



**UNIwersytet Medyczny**  
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

**Lekarz weterynarii Olga Rodak**

doktorantka

Katedra Morfologii i Embriologii Człowieka

Zakład Histologii i Embriologii

Tytuł pracy doktorskiej:

**Antyproliferacyjne działanie inhibitora czynnika transkrypcyjnego SOX18  
w niedrobnokomórkowym raku płuc**

**Promotorzy:**

prof. dr hab. Piotr Dzięciel

prof. dr hab. Maciej Ugorski

Wrocław, 13.09.2023

## STRESZCZENIE

Badanie aktywności czynników transkrypcyjnych w transformacji nowotworowej jest niezmiernie istotne. Zmiany w ich ekspresji prowadzą do przeprogramowania mechanizmów molekularnych, kierujących procesami życiowymi komórek. Między innymi, wzmożona aktywność czynników transkrypcyjnych może prowadzić do patologicznego podtrzymania aktywności cyklu komórkowego, pomimo współistniejącego stresu komórkowego. Ze względu na nie w pełni poznaną strukturę czynników transkrypcyjnych oraz ich złożone interakcje, opracowanie ich inhibitorów stanowi duże wyzwanie. Dotychczasowe badania koncentrowały się jedynie na modulacji ekspresji genów. Jednakże, w ostatnich latach opracowano inhibitory specyficzne dla poszczególnych czynników transkrypcyjnych, czego przykładem jest inhibitor Sm4, który hamuje aktywność transkrypcyjną czynnika SOX18.

SOX18, białko należące do rodziny SOX (ang. sex determining region Y-related high-mobility group box), pełni kluczową rolę w regulacji transkrypcji podczas rozwoju zarodkowego. SOX18, wraz z SOX7 i SOX17, tworzą podgrupę białek SOXF, odpowiedzialną za rozwój układu sercowo-naczyniowego, limfangiogenezę i różnicowanie komórek krwi. Ostatnie doniesienia wskazują także na ich udział w gojeniu ran, neowaskularyzacji i modulacji bariery śródbłonkowej. Białka SOXF, a zwłaszcza SOX18, zyskały uwagę ze względu na istotne zmiany ekspresji w komórkach nowotworowych, które powiązano z ich aktywnością w procesach naprawczych tkanek. W przeciwieństwie do pozostałych białek SOXF, SOX18 prezentuje unikalną zdolność do formowania homodimeru, co może przyczyniać się do jego onkogennej natury. Udowodniono, że SOX18 promuje migrację, inwazję i proliferację w wielu typach nowotworów. Z kolei badanie, dotyczące raka tarczycy wskazało, iż pełni rolę przeciwnowotworową, ujawniając złożoną aktywność białka SOX18 zależną od molekularnego kontekstu.

Choć udział białka SOX18 w transformacji nowotworowej czyni go potencjalnym celem terapeutycznym, to jego rola w patogenezie niedrobnokomórkowego raka płuc (NDRP) nie została wyjaśniona. NDRP jest najczęściej diagnozowaną chorobą nowotworową na świecie. Podczas gdy globalne tendencje w zachorowalności na NDRP zaczęły spadać, w poszczególnych rejonach świata obserwujemy znaczne zróżnicowanie wskaźników występowania, co ściśle wiąże się z poziomem edukacji i rozwoju ekonomicznego. Ponadto, NDRP cechuje się jednym z najwyższych wskaźników śmiertelności na świecie. Skutkiem czego jest rosnąca liczba badań naukowych, które umożliwiają opracowanie nowych strategii

diagnostycznych oraz terapeutycznych. Uaktualniona klasyfikacja histopatologiczna, genotypowanie komórek guza, czy wprowadzenie terapii celowanej dla zaawansowanych stadiów choroby, istotnie przyczyniły się do wzrostu wskaźników prognostycznych w NDRP. Szczególnie ważny jest trend medycyny spersonalizowanej, który skupia się na rozpoznawaniu znanych mutacji genetycznych w komórkach raka płuc, nazywanych „mutacjami kierującymi” transformacją nowotworową. Rozpoznanie mutacji pozwala na zastosowanie terapii inhibitorami, specyficznymi dla nieprawidłowo funkcjonujących białek. Rosnąca grupa zatwierdzonych leków dla terapii celowanej w NDRP umożliwia terapeutyczne modulowanie następujących białek: rodziny EGFR (ERBB-1, ERBB-2), ALK, ROS1, MET, RET, NTRK i RAF. Niemniej jednak, wciąż u znacznej części chorych nie stwierdza się obecności mutacji powyższych białek, pozostawiając ich bez możliwości skorzystania z terapii celowanej. Stąd, tak ważne jest poszukiwanie nowych celów terapeutycznych, czego przykładem są badania nad oceną antyproliferacyjnego potencjału inhibitora SOX18 w raku płuc.

