukocyte antigen B</i>) |
| HLA-DQA2 | ludzki antygen leukocytarny DQA2 (<i>ang. human leukocyte antigen-DQA2</i>) |
| IL | interleukina (<i>ang. interleukin</i>) |
| MAF | frekwencja rzadszego allelu (<i>ang. minor allele frequency</i>) |
| MC1R | receptor melanokortyny 1 (<i>ang. melanocortin 1 receptor</i>) |
| MCP-1 | białko chemotaktyczne dla monocytów typu 1 (<i>ang. monocyte chemotactic protein-1</i>) |
| MIR146A | mikroRNA 146a (<i>ang. microRNA 146a</i>) |
| NEU1 | neuraminidaza 1, nazywana także sialidazą 1 (<i>ang. neuraminidase 1</i>) |
| NMSC | nieczerniakowy nowotwór skóry/ rak skóry (<i>ang. non-melanoma skin cancer</i>) |
| PD-1 | receptor programowanej śmierci 1 (<i>ang. programmed death receptor 1</i>) |
| RNASEL | rybonukleaza L (<i>ang. ribonuclease L</i>) |
| SHH | <i>ang. sonic hedgehog</i> |

| | |
|-------------------|---|
| SSP-PCR | amplifikacja DNA ze starterami swoistymi dla alleli (<i>ang. single specific primer-polymerase chain reaction</i>) |
| STAT | przełącznik sygnału i aktywator transkrypcji (<i>ang. signal transducer and activator of transcription</i>) |
| TNF | czynnik martwicy nowotworu (<i>ang. tumor necrosis factor</i>) |
| T _{regs} | limfocyty T regulatorowe (<i>ang. regulatory T cells</i>) |
| TICAM-1/ TRIF | cząsteczka adaptacyjna 1 zawierająca domenę TIR (<i>ang. TIR-containing adapter molecule-1/ TIR domain-containing adapter inducing interferon-beta</i>) |
| TYR | tyrozynaza (<i>ang. tyrosinase</i>) |
| UVR | promieniowanie ultrafioletowe (<i>ang. ultraviolet radiation</i>) |

2. Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy

Rozprawa doktorska powstała w oparciu o cykl trzech spójnych tematycznie prac oryginalnych, opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych o sumarycznym wskaźniku IF 5,837 oraz sumie punktów MNiSW 210.

Publikacja A

Martyna Sławińska, Monika Zabłotna, Jolanta Gleń, Joanna Lakomy, Roman J. Nowicki, Michał Sobjanek.

STAT3 polymorphisms and *IL-6* polymorphism are associated with the risk of basal cell carcinoma in patients from northern Poland. *Archives of Dermatological Research* 2019;311(9):697-704. DOI:10.1007/s00403-019-01952-7.

IF: 2,309; MNSiW: 70

Publikacja B

Martyna Sławińska, Monika Zabłotna, Roman J. Nowicki, Michał Sobjanek.

FOXP3 and *CTLA-4* genetic variants' influence on the susceptibility and clinical course of basal cell carcinoma. *Advances in Dermatology and Allergology* 2019; DOI:10.5114/ada.2020.93368

IF: 1,757; MNSiW: 70

Publikacja C

Martyna Sławińska, Joanna Lakomy, Wojciech Biernat, Małgorzata Sokołowska-Wojdyło, Joanna Karczewska, Monika Zabłotna, Jerzy Jankau, Roman J. Nowicki, Michał Sobjanek.

STAT3, STAT5A, STAT5B, STAT6 proteins are overexpressed in human basal cell carcinoma. *Clinical and Experimental Dermatology* 2020;45(2):165-171. DOI:10.1111/ced.14048.

IF: 1,771; MNSiW:70

3. Wstęp

Rak podstawnokomórkowy skóry (ang. *basal cell carcinoma*, BCC) jest złośliwym nowotworem pochodzenia nabłonkowego wywodzącym się z podstawnych komórek nabłonka mieszka włosowego okolicy wybrzuszenia włosów anagenowych, komórek macierzy włosa lub pluripotencjalnych komórek naskórka.

BCC jest najczęstszym nowotworem złośliwym występującym w populacji kaukaskiej. Ze względu na brak odpowiednich rejestrów zachorowań, dokładne dane epidemiologiczne dla wielu krajów nie są znane. Wiadomo, że zachorowalność na ten nowotwór w Europie wzrasta w ostatnich dziesięcioleciach o około 5-10% rocznie [2-4].

Choć BCC rzadko (0,0028%-0,55% przypadków) daje przerzuty i jest przyczyną śmierci chorych, może naciekać otaczające tkanki i prowadzić do poważnych następstw funkcjonalnych, estetycznych, psychologicznych. Wysoka i wciąż wzrastająca zachorowalność na ten nowotwór, obniżanie się średniego wieku wystąpienia pierwszego ogniska BCC, częstsze występowanie wariantów histopatologicznych o agresywnym charakterze wzrostu i licznych ognisk BCC, a także zwiększone ryzyko wystąpienia innych raków skóry (ang. *non-melanoma skin cancer*, NMSC) oraz czerniaka w tej grupie pacjentów stanowią istotny problem medyczny, ekonomiczny i społeczny [2].

BCC jest nowotworem o złożonym i wieloczynnikowym podłożu, którego patogeneza nie została w pełni poznana [5]. Dokładniejsze poznanie tych zagadnień stanowi punkt wyjścia do rozwoju nowych metod profilaktyki oraz leczenia.

Najważniejszym środowiskowym czynnikiem ryzyka zachorowania na BCC jest ekspozycja na promieniowanie ultrafioletowe (UVR). Prócz ekspozycji na promieniowanie słoneczne, udokumentowany jest związek zachorowania na BCC z ekspozycją na sztuczne źródła UVR (w tzw. solariach lub podczas fototerapii stosowanej w przebiegu schorzeń dermatologicznych). Do innych środowiskowych czynników ryzyka należą stosowanie leków uwrażliwiających na UVR, leków immunosupresyjnych, ekspozycja na promieniowanie jonizujące oraz arsen. Cechami fenotypowymi predysponującymi do zachorowania na BCC są jasny kolor skóry, tęczówek oczu oraz włosy koloru rudego lub blond. Zachorowalność jest wyższa u osób w zaawansowanym wieku, mężczyzn (wśród pacjentów poniżej 40 roku życia dominują natomiast kobiety) i chorych z wywiadem raka skóry [2]. Na rozwój BCC mają

również wpływ uwarunkowania genetyczne. Znane są schorzenia w przebiegu których obserwuje się zwiększoną predyspozycję do zachorowania na ten nowotwór (zespół Gorlina-Goltza, zespół Rombo, zespół Bazex–Duprè–Christol, *xeroderma pigmentosum*, albinizm, *epidermodysplasia verruciformis*) [6].

