

Uniwersytet Medyczny w Łodzi



**UNIwersYTET
MEDYCZNY
W ŁODZI**

ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr Magdalena Dzikowiec

Ocena zmiany poziomu ekspresji wybranych genów uczestniczących w kancerogenezie oraz regulujących ich miRNA w powiązaniu z czynnikami zakaźnymi u pacjentów z rakiem żołądka.

Promotor pracy:

dr hab. n. med. Dorota Pastuszek-Lewandoska

Łódź 2022

Streszczenie

Rak żołądka to jedna z najczęściej notowanych chorób nowotworowych na świecie o bardzo złożonej etiologii. Duże znaczenie w rozwoju choroby mają zarówno czynniki genetyczne, jak i środowiskowe, takie jak dieta czy czynniki zakaźne. W związku z tym, że objawy pojawiają się późno i są mało specyficzne, nowotwór jest zwykle diagnozowany w zaawansowanym stadium, a rokowania są słabe.

Celem pracy była próba wyjaśnienia znaczenia wybranych zaburzeń genetycznych i epigenetycznych w karcynogenezie żołądka, z uwzględnieniem obecności czynników zakaźnych - *Helicobacter pylori* i wirusa Epsteina-Barr. Podjęto próbę określenia wpływu koinfekcji lub zakażenia pojedynczym patogenem na procesy związane z kancerogenezą u pacjentów z rakiem żołądka. Przeanalizowano poziom ekspresji wybranych genów: genu supresorowego *PTEN* (którego zaburzoną regulację obserwuje się w różnych typach nowotworów) oraz genu *SMOX* (którego ekspresja zwiększa poziom reaktywnych form tlenu w komórce). Zbadano mechanizmy, które mogą być odpowiedzialne za wyciszenie badanego genu supresorowego, takie jak obecność zmian typu LOH/MSI w *locus* genu *PTEN*, oraz ekspresja wybranych mikroRNA (miRNA-21 i miRNA-200a). Stan zapalny, leżący u podstaw transformacji nowotworowej, przeanalizowano pod kątem poziomu ekspresji genów kodujących IL-2, TNF- α i IFN- γ oraz katelicydynę LL-37. Zbadane parametry korelowano z cechami histopatologicznymi guzów żołądka. Przeprowadzone analizy wiązały się także z poszukiwaniem potencjalnych biomarkerów o znaczeniu diagnostycznym i/lub prognostycznym u pacjentów z rakiem żołądka.

Materiałem do badań była surowica uzyskana z krwi pełnej pobranej od pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem żołądka przed zabiegiem operacyjnym oraz próbki tkanki żołądka pobrane podczas całkowitej resekcji żołądka z trzech miejsc: z guza pierwotnego oraz dwie próbki tkanki niezmięnionej makroskopowo, pobrane w odległości 3 cm od zmiany pierwotnej i z przeciwległej do guza pierwotnego ściany żołądka. W pracy wykorzystano metody serologiczne (ELISA, IIFT) w przypadku oceny czynników zakaźnych oraz metodę qRT-PCR w celu określenia ekspresji wybranych genów i miRNA. Zastosowano markery mikrosatelitarne w celu analizy LOH/MSI w obrębie chromosomu 10, w regionie zawierającym *locus PTEN*. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą programów Statistica 13.1 StatSoft Inc.

Coraz większą rolę w rozwoju nowotworów przypisuje się czynnikom zakaźnym, a w przypadku raka żołądka szczególne znaczenie mają *H. pylori* i EBV. Oba patogeny wywołują stan zapalny w obrębie błony śluzowej żołądka, a w wyniku możliwej koinfekcji zapalenie błony śluzowej żołądka jest dużo poważniejsze. Chroniczna infekcja zapewnia mikrośrodowisko, które napędza onkogeną transformację komórek nabłonka. U wszystkich zbadanych pacjentów z rakiem żołądka stwierdzono w przeszłości zakażenie EBV. W przypadku *H. pylori* zaobserwowano wyższą seroprewalencję w grupie badanej (69%) w porównaniu z grupą kontrolną (42%). Co istotne, uzyskana w wynikach dodatnia korelacja pomiędzy obecnością przeciwciał IgG skierowanych przeciwko *H. pylori* a stadium nowotworu oraz poziomem IgG a wielkością guza pierwotnego, może potwierdzać znaczenie zakażenia patogenem w progresji guza żołądka. W wyniku różnych bodźców, jak np. stan zapalny czy czynniki zakaźne, następuje indukcja aktywności genu *SMOX* (gen oksydazy sperminy), czego skutkiem jest produkcja prekursorów reaktywnych form tlenu, których obecność wiąże się ze stresem oksydacyjnym, apoptozą komórek nabłonka, a także nasileniem procesów uszkodzenia DNA, co zwiększa ryzyko nowotworzenia. Zaobserwowany w przeprowadzonym badaniu istotnie zwiększony poziom ekspresji genu *SMOX* w guzie pierwotnym (ponad 4-krotnie względem kalibratora) potwierdza rolę stresu oksydacyjnego w karcynogenezie. Dodatkowo stwierdzono ujemną zależność pomiędzy ekspresją genu i stopniem zaawansowania nowotworu. Natomiast indukcja ekspresji *SMOX* pod wpływem zakażenia *H. pylori* wymaga potwierdzenia na większej grupie pacjentów: zaobserwowana wysoka ekspresja genu u pacjentów z obecnymi w surowicy przeciwciałami anti-*H. pylori* (niemal 4-krotnie zwiększona względem kalibratora) nie osiągnęła istotności statystycznej.

