

Streszczenie

Rak płuc jest jednym z najczęstszych nowotworów złośliwych, charakteryzującym się wysoką zapadalnością i śmiertelnością. Pod względem histologicznym dzieli się na niedrobnokomórkowego raka płuc (ang. *non-small cell lung cancer*, NSCLC), stanowiącego ok. 85% wszystkich przypadków, oraz drobnokomórkowego raka płuc (ang. *small cell lung cancer*, SCLC). W niedrobnokomórkowym raku płuc wyróżnia się raka płaskonabłonkowego (ang. *squamous cell carcinoma*, SCC), gruczolakoraka (ang. *adenocarcinoma*, AC) oraz raka wielkokomórkowego (ang. *large cell carcinoma*, LCC). Ze względu na wysoką śmiertelność spowodowaną tą chorobą, badania nad poszukiwaniem markerów prognostycznych tego nowotworu wydają się nadal uzasadnione.

Zyksyna (ZYX) jest białkiem należącym do rodziny białek z domeną LIM (ang. *LIM domain proteins*), powszechnie znanym jako komponent ognisk adhezyjnych. Bierze ona udział w organizacji i remodelingu cytoszkieletu. Cząsteczka zyksyny składa się z miejsca wiążącego α -aktyninę, powtórzeń bogatych w prolinę ActA, sekwencji eksportu jądrowego (ang. *nuclear export sequence*, NES) oraz z trzech domen LIM. Wykazano, że białko to może ulegać przemieszczeniu z cytoplazmy do jądra komórkowego, co sugeruje jego udział w przekazywaniu sygnału z zewnątrz do wnętrza komórki oraz udział w regulacji ekspresji genów. Eksperymenty wykazały, że ZYX może uczestniczyć w takich procesach jak apoptoza czy przejście epitelialno-mezenchymalne.

Przeprowadzone dotychczas badania sugerują udział zyksyny w onkogenezie. Może ona pełnić zarówno funkcję promującą, jak i supresorową w procesie nowotworzenia. Onkogeną rolę ZYX wykazano między innymi w raku gruczołu piersiowego oraz jelita grubego. Natomiast supresorową rolę tego białka postuluje się w raku prostaty i pęcherza moczowego. Istnieje jednak niewielka liczba publikacji weryfikujących udział ZYX w powstawaniu niedrobnokomórkowego raka płuc. Badania pokazują zmniejszoną ekspresję ZYX w linii komórkowej niedrobnokomórkowego raka płuc. Inne eksperymenty demonstrowują z kolei rolę ZYX w migracji i adhezji komórkowej. Wykazano również zmniejszony poziom ZYX w guzach nowotworowych w mysim modelu raka płuc. Dlatego też, celem naszych badań było określenie poziomu ekspresji ZYX w przypadkach niedrobnokomórkowego raka płuc, pozyskanych od pacjentów leczonych operacyjnie i skorelowanie otrzymanych wyników z danymi kliniczno-patologicznymi. Tym samym podjęto próbę odpowiedzi na pytanie, czy poziom ekspresji tego białka może mieć związek z rozwojem NSCLC?

Pierwsza praca zawarta w cyklu publikacji ma charakter przeglądowny. Jej celem było usystematyzowanie wiedzy na temat udziału zyxiny w rozwoju różnych typów nowotworów (*Partyńska Aleksandra, Gomulkiewicz Agnieszka, Dzięgiel Piotr, Podhorska-Okolów Marzenna. The role of zyxin in carcinogenesis. Anticancer Res., 2020, Vol. 40, no. 11, s. 5981-5988, DOI:10.21873/anticancerres.14618*). We wstępie pracy opisano budowę oraz funkcje ZYX. Dalsza część pracy skupia się na roli tego białka w rozwoju i progresji różnego typu nowotworów.

