



UNIwersytet Medyczny IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Według ostatnich statystyk, rak gruczołu piersiowego jest drugim najczęściej diagnozowanym nowotworem na świecie, odpowiadając za prawie 12% wszystkich nowych przypadków nowotworów. W związku z tak wysokim wskaźnikiem zachorowalności, rak gruczołu piersiowego stanowi nie tylko poważny globalny problem zdrowotny, ale także duże wyzwanie ekonomiczne. Pomimo znacznego postępu w zakresie diagnostyki oraz leczenia raka gruczołu piersiowego w przypadku wyższych stopni zaawansowania nowotworu, w których obecne są już przerzuty odległe przeżywalność 5-letnia wynosi zaledwie 30%. Wskazuje to na ciągle istniejącą potrzebę poszukiwania nowych biomarkerów diagnostycznych oraz celów terapeutycznych mających na celu wzrost jakości procesu diagnostycznego oraz leczniczego.

Białko RBMS 3 (Białko wiążące RNA z motywem oddziałującym z jednoniciowymi kwasami nukleinowymi 3, ang. RNA-binding motif single-stranded-interacting protein), jest bogatym w glicynę białkiem należącym do rodziny białek c-Myc (gene single-strand binding proteins MSSPs), opisanym po raz pierwszy w 2000 roku. Ekspresja RBMS 3, wiązana jest z wieloma procesami fizjologicznymi, takimi jak regulacja rozwoju embrionalnego trzustki oraz układu nerwowego, a także patologicznymi, między innymi marskości wątroby. Badania ostatnich lat wskazują dodatkowo na potencjalną rolę RBMS 3 jako markera prognostycznego oraz czynnika regulującego proces kancerogenezy w różnych typach nowotworów litych, takich jak rak jajnika, rak jamy nosowo-gardłowej czy rak żołądka. Dotychczas opublikowane, nieliczne dane literaturowe wykazały potencjalny związek pomiędzy ekspresją białka RBMS 3 a progresją raka gruczołu piersiowego.

Celem projektu stanowiącego przedmiot mojej rozprawy doktorskiej pt. „Rola białka RBMS 3 w raku gruczołu piersiowego” było określenie znaczenia poziomu ekspresji białka RBMS 3 w procesach uczestniczących w progresji raka gruczołu piersiowego, a także jego rokowniczego znaczenia.

Pierwsza publikacja wchodząca w skład cyklu (Górnicki T, Lambrinow J, Mrozowska M, Podhorska-Okołów M, Dzięgiel P, Grzegorzółka J. Role of RBMS3 Novel Potential Regulator of the EMT Phenomenon in Physiological and Pathological Processes. Int J Mol Sci. 2022 Sep

17;23(18):10875. DOI: 10.3390/ijms231810875.) jest pracą poglądową, mającą na celu usystematyzowanie aktualnego stanu wiedzy dotyczącego roli białka RBMS 3 w procesach fizjologicznych oraz patologicznych, ze szczególnym uwzględnieniem inicjacji i progresji nowotworów litych.

