

Kinga Bednarek

Udział wybranych genów o potencjale onkogennym lub supresorowym w patogenezie płaskonabłonkowego raka krtani

M O N O G R A F I A

Copyright © Kinga Bednarek Copyright © Instytut Genetyki Człowieka PAN Poznań 2018

Recenzenci naukowi – Dr hab. Małgorzata Jarmuż-Szymczak Projekt okładki – Mirka Korbańska Zdjęcia i ilustracje pochodzą ze zbiorów autora

978-83-950393-3-1

Wydawca Instytut Genetyki Człowieka PAN ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań www.igcz.poznan.pl

SPIS TREŚCI

I.		WSTĘ	Ρ	7
	1.	Epide	MIOLOGIA RAKA KRTANI W POLSCE	7
	2.	Etiol	OGIA RAKA KRTANI	8
	3.	TRAN	SFORMACJA NOWOTWOROWA	9
	4.	Rola	GENÓW SUPRESJI NOWOTWOROWEJ I ONKOGENÓW W POWSTAWANIU NOWOTWORÓW KRTANI	11
	5.	MECH	ΙΑΝΙΖΜΥ ΑΚΤΥΨΑCΙΙ ΟΝΚΟGΕΝÓΨ	12
	6	MECH	ΙΑΝΙΖΜΥ ΙΝΑΚΤΥΨΑCΙΙ GENÓW SUPRESII ΝΟΨΟΤΨΟΡΟΨΕΙ	13
	7	L FC7F		14
	я. 8	CHAR	ΑΚΤΕRYSTYKA ΑΝΑΙΙΖΟΨΑΝΥCΗ GENÓW	14
	0.	8 1	ATAD2 - ATPase family AAA domain containing 2 (8a24 13)	14
		82	CDK1 - Cyclin-dependent kinase 1 (10021 2)	15
		83	CFACAM6 - Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 6 (19g13 2)	16
		84	CICA4 - Chloride Channel Accessory 4 (1n22 3)	17
		85	FLIT3 - Eucosyltransferase 3 (Lewis Blood Group) (19n13 3)	17
		8.5. 8.6	APTMAR - Lycosomal Protein Transmembrane / Reta (8022.1)	17
		8.0. 8.7	$NETO_2$ Neuropilin And Tolloid Like 2 (16a12.1)	17
		0.7. Q Q	SEPDINH1 (HSD/7) - Servin Pentidase Inhibitor, Clade H (Heat Shock Protein 47) (11g1	12 5110
		0.0. 9 0	SERP2 - Secreted Erizzled-Related Drotein 2 (Ag21 2)	10.5/10
		8.J.	SNA/2 - Spail Family Zinc Finger 2 (spail family transcriptional repressor 2) (8g11 21)	10
		0.10.		19
II.		CEL PF	RACY	20
ш.		MATE	RIAŁ	21
	1	1.0.05		
	1. 1.		KOMORKOWE PŁASKONABŁONKOWEGO RAKA KRIANI (ANG. LARYNGEAL SQUAMOUS CELL CARCII	
	23	NA . = -		21
	2. ว			21
	3.	GRUP		22
		3.1. 2.2	Proby Kontrolne uzyte do analiz DNA	22
		3.2.	Proby Kontrolne uzyte do analiz RNA	22
		3.3.	Lizaty kontrolne uzyte do analizy blałek	23
		3.4.	Proby kontrolne uzyte w barwieniu immunohistochemicznym	24
IV.		ΜΕΤΟ	DY	26
	1	METC		26
	1.	1 1	Hodowla linii komórkowych płaskonabłonkowogo raka krtani	20 26
		1.1.	Pozyskiwanie wycinków guzów krtani i prawidłowej tkanki kontrolnej	20 26
		1.2.		20
		121	Izolacja DNA z linii komárkovych	27
		1.3.2	Izolacja DNA z tranek	
		1.3.3.	Izolacja DNA limfocytów krwi obwodowej i reakcja amplifikacji całego genomu (WGA)	28
		1.3.4.	Izolacja DNA z komórek nabłonka jamy ustnej	29
		1.4.	Izolacja RNA	29
		1.4.1.	Izolacja RNA z linii komórkowych	29
		1.4.2.	Izolacja RNA z wycinków guza	30
		1.5.	Izolacja białek	30
		1.5.1.	Izolacja białek z linii komórkowych	30
		1.5.2.	Izolacja białek z fragmentów nienowotworowej tkanki obrębu głowy i szyi	31
	2.	Μετο	DDY SELEKCJI GENÓW DO BADAŃ	31
		2.1.	Analiza poziomu ekspresji genów przy wykorzystaniu mikromacierzy	31

2.	.2.	Odwro	tna transkrypcja i PCR w czasie rzeczywistym	34
	2.2.1	. Odw	rrotna transkrypcja	3
	2.2.2	. Reak	cja PCR w czasie rzeczywistym	3
	2.2.3	. Anal	iza wyników	3
3.	ANAL	IZA KORE	LACJI POZIOMU EKSPRESJI Z PARAMETRAMI HISTOLOGICZNO-KLINICZNYMI NOWOTWORU	3
4.	ANAL	IZA MECH	IANIZMÓW ODPOWIEDZIALNYCH ZA OBSERWOWANE ZMIANY POZIOMU EKSPRESJI GENÓW	3
4.	.1.	Analiza	a liczby kopii genu - Porównawcza Hybrydyzacja Genomowa do mikromacierzy	-
а	rrav-C	GH		3
4.	.2.	Analiza	a poziomu metylacii DNA regionu promotorowego genów - pirosekwencionowa	anie3
	4.2.1	. Konv	versja DNA	3
	4.2.2	. Piros	sekwencjonowanie	3
	4.2.3	. Anal	iza wyników	4
4.	.3.	Analiza	a zmian sekwencji DNA na podstawie danych dostępnych za pośrednictwem ba	Z
da	anych	(cBioPo	ortal, COSMIC)	4
5.	Anal	IZY WYKC	NANE DLA WYTYPOWANEGO POTENCJALNEGO ONKOGENU - <i>CDK1</i>	4
5	1	Analiza	a noziomu białka CDK1 - Western blot	Δ
5.	511	Dena	aturacia próh i elektroforeza SDS-PAGE	лт Л
	512	Tran	sfer hiałek na membrane	۲ ۵
	5.1.3	. Dete	kcja białek i analiza wyników.	
	5.1.4	. Anal	iza wyników	4
5.	2.	Deteko	ia białka CDK1 - Barwienie immunohistochemiczne	4
	5.2.1	Przvi	gotowanie skrawków oraz wykrywanie antygenów	
	5.2.2	. Anal	iza półilościowa oznaczanych antygenów	4
	5.2.3	. Anal	iza statystyczna	4
5.	.3.	Sekwei	ncionowanie DNA technika Sangera	4
0.	5.3.1	Proie	ektowanie starterów i reakcia PCR	4
	5.3.2	. Oczv	vszczanie produktów PCR i reakcia sekwencionowania	5
	5.3.3	. Anal	iza wyników	5
5.	.4.	Wycisz	anie genu CDK1 poprzez interferencję RNA (RNAi) oraz potwierdzanie skuteczr	ności
w	vcisze	, nia geni		5
	5.4.1	Wvc	iszanie genu CDK1 w liniach komórkowych I SCC	5
	5.4.2	. Anal	iza skutków wyciszenia genu CDK1 w liniach komórkowych płaskonabłonkowego raka k	rtani
	56			
	5.4	4.2.1.	Mikromacierze ekspresyjne i analiza zmian ekspresji genów zależnych od CDK1	5
	5.4	4.2.2.	Testy funkcjonalne - analiza tempa proliferacji i żywotności komórek linii komórkowy	ch
	ΖV	vyciszon	ym genem CDK1	6
	5.	4.2.2.1.	Monitoring przyżyciowy komórek	6
	5.	4.2.2.2.	Analiza żywotności komórek - test kolorymetryczny (CCK-8)	e
6.	Doda	TKOWE A	analizy dla wytypowanego potencjalnego genu supresji nowotworowej - <i>CEACAN</i>	166
6.	.1.	Hamov	vanie metylacii DNA w liniach komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani .	6
-	6.1.1	Hode	owla linii komórkowych w obecności decytabiny	e
	6.1.2	Anal	iza zmian w poziomie metvlacii DNA regionu promotorowego genu CEACAM6	e
				_
	WYNI	KI		6
1.	Selek	CJA GENO	ÓW ORAZ ANALIZA POZIOMU EKSPRESJI GENÓW PRZY WYKORZYSTANIU MIKROMACIERZY	6
2.	Odw	ROTNA TI	RANSKRYPCJA I PCR W CZASIE RZECZYWISTYM (RT-QPCR)	7
3.	Korf	LACIA ΡΟ	ZIOMU EKSPRESJI GENÓW Z PARAMETRAMI HISTOLOGICZNO-KI INICZNYMI NOWOTWORU	7
4	ΑΝΔΙ		IANIZMÓW PROWADZACYCH DO OBSERWOWANYCH ZMIAN W EKSPRESII GENÓW	7
 л	1	Δnaliza	a liczby konij genu - Porównawcza Hybrydyzacja Genomowa do mikromacjorzy	
4.	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		a nezwy kopii Benu - i orownawcza mybryuyzacja Oenomowa uo mikromadcierzy	
a	n ay-C	חט. ^יי - יי		/
4.	.2.	Analiza	a poziomu metylacji DNA regionu promotorowego genu metodą	
pi	irosek	wencjor	nowania	7

	4.3. Analiza zmian sekwencji DNA na podstawie danych dostępnych za pośrednict	wem bazy
	danych cBioPortal i COSMIC	78
5.	Analizy genu <i>CDK1</i> - potencjalnego onkogenu	79
	5.1. Western blot	80
	5.2. Analiza stopnia akumulacji białka CDK1 w guzach pierwotnych - barwienie	
	immunohistochemiczne	83
	5.3. Sekwencjonowanie DNA techniką Sangera - gen <i>CDK1</i>	85
	5.4. Wyciszanie genu CDK1 poprzez interferencję RNA (RNAi) oraz testy funkcjona	lne88
	5.4.1. Analiza skutków wyciszenia genu CDK1 w liniach komórkowych płaskonabłonkowe	30 raka krtani -
	mikromacierze ekspresyjne	
6.	ANALIZA WYNIKOW UZYSKANYCH Z MIKROMACIERZY EKSPRESYJNEJ - SELEKCJA GENOW	
7.	POTWIERDZANIE WYNIKÓW UZYSKANYCH Z MIKROMACIERZY Z WYKORZYSTANIEM ILOŚCIOWEGO	PCR w czasie
RZ	zeczywistym (RI-QPCR)	
8.	ANALIZA BIOINFORMATYCZNA UZYSKANYCH WYNIKOW	
	8.1.1. Analiza skutkow wyciszenia genu <i>CDK1</i> w liniach komorkowych płaskonabłonkowej testy funkcionalne	o raka krtani -
	8.1.1.1. Analiza tempa proliferacii komórek - monitoring przyżyciowy	
	8.1.1.2. Analiza żywotności komórek - test kolorymetryczny	
9.	ANALIZY DLA WYTYPOWANEGO POTENCJALNEGO GENU SUPRESJI NOWOTWOROWEJ- CEACAM6	111
	9.1. Hamowanie metylacji DNA regionu promotorowego genu <i>CEACAM6</i> przy użyc	ciu
	decytabiny w liniach komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani	111
VI.	DYSKUSJA	119
VII.	PODSUMOWANIE	140
VIII.	WNIOSKI	142
IX.	STRESZCZENIE	143
х.	SUMMARY	146
XI.	WYKAZ SKRÓTÓW	148
XII.	SPISY RYCIN I TABEL	150
1.	Spis Rycin	150
2.	SPIS TABEL	151
XIII.	LITERATURA	154
XIV.	ZAŁĄCZNIKI	162
1.	Spis Rycin - Załącznik	162
2.	SPIS TABEL - ZAŁĄCZNIK	162
3.	SUPLEMENT 1.	176
4.	SUPLEMENT 2	177

I. WSTĘP

Płaskonabłonkowy rak krtani (ang. *Laryngeal Squamous Cell Carcinoma, LSCC*) należy do grupy nowotworów głowy i szyi (ang. *Head and Neck Squamous Cell Carcinomas, HNSCCs*). Do nowotworów tych zalicza się zmiany w obrębie warg, jamy ustnej, gardła (części nosowej, ustnej i krtaniowej), zatok przynosowych, ślinianek, krtani oraz ucha. Nowotwory płaskonabłonkowe - wywodzące się z nierogowaciejącego nabłonka wielowarstwowego płaskiego stanowią około 90% wszystkich nowotworów rozwijających się w obrębie głowy i szyi [1] (http://onkologia.org.pl).

Zmiany genetyczne, pojawiające się w komórkach spontanicznie lub pod wpływem czynników zewnętrznych, są w większości przypadków skutecznie eliminowane przez komórkowe systemy naprawy. W sytuacji patologicznej, zmiany te kumulują się, rozpoczynając w ten sposób proces nowotworzenia. Z procesem tym związane są głównie dwa typy genów o przeciwstawnym działaniu w komórce - onkogeny i geny supresji nowotworowej. Od ich właściwej aktywności zależy prawidłowe funkcjonowanie komórki.

1. Epidemiologia raka krtani w Polsce

Według najnowszych dostępnych danych zgromadzonych w Krajowym Rejestrze Nowotworów [1] (http://onkologia.org.pl) dotyczących epidemiologii raka krtani w Polsce, w 2015 roku zapadło na niego 2171 mężczyzn i 355 kobiet. W tej grupie 173 mężczyzn i 34 kobiety pochodziło z Wielkopolski. Zachorowania na złośliwego raka krtani stanowią 2,7% diagnozowanych przypadków nowotworów u mężczyzn, co plasuje go na 9. miejscu wśród wszystkich nowotworów. U kobiet rak krtani stanowi 0,4% przypadków nowotworów i zajmuje 31. pozycję. Odsetek zachorowań utrzymuje się na porównywalnym poziomie na przestrzeni lat. W 2008 roku wartość ta wynosiła 3,2% dla mężczyzn (9. miejsce spośród wszystkich nowotworów) i 0,5% dla kobiet (31. miejsce).

Od lat utrzymuje się wysoka śmiertelność pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem tego typu. W 2015 roku z jego powodu zmarło 1405 mężczyzn oraz 205 kobiet (w Wielkopolsce odpowiednio 134 oraz 17). Stosunek śmierci pacjentów do zachorowań wynosi dla mężczyzn 0,65 i 0,58 dla kobiet. Odsetek zgonów z powodu raka krtani wynosi 2,5% (11. miejsce wśród wszystkich nowotworów) dla mężczyzn

i 0,5% (31. miejsce) dla kobiet. Co istotne, odsetek zgonów nie uległ istotnej zmianie na przestrzeni ostatnich 7 lat. Według danych zebranych w Krajowym Rejestrze Nowotworów w 2008 roku wynosił 2,7% (11. miejsce) dla mężczyzn i 0,5% (32. miejsce) dla kobiet [1]. Wzrost zachorowań i związany z tym wzrost liczby zgonów obserwuje się u osób po 50 roku życia, z apogeum liczby przypadków w wieku 60-65 lat [1].

2. Etiologia raka krtani

Czynniki zwiększające ryzyko rozwoju nowotworu krtani można podzielić na dwie główne grupy: egzo- i endogenne. Głównym czynnikiem egzogennym jest dym tytoniowy, a dokładniej wchodzące w jego skład związki chemiczne. Wykazano, że z około 5000 różnych związków chemicznych składających się na dym tytoniowy, 98 stanowi potencjalne zagrożenie dla życia i zdrowia [2]. Należą one głównie do policyklicznych węglowodorów aromatycznych, reaktywnych form tlenu, amin aromatycznych czy też N-nitrozoamin [3]. Związki te, działając bezpośrednio na DNA powodują uszkodzenia, które, o ile nie zostaną w porę skutecznie usunięte, mogą zostać utrwalone w komórce w postaci mutacji, przekazywanej kolejnym pokoleniom komórek.

Negatywne działanie dymu tytoniowego potęgowane jest przez spożywanie wysokoprocentowych napojów alkoholowych. Wykazano, że u osób palących, nie pijących alkoholu ryzyko rozwoju nowotworu wzrasta ponad 30 razy, u osób pijących alkohol, ale nie palących tytoniu - prawie 10 razy; natomiast równoczesna ekspozycja na oba czynniki powoduje wzrost ryzyka do około 330 razy [4]. Synergistyczne działanie obu używek tłumaczy się drażniącym wpływem alkoholu na błonę śluzową, co skutkuje powstawaniem mikrourazów, ułatwiających dostęp związkom chemicznym do komórek nabłonka. Rakotwórczego działania alkoholu upatruje się też w indukcji enzymów mikrosomalnych (grupy enzymów odpowiedzialnych za metabolizm ksenobiotyków) oraz aktywacji metabolicznej substancji zawartych w dymie tytoniowym [5].

Dodatkowymi czynnikami egzogennymi zwiększającymi ryzyko rozwoju raka krtani są: ekspozycja zawodowa (praca z pyłem węglowym, drzewnym, azbestem, spalinami, nawozami oraz innymi środkami o działaniu drażniącym), niewłaściwa - niezbilansowana dieta oraz niedostateczna higiena jamy ustnej. Na rozwój nowotworu

8

może wpływać także występowanie refluksów: żołądkowo-przełykowego oraz krtaniowo-gardłowego [6].

Do czynników endogennych zalicza się indywidualną podatność organizmu na działanie kancerogenów. Zależy ona w głównej mierze od sprawności procesów detoksykacji i naprawy uszkodzeń DNA. Polimorfizmy w genach odpowiedzialnych za te procesy warunkują różny stopień ich wydajności, a co za tym idzie - skuteczności. Wrażliwość na mutageny jest dziedziczna. Jak wykazano, prawdopodobieństwo rozwoju nowotworu u krewnych osoby chorej wzrasta, ulegając dodatkowemu zwiększeniu u osób o zwiększonej wrażliwości [7].

Jako czynnik ryzyka rozwoju nowotworów głowy i szyi wskazuje się również infekcję wirusem brodawczaka ludzkiego (ang. *Human Papilloma Virus*, *HPV*) chociaż jego udział w rozwoju raka krtani nie został ostatecznie ustalony, w odróżnieniu od raków jamy ustnej i gardła, gdzie odgrywa rolę etiologiczną i prognostyczną [8], [9]. Poznano około 100 typów tego wirusa. Pod kątem patogenności, podzielono je na typy wysokiego i niskiego ryzyka. Wirusy niskiego ryzyka - HPV -11 i -6 odpowiadają za postawnie łagodnych zmian w postaci brodawek i brodawczaków w obrębie skóry oraz błony śluzowej jamy ustnej, gardła, krtani i dróg rodnych. Wirusy wysokiego ryzyka - głównie HPV -16 i -18 odpowiadają za rozwój zmian przedrakowych oraz raka [10].

3. Transformacja nowotworowa

Transformacja nowotworowa jest wynikiem zachwianej równowagi tempa podziału i śmierci komórek (apoptozy). Zaburzenie to jest skutkiem niestabilności genetycznej, utraty zdolności komórek do różnicowania, nabywania zdolności do migracji i inwazji obszarów zajętych przez inne typy komórek. W przebiegu procesu można wyróżnić cztery główne etapy (wg. Janusz A. Siedlecki, Choroby nowotworowe w "Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej" pod red. J. Bala, 2011) [11]:

- 1. Preinicjacja ekspozycja na kancerogeny, zarówno egzo- jak i endogenne.
- 2. Inicjacja pojawienie się pierwszej zmiany w materiale genetycznym, takiej jak mutacja punktowa DNA, insercja, delecja, zmiana epigenetyczna, zaburzenie w regulacji ekspresji genów. Poszczególne zmiany mogą wywoływać kolejne zaburzenia, które kumulują się w komórce. Długość fazy inicjacji zależy od predyspozycji osobniczych (odziedziczonych po

rodzicach/przodkach) oraz polimorfizmów genów odpowiedzialnych za naprawę uszkodzeń DNA i detoksykacji.

- 3. Promocja (rak *in situ*) zwiększenie aktywności mitotycznej. Etap ten rozpoczyna się, gdy mechanizmy naprawcze zawodzą. Pojawiają się kolejne mutacje i uszkodzenia, prowadzące do utraty kontroli nad komórką. Powstają subklony komórek nowotworowych. Część z nich eliminowana jest poprzez presję selekcyjną, natomiast pozostałe tworzą ograniczony guz nowotworowy.
- 4. Progresja (przerzutowanie) guz uzyskuje unaczynienie zapewniające substancje odżywcze i tlen komórkom nowotworowym. Genom komórek zmienia się, prowadząc do powstania klonów komórek o fenotypie przerzutowania. Komórki zyskują zdolność migracji i mogą rozprzestrzeniać się w inne regiony organizmu.

W 1996 roku Califano wraz z współpracownikami stworzył klasyczny model progresji nowotworów głowy i szyi [12]. Poszczególnym etapom przypisano charakterystyczne zmiany w genomie. Model ten był przez lata uzupełniany i rozbudowywany o kolejne aberracje (Rycina 1) [13].