Określenie roli mutacji genu *PTCH1* u chorych z zespołem Golina-Goltza było przełomem w poznaniu patogenezy tego nowotworu i zaowocowało wprowadzeniem nowych metod leczenia (wismodegib, sonidegib) [6]. Wykazano także, że mutacje genów zaangażowanych w regulację szlaku *sonic hedgehog* (SHH) obserwowane są w komórkach ponad 70% sporadycznych BCC [7].

Wciąż jednak niewystarczająco poznane są czynniki genetyczne warunkujące podatność na wystąpienie BCC w populacji ogólnej. Wskazywano m.in. na udział polimorfizmów genów warunkujących pigmentację skóry (*MC1R*, *ASIP*, *TYR*), S-transferazy glutationowej, receptora witaminy D, cytochromu P-450 (*CYP2D6*), czynnika martwicy nowotworów (*TNF*), *TP53*, *VEGF*, genów zaangażowanych w naprawę uszkodzonego DNA oraz genów szlaku SHH [8-18].

Wydaje się, że geny regulujące odpowiedź immunologiczną mogą wpływać na podatność oraz przebieg kliniczny BCC. Wiadomo, że jest to nowotwór immunogeny, a w mikrośrodku guza stwierdza się komórki układu immunologicznego będące źródłem cytokin oraz czynników wzrostu, które odgrywają istotną rolę w przebiegu choroby [19-22]. Upřednio wskazywano na rolę związku polimorfizmów genów związanych z różnymi mechanizmami regulującymi odpowiedź immunologiczną, w tym *CTLA-4*, *PD-1*, *IL-1B*, *IL-6*, *RNASEL*, *MIR146A*, *HLA-B*, *HLA-DQA2*, *TICAM1*, *NEUI* z ryzykiem zachorowania i/lub przebiegiem klinicznym BCC [23-28].

Badania przeprowadzone w ostatnich latach w Klinice Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego wskazały na rolę polimorfizmów *IL-2*, *IL-10*, *MCP-1* oraz *TNF-α* [29-31]. Niniejsza praca doktorska stanowi kontynuację badań nad molekularnymi aspektami patogenezy BCC. Prócz znaczenia polimorfizmów *STAT3*, *IL-6*, *FOXP3* i *CTLA-4* przedmiotem badań była ocena ekspresji *STAT3* oraz innych białek z tej rodziny, tj. *STAT5A*, *STAT5B*, *STAT6* w tkankach tego nowotworu.

IL-6 jest kluczowym czynnikiem aktywującym szlak *IL-6/JAK/STAT3*. Upřednio przeprowadzone badania pokazały, że interleukina ta może stymulować proces wzrostu guza nowotworowego działając bezpośrednio lub poprzez modulację jego

mikrośrodowiska (ang. *tumour microenvironment*) [32]. Jee i wsp. [33] w badaniu przeprowadzonym na liniach komórkowych BCC wykazali, że IL-6 jest zaangażowana zarówno w hamowanie apoptozy, jak i w stymulowanie angiogenezy. Wykazano ponadto zwiększoną ekspresję IL-6 w tkankach ludzkiego BCC w porównaniu ze skórą zdrową [19,34,35]. W literaturze istnieją nieliczne doniesienia na temat roli polimorfizmów genów powiązanych ze szlakiem molekularnym IL-6/JAK/STAT3 w patogenezie BCC [26,36,37].

Limfocyty T regulatorowe (ang. *regulatory T cells*; T_{regs}) są dominującym typem komórek układu immunologicznego w mikrośrodowisku BCC i odgrywają kluczową rolę w hamowaniu przeciwnowotworowej odpowiedzi zapalnej [21,38,39]. Genem regulującym funkcję T_{regs} jest *FOXP3*, kodujący czynnik FOXP3 odpowiedzialny za regulację transkrypcji licznych genów, w tym *CTLA-4*. Ekspresja CTLA-4 na powierzchni T_{regs} poprzez interakcję z komórkami prezentującymi antygen, hamuje aktywację limfocytów T [23,40]. Warianty polimorficzne *FOXP3* i *CTLA-4* mogą wpływać na funkcję T_{regs}, a tym samym na podatność na wystąpienie choroby oraz jej przebieg [41].

Zwiększoną ekspresję białek STAT stwierdza się w wielu nowotworach występujących u człowieka – w tym w guzach litych oraz nowotworach hematologicznych. Uprzednio przeprowadzone badania dowiodły, że proliferacja komórek nowotworowych jest zależna od konstytutywnej ekspresji STAT oraz że wykazują one zwiększoną wrażliwość na inhibitory tych białek, w porównaniu z prawidłowymi komórkami organizmu. Wskazywano głównie na onkogeną rolę białek STAT3, STAT5A, STAT5B oraz STAT6. Ekspresja STAT3 w komórkach BCC była przedmiotem pojedynczych doniesień [42-47]. W żadnym z badań nie oceniano roli białek STAT5A, STAT5B oraz STAT6.

Powyższe spostrzeżenia te były inspiracją do podjęcia badań będących przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej.

4. Cele pracy

1. Analiza częstości występowania genotypów i alleli wybranych polimorfizmów genów *STAT3*, *IL-6*, *FOXP3*, *CTLA-4* w grupie chorych na BCC oraz w grupie kontrolnej.
2. Sprawdzenie czy istnieje związek pomiędzy badanymi wariantami polimorficznymi a wybranymi zmiennymi klinicznymi i rokowniczymi w grupie osób chorych na BCC.
3. Porównanie ekspresji białek *STAT3*, *STAT5A*, *STAT5B*, *STAT6* w tkankach BCC oraz w skórze niezmienionej.
4. Sprawdzenie czy istnieje związek pomiędzy ekspresją białek *STAT3*, *STAT5A*, *STAT5B*, *STAT6* w tkankach BCC a wybranymi zmiennymi klinicznymi.

5. Materiał i metody

Poniżej przedstawiono jedynie ogólny zarys materiału i metod zastosowanych w niniejszej pracy; szczegółowe omówienie tych aspektów znajduje się w każdej z publikacji.

Do badania analizującego znaczenie polimorfizmów genów *STAT3* oraz *IL-6* włączono 254 pacjentów z rozpoznaniem BCC w oraz 198 osób z grupy kontrolnej dobranej względem płci i wieku. W toku prowadzonych badań, grupę badaną poszerzono i do pracy, w której analizowano rolę polimorfizmów genów *FOXP3* i *CTLA-4* włączono 280 chorych z rozpoznaniem BCC oraz 200 osób stanowiących grupę kontrolną dobraną względem płci i wieku.

