

Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

PRACA DOKTORSKA

Krzysztof Rogala

***„Ekspresja czynnika transkrypcyjnego SOX18
w gruczolakoraku jelita grubego”***

Promotor pracy: prof. dr hab. Piotr Dzięgiel

Wrocław 2015

8. STRESZCZENIE

Rak jelita grubego stanowi drugi pod względem zapadalności i umieralności nowotwór złośliwy w Polsce. Cechuje go szybka dynamika wzrostu oraz niejednokrotnie skąpoobjawowy obraz kliniczny. Najczęstszy typ histologiczny stanowi gruczolakorak, występujący w około 90% przypadków.

Białka SOX stanowią wysoko konserwatywną rodzinę polipeptydów posiadających sekwencję DNA homologiczną z genem odpowiedzialnym za różnicowanie płciowe – SRY. Pełni rolę aktywatorów czynników transkrypcyjnych poprzez tworzenie z nimi kompleksów oraz wspomaganie ich aktywności. Białko SOX18, należące do podrodziny białek SOX F, jest zaangażowane w rozwój układu sercowo – naczyniowego oraz limfatycznego w życiu embrionalnym. Wskazuje się także na jego uczestnictwo w procesie transformacji nowotworowej oraz proliferacji komórek nowotworów złośliwych, m. in. raka żołądka, trzustki, płuc, jajnika oraz gruczołu piersiowego. Brak jest natomiast rzetelnej analizy ekspresji SOX18 w raku gruczołowym jelita grubego.

Celem moich badań było zbadanie ekspresji SOX18 na poziomie mRNA oraz białka w komórkach nowotworowych raka jelita grubego, oraz komórkach błony śluzowej jelita grubego objętej stanem zapalnym, jak również makroskopowo niezmięnionej. Ponadto celem było skorelowanie uzyskanych rezultatów z danymi kliniczno-patologicznymi.

Materiał do przeprowadzonych eksperymentów stanowiły fragmenty bioptatów raków jelita grubego, uzyskane podczas badania endoskopowego jelita grubego, częściowo utrwalone w formalinie a następnie zabezpieczone w postaci bloczków parafinowych, częściowo utrwalone w płynie RNAlater. Do badań wykorzystałem dodatkowo archiwalne przypadki raka jelita grubego w postaci bloczków parafinowych pozyskane z Zakładu Patomorfologii 4 Wojskowego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu. Zgromadzony materiał badawczy stanowiło: 25 biopsji endoskopowych raka jelita grubego, 50 preparatów

chirurgicznych raka jelita grubego, podczas gdy kontrolę stanowiło: 9 biopsji endoskopowych przypadków nieswoistych zapaleń jelita grubego, 12 biopsji endoskopowych błony śluzowej jelita makroskopowo niezmienionej oraz 16 preparatów chirurgicznych morfologicznie niezmienionych.

Na skrawkach parafinowych przeprowadzono reakcje immunohistochemiczne z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko SOX18 oraz Ki-67. Ocenie podlegał stopień ekspresji jądrowej białka SOX18 oraz Ki-67. Poziom ekspresji *SOX18* mRNA określany był za pomocą techniki Real-Time PCR. Uzyskane rezultaty analizowałem w odniesieniu do danych kliniczno-patologicznych (stopień złośliwości histologicznej G, skala klinicznego zaawansowania Dukes'a w modyfikacji Astlera i Collera, wiek, płeć, oraz obecność martwicy).

Wykazałem jądrową ekspresję SOX18 w komórkach nowotworowych raka jelita grubego oraz w śródbłonku naczyń podścieliska nowotworu. Opisywana ekspresja była istotnie statystycznie wyższa w przypadkach raka jelita grubego w porównaniu do kontroli. Zaobserwowałem także istotnie wyższą ekspresję *SOX18* mRNA w przypadkach raka w porównaniu do kontroli. Ekspresja *SOX18* mRNA korelowała istotnie, średnio dodatnio, z białkiem SOX18 w raku jelita grubego. Nie stwierdziłem istotnych zależności ekspresji SOX18 na poziomie mRNA oraz białka z ekspresją antygenu Ki-67 oraz dostępnymi danymi kliniczno-patologicznymi.

W oparciu o przeprowadzone badania stwierdziłem ekspresję SOX18 w prawidłowej błonie śluzowej jelita grubego jak również objętej nieswoistym procesem zapalnym oraz złośliwym procesem nowotworowym, zarówno na poziomie mRNA jak i białka. Ponadto wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań wskazują na zaangażowanie SOX18 w proces transformacji nowotworowej raka jelita grubego.

9. SUMMARY

Colorectal cancer is in terms of morbidity and mortality the second most common malignant neoplasm in Poland. It characterizes rapid proliferation rate and often oligosymptomatic clinical image. In approximately 90% of cases occurs adenocarcinoma histological type.

SOX proteins are a highly conserved family of polypeptides having homologous DNA sequence with sex-determining region Y (SRY) protein. They work as an activators of transcription factors by forming complexes and supporting their activity. SOX18 protein belong to the subfamily of SOX F and is involved in the development of cardio - vascular and lymphatic system in embryonic period. Their participation in the process of malignant transformation and proliferation of malignant tumors, *inter alia* in stomach, pancreas, lung, ovary and breast cancer was also shown. However, there was no reliable analysis SOX18 expression in colon adenocarcinoma.

The purpose of my study was to investigate SOX18 expression at the mRNA and protein level in tumor cells of colon cancer and cells of inflamed and macroscopically unchanged colonic mucosa. Moreover, the aim was to correlate the obtained results with clinicopathological data.

The material for the experiments consisted of the fragments of colon cancer biopsies obtained during endoscopy of the colon, partially fixed in formalin and embedded in paraffin blocks and partially preserved in RNAlater solution. Moreover for the study were also used additional archival cases of colon cancer in the form of paraffin blocks obtained from the Department of Pathology, 4 Military Hospital in Wrocław. The collected material consisted of 25 endoscopic biopsies of colon cancer, 50 surgical colon cancer specimens, while the control group consisting of 9 endoscopic biopsy cases of inflammatory bowel disease, 12 endoscopic

biopsy of the intestinal mucosa macroscopically unchanged and 16 preparations of surgical morphologically unchanged specimens.

The immunohistochemical reactions were carried out on paraffin sections using antibodies directed against SOX18 and Ki-67. The nuclear expression of SOX18 protein and Ki-67 was evaluated. *SOX18* mRNA expression was determined by the technique of real-time PCR. The obtained results were analyzed in relation to clinicopathological data (histologic grade G, Dukes clinical advancement scale modified by Astler-Coller, age, gender, and presence of necrosis).

I have shown nuclear SOX18 expression in tumor cells of colon cancer and endothelium of vessels in tumor stroma. The SOX18 protein expression was significantly higher in cases of colon cancer as compared to controls. Also I observed a significantly higher *SOX18* mRNA expression in cancer cases compared to controls. Moreover I found significant positive correlation between *SOX18* mRNA and SOX18 protein expression in colon cancer cells. I found no associations between SOX18 mRNA and protein as well Ki-67 expression with available clinicopathological data.

Based on the performed studies I disclosed SOX18 expression in normal colon mucosa, as well in non-specific inflammatory disease and malignant cancer, both at the mRNA and protein level. In addition, the results of my study indicate the involvement of SOX18 in the process of malignant transformation of colon cancer.