Normal mucosa	Hyperplasia	Dysplasia	Carcinoma in situ	Squamous cell
Î		1 I	1 1	carcinoma
9p21 de	eletion 3p de	letions 11q1	3 18q de	eletion
p16/p1/	4 17p13	3 (p53 13q2	10q23	I
		8p de	eletion 3q26	
Trisomy	7 Tetrap	loidy Aneu	ploidy pTEN	
EGFR			inactive	ation
Telomera activatio	ise n	Cyclir ampli	n D1 ification	

Rycina 1. Model Califano, zmodyfikowany przez B. Perez-Ordoñez i współpracowników [13], przedstawiający model progresji nowotworów głowy i szyi w powiązaniu z poszczególnym aberracjami genetycznymi.

Do najczęstszych aberracji chromosomowych obserwowanych w nowotworach głowy i szyi należą amplifikacje 3q, 5p, 7p, 8q, 9q, 11q13, 20q oraz delecje 3p, 9p, 5q, 8p, 13q, 18q, 21q, jak też łamliwość regionu 3q14 [14].

4. Rola genów supresji nowotworowej i onkogenów w powstawaniu nowotworów krtani

Geny supresji nowotworowej (geny supresorowe, ang. *Tumor Suppressor Genes*, *TSG*) oraz protoonkogeny są genami o przeciwstawnym działaniu, niezbędnymi dla prawidłowego funkcjonowania komórki. Protoonkogeny stymulują wzrost komórek, pobudzają podziały komórkowe i hamują apoptozę, natomiast geny supresorowe hamują proliferację komórek, zwłaszcza w sytuacji, gdy występują uszkodzenia DNA. Amplifikacja lub inna aberracja chromosomowa występująca w obrębie protoonkogenu prowadzi do jego przekształcenia w onkogen i skutkuje niepohamowaną proliferacją komórek. Inaktywacja genów supresorowych lub ich niedostateczna wydajność powoduje deregulację cyklu komórkowego.

Protonkogeny podzielić można na trzy główne klasy genów: 1) kodujące białka regulatorowe cyklu komórkowego (czynniki wzrostu i ich receptory - EGF/EGFR, VEGF/VEGFR, kinazy białkowe - SRC, FGR, ABL, czynniki transkrypcyjne - MYC, FOS, JUN, białka wiążące GTP - HRAS, KRAS, N-RAS); 2) kodujące białka uczestniczące w procesie apoptozy - BCL-2, BAX; 3) kodujące białka pełniące inne role, np. białka tworzące kanały jonowe [11]. W nowotworach głowy i szyi potwierdzono onkogenny charakter genów: *PIK3CA*, *EGFR*, *MET*, *CCND1* oraz wskazano grupę potencjalnych onkogenów: *CCNL1*, *PARP1*, *TP63*, *MYC*, *PTK2*, *CTTN*, *FADD* [15], [16].

Rola genów supresji nowotworowej skupia się na kontroli cyklu komórkowego i różnicowania komórek. Kodują one też białka stanowiące czynniki transkrypcyjne (np. *TP53, RB1*), inhibitory fosforylacji białek oraz elementy struktur komórkowych odpowiedzialnych za oddziaływania międzykomórkowe oraz między komórką a macierzą zewnątrzkomórkową. Zaangażowane są także w proces angiogenezy oraz degradacji i ubikwitynacji białek. Uznanymi genami supresorowymi w nowotworach głowy i szyi są: *TP53, PTEN, SMAD4, CDKN2A*, natomiast *FHIT, RASSF1A, PTPRD, CSMD1* stanowią potencjalne geny supresji nowotworowej [15].

Wykazano, że onkogeny cechują się dominującym charakterem działania, natomiast geny supresorowe - recesywnym. Oznacza to, że wystarczy jedna kopia zmutowanego protoonkogenu, aby zainicjować proces nowotworzenia, natomiast prawidłowe funkcjonowanie genów supresorowych trwa do momentu zmiany w obu allelach danego genu. Z faktem tym wiąże się teoria "dwóch zdarzeń" (ang. *two hit*

hypothesis) Knudsona. Zakłada ona, że aby unieczynnić gen, po wystąpieniu mutacji/aberracji w jednym z alleli genu, musi nastąpić kolejne zdarzenie w drugim z alleli [17].

5. Mechanizmy aktywacji onkogenów

Do najczęściej obserwowanych mechanizmów aktywujących protoonkogeny należą: amplifikacje, mutacje punktowe oraz translokacje [18].

Amplifikacja genu prowadzi do jego nadekspresji i gromadzenia się nadmiernej ilości białka w komórce. Klasycznymi przykładami często amplifikowanych onkogenów w różnego typu nowotworach są geny z rodzin *MYC*, *ERB* oraz *RAS* [18]. Zwiększona liczba kopii genu często dotyczy większego regionu chromosomowego - w nowotworach głowy i szyi najczęściej spotyka się amplifikację regionu 11q13. Prowadzi to także do nadmiernej ekspresji *CCND1* - genu stanowiącego uznany onkogen oraz innych genów o charakterze onkogennym: *CTTN*, *ORAOV1* i *FADD* [16], [19].

Nadmierna ekspresja onkogenu może być również skutkiem jego translokacji w region chromosomowy objęty silnym promotorem. Przeniesienie genu *MYC* w region kodujący ciężki łańcuch immunoglobuliny (t(8;14)(q24;q32)) lub - rzadziej - IgK (t(2;8)(p12;q24)) bądź Ig λ (t(8;22)(q24;q11)) obserwowany jest w chłoniaku Burkitta [20]. W wyniku translokacji powstać może także gen fuzyjny, którego produkt - białko fuzyjne - ma działanie onkogenne. Przykład takiej aktywacji onkogenu obserwuje się w przewlekłej białaczce szpikowej. W przybliżeniu u 95% przypadków na chromosomie Philadelphia zlokalizowany jest gen fuzyjny *BCR-ABL1* powstający wskutek translokacji t(9;22)(q34;q11) [21].

W większości typów nowotworów obserwuje się mutacje punktowe genów z rodziny *RAS* [18]. Polegają one najczęściej na zmianie pojedynczego nukleotydu, prowadzącej do zmiany sekwencji aminokwasowej białka, co powoduje z kolei ciągłe aktywowanie funkcji przekazywania sygnałów. W nowotworach głowy i szyi najczęstsze mutacje obserwuje się w obrębie onkogenów *PIK3CA*, *HRAS* oraz *TP63* [22].

Stosunkowo nowym zagadnieniem jest analiza zmian epigenetycznych wpływających na poziom ekspresji genów. Do czynników wpływających na

12

nadekspresję onkogenów zalicza się: globalną hipometylację DNA, acetylację histonów oraz obniżoną ekspresję mikroRNA pełniących rolę supresorów onkogenów [23], [24].

6. Mechanizmy inaktywacji genów supresji nowotworowej

Najważniejszym genem supresji nowotworowej, nie tylko w nowotworach głowy i szyi, jest gen *TP53*. Somatyczne mutacje tego genu obserwuje się w 60-80% przypadków HNSCC. Aktywność białka TP53 ograniczana jest także poprzez związanie z białkiem E6 wirusa HPV16 [15]. Ponadto, inne białko wirusa - E7 - inaktywuje białko RB1, co dodatkowo dereguluje cykl komórkowy i pozwala na niekontrolowaną proliferację komórek. Gen *RB1* jest jednym z genów ulegających częstym delecjom w różnych typach nowotworów, również w HNSCC, co wynika z jego lokalizacji w często traconym regionie 13q14 [25].

Zjawiskiem często obserwowanym w przypadku genów supresorowych jest utrata heterozygotyczności (ang. *Loss of Heterozygosity*, *LOH*). Polega ono na utracie funkcji genu (np. poprzez mutację) w sytuacji, gdy drugi z alleli został wcześniej utracony - np. na skutek delecji. Przykładowo, utratę heterozygotyczności obserwuje się w obrębie ramienia p chromosomu 3 a także regionu 9p21, gdzie zlokalizowany jest ważny gen supresorowy *CDKN2A* [26]. Gen *CDKN2A* koduje dwa ważne białka zaangażowane w regulację cyklu komórkowego: p16 [INK4a] stanowiące inhibitor kinaz CDK4 i CDK6 oraz p14 [ARF] zapobiegające blokowaniu białka TP53 przez białko MDM2. Inaktywacja tego genu, poza LOH, spowodowana jest hipermetylacją genu i - rzadziej - mutacjami punktowymi [27], [28]. Utrata aktywności genu wynikać może także z delecji homozygotycznych. Przykładem genu ulegającego takiej delecji, jak również delecji heterozygotycznej, jest gen *SMAD4* [29].

Aktualnie uwaga skupia się na analizie wpływu czynników epigenetycznych na rozwój nowotworu. Inaktywacja genów poprzez metylację DNA wskazywana jest w wielu typach nowotworów. Hipermetylacaja regionów promotorowych genów supresorowych: *MGMT* i *RASSF1A* a także *CDKN2A* została wykazana w nowotworach głowy i szyi [30], [31]. Ponadto, istotną rolę w regulowaniu aktywności genów odgrywa mikroRNA. Podwyższony poziom mikroRNA może inaktywować geny - w tym geny supresji nowotworowej. Wykazano, że w raku jamy ustnej nadekspresja miR-21 negatywnie wpływa na ekspresję genu *PTEN* [32].

13

7. Leczenie raka krtani

Istotny problem związany z nowotworem krtani stanowi brak specyficznych objawów towarzyszących jego rozwojowi. Występujące we wczesnych etapach dolegliwości, takie jak chrypka, obniżenie głosu, kaszel czy problemy z przełykaniem często są bagatelizowane zarówno przez pacjentów jak i lekarzy, co utrudnia diagnostykę i może opóźnić wprowadzenie odpowiedniej terapii. Związane z obecnością guza trudności w oddychaniu, odżywianiu, mowie itp. negatywnie wpływają na jakość życia chorych. Leczenie jest wysoce inwazyjne i polega głównie na chirurgicznym bądź laserowym usunięciu zmian nowotworowych z jednoczesną radioterapią. Dodatkowo w leczeniu oszczędzającym krtań i krtaniową część gardła stosuje się chemioterapię z zastosowaniem cisplatyny.

Obecnie coraz większe nadzieje pokłada się w terapii celowanej - dopasowanej do zmian genetycznych jakie zachodzą w komórce nowotworowej. Tego typu leczenie z powodzeniem jest prowadzone z zastosowaniem Imatinibu - inhibitora kinazy tyrozynowej BCR-ABL u chorych na przewlekłą białaczkę szpikową (ang. *Chronic Myeloid Leukemia, CML*) oraz kombinacji lapatynibu i transtuzumabu u pacjentek z HER2-dodatnim rakiem piersi [33], [34]. W Polsce w leczeniu nowotworów głowy i szyi stosuje się obecnie jeden lek terapii celowanej - Cetuximab - monoklonalne przeciwciało przeciwko EGRF [35]. W sierpniu 2016 roku amerykańska Agencja Żywności i Leków (ang. *The Food and Drug Administration - FDA*) dopuściła kolejny lek: pembrolizumab (nazwa handlowa: Keytruda®) do stosowania u pacjentów z zaawansowanym rakiem głowy i szyi, u których wystąpiła wznowa choroby [36]. Związek ten jest humanizowanym przeciwciałem monoklonalnym przeciwko receptorowi programowanej śmierci komórki 1 (PD-1, ang. *Programmed Cell Death Protein 1*). Lek ten w Polsce wcześniej dopuszczony został do leczenia czerniaka skóry lub błon śluzowych. Prace nad kolejnymi środkami są nadal w toku.

8. Charakterystyka analizowanych genów

8.1. ATAD2 - ATPase family, AAA domain containing 2 (8q24.13)

Gen kodujący białko należące do rodziny ATP-az, posiadających w sekwencji zachowawczy region z miejscem wiązania ATP. ATAD2 zawiera dwie domeny AAA (ang. *ATPases Associated with diverse cellular Activities*) oraz bromodomenę wiążącą

acetylowane histony. Białka należące do tej rodziny pełnią funkcje białek opiekuńczych (chaperonów) zaangażowanych w składanie, działanie oraz rozpad kompleksów białkowych.

Nadekspresję genu *ATAD2*, często wraz z jego amplifikacją, obserwuje się w wielu typach nowotworów. Wykazano, że stanowi kofaktor dla genu *MYC*, stymulując jego aktywność transkrypcyjną [37]. Ponadto stanowi koaktywator czynników transkrypcyjnych z rodziny E2F i wymagany jest dla ich aktywności transkrypcyjnej oraz kontroli cyklu komórkowego (proliferacja niezależna od hormonów). Gen ten zaangażowany jest w także modyfikację potranslacyjną histonów [38], [39].

8.2. *CDK1* - Cyclin-dependent kinase 1 (10q21.2)

Gen koduje białko należące do kinaz serynowo-treoninowych. Oddziałuje głównie z cyklinami B (CCNB1 i CCNB2), tworząc kompleks MPF (ang. *Maturation - Promoting Factor*), kluczowy dla wejścia komórki w fazę mitozy [40]. Z kolei oddziaływania CDK1 z cykliną A1 (CCNA1) pozwalają na przejście komórki z fazy G2 do M cyklu komórkowego [41]. Jak wykazano, CDK1 jest jedyną kinazą zależną od cyklin, mogącą samodzielnie wprowadzić komórkę ssaczą w stan mitozy [42]. Fosforyluje szereg białek, regulując w ten sposób przejście komórki przez poszczególne fazy cyklu komórkowy oraz podziały mitotyczne. Wykazano, że u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* ponad 70 genów regulowanych jest przez cdk1 [43]. Przykład sieci zależności białka CDK1 z innymi białkami w komórce ludzkiej przedstawiono na Rycinie 2.

Aktywność białka CDK1 w trakcie kolejnych faz cyklu komórkowego regulowana jest poprzez procesy fosforylacji i defosforylacji. Do aktywacji białka wymagane jest w pierwszym etapie stworzenie kompleksu z odpowiednią cykliną. Następnie wymagana jest fosforylacja reszty w treoniny pozycji 161 (Thr-161) oraz defosforylacja reszt treoninowej w pozycji 14 (Thr-14) i tyrozynowej w pozycji 15 (Tyr-15), pozwalająca na przejście białka do jądra komórkowego. Z kolei fosforylacja tyrozyny w pozycji 15 (Tyr-15) blokuje aktywność kinazową białka CDK1 [44].



Rycina 2. Sieć zależności między białkiem CDK1 a innymi białkami w komórce ludzkiej (źródło: baza danych www.string-db.org). Liczbę białek oddziałujących zawężono do 50, przy zachowanym wysokim minimalnym współczynniku interakcji równym 0,700. Oddziaływania pochodzą ze źródeł eksperymentalnych (różowe linie), koekspresji (co-expression, czarne linie) i współwystępowania (co- occurence, niebieskie linie).

8.3. *CEACAM6* - Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 6 (19q13.2)

Białko CEACAM6 należy do rodziny ludzkich antygenów CEA-podobnych, obejmującej dwie podrodziny: swoiste glikoproteiny ciążowe (ang. Pregnancy Specific Glycoproteins - PSG) oraz CEA-podobne cząsteczki adhezyjne (ang. CEA Related Cell CEA Adhesion *Molecules* - CEACAM). (antygen karcynoembrionalny, ang. carcinoembryonic antigen) stanowią glikoproteiny zlokalizowane na powierzchni komórek. Białka CEACAM stanowią adhezyjne cząsteczki, zaliczane do nadrodziny immunoglobulinowych Immunoglobulin białek IgSF (ang. Super Family), charakteryzujących się obecnością w strukturze stałych i zmiennych domen immunoglobulinopodobnych. Liczba takich domen, stopień glikozylacji, obecność

izoform, dystrybucja tkankowa oraz sposób zakotwiczenia białka w błonie komórkowej wyznaczyły siedem antygenów CEACAM [45].

Gen *CEACAM6* koduje białko, którego cząsteczki tworzą glikoproteiny zakotwiczone w błonie komórkowej poprzez kotwicę glikozylofosfatydylo-inozytolową (GPI) i zawiera jedną domenę Ig-podobną stałą i jedną zmienną. Białka te zlokalizowane są głównie na powierzchni komórek nabłonka przewodu pokarmowego, oddechowego, sutka oraz neutrofili, gdzie pełnią rolę w procesie adhezji komórkowej. Gen *CEACAM6* bierze udział w regulacji anoikis poprzez ścieżkę sygnałową Akt/c-src: nadekspresja genu CEACAM6 powoduje zwiększoną aktywność kinazy Akt za pośrednictwem c-src. Ponadto, nadekspresja genu *CEACAM6* może wpływać na oporność komórek raka z wewnątrzwątrobowych przewodów żółciowych (ang. *intrahepatic cholangiocarcinoma*) oraz gruczakolakoraka trzustki (ang. *pancreatic adenoma*) na gemcytabinę [46], [47].

8.4. *CLCA4* - Chloride Channel Accessory 4 (1p22.3)

Produkt genu należy do rodziny aktywowanych wapniem białek przewodzących aniony chlorkowe. Badania oparte o przewidywanie struktury białka wykazały, że białka z rodziny CLCA mogą stanowić zakotwiczone w błonie komórkowej hydrolazy zależne od metalu - prawdopodobnie proteazy. Modelowanie struktury białka sugeruje aktywność analogiczną do metaloproteaz, głównie cynkowych [48].

8.5. *FUT3* - Fucosyltransferase 3 (Lewis Blood Group) (19p13.3)

Gen koduje enzym o aktywności alfa(1,3)- oraz (1,4)-fukozylotransferazy, katalizujący przeniesienie reszty L-fukozy z aktywnego donora (GDP-fukozy) na odpowiednią resztę cukrową polisacharydowego prekursora w przebiegu biosyntezy antygenów Lewisa. Antygeny te absorbowane są przez erytrocyty i stanowią wyznacznik grup krwi w układzie Lewis (LE) [49]

8.6. LAPTM4B - Lysosomal Protein Transmembrane 4 Beta (8q22.1)

Gen ten jest słabo poznany. Shao wraz współpracownikami wykazali, że koduje białko wielkości 35 kDa, w obrębie którego zlokalizowane są cztery regiony o transbłonowym charakterze. Zarówno koniec C jak i N białka są bogate w prolinę i - głównie te zlokalizowane w końcu N - stanowią potencjalne ligandy dla innymi domen SH3 występujących między w białkach z rodziny PI3K. cytoplazmatycznych kinazach tyrozynowych (np. ABL, SRC). Dodatkowo, w regionie tym znajdują się potencjalne miejsca fosforylacji przez kinazy białkowe zależne od cAMP/cGMP oraz białkowej kinazy C, co sugeruje udział białka w przekazywaniu sygnałów [50]. Potwierdzono występowanie dwóch izoform białka o wielkości 35 i 24 kDa. Jak wykazano, krótsza forma białka pozbawiona jest fragmentu końca N zawierającego motyw bogaty w prolinę i blokuje proliferację komórek. Dłuższa izoforma białka wpływa pozytywnie na proliferację, wzrost niezależny od stymulatorów egzogennych oraz zakotwiczenia, wzmaga potencjał migracyjny i inwazyjny komórek [50], [51].

8.7. *NETO2* - Neuropilin And Tolloid Like 2 (16q12.1)

Gen *NETO2* koduje transbłonowe białko posiadające dwie zachowawcze zewnątrzkomórkowe domeny CUB oraz jedną domenę lipoproteiny niskiej gęstości klasy a - LDLa (ang. *Low - Densty Lipoprotein Class A*) [52]. Początkowo białko NETO2 wiązano z procesami specyficznymi dla neuronów, gdzie wraz z genem/białkiem NETO1 działają jako pomocnicze podjednostki neuronalnych receptorów kainianowych (KAR) w procesie synaptycznego pobudzenia mózgu kręgowców, modulując ich kinetykę. W późniejszym okresie wykazano udział białka NETO2 w nowotworach różnego typu, m.in. jelita grubego [53].

8.8. *SERPINH1 (HSP47)* - Serpin Peptidase Inhibitor, Clade H (Heat Shock Protein 47) (11q13.5)

Gen zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 11, w regionie często amplifikowanym w nowotworach głowy i szyi. Produkt genu stanowi białko opiekuńcze (chaperon), zaangażowane w prawidłowe składanie i sekrecję białek kolagenowych poprzez przejściowe oddziaływanie z regionem potrójnej helisy nowo syntetyzowanych białek - prokolagenów - w retikulum endoplazmatycznym [54], [55].

8.9. SFRP2 - Secreted Frizzled-Related Protein 2 (4q31.3)

Gen koduje białko należące do rodziny wydzielniczych białek SFRP. Uczestniczą one w szlaku przekazywania sygnałów Wnt, stanowiąc jego swoisty endogenny inhibitor. Białka SFRP zawierają domenę bogatą w cysteinę, homologiczną do miejsca potencjalnego wiązania cząsteczek Wnt obecną w białkach Frizzled i cechującą się wysokim powinowactwem do białek Wnt. Blokowanie szlaku Wnt wspierane jest poprzez czynnik hamujący WIF (ang. *Wnt Inhibitory Factor*). Białka WIF i SFRP poprzez blokowanie dostępności białek Wnt stanowią zewnątrzkomórkowe inhibitory szlaku Wnt [56]. Ze względu na ich zaangażowanie w szlak Wnt, roli genu/białka upatruje się w regulacji proliferacji, migracji i różnicowania komórek.