Druka publikacja stanowi oryginalny artykuł badawczy (Górnicki T, Lambrinow J, Mrozowska M, Romanowicz H, Smolarz B, Piotrowska A, Gomułkiewicz A, Podhorska-Okołów M, Dzięgiel P, Grzegorzółka J. Expression of RBMS3 in Breast Cancer Progression. *Int J Mol Sci.* 2023 Feb 2;24(3):2866. DOI: 10.3390/ijms24032866.), w którym przedstawiono wyniki badań z wykorzystaniem reakcji immunohistochemicznych przeprowadzonych na materiale klinicznym pochodzącym od 490 pacjentek, z rozpoznaniem inwazyjnego przewodowego raka gruczołu piersiowego. W publikacji przedstawiono także analizę dostępnych baz danych w zakresie przeżycia całkowitego pacjentów z wykorzystaniem narzędzia „Kaplan-Meier Plotter”. Opublikowane wyniki uwzględniały również analizy molekularne przy użyciu metod immunoblottingu (ang. western blot, WB) oraz ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. quantitative real time PCR, RT-qPCR), przeprowadzonych na komercyjnie dostępnych liniach komórkowych raka gruczołu piersiowego, reprezentujących podstawowe podtypy molekularne tego nowotworu. Rezultaty przeprowadzonych badań pokazały istotną statystycznie niższą ekspresję RBMS 3 w przypadkach raka w porównaniu do przypadków kontrolnych mastopatii. Ekspresja RBMS 3 w komórkach nowotworowych była pozytywnie skorelowana z dodatnim statusem receptora HER-2 oraz receptora estrogenowego. Ponadto, ekspresja RBMS 3 wykryta została także, w podścielisku raka gruczołu piersiowego. Analiza statystyczna wyników wykazała, iż poziom ekspresji RBMS 3 był istotnie wyższy w podścielisku niż w komórkach raka oraz w stosunku do przypadków kontrolnych. Co więcej zaobserwowano negatywną korelację ekspresji RBMS 3 w podścielisku w przypadkach potrójnie negatywnego raka gruczołu piersiowego (ang. triple negative breast cancer, TNBC), w stosunku do pozostałych grup oraz dodatnią korelację z ekspresją receptora estrogenowego oraz progesteronowego. Analiza danych klinicznych oraz internetowych baz danych wykazała pozytywną korelację, między ekspresją RBMS 3, a całkowitym czasem przeżycia. In vitro analiza ekspresji RBMS 3, w wybranych liniach komórkowych na poziomie mRNA oraz białka wykazała istotnie wyższy poziom białka RBMS 3 w najbardziej agresywnych podtypach raka gruczołu piersiowego: HER-2 dodatnim oraz potrójnie negatywnym.

Ostatnia publikacja wchodząca w skład cyklu (Górnicki T, Lambrinow J, Mrozowska M, Krawczyńska K, Staszko N, Kmiecik A, Piotrowska A, Gomułkiewicz A, Romanowicz H, Smolarz B, Podhorska-Okołów M, Grzegorzółka J, Rusak A, Grzegorzółka J, Impact of RBMS 3

Progression on Expression of EMT Markers. *Cells* 2024, Sep 13, 1548. DOI: 10.3390/cells13181548) jest oryginalną pracą badawczą oraz stanowi bezpośrednie rozwinięcie badań zaprezentowanych w poprzedniej publikacji. W artykule skupiono się na roli białka RBMS 3 w dwóch najbardziej agresywnych podtypach raka gruczołu piersiowego HER-2 dodatnim oraz TNBC, a także powiązaniem jego ekspresji z jednym z kluczowych procesów odpowiedzialnych za progresję w raku gruczołu piersiowego: procesem EMT. W publikacji przedstawiono wyniki badań przeprowadzonych na materiale klinicznym, jak i na funkcjonalnych modelach komórkowych HER-2 dodatniego oraz potrójnie negatywnego raka gruczołu piersiowego z nadekspresją oraz wyciszeniem białka RBMS 3. W publikacji wykorzystano metody analizy immunohistochemicznej, immunofluorescencyjnej oraz molekularnej. Wyniki badań przeprowadzone na materiale tkankowym wykazały pozytywną korelację ekspresji RBMS 3 ze znanymi markerami EMT: TWIST 1 (ang. twist-related protein 1), N-kadheryną (ang. neural cadherin, N-CAD) oraz SNAIL (ang. snail family transcriptional repressor 1). W grupie przypadków TNBC ekspresja RBMS 3 pozytywnie korelowała z TWIST 1, SLUG (ang. snail family transcriptional repressor 2) oraz E-kadheryną (ang. epithelial cadherin, E-CAD), natomiast w przypadkach HER-2 dodatnich nie zaobserwowano istotnych korelacji. Badania funkcjonalnych modeli in vitro z wykorzystaniem metod WB oraz RT-qPCR wykazały w przypadku modelu TNBC przy nadekspresji RBMS 3, wzrost ekspresji markerów promujących EMT, a w przypadku wyciszenia, spadek ekspresji markerów promujących EMT. Odwrotna sytuacja miała miejsce w przypadku modelu HER-2 dodatniego, gdzie nadekspresja RBMS 3 wywoływała spadek ekspresji markerów promujących EMT, a wyciszenie wzrost ich ekspresji. Ponadto, wykonany test migracji wykazał w modelu TNBC większe zdolności migracyjne komórek z nadekspresją RBMS 3, w stosunku do tych z wyciszonym białkiem. Rezultaty przeprowadzonej analizy ekspresji E-kadheryny oraz N-kadheryny za pomocą mikroskopii konfokalnej pozostawały w zgodzie z rezultatami otrzymanymi za pomocą metod molekularnych.

