

## 1. Streszczenie

Pomimo rozwoju diagnostyki oraz metod leczenia rak płuca oraz rak gruczołu piersiowego nadal pozostają jedną z głównych przyczyn śmiertelności na świecie.

Rak płuca obejmuje: niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC, ang. *non-small cell lung carcinoma*) stanowiącego 80% wszystkich przypadków oraz drobnokomórkowego raka płuca (SCLC, ang. *small cell lung carcinoma*) – 20% przypadków. Wśród NSCLC wyróżnia się: gruczolakoraka (AC, ang. *adenocarcinoma*; ~40%), płaskonabłonkowego raka płuca (SCC, ang. *squamous cell carcinoma*; ~30%) i wielkokomórkowego raka płuca (LCC, ang. *large-cell carcinoma*; ~10%).

Natomiast rak gruczołu piersiowego (BC, ang. *breast cancer*) wykazuje dużą różnorodność i obejmuje kilka podtypów molekularnych, m.in. luminalny A (ang. *luminal A*), luminalny B, HER2+, seminormalny (ang. *normal breast-like*), podstawny (BLBC, ang. *basal-like breast cancer*), potrójnie negatywny (TN, ang. *triple negative*). Ze względu na wysoką zapadalność i śmiertelność z powodu tych chorób niezbędne wydaje się poszukiwanie nowych markerów prognostycznych.

B-cell leukemia/lymphoma 11A (BCL11A) to czynnik transkrypcyjny zawierający domeny palca cynkowego C2H2. Dotychczas wyróżniono 5 izoform BCL11A różniących się długością, masą cząsteczkową oraz zawartością domen. BCL11A m.in. reguluje transkrypcję genów uczestniczących w procesach podziałów komórkowych i apoptozy. Wykazano oddziaływanie BCL11A z białkami antyapoptotycznymi BCL2 i BCL-XL, a także negatywnymi regulatorami białka p53: MDM2, MDM4 oraz SIRT1. Dodatkowo, badania na liniach komórkowych chłoniaka Burkitta EB1 i chłoniaka rozlanego z dużych komórek B SU-DHL-6 dowiodły, że zahamowanie ekspresji genu BCL11A za pomocą siRNA redukuje żywotność komórek oraz kieruje je na drogę apoptozy. Łącznie sugeruje to, że BCL11A może mieć działanie antyapoptotyczne i może uczestniczyć w procesie karcinogenezy. Podwyższony poziom ekspresji BCL11A dowiedziono w różnych typach nowotworów, m.in. raku prostaty, jelita grubego oraz chłoniakach i białaczkach B-komórkowych. Wyższy poziom BCL11A wiązał się z rozwojem nowotworu oraz gorszym rokowaniem dla pacjentów.

Pomimo dostępnych badań opisujących udział badanego białka w procesie karcinogenezy, niewiele doniesień dotyczy jego roli w NSCLC. Jiang i wsp. zaobserwowali 3-krotnie wyższą ekspresję mRNA BCL11A w NSCLC niż w tkance prawidłowej. Dodatkowo wysoka ekspresja tego białka wiąże się z paleniem tytoniu, podtypem

histologicznym SCC oraz z lepszym rokowaniem pacjentów z SCC. Te wyniki częściowo potwierdziły badania Boelens i wsp. oraz Zhang i wsp. z tym, że dotyczyły one najdłuższej izoformy białka – BCL11A-XL. Przeciwnie wyniki otrzymali natomiast Liao i wsp., którzy wykazali, że wysoka ekspresja BCL11A wiąże się z gorszym rokowaniem.