8.10. SNAI2 - Snail Family Zinc Finger 2 (snail family transcriptional repressor 2) (8q11.21)

Gen kodujący białko z rodziny SNAIL, stanowiących czynniki transkrypcyjne z motywem palców cynkowych typu C2H2. Wiążąc się z sekwencją E-box działa jako represor transkrypcji. Wykazano udział tego białka w procesie EMT (przejście epitelialno-mezenchymalne, ang. *Epithelial to Mesenchymal Trasition*) poprzez blokowanie E-kadheryny [57], [58].

II. CEL PRACY

Intensywne badania molekularne prowadzone w celu poznania biologii nowotworów głowy i szyi w tym nowotworu krtani prowadzone są od wielu lat. Mimo to, wciąż brak markerów jednoznacznie związanych z indukcją i progresją choroby. Identyfikacja nowych genów o zmienionym profilu ekspresji może mieć znaczenie dla ustalenia panelu genów służących do łatwiejszej, precyzyjniejszej diagnostyki i skutecznego leczenia. Wcześnie postawiona diagnoza wiąże się z mniej inwazyjnym leczeniem. Z kolei poznanie korelacji ekspresji genu z parametrami histologicznoklinicznymi nowotworu może umożliwić oszacowanie rokowań dla danego pacjenta oraz ryzyka wystąpienia przerzutów.

Celem pracy była analiza udziału wybranych genów - potencjalnych onkogenów i genów supresji nowotworowej - w patogenezie płaskonabłonkowego raka krtani.

Cel główny realizowano poprzez cele szczegółowe:

- selekcję genów na podstawie zmian profilu ich ekspresji w płaskonabłonkowym raku krtani, informacji zgromadzonych w genetycznych bazach danych i literaturze,
- analizę korelacji ekspresji analizowanych genów z parametrami histologicznoklinicznymi w oparciu o klasyfikację stopnia zaawansowania choroby (TNM i G),
- 3. identyfikację mechanizmu molekularnego odpowiedzialnego za zmiany poziomu ekspresji analizowanych genów,
- 4. potwierdzenie potencjału onkogennego bądź supresorowego wytypowanych genów w przebiegu płaskonabłonkowego raka krtani.

III. MATERIAŁ

1. Linie komórkowe płaskonabłonkowego raka krtani (ang. *Laryngeal Squamous Cell Carcinoma - LSCC*)

W pracy wykorzystano 25 linii komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani udostępnionych przez prof. R. Grenmana z Uniwersytetu w Turku (Finlandia). Linie są ustabilizowane i scharakteryzowane metodami cytogenetycznymi [59], [60]. Dostępne są dane dotyczące stadium klinicznego zaawansowania guza wg klasyfikacji TNM oraz stopnia zróżnicowania histologicznego w trzystopniowej skali G (wg WHO), a także dane pacjentów, od których wyprowadzono linie komórkowe - płeć, wiek, czas przeżycia, ewentualna przyczyna zgonu (Tabela Z1, Załącznik, klasyfikacje TNM oraz G opisane są w wykazie skrótów). Wszyscy pacjenci, od których uzyskano guzy krtani do wyprowadzenia linii komórkowych pochodzili z Finlandii.

2. Materiał z guzów pierwotnych krtani

Fragmenty guzów pobierane były od pacjentów ze zdiagnozowanym płaskonabłonkowym rakiem krtani w trakcie laryngektomii całkowitej. Warunkiem koniecznym było uzyskanie od pacjenta pisemnej zgody na wykorzystanie materiału do badań genetycznych. Dla każdego wycinka przeprowadzono badanie histopatologiczne. W pracy wykorzystano próbki zawierające minimum 60% komórek nowotworowych w przekroju guza. Charakterystyka histologiczno-kliniczna guzów oraz pacjentów znajduje się w Tabeli Z2 (Załącznik).

Dla wykorzystanych w pracy próbek dostępne są dane dotyczące stadium histologicznej dojrzałości (wg klasyfikacji G) oraz klinicznego zaawansowania (wg klasyfikacji TNM) guza a także płeć i wiek pacjenta, od którego zostały pobrane. Wycinki guza pochodzą z Kliniki Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Badania zostały objęte zgodą Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (numery zgód: 230/02 i 904/06).

W badaniu immunohistochemicznym wykorzystano skrawki parafinowe raka płaskonabłonkowego krtani uzyskane w trakcie całkowitej laryngektomii

21

przeprowadzonej w Katedrze i Klinice Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej CM UMK, Szpitala Uniwersyteckiego nr 1 im. dr. A. Jurasza w Bydgoszczy. Na badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o numerze 417/2010. Grupę badaną stanowiło 35 mężczyzn oraz 5 kobiet. Charakterystyka pacjentów oraz nowotworów przedstawiona jest w Tabeli Z2 (Załącznik).

3. Grupy kontrolne

Każdy etap analiz, prowadzono w oparciu o dostępne nienowotworowe kontrole, pochodzące z obrębu głowy i szyi.

3.1. Próby kontrolne użyte do analiz DNA

Analizę poziomu metylacji DNA regionów promotorowych genów przeprowadzono wykorzystując trzy grupy prób kontrolnych:

- 10 prób DNA (W1-W10) wyizolowanych z wymazów z jamy ustnej zdrowych dawców,
- próba DNA wyizolowanego z limfocytów krwi obwodowej, służąca do uzyskania niemetylowanego DNA,
- próba DNA o pełnej metylacji, komercyjnie dostępna (Millipore, Hilden, Niemcy).

3.2. Próby kontrolne użyte do analiz RNA

Analizę poziomu ekspresji genów na poziomie mRNA wykonano w porównaniu z całkowitym RNA wyizolowanym z tkanek obrębu głowy i szyi:

- RNA z krtani, komercyjnie dostępne (Stratagene, Agilent Technologies, Waldbronn, Niemcy),
- RNA pochodzące z oskrzeli, uzyskane od dwóch dawców (Epithelix Sarl, Geneve, Switzerland),
- RNA wyizolowane z linii komórkowej prawidłowego nabłonka dróg oddechowych oskrzeli (NHBE - Lonza, Verviers, Belgia),

- RNA wyizolowane z linii komórkowej prawidłowego nabłonka tchawicy (HTEC - PromoCell, Heidelberg, Niemcy),
- RNA wyizolowane z fragmentu prawidłowego nabłonka krtani, pobranego w trakcie laryngektomii (pochodzenie próby: Klinika Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu).

3.3. Lizaty kontrolne użyte do analizy białek

Zmianę poziomu białka w liniach komórkowych analizowano w porównaniu z lizatami białkowymi uzyskanymi z prawidłowych tkanek krtani oraz linii komórkowych:

 lizaty białkowe z prawidłowych tkanek obrębu głowy i szyi uzyskane podczas operacji niezwiązanej z nowotworem - chordektomii (zabieg usunięcia lub modelowania fałdu głosowego) oraz uvulopalatoplastyki – plalastyki podniebienia miękkiego z użyciem lasera (ang. LAUP: *Laser Assisted Uvulopalatoplasty*).

Uzyskane fragmenty tkanek posłużyły do izolacji białka bezpośrednio oraz prowadzenia krótkoterminowych hodowli komórkowej w Zakładzie Genetyki Nowotworów Instytutu Genetyki Człowieka PAN. Opis fragmentów tkanek i sposób izolacji białka przedstawiono poniżej:

Numer próby	Zabieg	Sposób izolacji białka
K2	LAUP	Izolacja bezpośrednia
К3	LAUP	Izolacja bezpośrednia
K6	LAUP	Izolacja bezpośrednia
K12	LAUP	Hodowla krótkoterminowe
K13	Chordektomia	Izolacja bezpośrednia
K14	LAUP	Izolacja bezpośrednia
K15	Chordektomia	Izolacja bezpośrednia

Komórki z hodowli krótkoterminowej zostały przebadane i ich prawidłowy nabłonkowy, nienowotoworowy charakter został potwierdzony histopatologicznie. Próby uzyskano z Kliniki Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Na wykonanie badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (numery: 235/14 oraz 502/2015). Każdy z pacjentów udzielił pisemnej zgody na udział w badaniu.

- Komercyjnie dostępny lizat białkowy z prawidłowej tkanki krtani połączone frakcje białek rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych (ab44731 oraz ab44733, Abcam, UK),
- lizaty z linii komórkowych Jurkat i HeLa jako kontrola pozytywne wykorzystane w technice Western blot.

3.4. Próby kontrolne użyte w barwieniu immunohistochemicznym

Jako grupę kontrolną w badaniu wykorzystano 18 fragmentów prawidłowej tkanki krtani, uzyskanej z obszaru położonego minimum 2 cm poza marginesem nowotworu. Brak cech nowotworu w badanym fragmencie potwierdzany był przez dwóch niezależnych patologów. Jako kontrolę pozytywną barwienia wykorzystano fragmenty łożyska. Badanie objęte było zgodą Komisji Bioetycznej Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o numerze 417/2010.

Podsumowanie materiału badanego i prób kontrolnych użytych do poszczególnych analiz wykonywanych w niniejszej pracy doktorskiej zebrano w Tabeli 1.

Rodzaj analizy	Materiał badany	Kontrole	
	A		
Porównawcza hybrydyzacja genomów (a-CGH 244K)	Linie komórkowe LSCC (n=10)	nd	
Porównawcza hybrydyzacja genomów (a-CGH 44K)	Linie komórkowe LSCC (n=3)	nd	
Sekwencjonowanie genu CDK1 techniką Sangera	Linie komórkowe LSCC (n=25)	nd	
Pirosekwencjonowanie analizowanych genów	Linie komórkowe LSCC (n=25) Guzy pierwotne (n=41) - tylko gen CDK1	Kontrola całkowicie zmetylowana (n=1) Kontrola niemetylowana - limfocyty krwi obwodowej poddane reakcji WGA (n=1) Wymazy w wewnetrznej strony policzka (n=10)	
	RN	A	
Mikromacierze ekspresyjne	Linie komórkowe LSCC (n=11) Guzy pierwotne (n=5)	RNA z krtani, komercyjnie dostępne (n=1) RNA pochodzące z oskrzeli, uzyskane od dwóch dawców (n=1) RNA wyizolowane z fragmentu prawidłowego nabłonka krtani, pobranego w trakcie laryngektomii (n=1)	
Ilościowy PCR w czasie rzeczywistym	Linie komórkowe LSCC (n=25)	RNA z krtani, komercyjnie dostępne (n=1) RNA wyizolowane z linii komórkowej prawidłowego nabłonka dróg oddechowych oskrzeli - NHBE (n=1) RNA wyizolowane z linii komórkowej prawidłowego nabłonka tchawicy - HTEC (n=1)	
	BIAŁ	KA	
Western blot Ab anty-CDK1 (koniec C białka)	Linie komórkowe LSCC (n=25)	Lizat z prawidłowej krtani, komercyjnie dostępny (n=1) Lizaty z fragmentów nabłonka uzyskanych w trakcie uvulopalatoplastyki - LAUP (n=5) Lizaty z nabłonka uzyskanego w trakcie zabiegu chordektomii tylnej lewostronnej (n=2)	
Western blot Ab anty-CDK1 (koniec N białka)	Linie komórkowe LSCC (n=7)	nd	
Western blot Ab anty-CDK1 (uforsforylowana forma białka) Linie komórkowe LSCC (n=24)		nd	
Barwienie immunohistochemiczne	Guzy pierwotne dające przerzuty (n=20) Guzy pierwotne nie dające przerzutów (n=20)	Nabłonek prawidłowej krtani (n=18)	

Tabela 1. Podsumowanie materiału badanego i prób kontrolnych wykorzystanych w poszczególnych analizach wykonywanych w niniejszej pracy.

IV. METODY

Wykaz najważniejszych urządzeń i odczynników używanych w trakcie wykonywania pracy oraz skład buforów znajduje się w Załączniku (Tabele Z3 - Z5).

1. Metody uzyskiwania materiału do badań, izolacji kwasów nukleinowych i białek

1.1. Hodowla linii komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani

Linie komórkowe hodowano w medium hodowlanym DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium) z dodatkiem 10% bydlęcej surowicy płodowej. W trakcie hodowli utrzymywana była stała temperatura: 37°C i 5% stężenie dwutlenku węgla. Hodowle prowadzono do uzyskania ok. 80% konfluencji, następnie komórki uwalniano z powierzchni naczynia przy użyciu trypsyny w zbalansowanym roztworze soli Hanka (ang. *Hanks' Balanced Salt solution*) bez jonów magnezu i wapnia.

Jeśli wymagała tego procedura, komórki po uwolnieniu z powierzchni naczynia były liczone z wykorzystaniem komory zliczeniowej Bürkera. Komórki zawieszone w medium mieszano z błękitem trypanu w proporcji 1:1. Do komory nanoszono 10 µl mieszaniny i zliczano żywe komórki w obrębie 4 (do izolacji białek) lub 5 kwadratów (do transfekcji) ograniczonych potrójną linią. Komórki stykające się z górną i prawą krawędzią takiego kwadratu (zarówno od wewnątrz jak i z zewnątrz) były zliczane, zaś styczne do dolnej i lewej krawędzi - odrzucane. Liczbę komórek w 1 µl zawiesiny komórek w medium wyznaczano według wzoru:

$$liczba \ komórek = \frac{suma \ zliczonych \ komórek}{liczba \ zliczanych \ kwadratów} \ x \ rozcieńczenie \ x10$$

1.2. Pozyskiwanie wycinków guzów krtani i prawidłowej tkanki kontrolnej

Fragmenty guzów pobierane podczas zabiegu laryngektomii dzielone były na trzy części. Jedna kierowana była do badań histopatologicznych w celu określenia procentowego udziału komórek nowotworowych w wycinku. Druga część była natychmiast mrożona i w dalszym etapie służyła do izolacji DNA. Ostatni fragment,

przeznaczony do izolacji RNA, umieszczany był w probówce z RNAlater® (Sigma), a następnie przechowywany zgodnie z zaleceniami producenta.

Fragmenty prawidłowego nabłonka krtani przeznaczone do bezpośredniej izolacji białek przechowywane były w jałowej probówce w temperaturze -80°C do czasu izolacji. Fragmenty tkanek przeznaczone do krótkotrwałej hodowli umieszczano w jałowym PBS i dostarczano do IGCz PAN w czasie nie dłuższym niż 24 godziny.

1.3. Izolacja DNA

1.3.1. Izolacja DNA z linii komórkowych

Do izolacji DNA z linii komórkowych wykorzystano metodę z użyciem fenolu i chloroformu. Komórki po uwolnieniu z powierzchni naczynia dwukrotnie przemywano buforem PBS. Następnie do komórek dodano 1 ml buforu do trawienia białek (1x SE), 1 µl 10% SDS oraz 30 µl Proteinazy K (stężenie wyjściowe: 10 mg/ml). Po wymieszaniu próby inkubowano przez noc w temperaturze 55°C a następnie przełożono do probówek typu Phase LockTM i dodawano fenol w objętości równej z próbą w celu usunięcia białek. Preparat z fenolem mieszano na mieszadle hematologicznym w temperaturze pokojowej przez 20 minut, następnie wirowano w +4°C (1600 g, 20 minut). Etap dodawania fenolu, mieszania i wirowania powtórzono. Do oddzielonej fazy górnej dodano mieszaninę chloroform: alkohol izoamylowy (24:1) w stosunku objętościowym 1:1. Mieszano i wirowano jak wcześniej. Fazę wodną przeniesiono do nowej probówki i dodano do niej zimny alkohol etylowy (96%), aby wytracić DNA. Próby inkubowano w temperaturze -20°C przez minimum jedną dobę. Następnie próby wirowano (15 minut, 1500 g, +4°C). Po odrzuceniu supernatantu osad zawieszano w 1 ml zimnego 70% alkoholu etylowego, przenoszono do probówki typu Eppendorf i wirowano (15 minut, 12000 g, +4°C). Etap przemywania alkoholem etylowym oraz wirowania powtórzono. Uzyskany osad osuszono po czym zawieszono go w 200 µl dejonizowanej wody i pozostawiono do rozpuszczenia w +4°C. Próby z wyizolowanym DNA przechowywano w temperaturze -20°C.

Stężenie i jakość uzyskanego DNA oceniano przy użyciu spektrofotometru (NanoDrop ND-1000). Stosunek absorpcji światła UV przy długościach fali 260 i 280 (A 260/280) powyżej 1,8 uznawano za odpowiedni do przeprowadzenia analiz.

1.3.2. Izolacja DNA z tkanek

Do izolacji DNA z fragmentów nowotworu krtani zastosowano metodę identyczną z zastosowaną w przypadku izolacji z linii komórkowych, z niewielkimi modyfikacjami.

Wycinki pobrane w trakcie operacji przechowywane były w temperaturze -80°C. Przed izolacją DNA tkanka była rozcierana w moździerzu przy wykorzystaniu ciekłego azotu. Osad płukano w buforze PBS i wirowano (10 minut, 1600 g, temperatura pokojowa), etap ten wykonano dwukrotnie. Do osadu dodano 2 ml buforu do trawienia tkanek oraz 60 µl Proteinazy K (stężenie wyjściowe 10 mg/ml), mieszano i inkubowano w temperaturze 55°C przez minimum 48 godzin. Etap usuwania białek z użyciem fenolu, wytrącanie oraz przemywanie uzyskanego DNA wykonano identycznie jak w przypadku izolacji DNA z linii komórkowych. DNA zawieszano w 20 µl wody dejonizowanej, rozpuszczano w +4 °C a następnie przechowywano w -20°C

1.3.3. Izolacja DNA limfocytów krwi obwodowej i reakcja amplifikacji całego genomu (WGA)

Krew (10 ml) pobierano do probówek z EDTA. Do każdej próby dodano 30 ml zimnego buforu do lizy (1x LE), mieszano i inkubowano w +4°C przez 30 minut, mieszając w tym czasie kilka razy. Następnie próby wirowano (15 minut, +4°C, 1600 g), usuwano supernatant a osad lekko suszono. Do osadu komórek dodawano 10 ml buforu do lizy (1x LE), mieszano i wirowano jak powyżej. Do osadu dodano 1 ml zimnego buforu 1x SE, 500 µl 10% SDS i 30 µl Proteinazy K (10 mg/ml) i inkubowano przez noc w 55°C. Usuwanie białek z użyciem fenolu, wytrącanie oraz przemywanie DNA wykonano jak w przypadku izolacji DNA z linii komórkowych. Osad DNA zawieszono w 300 µl wody dejonizowanej, rozpuszczono w +4°C i przechowywano w -20°C.

Reakcję amplifikacji całego genomu (ang. *WGA - whole genome amplification*) przeprowadzono przy użyciu zestawu odczynników REPLI-g Mini Kit (Qiagen) według zaleceń producenta.

1.3.4. Izolacja DNA z komórek nabłonka jamy ustnej

Komórki nabłonka jamy ustnej zostały pobrane od zdrowych dawców (ochotników) w postaci wymazów z wewnętrznej części policzka. Izolację przeprowadzono przy użyciu zestawu odczynników firmy Roche - High Pure PCR Template Preparation Kit. Dostarczony przez producenta bufor do elucji DNA został zastąpiony sterylną wodą dejonizowaną (200 µl).

1.4. Izolacja RNA

1.4.1. Izolacja RNA z linii komórkowych

RNA z linii komórkowych - zarówno płaskonabłonkowego raka krtani jak i komercyjnie dostępnych linii komórkowych pochodzących z prawidłowych tkanek obrębu głowy i szyi - wyizolowano metoda Chomczyńskiego [61] z użyciem odczynnika typu Trizol. Hodowlę linii komórkowych prowadzono do uzyskania około 80% konfluencji. Bezpośrednio do naczynia hodowlanego dodawano Trizol (2 ml trizolu na naczynie hodowlane o powierzchni 25 cm²). Po 5 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej próby intensywnie mieszano przy użyciu strzykawki z igłą a następnie przenoszono do probówek typu Eppendorf. Do probówek dodawano 0,2 ml chloroformu na każdy 1 ml dodanego Trizolu i intensywnie wytrząsano. Po 2 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej próby wirowano (12000 g, 15 minut, +4°C) fazę wodną przenoszono do nowej probówki typu Eppendorf i dodawano 0,5 ml izopropanolu, intensywnie wytrząsano i po 10 minutowej inkubacji wirowano (12000 g, 10 minut, +4°C). Odrzucano supernatant a osad dwukrotnie przemywano 1 ml 75% alkoholu etylowego, za każdym razem usuwając supernatant. Osad osuszono w temperaturze pokojowej. **RNA** rozpuszczono w wodzie z dodatkiem dietylopiroweglanu (DEPC) w +4°C i przechowywano w -80°C.

Stężenie i jakość uzyskanego RNA oceniano przy użyciu spektrofotometru (NanoDrop ND-1000). Wartości a 260/280 w zakresie 1,8 - 2,0 uznawano za odpowiednie do przeprowadzenia analiz. Dodatkowo ilość i jakość uzyskanego RNA oceniono przy użyciu bioanalizatora Agilent RNA6000 NanoKit (Total RNA Assay).

29

Uzyskane wartości RIN (ang. *RNA Integrity Number*) w zakresie 8,9 - 10 dla linii komórkowych oraz 6 - 10 dla próbek z wycinków guzów uznawano za odpowiednie.

