

## 1. Streszczenie

Rak płuc jest jednym z najczęściej występujących nowotworów złośliwych. Najwięcej, bo aż 40-50% wszystkich przypadków, stanowi gruczolakorak płuc (*adenocarcinoma*, AC). Na drugim miejscu plasuje się rak płaskonabłonkowy (*squamous-cell carcinoma*, LSCC) – około 20-30% przypadków. Oba te nowotwory zaliczają się do grupy niedrobnokomórkowych raków płuc (*non-small cell lung carcinoma*, NSCLC). Obecnie, wiele uwagi poświęca się poszukiwaniu markerów molekularnych, umożliwiających wykrycie choroby na wczesnym stadium, a także białek, mogących stanowić cel dla nowych terapii. Dotychczasowe doniesienia sugerują, że jednym z białek zaangażowanych w rozwój i progresję NSCLC może być SATB1 (*special AT-rich binding protein 1*).

SATB1 to czynnik transkrypcyjny, mający zdolność regulacji ekspresji całych zestawów genów w sposób tkankowo specyficzny. Wiąże się on z charakterystycznymi, bogatymi w pary A-T sekwencjami w genomie i organizuje DNA w trzeciorzędowe struktury, co umożliwia wiązanie innych czynników transkrypcyjnych oraz enzymów modyfikujących chromatynę. Wysoką ekspresję SATB1 stwierdzono w przypadku wielu nowotworów, między innymi raków gruczołu piersiowego, jajnika, jelita i prostaty. W komórkach nowotworowych obecność tego białka jest powiązana z agresywnym fenotypem, wysoką inwazyjnością i opornością na apoptozę. Najnowsze doniesienia wskazują, że w komórkach nowotworowych SATB1 może być również jednym z regulatorów procesu przejścia epitelialno-mezenchymalnego (*epithelial-mesenchymal transition*, EMT). Uważa się, że poza swoją rolą fizjologiczną, proces EMT ma duże znaczenie w progresji nowotworowej i może warunkować tworzenie przerzutów. Przegląd aktualnej literatury, podsumowujący rolę SATB1 jako czynnika promującego progresję nowotworów i powstawanie przerzutów, został opublikowany w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* (**Glatzel-Plucińska et al., „The role of SATB1 in tumour progression and metastasis”, *International Journal of Molecular Sciences* 2019 Vol.20 no.17, art.4156**).

Głównym celem pierwszej z prac oryginalnych, będących częścią rozprawy doktorskiej, było oznaczenie nasilenia ekspresji SATB1 na poziomie białka oraz mRNA w materiale klinicznym NSCLC, a następnie określenie potencjalnych korelacji z danymi kliniczno-patologicznymi pacjentów oraz z poziomem ekspresji markera proliferacyjnego Ki67. Materiał do badań stanowiło 277 przypadków NSCLC (158 AC; 119 LSCC) oraz 20 fragmentów tkanki płucnej nie zmienionej nowotworowo (NMLT), utrwalonych w postaci

bloczków parafinowych. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem metody immunohistochemicznej (IHC) oraz Real Time PCR. Dodatkowo, oznaczono nasilenie ekspresji SATB1 i mRNA genu *SATB1* w liniach komórkowych IMR90 (prawidłowe fibroblasty płucne), A549 (AC) i NCI-H1703 (LSCC). W badaniach na liniach komórkowych posłużono się metodami Western Blot, Real Time PCR oraz Droplet Digital PCR.

W analizowanym materiale klinicznym, zaobserwowano istotnie wyższe nasilenie ekspresji SATB1 w NSCLC w porównaniu do NMLT ( $3.94 \pm 1.16$  vs.  $3.00 \pm 0.44$ ;  $p < 0.0001$ ), a także w LSCC w porównaniu do AC ( $4.16 \pm 1.28$  vs.  $3.78 \pm 1.03$ ;  $p = 0.0164$ ). W AC, nasilenie ekspresji SATB1 wzrastało wraz ze stopniem złośliwości histologicznej guza G ( $3.46 \pm 0.91$  (G2) vs.  $4.16 \pm 1.05$  (G3);  $p = 0.0047$ ), podczas gdy w LSCC, zależność ta była odwrotna ( $4.51 \pm 1.17$  (G2) vs.  $3.47 \pm 1.20$  (G3);  $p < 0.0001$ ). Ponadto, wykazano istnienie dodatknej korelacji pomiędzy ekspresją SATB1 i Ki67 w NSCLC ( $r = 0.2157$ ;  $p = 0.0003$ ) i LSCC ( $r = 0.4127$ ;  $p < 0.0001$ ), lecz nie w AC. Analiza przeżyć wykazała, że wysokie nasilenie ekspresji SATB1 było pozytywnym czynnikiem prognostycznym dla pacjentów z NSCLC ( $p = 0.0167$ ).