W niniejszej pracy doktorskiej zbadano wpływ Sm4 - inhibitora białka SOX18, na regulację cyklu komórkowego w liniach komórkowych niedrobnokomórkowego raka płuc, tj. LXF-289 (gruczolakoraka) SK-MES-1 (raka płaskonabłokowego), oraz linii fibroblastów płucnych IMR-90. Ocenie podlegała cytotoksyczność związku Sm4, wykonana metodą MTT. Następnie przeprowadzono doświadczenia, w których komórki otrzymywały inhibitor w stężeniu 10  $\mu$ M lub 20  $\mu$ M przez 72h. Zmiany cyklu komórkowego zostały ocenione poprzez znakowanie DNA jodkiem propidyny oraz detekcję komórek z użyciem cytometru przepływowego. W celu potwierdzenia uzyskanych wyników, wykonano ocenę ekspresji cyklin A1, D, E na poziomie mRNA oraz białka, odpowiednio technikami q-PCR oraz Western blot. Następnie, wykorzystując tożsame techniki biologii molekularnej określono poziom ekspresji genów oraz białek grupy SOXF oraz białka p21. Dla potwierdzenia uzyskanych wyników ocenie poddano archiwalny materiał tkankowy z guzów płuc, w którym za pomocą metody immunohistochemicznej określono ekspresji białek SOX18 oraz p21.

Uzyskane wyniki potwierdziły, że Sm4 wykazuje działanie cytotoksyczne we wszystkich trzech liniach komórkowych. Inhibitor w stężeniu 20  $\mu$ M wywołał akumulację komórek nowotworowych w fazie replikacji DNA (S), co zostało potwierdzone istotnie mniejszą ekspresją cyklin D oraz E. Analiza ekspresji białek SOXF wykazała, iż hamowanie aktywności białka SOX18, nie indukuje wzrostu stężenia białek SOX7 lub SOX17. Pomimo braku znaczących zmian w ekspresji białek, Sm4 spowodował istotne zwiększenie ekspresji genu *SOX17*, co częściowo podtrzymuje tezę o silnym powiązaniu mechanizmów transkrypcyjnych

tych białek. Jednakże, prawdopodobnie w wyniku procesów na poziomie epigenetycznym, zwiększony poziom mRNA *SOX17*, nie przekłada się na zwiększony poziom białka. Poszukiwania białka odpowiedzialnego za hamowanie cyklu komórkowego wywołanego inhibitorem Sm4, wykazały aktywację ekspresji genu *CDKN1A* oraz konsekwentnie, istotnie zwiększoną ekspresję kodowanego przez niego białka – p21. Inhibitor kinaz cyklinozależnych 1A (p21) jest kluczowym białkiem regulującym przejście z fazy S do G2/M. Zatem, uzyskane wyniki sugerują złożoną interakcję między SOX18 a p21 w kontekście raka płuc. Ostatecznym potwierdzeniem związku między białkami była analiza materiału klinicznego, która wykazała dodatnią korelację między nasileniem ekspresji cytoplazmatycznej SOX18, która może świadczyć o braku aktywności białka, a obecnością p21 w jądrze komórkowym.

Przedstawione w pracy wyniki wskazują na potencjał Sm4 jako inhibitora cyklu komórkowego komórek nowotworowych poprzez pośrednią aktywację białka p21. Niemniej jednak, należy podkreślić, iż konieczna jest kontynuacja badań, by w pełni zrozumieć związek między SOX18 a p21 w raku płuc, jak również zbadać potencjał terapeutyczny hamowania SOX18.

## SUMMARY

Investigating transcription factor activity is essential due to their varying expression in pathological conditions, such as cancer, where altered molecular networks sustain cell divisions under stress. Developing pharmacological TF inhibitors is challenging due to not fully discovered structure and their complex interactions. Previous studies have focused on gene expression modulation, but recent research has explored TF-specific inhibitors. For instance, the Sm4 inhibitor effectively disrupts SOX18's transcriptional activity.