1.4.2. Izolacja RNA z wycinków guza

Fragmenty wycinków nowotworów pobranych w trakcie laryngektomii do czasu izolacji przechowywano w buforze RNAlater® w temperaturze -80°C. Guzy rozcierano w moździerzu z wykorzystaniem ciekłego azotu a następnie dodawano 1 ml Trizolu na każde 50 mg użytego materiału biologicznego. Izolację RNA przeprowadzono w sposób analogiczny do izolacji z linii komórkowych, zawieszając RNA w 10 µl wody z dodatkiem DEPC i przechowywano w temperaturze -80°C.

1.5. Izolacja białek

1.5.1. Izolacja białek z linii komórkowych

Hodowlę linii komórkowych - zarówno nowotworowych jak i nabłonkowych prowadzono do uzyskania około 80% konfluencji. Uwalniano komórki od powierzchni naczynia hodowlanego przy użyciu roztworu trypsyny i dwukrotnie przemywano je zimnym buforem PBS, wirując je po każdym podaniu buforu i usuwając supernatant (515 g, 5 minut, temperatura pokojowa). Komórki wybarwiono błękitem trypanu i liczono przy użyciu komór zliczeniowych Bürkera a następnie dodawano 1ml zimnego buforu do lizy komórek (NP-40) z dodatkiem inhibitora proteaz na każde 10⁷ żywych komórek. Probówki intensywnie wytrząsano przez 40 minut w temperaturze +4°C a następnie wirowano (15000 g, 20 minut, +4°C). Supernatant przenoszono do świeżych probówek typu Eppendorf i przechowywano w -80°C.

Stężenie białka mierzono spektrofotometrycznie metodą Bradford [62]. Stężenie określano na podstawie krzywej wzorcowej wyznaczonej z użyciem wzorca - surowiczej albuminy wołowej o znanych stężeniach: 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 μg/ml. Pomiary spektrofotometryczne przeprowadzono przy długości fali 595 nm.

1.5.2. Izolacja białek z fragmentów nienowotworowej tkanki obrębu głowy i szyi

Fragmenty tkanki przeznaczone do bezpośredniej izolacji białek (K2, K3, K6, K13, K14, K15,) wstępnie rozcierano w moździerzu z użyciem ciekłego azotu. Następnie próby rozdrobniono z wykorzystaniem homogenizatora kulkowego: 1 cykl: czas 40 sekund, prędkość 6 m/s z użyciem złoża Lysis matrix A (MP Biomedicals, ABO). Białka izolowano z użyciem buforu do lizy (NP-40 lub RIPA) z dodatkiem inhibitora proteaz według opisu przedstawionego dla linii komórkowych, wydłużając wytrząsanie w temperaturze +4°C do 2 godzin.

Po rozdrobnieniu tkanki (K12) hodowle pierwotne prowadzono w naczyniach pokrytych kolagenem (NUTACON w stężeniu końcowym 18 μg/cm²) w medium hodowlanym DMEM z dodatkiem 20% surowicy bydlęcej płodowej oraz MEGS (ang. *Mammary Epithelial Growth Supplement*, ThermoFisher Scientific). Hodowlę prowadzono do uzyskania pełnej konfluencji, przeprowadzając jeden pasaż komórek. Izolację białek z hodowli pierwotnej prowadzono w sposób opisany dla linii komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani.

2. Metody selekcji genów do badań

Selekcja genów do analizy w ramach niniejszej pracy odbywała się w dwuetapowo. Pierwszy etap selekcji stanowiła analiza wyników uzyskanych z mikromacierzy ekspresyjnych. Drugi etap stanowiło potwierdzenie uzyskanych wyników poprzez PCR w czasie rzeczywistym. Geny, dla których wyników nie potwierdzono, zostały wykluczone z dalszej analizy.

2.1. Analiza poziomu ekspresji genów przy wykorzystaniu mikromacierzy

W niniejszej pracy wykorzystano część wyników uzyskanych w ramach wcześniejszych projektów prowadzonych w Zakładzie Genetyki Nowotworów IGCz PAN polegających na analizie ekspresji genów w liniach komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani z wykorzystaniem mikromacierzy, między innymi w ramach projektu nr N403 03232/1989 (kierownik: dr hab. Małgorzata Jarmuż - Szymczak). W poniższym rozdziale przedstawiono sposób przygotowania

prób oraz analizę wstępną wyników a także własne kryteria ich selekcji przyjęte na potrzeby analizy ekspresji genów badanych w niniejszej pracy.

Do analizy wytypowano 11 linii komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani (UT-SCC-6A, -6B, -11, -19B, -22, -29, -34, -57, -106A, -107, -116). Jako grupa kontrolna posłużyły 3 próbki RNA wyizolowanego z prawidłowych tkanek obrębu głowy i szyi: fragmentu prawidłowego nabłonka krtani oraz komercyjnie dostępnego RNA z tkanek krtani i oskrzeli. Próby całkowitego RNA zostały przekazane do firmy Atlas Biolabs (Berlin), gdzie została wykonana analiza z użyciem platformy GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix). Samą analizę poprzedziła dodatkowa ocena jakości i ilości dostarczonego RNA. Firma Atlas Biolabs wykonała także wstępne analizy statystyczne oraz analizę polegającą na porównaniu poziomu ekspresji transkryptów w próbach nowotworowych w odniesieniu do prób kontrolnych w oparciu o algorytmy ustalone przez firmę Affymetrix. Znormalizowane wyniki z mikromacierzy otrzymano w postaci tabel i wykresów (Excel i Power Point, Microsoft Office 2003), które wykorzystano do wykonania własnych analiz. Niektóre z parametrów opisano poniżej.

Analiza ekspresji z użyciem mikromacierzy opiera się na hybrydyzacji transkryptu do oligonukleotydów (sond, ang. *probe*) zlokalizowanych na płytce. Jeden transkrypt może hybrydyzować do jednego lub więcej zestawu sond (ang. *probe set*), czyli puli oligonukleotytów złożonych z par sond o pełnej i niepełnej komplementarności (różniących się 1 nukleotydem). Jeden zestaw sond składa się maksymalnie z 20 par sond. W niniejszej pracy, zestaw sond nazwano dla uproszczenia tagiem. W selekcji genów do analizy brano pod uwagę głównie poniższe dane:

- Sygnał (ang. *Signal*): intensywność sygnału uzyskanego po hybrydyzacji badanego transkryptu do tagu. Odpowiada poziomowi względnej ekspresji transkryptu w badanej próbie.
- Zmiana (ang. *Change*): określa różnicę w intensywności sygnału obserwowanego dla każdego z tagów po hybrydyzacji z transkryptem w próbie nowotworowej w porównaniu intensywnością sygnału dla tego samego tagu w próbie kontrolnej. Na podstawie uzyskanych wyników, zmiana może zostać oznaczona jako Wzrost, Wzrost marginalny, Brak zmiany, Marginalne obniżenie, Obniżenie (ang. odpowiednio: *Increase (I), Marginal increase (MI), No change (NC), Marginal Decrease (MD), Decrease (D)*). Parametr ten uwzględnia istotność statystyczną zmiany (ang. *Change p*-value), ustaloną

z użyciem Testu Wilcoxona dla par obserwacji, przyjmując zmianę za istotną, gdy p <0,01. Dane te pozwalają na oszacowanie zmiany ekspresji danego transkryptu w próbach badanych w odniesieniu do próby kontrolnej.

• Detekcja Sygnału (ang. *Signal Detection*): współczynnik określający czy dany transkrypt jest wykrywany w badanej próbie. Na podstawie uzyskanych wyników intensywności sygnału po hybrydyzacji tagu z transkryptem z badanej próby algorytm przypisuje go do jednej z kategorii detekcji: obecna, marginalna, nieobecna (ang. odpowiednio: *Present*, (*P*), *Marginal (M)*, *Absent*, (*A*)). Na podstawie tego parametru można określić, czy w danej próbie wystąpiła ekspresja transkryptu/genu.

W pierwszym etapie selekcji genów dokonano przypisania tagów do poszczególnych genów w oparciu o bazę danych Genome Browser (http://genome.ucsc.edu; NCBI36/hg18). Następnie wytypowano tagi, dla których zmiana została określona jako Wzrost (Increase) lub Spadek (Decrease), czyli takich, dla których obserwowano istotną statystycznie zmianę ekspresji transkryptu. Zmiana ekspresji transkryptu uznawana była za istotną, gdy występowała w odniesieniu do minimum dwóch z trzech prób kontrolnych. Do analizy wybrano geny, o wszystkich tagach zakwalifikowanych jako istotnie zmienione.

Ostatecznie, do analizy w niniejszej pracy wybrano geny, których ekspresja różniła się istotnie we wszystkich badanych liniach komórkowych w porównaniu do przynajmniej dwóch z trzech prób kontrolnych. Oceniono także tag pod kątem detekcji ekspresji. Dodatkowe kryteria selekcji genów stanowiły: brak polimorfizmu liczby kopii DNA genu (ang. *Copy Number Variation*, CNV) wyznaczony na podstawie bazy danych Genome Browser (NCBI36/hg18), funkcja genów oraz brak doniesień o udziale genu w rozwoju nowotworu krtani.

Poziom ekspresji genów wytypowanych na podstawie wyników uzyskanych dla linii komórkowych przeanalizowano także w próbach pochodzących z guzów pierwotnych pobranych w trakcie laryngektomii. Umożliwił to wykonany w późniejszym okresie analogiczny eksperyment z wykorzystaniem 5 prób RNA (MK32, MK36, MK42, MK59, MK60). Wybrano ten sam typ mikromacierzy jaki zastosowano dla linii komórkowych. Sposób przygotowania prób oraz wstępnej analizy statystycznej był także identyczny.

2.2. Odwrotna transkrypcja i PCR w czasie rzeczywistym

W celu potwierdzenia zmian w poziomie ekspresji genów zaobserwowanych dzięki zastosowaniu mikromacierzy wykonano PCR w czasie rzeczywistym (RT-qPCR). Matrycę do reakcji stanowił cDNA, uzyskany na poprzez przeprowadzenie reakcji odwrotnej transkrypcji mRNA. Technika ta pozwala na monitorowanie zmian ilości produktu reakcji w trakcie jej trwania. W tym celu, stosuje się barwniki fluorescencyjne (w niniejszej pracy: EvaGreen) łączące się z dwuniciowym DNA a następnie mierzy się fluorescencję próbek po każdym cyklu reakcji. Wzrost intensywności fluorescencji proporcjonalny jest do wzrostu ilości produktu reakcji.

2.2.1. Odwrotna transkrypcja

Do reakcji odwrotnej transkrypcji użyto RNA wyizolowanego z linii komórkowych (n = 25) oraz kontrolnego RNA z całkowitej tkanki krtani (komercyjnie dostępne - Stratagene), linii komórkowej prawidłowego nabłonka dróg oddechowych oskrzeli (NHBE) oraz linii komórkowej prawidłowego nabłonka tchawicy (HTEC). Użyto 4 µg RNA w objętości końcowej reakcji 40 µl. Wykorzystano zestaw odczynników Enhanced Avian RT First Strand Synthesis Kit (Sigma) postępując według zaleceń producenta. Startery reakcji stanowiły nonamery o przypadkowej kolejności par zasad.

2.2.2. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym

Startery do reakcji PCR w czasie rzeczywistym zostały zaprojektowane przy użyciu programu Beacon DesignerTM 7.5 (PRIMER Biosoft International) a ich specyficzność sprawdzono przy pomocy programu Primer BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Wykorzystano dwa geny referencyjne - *ARNT* (Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) oraz *UBC* (Ubiquitin C). Wszystkie pary starterów zaprojektowano w taki sposób, by amplikony obejmowały granicę pomiędzy dwoma eksonami, dzięki czemu amplifikowane były tylko fragmenty cDNA, zamiast genomowego DNA. Sekwencje starterów genów badanych oraz referencyjnych wraz z odpowiednimi dla nich temperaturami przyłączania starterów przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Startery wykorzystane w reakcji PCR w czasie rzeczywistym. F - starter F (ang. *Forward*), R - starter R (ang. *Reverse*). Podwójny myślnik w sekwencji startera oznacza granicę ekson/ekson, bd - brak danych. Sekwencje starterów dla genu SFRP2 oznaczone symbolem # pochodzą z publikacji [63].

Gen	Sekwencje starterów 5' - 3'	Długość amplikonu [bp]	Temperatura przyłączania starterów [°C]	Wydajność reakcji PCR [%]
ARNT	F: TTGGCAGCACACTCTATG	191	55	100
NM_001668	R: CCICATICGGCAAATAAACG			
ATAD2	F: TGCTACGAACAGGCTAGATTC	196	55	100
NM_014109	R: TGCTCCACAGTATCCAACAC			
CDK1	F: CAGACTAGAAAGTGAAGAGGAAGG	191	55	100
NM_001170406	R: ACTGACCAGGAGGGATAGAATC			
CEACAM6	F: CGTCGGCATCACGATTGG	127	61	100
NM_002483	R: TGGGATTGGAGGAGCTAGAAG			100
CLCA4	F: TGAGCAAGATAACAGGAGGAAGTC	173 55	100	
NM_012128	R: AGTGTCGTTCATCCAGGCATTAC	1/5	55	100
FUT3	F: CCCATACAGTGAATCCATTTAAG	165	55	100
NM_000149	R: ATCCAGTGGCATCGTCTC	105	55	100
LAPTM4B	F: GATACATCAATGGTAGGAACTC	146	55	100
NM_018407	R: GAAGGCTTAGGCAGACAC	140	33	100
NETO2	F: TAGTCAGGTAGAACAAGAG	170	55	100
NM_018092	R: AACTGCTTCCATCATAGA	170		
SERPINH1	F: GTTCTTCAAGCCACACTG	125	55	98
NM_001235	R: TCGTCGTCGTAGTAGTTG	155		
SFRP2	F: TGCCAGCCACCGAGGAAG	170	bd	bd
NM_003013	R: AATGGTCTTGCTCTTGGTCTCC	179		
SFRP2	F: CTTGAGTGCGACCGTTTC	140 bd	hd	
NM_003013	R: ATTATGTCGTTGTCATCATCA	140	bu	bu
SFRP2 #	F: CTCGCTGCTGCTGCTCTTC	FOF	62	bd
NM_003013	G: GGCTTCACATACCTTTGGAG	505		
SNAI2	F: TCAAGGACACATTAGAACTCAC	100	61	0.9
NM_003068	R: ACACAGCAGCCAGATTCC	190	01	30
UBC	F: TCGCAGTTCTTGTTTGTG	150	55	100
NM_021009	R: GATGCCTTCCTTATCTTGG	130		

Reakcję PCR w czasie rzeczywistym wykonano z użyciem 5x HOT FIREPol® EvaGreen®qPCR Mix Plus (no ROX) firmy Solis BioDyne. Dla każdej próby wykonano trzykrotne powtórzenie. Skład mieszaniny reakcyjnej:

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Stężenie wyjściowe	Objętość na próbę [µl]
HOT FIREPol [®] EvaGreen [®] qPCR Mix Plus	5x	4
Starter F	50 µM	0,3
Starter R	50 µM	0,3
H ₂ 0	-	14,9
cDNA	-	0,4

Reakcję przeprowadzono w aparacie i-Cycler iQ5 (Bio-Rad) a następnie analizowano wyniki wykorzystując program Gene Expression Analysis for iCycler iQ5® Real-time PCR Detection System. Warunki reakcji PCR przedstawiono poniżej:

	Etap reakcji	Temperatura [°C]	Czas
Cykl 1	Inkubacja wstępna - aktywacja polimerazy	95	15 minut
	Denaturacja	95	20 sekund
Cykl 2(40x)	Przyłączanie starterów	55-61	10 sekund
	Wydłużanie łańcucha i pomiar fluorescencji	72	20 sekund
Cykl 3		95	30 sekund
Cvkl 4 (91x)	Krzywa topnienia	50-95	10 sek/temp
	Pomiar fluorescencji	Skok: 0,5°C	10 servicemp
Cykl 5	Zakończenie	10	∞

2.2.3. Analiza wyników

Aby określić wydajność reakcji, przygotowano serię rozcieńczeń DNA, które posłużyły do przeprowadzenia reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Następnie, przy wykorzystaniu programu GraphPad Prism 5 wyliczono wydajność reakcji wg wzoru:

$$E = 10^{-1/nachylenie} - 1$$

gdzie *E* to wydajność reakcji a *nachylenie* to nachylenie krzywej standardowej, przedstawiającej zależność wartości cyklu progowego - cyklu PCR, w którym przekroczony zostaje progowy poziom fluorescencji (C_T) od logarytmu stężenia DNA. Uzyskane wartości wydajności przedstawione są w Tabeli 2.

W celu określenia wartości progowych, po przekroczeniu których poziom ekspresji genów można uznać za zmieniony, dla każdego z analizowanych genów wyznaczono wartości odcięcia. W tym celu zastosowano dwa schematy:

- dla genów, których poziom ekspresji w liniach komórkowych był podwyższony w stosunku do grupy kontrolnej, wartość odcięcia wyznaczono jako wartość najwyższego wyniku uzyskanego dla prób kontrolnych dodaną do trzykrotnej wartości odchylenia standardowego obliczonego dla próbek kontrolnych,
- dla genów o obniżonym poziomie ekspresji w liniach komórkowych w stosunku do grupy kontrolnej, wartość odcięcia była równa wartości najniższego wyniku
uzyskanego dla prób kontrolnych. Poziom ekspresji poniżej wartości odcięcia uznawany był za obniżoną ekspresję genu.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem testu U Manna -Whitney'a. Wyniki uznano za istotnie, gdy p<0,05.

3. Analiza korelacji poziomu ekspresji z parametrami histologicznoklinicznymi nowotworu

Przeanalizowano korelacje ekspresji genów z parametrami histologicznoklinicznymi guza. Wykorzystano dane oparte o klasyfikacje TNM oraz G, gdzie T oznacza wielkość guza, N - przerzuty do węzłów chłonnych, M - przerzuty do odległych narządów, natomiast G - stopień zróżnicowania histologicznego nowotworu. W analizie zastosowano test U Manna - Whitney'a, wyniki uznano za istotnie, gdy p<0,05. Analizę korelacji poziomu ekspresji genu z czasem przeżycia pacjenta, od którego pobrano fragment guza w celu wyprowadzenia linii komórkowej, wykonano z wykorzystaniem testu Pearsona.

4. Analiza mechanizmów odpowiedzialnych za obserwowane zmiany poziomu ekspresji genów

4.1. Analiza liczby kopii genu - Porównawcza Hybrydyzacja Genomowa do mikromacierzy - array-CGH

W celu oceny zmian w liczbie kopii DNA badanych genów przeprowadzono analizę wyników porównawczej hybrydyzacji genomów (ang. *Comparative genomic hybridization*, CGH) z wykorzystanie mikromacierzy (array-CGH). Wykorzystano wyniki z wykonanych wcześniej hybrydyzacji do mikromacierzy:

 Agilent Human Genome CGH 44K Oligo Microarray Kit (Agilent Technologies, Walbornn, Niemcy), którą wykonano w ramach uprzejmej pomocy w zespole kierowanym przez prof. R. Sieberta (Institute of Human Genetics, University Hospital Schleswig-Holstein Campus Kiel, Christian-Albrechts University, Kiel, Germany), Agilent Human Genome CGH Oligo Microarray 244K Kit (Agilent Technologies, Walbornn, Niemcy), wykonana dzięki uzyskaniu finansowania z Wielkopolskiego Centrum Badań Przyrodniczych i Medycznych.

Poniżej przedstawiono podstawy teoretyczne techniki oraz własne kryteria przyjęte do analizy wyników.

Technika porównawczej hybrydyzacji genomów opiera się o analizę stosunku fluorescencji barwników użytych do wyznakowania DNA: badanego (zielony) i referencyjnego (czerwony). Po zmieszaniu obu prób w równym stosunku przeprowadza się hybrydyzację do mikromacierzy oligonukleotydowej i dokonuje pomiaru fluorescencji obu barwników. Różnica w intensywności fluorescencji wyraża się w postaci współczynnika log2ratio, przyjmując, że log2ratio = 0 oznacza brak zmian, natomiast log2ratio = 1 oznacza dwukrotną zmianę w ilości DNA.

Próby DNA 10 linii komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani: UT-SCC- 6A, -19B, -29, -35, -38, -42B, -57, -106A, -107, -116 zostały przeanalizowane przy użyciu platformy Agilent Human Genome CGH 244K Oligo Microarray; kolejnych trzech linii: UT-SCC -11,-22, -34 - platformy Agilent Human Genome CGH 44K Oligo Microarray Kit. Otrzymano wyniki w postaci tabel i wykresów (Excel i Power Point, Microsoft Office 2003), na podstawie której ustalono współczynnik log2ratio dla regionów DNA, w których zlokalizowane są poszczególne geny analizowane w niniejszej pracy. Średnią wartość współczynnika log2ratio w zakresie pomiędzy +0,5 i -0,5 przyjęto jako oznaczającą brak zmian w liczbie kopii analizowanego genu.