Stan zapalny jest związany z podwyższonym poziomem ekspresji cytokin prozapalnych, w tym zbadanych: $TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$ i IL-2. $TNF-\alpha$ jest głównym mediatorem stanu zapalnego i jest wykrywany w różnych nowotworach, także żołądka. Udowodniono, że odgrywa kluczową rolę w powstawaniu, promocji i przerzutowaniu większości nowotworów. $IFN-\gamma$ może indukować proliferację komórek żołądka i sprzyja przerzutom. IL-2 wykazuje plejotropowe działanie, a jej wyższy poziom może mieć związek z rozwojem procesu nowotworowego – w komórkach nowotworowych bierze udział w proliferacji komórek. W przeprowadzonych badaniach odnotowano najwyższy poziom cytokin w tkance pobranej z guza pierwotnego ($TNF-\alpha$ - niemal 15-krotnie

wyższy poziom ekspresji genu względem kalibratora, *IFN-γ* - 10-krotnie wyższy poziom ekspresji genu względem kalibratora, *IL-2* - 2-krotnie wyższy poziom ekspresji genu względem kalibratora), a różnice między wszystkimi typami próbek były istotne statystycznie. Zwiększony poziom ekspresji badanych cytokin prozapalnych w tkance guza potwierdza rolę procesu zapalnego w nowotworzeniu.

Dodatkowo przeanalizowano ekspresję genu katelicyny *LL-37*, który koduje peptyd przeciwdrobnoustrojowy wytwarzany przez organizm człowieka w ramach mechanizmu obronnego. Odnotowano bardzo niską ekspresję we wszystkich typach analizowanych tkanek: w tkance pobranej ze zmiany pierwotnej poziom ekspresji był 2,5-krotnie niższy względem kalibratora. Niski poziom *LL-37* ułatwia inicjację stanu zapalnego i może mieć związek z rozwojem procesu nowotworowego. Znacznie obniżony poziom ekspresji *LL-37* we wszystkich typach badanych tkanek wskazuje na znaczenie zaburzenia odpowiedzi immunologicznej w procesie kancerogenezy.

PTEN jest genem supresorowym, którego obniżoną ekspresję potwierdzono w różnych typach nowotworów, także w raku żołądka. W przeprowadzonych badaniach odnotowano najniższy poziom ekspresji w tkance z guza pierwotnego: 4-krotne obniżenie względnej ekspresji genu wobec kalibratora. Zaburzona ekspresja genu *PTEN* ma znaczenie we wczesnym etapie rozwoju raka żołądka, co potwierdza jego rolę jako genu supresorowego. Wydaje się, że *PTEN* można uznać za marker prognostyczny raka żołądka, ze względu na stwierdzoną ujemną korelację ekspresji genu ze stopniem zaawansowania i zróżnicowania guza.

Jako jeden z mechanizmów wyciszenia ekspresji *PTEN*, w przeprowadzonym badaniu przeanalizowano niestabilność genetyczną typu LOH/MSI z użyciem 4 markerów mikrosatelitarnych w *locus* genu. W zależności od badanego markera częstość występowania zmian wahała się od 18,2% do 25,9%. Niższą ekspresję genu *PTEN* zaobserwowano u pacjentów z niestabilnością genetyczną, u których odnotowano ponad 6-krotne obniżenie ekspresji genu względem kalibratora, natomiast u pozostałych pacjentów poziom ekspresji genu był ok. 3-krotnie niższy. Wskazuje to na udział mechanizmu molekularnego związanego z utratą heterozygotyczności/niestabilnością mikrosatelitarną w *locus* genu z wyciszeniem genu.