Do tej pory ukazało się jedynie kilka prac dotyczących znaczenia BCL11A w BC. Ke i wsp. wykazali wyższą ekspresję tego białka w komórkach BC w porównaniu do komórek prawidłowych. Trzy inne badania wykazały nadekspresję BCL11A zarówno na poziomie mRNA, jak i białka w przypadkach podtypu podstawnego, jak i TN. Z kolei wysoka ekspresja BCL11A promowała tworzenie guza oraz korelowała dodatnio ze stopniem złośliwości histologicznej i stopniem zaawansowania klinicznego. Moody i wsp. dowiedli z kolei, że BCL11A wpływa na transkrypcję genów ważnych dla rozwoju komórek macierzystych raka gruczołu piersiowego (BCSC, ang. *breast cancer stem cells*). Z kolei Zhu i wsp. dowiedli, że BCL11A uczestniczy w przejściu epithelialno-mezenchymalnym (EMT, ang. *epithelial-mesenchymal transition*) komórek nowotworowych, promując tym samym tworzenie przerzutów. Pomimo, że pojawiło się kilka prac opisujących BCL11A w nowotworach gruczołu piersiowego, jego rola w tym typie nowotworu wymaga dalszych badań. Dlatego też celem naszych badań było określenie nasilenia ekspresji BCL11A w przypadkach niedrobnokomórkowego raka płuc oraz raka gruczołu piersiowego uzyskanych od pacjentów i skorelowanie otrzymanych wyników z danymi kliniczno-patologicznymi.

W pracy poglądowej pt. *Białko BCL11A - rola biologiczna i znaczenie w procesie nowotworowym* został przedstawiony przegląd piśmiennictwa dotyczącego roli ekspresji BCL11A w nowotworach człowieka oraz innych chorobach. We wstępie opisano budowę i izoformy białka oraz funkcje BCL11A. W dalszej części pracy skupiono się na roli tego białka w rozwoju i progresji różnych typów nowotworów. Na koniec przedstawiono związek białka BCL11A z innymi chorobami m.in. cukrzycą typu drugiego czy schizofrenią.

W pracy oryginalnej pt. *BCL11A expression in non-small cell lung cancers* opisano ekspresję BCL11A, zarówno na poziomie mRNA, jak i białka. Badania wykonano na materiale klinicznym pobranym od pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuc oraz na liniach komórkowych niedrobnokomórkowego raka płuc (NCI-H1703, A549) stanowiących model *in vitro*. Z wykorzystaniem reakcji immunohistochemicznych (IHC) oceniono poziom ekspresji oraz lokalizację: BCL11A, Ki-67 (marker proliferacji komórek), Slug, Snail i Twist (markery EMT). Grupa badawcza liczyła 259 przypadków niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC; w tym SCC – 96 przypadków oraz AC – 163 przypadki). Grupę kontrolną natomiast stanowił materiał prawidłowej tkanki płuc (NMLT) z marginesu cięcia

chirurgicznego. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej. Na tej podstawie wykazano istotnie wyższy poziom ekspresji BCL11A w przypadkach NSCLC w porównaniu do NMLT. Dodatkowo w SCC wykazano ekspresję jądrową, natomiast w AC ekspresję cytoplazmatyczną badanego białka. Ekspresja jądrowa BCL11A malała wraz ze wzrostem stopnia złośliwości oraz korelowała dodatnio z ekspresją Ki-67, Slug i Twist. W przypadku ekspresji cytoplazmatycznej BCL11A stwierdzono odwrotne zależności. Nie wykazano w pracy związku pomiędzy poziomem ekspresji BCL11A a całkowitym czasem przeżycia pacjentów z NSCLC. Badania real-time PCR pokazały wyższą ekspresję mRNA BCL11A w NSCLC niż w NMLT oraz wyższy poziom ekspresji w SCC niż w AC. Poziom i lokalizacja BCL11A została zbadana także w liniach komórkowych NSCLC: linii SCC – NCI-H1703 oraz linii AC – A549 oraz w linii komórkowej prawidłowych fibroblastów płuc IMR-90. Reakcje immunofluorescencyjne wykazały wyższy poziom badanego białka w liniach komórkowych NCI-H1703 oraz A549 w porównaniu do komórek kontrolnych (IMR-90). Ponadto linia NCI-H1703 (SCC) prezentowała ekspresję jądrową, a linia A549 (AC) ekspresję cytoplazmatyczną badanego białka. Analiza metodą real-time PCR wykazała wyższy poziom ekspresji mRNA BCL11A w liniach komórkowych NSCLC: NCI-H1703 oraz A549 w porównaniu do linii prawidłowych fibroblastów płuc IMR-90.

