

Streszczenie

Według danych Krajowego Rejestru Nowotworów, najczęstszym w Polsce nowotworem złośliwym wśród mężczyzn jest rak płuc (21.4% zachorowań i 31,2% zgonów). Z kolei u kobiet znajduje się on na drugim miejscu pod względem liczby występujących przypadków (8.6%) i na pierwszym miejscu biorąc pod uwagę śmiertelność (15% zgonów). Główną przyczyną zapadalności na raka płuc jest ekspozycja organizmu na szkodliwe, karcinogenne substancje chemiczne. Uważa się, że najczęstszym i najważniejszym czynnikiem ryzyka dla wszystkich histologicznych typów raka płuc, odpowiedzialnym za rozwój około 85% przypadków, jest palenie tytoniu.

Strategia leczenia chorych z niedrobnokomórkowym rakiem płuc (NSCLC) jest ustalana dla każdego przypadku indywidualnie, w zależności od stopnia zaawansowania nowotworu. Główną wadą stosowania standardowej chemioterapii jest mała selektywność w stosunku do komórek nowotworowych, gdyż substancje stosowane w leczeniu raka płuc działają również szkodliwie na zdrowe, niezmiennione nowotworowo komórki organizmu.

Zapotrzebowanie na leki przeciwnowotworowe jest wciąż ogromne, a leki obecnie stosowane w terapii antynowotworowej, obok pożądanego efektu terapeutycznego wywołują szereg poważnych skutków ubocznych, drastycznie obniżając standard życia chorego. Natomiast, najnowsze terapie wykorzystujące przeciwciała monoklonalne są niezwykle kosztowne. Dlatego wciąż poszukuje się nowych leków, równie skutecznych ale charakteryzujących się niską toksycznością oraz nie wywołujących efektów ubocznych.

Cząsteczki miRNA, wg licznych badań eksperymentalnych, charakteryzuje bardzo niska, jeśli nie zerowa cytotoksyczność w stosunku do zdrowych komórek i narządów pacjenta. Podobnie, jak ma to miejsce w przypadku raka jelita grubego, gdzie międzynarodowe badania zidentyfikowały związek między ekspresją szczególnego rodzaju miRNA a prognozowaniem oraz wyborem leczenia pacjentów z tym typem nowotworu, tak również w przypadku niedrobnokomórkowego raka płuc, być może możliwe będzie ustalenie grupy cząsteczek miRNA pomocnych w jego prognostyce i leczeniu.

Sam fakt wytypowania nowotworowo specyficznych markerów (miRNA), kluczowych dla rozwoju nowotworu genów, kładzie solidne podwaliny pod nowoczesną celowaną terapię antynowotworową, pomimo stosunkowo ograniczonej jeszcze wiedzy na temat roli tych epigenetycznych czynników w patogenezie choroby nowotworowej. Perspektywa zastosowania miRNA oddziałującego z transkryptem genu *SOX18* w leczeniu gruczolaka

płuc (AC) oraz płaskonabłonkowego raka płuc (LSCC) wydaje się obiecująca, ponieważ istnieje już wiele podobnych innych cząsteczek miRNA o udowodnionych funkcjach pro- lub antynowotworowych.

Zmienne poziomy interesujących nas cząsteczek miRNA mogą być wykrywane we krwi pacjenta, co dodatkowo zwiększa dostępność oraz powszechność zastosowania ich w diagnostyce raka płuc. Dostarczają one wiadomości nie tylko o typie, ale również o stadium rozwoju nowotworu. Wnikliwe przebadanie poziomu ekspresji mRNA *SOX18* oraz cząsteczek miR-7a i miR-24-3p może pomóc w przyszłej diagnostyce gruczolaka oraz płaskonabłonkowego raka płuc, a nawet stanowić kluczowy aspekt w terapii antynowotworowej.

Na możliwość wykorzystania miRNA w prognostyce, wskazuje korelacja pomiędzy profilami ich ekspresji a przeżywalnością pacjentów. Wykazano m.in. związek pomiędzy poziomem ekspresji ośmiu miRNA i przeżywalnością pacjentów z gruczolakiem płuc. Obiecująco przedstawia się również perspektywa zastosowania miRNA w terapii antynowotworowej.