W wyciszeniu ekspresji genu *PTEN* mogą uczestniczyć także mechanizmy epigenetyczne związane z aktywnością miRNA. W pracy zbadano poziom ekspresji

miRNA-21 oraz miRNA-200a, dla których genem docelowym jest *PTEN*. Wykazano istotną statystycznie różnicę dotyczącą poziomu ekspresji obydwóch badanych miRNA pomiędzy pacjentami i grupą kontrolną. Ekspresja miRNA-21 była istotnie wyższa, a ekspresja miRNA-200a istotnie niższa u osób z rakiem żołądka. Uzyskane wyniki potwierdzają rolę miRNA-21 jako onkomiru oraz sugerują supresorową funkcję miRNA-200a w raku żołądka.

Cząsteczki miRNA mają potencjał biomarkerów o znaczeniu diagnostycznym i/lub prognostycznym w różnych nowotworach. Dlatego analiza profilu ekspresji wybranych miRNA może wspomóc identyfikację nieinwazyjnych biomarkerów raka żołądka. Uzyskane w przeprowadzonym badaniu wyniki sugerują możliwość wykorzystania w przyszłości obydwóch miRNA w opracowaniu panelu biomarkerów diagnostycznych dla raka żołądka. To z kolei umożliwi podjęcie wczesnego leczenia pacjentów z tym nowotworem.

Słowa kluczowe: rak żołądka, czynniki zakaźne w kancerogenezie, *PTEN*, *SMOX*, cytokiny prozapalne w raku żołądka, LL-37, miRNA-21, miRNA-200a, biomarkery w raku żołądka

Summary

Gastric cancer is one of the most frequently reported neoplastic diseases in the world with a very complex etiology. Both genetic and environmental factors, such as diet and infectious agents, play a significant role in the development of the disease. Since the symptoms appear late and are not specific, the cancer is usually diagnosed at an advanced stage and the prognosis is poor.

The aim of the study was to try to explain the importance of selected genetic and epigenetic lesions in carcinogenesis of gastric cancer, considering the presence of infectious agents - *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus. An attempt was made to determine the effect of co-infection or infection with a single pathogen on the processes related to carcinogenesis in patients with gastric cancer. The expression level of selected genes was analyzed: the *PTEN* suppressor gene (which disturbed regulation is observed in various types of cancer) and the *SMOX* gene (which expression increases the level of reactive forms of oxygen in the cell). The mechanisms that may be responsible for silencing the studied suppressor gene, such as the presence of LOH/MSI changes in the *PTEN* gene *locus*, and the expression of selected miRNAs (miRNA-21 and miRNA-200a) were investigated. The inflammation underlying the neoplastic transformation was analyzed in terms of the expression levels of genes encoding IL-2, TNF- α , IFN- γ and cathelicidin LL-37. The parameters studied were correlated with the histopathological features of gastric tumors. The conducted analyzes were also related to the search for potential biomarkers of diagnostic and / or prognostic importance in patients with gastric cancer.

The material for the study was serum obtained from whole blood collected from patients diagnosed with gastric cancer before the surgery and samples of gastric tissue collected during a total gastrectomy from three sites: from the primary tumor and two samples of macroscopically unchanged tissue taken 3 cm from the primary lesion and from the gastric wall opposite to the primary tumor. Serological methods (ELISA, IIFT) were used for the assessment of infectious agents and the qRT-PCR method to determine the expression of selected genes and miRNAs. Microsatellite markers were used to analyze LOH/MSI on chromosome 10 in the region containing the *PTEN* *locus*. Statistical analysis was performed using Statistica 13.1 StatSoft Inc.