4.2. Analiza poziomu metylacji DNA regionu promotorowego genów - pirosekwencjonowanie

W celu przeanalizowania poziomu metylacji DNA regionów promotorowych analizowanych genów wykonano pirosekwencjonowanie. Reakcja ta polega na włączaniu do reakcji poszczególnych dNTP w określonej kolejności w obecności enzymów: fragmentu Klenowa polimerazy DNA I, sulfurylazy ATP, lucyferazy oraz apirazy. Po włączeniu nukleotydu komplementarnego do badanej nici DNA następuje uwolnienie pirofosforanu, wykorzystywanego przez sulfurylazę do wytworzenia ATP z wykorzystaniem adenozyno-5'-fosfosiarczanu (APS). Następnie w obecności lucyferyny i tlenu, ATP wykorzystany jest przez lucyferazę jako źródło energii do

wytworzenia oxylucyferyny, emitującej fotony świetlne rejestrowane przez fotokamerę. Apiraza degraduje niewłączone nukleotydy.

4.2.1. Konwersja DNA

Pierwszy etap reakcji stanowi konwersja niemetylowanych cytozyn do uracylu poprzez reakcję z wodorosiarczanem IV sodu w celu odróżnienia sekwencji niemetylowanej od metylowanej. DNA wyizolowane z linii komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani oraz tkanek kontrolnych (1 µg) zostało skonwertowane przy użyciu EpiTect DNA Modification Kit (Qiagen) według zaleceń producenta. Analizowaną grupę stanowiło 25 linii komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani, zaś grupę kontrolną - 10 prób DNA uzyskanych z wymazów z wewnętrznej strony policzka (W1 - W10). Wykonano także analizę poziomu metylacji DNA regionu promotorowego genu *CDK1* wykorzystując próby DNA uzyskane z guzów pierwotnych płaskonabłonkowego raka krtani (n = 41). Charakterystyka linii komórkowych oraz materiału pierwotnego znajduje się w Tabelach Z1 i Z2 (Załącznik).

4.2.2. Pirosekwencjonowanie

DNA poddane konwersji amplifikuje się poprzez reakcję PCR. Startery zostały zaprojektowane z użyciem programu PyroMark Assay Design Software 1.0 (Biotage, Uppsala, Szwecja). Jeden ze starterów każdej pary, został wyznakowany biotyną. Sekwencje starterów, długości amplikonów oraz zastosowane temperatury przyłączania wraz z liczbą sekwencji CG zawartych w analizowanym fragmencie DNA zebrane są w Tabeli 3.

Tabela 3. Lista starterów wykorzystanych w reakcjach pirosekwencjonowania. F - starter F (ang. *Forward*); R - starter R (ang. *Reverse*); S - starter sekwencyjny (ang. *Sequencing*); TSS - miejsce startu transkrypcji (ang. *Transcription Start Site*); bd - brak danych. Gwiazdka przy lokalizacji genu oznacza, że jest on zlokalizowany na nici ujemnej.

Gen	Sekwencje starterów 5' - 3'	Długość amplikonu [bp]	Temperatura przyłączania starterów [°C]	Lokalizacja analizowanej sekwencji (UCSC Genome Browser hg19)	Lokalizacja badanych dinukleotydów (Liczba analizowanych dinukleotydów CG)	Lokalizacja TSS (UCSC Genome Browser hg19)
	F: AGATAGAAAGTAGTTAGGGGATG					
ATAD2	R: biot-AACATTTAATCACCACCTACTTTAC	194	60	chr8:124408026-124408220 *	chr8:124408093-124408143 (9)	chr8:124408705
	S: AATTTAGGGTAGGAGTTTG					
	F: TGGTTTTAAAGTTGGTTTTTGGAAA					
CDK1	R: biot-ACCCTAACCCCAACCACTATA	110	60	chr10:62538241-62538350	chr10:62538271-62538309 (7)	chr10:62538212
	S: TGGTTTTTGGAAATTGAG					
	F: biot-ATTTTGGGGTAGGTTGTGGG					
CEACAM6	R: CACCACTACCAAACTCACTAT	91	65	chr19:42260536-42260626	chr19:42213656-42213670 (3)	chr19:42259398
	S: ACCAAACTCACTATTAAATC					
	F: GTGATTGGGTAAAGGTTAGAAATT					
CLCA4	R: biot-AAACCACTTAATCTTCATAAAAATT	123	55	chr1:87018635-87018757	chr1:87018669-87018699 (3)	chr1:87012759
	S: AAGGTTAGAAATTGAGTTTTG					
	F: GGTATTTGTAGGAGTTGGATAAGGA					
FUT3	R: biot-CCTACTACAATTTCCAACAAACCTT	129	60	chr19:5844198-5844326 *	chr19:5843865-5843912 (7)	chr19:5851485
	S: GTAGGAGTTGGATAAGGATTA					
	F: GGTTAGATGAAAGAAGGAAGGT					
LAPTM4B	R: biot-AACTCCAACCAACTACTAAAAC	120	55	chr8:98787841-98787960	chr8:98787864-987879898 (3)	chr8:98787809
	S: AGATGAAAGAAGGAAGGTT					
	F: GAGATGGTTTTGTTTGGGGTAGA					
SERPINH1	R: biot-ACCCCCAAACTCTCTACATA	98	55	chr11:75272921-75273018	chr11:75272951-75272985 (5)	chr11:75273101
	S: TGTTTGGGGTAGAGT					
	F: TTTTGAGTTAGGTGTGGGATATA					
LINE-1	R: Biot-AAAATCAAAAAATTCCCTTTC	146	55	bd	4	bd
	S: GGGTGGGAGTGAT					

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Stężenie wyjściowe	Objętość na próbę [µl]
PyroMark Buffer	2x	12,5
Starter F	20 µM	0,5
Starter R	20 µM	0,5
CoralLoad	10x	2,5
dH₂O	-	8
DNA po konwersji	-	1

Reakcja PCR została zoptymalizowana i przeprowadzona przy użyciu PyroMark PCR kit (Qiagen) według zaleceń producenta. Skład mieszaniny reakcyjnej:

W reakcji PCR dla każdego z analizowanych genów użyto także prób DNA o pełnej metylacji (opisane w tekście jako FM) oraz niemetylowanego DNA (opisane jak o UM) pochodzącego z reakcji amplifikacji całego genomu przeprowadzonej na limfocytach krwi obwodowej. Reakcja prowadzona była w następujących warunkach:

	Etap reakcji	Temperatura [°C]	Czas
Cykl 1	Inkubacja wstępna - aktywacja polimerazy	95	15 minut
	Denaturacja	94	30 sekund
Cykl 2(45x)	Przyłączanie starterów	55-60	30sekund
	Wydłużanie łańcucha	72	30 sekund
Cykl 3	Dodatkowe wydłużanie	72	10 minut
Cykl 4	Zakończenie	10	∞

W celu potwierdzenia specyficzności uzyskanych produktów PCR analizowano je poprzez elektroforezę w 1,8% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny, w buforze 1x TBE.

Reakcję przeprowadzono w aparacie PyroMark Q24 (Qiagen) przy wykorzystaniu odczynników przeznaczonych do reakcji pirosekwencjonowania tej samej firmy. Produkt PCR został oczyszczony z użyciem kolejno: 70% alkoholu etylowego, 0,2% NaOH oraz buforu płuczącego (według zaleceń firmy Qiagen). Starter sekwencyjny został zdenaturowany w 85°C przez 2 minuty a następnie hybrydyzowany do matrycy DNA.

Uzyskane wyniki analizowano w programie PyroMarkQ24 software wersja 2.0.6 (Qiagen).

4.2.3. Analiza wyników

Wyznaczono kluczowe wartości odcięcia dla każdego z genów, wyznaczające zakres poziomu metylacji DNA przyjmowany w niniejszej pracy jako hipermetylacja oraz hipometylacja:

- hipermetylacja: wartości powyżej najwyższego wyniku uzyskanego dla prób grupy kontrolnej dodanego do dwukrotnej wartości odchylenia standardowego obliczonego dla próbek kontrolnych. w przypadku uzyskania wyniku powyżej 100 jako wartość odcięcia przyjmowano 100%,
- hipometylacja: wartości poniżej najniższego wyniku uzyskanego dla prób z grupy kontrolnej pomniejszone o dwukrotną wartość odchylenia standardowego obliczonego dla próbek kontrolnych.

Uzyskane wyniki analizowano w odniesieniu do krzywych wyznaczonych na podstawie wyników uzyskanych dla serii rozcieńczeń DNA o pełnej metylacji wykonanej dla każdego z genów. Seria ta obejmowała próby DNA o metylacji w zakresie 0 - 100%, różniące się od siebie o 10%.

Analizę korelacji poziomu metylacji DNA regionu promotorowego genu z poziomem ekspresji genu (wyniki analizy RT-qPCR) oraz czasem przeżycia pacjenta, od którego pobrano fragment guza w celu wyprowadzenia linii komórkowej, wykonano z wykorzystaniem testu Pearsona. Poziom istotności statystycznej różnicy pomiędzy poziomem metylacji DNA genów w liniach komórkowych LSCC i próbach kontrolnych określono z użyciem testu U Manna-Whitney'a. Wyniki uznano za istotnie, gdy p<0,05.

4.3. Analiza zmian sekwencji DNA na podstawie danych dostępnych za pośrednictwem baz danych (cBioPortal, COSMIC)

Wszystkie z badanych genów przeanalizowano z wykorzystaniem bazy danych gromadzącej dane z zakresu genomiki nowotworów: cBioPortal [64], [65]. Dane umieszczone w bazie, które posłużyły do wykonania poniższego porównania obejmują 279 prób uzyskanych od pacjentów z płaskonabłonkowym rakiem głowy i szyi i zostały

opublikowane w 2015 roku w czasopiśmie *Nature* [66]. Spośród analizowanych prób 72 pobrano z krtani.

Dodatkowo przeanalizowano dostępne dane dotyczące mutacji w płaskonabłonkowym raku krtani zgromadzone w bazie COSMIC (Catalogue Of Somatic **Mutations** In Cancer. GRCh38. COSMIC wersja v83. http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic [67]. Badana grupa obejmowała 512 prób płaskonabłonkowego raka krtani, aczkolwiek nie dla wszystkich próbek dostępne były informacje dotyczące mutacji w obrębie genów analizowanych w niniejszej pracy.

5. Analizy wykonane dla wytypowanego potencjalnego onkogenu - CDK1

5.1. Analiza poziomu białka CDK1 - Western blot

Białka analizowano z użyciem techniki Western blot, polegającej na wykrywaniu białek poprzez zastosowanie specyficznych dla niego przeciwciał. Białka zostają rozdzielone w żelu poliakrylamidowym na podstawie masy molekularnej, a następnie membrane (filtr) nitrocelulozowy lub PVDF w celu ich przenoszone na unieruchomienia. Stosuje się przeciwciała pierwszorzędowe - skierowane przeciwko badanemu białku oraz drugorzędowe - przeciwko pierwszorzędowemu. Przeciwciało drugorzędowe sprzężone jest z enzymem, dzięki czemu po podaniu mieszaniny do detekcji zawierającej jego substrat następuje reakcja chemiczna, która umożliwia lokalizację badanego białka na membranie. W niniejszej pracy wykorzystano detekcję z zastosowaniem chemiluminescencji. Przeciwciało drugorzędowe sprzężone było z peroksydazą chrzanową. Po podaniu mieszaniny zawierającej nadtlenek wodoru oraz luminal następują reakcja utlenienia luminalu przez peroksydazę i uwolnienie nadmiaru energii w postaci fotonów światła. Do analizy w niniejszej pracy wykorzystano zarówno linie komórkowe płaskonabłonkowego raka krtani (n = 25) jak i kontrolne lizaty białkowe uzyskane z tkanek obrębu głowy i szyi - izolacja białek bezpośrednio z tkanki lub z komórek uzyskanych z hodowli krótkoterminowych (n = 8).

5.1.1. Denaturacja prób i elektroforeza SDS-PAGE

Lizaty komórkowe denaturowano w buforze do próbek 4xLaemmli [68] z SDS w temperaturze 95°C przez 5 minut. Na żel nakładano 20 µg białka do każdej ze

ścieżek. Następnie próby rozdzielano elektroforetycznie w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących.

Rozdział białek prowadzono w buforze TRIS-Glicyna-SDS przy stałym napięciu 100V, z użyciem systemu Mini Protean (Bio-Rad) do momentu osiągnięcia przez barwnik znajdujący się w próbach końca żelu. Wielkość białka oceniano w odniesieniu do wzorca wielkości białek Precision Plus Protein[™] Kaleidoscope[™] Prestained Protein Standard (Bio-Rad). Skład mieszanin do przygotowania żeli zamieszczono poniżej:

Składnik żelu	Żel zagęszczający 4% [ml]	Żel rozdzielający 12% [ml]
40% akrylamid/bisakrylamid (29:1)	0,5	3
1,5M TRIS (pH 8,8)	-	2,5
0,5M TRIS (pH 6,8)	1,25	-
dd H ₂ O	3,2	4,3
10% SDS	0,05	0,1
10% APS	0,05	0,1
TEMED	0,005	0,01

5.1.2. Transfer białek na membranę

Po zakończeniu elektroforezy, wykonano transfer mokry (system MiniProtean, Bio-Rad), z użyciem buforu TRIS-Glicyna z dodatkiem 20% alkoholu metylowego. Białka przenoszono na membranę wykonaną z polifluorku winylidenu (PVDF) po jej uprzedniej aktywacji w 100% alkoholu metylowym. Transfer prowadzono przez 60 minut, przy stałym napięciu 100V w temperaturze +4°C. Po zakończeniu transferu, jego jakość oraz jakość prób analizowano poprzez barwienie białek związanych do membrany odczynnikiem Ponceau S.

5.1.3. Detekcja białek i analiza wyników

Membrany inkubowano w buforze blokującym (5% mleko odtłuszczone w TBS-T) przez 60 minut w temperaturze +4°C z łagodnym mieszaniem. Następnie przeprowadzono inkubację z przeciwciałem pierwszorzędowym skierowanym przeciwko badanemu białku (przez noc, +4°C, lekkie mieszanie). Przeciwciała

zawieszono w buforze blokującym. W niniejszej pracy stosowano trzy warianty przeciwciał anty-CDK1:

- przeciwciało anty-CDK1 wiążące się do C-końca białka,
- przeciwciało anty-CDK1 wiążące się do białka posiadającego w pozycji 161 ufosforylowaną treoninę (phospho T161 anty-CDK1);
- przeciwciało anty-CDK1 wiążące się do N-końca białka w celu analizy linii komórkowych różniących się pod kątem wariantów polimorfizmów genu *CDK1* zidentyfikowanych techniką sekwencjonowania Sangera. Linie komórkowe wybrane do analizy przedstawiono poniżej:

Linia komórkowa	Polimorfizm genu CDK1		
Linia komorkowa	rs3212319	rs1871446	
UT-SCC-6B	C/C	A/G	
UT-SCC-35	-/-	G/G	
UT-SCC-42B	C/C	A/G	
UT-SCC-49	C/C	A/A	
UT-SCC-50	-/-	G/G	
UT-SCC-108	C/-	G/G	
UT-SCC-116	C/-	A/G	

Po zakończeniu inkubacji, membrany płukano trzykrotnie po 10 minut w buforze TBS-T, nałożono przeciwciało drugorzędowe i przeprowadzono inkubację (2 godziny, temperatura pokojowa, łagodne mieszanie). Membrany płukano przez 10 minut w buforze TBS-T a następnie dwukrotnie w TBS przez 10 minut.

Jako kontrolę nałożenia (ang. *loading control*) użyto białka GAPDH, inkubacje prowadzono w identyczny sposób jak przedstawiony dla badanych genów. Lista użytych przeciwciał, wraz z zastosowanymi rozcieńczeniami zebrano poniżej:

Przeciwciało (producent, numer katalogowy)	Rozcieńczenie	
Królicze poliklonalne Anty-CDK1 koniec C białka (Abcam, ab7953)	1:1000	
Królicze poliklonalne Anty-CDK1 koniec N białka (Abcam, ab131011)	1:6000	
Królicze poliklonalne Anty-CDK1 ufosforylowane białko - phospho T161 (Abcam, ab138389)	1:750	
Królicze poliklonalne Anty-GAPDH (Abcam, ab9485)	1:2500	
Przeciwciało drugorzędowe:	1:38500	
Kozie przeciw króliczemu: IgG H&L (Abcam, ab97051)	1.50500	

Na membrany nałożono odczynniki do detekcji opartej o chemiluminescencję (SuperSignal[™] West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific) postępując według zaleceń producenta. Wizualizacji wyników dokonano z wykorzystaniem systemu ChemiDoc+ XRS (Bio-Rad).

5.1.4. Analiza wyników

Uzyskane pliki graficzne analizowano za pomocą kompatybilnego z systemem ChemiDoc+XRS programu Image Lab 5.1 (Bio-Rad). Względny poziom akumulacji białka CDK1 w poszczególnych linach komórkowych wyliczano na podstawie intensywności prążków uzyskanych na membranie dla GAPDH i CDK1 z użyciem narzędzia "Relative Quantity" ("względna ilość"). Dla każdej z linii komórkowych jako prążek referencyjny przyjmowano prążek dla GAPDH. Wynik stanowił proporcję intensywności prążka dla CDK1 do intensywności prążka dla GAPDH (CDK/GAPDH). Do analizy wybierano obrazy, dla których nie obserwowano saturacji sygnału w żadnym z analizowanych prążków.

5.2. Detekcja białka CDK1 - Barwienie immunohistochemiczne

Barwienie immunohistochemiczne polega na uwidacznianiu badanego antygenu (w przypadku niniejszej pracy - białka) w odpowiednio przygotowanym materiale tkankowym, np. utrwalonym w formalinie oraz zatopionym w postaci bloczków parafinowych.

W badaniu wykorzystano dwuetapową, pośrednią metodę barwienia immunohistochemicznego z wykorzystaniem specyficznego pierwszorzędowego przeciwciała wiążącego się z analizowanym białkiem oraz znakowanym przeciwciałem drugorzędowym, skierowanym przeciwko immunoglobulinie zwierzęcia, od którego uzyskano pierwszorzędowe przeciwciało. Utworzony w ten sposób złożony kompleks wykrywa się za pomocą chromogenu, będącego związkiem umożliwiającym wytworzenie barwnego, trwałego produktu reakcji.

Analiza wykonana została w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii Klinicznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy pod kierunkiem prof. Andrzeja Marszałka. Poniżej przedstawiono sposób oznaczania

46

antygenu w tkankach przechowywanych w postaci bloczków parafinowych oraz analizy wyników.

5.2.1. Przygotowanie skrawków oraz wykrywanie antygenów

Bloczki parafinowe skrojono na grubość 3 µm i umieszczono na szkiełkach podstawowych o zwiększonej adhezyjności. Skrawki wysuszono i poddano wstępnej deparafinizacji w temperaturze 60°C przez noc. Następnie przeprowadzono ostateczną deparafinizacje ksylenów uwodnienie w szeregu (I - IV), w szeregu alkoholi o malejącym stężeniu (99,8% - 80%) oraz odsłoniecie antygenów w buforze o wysokim pH (Epitope Retrieval Solution high-pH, Dako) w temperaturze 95 - 99°C przez 20 minut. Skrawki studzono (20 minut, do uzyskania przez bufor reakcyjny temperatury 65°C). Endogenną aktywność enzymatyczną zablokowano z użyciem 3% wodnego roztworu perhydrolu (10 min, temperatura pokojowa) oraz zablokowano miejsca nieswoistych wiązań przeciwciała (5% BSA w buforze PBS, 10 minut, temperatura pokojowa).

Tak przygotowany materiał tkankowy inkubowano z pierwszorzędowym przeciwciałem, skierowanym przeciwko lokalizowanemu antygenowi wykorzystując królicze poliklonalne przeciwciało anty-CDK1 (immunogen: C-koniec białka, Abcam, ab7953) stosując rozcieńczenie 1:250 w temperaturze 37°C przez 30 min. Następnie przeprowadzono inkubację wycinków z drugorzędowym przeciwciałem znakowanym peroksydazą chrzanową. Do lokalizacji kompleksu antygen-przeciwciało jako chromogen wykorzystano DAB (3-3'diaminobenzydyna). W celu kontrastowego wybarwienia tła podbarwiono jądra komórkowe za pomocą hematoksyliny wg Meyera. Badany materiał odwodniono w alkoholach etylowych o wzrastającym stężeniu (od 80% do 99,8%), następnie całkowicie odwodniono i prześwietlono skrawki w szeregu ksylenów (I - IV), a ostatecznie preparaty zamknięto w medium (Consul Mount, ThermoScientific).