W pracy oryginalnej pt. *BCL11A expression in breast cancer* opisano ekspresję BCL11A, zarówno na poziomie mRNA, jak i białka. Badania przeprowadzono na materiale klinicznym pobranym od pacjentek z inwazyjnym rakiem przewodowym gruczołu piersiowego oraz na liniach komórkowych raka gruczołu piersiowego (MCF-7, SK-BR-3, MDA-MB-231, MDA-MB-468) stanowiących model *in vitro*. Z wykorzystaniem reakcji immunohistochemicznych (IHC) oceniono poziom ekspresji oraz lokalizację BCL11A. Grupa badawcza liczyła 200 przypadków inwazyjnego raka przewodowego gruczołu piersiowego. Grupę kontrolną natomiast stanowiły mastopatie. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej. Na tej podstawie wykazano cytoplazmatyczną ekspresję BCL11A oraz wyższy poziom ekspresji badanego białka w komórkach BC w porównaniu do mastopatii. Poziom ekspresji BCL11A był ujemnie skorelowany ze stopniem złośliwości histologicznej oraz z wielkością guza pierwotnego. Istotnie niższa ekspresja białka BCL11A została stwierdzona w przypadkach BC niewykazujących ekspresji receptorów estrogenowych (ER-) i progesteronowych (PR-) oraz w przypadkach potrójnie negatywnych (TN). Zaobserwowano również, że wyższy poziom ekspresji BCL11A w BC wiąże się z dłuższym całkowitym czasem przeżycia, jednak opisana zależność nie była istotna statystycznie. Badania real-time PCR nie pokazały istotnych statystycznie różnic w ekspresji mRNA BCL11A w rakach

gruczołu piersiowego w porównaniu do mastopatii. Poziom i lokalizacja BCL11A została zbadana także w liniach komórkowych BC (MCF-7, SK-BR-3, MDA-MB-231, MDA-MB-468) oraz linii komórkowej MCF-10A, wyprowadzonej z mastopatii. Reakcje immunofluorescencyjne wykazały ekspresję cytoplazmatyczną białka BCL11A we wszystkich 5 liniach komórkowych. Dodatkowo najwyższą ekspresję opisano w linii MCF-7 (odpowiadającej przypadkom BC o stopniu złośliwości G1), niższą ekspresję natomiast kolejno w liniach SK-BR-3 (G2), MDA-MB-468 (TN) oraz najniższą w linii MDA-MB-231 (G3). Komórki linii MCF-7 oraz SK-BR-3 wykazywały wyższy poziom BCL11A w porównaniu do komórek linii wywodzącej się z mastopatii (MCF-10A). Analiza metodą real-time PCR wykazała wysoką ekspresję mRNA BCL11A w linii SK-BR-3 oraz w linii MDA-MB-468. Niższy poziom mRNA BCL11A stwierdzono w liniach MCF-7 i MDA-MB-231.

Podsumowując, w powyższych pracach pokazano, że BCL11A może mieć znaczenie w rozwoju zarówno NSCLC, jak i BC. Jednak istnieje potrzeba dalszych, szczegółowych badań dotyczących BCL11A w NSCLC i BC, celem pełniejszego wyjaśnienia jego mechanizmu działania w tych typach nowotworów.

## 2. Summary

Despite the development of diagnostics and treatments, lung cancer and breast cancer remain among the leading causes of mortality worldwide.