Infectious agents are playing an increasingly important role in the development of tumors, and *H. pylori* and EBV are of particular importance in the case of gastric cancer. Both pathogens cause inflammation in the gastric mucosa, and gastritis is much more severe in case of possible co-infection. Chronic infection provides a microenvironment that drives the oncogenic transformation of epithelial cells. All gastric cancer patients under the study had EBV infection in the past. In the case of *H. pylori*, a higher seroprevalence was observed in the study group (69%) compared to the control group (42%). Importantly, the positive correlation found between the presence of anti-*H. pylori* IgG antibodies and the tumor stage as well as between the level of IgG and the size of the primary tumor may confirm the importance of pathogen infection in gastric tumor progression. As a result of various stimuli, such as inflammation or infectious agents, the activity of the *SMOX* gene (spermine oxidase gene) is induced, which results in the production of reactive oxygen species precursors, the presence of which is associated with oxidative stress, apoptosis of epithelial cells, and the intensification of DNA damage processes, which increases the risk of neoplasia. The significantly increased level of *SMOX* gene expression in the primary tumor (more than 4 times compared to the calibrator) observed in the conducted study confirms the role of oxidative stress in carcinogenesis. Additionally, a negative correlation was found between the gene expression and the tumor advancement stage. On the other hand, the induction of *SMOX* expression due to *H. pylori* infection requires confirmation in a larger group of patients: high gene expression observed in patients with anti-*H. pylori* antibodies present in the serum (almost 4 times higher than the calibrator) did not reach statistical significance.

Inflammation is associated with an increased level of the expression of pro-inflammatory cytokines, including the cytokines analyzed in the study: TNF- α , IFN- γ and IL-2. TNF- α is the main mediator of inflammation and is found in a variety of neoplasms, including the stomach. It has been proven to play a key role in the formation, promotion, and metastasis of most cancers. IFN- γ can induce the proliferation of gastric cells and promotes metastasis. IL-2 has a pleiotropic effect, and its higher level may be related to the development of the cancerous process, as it is involved in neoplastic cell proliferation. The results of the study showed the highest level of cytokines in the tissue samples taken from the primary tumor (*TNF- α* expression level was almost 15 times higher, *IFN- γ* - 10 times, and *IL-2* - 2 times higher compared to calibrator), and the differences between all sample types were statistically significant. The increased expression level of the

investigated pro-inflammatory cytokines in the tumor tissue confirms the role of the inflammatory process in neoplasm.

Additionally, the expression of cathelicidin *LL-37* gene, which encodes an antimicrobial peptide produced by the human body as a defense mechanism, was analyzed. Very low expression level was noted in all types of analyzed tissues: in the tissue taken from the primary lesion the expression level of *LL-37* was 2.5 times lower than in the calibrator tissue. Low *LL-37* levels facilitate the initiation of inflammation and may be associated with the development of the neoplastic process. The significantly reduced expression level of *LL-37* in all types of examined tissues indicates the importance of the disturbed immune response in the process of carcinogenesis.

PTEN is a suppressor gene which reduced expression has been confirmed in various types of cancer, including gastric cancer. In the present study, the lowest *PTEN* expression level was found in the primary tumor tissue: compared to the calibrator, the decrease was 4-fold. The impaired expression of the *PTEN* gene is important in the early stage of gastric cancer development, which confirms its role as a suppressor gene. It seems that *PTEN* can be considered a prognostic marker of gastric cancer, because of the negative correlation found between gene expression and the stage, as well as the differentiation of the tumor.

Genetic instability of LOH/MSI type, as one of the mechanisms of silencing *PTEN* expression, was analyzed with the use of 4 microsatellite markers mapped to the gene *locus*. Depending on the tested marker, the frequency of genetic changes ranged from 18.2% to 25.9%. Lower expression of the *PTEN* gene was observed in patients with genetic instability, who had a 6-fold reduction in gene expression compared to the calibrator, while in the patients without LOH/MSI the level of gene expression was approximately 3 times lower. This indicates an involvement of a molecular mechanism associated with loss of heterozygosity/microsatellite instability at the gene *locus* with gene silencing.

Epigenetic mechanisms related to miRNA activity may also play a role in *PTEN* expression silencing. The expression levels of miRNA-21 and miRNA-200a, for which *PTEN* is the target gene, were analyzed in the study. There was a statistically significant difference in the expression level of both tested miRNAs between the patients and the control group. The expression of miRNA-21 was significantly higher, and the expression

of miRNA-200a was significantly lower in patients with gastric cancer. The obtained results confirm the role of miRNA-21 as an oncomir and suggest a suppressive function of miRNA-200a in gastric cancer.

miRNA molecules have the potential of biomarkers of diagnostic and / or prognostic importance in various cancers. Therefore, the analysis of the expression profile of selected miRNAs can help identify non-invasive biomarkers of gastric cancer. The results obtained in the study suggest the possibility of using both miRNAs in the future to develop a panel of gastric cancer diagnostic biomarkers. This, in turn, is likely to enable early treatment of patients with this cancer.

Key words: gastric cancer, infectious agents in carcinogenesis, *PTEN*, *SMOX*, pro-inflammatory cytokines in gastric cancer, LL-37, miRNA-21, miRNA-200a, biomarkers in gastric cancer