Wszyscy pacjenci byli diagnozowani i leczeni w Klinice Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. We wszystkich przypadkach rozpoznanie BCC potwierdzono badaniem histopatologicznym. Szczegółowe kryteria włączenia i wyłączenia z badania opisano w poszczególnych publikacjach (A, B).

Prócz obecności określonych wariantów polimorficznych analizowano zmienne kliniczne takie jak: wiek i płeć chorych, wielkość guza, wariant histopatologiczny, umiejscowienie anatomiczne, liczbę ognisk BCC, obecność guza pierwotnego vs. wznowy nowotworu.

Wybór badanych polimorfizmów uwarunkowany był uprzednio udokumentowanym ich znaczeniem w patogenezie innych nowotworów, ich znaczeniem funkcjonalnym, jak również wartością MAF (ang. *minor allele frequency*) $\geq 0,1$ dla populacji kaukaskiej.

Do oznaczeń polimorfizmów genów *STAT3*, *IL-6*, *FOXP3*, *CTLA-4* posłużono się metodą SSP-PCR. Do pomiaru stężenia IL-6 wykorzystano metodę ELISA.

Ekspresję białek *STAT3*, *STAT5A*, *STAT5B* i *STAT6* oceniano metodą immunohistochemiczną w 60 skrawkach tkankowych BCC (w tym od 20 pacjentów z rozpoznaniem postaci powierzchniowej BCC, od 20 z rozpoznaniem postaci guzkowej BCC oraz 20 z rozpoznaniem postaci naciekającej BCC) oraz w 20 skrawkach skóry zdrowej (klinicznie i histopatologicznie niezmienionej). Ze względu na heterogeniczność wybarwienia dotyczącą istotnego odsetka badanych preparatów, wykorzystano wskaźnik H (*H-score*) celem oceny intensywności ekspresji z zastosowaniem następującej formuły: $[1 \times (\% \text{ komórek wykazujących ekspresję o intensywności ocenianej na } 1+) + 2 \times (\% \text{ komórek wykazujących ekspresję o intensywności ocenianej$

na 2+) + 3 × (% komórek wykazujących ekspresję o intensywności ocenianej na 3+)] [48].

Analizę statystyczną przeprowadzono przy wykorzystaniu oprogramowania Statistica 12.0 (StatSoft, Inc., 2015) wykorzystując odpowiednie testy w zależności od charakteru rozkładu danych.

Na przeprowadzanie badań uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (NKBBN/322/2014; NKBBN/383/2018).

6. Omówienie wyników publikacji wchodzących w skład rozprawy

Publikacja A

Martyna Sławińska, Monika Zabłotna, Jolanta Gleń, Joanna Lakomy, Roman J. Nowicki, Michał Sobjanek.

STAT3 polymorphisms and *IL-6* polymorphism are associated with the risk of basal cell carcinoma in patients from northern Poland. *Archives of Dermatological Research* 2019;311(9):697-704. DOI: 10.1007/s00403-019-01952-7.

IF: 2,309; MNSiW: 70

W pracy badano związek polimorfizmu rs1800795 (-174 G/C) *IL-6* oraz dwóch polimorfizmów *STAT3* rs2293152 (intron 11, C/G) oraz rs4796793 (-1697, C/G) z ryzykiem zachorowania na BCC oraz z wybranymi zmiennymi klinicznymi. Ponadto oceniano stężenie *IL-6* w surowicy w odniesieniu do badanego polimorfizmu genu tej interleukiny oraz korelację jej stężenia z wybranymi zmiennymi klinicznymi.

Obecność allelu C polimorfizmu rs2293152 *STAT3* była związana ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na BCC (aOR 1,31; 95% CI 1,01–1,69; $p=0,04$). Obecność genotypu CC polimorfizmu rs2293152 *STAT3* była związana z prawie czterokrotnie zwiększonym ryzykiem zachorowania na BCC w modelu recesywnym (aOR 3,94; 95% CI 1,59–9,77; $p=0,003$).

Z kolei obecność allelu G polimorfizmu rs4796793 *STAT3* była związana ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na BCC (aOR 1,59; 95% CI 1,01–2,49; $p=0,04$). Obecność genotypu GG polimorfizmu rs4796793 *STAT3* była związana z ponad trzykrotnie zwiększonym ryzykiem zachorowania na BCC w modelu recesywnym (aOR 3,66; 95% CI 1,33–10,10; $p=0,012$).

Ponadto wykazano, że obecność allelu C polimorfizmu rs1800795 *IL-6* wiązała się z istotnie wyższym ryzykiem zachorowania na BCC (aOR 1,86; 95% CI 1,22–2,84; $p=0,004$).

Nie stwierdzono związku pomiędzy częstością występowania określonych alleli i genotypów badanych polimorfizmów *STAT3* i *IL-6*, a badanymi zmiennymi klinicznymi zarówno wśród pacjentów z pierwotnym BCC, jak i w grupie ze wznową

nowotworu.

Stężenie IL-6 było istotnie wyższe w grupie badanej ($p < 0,00001$) i dodatnio korelowało z wymiarem guza ($p = 0,005$). Nie stwierdzono natomiast istotnej statystycznie zależności pomiędzy stężeniem IL-6 w surowicy a pozostałymi badanymi zmiennymi klinicznymi, zarówno wśród pacjentów z pierwotnym BCC, jak i ze wznową nowotworu.

W piśmiennictwie nie odnalazłam badań poświęconych znaczeniu polimorfizmów genu *STAT3* w patogenezie BCC. Opublikowana praca jest zatem pierwszym doniesieniem wskazującym na patogenetyczną rolę polimorfizmów tego genu w patogenezie nowotworu. Dotąd opublikowano natomiast dwa badania, w których badano wpływ polimorfizmu rs1800795 (-174 G/C) *IL-6* na ryzyko BCC [36,37]. W przeciwieństwie do moich badań, w żadnym z nich nie stwierdzono różnic w występowaniu częstości poszczególnych genotypów i alleli w grupie osób z BCC, w porównaniu z grupą kontrolną. Różnice w otrzymanych wynikach, uwzględniając podobną wielkość grup badanych, mogą wynikać z odmienności pomiędzy badanymi populacjami. Wykazane podwyższone stężenie IL-6 w surowicy u osób chorych na BCC wydaje się potwierdzać jej udział w patogenezie tego nowotworu.

Publikacja B

Martyna Sławińska, Monika Zabłotna, Roman J. Nowicki, Michał Sobjanek.

FOXP3 and *CTLA-4* genetic variants' influence on the susceptibility and clinical course of basal cell carcinoma. *Advances in Dermatology and Allergology* 2019; DOI: <https://doi.org/10.5114/ada.2020.93368>

IF: 1,757; MNSiW: 70

W pracy oceniano związek polimorfizmów rs3761548 (-3279, C/A) oraz rs2232365 (-924, A/G) genu *FOXP3*, a także polimorfizmu rs5742909 (-318, C/T) *CTLA-4* z ryzykiem zachorowania na BCC oraz wybranymi zmiennymi klinicznymi.