Poziom ekspresji mRNA dla genu *SATB1* był istotnie niższy w NSCLC w porównaniu do NMLT (RQ= $2.709 \pm 1.685$  vs. RQ= $3.851 \pm 1.235$ ;  $p = 0.0076$ ). Ponadto, istotnie wyższą ekspresję mRNA *STAB1* stwierdzono w LSCC w porównaniu do AC (RQ= $3.11 \pm 1.44$  vs. RQ= $2.42 \pm 1.81$ ;  $p = 0.0395$ ).

Podsumowując, wykazano, że białko SATB1 jest ekspresjonowane w komórkach NSCLC na poziomie istotnie wyższym niż w NMLT, a nasilenie jego ekspresji jest uzależnione od typu histologicznego nowotworu i stopnia złośliwości histologicznej G. Co więcej, wysoki poziom ekspresji SATB1 jest pozytywnym czynnikiem prognostycznym dla pacjentów z NSCLC. Powyższe wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie *Anticancer Research* (**Glatzel-Plucińska et al., „SATB1 level correlates with Ki-67 expression and is a positive prognostic factor in non-small cell lung carcinoma”, *Anticancer Research* 2018 Vol.38 no.2, s.723-736**).

W drugiej z prac oryginalnych, skupiono się głównie na oznaczeniu możliwych korelacji pomiędzy nasileniem ekspresji SATB1 a ekspresją białek powiązanych z EMT (SNAIL, SLUG, Twist1, E-kadheryna, N-kadheryna) w materiale klinicznym NSCLC. Ponadto, przeprowadzono eksperymenty polegające na indukcji EMT *in vitro* w hodowli linii komórkowych NSCLC i obserwacji, w jaki sposób wpłynie to na poziom ekspresji mRNA dla genu *SATB1*.

Badania przeprowadzono na 242 przypadkach NSCLC (150 AC, 92 LSCC), utrwalonych w postaci bloczków parafinowych. Grupę kontrolną stanowiło 20 przypadków NMLT. Nasilenie ekspresji białek zaangażowanych w proces EMT oznaczono metodą IHC, a preparaty zeskanowano i przeanalizowano w formie cyfrowej. Przeprowadzono następnie korelację uzyskanych wyników z oznaczonymi uprzednio w badanym materiale poziomami ekspresji SATB1.

Po przeprowadzeniu analizy statystycznej, zaobserwowano istnienie dodatnich korelacji pomiędzy nasileniem ekspresji SATB1 a ekspresją jądrową (N) i cytoplazmatyczną (C) białka SLUG. Korelacja ta była obecna zarówno w pełnej puli przypadków NSCLC (SLUG N:  $r=0.449$ ;  $p<0.0001$ ; SLUG C:  $r=0.288$ ;  $p<0.0001$ ), jak i w analizowanych oddzielnie podtypach AC (SLUG N:  $r=0.365$ ;  $p<0.0001$ ; SLUG C:  $r=0.294$ ;  $p<0.001$ ) i LSCC (SLUG N:  $r=0.424$ ;  $p<0.0001$ ; SLUG C:  $r=0.403$ ;  $p<0.0001$ ). Poziom ekspresji SATB1 był pozytywnie skorelowany również z ekspresją Twist1 w NSCLC ( $r=0.264$ ;  $p<0.0001$ ) i AC ( $r=0.218$ ;  $p=0.008$ ), a także z ekspresją SNAIL w NSCLC ( $r=0.129$ ;  $p=0.045$ ).