Lung cancer includes: non-small cell lung carcinoma (NSCLC), which accounts for 80% of all cases, and small cell lung carcinoma (SCLC) - 20% of cases. NSCLC includes adenocarcinoma (AC; ~40%), squamous cell carcinoma (SCC; ~30%) and large-cell lung carcinoma (LCC; ~10%).

In contrast, breast cancer (BC) shows great diversity and includes several molecular subtypes, including luminal A, luminal B, HER2+, normal breast-like, basal-like breast cancer (BLBC), and triple negative (TN) BC. Due to the high incidence and mortality of these diseases, it seems necessary to search for new biomarkers.

B-cell leukemia/lymphoma 11A (BCL11A) is a transcription factor containing C2H2 zinc finger domains. To date, five isoforms of BCL11A have been distinguished, that differ in length, molecular weight, and domain content. Among other things, BCL11A participates in the regulation of transcription of genes involved in the processes of cell division and apoptosis. BCL11A has been shown to interact with the antiapoptotic proteins BCL2 and BCL-XL, as well as the negative regulators of the p53 protein MDM2, MDM4 and SIRT1. In addition, studies on Burkitt lymphoma (EB1) and diffuse large B-cell lymphoma (SU-DHL-6) cell lines demonstrated that siRNA-mediated inhibition of BCL11A gene expression reduces cell viability and directs cells toward apoptosis. These results suggest that BCL11A may have an anti-apoptotic effect and may participate in carcinogenesis. High expression of BCL11A have been proven in various types of cancer, including prostate cancer, colorectal cancer, and B-cell leukemias and lymphomas. Elevated levels of BCL11A were associated with tumor growth and a worse prognosis for patients.

Although many studies have demonstrated the involvement of BCL11A in carcinogenesis, only a few reports have addressed its role in NSCLC. Jiang et al. observed a 3-fold higher expression of BCL11A mRNA in NSCLC than in normal lung tissue. In addition, high expression of this protein is associated with smoking, the histologic subtype of SCC and a better prognosis of patients with SCC. These results were partially confirmed by the studies of Boelens et al. and Zhang et al. except that they involved the longest isoform of the protein, BCL11A-XL. In contrast, the opposite results were obtained by Liao et al., who showed that high BCL11A expression was associated with a worse prognosis.

To date, only a few papers have been published on the significance of BCL11A in BC. Ke et al. found higher expression of this protein in BC cells compared to normal cells. Three other studies showed overexpression of BCL11A at both mRNA and protein levels in cases of BLBC and TN subtypes. In turn, high expression of BCL11A promoted tumor formation and correlated positively with the grade of histological malignancy and clinical stage. Moody et al. proved that BCL11A affects the transcription of genes important for breast cancer stem cells (BCSCs) development. In addition, Zhu et al. showed that BCL11A participates in the epithelial-mesenchymal transition (EMT) of cancer cells, thereby promoting metastasis formation. Although there have been several papers describing BCL11A in breast cancers, its role in this type of cancer requires further investigation. Therefore, the purpose of our study was to determine the level of expression of BCL11A in cases of non-small cell lung carcinoma and breast cancer obtained from patients and correlate the results with the clinicopathological data.

The review paper, BCL11A protein - biological role and significance in cancer, presents an overview of the literature on the role of BCL11A expression in human cancers and other diseases. The introduction describes the structure, isoforms of the protein and the functions of BCL11A. The following section of the paper focuses on the role of this protein in the development and progression of various types of cancer. At the end of the article, the association of the BCL11A protein with other diseases including type two diabetes and schizophrenia is presented.