5.2.2. Analiza półilościowa oznaczanych antygenów

Odczyny immunohistochemiczne zostały analizowane w mikroskopie świetlnym ECLIPSE E800 (NIKON). Wykonano mikrofotografie w trzech reprezentatywnych obszarach każdego z badanych przypadków, przy pierwotnym powiększeniu obiektywu

20x. W obszarze utkania guza, każda z fotografii została wykonana w miejscu, gdzie masa guza stanowiła minimum 80% obszaru.

ekspresji białka Ocenę poziomu oznaczanego na podstawie reakcji immunohistochemicznej w obszarze guza oraz w obszarze prawidłowej błony śluzowej zautomatyzowanych przeprowadzono za pomocą metod morfometrycznych z wykorzystaniem narzędzia graficznego ImageJ (wersja 1.46a). Analizę przeprowadzili dr Magdalena Bodnar oraz dr Łukasz Szylberg, wykorzystując autorski algorytm analizy obrazu [69]. Obraz został przetworzony z wykorzystaniem funkcji "Colour Deconvolution" i "Treshold" w programie ImageJ w celu przekonwertowania obrazu na plik umożliwiający analizę graficzną. Wyniki dla poszczególnych z analizowanych skrawków porównywano w oparciu o wartości w skali IRS (ImmunoReactive Score), który zdefiniowany jest jako stosunek procentu pozytywnie wybarwionych komórek do intensywności ekspresji białka CDK1. Na zaznaczonych fragmentach wykonano serię pomiarów intensywności ekspresji (w skali szarości 0 - 255 gdzie 0 = kolor czarny, 255 = kolor biały). Powierzchnię obszaru zajętego przez barwnik wyliczono w skali 0 -3, gdzie 0: brak wybarwionych komórek; 1: <10% wybarwionych komórek; 2:10 - 50% wybarwionych komórek; 3: ≥50% wybarwionych komórek). Następnie dokonano obliczeń w celu uzyskania mediany intensywności ekspresji genu CDK1, a także powierzchni obszaru zajętego przez barwnik [69].

5.2.3. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono z zastosowaniem programu STATISTICA 10. Zgodność poszczególnych zmiennych z rozkładem normalnym zbadano wykorzystując test Kołmogorowa-Smirnowa z poprawką istotności Lillieforsa oraz testem Shapiro-Wilka. Jednorodność wariancji oceniono za pomocą testu Levene'a. Analiza statystyczna została przeprowadzona za pomocą testu U Manna-Whitneya. Za różnicę istotną statystycznie przyjęto wartości p<0,05.

5.3. Sekwencjonowanie DNA techniką Sangera

W celu analizy zmian w sekwencji genu, wykonano sekwencjonowanie DNA metodą Sangera. Metoda ta polega na analizie fragmentów DNA powstających w trakcie reakcji PCR, w której używa się, obok prawidłowych nukleotydów

(deoksynukleotydy, dNTP), nukleotydów pozbawionych grupy hydroksylowej w pozycji 3' (dideoksynukleotydy, ddNTP). Wprowadzenie takiego nukleotydu uniemożliwia dalsze wydłużane łańcucha DNA przez polimerazę, co skutkuje uzyskaniem fragmentów DNA o różnej długości. Każdy z dideoksynukleotydów sprzężony jest z innym barwnikiem fluorescencyjnym, dzięki czemu, po uszeregowaniu fragmentów DNA pod względem ich wielkości, możliwe jest odczytanie analizowanej sekwencji. W niniejszej pracy, badano sekwencję kodującą genu *CDK1* wykorzystując próby DNA z 25 linii komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani.

5.3.1. Projektowanie starterów i reakcja PCR

Startery do reakcji PCR zostały zaprojektowanie przy użyciu programu bezpłatnej wersji programu Primer3 v.0.4.0 (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/), ich specyficzność potwierdzono przy wykorzystaniu narzędzia Primer BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Sekwencje starterów wraz z długością amplikonów znajdują się w Tabeli 4.

Tabela 4.	Lista starterów	wykorzystanych	w reakcjach	sekwencjonowania	genu	CDK1.	F-
starter F (ar	ng. Forward); R	- starter R (ang. R	leverse).				

Numer eksonu genu CDK1	Sekwencje starterów (5'-3')	Długość amplikonu (bp)
Ekson1	Ekson niekodujący	nd
Ekson 2	F: CACGTTTCCAATGTCTCAGG R: CGGTCATTAGGGATTCGGTA	478
Ekson 3	F: CAAGACCCTGCCATAAGGAA R: TGTGCGGCATTCTCAACTAC	396
Ekson 4	F: GTTGCCCTGAGATTCCTTTC R: CCACAAAATGCAGGGACTTC	380
Ekson 5	F: GCCTAAAATGGCCTGAAAGC R: CTCCTGCCATGTCCCTCTAG	545
Ekson 6+7	F: TTGGTGGCAGTCATACAACC R: TTTTCTAGGCAAAACAAAGAACTG	591
Ekson 8	F: TGAAAGTATTAGTTTTGGTTTATTGC R: CGAAGTACAGCTGAAGTTTGATAAC	326

Reakcję PCR prowadzono w termocyklerze DNA Engine Dyad Thermal Cycler (Bio-Rad) w następujących warunkach:

	Etap reakcji	Temperatura [°C]	Czas
Cykl 1	Inkubacja wstępna - aktywacja polimerazy	95	10 minut
	Denaturacja	95	15 sekund
Cykl 2(34x)	Przyłączanie starterów	60	15 sekund
	Wydłużanie łańcucha	72	40 sekund
Cykl 3	Dodatkowe wydłużanie	72	10 minut
Cykl 4	Zakończenie	10	8

Reakcję prowadzono z użyciem Polimerazy Taq (Sigma lub Fermentas). Skład mieszaniny reakcyjnej:

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Stężenie wyjściowe	Objętość na próbę [µl]
Taq Bufor	10x	1
Starter F	10 uM	0,2
Starter R	10 uM	0,2
dNTP (mieszanina)	10 mM	0,2
MgCl ₂	25mM	2,5
dH ₂ O	-	5,52
Taq DNA Polimeraza	5U/μl	0,08
DNA	25ng/μl	2

Wielkość produktów PCR sprawdzano poprzez elektroforezę w 1,8% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny, w buforze 1x TBE.

5.3.2. Oczyszczanie produktów PCR i reakcja sekwencjonowania

Produkty PCR oczyszczono przy użyciu gotowego zastawów odczynników: ExoSAP-IT reagent (USB Corporation, Cleveland, OH, USA). Mieszaninę reakcyjną przygotowano na lodzie, dodając 1,8 µl odczynnika do 5 µl produktu PCR. Mieszaninę inkubowano 15 minut w 37°C a następnie 15 minut w 85°C. Po zakończeniu mieszaninę rozcieńczano dodając 50 µl wody dejonizowanej i przechowywano w temperaturze -20°C.

Sekwencjonowanie prowadzono przy wykorzystaniu BigDye Terminator v3.1 Cycle Seqencing Kit (Applied Biosystems, USA). Warunki reakcji oraz skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono poniżej:

	Etap reakcji	Temperatura [°C]	Czas
Cykl 1	Aktywacja polimerazy	96	2 minuty
	Denaturacja	96	10 sekund
Cykl 2(26x)	Przyłączanie starterów	50	5sekund
	Wydłużanie łańcucha	60	4 minuty
Cykl 3	Zakończenie	10	∞

Skład mieszaniny reakcyjnej:

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Stężenie wyjściowe	Objętość na próbę [µl]
Bufor	5x	2
Starter	10μΜ	1
BigDye	-	0,4
dH ₂ O	-	5,1
Produkt PCR po oczyszczeniu, rozcieńczony 10x	-	1,5

Po zakończeniu reakcji, produkt oczyszczono, dodając do każdej probówki 2,5 μ l 125 mM EDTA oraz 30 μ l 96% alkoholu etylowego. Próby intensywnie mieszano a następnie inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Następnie wirowano (30 minut, 3000 g, +4°C), poprzez odwrócenie probówek usuwano supernatant i wirowano w pozycji odwróconej w temperaturze +4°C (czas wirowania - do osiągnięcia przez wirówkę prędkości równej 180 g). Osad przemyto 70% alkoholem etylowym o temperaturze pokojowej i wirowano (15 minut, 1600 g, +4°C). Poprzez odwrócenie probówek usuwano supernatant, wirowano w pozycji odwróconej przez minutę od momentu uzyskania przez wirówkę prędkości równej 180 g (temperatura wirowania: +4°C). Po 2 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej do każdej z prób dodano 12 μ l formamidu, uprzednio mocno mieszanego i wirowanego. Rozdziału uzyskanych produktów oraz ich odczytu dokonano przy wykorzystaniu sekwenatora ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

5.3.3. Analiza wyników

Uzyskane odczyty sekwencji DNA analizowano przy wykorzystaniu bezpłatnej wersji testowej oprogramowania CodonCode Aligner. Sekwencję referencyjną użytą do analizy stanowiła sekwencja NC_000010.10 (GRCh37/hg19). Wykonano analizę statystyczną (test U Manna-Whitney'a) w celu porównania poziomu ekspresji genu *CDK1* (wyniki PCR w czasie rzeczywistym) w liniach komórkowych różniących się wariantem polimorfizmu: genotyp homozygotyczny allelu macierzystego (ang. *ancestral allele*) danego polimorfizmu *versus* grupa złożona z heterozygot i genotypu homozygotycznego allelu pochodnego polimorfizmu. Wyniki uznano za istotne, jeśli p<0,05.

Częstości genotypów i alleli zidentyfikowanych polimorfizmów w analizowanych liniach komórkowych LSCC zostały porównane z częstościami zmian w populacjach fińskiej (ze względu na fakt, iż pacjenci, od których zostały wyprowadzone linie komórkowe pochodzili z Finlandii) i europejskiej z wykorzystaniem danych dostępnych w bazie 1000 Genomes (1000 Genomes Project Phase 3). Aby porównać rozkład genotypów (genotyp homozygotyczny allelu macierzystego *versus* grupa złożona z heterozygot i homozygot o genotypie pochodnym) i alleli zidentyfikowanych polimorfizmów w badanej grupie linii komórkowych LSCC z populacja fińską i europejską wykorzystano test chi kwadrat (χ^2).

5.4. Wyciszanie genu *CDK1* poprzez interferencję RNA (RNAi) oraz potwierdzanie skuteczności wyciszenia genu

Zjawisko interferencji RNA (RNAi) stanowi komórkowy mechanizm obronny przeciwko obcemu (np. wirusowemu) dwuniciowemu RNA trafiającego do komórek. Taka cząsteczka jest cięta przez enzym o aktywności RNAzy - DICER na odcinki długości 20 - 25 nt - siRNA (ang. *small interfering RNA*). Fragmenty te wiązane są przez białkowy kompleks o aktywności endonukleazy - RISC (ang. *RNA-Induced Silencing Complex*). Nici RNA rozdzielają się i kierowane są do docelowego mRNA. Warunkiem utworzenia kompleksu siRNA z mRNA jest całkowita komplementarność zasad obu cząsteczek. Po związaniu aktywowany zostaje enzym AGO (Argonauta,

Slicer) zlokalizowany w obrębie kompleksu RISC, będący RNAzą H. Ma on zdolność cięcia i degradowania związanych z siRNA cząsteczek mRNA genu docelowego.

5.4.1. Wyciszanie genu CDK1 w liniach komórkowych LSCC

Aby przeanalizować rolę jaką pełni gen *CDK1* w komórkach płaskonabłonkowego raka krtani, trzy linie komórkowe poddano wyciszaniu genu z zastosowaniem zjawiska interferencji RNA. Wykorzystano technikę opartą o przejściową transfekcję komórek z użyciem siRNA. W technice tej stosuje się krótkie cząsteczki interferującego RNA wprowadzane do komórek za pomocą liposomów bądź też elektroporację.

Linie komórkowe LSCC wybrane do wyciszania genu *CDK1* wytypowane zostały na podstawie wyników analizy ekspresji genów metodą RT-qPCR i wartości odcięcia wyznaczonej na podstawie wyników dla grupy nienowotworowych prób kontrolnych przyjętej jako podwyższony poziom ekspresji genu. W linii UT-SCC-107 obserwowano podwyższenie ekspresji genu, natomiast w linii UT-SCC-34 poziom ekspresji nie przekraczał wartości odcięcia. Dla linii UT-SCC-106A poziom ekspresji genu był drugim z najniższych ze wszystkich badanych linii komórkowych. Niższy poziom ekspresji obserwowany był w linii komórkowej UT-SCC-23, jednak nie była ona dostępna do badań w czasie, gdy były one wykonywane. Co istotne, we wszystkich liniach komórkowych ekspresja genu *CDK1* była podwyższona w stosunku do nienowotworowej krtani.

Wyciszanie genu przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnie dostępnego zestawu oligonukleotydów (Trilencer-27 Human siRNA, OriGene, numer SR300701). W skład zestawu wchodzą trzy 27-nukleotydowe dupleksy siRNA wyciszające gen oraz kontrola negatywna: 27 - nukleotydowy dupleks siRNA o sekwencji niekomplementarnej do znanych sekwencji genów ludzkich, każdy w ilości 2 nmoli. Sekwencje oligonukleotydów stanowią tajemnicę handlową i nie są udostępniane. Poniżej przedstawiono udostępnione sekwencje siRNA wyciszające gen CDK1 (SR300701 A - C, Origene, oznaczone w pracy odpowiednio: siRNA-A, -B i -C) oraz kontroli negatywnej (Trilencer-27 Universal Scrambled Negative Control siRNA Duplex, Origene, numerSR30004, oznaczonej W pracy jako siRNA-N). W sekwencjach nieudostępniane nukleotydy oznaczono jako "r":

53

siRNA-A: rGrGrArArCrUrUrCrGrUrCrArUrCrCrArArArUrArUrArGTC siRNA-B: rGrArCrUrArArCrUrArUrGrGrArArGrArUrUrArUrArCrCAA siRNA-C: rArCrUrArCrArGrGrUrCrArArGrUrGrGrUrArGrCrCrArUGA siRNA-N: cała sekwencja stanowi tajemnicę handlową

W dalszej części pracy dupleksy siRNA wyciszające gen *CDK1* określane będą jako siRNA-A, -B, -C natomiast dupleks kontrolny jako siRNA-N.

Wykorzystane dupleksy siRNA zostały przygotowane zgodnie ze wskazówkami producenta. Każdy z dupleksów zawieszono w buforze wolnym od RNAz (dostarczonego przez producenta) w ilości odpowiednio: 100 µl do dupleksów siRNA wyciszających *CDK1* oraz 50 µl do dupleksu siRNA kontrolnego, uzyskując stężenie 20 µM. Mieszaniny inkubowano w 94°C przez 2 minuty. Po wystudzeniu przygotowano roztwór 5 µM, stanowiący roztwór bezpośrednio wykorzystywany do analiz. Roztwory przechowywano w temperaturze -20°C.

Transfekcję komórek wykonano z użyciem odczynnika do transfekcji - JetPrime (PolyPlus Transfection) zgodnie z zaleceniami producenta. Komórki hodowano na płytkach 48- lub 24- dołkowych, w zależności od prowadzonego badania. Konfluencja komórek w momencie transfekcji wynosiła 40 - 60%. W tabeli poniżej zebrano warunki transfekcji:

Wielkość płytki	Liczba komórek poszczególnych linii komórkowych nanoszonych do dołka na dzień przed transfekcją [x1000]	Objętość buforu JetPrime na 1 dołek [µl]	Objętość dupleksu siRNA [µl]	Objętość odczynnika JetPrime [µl]	Objętość medium hodowlanego na 1 dołek [µl]
48 - dołkowa	UT-SCC-107: 40 UT-SCC-34: 40 UT-SCC-106A: 50	24,4	0,6 [10nM]	1	250
24 - dołkowa	UT-SCC-107: 80 UT-SCC-34: 80 UT-SCC-106A: 80	48,8	1,2 [10nM]	2	500

Aby ocenić poziom wyciszenia genu, wykonano PCR w czasie rzeczywistym (RTqPCR) oraz Western blot. Izolację RNA przeprowadzono po 24 godzinach, natomiast izolację białek po 48 godzinach od transfekcji. Izolację RNA przeprowadzono w sposób analogiczny do opisanego w rozdziale *Metody* (podrozdział 1.4.1.) używając 0,5 ml Trizolu na każdy dołek. Odwrotną transkrypcję wykonano z użyciem Maxima First Strand cDNA z DNAzą (Thermo Scientific) wykorzystując 0,25 μg RNA do reakcji. PCR w czasie rzeczywistym wykonany został analogicznie do opisanego w rozdziale *Metody* (podrozdział 2.2.) z *GAPDH* (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) i *ACTB* (Actin-B) użytymi jako geny referencyjne. Sekwencje starterów znajdują się w Tabeli 5.

Tabela 5. Sekwencje starterów wykorzystanych w reakcji PCR w czasie rzeczywistym. F - starter F (ang. *Forward*); R - starter R (ang. *Reverse*).

Gen	Sekwencje starterów 5' - 3'	Długość amplikonu [bp]	Temperatura przyłączania starterów [°C]	Wydajność reakcji PCR [%]
CDK1	F: CAGACTAGAAAGTGAAGAGGAAGG	101	55	100
NM_001170406	R: ACTGACCAGGAGGGATAGAATC	151	55	
GAPDH	F: GTCGGAGTCAACGGATT	220	55	96
NM_002046	R: CCTGGAAGATGGTGATGG	220	55	90
АСТВ	F: CACCACACCTTCTACAATG	160		100
NM_001101	R: TAGCACAGCCTGGATAG	102	55	

Skład mieszaniny reakcyjnej:

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Stężenie wyjściowe	Objętość na próbę [µl]
HOT FIREPol [®] EvaGreen [®] qPCR Mix Plus	5x	2
Starter F	50 µM	0,04
Starter R	50 µM	0,04
H ₂ 0	-	6,96
cDNA	-	1

Białka izolowano w sposób przedstawiony w rozdziale *Metody* (podrozdział 1.5.1.) z niewielką modyfikacją. Komórki rosnące w naczyniu przepłukano dwukrotnie zimnym PBS a następnie wykonano lizę komórek z użyciem buforu NP-40 z dodatkiem inhibitora proteaz (20 µl buforu/dołek) bez uprzedniego uwalniania ich z powierzchni naczynia. Pozwoliło to na zminimalizowanie strat w liczbie komórek w trakcie kolejnych płukań. Dalsza izolacja białek oraz pomiar stężenia białek wykonano wg opisanego wcześniej protokołu. Wykonano analizę Western blot według warunków przedstawionych w rozdziale *Metody* (podrozdział 5.1) niniejszej pracy nanosząc 10 µg

białka na każdą ścieżkę żelu poliakrylamidowego. Użyto przeciwciała anty-CDK1, skierowanego przeciwko końcowi C białka (Abcam, ab7953).

Dla każdego z użytych dupleksów siRNA ustalono wyrażony w procentach poziom uzyskiwanego wyciszenia genu *CDK1* przyjmując poziom ekspresji genu (zarówno na poziomie mRNA jak i białka) w linii transfekowanej kontrolnym dupleksem siRNA jako 100% ekspresji genu.

Do dalszych analiz wybrano dupleksy siRNA, dla której poziom wyciszenia genu *CDK1* w liniach komórkowych był najwyższy - uzyskano niski poziom ekspresji genu w analizie RT-qPCR i niski poziom akumulacji białka (Western blot). Poziom obniżenia ekspresji genu jaki uznano za jego skuteczne wyciszenie to 50%.

Aby ocenić czas trwania wyciszenia genu, wykonano transfekcję komórek wybranym dupleksem siRNA, a następnie izolowano RNA oraz białko po 24, 48, 72 godzinach od transfekcji. Wykonano odwrotną transkrypcję, RT-qPCR oraz Western blot w sposób przedstawiony w rozdziale *Metody* (podrozdziały 2.2 i 5.1.) Etap ten stanowił potwierdzenie stabilności wyciszenia genu w określonym czasie.

5.4.2. Analiza skutków wyciszenia genu CDK1 w liniach komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani

5.4.2.1. Mikromacierze ekspresyjne i analiza zmian ekspresji genów zależnych od *CDK1*

W celu analizy globalnego wpływu wyciszenia genu *CDK1* na ekspresję innych genów w liniach komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani przeprowadzono eksperyment z wykorzystaniem ekspresyjnych mikromacierzy Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array. W tym celu próbki zawierające minimum 1000 ng całkowitego RNA przekazano do firmy Atlas Biolabs (Berlin, Niemcy). Do analizy użyto RNA uzyskanego z dwóch linii komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani transfekowanych dupleksem siRNA wyciszającym *CDK1* (UT-SCC-107A i UT-SCC-34A) oraz linii komórkowych poddanych działaniu kontrolnego dupleksu siRNA (odpowiednio UT-SCC-107N i UT-SCC-34N). Hodowlę po transfekcji prowadzono przez 48 godzin. Dla każdej z linii komórkowych, poziom wyciszenia genu *CDK1* został potwierdzony poprzez PCR w czasie rzeczywistym i Western blot (w sposób

opisany w rozdziale *Metody*, podrozdziały odpowiednio: 2.2. i 5.1). Wstępna analiza statystyczna wykonana została przez firmę Atlas Biolabs, wyniki uzyskano w postaci tabel zbiorczych, wykorzystanych w celu przeprowadzenia własnych, sprecyzowanych w kontekście *CDK1* analiz.