Badania *in vitro* przeprowadzono na liniach komórkowych A549 (AC) i NCI-H1703 (LSCC). Do indukcji EMT wykorzystano cytokinę TGF- $\beta$ 1, standardowo używaną w tego typu eksperymentach. Poziom ekspresji mRNA *SATB1* oznaczano metodą Droplet Digital PCR 24, 48 i 72 h po indukcji EMT. W przypadku obu badanych linii, wykazano istotny wzrost ekspresji mRNA *SATB1* w porównaniu do komórek nie traktowanych TGF- $\beta$ 1. Wzrostowi temu towarzyszyło istotne zwiększenie poziomu ekspresji mRNA dla genów kodujących białka SNAIL i SLUG, a także wyraźne zmiany w morfologii komórek.

Uzyskane wyniki pozwoliły na wyciągnięcie wniosku, że SATB1 może być zaangażowany w proces EMT w niedrobnokomórkowych rakach płuc. Rezultaty powyższych badań zostały opublikowane w czasopiśmie *Oncology Reports* (*Glatzel-Plucińska et al., „SATB1 protein is associated with the epithelial-mesenchymal transition process in non-small cell lung cancers”, Oncology Reports 2021 Vol.45 no.6, art.118*).

## 2. Summary

Lung cancer is one of the most common malignant neoplasms. As much as 40-50% of them are adenocarcinomas (ACs). Squamous-cell carcinomas (LSCCs) come second, with approximately 20-30% of cases. Both tumors belong to the group of non-small cell lung carcinomas (NSCLCs). Currently, much attention is being paid to the search for molecular markers that could detect the disease at an early stage, as well as proteins that could be targets for new therapies. Previous reports suggest that one of the proteins involved in NSCLC development and progression may be SATB1 (special AT-rich binding protein 1).

SATB1 is a transcription factor capable of regulating the expression of entire sets of genes in a tissue-specific manner. It binds to distinctive A-T pair-rich sequences in the genome and organizes DNA into tertiary structures, which allows it to bind other transcription factors and chromatin-modifying enzymes. High SATB1 expression has been found in many cancers, including breast, ovarian, intestinal and prostate cancers. In cancer cells, the presence of this protein is associated with an aggressive phenotype, high invasiveness and resistance to apoptosis. Recent reports indicate that, in cancer cells, SATB1 may also be one of the regulators of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) process. It is believed that, apart from its physiological role, the EMT process is of great importance in the progression of neoplastic diseases and may be responsible for the formation of metastases. A review of the current literature, summarizing the role of SATB1 as a factor promoting tumor progression and metastasis, was published in the International Journal of Molecular Sciences (**Glatzel-Plucińska *et al.*, "The role of SATB1 in tumor progression and metastasis", International Journal of Molecular Sciences 2019 Vol.20 no.17, article 4156).**

The main goal of the first original work, part of the doctoral dissertation, was to determine the intensity of SATB1 expression at the protein and mRNA levels in NSCLC clinical material, and then establish the potential correlations with the patients' clinicopathological data and the level of expression of the proliferative marker Ki67. The research material consisted of 277 cases of NSCLC (158 ACs, 119 LSCCs) and 20 fragments of non-neoplastic lung tissue (NMLT), fixed in the form of paraffin blocks. The experiments were carried out using the immunohistochemical (IHC) and Real Time PCR methods. Additionally, the mRNA and protein expression levels of the *SATB1* gene in the IMR90 (normal pulmonary fibroblasts), A549 (AC) and NCI-H1703 (LSCC) cell lines were determined. The Western Blot, Real Time PCR and Droplet Digital PCR methods were used in the experiments.

In the analyzed clinical material, a significantly higher level of SATB1 expression was observed in NSCLC compared to NMLT ( $3.94 \pm 1.16$  vs.  $3.00 \pm 0.44$ ;  $p < 0.0001$ ), as well as in LSCC compared to AC ( $4.16 \pm 1.28$  vs.  $3.78 \pm 1.03$ ;  $p = 0.0164$ ). In AC, the intensity of the SATB1 expression increased with the histological G grade of the tumor ( $3.46 \pm 0.91$  (G2) vs.  $4.16 \pm 1.05$  (G3);  $p = 0.0047$ ), while in LSCC, the relationship was the opposite ( $4.51 \pm 1.17$  (G2) vs.  $3.47 \pm 1.20$  (G3);  $p < 0.0001$ ). Moreover, a positive correlation was demonstrated between SATB1 and Ki67 expression in NSCLC ( $r = 0.2157$ ;  $p = 0.0003$ ) and LSCC ( $r = 0.4127$ ;  $p < 0.0001$ ), but not in AC. The survival analysis showed that a high level of SATB1 expression was a positive prognostic factor for NSCLC patients ( $p = 0.0167$ ).