In the original paper titled BCL11A expression in non-small cell lung cancers, the expression of BCL11A was described, both at mRNA and protein levels. The study was performed on clinical specimens from patients with non-small cell lung carcinoma and on non-small cell lung cancer cell lines (NCI-H1703, A549) that serve as an *in vitro* model. Using immunohistochemical (IHC) reactions, localization and the expression levels were examined for: BCL11A, Ki-67 (a marker of cell proliferation), Slug, Snail and Twist (EMT markers). The study group included 259 cases of non-small cell lung carcinoma (NSCLC; including SCC - 96 cases and AC - 163 cases). In contrast, the control group consisted of normal lung tissue (NMLT) material obtained from tumor margins. The results obtained were subjected to statistical analysis. This showed significantly higher expression levels of BCL11A in NSCLC cases compared to NMLT. In addition, nuclear expression was found in SCC cells, while AC cells demonstrated cytoplasmic expression of the studied protein. Nuclear expression of BCL11A decreased with increasing malignancy grade and correlated positively with Ki-67, Slug and Twist expression. In the case of cytoplasmic expression of

BCL11A, the opposite dependencies were found. The study did not show an association between BCL11A expression levels and overall survival for patients with NSCLC. Real-time PCR studies showed higher BCL11A mRNA expression in NSCLC than in NMLT and higher expression levels in SCC than in AC. The level and localization of BCL11A was also examined in NSCLC cell lines: the NCI-H1703 SCC cell line and the A549 AC cell line, as well as in the IMR-90 normal lung fibroblast cell line. Immunofluorescence reactions showed higher levels of the tested protein in the NCI-H1703 and A549 cell lines compared to control cells (IMR-90). In addition, the NCI-H1703 SCC cell line presented nuclear expression, and the A549 AC line presented cytoplasmic expression of BCL11A. Real-time PCR analysis determined higher levels of BCL11A mRNA expression in NSCLC cell lines: NCI-H1703 and A549 compared to the IMR-90 normal lung fibroblast cell line.

The original paper titled BCL11A expression in breast cancer, described expression of BCL11A, both at mRNA and protein levels. The study was carried out on clinical specimens from patients with invasive ductal breast carcinoma of the breast and on breast cancer cell lines (MCF-7, SK-BR-3, MDA-MB-231, MDA-MB-468) representing an *in vitro* model. Using immunohistochemical (IHC) reactions, the expression level and localization of BCL11A were evaluated. The study group consisted of 200 cases of invasive ductal breast carcinoma. Whereas the control group included mastopathies. The obtained results were subjected to statistical analysis. This showed the cytoplasmic expression of BCL11A and a higher expression level of the studied protein in BC cells compared to mastopathy samples. The expression level of BCL11A was negatively correlated with grade of histological malignancy (G) and the primary tumor size. Significantly lower expression of BCL11A was found in BC cases that did not express estrogen or progesterone receptors, as well as in triple-negative (TN) cases. It was also observed that a higher BCL11A expression in BC was associated with a slightly longer survival of patients. However, the described correlation was not statistically significant. Real-time PCR studies showed no statistically significant differences in BCL11A mRNA expression in breast cancers compared to mastopathies. The level and localization of BCL11A was also examined in BC cell lines (MCF-7, SK-BR-3, MDA-MB-231, MDA-MB-468) and the MCF-10A cell line derived from mastopathy samples. Immunofluorescence reactions revealed cytoplasmic expression of BCL11A protein in all five cell lines. In addition, the highest expression of BCL11A was found in the MCF-7 cell line (corresponding to BC cases with malignancy grade G1), while lower expression was sequentially observed in the SK-BR-3 cell line (G2), the MDA-MB-468 cell line (TN) and the lowest expression in the MDA-MB-231 cell line (G3). The MCF-7 and SK-BR-3 cell lines

showed higher levels of BCL11A compared to the MCF-10A cell line derived from mastopathy samples. Real-time PCR analysis demonstrated high expression of BCL11A mRNA in the SK-BR-3 cell line and, in the MDA-MB-468 cell line. Lower levels of BCL11A mRNA were found in the MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines.

In conclusion, the above work has shown that BCL11A might be important in the development of both NSCLC and BC. However, further studies on BCL11A in NSCLC and BC are essential to more fully elucidate its mechanism of action in these tumor types.