

Izabela Zawadzka

**Polimorfizmy i ekspresja genów kodujących białka z rodziny ABC
w raku płuca**

**Polymorphisms and expression of genes coding proteins from
ABC family in lung cancer**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Farmakogenomiki

Zakład Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej

Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej i Molekularnej

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Promotor: prof. dr hab. n farm Ewa Balcerczak

Łódź, 2022

IX. Streszczenie

Polimorfizmy i ekspresja genów kodujących białka z rodziny ABC w raku płuca

Gen *ABCB1* należy do nadrodziny genów transporterów błonowych wiążących ATP (ABC). Ma związek z progresją nowotworów i skutecznością odpowiedzi na stosowane leczenie. Gen ten jest wysoce polimorficzny. Genetyczne polimorfizmy powodują zmiany ilościowe lub jakościowe, prowadząc do zmiany funkcji fizjologicznych białka i wpływają na jego funkcję transportującą leki. Najlepiej poznanym białkiem z tej rodziny jest glikoproteina-P związana ze zjawiskiem oporności wielolekowej a jednym z najczęściej występujących polimorfizmów jest SNP C3435T.

Celem pracy była ocena zależności pomiędzy SNP 3435 a ekspresją genu *ABCB1* u chorych na raka płuca w populacji polskiej i zestawienie otrzymanych rezultatów z parametrami kliniczno-patologicznymi oraz wdrożonym leczeniem.

Wyizolowano 150 prób RNA i 47 prób DNA z 49 prób tkanek pobranych śródoperacyjnie i prób krwi pobranych od tych samych pacjentów w trzech punktach czasowych: w momencie diagnozy, 100 dni i rok po interwencji chirurgicznej. U wszystkich pacjentów wykonano morfologię krwi obwodowej i oceniono stężenie fibrynogenu.

Badanie ekspresji genu przeprowadzono metodą jakościową (PCR) i ilościową (*real-time PCR*), a genotypowanie metodą PCR-RFLP. Fibrynogen oznaczono metodą Claussa, a morfologię krwi obwodowej wykonano na analizatorach Sysmex-XN.

Zmutowany genotyp TT i allel T występowały istotnie statystycznie częściej w grupie chorych na raka płuca niż w grupie kontrolnej (odpowiednio TT: 38,3% i 21,9%; T: 64,9%; 46,9%). Genotyp TT był związany z 5,78 razy większym ryzykiem rozwoju raka płuca w porównaniu z genotypem CC. Wykazano, tendencję do częstszego występowania zmutowanego genotypu TT w podgrupie mężczyzn niż w podgrupie kobiet z rakiem płuca oraz tendencję do częstszego występowania zmutowanego genotypu TT w grupie palaczy tytoniu niż w grupie niepalących, jak również u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym w porównaniu do pacjentów z rakiem gruczołowym, ale nie były to różnice istotne statystycznie.

Nie zaobserwowano różnicy w poziomie ekspresji w tkance raka płuca i krwi pobranej od tych samych chorych przed leczeniem chirurgicznym. Na podstawie analizy prób krwi zaobserwowano, że poziom ekspresji mRNA *ABCB1* wzrastał w czasie w trakcie leczenia.

Wykazano istotną statystycznie różnicę w poziomach ekspresji genu *ABCBI* u pacjentów 100 dni po zabiegu chirurgicznym i 1 rok po operacji w stosunku do grupy kontrolnej. Poziom ekspresji genu *ABCBI* w grupie pacjentów o niższym stopniu zaawansowania nowotworu był ponad 40 razy niższy niż w grupie pacjentów o wyższym stopniu zaawansowania. Wykazano, iż względny poziom ekspresji genu *ABCBI* był istotnie statystycznie niższy w podgrupie pacjentów ze słabym zróżnicowaniem komórkowym w obrębie guza w porównaniu do podgrupy pacjentów, u których stopień zróżnicowania komórek nowotworowych oceniono na G1 lub G2. Poziom ekspresji mRNA genu *ABCBI* był istotnie statystycznie niższy w podgrupie pacjentów z niższą liczbą krwinek czerwonych (RBC) oraz niższą wartością hematokrytu niż średnia wartość tych parametrów w obrębie całej grupy badanej. W podgrupie pacjentów, u których stężenie fibrynogenu było wyższe niż mediana stężenia fibrynogenu w obrębie grupy badanej, poziom ekspresji *ABCBI* był ponad dziesięciokrotnie niższy.

