

Jędrzej Grzegorzółka

„Rola ekspresji tesminy w raku niedrobnokomórkowym płuc”

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Mimo znaczącej poprawy sytuacji w zakresie wykrywalności i leczenia chorób nowotworowych, rak płuc stanowi coraz większy problem zdrowotny oraz społeczno-ekonomiczny. Zgodnie danymi Krajowej Bazy Nowotworów, w Polsce w 2018 roku zdiagnozowano 21 226 przypadków raka płuc (12,68% ogółu nowych zachorowań na choroby nowotworowe) oraz zarejestrowano 23 695 zgonów z powodu raka płuc (23,37% ogółu zgonów z powodu choroby nowotworowej). Niekorzystne wskaźniki epidemiologiczne w postaci wysokiej i stale rosnącej na przestrzeni lat liczby nowo rozpoznawanych przypadków raka płuc, a także wysokiej śmiertelności pacjentów, świadczą o niedostatecznym poznaniu mechanizmów rozwoju tego nowotworu i potrzebie dalszego poszerzania wiedzy na ten temat.

Tesmina (Testis-specific metallothionein-like protein) – białko podobne do metalotionein swoiste dla jąder, znane również jako metallothionein-like 5 protein – MTL5, zostało opisane po raz pierwszy w spermatocytach podczas podziału mejotycznego w jądrach myszy. Ekspresję tego białka stwierdzano także w komórkach somatycznych różnych narządów. Dzięki domenom bogatym w cysteinę, tesmina może wiązać jony metali ciężkich, przez co brać udział w homeostazie m.in. cynku, lub posiadać właściwości antyoksydacyjne. Białko to może pełnić również funkcję koaktywatora jądrowego receptora mineralokortykosteroidów i przez to wpływać na ekspresję wielu innych genów. Brak jest jednak dostatecznej wiedzy na temat roli tesminy w raku płuc.

W badaniach immunohistochemicznych wykorzystano materiał pochodzący od 364 przypadków niedrobnokomórkowego raka płuc (ang. non-small cell lung cancer – NSCLC), w tym 121 w postaci bloczków parafinowych oraz 243 w postaci mikromacierzy tkankowych) oraz 124 fragmentów niezmięnionej tkanki płucnej z marginesu cięcia chirurgicznego –

kontroli (w tym 20 bloczków parafinowych oraz 104 przypadki w postaci mikromacierzy tkankowych). Do badań metodą real-time qPCR oraz western blot (WB) wykorzystano materiał tkankowy świeżo mrożony z 20 przypadków NSCLC oraz 20 kontroli. W kolejnym eksperymencie z 36 przypadków NSCLC oraz 8 przypadków kontroli metodą mikrodysekcji laserowej wyizolowano odpowiednio: komórki raka i prawidłowej tkanki płucnej, a następnie przeprowadzono reakcje metodą real-time qPCR. Oprócz tego wykonano eksperymenty *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowych: fibroblastów płucnych IMR90, raka płaskonabłonkowego płuc NCI-H1703, oraz dwóch linii gruczolakoraka płuc: NCI-H522 i A549, w tym linii NCI-H1703 z wyciszoną za pomocą siRNA ekspresją *MTL5*.

Analiza uzyskanych metodą real-time qPCR rezultatów wykazała istotnie wyższy poziom mRNA *MTL5* w przypadkach NSCLC w porównaniu do kontroli ($p < 0,05$). Poziom mRNA *MTL5* w komórkach nowotworowych wyizolowanych za pomocą mikrodysekcji laserowej pozytywnie korelował zarówno z poziomem *MCM5* ($r = 0,421$; $p < 0,05$) jak i *MCM7* ($r = 0,553$; $p < 0,01$). Analiza przeżyć wykazała, że w komórkach raka NSCLC wyizolowanych za pomocą mikrodysekcji laserowej, wysoki poziom mRNA *MTL5* wiązał się z krótszym czasem przeżycia pacjentów ($p < 0,05$). W badanych przypadkach NSCLC, immunohistochemiczna ekspresja tesminy występowała w komórkach nowotworowych, komórkach nacieku zapalnego oraz makrofagach płucnych i miała charakter cytoplazmatyczno-jądrowy. Cytoplazmatyczna oraz jądrowa ekspresja (IHC) tesminy podobnie jak poziom tesminy badany metodą western blot (WB) również były wyższe w przypadkach NSCLC w porównaniu do kontroli ($p < 0,0001$). Wykazałem ponadto wyższą ekspresję cytoplazmatyczną (IHC) tesminy w podgrupie gruczolakoraków, i wyższą ekspresję jądrową tesminy w przypadku raków płaskonabłonkowych (odpowiednio: $p < 0,01$; $p < 0,0001$). Ponadto, jądrowa ekspresja (IHC) tesminy pozytywnie korelowała z ekspresją (IHC) markerów proliferacji komórkowej: Ki-67 ($r = 0,239$, $p < 0,001$), *MCM5* ($r = 0,336$; $p < 0,0001$) oraz *MCM7*

($r=0,315$; $p<0,0001$). Analiza przeżyć wykazała, że zarówno cytoplazmatyczna ekspresja (IHC) jak i poziom (WB) tesminy w NSCLC związane były z krótszym czasem przeżycia pacjentów ($p<0,05$). Badania *in vitro* metodami real-time qPCR oraz WB wykazały wyższą ekspresję odpowiednio *MTL5* i białka tesminy we wszystkich liniach komórkowych podtypów raka NSCLC w porównaniu do linii kontrolnej (fibroblastów płucnych). Eksperymenty z wykorzystaniem metody immunofluorescencyjnej (IF) potwierdziły cytoplazmatyczno-jądrową lokalizację tesminy w liniach komórkowych NSCLC. Linia NCI-H1703 z wyciszoną ekspresją tesminy charakteryzowała się wyższym odsetkiem komórek w fazie G1 oraz S a także zmniejszeniem odsetka komórek w fazie G2 oraz obniżoną ekspresją *MTL5*, *MCM5*, *MCM7* na poziomie mRNA jak i obniżoną ekspresją tesminy, *MCM5*, *MCM7* na poziomie białka, w porównaniu do nie zmienionej linii NCI-H1703.