Nie stwierdzono związku pomiędzy częstością występowania wymienionych alleli i genotypów badanych polimorfizmów *FOXP3* i *CTLA-4* pomiędzy grupą badaną i kontrolną oraz w odniesieniu do badanych zmiennych klinicznych, za wyjątkiem genotypu CC polimorfizmu rs5742909 *CTLA-4*, który statystycznie częściej stwierdzano w grupie pacjentów z mnogimi ogniskami BCC ($p=0,05$).

Według mojej wiedzy, nie przeprowadzono wcześniej badań dotyczących roli polimorfizmów genu *FOXP3* w patogenezie BCC. W piśmiennictwie odnalazłam zaledwie jedno doniesienie wskazujące na rolę innego polimorfizmu *CTLA-4* (CT60) w patogenezie tego nowotworu [23]. Opublikowana praca jest zatem pierwszym doniesieniem oceniającym rolę badanych polimorfizmów w patogenezie BCC. Mimo, że nie udało się wykazać związku badanych polimorfizmów z ryzykiem zachorowania na BCC, to z racji uznanej roli komórek T_{regs} w tym schorzeniu celowe wydaje się poszukiwanie związku innych polimorfizmów z ryzykiem zachorowania, a także przeprowadzenie podobnych badań w innych populacjach.

Publikacja C

Martyna Sławińska, Joanna Lakomy, Wojciech Biernat, Małgorzata Sokołowska-Wojdyło, Joanna Karczewska, Monika Zabłotna, Jerzy Jankau, Roman J. Nowicki, Michał Sobjanek.

STAT3, STAT5A, STAT5B, STAT6 proteins are overexpressed in human basal cell carcinoma. *Clinical and Experimental Dermatology* 2020;45(2):165-171.

DOI: 10.1111/ced.14048

IF: 1,771; MNSiW: 70

W badaniu oceniano ekspresję białek STAT3, STAT5A, STAT5B, STAT6 w tkankach trzech wariantów histopatologicznych BCC (guzkowym, powierzchniowym oraz naciekającym) w porównaniu do skóry zdrowej, a także w odniesieniu do wybranych zmiennych klinicznych.

Zwiększoną ekspresję białek STAT3, STAT5A, STAT5B, STAT6 obserwowano w skrawkach wszystkich badanych wariantów histopatologicznych BCC i była ona istotnie wyższa niż w komórkach naskórka sąsiadującego z tkanką guza, a także w naskórku skóry zdrowej (grupa kontrolna). Najwyższą średnią wartość wskaźnika H w tkance BCC stwierdzono dla białka STAT5A, a następnie STAT6, STAT5B i STAT3 (odpowiednio $276,25 \pm 38,31$, $206,52 \pm 22,85$, $171,25 \pm 52,41$ oraz $135,81 \pm 52,59$). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w średnich wartościach wskaźnika H pomiędzy badanymi wariantami histopatologicznymi nowotworu, a także w zależności od płci i wieku osób badanych oraz wielkości guza i jego umiejscowienia (lokalizacja na skórze przewlekłe ekspozowanej vs. nieekspozowanej na światło słoneczne). Zwiększoną immunoekspresję białek STAT3, STAT5A, STAT5B, STAT6 obserwowano także w komórkach nacieku zapalnego znajdujących się w otoczeniu guza, komórkach śródbłonna naczyniowego oraz w gruczołach łojowych.

Według mojej wiedzy jest to pierwsze na świecie badanie, w którym oceniano ekspresję kilku białek z rodziny STAT w różnych wariantach histopatologicznych BCC uwzględniając dodatkowo wyżej wymienione zmienne kliniczne. Potwierdzono zaobserwowaną uprzednio zwiększoną ekspresję STAT3 w tkankach BCC; po raz pierwszy wykazano zwiększoną ekspresję STAT5A, STAT5B oraz STAT6.

Obserwacja ta niesie ze sobą cenne implikacje terapeutyczne, ponieważ pierwsze inhibitory białek STAT (STAT3, STAT5) są już stosowane w leczeniu chorób nowotworowych [49-55]. Wykazana zwiększona ekspresja tych białek w BCC stanowi przesłankę do kontynuacji badań nad możliwością zastosowania inhibitorów STAT w leczeniu tego nowotworu (także w postaci leków stosowanych miejscowo – na powierzchnię skóry lub doogniskowo).

7. Wnioski

1. Wykazana różnica w częstości występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów sugeruje, że polimorfizm *IL-6* (rs1800795) oraz polimorfizmy *STAT3* (rs2293152 i rs4796793) mają związek z ryzykiem zachorowania na BCC, natomiast badane polimorfizmy *FOXP3* (rs3761548 oraz rs2232365) i *CTLA-4* (rs5742909) nie wpływają na wystąpienie choroby.
2. Niestwierdzenie związku pomiędzy badanymi wariantami polimorficznymi *STAT3* (rs2293152 i rs4796793), *IL-6* (rs1800795), *FOXP3* (rs3761548 i rs2232365), a analizowanymi zmiennymi klinicznymi i rokowniczymi pozwala domniemać, że nie mają one istotnego wpływu na przebieg choroby. Badany polimorfizm *CTLA-4* (rs5742909) może odgrywać rolę w podatności na występowanie licznych ognisk BCC.
3. Stwierdzona podwyższona ekspresja białek *STAT3*, *STAT5A*, *STAT5B*, *STAT6* w tkankach BCC w porównaniu do naskórka sąsiadującego z tkanką guza, a także naskórka skóry zdrowej świadczy o ich udziale w patogenezie nowotworu. Wydaje się zatem, że białka te mogą stanowić potencjalny punkt uchwytu dla nowych ukierunkowanych molekularnie metod leczenia tego nowotworu.
4. Niestwierdzenie różnic w ekspresji *STAT3*, *STAT5A*, *STAT5B*, *STAT6* w tkankach BCC w zależności od wariantu histopatologicznego, płci i wieku osób badanych, wielkości guza i jego umiejscowienia (lokalizacja na skórze eksponowanej vs. nieeksponowanej na światło słoneczne) sugeruje wspólną ścieżkę patogenetyczną nowotworów różniących się wymienionymi cechami klinicznymi.

8. Streszczenie pracy w języku polskim

BCC jest nowotworem o wieloczynnikowym podłożu, którego patogenezą nie została w pełni poznana. Dokładniejsze poznanie tych zagadnień stanowi punkt wyjścia do rozwoju nowych metod profilaktyki i leczenia.