Uzupełniające leczenie farmakologiczne indukowało wyższy poziom ekspresji *ABCBI*. Przedstawione dane wskazują na ważną rolę *ABCBI* w raku płuca. Istotny jest również wzrost poziomu mRNA *ABCBI*, który może być związany z indukcją mechanizmu oporności wielolekowej.

Podsumowując należy stwierdzić, że ocena poziomu ekspresji genu *ABCBI* oraz wybranego w pracy polimorfizmu, które modyfikują stabilność mRNA oraz potencjalnie wpływają na funkcje glikoproteiny-P, wydaje się mieć istotne znaczenie kliniczne w procesie monitorowania pacjenta po zabiegu chirurgicznym, wykazuje bowiem zmiany w czasie obserwacji, jakiej byli podani pacjenci włączeni do badania, oraz koreluje z innymi parametrami laboratoryjnymi i kliniczno-patologicznymi, co w sposób istotny może poprawić opiekę nad pacjentem onkologicznym.

X. Summary

Polymorphisms and expression of genes coding proteins from ABC family in lung cancer

ABCB1 gene belongs to the superfamily of binding ATP (ABC) transporter membrane genes and is related to cancer progression and response to the applied treatment. This gene is highly polymorphic. Genetic polymorphisms cause quantitative or qualitative alterations leading to the changes in physiological functions of a protein and impacting its function, which is drug transportation. A protein from this family, best known to-date, is *P*-Glycoprotein related to the phenomenon of multi-drug resistance, whereas one of the most frequently occurring polymorphisms is SNP C3436T.

The aim of this work was to evaluate the dependency between SNP C3436T and the expression of *ABCB1* gene in patients suffering from lung cancer in Polish population, and confronting the obtained results with the clinico-pathological parameters as well as the implemented treatment.

150 RNA samples and 47 DNA samples were isolated from 49 samples collected intraoperatively, and blood samples collected from the same patients at three time points: the diagnosis, 100 days post and one year post the surgical intervention. In all patients, morphology tests were performed and the concentration of fibrinogen was assessed.

The studies into the expression of the gene were performed using a qualitative method (PCR) and a quantitative one (real-time PCR), whereas genotyping was performed using PCR-RFLP method. Fibrinogen was marked using the Clauss method, and peripheral blood count was performed using Sysmex-XN analysers.

Mutated homozygous TT and allele T were present statistically more frequently in the group of patients suffering from lung cancer than the control group (TT: 38,3% and 21,9%; T: 64,9% and 46,9%, respectively). Genotype TT was related with 5,78 times higher risk of developing lung cancer as opposed to CC genotype. It was shown that there is a greater tendency to a more frequently occurrence of the mutated TT genotype in the subgroup of men than in the subgroup of women with lung cancer and there is also a tendency to a more frequently occurrence of a mutated TT genotype in the group of smokers as opposed to patients with adenocarcinoma, however, these differences were not statistically relevant.

No difference was observed in the level of expression in lung cancer tissue in blood collected from the same patients prior to surgical treatment. Based on the analysis of blood samples, it was observed that the level of expression of mRNA *ABCB1* increased during the treatment. Also, a statistically relevant difference was found in the levels of expression of *ABCB1* gene in patients 100 days after and one year after the surgical operation as opposed to the control group. It was discovered that the relevant level of expression of *ABCB1* gene was indeed statistically lower in the subgroup of patients with a poor differentiation of tissue within the tumour as opposed to the subgroup of patients in whom the degree of differentiation in cancer tissue was assessed as G1 or G2. The level of expression of mRNA in *ABCB1* gene was indeed statistically lower in the subgroup of patients with a lower number of blood cells (RBC) and lower value of haematocrit than the average value of these parameters within the whole tested group. In the subgroup of patients in whom the concentration of fibrinogen was higher than the median of fibrinogen concentration within the tested group, the level of expression of *ABCB1* gene was ten times lower.

Complementary pharmacological treatment induced a higher level of concentration of *ABCB1* gene. Basic data point to the important role of *ABCB1* in lung cancer, however, the increase in mRNA of *ABCB1* is also important as it may be related to the induction of multi-drug resistance mechanism.

Summarising, evaluation of the level of expression of *ABCB1* gene and the polymorphism selected for this work which modify the stability of mRNA and potentially may influence the functions of *P*-glycoprotein, seems to be of significant clinical importance in the process of monitoring a patient after the surgical operation, because it presents changes in the process of observation that the patients who were included in the study underwent, it also correlates with other laboratory and clinico-pathological parameters, which may significantly improve the care of oncological patients.