The mRNA expression level for the *SATB1* gene was significantly lower in NSCLC compared to NMLT ( $RQ = 2.709 \pm 1.685$  vs.  $RQ = 3.851 \pm 1.235$ ;  $p = 0.0076$ ). Moreover, a significantly higher expression of *SATB1* mRNA was found in LSCC compared to AC ( $RQ = 3.11 \pm 1.44$  vs.  $RQ = 2.42 \pm 1.81$ ;  $p = 0.0395$ ).

Summing up, it was shown that the SATB1 protein is expressed in NSCLC cells at a significantly higher level than in NMLT, and the intensity of its expression depends on the histological type of the tumor and the histological G grade. Furthermore, a high level of SATB1 expression is a positive prognostic factor for patients with NSCLC. The above results were published in the Anticancer Research journal (**Glatzel-Plucińska *et al.*, "SATB1 level correlates with Ki-67 expression and is a positive prognostic factor in non-small cell lung carcinoma", Anticancer Research 2018 Vol. 38 no.2, pp. 723-736.**

In the second original work, the main focus was to determine the possible correlations between the intensity of SATB1 expression and the expression of EMT-related proteins (SNAIL, SLUG, Twist1, E-cadherin and N-cadherin) in NSCLC clinical material. In addition, experiments to induce EMT in vitro in the culture of NSCLC cell lines were performed so as to establish how this would affect SATB1 mRNA expression level.

The experiments were carried out on 242 cases of NSCLC (150 ACs, 92 LSCCs), fixed in the form of paraffin blocks. The control group consisted of 20 cases of NMLT. The intensity of the expression of the proteins involved in the EMT process was determined by the IHC method, and the slides were scanned and digitized. The results obtained were then correlated with the levels of SATB1 expression previously determined in the tested material.

After performing the statistical analysis, the existence of positive correlations between the intensity of SATB1 expression and the nuclear (N) and cytoplasmic (C) expression of the

SLUG protein was observed. This correlation was present both in the whole NSCLC case pool (SLUG N:  $r=0.449$ ;  $p<0.0001$ ; SLUG C:  $r=0.288$ ;  $p<0.0001$ ) and in the AC and LSCC subtypes analyzed separately (SLUG N:  $r=0.0.365$ ;  $p<0.0001$ ; SLUG C:  $r=0.294$ ;  $p<0.001$ , and SLUG N:  $r=0.424$ ;  $p<0.0001$ ; SLUG C:  $r=0.403$ ;  $p<0.0001$ , respectively). The level of SATB1 expression was also positively correlated with Twist1 expression in NSCLC ( $r=0.264$ ;  $p<0.0001$ ) and AC ( $r=0.218$ ;  $p=0.008$ ) and SNAIL expression in NSCLC ( $r=0.129$ ;  $p=0.045$ ).

*In vitro* tests were performed on the A549 (AC) and NCI-H1703 (LSCC) cell lines. The TGF- $\beta$ 1 cytokine, normally used in this type of experiment, was used to induce EMT. *SATB1* mRNA expression level was determined by Droplet Digital PCR 24, 48 and 72 h after EMT induction. For both lines, a significant increase in *SATB1* mRNA expression was demonstrated compared to cells untreated with TGF- $\beta$ 1. This increase was accompanied by a significant increase in the level of mRNA expression for the genes encoding the SNAIL and SLUG proteins as well as by marked changes in cell morphology.

The results obtained allowed for the conclusion that SATB1 may be involved in the EMT process in non-small cell lung cancer. The results of the above studies were published in the journal *Oncology Reports* (Glatzel-Plucińska *et al.*, "SATB1 protein is associated with the epithelial-mesenchymal transition process in non-small cell lung cancers", *Oncology Reports* 2021 Vol. 45 No. 6, Art. 118).