Celem pracy były: 1. Analiza częstości występowania genotypów i alleli wybranych polimorfizmów genów *STAT3*, *IL-6*, *FOXP3*, *CTLA-4* w grupie chorych na BCC oraz w grupie kontrolnej. 2. Sprawdzenie, czy istnieje związek pomiędzy badanymi wariantami polimorficznymi a wybranymi zmiennymi klinicznymi i rokowniczymi w grupie osób chorych na BCC. 3. Porównanie ekspresji białek *STAT3*, *STAT5A*, *STAT5B*, *STAT6* w tkankach BCC oraz w skórze niezmięnionej. 4. Sprawdzenie, czy istnieje związek pomiędzy ekspresją białek *STAT3*, *STAT5A*, *STAT5B*, *STAT6* w tkankach BCC a wybranymi zmiennymi klinicznymi.

Do badania analizującego znaczenie polimorfizmów genów *STAT3* oraz *IL-6* włączono 254 pacjentów z rozpoznaniem BCC w oraz 198 osób z grupy kontrolnej dobranej względem płci i wieku. W toku prowadzonych badań, grupę badaną poszerzono i do pracy, w której analizowano rolę polimorfizmów genów *FOXP3* i *CTLA-4* włączono 280 chorych z rozpoznaniem BCC oraz 200 osób stanowiących grupę kontrolną. Prócz obecności określonych wariantów polimorficznych analizowano zmienne kliniczne takie jak: wiek i płeć chorych, wielkość guza, wariant histopatologiczny, umiejscowienie anatomiczne, liczba ognisk BCC, obecność guza pierwotnego vs. wznowy nowotworu. Do oznaczeń polimorfizmów genów *STAT3*, *IL-6*, *FOXP3*, *CTLA-4* posłużono się metodą SSP-PCR. Do pomiaru stężenia *IL-6* wykorzystano metodę ELISA. Ekspresję białek *STAT3*, *STAT5A*, *STAT5B* i *STAT6* oceniano metodą immunohistochemiczną w 60 skrawkach tkankowych BCC (w tym od 20 pacjentów z rozpoznaniem postaci powierzchniowej BCC, od 20 z rozpoznaniem postaci guzkowej BCC oraz 20 z rozpoznaniem postaci naciekającej BCC) oraz w 20 skrawkach skóry zdrowej (klinicznie i histopatologicznie niezmięnionej). Celem półilościowej oceny immunoekspresji posłużono się wskaźnikiem H.

Obecność allelu C polimorfizmu rs2293152 *STAT3* była związana ze

zwiększonym ryzykiem zachorowania na BCC (aOR 1,31; 95% CI 1,01–1,69; $p=0,04$). Obecność genotypu CC polimorfizmu rs2293152 *STAT3* była związana z prawie czterokrotnie zwiększonym ryzykiem zachorowania na BCC w modelu recesywnym (aOR 3,94; 95% CI 1,59–9,77; $p=0,003$). Z kolei obecność allelu G polimorfizmu rs4796793 *STAT3* była związana ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na BCC (aOR 1,59; 95% CI 1,01–2,49; $p=0,04$). Obecność genotypu GG polimorfizmu rs4796793 *STAT3* była związana z ponad trzykrotnie zwiększonym ryzykiem zachorowania na BCC w modelu recesywnym (aOR 3,66; 95% CI 1,33–10,10; $p=0,012$). Ponadto wykazano, że obecność allelu C polimorfizmu rs1800795 *IL-6* wiązała się z istotnie wyższym ryzykiem zachorowania na BCC (aOR 1,86; 95% CI 1,22–2,84; $p=0,004$). Nie stwierdzono związku pomiędzy częstością występowania określonych alleli i genotypów badanych polimorfizmów *STAT3* i *IL-6*, a badanymi zmiennymi klinicznymi zarówno wśród pacjentów z pierwotnym BCC, jak i w grupie ze wznową nowotworu. Stężenie IL-6 było istotnie wyższe w grupie badanej ($p<0,00001$) i dodatkowo korelowało z wymiarem guza ($p=0,005$). Nie stwierdzono natomiast istotnej statystycznie zależności pomiędzy stężeniem IL-6 w surowicy a pozostałymi badanymi zmiennymi klinicznymi, zarówno wśród pacjentów z pierwotnym BCC, jak i ze wznową nowotworu.

Nie stwierdzono związku pomiędzy częstością występowania wymienionych alleli i genotypów badanych polimorfizmów *FOXP3* i *CTLA-4* pomiędzy grupą badaną i kontrolną oraz w odniesieniu do badanych zmiennych klinicznych, za wyjątkiem genotypu CC polimorfizmu rs5742909 *CTLA-4*, który statystycznie częściej stwierdzano w grupie pacjentów z mnogimi ogniskami BCC ($p=0,05$).

Zwiększoną ekspresję białek STAT3, STAT5A, STAT5B, STAT6 obserwowano w skrawkach wszystkich badanych wariantów histopatologicznych BCC i była ona istotnie wyższa niż w komórkach naskórka sąsiadującego z tkanką guza, a także w naskórku skóry zdrowej (grupa kontrolna). Najwyższą średnią wartość wskaźnika H (*H-score*) w tkance BCC stwierdzono dla białka STAT5A, a następnie STAT6, STAT5B i STAT3 (odpowiednio $276,25 \pm 38,31$, $206,52 \pm 22,85$, $171,25 \pm 52,41$ oraz $135,81 \pm 52,59$). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w średnich wartościach wskaźnika H pomiędzy badanymi wariantami histopatologicznymi nowotworu, a także w zależności od płci i wieku osób badanych oraz wielkości guza i jego umiejscowienia (lokalizacja na skórze przewlekle ekspozowanej vs. nieekspozowanej na światło słoneczne).

Podsumowując, wykazana różnica w częstości występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów sugeruje, że polimorfizm *IL-6* (rs1800795) oraz polimorfizmy *STAT3* (rs2293152 i rs4796793) mają związek z ryzykiem zachorowania na BCC, natomiast badane polimorfizmy *FOXP3* (rs3761548 oraz rs2232365) i *CTLA-4* (rs5742909) nie wpływają na wystąpienie choroby. Niestwierdzenie związku pomiędzy badanymi wariantami polimorficznymi *STAT3* (rs2293152 i rs4796793), *IL-6* (rs1800795), *FOXP3* (rs3761548 i rs2232365) a analizowanymi zmiennymi klinicznymi i rokowniczymi pozwala domniemać, że nie mają one istotnego wpływu na przebieg choroby. Badany polimorfizm *CTLA-4* (rs5742909) może odgrywać rolę w podatności na występowanie licznych ognisk BCC. Stwierdzona podwyższona ekspresja białek STAT3, STAT5A, STAT5B, STAT6 w tkankach BCC w porównaniu do naskórka sąsiadującego z tkanką guza, a także naskórka skóry zdrowej świadczy o ich udziale w patogenezie nowotworu. Wydaje się zatem, że białka te mogą stanowić potencjalny punkt uchwytu dla nowych ukierunkowanych molekularnie metod leczenia tego nowotworu. Niestwierdzenie różnic w ekspresji STAT3, STAT5A, STAT5B, STAT6 w tkankach BCC w zależności od wariantu histopatologicznego, płci i wieku osób badanych, wielkości guza i jego umiejscowienia (lokalizacja na skórze eksponowanej vs. nieeksponowanej na światło słoneczne) sugeruje wspólną ścieżkę patogenetyczną nowotworów różniących się wymienionymi cechami klinicznymi.