Rezultaty projektu przedstawiają RBMS 3 jako białko o potencjalnie bardzo złożonej funkcji w raku gruczołu piersiowego. Ekspresja RBMS 3 może odgrywać rolę nie tylko w komórkach nowotworowych, ale także w komórkach podścieliska, które stanowią istotną komponentę guza. W komórkach nowotworowych gruczołu piersiowego rola białka RBMS3 może zależeć od molekularnego typu nowotworu, co znajduje swoje odzwierciedlenie w zmianach ekspresji markerów EMT. Z klinicznego punktu widzenia, rezultaty badań przeprowadzone na materiale klinicznym wskazują na RBMS 3 jako przyszły potencjalny biomarker diagnostyczny, zaś badania in vitro mogą stanowić wstęp do dalszych doświadczeń, celem wykorzystania RBMS 3 jako punktu uchwytu w spersonalizowanej celowanej terapii

onkologicznej, w raku gruczołu piersiowego. W związku ze złożonymi mechanizmami działania, niezbędne są dalsze wnikliwe badania mające na celu poznanie dokładnych molekularnych mechanizmów leżących u podstawy roli białka RBMS 3 w raku gruczołu piersiowego, w szczególności w procesie EMT.

STRESZCZENIE W JEZYKU ANGIELSKIM

According to recent statistics, breast cancer is the second most commonly diagnosed cancer in the world, accounting for nearly 12% of all new cancer cases. Due to such a high incidence rate, breast cancer is not only a serious global health problem but also a significant economic challenge. Despite significant advances in the diagnosis and treatment of breast cancer, the 5-year survival rate for advanced breast cancer with distant metastases is only 30%. This indicates a continuous need to search for new diagnostic biomarkers and therapeutic targets in order to improve the quality of the diagnostic process and treatment.

RBMS 3 (RNA-binding motif single-stranded-interacting protein 3) is a glycine-rich protein which belongs to the c-Myc gene single-strand binding proteins (MSSPs) family, first described in the year 2000. The expression of RBMS 3 has been linked to a number of physiological processes, including the regulation of embryonic development of the pancreas and the nervous system, as well as pathological processes such as liver cirrhosis. Recent studies have indicated the potential of RBMS 3 to serve as a prognostic marker and a factor regulating the process of carcinogenesis in various types of tumours, including ovarian cancer, nasopharyngeal cancer, and gastric cancer. The existing literature provides evidence suggesting a potential correlation between RBMS 3 expression and the progression of breast cancer.

The aim of the project which is the subject of my doctoral dissertation entitled “The Role of RBMS 3 Protein in Breast Cancer” was to determine the significance of RBMS 3 protein expression levels in processes involved in breast cancer progression, as well as its prognostic value.

The first publication (Górnicki T, Lambrinow J, Mrozowska M, Podhorska-Okołów M, Dzięgiel P, Grzegorzółka J. Role of RBMS3: Novel Potential Regulator of the EMT Phenomenon in Physiological and Pathological Processes. *Int J Mol Sci.* 2022 Sep 17;23(18):10875. DOI: 10.3390/ijms231810875) is a review article aimed at systematizing the current knowledge regarding the role of RBMS 3 in physiological and pathological processes, with particular emphasis on the initiation and progression of solid tumours.