Selekcja genów potencjalnie zależnych od *CDK1* wykonana została w dwóch etapach. Pierwszy opierał się na analizie wyników uzyskanych z mikromacierzy ekspresyjnych z zastosowaniem poniższych kryteriów:

a. detekcja sygnału danej pozycji na mikromacierzy opisanej unikalnym tagiem musi posiadać istotność statystyczną (mas5-Detection p-value <0.05), co stanowi potwierdzenie relatywnej ekspresji transkryptu hybrydyzującego z tym tagiem na mikromacierzy. Zarówno analiza statystyczna, jak i normalizacja mikromacierzy z wykorzystaniem metody Mas5 przeprowadzona została przez Atlas Biolabs.

b. Minimum dwukrotna zmiana poziomu ekspresji transkryptu hybrydyzującego z tagiem w linii z wyciszonym genem *CDK1* w odniesieniu do linii kontrolnej. Zmiana poziomu ekspresji musi być obserwowana w obu analizowanych liniach komórkowych.

 c. Sekwencja tagu dla którego obserwuje się zmianę poziomu ekspresji musi być zlokalizowana w obrębie sekwencji genu.

Po wytypowaniu genów o zmienionym poziomie ekspresji w liniach komórkowych LSCC z wyciszonym genem *CDK1* przeprowadzony został drugi etap selekcji. W oparciu o narzędzia: GO (Gene Ontology), DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, wersja v6.8) oraz GOrilla (Gene Ontology enRIchment anaLysis and visuaLizAtion tool, Updated March 8th 2013) przeprowadzono analizę funkcjonalnej charakterystyki genów oraz starano się wykryć procesy biologiczne w jakie powyższe geny mogą być zaangażowane. Po uzyskaniu listy domniemanych procesów, zawężono zbiór wynikowy stosując następujące kryteria: odrzucono procesy ze współczynnikiem wzbogacenia (ang. *enrichment score*) poniżej 1, jak również te, u których wartość statystyki p (p value) oraz współczynnika FDR (ang. *False Discovery Rate*, spodziewany odsetek wyników fałszywie dodatnich) przekraczała próg 0,05. W celu wytypowania genów/białek wchodzących w interakcje z CDK1 oraz uzyskania danych dotyczących procesów biologicznych w jakie

57

zaangażowane są analizowane geny skorzystano z bazy danych interakcji białkowych STRING (wersja 10.5) [70]-[77].

Jako uzupełnienie wyników przeanalizowano również znane interakcje w jakie wchodzi gen *CDK1*. W tym celu skorzystano z bazy danych BioGRID (thebiogrid.org, stan na dzień 1.12.2017). Wyszukano wszystkie oddziaływania fizyczne oraz genetyczne znane dla genu *CDK1*. Uzyskaną w ten sposób listę genów zestawiono z listą genów wyselekcjonowanych z mikromacierzy, dla których obserwowano minimum dwukrotną zmianę poziomu ekspresji w liniach komórkowych poddanych wyciszaniu genu *CDK1*.

Zmianę poziomu ekspresji wytypowanych genów potwierdzano poprzez PCR w czasie rzeczywistym. Analizowano te same próby RNA, których użyto do przeprowadzenia eksperymentu z wykorzystaniem mikromacierzy ekspresyjnych (linie komórkowe UT-SCC-34 i UT-SCC-107) oraz RNA z linii komórkowej UT-SCC-106A. RNA izolowano po upływie 48 godzin od momentu transfekcji. Startery zaprojektowane zostały z użyciem programu Beacon Designer[™] 7.5 (PRIMER Biosoft International) w taki sposób, by amplikony obejmowały granicę pomiędzy dwoma eksonami, a następnie sprawdzono ich specyficzność w programie Primer BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Reakcje odwrotnej transkrypcji oraz PCR w czasie rzeczywistym wykonano i analizowano w sposób opisany w rozdziale *Metody* (podrozdział 2.2.). Geny: GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) oraz ACTB zostały wykorzystane jako geny referencyjne. Krotność zmiany poziomu ekspresji genów wyliczono jako stosunek poziomu ekspresji obserwowany w linii komórkowej transfekowanej dupleksem siRNA wyciszającym CDK1 do poziomu ekspresji genu w linii transfekowanej dupleksem kontrolnym. Jako potwierdzenie wyniku z mikromacierzy uznano minimum 1,5-krotną zmianę poziomu ekspresji. Wartości odcięcia wynosiły więc odpowiednio: 0,67 dla obniżenia oraz 1,5 dla podwyższenia ekspresji genu. Sekwencje starterów znajdują się w Tabeli 6.

Gen	Sekwencje starterów 5' - 3'	Długość amplikonu [bp]	Temperatura przyłączania starterów [°C]	Wydajność reakcji PCR [%]
ACTB	F: CACCACACCTTCTACAATG	162	55	100
NM_001101	R: TAGCACAGCCTGGATAG	102	55	100
CALD1	F: CCTCGGGAAGAAGTTTCAGA	127	58	100
NM_004342	R: TGATGTCTGGACAGGTCAGC	127		100
CDC42	F: GTGGATAACTCAGCGGTCGT	191	58	90
NM_044472	R: CGATGGTGCTGTTGGTAAAA			
CDK6	F: TGGTTTCTCTGTCTGTTCGTG	118	58	100
NM_001259	R: AIGCCGCICICCACCAI			
DOCKI		158	55	100
XIVI_01/01581/				
		163	55	85
NIVI_001289937				
		107	58	100
NM 002046	R. CCTGGAAGATGGTGATGG	220	55	96
HELLS	E: GGTCCACCTCTGGCTGTATT			
NM 018063	R: AGCCATTGTGAACCGTACAA	179	58	100
HIST1H1C	F: ACACCGAAGAAAGCGAAGAA			
NM 005319	R: AGCCTTAGCAGCACTTTTGG	117	58	99
HIST1H2BJ	F: GCTCGAAAATGTCGTTCACA			
NM 021058	R: CAAGAAGGCGGTGACTAAGG	173	58	97
MYBL2	F: TGGATGAGCTGCACTACCAG	122	50	00
NM_002466	R: AGTCCTGCTGTCCAAACTGC	132	58	99
MYO1C	F: GCCCTGACACACAGGAAGAT	120	55	07
NM_001080950	R: GACGAGCCAGGTAAAAGTGC	129	55	57
PTK2	F: GGTGCAATGGAGCGAGTATT	202	55	87
NM_001352716	R: AGCCAGTGAACCTCCTCTGA	202		0,
RUNX1	F: CACTGCCTTTAACCCTCAGC	107	58	100
NM_001001890	R: CAATGGATCCCAGGTATTGG			
SHB	F: CTGAGTTCTGCGGGATCCTA	178	55	100
NM_003028	R: AGGGAGAGGGGAGTAGTCATGC			
SMARCA4	F: ACTCCTCGATGTGCTGGAAC	242	58	95
XM_017027168	R: CCGACGACTCAAGAAGGAAG			
SMC1A		160	58	99
NM_001281463				
1 IVIEIVIO7		202	58	94
XIVI_011517303				
13C2 XM 017022610	R: AAGAAGGGGGGAATGGTAGAGGGACG	116	58	100
1/RE21				
NM 194261		113	58	100
W/Δ<201	F: TCTCTCCCAGTGCCTGTCTT			
NM 001201404	R: CTGCAGCATCTTCTCCTTCC	156	55	94

Tabela 6. Startery wykorzystane w reakcji PCR w czasie rzeczywistym. F - starter F (ang. *Forward*), R - starter R (ang. *Reverse*).

Kolejnym krokiem była analiza interakcji białkowych wcześniej potwierdzonych genów z wykorzystaniem bazy danych STRING (string-db.org, ver. 10.5), gdzie za średni minimalny wymagany wynik interakcji obrano wartość 0,4. Baza ta korzysta z informacji zawartych w innych bazach danych takich jak KEGG, Pfam i InterPro. Pozwalają one na analizę interakcji między białkami oraz fizycznych oddziaływań między genami/białkami. Umożliwia ponadto określenie szlaków sygnałowych (ang. *pathways*) w komórce dla rozpatrywanego zbioru genów. Dzięki temu, sieć zależności między białkami wzbogacona jest o dane funkcjonalne. W analizie uwzględniono także gen *CDK1*, co pozwoliło na oszacowanie podobieństw, a także korelacji wyselekcjonowanych genów/białek właśnie z *CDK1*. Dodatkowo umożliwiło to wskazanie szlaków sygnałowych w jakich ww. geny współuczestniczą.

5.4.2.2. Testy funkcjonalne - analiza tempa proliferacji i żywotności komórek linii komórkowych z wyciszonym genem *CDK1*

Aby przeanalizować skutki wyciszania genu *CDK1* w liniach komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani wykonano analizy funkcjonalne. W badaniach wykorzystano trzy linie komórkowe LSCC: UT-SCC-34, UT-SCC-106A, UT-SCC-107. Każda z linii transfekowana była dupleksami siRNA: wyciszającym gen *CDK1* i kontrolnym.

5.4.2.2.1. Monitoring przyżyciowy komórek

Do monitorowania tempa proliferacji komórek poddanych wyciszaniu genu *CDK1* wykorzystano technikę opierającą się na monitoringu przyżyciowym komórek z wykorzystaniem systemu do obserwacji komórek JuliBr (NanoEnTec). System ten pozwala na ciągłą obserwację komórek z jednoczesnym ich obrazowaniem. Urządzenie sprzężone jest z kamerą, dzięki czemu obraz jest rejestrowany w postaci zdjęć oraz filmów. Stosując jednocześnie dwa urządzenia, możliwe jest równoległe monitorowanie naczyń z komórkami poddanych działaniu zarówno dupleksu siRNA wyciszającego gen *CDK1* jak i kontrolnego.

Po wykonaniu transfekcji, płytka 48-dołkowa z komórkami umieszczona była na module obrazującym uprzednio wstawionym do inkubatora do hodowli komórkowych. Monitoring prowadzono przez 72 godziny, wykonując zdjęcie co 30 minut. Jednocześnie wyznaczana została konfluencja komórek na każdym z wykonanych zdjęć. Dzięki oprogramowaniu zintegrowanemu ze sprzętem, na jej podstawie wyznaczona została krzywa wzrostu komórek transfekowanych dupleksami siRNA: wyciszającym i kontrolnym. Porównanie obu krzywych pozwoliło na ocenę tempa proliferacji obu analizowanych populacji komórek. Jako tempo proliferacji komórek przyjęto różnicę w konfluencji komórek w analizowanym naczyniu po upływie 72 godzin od transfekcji w odniesieniu do konfluencji obserwowanej w momencie transfekcji (0 godzin). Różnica w tempie proliferacji komórek transfekowanych dupleksem siRNA kontrolnym i wyciszającym gen *CDK1* określa zmianę tempa proliferacji komórek wywołaną wyciszeniem genu. Aby potwierdzić wyciszenie genu *CDK1*, po zakończeniu analizy, wykonano izolację białek z badanych komórek oraz przeprowadzono analizę Western blot według procedury opisanej w rozdziale *Metody* (podrozdział 5.1.).

Badanie wykonano w dwóch powtórzeniach dla każdej z linii komórkowych. Wyniki analizowano jako średnią arytmetyczną z odchyleniem standardowym. Istotność statystyczną oszacowano z użyciem testu T dla danych sparowanych. Wyniki uznano za istotne, gdy p<0,05.

5.4.2.2.2. Analiza żywotności komórek - test kolorymetryczny (CCK-8)

Druga część analizy funkcjonalnej obejmowała przeprowadzenie analizy żywotności komórek w oparciu o test kolorymetryczny. Tego typy testy wykorzystują właściwości związków chemicznych, zmieniających barwę pod wpływem aktywności enzymów występujących w żywych (aktywnych metabolicznie) komórkach. Stopień zmiany barwy jest proporcjonalny do liczby żywych komórek. Do badań wykorzystano test Cell - Counting Kit 8 (CCK8, Sigma Aldrich). Wykorzystuje on rozpuszczalną w wodzie sól tetrazolową - WST-8. Pod wpływem aktywności dehydrogenaz komórkowych jest on redukowany do rozpuszczalnego w medium hodowlanym formazanu o żółtym zabarwieniu. Związek ten nie jest toksyczny dla komórek.

W celu przeprowadzenia analizy komórki umieszczono na płytce 48-dołkowej a następnie przeprowadzono transfekcję dupleksami siRNA: wyciszającym i kontrolnym. Po upływie odpowiednio 24, 48 i 72 godzin do komórek dodawano świeże medium hodowlane (200 µl) oraz 20 µl odczynnika CCK-8. Przeprowadzono 2godzinną inkubację w inkubatorze hodowlanym (w ciemności). Następnie medium przenoszono na płytkę 96-dołkową i dokonywano odczynu kolorymetrycznego z użyciem GloMax®-Multi Detection System (Promega) przy długości fali 450 nm.

Na podstawie uzyskanych wyników absorbancji wyliczono żywotność komórek wg poniższego równania:

$\dot{z}ywotność [\%] = \frac{absorbancja \ komórek \ poddanych \ wyciszaniu}{absorbancja \ komórek \ kontrolnych} \ x \ 100$

Po inkubacji przez 24 oraz 48 godzin od transfekcji, komórki pozostające na płytce po zebraniu medium w celu dokonania odczytu były przemywane dwukrotnie jałowym PBS a następnie dodawano do dołka 250 µl świeżego medium hodowlanego i kontynuowano hodowlę. Po inkubacji 72-godzinnej, po dwukrotnym przemyciu dołków PBS, wykonano izolację białek a następnie analizę Western blot w sposób opisany w rozdziale *Metody* (podrozdział 5.1.)

Dla każdej z linii komórkowych wykonano trzy powtórzenia. Wyniki analizowano jako średnią arytmetyczną z odchyleniem standardowym. Istotność statystyczną oszacowano z użyciem testu T dla danych sparowanych. Wyniki uznano za istotnie, gdy p<0,05.

6. Dodatkowe analizy dla wytypowanego potencjalnego genu supresji nowotworowej - *CEACAM6*

6.1. Hamowanie metylacji DNA w liniach komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani

Aby potwierdzić wpływ metylacji DNA na poziom ekspresji genu *CEACAM6*, dwie linie komórkowe poddane zostały działaniu Decytabiny (5-Aza-2'deoksycytydyna, DAC). Związek ten jest inhibitorem metylotransferazy DNA (DNMT) - enzymu odpowiedzialnego za przyłączanie grup metylowych do piątego węgla w pierścieniu cytozyny w procesie metylacji DNA. Zablokowanie aktywności enzymu w proliferujących komórkach powoduje brak lub obniżenie poziomu metylacji DNA w powstających komórkach, co skutkuje wzrostem ekspresji genów inaktywowanych poprzez hipermetylację. W niniejszej pracy wykorzystano DNA oraz cDNA uzyskane z linii komórkowych - UT-SCC-11 i -29 poddawanych działaniu DAC w trakcie realizacji projektu NCN 2012/05/B/NZ2/00870 (kierownik: dr hab. M. Giefing). Poniżej znajduje się opis procedury zastosowanej do inhibicji metylacji DNA oraz metod analizy jej skutków.

6.1.1. Hodowla linii komórkowych w obecności decytabiny

Do analiz stosowano decytabinę w stężeniu wyjściowym 50 mg/ml (219 mM) zawieszoną w 50% kwasie octowym. Dla każdej z linii przeprowadzono optymalizację warunków doświadczenia, ustalając takie stężenie DAC, przy którym obserwowano skuteczność działania z jednoczesną niską śmiertelnością komórek. Dla obu analizowanych linii, komórki poddawane były działaniu DAC w stężeniu 0,1 µM oraz 0,3 µM. Jako próbę kontrolną stosowano komórki inkubowane w identycznych warunkach, dla których do medium hodowlanego dodano 50% kwas octowy w objętości identycznej do dodawanego roztworu DAC. Dodatkową próbę kontrolną stanowiły linie komórkowe, hodowane w takich samych warunkach w standardowym medium hodowlanym (tzw. "mock").

Hodowle linii komórkowych prowadzono w standardowym medium hodowlanym i warunkach opisanych w rozdziale *Metody* (podrozdział 1.). Hodowle prowadzono na płytkach 6-dołkowych, wykorzystując po 6 dołków na każde użyte stężenie DAC oraz odpowiadającą mu próbę kontrolną, z których 3 przeznaczone były do izolacji DNA oraz 3 do izolacji RNA. Do dołka nanoszono komórki w standardowym medium hodowlanym. Liczba komórek nanoszonych do dołka została dobrana tak, by po upływie doby konfluencja wynosiła 15-20% i wynosiła odpowiednio: linia UT-SCC-11: 200 tysięcy komórek/dołek i UT-SCC-29: 100 tysięcy komórek/dołek.

Po 24-godzinnej inkubacji w celu adhezji komórek do naczynia, medium hodowlane zostało zastąpione medium hodowlanym z dodatkiem DAC lub kwasu octowego (próba kontrolna). Hodowle prowadzono do uzyskania przez linie komórkowe konfluencji ok. 80%, czyli 96 godzin (UT-SCC-11) lub 72 godziny (UT-SCC-29), zmieniając co 24 godziny medium hodowlane. Roztwór DAC oraz 50% kwasu octowego przygotowywany był bezpośrednio przed dodaniem do komórek. Po zakończeniu hodowli, DNA oraz RNA izolowano technikami opisanymi w rozdziale *Metody* (podrozdziały 1.3. i 1.4.).

63

6.1.2. Analiza zmian w poziomie metylacji DNA regionu promotorowego genu *CEACAM6*

W celu oceny poziomu metylacji DNA regionu promotorowego genu CEACAM6 wykonano reakcję pirosekwencjonowania. DNA zostało oczyszczone a następnie poddane konwersji wodorosiarczanem IV sodu z użyciem zestawu odczynników EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research, Irvine, USA). Reakcja pirosekwencjonowania została przeprowadzona identycznie jak opisano w rozdziale Metody (podrozdział 4.2.) z wykorzystaniem starterów dla genu CEACAM6 wymienionych w Tabeli 3. Ze względu na problemy techniczne, analizie poddano dwa dinukleotydy CG, reakcja powtórzona została dwukrotnie. Dodatkowo, w celu oszacowania globalnych zmian poziomu metylacji DNA, przeanalizowany został poziom metylacji sekwencji LINE-1 (L1, Long Interspersed Nucleotide Element 1). Reakcja została wykonana w trzech powtórzeniach, analizowano cztery dinukleotydy CG. Sekwencje użytych starterów oraz warunków reakcji umieszczono w Tabeli 3.

Całkowite RNA (1 μg) wyizolowane z linii komórkowych hodowanych w obecności DAC oraz linii kontrolnych (inkubowanych z kwasem octowym oraz bez dodatkowych czynników) zostało poddane odwrotnej transkrypcji z użyciem Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA). Reakcja PCR w czasie rzeczywistym została przeprowadzona według opisu przedstawionego w rozdziale *Metody* (podrozdział 2.2.) z wykorzystaniem *GAPDH* jako genu referencyjnego. Reakcję wykonano w trzech powtórzeniach. Zmianę poziomu ekspresji genu *CEACAM6* wyliczono jako iloraz średniej ekspresji genu w komórkach indukowanych DAC oraz kontrolnych - hodowanych w obecności kwasu octowego.

V. WYNIKI

1. Selekcja genów oraz analiza poziomu ekspresji genów przy wykorzystaniu mikromacierzy

W pierwszym etapie badań przeanalizowano wyniki uzyskane dla 11 linii komórkowych LSCC z wykorzystaniem mikromacierzy ekspresyjnych. Poszczególne tagi zlokalizowane na mikromacierzy przypisano do konkretnych genów. Następnie wytypowano geny, dla których obserwowano istotny statystyczne spadek lub wzrost poziomu ekspresji we wszystkich liniach komórkowych względem minimum dwóch prób kontrolnych. Wybrano tylko takie geny, dla których we wszystkich tagach obserwowano istotną zmianę poziomu ekspresji. W ten sposób wybrano 359 genów, do których przypisanych było 448 tagów. Dla 237 genów obserwowano spadek poziomu ekspresji, dla pozostałych 122 - wzrost. Wykorzystując bazę danych Genome Browser w celu potwierdzenia braku zmian liczby kopii genu (CNV) do kolejnego etapu selekcji wytypowano 31 genów o podwyższonym oraz 17 o obniżonym poziomie ekspresji. Ostatecznej selekcji 10 genów dokonano na podstawie danych literaturowych, skupiając się na funkcji pełnionej przez dany gen oraz braku doniesień o jego udziale w rozwoju raka krtani oraz. Schemat na Rycinie 3 przedstawia poszczególne etapy selekcji tagów i genów do analizy.

Należy jednak zaznaczyć, że w toku wykonywania pracy informacje zawarte w bazie danych uległy zmianie i aktualnie dla części z genów dostępne są dane dotyczące zmiany liczby kopii. Pojawiły się także publikacje dotyczące udziału wybranych genów, np. *SFRP2* i *CEACAM6* w nowotworach głowy i szyi, w tym w raku krtani [78], [79].

Spośród 10 wybranych do analizy genów, dla 6: ATAD2, CDK1, NETO2, LAPTM4B, SERPINH1, SNAI2 obserwowano istotny statystycznie wzrost poziomu ekspresji. Poziom ekspresji kolejnych 4 genów: CEACAM6, CLCA4, FUT3, SFRP2 był obniżony (Rycina 4). Dla wszystkich tagów istotnie przypisanych do genów o podwyższonym poziomie ekspresji parametr Sygnał Detekcji ustalony na podstawie danych z mikromacierzy wskazywał obecność transkryptów w liniach komórkowych LSCC, natomiast dla genów o obniżonym poziomie ekspresji transkrypt wykrywany był w próbach kontrolnych (detekcja sygnału określona jako obecna).