9. Streszczenie pracy w języku angielskim

BCC is a multifactorial tumor whose pathogenesis has not been fully understood. A better understanding of these issues is the starting point for the development of new methods of prevention and treatment.

Aims of the study were: 1. Analysis of the frequency of genotypes and alleles of selected *STAT3*, *IL-6*, *FOXP3*, *CTLA-4* gene polymorphisms in the group of patients with BCC and in the control group. 2. Checking whether there is a relationship between the polymorphic variants studied and selected clinical and prognostic variables in the group of BCC patients. 3. Comparison of expression of *STAT3*, *STAT5A*, *STAT5B*, *STAT6* proteins in BCC tissues and in unchanged skin. 4. Checking if there is a relationship between the expression of *STAT3*, *STAT5A*, *STAT5B*, and *STAT6* proteins in BCC tissues and selected clinical variables.

Two hundred fifty-four patients with BCC diagnosis and 198 patients from the control group selected according to gender and age were included in the study, which analyzed the significance of *STAT3* and *IL-6* gene polymorphisms. In the course of conducted research, the study group was expanded and the study, in which the role of *FOXP3* and *CTLA-4* gene polymorphisms was analyzed, included 280 patients diagnosed with BCC and 200 people constituting the control group. In addition to the presence of specific polymorphic variants, clinical variables such as age and sex of patients, tumor size, histopathological variant, anatomical location, number of BCC foci, and the presence of primary tumor vs. tumor recurrence were analyzed.

SSP-PCR was used to determine the polymorphic variants of *STAT3*, *IL-6*, *FOXP3*, *CTLA-4* genes. ELISA was used to measure IL-6 concentration. Expression of *STAT3*, *STAT5A*, *STAT5B* and *STAT6* proteins was assessed by immunohistochemistry in 60 tissue sections of BCC (including 20 patients with the diagnosis of superficial BCC, 20 with nodular BCC and 20 with infiltrative BCC) and 20 sections of healthy skin (clinically and histopathologically unchanged). The H-score was used for the semi-quantitative assessment of immunoexpression.

The presence of C allele in rs2293152 *STAT3* polymorphism was associated with an increased risk of developing BCC (aOR 1.31; 95% CI 1.01–1.69; $p=0.04$). The presence of the CC genotype in *STAT3* rs2293152 polymorphism was associated with an almost 4-fold increased risk of developing BCC in the recessive model analysis (aOR 3.94; 95% CI 1.59–9.77; $p=0.003$).

In turn, the presence of G allele in rs4796793 *STAT3* polymorphism was associated with an increased risk of BCC (aOR 1.59; 95% CI 1.01–2.49; $p=0.04$). The presence of GG genotype in *STAT3* rs4796793 polymorphism was associated with a more than 3-fold increased risk of BCC in the recessive model analysis (aOR 3.66; 95% CI 1.33–10.10; $p=0.012$). In addition, it was demonstrated that the presence of C allele in rs1800795 *IL-6* polymorphism was associated with a significantly higher risk of developing BCC (aOR 1.86; 95% CI 1.22–2.84; $p=0.004$). There was no relationship between the incidence of specific alleles and genotypes of the *STAT3* and *IL-6* polymorphisms studied, and the clinical variables studied in both primary BCC patients and in the group with tumor recurrence. IL-6 concentration was significantly higher in the study group ($p<0.00001$) and positively correlated with tumor size ($p=0.005$). No statistically significant correlation was found between serum IL-6 concentration and other clinical variables studied, both among patients with primary BCC and with recurrent tumor.

There was no relationship between the incidence of alleles and genotypes of the *FOXP3* and *CTLA-4* polymorphisms studied between the study and control group and in relation to the clinical variables studied, except for the CC genotype of the rs5742909 *CTLA-4* polymorphism, which was statistically more common in the group of patients with multiple BCCs ($p=0.05$).

Increased expression of STAT3, STAT5A, STAT5B, STAT6 proteins was observed in sections of all examined BCC histopathological variants and it was significantly higher than in the epidermal cells adjacent to the tumor tissue, as well as in the epidermis of healthy skin (control group). The highest mean H-score values in BCC tissue were found for the STAT5A protein, followed by STAT6, STAT5B and STAT3 (276.25 ± 38.31 , 206.52 ± 22.85 , 171.25 ± 52.41 and 135.81 ± 52.59 , respectively). There were no statistically significant differences in the mean H-score values between the examined histopathological variants of the tumor, as well as depending on the sex and age of the subjects, the size of the tumor and its location (location on the skin exposed vs. not exposed to UVR).

To sum up, the analysis of the frequency of genotypes and alleles of the polymorphisms studied suggests that the *IL-6* polymorphism (rs1800795) and *STAT3* polymorphisms (rs2293152 and rs4796793) are associated with the risk of BCC, while the *FOXP3* polymorphisms studied (rs3761548 and rs2232365) and *CTLA-4* polymorphism (rs5742909) do not affect the risk. The lack of association between the examined polymorphic variants of *STAT3* (rs2293152 and rs4796793), *IL-6* (rs1800795), *FOXP3* (rs3761548 and rs2232365), and the analyzed clinical and prognostic variables allow to presume that they have no significant effect on the course of the disease. In turn, the examined *CTLA-4* polymorphism (rs5742909) may play a role in the susceptibility to multiple BCCs. Increased expression of the STAT3, STAT5A, STAT5B, STAT6 proteins in BCC tissues compared to the epidermis adjacent to the tumor tissue, as well as the epidermis of healthy skin support their involvement in tumor pathogenesis. It seems, therefore, that these proteins may be a potential point of entry for new molecularly targeted treatments for this cancer. No differences in the expression of STAT3, STAT5A, STAT5B, STAT6 in BCC tissues depending on the histopathological variant, sex and age of the subjects, tumor size and location (location on the skin exposed vs. not exposed to sunlight) suggests a common pathogenetic pathway for tumors differing listed clinical features.