The second publication is an original research article (Górnicki T, Lambrinow J, Mrozowska M, Romanowicz H, Smolarz B, Piotrowska A, Gomułkiewicz A, Podhorska-Okołów M, Dzięgiel P, Grzegorzółka J. Expression of RBMS3 in Breast Cancer Progression. *Int J Mol Sci.* 2023 Feb 2;24(3):2866. DOI: 10.3390/ijms24032866.) which presents the results of studies utilizing immunohistochemical reactions performed on clinical material from 490 patients diagnosed with invasive ductal breast carcinoma. The publication also includes an analysis of

available databases regarding overall patient survival using the Kaplan-Meier Plotter tool. The published results further incorporate molecular analyses using western blot (WB) and quantitative real-time PCR (qRT-PCR) methods conducted on commercially available breast cancer cell lines representing the major molecular subtypes of this cancer. The results of the studies demonstrated a statistically significant lower expression of RBMS 3 in cancer cases compared to control cases of mastopathy. RBMS 3 expression in cancer cells was positively correlated with the status of the HER-2 receptor and the estrogen receptor. Additionally, RBMS 3 expression was also detected in the breast cancer stroma. The statistical analysis revealed that the expression level of RBMS 3 was significantly higher in the stroma compared to cancer cells and control cases. Moreover, a negative correlation was observed between RBMS 3 expression in the stroma in cases of triple-negative breast cancer (TNBC) compared to other groups, and a positive correlation with estrogen and progesterone receptor expression was also noted. Clinical data analysis and online database analysis showed a positive correlation between RBMS 3 expression and overall survival. In vitro analysis of RBMS 3 expression in selected cell lines at the mRNA and protein levels revealed a significantly higher level of RBMS 3 protein in the most aggressive subtypes of breast cancer: HER-2 positive and triple-negative.

The last publication included in the series (Górnicki T, Lambrinow J, Mrozowska M, Krawczyńska K, Staszko N, Kmiecik A, Piotrowska A, Gomułkiewicz A, Romanowicz H, Smolarz B, Podhorska-Okolów M, Grzegorzółka J, Rusak A, Grzegorzółka J, Impact of RBMS3 Progression on Expression of EMT Markers. *Cells* 2024, Sep 13, 1548. DOI: 10.3390/cells13181548) is an original research article and represents a direct continuation of the studies presented in the previous publication. The article focuses on the role of RBMS 3 in the two most aggressive breast cancer subtypes: HER-2 positive and triple-negative breast cancer (TNBC), and its association with one of the key processes responsible for breast cancer progression, the epithelial-mesenchymal transition (EMT) process. The publication presents the results of studies conducted on clinical material as well as on functional HER-2 positive and TNBC cell models with RBMS 3 overexpression and silencing. Immunohistochemical, immunofluorescent, and molecular analyses were performed. The tissue-based studies demonstrated a positive correlation between RBMS 3 expression and selected EMT markers: TWIST1 (twist-related protein 1), N-cadherin (neural cadherin), and SNAIL (snail family transcriptional repressor 1). In the TNBC group, RBMS 3 expression was positively correlated with TWIST1, SLUG (snail family transcriptional repressor 2), and E-cadherin (epithelial cadherin), whereas no significant correlations were observed in the HER-2 positive cases. Functional in vitro model studies using WB and qRT-PCR methods showed that in the TNBC model, RBMS 3 overexpression resulted in

an increase in EMT markers, while RBMS 3 silencing led to a decrease in these markers. In contrast, the HER-2 positive model demonstrated that RBMS 3 overexpression resulted in a reduction in EMT markers, whereas their silencing led to an increase in their expression. Furthermore, a migration assay revealed that TNBC cells with RBMS 3 overexpression exhibited enhanced migratory capabilities compared to those with silenced RBMS 3. The results of E-cadherin and N-cadherin expression analysis using confocal microscopy were consistent with the results obtained through molecular methods.

The results of the project present RBMS 3 as a protein with a potentially very complex role in breast cancer. The expression of RBMS 3 may play a role not only in cancer cells but also in stromal cells, which constitute a significant component of the tumour. In breast cancer cells, the role of RBMS 3 may depend on the molecular subtype of the tumour, as reflected in changes in the expression of EMT markers. From a clinical perspective, the results of the studies conducted on clinical material present RBMS 3 as a potential future diagnostic biomarker, while the in vitro studies may serve as a foundation for further experiments aimed at utilizing RBMS 3 as a target in personalized cancer therapy for breast cancer. However, given the complex mechanisms involved, further in-depth research is necessary to understand the precise molecular mechanisms underlying the role of RBMS 3 in breast cancer, particularly in the EMT process.