Druga publikacja jest pracą oryginalną opisującą ekspresję ZYX, zarówno na poziomie mRNA, jak i białka, w materiale klinicznym niedrobnokomórkowego raka płuc oraz w wybranych liniach komórkowych stanowiących model *in vitro* tego nowotworu (*Partyńska Aleksandra, Gomulkiewicz Agnieszka, Piotrowska Aleksandra, Grzegorzółka Jędrzej, Rzechonek Adam, Ratajczak-Wielgomas Katarzyna, Podhorska-Okolów Marzenna, Dzięgiel Piotr. Expression of zyxin in non-small cell lung cancer – a preliminary study. Biomolecules, 2022, Vol. 12, no. 6, art.827, DOI:10.3390/biom12060827*). Badania na materiale klinicznym zostały wykonane wykorzystując następujące metody badawcze: immunohistochemię (IHC), Western Blot, real-time PCR oraz RT-qPCR wykonany na mRNA pochodzącym z komórek wyizolowanych za pomocą mikrodysekcji laserowej. W badaniach IHC wykorzystano 399 przypadków NSCLC oraz 85 wycinków tkanki płuc niezmięnionej nowotworowo, utrwalonych w postaci bloczków parafinowych oraz przygotowanych jako mikromacierze tkankowe. Wykonane reakcje IHC wykazały obecność ZYX w cytoplazmie, błonie komórkowej oraz jądrze komórkowym komórek nowotworowych oraz komórek prawidłowej tkanki płuc. Analiza statystyczna wykazała istotnie niższy poziom cytoplazmatycznej ZYX w komórkach NSCLC niż w tkance prawidłowej. Z kolei poziom jądrowej ZYX był podwyższony w komórkach NSCLC w stosunku do prawidłowych komórek płuc. Dalsze analizy pokazały wyższy poziom jądrowej ZYX w komórkach SCC niż w AC. Badania zademonstrowały również istotnie niższy poziom cytoplazmatycznej ZYX w komórkach NSCLC i SCC, w guzach pT3-4 niż w pT1. Zauważono także istotnie niższy poziom cytoplazmatycznej ZYX w komórkach NSCLC i SCC w stadium zaawansowania klinicznego III-IV niż w stadium I. Analizy wykazały, że ZYX nie może być traktowana jako niezależny czynnik prognostyczny w NSCLC. Metoda Western Blot pokazała niższy poziom białka ZYX w guzach NSCLC i SCC niż w tkance kontrolnej. Badania real-time PCR zademonstrowały niższy poziom mRNA ZYX w guzach NSCLC i AC niż w prawidłowej tkance płuc. Z kolei RT-qPCR wykonany na mRNA pochodzącym z komórek wyizolowanych za pomocą mikrodysekcji laserowej również wykazał niższy poziom mRNA ZYX w komórkach

NSCLC, SCC i AC niż w prawidłowych komórkach płuc. Poziom *ZYX* został zbadany także w liniach NSCLC (linia płaskonabłonkowego raka płuc – NCI-H1703, linia gruczolakoraka płuc – NCI-H522) oraz w linii kontrolnej prawidłowych fibroblastów płucnych IMR-90. Wykorzystane techniki badawcze obejmowały: immunofluorescencję, immunocytochemię, Western Blot oraz real-time PCR. Reakcje immunocytochemiczne wykazały obecność *ZYX* w cytoplazmie. Dodatkowo reakcje immunofluorescencyjne ujawniły obecność *ZYX* w jądrze komórkowym badanych komórek. Eksperymenty wykonane na liniach komórkowych zademonstrowały niższy poziom białka *ZYX* w liniach NSCLC niż w linii kontrolnej IMR-90. Z kolei analiza metodą real-time PCR wykazała wyższy poziom mRNA *ZYX* w linii komórkowej NCI-H1703 niż w linii prawidłowej IMR-90. Niższy poziom mRNA *ZYX* w stosunku do linii kontrolnej IMR-90 występował w linii NCI-H522.

Podsumowując, obniżony poziom *ZYX* w komórkach NSCLC w porównaniu do tkanki kontrolnej sugeruje, że *ZYX* może pełnić rolę białka supresorowego w rozwoju NSCLC. Jednakże uzyskane wyniki wskazują, że *ZYX* nie ma potencjału prognostycznego w tym typie nowotworu.

Summary

Lung cancer is one of the most frequent cancers, described with high incidence and mortality. Based on histological classification, non-small cell lung cancer (NSCLC), accounting for nearly 85% of all lung cancer cases, and small cell lung cancer (SCLC) are distinguished. Non-small cell lung cancer is subdivided into squamous cell carcinoma (SCC), adenocarcinoma (AC), and large cell carcinoma (LCC). As this disease is characterized by high mortality, research concerning searching for prognostic factors is still justified.

Zyxin (ZYX) is a protein owned by *LIM domain proteins* family. ZYX is commonly acknowledged as a component of focal adhesions. It is responsible for organization and remodeling of cytoskeleton. The molecule of zyxin is made up of the following sequences: α -actinin binding site, proline-rich ActA repeats, nuclear export sequences (NES), and three LIM domains. The studies demonstrated this protein could translocate from cytoplasm into nucleus. It advocates the contribution of ZYX to extra-to-intracellular signaling and gene expression regulation. The experiments showed ZYX could take part in processes such as apoptosis or epithelial-mesenchymal transition.