Rola ekspresji białek SOX w NSCLC nie jest do końca poznana, jednakże biorąc pod uwagę wcześniejsze doniesienia, białka te mogą być znaczącymi czynnikami wpływającymi na rozwój i progresję NSCLC. Zaprezentowane w pracy wyniki badań pokazują dysproporcję w ilości mRNA *SOX18* w stosunku do ilości białka, co związane jest z regulacją procesu translacji przez cząsteczki miR-7a i miR-24-3p.

Badania immunohistochemiczne (IHC) przeprowadzone zostały na grupie 45 przypadków niedrobnokomórkowego raka płuc (25 przypadków płaskonabłonkowego raka płuc i 20 przypadków gruczolaka płuc). Do badań molekularnych wykorzystano 45 par NSCLC oraz tkanki płucnej niezmięnionej nowotworowo z pogranicza guza (ang. *non-malignant lung tissue* - *NMLT*) oraz linie komórkowe raka płuc (NCI-H1703, NCI-H522 i A549). We wszystkich badanych przypadkach reakcja IHC miała charakter jądrowy. Zaobserwowano obecność czynnika transkrypcyjnego SOX18 w jądrach komórek NSCLC, jądrach śródbłonna naczyń krwionośnych oraz brak tego białka w materiale kontrolnym *NMLT*. Analiza wyników RT-qPCR wskazała na wzrost ekspresji mRNA dla genu *SOX18* w przypadkach NSCLC w stosunku do przypadków *NMLT* ($p=0.019$). Natomiast analiza rezultatów otrzymanych z wykorzystaniem metody western blot (WB) wykazała sytuację odwrotną: wyższy poziom białka SOX18 w przypadkach NSCLC w porównaniu do przypadków *NMLT* ($p<0.0001$). Spośród panelu miRNA, które wg bioinformatycznej analizy najpewniej oddziaływać mogą z transkryptem *SOX18*, tylko 2 cząsteczki: miR-7a i miR-24-3p

charakteryzowała istotnie statystycznie wyższa ekspresja w przypadkach NMLT w stosunku do przypadków NSCLC ($p < 0.001$). Bezpośredniego dowodu na wpływ cząsteczek miR-7a i miR-24-3p na transkrypt *SOX18* dostarczyła metoda RISC-Trap. Wykazano jednoznacznie hamowanie ekspresji mRNA *SOX18* poprzez cząsteczki miRNA w liniach raka płuc NCI-H1703, NCI-H522 oraz A549. W oparciu o zaprezentowane w przedstawionej pracy doktorskiej wyniki badań, jak również dotychczasowe dane literaturowe, udało się wskazać po raz pierwszy, na istnienie mechanizmu znoszenia ekspresji *SOX18* w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc z udziałem cząsteczek miR-7a i miR-24-3p. Wnikliwsze przebadania tego epigenetycznego mechanizmu pozwoli na pełniejsze zrozumienie molekularnych podstaw rozwoju NSCLC, a w przyszłości przyczynić się może do rozwoju nowej terapii celowanej, opartej na białkach z rodziny SOX.

Summary

According to data from the National Cancer Registry, the most common malignant tumour among men in Poland is lung cancer (21.4% of cases and 31.2% of deaths). By contrast, lung cancer among women is in second place in terms of the number of existing cases (8.6%), and in first place when it comes to mortality (15% mortality).

The main cause of lung cancer is the exposure of the organism to harmful, carcinogenic chemical substances. It is believed that the most common and most important risk factor for all histological types of lung cancer, responsible for the development of about 85% of the cases, is smoking.

The treatment strategy of patients with non-small-cell lung carcinoma (NSCLC) is determined for each case individually depending on the tumour stage. The main disadvantage of the use of standard chemotherapy is the low selectivity in relation to cancer cells, because the substances used in the treatment of lung cancer are also harmful to healthy unchanged cells.