SOX18, a member of the SOX family (sex determining region Y-related high-mobility group box), plays a pivotal role in transcriptional regulation during embryogenesis. SOX18, along with SOX7 and SOX17, forms the SOXF subgroup responsible for cardiovascular development, lymphangiogenesis, and blood cell differentiation. Emerging evidence indicates their involvement in wound healing, neovascularisation, and endothelial barrier modulation. In cancer research, SOXF proteins, particularly SOX18, have gained attention due to their altered expression levels in cancer cells which aligns with their activity during tissue repairment processes. Unlike other SOXF proteins, SOX18 presents unique mode of action as a homodimer, which may contribute to its tumorigenic role. SOX18 exhibits an oncogenic role in promoting migration, invasion, and proliferation across diverse cancer types. However, a study on thyroid cancer cell lines indicated its role as a tumor suppressor, revealing its complex context-dependent activity.

While the activity of SOX18 in carcinogenesis underscores it as a potential cancer therapeutic target, its transcriptional regulation mechanisms in non-small cell lung cancer (NSCLC) are not yet fully understood. NSCLC is the most frequently diagnosed cancer in the world. When the global trends in NSCLC incidence have started to decline, we can observe region-dependent differences related to the education and the economic level. Moreover, NSCLC presents one of the highest mortality worldwide. To overcome this issue, an increasing understanding of NSCLC biology provided new diagnostic and therapeutic strategies. The reorganization of histopathological classification, tumor genotyping, or introduction of targeted therapy for advanced states of the disease are relevant in increasing prognostic factors. Precision medicine is focused on the recognition of a genetic mutation in lung cancer cells called “driver mutation” to provide a variety of specific inhibitors of improperly functioning proteins. Growing group of approved drugs for targeted therapy in NSCLC currently allows the following mutated proteins to be modulated: EGFR family (ERBB-1, ERBB-2), ALK, ROS1, MET, RET, NTRK, and

RAF. Nevertheless, treatable mutations are not being detected in a substantial portion of NSCLC patients, leaving them without the possibility of targeted treatment. Therefore, it is of utmost importance to investigate novel therapeutic targets, such as study on antiproliferative potential of SOX18 inhibitor in NSCLC treatment.

In this doctoral thesis, the impact of Sm4, an inhibitor of the SOX18, on the cell cycle regulation in non-small cell lung cancer cell lines was investigated. These cell lines included LXF-289 (adenocarcinoma), SK-MES-1 (squamous cell carcinoma), and the IMR-90 lung fibroblast cell line. The cytotoxicity of the Sm4 compound was assessed using the MTT method. Subsequently, experiments were conducted in which cells were treated with the inhibitor at concentrations of 10  $\mu$ M or 20  $\mu$ M for 72 hours. Cell cycle disturbances were examined through DNA labeling with propidium iodide and cell detection using flow cytometry. To confirm the obtained results, the expression of cyclins A1, D, and E was evaluated at the mRNA and protein levels using respectively q-PCR and Western blot techniques. Subsequently, employing identical molecular biology techniques, the expression levels of SOXF group genes and proteins, as well as the p21, were determined. To validate the obtained results, tissue material from lung tumors was subjected to immunohistochemical methods to determine the expression of SOX18 and p21 proteins.

The obtained results confirmed that Sm4 exhibits cytotoxic activity in all three cell lines. Treatment with the Sm4 inhibitor resulted in cell accumulation in the S phase, as confirmed by the cyclin expression level results. The expression results of SOXF proteins allowed us to reject the research hypothesis that inhibiting the activity of SOX18 would induce the expression of SOX7 or SOX17 proteins, which are known for their anti-proliferative properties. Despite the lack of significant changes in the expression of SOX7 or SOX17 proteins, Sm4 led to a significant increase in the expression of the SOX17 gene, partially supporting the hypothesis of transcriptional interactions of these proteins. However, likely due to epigenetic processes, the increased level of SOX17 mRNA did not translate into an increased expression level of the protein. Further experiments revealed the activation of *CDKN1A* gene expression and consequently, a significantly increased protein expression - p21, as the protein responsible for inhibiting the cell cycle induced by the Sm4 inhibitor. The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A (p21) is a key protein that regulates the transition from the S phase to the G2/M phase. Therefore, the obtained results suggest a complex interaction between SOX18 and p21 in the context of lung cancer. The ultimate confirmation of the relationship between the proteins was the analysis of clinical material, which revealed a positive correlation between the intensity of

cytoplasmic SOX18 expression, indicating protein inactivity, and the presence of p21 in the cell nucleus.

The results presented in this study indicate the potential of Sm4 as an inhibitor of the cell cycle and the growth of cancer cells through indirect activation of the p21 protein. However, it should be emphasized that further research is necessary to fully understand the relationship between SOX18 and p21 in lung cancer, as well as to explore the therapeutic potential of inhibiting SOX18 in lung cancer treatment.