10. Piśmiennictwo

1. Wain HM, Bruford EA, Lovering RC, Lush MJ, Wright MW, Povey S. Guidelines for human gene nomenclature. *Genomics*. 2002;79(4):464-470.
2. Verkouteren JAC, Ramdas KHR, Wakkee M, Nijsten T. Epidemiology of basal cell carcinoma: scholarly review. *Br J Dermatol*. 2017;177(2):359-372.
3. Lomas A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol*. 2012;166:1069-1080.
4. Lesiak A, Czuwara J, Kamińska-Winciorek G, Kiprian D, Maj J, Owczarek W, *et al*. Basal cell carcinoma. Diagnostic and therapeutic recommendations of Polish Dermatological Society. *Dermatology Review/Przegląd Dermatologiczny*. 2019;106(2):107-126.
5. Kyrgidis A, Tzellos TG, Vahtsevanos K, Triaridis S. New concepts for basal cell carcinoma. Demographic, clinical, histological risk factors, and biomarkers. A systematic review of evidence regarding risk for tumor development, susceptibility for second primary and recurrence. *J Surg Res*. 2010;159:545-556.
6. de Zwaan SE, Haass NK. Genetics of basal cell carcinoma. *Australas J Dermatol*. 2010; 51(2):81-92.
7. Xie J, Murone M, Luoh SM, Ryan A, Gu Q, Zhang C, *et al*. Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature*. 1998;391(6662):90-92.
8. Han J, Kraft P, Colditz GA, Wong J, Hunter DJ. Melanocortin 1 receptor variants and skin cancer risk. *Int J Cancer*. 2006;119(8):1976.
9. Box NF, Duffy DL, Irving RE, Russell A, Chen W, Griffyths LR, *et al*. Melanocortin-1 receptor genotype is a risk factor for basal and squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol*. 2001;116(2):224.

10. Gudbjartsson DF, Sulem P, Stacey SN, Goldstein AM, Rafnar T, Sigurgeirsson B, *et al.* ASIP and TYR pigmentation variants associate with cutaneous melanoma and basal cell carcinoma. *Nat Genet.* 2008;40(7):886.
11. Ramachandran S, Lear JT, Ramsay H, Smith AG, Bowers B, Hutchinson PE, *et al.* Presentation with multiple cutaneous basal cell carcinomas: association of glutathione S-transferase and cytochrome P450 genotypes with clinical phenotype. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999;8(1):61.
12. Yengi L, Inskip A, Gilford J, Alldersea J, Bailey L, Smith A, *et al.* Polymorphism at the glutathione S-transferase locus GSTM3: interactions with cytochrome P450 and glutathione S-transferase genotypes as risk factors for multiple cutaneous basal cell carcinoma. *Cancer Res.* 1996;56(9):1974.
13. Lesiak A, Wódz-Naskiewicz K, Pawliczak R, Rogowski-Tylman M, Sysa-Jędrzejowska A, Sobjanek M, *et al.* The influence of vitamin D receptor gene polymorphism on basal cell carcinoma development in Polish population. *Post Dermatol Alergol.* 2011;28:165-169.
14. Ramachandran S, Fryer AA, Lovatt TJ, Smith AG, Lear JT, Jones PW, *et al.* Combined effects of gender, skin type and polymorphic genes on clinical phenotype: use of rate of increase in numbers of basal cell carcinomas as a model system. *Cancer Lett.* 2003; 189(2):175.
15. Sobjanek M, Zabłotna M, Lesiak A, Michajłowski I, Szczerkowska-Dobosz A, Sokolowska-Wojdyło M, *et al.* The -1154 G/A VEGF gene polymorphism is associated with the incidence of basal cell carcinoma in patients from northern Poland. *Arch Dermatol Res.* 2014;306(6):539-544.
16. Lin Y, Chahal HS, Wu W, Cho HG, Ransohoff KJ, Song F, *et al.* Association study of genetic variation in DNA repair pathway genes and risk of basal cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2017;141(5):952.
17. Wódz-Naskiewicz K, Narbutt J, Rogowski-Tylman M, Pawliczak R, Sobjanek M, Sysa-Jędrzejowska A, *et al.* Association of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms with basal cell carcinoma development. *Post Dermatol Alergol.* 2011;28:1-5.

18. Lesiak A, Sobolewska-Sztychny D, Majak P, Sobjanek M, Wodz K, Sygut KP, *et al.* Relation between sonic hedgehog pathway gene polymorphisms and basal cell carcinoma development in the Polish population. *Arch Dermatol Res.* 2016;308(1):39-47.
19. Elamin I, Zecević RD, Vojvodić D, Medenica L, Pavlović MD. Cytokine concentrations in basal cell carcinomas of different histological types and localization. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2008;17:55-59.
20. Jee SH, Shen SC, Chiu HC, Tsai WL. Overexpression of interleukin-6 in human basal cell carcinoma cell lines increases anti-apoptotic activity and tumorigenic potency. *Oncogene.* 2001;20(2):198-208.
21. Kaporis HG, Guttman-Yassky E, Lowes MA, Haider AS, Fuentes-Duculan J, Darabi K, *et al.* Human basal cell carcinoma is associated with Foxp3⁺ T cells in a Th2 dominant microenvironment. *J Invest Dermatol.* 2007;127(10):2391-2398.
22. Wong DA, Bishop GA, Lowes MA, Cooke B, Barnetson RSC, Halliday GM. Cytokine profiles in spontaneously regressing basal cell carcinomas. *Br J Dermatol.* 2000;143(1):91-98.
23. Welsh MM, Applebaum KM, Spencer SK, Perry AE, Karagas MR, Nelson HH. CTLA4 variants, UV-induced tolerance, and risk of non-melanoma skin cancer. *Cancer Res.* 2009;69(15):6158-6163.
24. Fathi F, Ebrahimi M, Eslami A, Hafezi H, Eskandari N, Motedayyen H. Association of programmed death-1 gene polymorphisms with the risk of basal cell carcinoma. *Int J Immunogenet.* 2019;10.1111/iji.12447.
25. Rizzato C, Canzian F, Rudnai P, Gurzau E, Stein A, Koppova K, *et al.* Interaction between functional polymorphic variants in cytokine genes, established risk factors and susceptibility to basal cell carcinoma of skin. *Carcinogenesis.* 2011;32(12):1849-1854.
26. Wilkening S, Hemminki K, Rudnai P, Gurzau E, Koppova K, Kumar R, *et al.* Case-control study in basal cell carcinoma of the skin: single nucleotide polymorphisms in three interleukin promoters pre-analysed in pooled DNA. *Br J*

Dermatol. 2006;155:1139-1144.