The demand for drugs against cancer is still high, and the therapeutics currently used in anticancer therapy, in addition to the desired therapeutic effects, cause a number of severe side effects that drastically lower the patient's quality of life. The latest available therapies, which use antibodies, are very expensive. Because of that, new drugs, equally effective but with low toxicity and no side effects, are still being sought.

According to numerous experimental studies, miRNA molecules are characterized by very low, if not zero, cytotoxicity in relation to the healthy cells and organs of the patient. As it is the case for colon cancer, where international studies have identified the relationship between the expression of a specific type of miRNA and the prognosis and selection of the treatment of patients with this type of cancer, in the case of NSCLC it may be possible to determine the group of miRNA molecules that could help in its prognosis and treatment.

The very fact that specific markers (miRNAs), crucial for the development of cancer genes, can be identified lays a solid foundation for modern anti-cancer targeted therapy, despite the relatively limited knowledge we still have about the role of these epigenetic factors in the pathogenesis of cancer. The prospect of the use of miRNAs interacting with the *SOX18* gene transcript in the treatment of lung adenocarcinoma (AC) and squamous cell lung cancer (LSCC) seems promising, since there are already many similar miRNA molecules with proven pro- or anti-cancer functions.

The variable levels of the miRNA molecules we are interested in may be detected in the blood of the patient, which increases the availability and universality of the use of these

molecules in lung cancer diagnosis, as they provide information not only about the type, but also about the stage of the tumour. A careful examination of the mRNA expression levels of *SOX18* and the molecules miR-7a and miR-24-3p could be used in future diagnosis of adenocarcinoma and squamous-cell lung carcinoma, and could even become a key aspect in anti-cancer therapy.

The correlation between the expression profiles and the patients' survival rate points to the possibility of using miRNA in cancer prognosis. For example, it has been shown there is a relation between the expression level of eight miRNAs and the survival of patients with lung adenocarcinoma. Moreover, the prospect of using miRNA in anti-cancer therapy also seems to be promising.

The role of the expression of the SOX proteins in NSCLC is still not fully understood, although taking into account previous studies, these proteins may be significant factors in the development and progression of NSCLC. The results presented in this dissertation show a disproportion in the amount of *SOX18* mRNA relative to the amount of protein. This may be associated with the regulation of the translation by the molecules miR-7a and miR-23-3p.

Immunohistochemical (IHC) tests were conducted on a group of 45 cases of NSCLC (25 cases of SqCLC and 20 cases of lung AC). For the molecular studies, 45 pairs of NSCLC and non-malignant lung tissue (NMLT) as well as the lung cancer cell lines NCI-H1703, NCI-H522 and A549 were used. In all the cases studied, the IHC was nuclear. We were able to observe the presence of transcription factor in the nuclei of the NSCLC cells and the nuclei of the endothelial cells, as well as a lack of *SOX18* protein level in the NMLT control material. The analysis of the RT-qPCR results indicated an increase in mRNA expression for the *SOX18* gene in the NSCLC cases in relation to the NMLT cases ($p=0.019$). However, the analysis of the WB results showed the opposite: a higher level of the *SOX18* protein in the NSCLC cases compared to the NMLT cases ($p<0.0001$). Among the miRNAs that according to bioinformatic analyses may most likely interact with the *SOX18* transcript, only two molecules (miR-7a and miR-24-3p) were characterized by a statistically significantly higher expression in the NMLT cases compared to the NSCLC cases ($p<0.001$). Direct proof of the effect of miR-7a and miR-24-3p on the *SOX18* transcript was provided by the RISC-Trap method. The inhibition of the *SOX18* mRNA expression through miRNA molecules in the NCI-H1703, NCI-H522 and A549 lung carcinoma cell lines was clearly demonstrated. Based on the results presented in this dissertation as well as on the data published in previous literature, we were able to identify for the very first time the existence of a mechanism of suppression of the expression of *SOX18* in NSCLC cells with the participation of the molecules miR-7a and miR-24-3p. Thorough testing

of these epigenetic processes will allow for a fuller understanding of the molecular basis of the development of NSCLC, and it may contribute in the future to the development of new targeted therapy based on SOX proteins.