W oparciu o zaprezentowane w tej pracy doktorskiej wyniki badań, według mojej wiedzy, po raz pierwszy wykazały podwyższoną ekspresję tesminy w komórkach raka niedrobnokomórkowego płuc oraz związek podwyższonej ekspresji tesminy z wyższą proliferacją komórek tego nowotworu. Ponadto wykazałem, że wysoka ekspresja tesminy jest negatywnym czynnikiem rokowniczym w NSCLC. Niezbędne są dalsze, wnikliwsze badania nad rolą tesminy w raku niedrobnokomórkowym płuc.

Summary of dissertation

Despite a significant improvement in the diagnosis and treatment of neoplastic diseases, lung cancer remains a growing health and socioeconomic problem worldwide. According to the data of the National Cancer Registry, in 2018 in Poland 21,226 cases of lung cancer (12.68% of all new diagnosed cancer cases) were diagnosed and 23,695 deaths from lung cancer (23.37% of all cancer-related deaths) were registered. Unfavorable and steadily increasing over the years epidemiological indicators such as a high number of newly diagnosed cases of lung cancer as well as high patient mortality indicate an insufficient understanding of the mechanisms of lung cancer development and the need for further research.

Tesmin (Testis-specific metallothionein-like protein, also known as metallothionein-like 5 protein, testis specific, MTL5) was firstly described in murine spermatocytes during meiotic division. The expression of tesmin was also described in the somatic cells of different organs. Due to the cysteine-rich domains, tesmin can bind heavy metal ions, thus taking part in the homeostasis of, e.g., zinc, or have antioxidant properties. Tesmin is also a coactivator for the nuclear mineralocorticoid receptor and may potentially regulate the expression of many other genes indirectly. However, there is insufficient knowledge in the literature worldwide about the role of tesmin in lung cancer.

For the immunohistochemical studies, I used material from 364 cases of non-small cell lung cancer (NSCLC, of which: 121 in the form of paraffin blocks and 243 in the form of tissue microarrays) and 124 fragments of normal lung tissue from the surgical incision margin – control (of which: 20 paraffin blocks and 104 cases in the form of tissue microarrays). For the real-time qPCR and western blot (WB) experiments, freshly frozen tissue material from 20 NSCLC cases and 20 controls was used. In another experiment, cancer cells from 36 NSCLC cases and normal lung tissue from 8 control cases were isolated by laser capture

microdissection, and then real-time qPCR reactions were performed. In addition, *in vitro* experiments were performed with the use of the IMR90 (lung fibroblasts) and NCI-H1703 (squamous cell carcinoma of the lung) cell lines, as well as two lines of lung adenocarcinoma, NCI-H522 and A549, and the NCI-H1703 cell line with siRNA silenced expression of *MTL5*.

In the case of mRNA expression, *MTL5* mRNA expression was significantly higher in NSCLC cases compared to the controls ($p < 0,05$). *MTL5* mRNA also correlated positively with both *MCM5* ($r = 0,421$; $p < 0,05$) and *MCM7* ($r = 0,553$; $p < 0,01$). The survival analysis of *MTL5* mRNA expression in cancer cells isolated by the laser capture microdissection method showed that a high level of *MTL5* in NSCLC was associated with a shorter survival time ($p < 0,05$). In the NSCLC cases studied, the immunohistochemical expression of tesmin was cytoplasmic-nuclear and was detected in neoplastic cells, inflammatory cells and pulmonary macrophages. The cytoplasmic and nuclear IHC expression of tesmin and the WB level of tesmin were significantly higher in the NSCLC cases compared to the controls ($p < 0,0001$). Moreover, I demonstrated a higher cytoplasmic IHC expression of tesmin in the adenocarcinoma subgroup, and a higher nuclear expression of tesmin in squamous cell carcinomas ($p < 0,01$; $p < 0,0001$, respectively). In addition, the nuclear IHC expression of tesmin correlated positively with the expression of the markers of cell proliferation: Ki-67 ($r = 0,239$, $p < 0,001$), *MCM5* ($r = 0,336$, $p < 0,0001$) and *MCM7* ($r = 0,315$; $p < 0,0001$). The survival analysis showed that both the cytoplasmic IHC expression and the WB level of tesmin in NSCLCs were associated with shorter survival times ($p < 0,05$ for both). *In vitro* studies using the immunofluorescence method confirmed the cytoplasmic-nuclear localization of tesmin expression, and the real-time qPCR and WB studies showed higher *MTL5* and tesmin protein expression, respectively, in all cell lines of NSCLC subtypes compared to the control cell line (of pulmonary fibroblasts). The NCI-H1703 line with silenced tesmin expression was characterized by a higher percentage of cells in the G1 and S phases and a lower percentage of cells in the G2 phase, as well

as a reduced mRNA expression of *MTL5*, *MCM5* and *MCM7* and WB levels of tesmin, MCM5, MCM7 proteins compared to the unchanged cell line.

Based on the results of the research presented in this dissertation, I have been able to demonstrate for the first time an increased expression of tesmin in non-small cell lung cancer cells and a relationship between an increased expression of tesmin and a higher proliferation of non-small cell lung cancer cells. Moreover, I have showed that high tesmin expression is a negative prognostic factor in NSCLC. However, further, more detailed research into the role of tesmin in non-small cell lung cancer is needed.