27. Farzan SF, Karagas MR, Christensen BC, Li Z, Kuriger JK, Nelson HH. RNASEL and MIR146A SNP-SNP interaction as a susceptibility factor for non-melanoma skin cancer. PLoS One. 2014;9(4):e93602.
28. Chahal HS, Wu W, Ransohoff KJ, Yang L, Hedlin H, Desai M, *et al.* Genome-wide association study identifies 14 novel risk alleles associated with basal cell carcinoma. Nat Commun. 2016;7:12510.
29. Sobjanek M, Zabłotna M, Bień E, Gleń J, Sokołowska-Wojdyło M, Ruckemann-Dziurdzińska K, *et al.* Clinical significance of IL-2 and IL-10 gene polymorphisms and serum levels in patients with basal-cell carcinoma. Biomark Med. 2016;10(2):185-195.
30. Sobjanek M, Zabłotna M, Szczerkowska-Dobosz A, Ruckemann-Dziurdzińska K, Sokolowska-Wojdylo M, Nowicki R. -2518 A/G MCP-1 but not -403 G/A RANTES gene polymorphism is associated with enhanced risk of basal cell carcinoma. Postepy Dermatol Alergol. 2016;33(5):381-385.
31. Sobjanek M, Zabłotna M, Michajłowski I, Nedoszytko B, Lesiak A, Nowicki R. -308 G/A TNF- α gene polymorphism influences the course of basal cell carcinoma in a Polish population. Arch Med Sci. 2015;11(3):599-604.
32. Zhou L, Zheng Y, Tian T, Liu K, Wang M, Lin S, *et al.* Associations of interleukin-6 gene polymorphisms with cancer risk: evidence based on 49,408 cancer cases and 61,790 controls. Gene. 2018;670:136-147.
33. Jee SH, Shen SC, Chiu HC, Tsai WLKM. Overexpression of interleukin-6 in human basal cell carcinoma cell lines increases anti-apoptotic activity and tumorigenic potency. Oncogene. 2001;20:198-208.
34. Gambichler T, Skrygan M, Hyun J, Bechara F, Tomi NS, Altmeyer P, *et al.* Cytokine mRNA expression in basal cell carcinoma. Arch Dermatol Res 2006;298:139-141.

35. Szepietowski JC, Walker C, McKenna DB, Hunter JAA, McKenzie RC. Leukaemia inhibitory factor and interleukin-8 expression in nonmelanoma skin cancers. *Clin Exp Dermatol*. 2001;26:72-78.
36. Festa F, Kumar R, Sanyal S, Undén B, Nordfors L, Lindholm B, et al. Basal cell carcinoma and variants in genes coding for immune response, DNA repair, folate and iron metabolism. *Mutat Res*. 2005;574(1-2):105-111.
37. Zhang Z, Liu W, Jia X, Gao Y, Hemminki K, Lindholm B. Use of pyrosequencing to detect clinically relevant polymorphisms of genes in basal cell carcinoma. *Clin Chim Acta*. 2004;342:137-143.
38. Rangwala S, Tsai KY. Roles of the immune system in skin cancer. *Br. J. Dermatol*. 2011;165(5):953-965.
39. Omland SH, Nielsen PS, Gjerdrum LMR, Gniadecki R. Immunosuppressive environment in basal cell carcinoma: The role of regulatory T cells. *Acta Derm Venereol*. 2016;96(7):917-921.
40. Szyllberg L, Karbownik D, Marszalek A. The Role of FOXP3 in Human Cancers. *Anticancer Res* 2016;36(8):3789-3794.
41. Oda JMM, Hirata BKB, Guembarovski RL, Watanabe MAE. Genetic polymorphism in FOXP3 gene: Imbalance in regulatory T-cell role and development of human diseases. *J. Genet*. 2013;92(1):163-171.
42. Chan KS, Sano S, Kiguchi K, Anders J, Komazawa N, Takeda J, *et al*. Disruption of Stat3 reveals a critical role in both the initiation and the promotion stages of epithelial carcinogenesis. *J Clin Invest*. 2004;114:720-728.
43. Kim DJ, Angel JM, Sano S, DiGiovanni J. Constitutive activation and targeted disruption of signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) in mouse epidermis reveal its critical role in UVB-induced skin carcinogenesis. *Oncogene*. 2009; 28: 950-960.
44. Macias E, Rao D, Digiovanni J. Role of stat3 in skin carcinogenesis: insights gained from relevant mouse models. *J Skin Cancer*. 2013;2013:684050.

45. Chen SY, Takeuchi S, Moroi Y, Hayashida S, Kido M, Chen SJ, *et al.* Overexpression of phosphorylated-ATF2 and STAT3 in cutaneous squamous cell carcinoma, Bowen's disease and basal cell carcinoma. *J Dermatol Sci.* 2008;51:210-215.
46. Suiqing C, Min Z, Lirong C. Overexpression of phosphorylated-STAT3 correlated with the invasion and metastasis of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Dermatol.* 2005;32:354-360.
47. Liu ZL, Li Y, Kong QY, Zhan C, Wang Q, Chen XY, *et al.* Immunohistochemical profiling of Wnt, NF-kappaB, Stat3 and Notch signaling in human epidermal tumors. *J Dermatol Sci.* 2008;52:133-136.
48. Fedchenko N, Reifenrath J. Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue – a review. *Diagn Pathol.* 2014;9:221.
49. Yu H, Jove R. The STATs of cancer-new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:97-105.
50. Qin JJ, Yan L, Zhang J, Zhang WD. STAT3 as a potential therapeutic target in triple negative breast cancer: a systematic review. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019;38:195.
51. Loh CY, Arya A, Naema AF, Wong WF, Sethi G, Looi CY. Signal transducer and activator of transcription (STATs) proteins in cancer and inflammation: functions and therapeutic implication. *Front Oncol.* 2019;9:48.
52. Reilley MJ, McCoon P, Cook C, Lyne P, Kurzrock R, Kim Y, *et al.* STAT3 antisense oligonucleotide AZD9150 in a subset of patients with heavily pretreated lymphoma: results of a phase 1b trial. *J Immunother Cancer.* 2018;6:119.
53. Wong AL, Soo RA, Tan DS, Lee SC, Lim JS, Marban PC, *et al.* Phase I and biomarker study of OPB-51602, a novel signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 inhibitor, in patients with refractory solid malignancies. *Ann Oncol.* 2015;26:998-1005.

54. Jonker DJ, Nott L, Yoshino T, Gill S, Shapiro J, Ohtsu A, *et al.* Napabucasin versus placebo in refractory advanced colorectal cancer: a randomised phase 3 trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2018;3:263-270.
55. Rousselot P, Prost S, Guilhot J, Roy L, Etienne G, Legros L, *et al.* Pioglitazone together with imatinib in chronic myeloid leukemia: A proof of concept study. *Cancer.* 2017;123: 1791-1799.

11. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej