

STRESZCZENIE

Tesmina (ang. testis specific metallothionein like protein), zwane też MTL5 (ang. metallothionein like protein 5) jest białkiem o masie 55 kDa, posiadającym w swojej budowie sekwencje cysteinowe. Ta określona cecha budowy umożliwia tesminie oddziaływanie na DNA komórki jak również wiązanie metali ciężkich wpływając na ich homeostazę komórkową. Postuluje się, że tesmina może mieć wpływ na procesy związane z replikacją komórki i indukcją apoptozy jak również chronić komórkę przed stresem związanym z obecnością metali ciężkich. Właściwości te mogą odgrywać rolę w procesie kancerogenezy. Ponadto, opisywane cechy upodobniają ją funkcjonalnie do białek z rodziny metalotionein, których zaburzona ekspresja została potwierdzona w różnych rodzajach nowotworów. Dotychczas potwierdzono istotnie wyższą ekspresję tesminy w komórkach nowotworowych niedrobnokomórkowego raka płuc oraz raka płaskonabłonkowego szyjki macicy.

Rak żołądka stanowi globalnie piątą pod uwagę zapadalności oraz czwarty pod względem umieralności nowotwór złośliwy. Cechuje go skąpoobjawowy przebieg oraz częste rozpoznanie w stadium utrudniającym lub uniemożliwiającym całkowite wyleczenie. Najczęstszym typem histologicznym jest rak gruczołowy. Wśród czynników ryzyka wymienia się m. in. nieodpowiednią dietę, małą aktywność fizyczną, picie alkoholu, palenie tytoniu czy zakażenie bakterią *H. pylori*.

Celem mojej pracy było zbadanie ekspresji tesminy (*MTL5*) na poziomie mRNA i białka w komórkach raka oraz niezmięnionej nowotworowo tkance żołądka. Ponadto celem było określenie związku pomiędzy uzyskanymi rezultatami oraz danymi kliniczno-patologicznymi pacjentów, w tym przeżyciami całkowitymi chorych.

Materiał do przeprowadzonych badań stanowiły fragmenty guzów oraz zdrowej tkanki żołądka pobierane i archiwizowane z preparatów chirurgicznych pacjentów z potwierdzonym wcześniej histopatologicznie rakiem żołądka. Pobierany materiał był utrwalany w formalinie a następnie zabezpieczany w postaci bloczków parafinowych jak również w płynie RNAlater. Materiał ten pochodził od pacjentów operowanych w Klinice Chirurgii Ogólnej i Chirurgii Onkologicznej USK im. Jana Mikulicza-Radeckiego we Wrocławiu. Ponadto, uzyskano archiwalny materiał guzów nowotworowych w postaci bloczków parafinowych z Zakładu Patomorfologii i Cytologii Onkologicznej. Zgromadzony materiał badawczy stanowiło 85 przypadków raka żołądka oraz 38 przypadków niezmięnionej nowotworowo tkanki żołądka.

Na skrawkach parafinowych przeprowadzono reakcje immunohistochemiczne (IHC) z użyciem przeciwciał przeciwko tesminie oraz Ki-67. Ocenie podlegał stopień ekspresji cytoplazmatycznej i jądrowej ww. białek. Poziom ekspresji mRNA *MTL5* był określany za pomocą techniki Real-Time PCR. Uzyskane rezultaty były analizowane w odniesieniu do danych kliniczno-patologicznych (stopień złośliwości histologicznej, klasyfikacja stopnia zaawansowania nowotworu, typ nowotworu wg klasyfikacji Laurena, wiek oraz płeć pacjentów, wartości markerów nowotworowych, przeżycia całkowite pacjentów).

Wykazałem ekspresję mRNA *MTL5* oraz ekspresję IHC cytoplazmatyczną i jądrową tesminy i Ki-67 w komórkach raka żołądka oraz w komórkach zdrowej tkanki żołądka. Ekspresja mRNA *MTL5* oraz ekspresja IHC cytoplazmatyczna i jądrowa tesminy jak również Ki-67 były istotnie wyższe w przypadku raka żołądka (odpowiednio $p < 0,05$; $p < 0,0001$; $p < 0,05$; $p < 0,001$ test Manna-Whitney'a). Cytoplazmatyczna ekspresja tesminy korelowała istotnie dodatnio z ekspresją jądrową tesminy ($r = 0,2288$; $p < 0,05$) oraz ekspresją Ki-67 ($r = 0,3274$; $p < 0,01$). Dodatkowo wykazałem, że niższa, cytoplazmatyczną ekspresja tesminy korelowała z niższymi wartościami przeżyć ($p < 0,05$, test Mantela-Coxa).

W oparciu o przeprowadzone badania stwierdziłem ekspresję tesminy w prawidłowej tkance żołądka jak również w komórkach raka żołądka zarówno na poziomie mRNA i białka. Ponadto wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań wskazują na potencjalny udział tesminy w procesie transformacji nowotworowej raka żołądka.

SUMMARY

Tesmin (testis specific metallothionein like protein), also known as MTL5 (metallothionein like protein 5) is a 55 kDa weight protein that contains cysteine sequences in its structure. This specific structural feature enables tesmin to interact with cell DNA as well as bind heavy metals, conditioning their cellular homeostasis. It is considered that tesmin may affect the processes related to cell replication, induction of apoptosis and protection against heavy metal presence induced cellular stress. These properties may have impact on carcinogenesis process. In addition, described features determine tesmin's functional similarity to proteins from the metallothionein family, whose disturbed expression has been confirmed in various types of cancer. So far, significantly higher expression of tesmin has been described in cancer cells of non-small cell lung cancer and cervical cancer.

Globally, gastric cancer is the fifth most common malignant tumor in terms of incidence and the fourth most common in terms of mortality. It is characterized by oligosymptomatic course and frequent diagnosis at a stage that makes complete recovery difficult or impossible. The most common histological type is adenocarcinoma. Among the risk factors are poor diet, low physical activity, alcohol consumption, smoking or *H. pylori* infection.

The aim of my research was to investigate the cytoplasmic and nuclear expression of tesmin (*MTL5*) at the mRNA and protein level in cancer cells and non-cancerous gastric tissue. Additionally, we tried to determine the relationship between the obtained results and clinical and pathological data of patients, including overall survival.

The material for the study consisted of fragments of tumors and healthy gastric tissue obtained from surgical specimens from patients with histopathologically confirmed gastric cancer. The collected material was partially fixed in formaline and then protected in the form

of paraffin blocks, partially fixed in RNAlater fluid. Collected material were obtained from patients operated in the Department of General Surgery and Oncological Surgery of University Clinical Hospital in Wrocław. In addition, archival material of cancer tumors in the form of paraffin blocks was obtained from the Department of Pathology and Oncological Cytology. The research material consisted of 85 cases of gastric cancer and 38 cases of non-cancerous gastric tissue.

Immunohistochemical (IHC) reactions were performed on paraffin sections using antibodies against tesmin and Ki-67. The degree of cytoplasmic and nuclear expression of tesmin as well as Ki-67 was evaluated. mRNA *MTL5* expression level was determined by Real-Time PCR technique. The obtained results were analyzed in relation to clinicopathological data (histological malignancy, tumor staging, type of tumor according to Lauren's classification, patients age and sex, tumor marker values, overall survival patients data).

I demonstrated expression of mRNA *MTL5* and IHC cytoplasmic and nuclear expression of tesmin and Ki-67 in gastric cancer and normal gastric tissue cells. The expression of mRNA *MTL5* and IHC cytoplasmic and nuclear expression of tesmin and Ki-67 was significantly higher cancer cells compared to healthy tissue ($p < 0,05$; $p < 0,0001$; $p < 0,05$; $p < 0,001$ Mann-Whitney test). Cytoplasmic tesmin expression correlated significantly positively with nuclear tesmin expression ($r = 0,2288$; $p < 0,05$) and Ki-67 expression ($r = 0,3274$; $p < 0,01$). In addition, I showed that lower cytoplasmic expression of tesmin correlated with lower survival rates ($p < 0,05$, Mantel-Cox test).

Based on the conducted research, I found the expression of tesmin in normal gastric tissue as well as in gastric cancer cells, both at the mRNA and protein level. In addition, results of my research indicate the potential involvement of tesmin in the process of malignant transformation in gastric cancer.