Studies so far undertaken have suggested the role of ZYX in oncogenesis. This protein might promote as well as suppress carcinogenesis. The oncogenic function of ZYX has been shown, inter alia, in breast cancer and colorectal cancer. However, the suppressive role of this protein has been postulated in prostate cancer and bladder cancer. In the literature, there are not enough publications verifying the contribution of zyxin to non-small cell lung cancer development. Downregulation of ZYX expression was described in a NSCLC cell line. Other experiments demonstrated the position of ZYX in migration and cell adhesion. Decreased level of zyxin was shown in tumours of lung cancer murine model. Therefore, the aim of our study was to evaluate the expression of ZYX in NSCLC cases, collected from patients treated surgically, and to correlate the obtained results with the clinicopathological data. These measures let answer the question of whether the expression level of zyxin could be associated with NSCLC development?

The first paper included in a publication series is a review paper. Its purpose was to systemize the knowledge about the role of zyxin in cancer development (*Partyńska Aleksandra, Gomułkiewicz Agnieszka, Dzięgiel Piotr, Podhorska-Okolów Marzenna. The role of zyxin in carcinogenesis. Anticancer Res., 2020, Vol. 40, no. 11, s. 5981-5988, DOI: 10.21873/anticancerres.14618*). In the introduction section, the structure and function of ZYX are described. The further part of the publication concerns the role of this protein in the development and progression of different cancer types.

The second publication is classified as an original research paper describing the mRNA and protein ZYX levels in NSCLC clinical specimens as well as in chosen cell lines which constitute the *in vitro* model of this cancer (*Partyńska Aleksandra, Gomułkiewicz Agnieszka, Piotrowska Aleksandra, Grzegorzółka Jędrzej, Rzechonek Adam, Ratajczak-Wielgomas Katarzyna, Podhorska-Okolów Marzenna, Dzięgiel Piotr. Expression of zyxin in non-small cell lung cancer – a preliminary study. Biomolecules, 2022, Vol. 12, no. 6, art. 827, DOI: 10.3390/biom12060827*). Clinical sample studies were executed using the following methods: immunohistochemistry (IHC), Western Blot (WB), real-time PCR, and RT-qPCR performed on mRNA stemmed from cells isolated with laser microdissection. IHC technique was carried out on 399 NSCLC cases and 85 non-malignant lung tissue specimens, fixed in paraffin blocks and prepared as tissue microarrays. IHC reactions demonstrated the presence of ZYX in the cytoplasm, cell membrane, and nucleus of cancer cells and normal lung tissue cells. The statistical analysis showed significantly decreased level of cytoplasmic ZYX in NSCLC cells compared to normal tissue. However, the nuclear ZYX level was elevated in NSCLC cells in relation to normal lung cells. Further analyses showed higher nuclear ZYX level in SCC cells than in AC cells. The study also presented statistically decreased cytoplasmic ZYX levels in NSCLC cells and SCC cells of pT3-4 tumours in relation to pT1 tumours. Statistically lower cytoplasmic ZYX levels in NSCLC cells and SCC cells of stage III-IV compared to stage I were noticed. The results showed ZYX could not be considered an independent prognostic factor in NSCLC. Western Blot method demonstrated decreased ZYX protein level in NSCLC and SCC tumours compared to the control tissue. Real-time PCR studies presented lower ZYX mRNA levels in NSCLC and AC lesions than in normal lung tissue. In addition, RT-qPCR carried out on mRNA derived from cells isolated with laser microdissection showed decreased ZYX mRNA expression in NSCLC, SCC, and AC cells in comparison to normal lung cells.

The expression of ZYX was also investigated in NSCLC cell lines (lung squamous cell carcinoma cell line – NCI-H1703, lung adenocarcinoma cell line – NCI-H522) and in the

control cell line comprising normal lung fibroblast cell line IMR-90. The applied research methods included immunofluorescence, immunocytochemistry, Western Blot, and real-time PCR. Immunocytochemical reactions revealed the presence of *ZYX* in the cytoplasm. Moreover, immunofluorescence reactions demonstrated the residence of *ZYX* in the nucleus of the examined cells. The experiments performed on the cell lines showed decreased *ZYX* protein levels in NSCLC cell lines in relation to the control cell line IMR-90. In turn, real-time PCR analysis presented higher *ZYX* mRNA expression in the cell line NCI-H1703 than in the normal cell line IMR-90. Lower *ZYX* mRNA level was detected in the cell line NCI-H522 than in the control cell line IMR-90.

In conclusion, decreased *ZYX* expression in NSCLC cells in comparison to the control tissue suggests that *ZYX* might function as a suppressor protein in NSCLC development. Nevertheless, the obtained outcomes point out that *ZYX* does not exhibit the prognostic potential in this cancer type.