65

Świadczy to o występowaniu ekspresji genów *ATAD2*, *CDK1*, *NETO2*, *LAPTM4B*, *SNAI2*, *SERPINH1* w liniach komórkowych LSCC i genów *CEACAM6*, *CLCA4*, FUT3, *SFRP2* w próbach kontrolnych.



Rycina 3. Schemat przedstawiający poszczególne etapy selekcji genów do analizy w niniejszej pracy. Punkt wyjścia stanowiły wyniki analizy ekspresji genów z użyciem mikromacierzy ekspresyjnej Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix).

Opierając się na wynikach z mikromacierzy wykonanej z wykorzystaniem guzów pobranych w trakcie laryngektomii przeanalizowano poziom ekspresji wybranych genów w materiale klinicznym. Wykazano wzrost poziomu ekspresji genów we wszystkich 5 wycinkach dla genów *CDK1*, *LAPTM4B*, *NETO2*, *SERPINH1*, *SNAI2*

oraz w 4/5 wycinków dla genu *ATAD2*. Obniżenie ekspresji genów *CEACAM6*, *CLCA4* i *FUT3* obserwowano w 4/5 a genu *SFRP2* w 3/5 próbek wykorzystanych do analizy (Rycina 5).

Wyniki uzyskane dla linii komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani oraz próbek pochodzących z wycinków guza pierwotnego wskazują na istotną zmianę poziomu ekspresji analizowanych genów: *ATAD2*, *CDK1*, *CEACAM6*, *CLCA4*, *FUT3*, *LAPTM4B*, *NETO2*, *SERPINH1*, *SFRP2*, *SNAI2*, w płaskonabłonkowym raku krtani. Szczegółowe wyniki przedstawiono w Tabelach Z6 i Z7 (Załącznik).



Rycina 4. Poziom ekspresji analizowanych genów (mikromacierze ekspresyjne) w liniach komórkowych LSCC (szare słupki) w odniesieniu do nienowotworowych prób kontrolnych (czarne słupki, kolejno: RNA z prawidłowej krtani, nabłonka oskrzeli, nabłonka krtani). Panel górny pokazuje geny, dla których ekspresja genów w liniach komórkowych była podwyższona w stosunku do grupy kontrolnej; panel dolny - geny o obniżonej ekspresji w liniach komórkowych w odniesieniu do grupy kontrolnej. Surowe wyniki z mikomacierzy zostały znormalizowane przy pomocy funkcji logarytmicznej o podstawie 10.



Rycina 5. Poziom ekspresji analizowanych genów (mikromacierze ekspresyjne) w materiale z guzów pierwotnych raka krtani (szare słupki) w odniesieniu do nienowotworowych prób kontrolnych (czarne słupki, kolejno od lewej próby RNA z: całkowitej krtani, nabłonka oskrzeli, nabłonka krtani). Surowe wyniki z mikomacierzy zostały znormalizowane przy pomocy funkcji logarytmicznej o podstawie 10.

2. Odwrotna transkrypcja i PCR w czasie rzeczywistym (RT-qPCR)

Reakcję odwrotnej transkrypcji wykonano z wykorzystaniem RNA wyizolowanego z 25 linii komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani oraz 3 kontrolnych prób RNA uzyskanych z nienowotworowych tkanek lub komórek z obrębu głowy i szyi: całkowitej krtani, nabłonka oskrzeli i nabłonka tchawicy.

Wyniki uzyskane z zastosowaniem PCR w czasie rzeczywistym były zbieżne z wynikami z mikromacierzy w przypadku 7 genów. W oparciu o wartości odcięcia wyznaczone na podstawie wyników dla prób kontrolnych (sposób ustalenia wartości odcięcia przedstawiono w rozdziale *Metody* (podrozdział 2.2.3.), zaobserwowano wzrost poziomu ekspresji genów *LAPTM4B* (w 18/25 linii komórkowych), *ATAD2* (14/25), *CDK1* (9/25) oraz *SERPINH1* (1/25) a także obniżenie poziomu ekspresji genów *CLCA4* (22/25), *FUT3* (18/25) oraz *CEACAM6* (14/25).

Dla genu *SFRP2* nie udało się uzyskać produktu PCR, pomimo zastosowania trzech różnych par starterów. Nie udało się przeprowadzić reakcji zarówno z wykorzystaniem próbek pochodzących z linii komórkowych jak i kontrolnych. Aby potwierdzić prawidłową optymalizację warunków reakcji, wykonana została dodatkowa analiza z wykorzystaniem prób RNA pochodzących spoza grupy materiału wykorzystanego do pracy. Użyte zostały linie komórkowe: HeLa oraz HepaRG a także limfocyty krwi obwodowej zdrowej osoby. Produkty PCR uzyskano jedynie w próbce uzyskanej z limfocytów krwi obwodowej.

Dla dwóch genów: *NETO2* oraz *SNAI2* poziom ekspresji nie przekroczył wartości odcięcia wyznaczonej na podstawie prób kontrolnych. Te geny, dla których wyniki z mikromacierzy nie zostały potwierdzone poprzez RT-qPCR, zostały wyłączone z dalszej analizy.

Do dalszej analizy wytypowano geny: *ATAD2*, *CDK1*, *CEACAM6*, *CLCA4*, *FUT3*, *LAPTM4B* oraz *SERPINH1*. Wyniki z wartościami liczbowymi dotyczącymi względnej ekspresji oraz wartości odcięcia zebrano w Tabelach Z8 i Z9 (Załącznik).

3. Korelacja poziomu ekspresji genów z parametrami histologicznoklinicznymi nowotworu

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej. Wykazano istotny statystycznie wzrost poziomu ekspresji genów: *LAPTM4B*, *ATAD2*, *CDK1* oraz istotne statystycznie obniżenie poziomu ekspresji genu *CLCA4* w liniach komórkowych w porównaniu z próbami kontrolnymi (test U Manna-Whitney'a, p<0,05, Rycina 6, Tabela 6). Poziom ekspresji genów *FUT3* i *CEACAM6* był obniżony w liniach komórkowych wyprowadzonych ze wznów w porównaniu z użytymi próbami kontrolnymi (test U Manna-Whitney'a, p<0,05, Rycina 6 Tabela 7). Nie zaobserwowano istotnie zmienionego poziomu ekspresji genu *SERPINH1* w liniach komórkowych w stosunku do grupy kontrolnej.

Tabela 7. Analiza korelacji poziomu ekspresji analizowanych genów z typem nowotworu krtani z jakiego zostały wyprowadzone linie komórkowe. Tabela przedstawia wartości poziomów istotności statystycznej (p). Kolorem czerwonym oznaczono zmianę istotną statystycznie. Liczebność grup: Linie komórkowe ogółem (LSCC): n = 25, w tym linie komórkowe wyprowadzone z guzów pierwotnych: n = 16 i wznów: n = 8, próby kontrolne: n = 3 (RNA z nienowotworowej tkanki krtani, nabłonka oskrzeli i tchawicy). Linia UT-SCC-6B została wyłączona z tej części analiz - jako jedyna została wyprowadzona z przerzutu.

	ATAD2	CDK1	LAPTM4B	SERPINH1	CEACAM6	CLCA4	FUT3
LSCC vs kontrole	0,001	0,016	0,003	0,070	0,070	0,011	0,119
pierwotne vs kontrole	0,002	0,033	0,002	0,064	0,138	0,014	0,303
wznowy vs kontrole	0,024	0,024	0,048	0,194	0,048	0,048	0,024
wznowy vs pierwotne	0,417	0,653	0,264	0,291	0,452	0,741	0,834



Rycina 6. Wykresy przedstawiające poziom ekspresji analizowanych genów w liniach komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani (RT-qPCR). Wykazano wzrost (A - D) oraz spadek (E - G) poziomu ekspresji genów w stosunku do zastosowanych prób kontrolnych (RNA z nienowotworowej tkanki krtani, nabłonka oskrzeli i tchawicy). Gwiazdką oznaczono zmianę istotną statystycznie (Test U Manna-Whitney'a, p<0,05). Linia UT-SCC-6B została wyłączona z tej części analizy, ponieważ jako jedyna została wyprowadzona z przerzutu LSCC.
Przeprowadzono także korelacji analize poziomu ekspresji genów z poszczególnymi stopniami zaawansowania choroby (TNM) oraz stopnia zróżnicowania histologicznego guza (G) a także czasem przeżycia pacjentów. Ponieważ żadna z analizowanych linii komórkowej nie została wyprowadzona z nowotworu dającego przerzuty do odległych narządów (M+), parametr ten został pominięty w analizie.

W porównaniu do użytych prób kontrolnych, poziom ekspresji genów *LAPTM4B*, *ATAD2*, *CDK1* jest podwyższony w odniesieniu do prób kontrolnych zarówno w liniach komórkowych LSCC wyprowadzonych z guzów T1/T2 jak i T3/T4, o wysokim i średnim stopniu zróżnicowania histologicznego (G1 i G2) a także w liniach komórkowych wyprowadzonych z nowotworów dających przerzuty (N+) jak i nie dających przerzutów (N0). Dodatkowo, podwyższony poziom ekspresji *ATAD2* i *CDK1* obserwowano w guzach słabo zróżnicowanych (G3). Nie zaobserwowano istotnych różnic porównując grupy utworzone na podstawie poszczególnych parametrów względem siebie: T1/2 *vs* T3/4, N0 *vs* N+ czy G1/2 *vs* G3 (Tabela 8).

W porównaniu do prób kontrolnych, poziom ekspresji genu *CLCA4* jest istotnie obniżony w liniach wyprowadzonych z guzów T1/T2 oraz guzów o wysokim i średnim stopniu zróżnicowania histologicznego a także guzów N+ oraz N0. Dodatkowo wykazano niższy poziom ekspresji genu *CLCA4* w liniach wyprowadzonych z guzów dających przerzuty w porównaniu do linii z guzów, które nie tworzą przerzutów. Obniżenie poziomu ekspresji genu *CEACAM6* obserwowano w liniach komórkowych uzyskanych z guzów nisko zróżnicowanych (G3), wysoko zaawansowanych (T3/T4), natomiast genu *FUT3* w liniach wyprowadzonych z guzów N+ oraz guzów o niskim stopniu zróżnicowania (G3). Poziom ekspresji genów nie koreluje z czasem przeżycia pacjentów. Dla genu *SERPINH1* nie zaobserwowano istotnych korelacji pomiędzy poziomem ekspresji a parametrami histologiczno - klinicznymi (Tabela 8).

Wykazano istotną korelację poziomu ekspresji genów: *ATAD2*, *CDK1*, *CEACAM6*, *CLCA4*, *FUT3*, *LAPTM4B z* parametrami histologiczno-klinicznymi nowotworu, co może mieć potencjalne zastosowanie diagnostyczne (geny *ATAD2*, *CDK1*, *CLCA4*, *LAPTM4B*,) lub predykcyjne (*CEACAM6*, *CLCA4* oraz *FUT3*,).

73

Tabela 8. Analiza korelacji poziomu ekspresji genów z parametrami histologiczno-klinicznymi w klasyfikacjach TNM oraz G i czasem przeżycia pacjentów. Tabela przedstawia wartości istotności statystycznej (p). Kolorem czerwonym zaznaczono zmiany istotne statystycznie (test U Manna - Whitney'a p<0,05), Współczynnik R - poziom korelacji (test Pearsona); p - poziom istotności statystycznej; Liczebność grup: Linie komórkowe ogółem (LSCC): n = 25, kontrole: n = 3 (RNA z nienowotworowej tkanki krtani, nabłonka oskrzeli i tchawicy); T1/2: n = 15, T3/4: n = 10, N0: n = 19, N+: n = 6, G1/2: n = 20, G3: n = 5.

		ATAD2	CDK1	LAPTM4B	SERPINH1	CEACAM6	CLCA4	FUT3			
				т							
T1/2 vs T	3/4	0,683	0,495	0,605	0,723	0,643	0,890	0,643			
T1/2 vs kon	trole	0,002	0,017	0,010	0,076	0,164	0,005	0,100			
T3/4 vs kon	trole	0,014	0,049	0,007	0,112	0,049	0,076	0,217			
Ν											
N0 vs N	+	0,198	0,555	0,514	0,400	0,437	0,038	0,156			
N0 vs kont	role	0,003	0,021	0,005	0,069	0,069	0,021	0,226			
N+ vs kontrole		0,024	0,048	0,024	0,167	0,262	0,028	0,024			
				G							
G1/2 vs	G3	0,974	0,869	0,668	0,243	0,060	0,518	0,129			
G1/2 vs kor	ntrole	0,002	0,026	0,001	0,094	0,139	0,008	0,196			
G3 vs kont	role	0,036	0,036	0,143	0,071	0,036	0,134	0,036			
				Czas przeż	ycia						
LSCC	R	-0,18	0,10	-0,14	0,05	0,10	0,19	0,28			
	p valu e	0,385	0,634	0,513	0,831	0,647	0,370	0,182			

4. Analiza mechanizmów prowadzących do obserwowanych zmian w ekspresji genów

4.1. Analiza liczby kopii genu - Porównawcza Hybrydyzacja Genomowa do mikromacierzy - array-CGH

Lokalizację każdego z analizowanych genów, dla których potwierdzono zmianę poziomu ekspresji określono na podstawie bazy danych Genome Browser (<u>http://genome.ucsc.edu;</u> NCBI36/hg18). Następnie, na tej podstawie przeanalizowano średnią wartość współczynnika log2ratio dla poszczególnych regionów DNA obejmujących analizowane geny.

Wykazano nieznaczne obniżenie liczby kopii DNA dla genu *CEACAM6* w linii komórkowej UT-SCC-22 (średnie log2ratio = -0,52) *FUT3* w UT-SCC-34 (średnie log2ratio = -0,67) oraz *CLCA4* w UT-SCC-11 (średnie log2ratio = -0,52). Dla

pozostałych genów nie zaobserwowano zmian w liczbie kopii DNA w badanych liniach komórkowych.

Wartości średniego log2ratio dla regionów, w których zlokalizowane są poszczególne geny przedstawione są w Tabeli 9. Szczegółowe dane znajdują się Tabeli Z10 (Załącznik) niniejszej pracy.

Tabela 9. Średnie wartości log2ratio dla regionów, w których zlokalizowane są badane geny. Kolorem czerwonym zaznaczono geny o zmienionej liczbie kopii DNA w liniach komórkowych LSCC.

	Pozycja	UT-												
	genomowa	SCC-												
	(GRCh37/hg19)	106A	107	11	116	19B	22	29	34	57	6A	35	38	42B
ATAD2	chr8:124,401,272 -124,477,886	0,12	0,09	0,40	0,34	0,11	0,36	-0,01	0,15	0,01	0,14	0,14	0,14	0,14
CDK1	chr10:62,209,905 -62,223,930	0,12	-0,03	-0,20	0,00	-0,15	-0,13	-0,04	0,15	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01
LAPTM4B	chr8:98,856,985- 98,934,006	0,19	0,19	0,42	0,41	0,19	0,46	-0,01	0,40	0,13	0,11	0,11	0,11	0,11
SERPINH 1	chr11:74,950,818 -74,961,494	0,09	-0,23	0,16	0,02	0,05	-0,38	0,17	0,10	0,31	-0,05	0,04	0,15	0,18
CEACAM6	chr19:46,951,341 -46,967,953	-0,07	-0,16	0,05	0,03	0,01	-0,52	0,01	0,27	0,32	-0,01	-0,08	-0,03	-0,08
CLCA4	chr1:86,785,347- 86,819,020	0,01	0,09	-0,52	0,01	0,01	-0,18	0,05	-0,27	0,10	-0,11	-0,09	0,00	-0,01
FUT3	chr19:5,793,899- 5,802,485	-0,30	-0,14	0,03	-0,19	0,00	-0,39	-0,08	-0,67	0,05	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09

Na podstawie uzyskanych wyników, wykluczono zmianę liczby kopii DNA jako główny mechanizm prowadzący do obserwowanej zmiany poziomu ekspresji genów badanych w niniejszej pracy.

4.2. Analiza poziomu metylacji DNA regionu promotorowego genu metodą pirosekwencjonowania

Przeprowadzono analizę poziomu metylacji DNA regionów promotorowych 7 genów: *CDK1*, *ATAD2*, *CEACAM6*, *CLCA4*, *FUT3*, *LAPTM4B* oraz *SERPINH1*w liniach komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani.

Poziom metylacji DNA genu *CEACAM6* w liniach komórkowych LSCC mieścił się w zakresie 30 - 93% (średnio: 70%), podczas gdy w próbach kontrolnych (DNA z wymazów z jamy ustnej zdrowych dawców) wynosił pomiędzy 18 a 52% (średnia: 36%). Wartość odcięcia, powyżej której próby uznawano za hipermetylowane ustalono na poziomie 74%. Wykazano podwyższony poziom metylacji DNA regionu promotorowego genu *CEACAM6* w 11/25 (44%) linii komórkowych (Rycina 7).

Zmiana ta była istotna statystycznie (test U Manna-Whitney'a, p = 0,000003). Jednocześnie zaobserwowano brak korelacji pomiędzy ekspresją genu *CEACAM6* oraz poziomem jego metylacji (test korelacji Pearsona, współczynnik korelacji = -0,37, p = 0,07).

W regionach promotorowych genów: *ATAD2*, *CDK1*, *CLCA4*, *FUT3*, *LAPTM4B* oraz *SERPINH1* nie zaobserwowano różnic w poziomie metylacji DNA w liniach komórkowych LSCC w odniesieniu do prób kontrolnych (Tabela 10). Poziom metylacji DNA poszczególnych genów w analizowanych liniach komórkowych przedstawiono na Rycinie Z1 (Załącznik).

Dodatkowo przeprowadzona została analiza poziomu metylacji DNA genu *CDK1* z wykorzystaniem prób DNA uzyskanych z guzów pierwotnych raka krtani (n = 41). Wyniki uzyskane dla genu *CDK1* w tych próbach zbieżne są z wynikami obserwowanymi dla linii komórkowych. Średni poziom metylacji DNA mieścił się w zakresie 0 - 1% (średnio: 1).

Uzyskane wyniki wskazują na hipermetylację DNA regionu promotorowego genu *CEACAM6* jako przyczynę obniżenia jego ekspresji. Jednocześnie nie wykazano zmian poziomu metylacji DNA pozostałych genów.



Rycina 7. Analiza poziomu metylacji regionu promotorowego genu *CEACAM6* w liniach komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani (UT-SCC) i próbach kontrolnych - wymazach z jamy ustnej (W1 - W10). Poszczególne słupki oznaczają poszczególne analizowane dinukloetydy CG. Gwiazdka przy numerze linii oznacza, że średnia wartość metylacji dla analizowanych dinukleotydów CG przekracza wartość przyjętą jako próg odcięcia wyznaczający hipermetylację (74%). FM - próba kontrolna: DNA całkowicie zmetylowane, UM - próba kontrolna: DNA niemetylowane.

Tabela 10. Średni poziom metylacji DNA regionów promotorowych poszczególnych genów, obserwowany dla linii komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani oraz prób kontrolnych. Sposób wyliczenia progów odcięcia: hipermetylacji i hipometylacji przedstawiony został w rozdziale *Metody*. Jednostką podanych wartości jest procent. sd - odchylenie standardowe

	ATAD2	CDK1	LAPTM4B	SERPINH1	CEACAM6	CLCA4	FUT3				
		Li	inie komórko	we LSCC							
Min	2	3	4	6	30	80	56				
Max	6	7	12	42	93	99	91				
Średnia 4 5 7 13 70 94 8											
sd 1,08 1,20 2,18 7,81 17,09 5,											
Kontrole - wymazy z jamy ustnej zdrowych dawców											
Min	3	4	6	6	18	96	77				
Max	6	8	12	11	52	98	90				
Średnia	4	6	9	9	36	97	84				
sd	1,05	1,08	1,79	1,37	11,28	0,42	4,22				
Próg odcięcia											
Hipermetylacja	n/a	n/a	n/a	n/a	74	99	98				
Hipometylacja	1	2	3	4	n/a	n/a	n/a				

4.3. Analiza zmian sekwencji DNA na podstawie danych dostępnych za pośrednictwem bazy danych cBioPortal i COSMIC

Wyniki własne uzupełniono o informacje zebrane w bazie danych cBioPortal (cBioPortal version 1.3.1). Geny analizowano pod względem występowania w nich zmian liczby kopii oraz mutacji. Na Rycinie 8 przedstawiono zmiany, jakie zaobserwowano dla każdego z genów. Grupa badana obejmowała 279 prób pobranych od pacjentów z płaskonabłonkowym nowotworem głowy i szyi, spośród których 72 uzyskano z nowotworu krtani. Dla genów, których nadekspresję wykazano zarówno poprzez mikromacierz jak i PCR w czasie rzeczywistym dominującą obserwowaną zmianą było zwiększenie liczby kopii genu. Wykazano amplifikację genu *ATAD2* u 7 pacjentów w nowotworem krtani co odpowiada 9,7% przypadków z tym typem nowotworu (w całej grupie nowotworów głowy i szyi: 25/279 pacjentów, 9%). Amplifikację genu *LAPTM4B* wykazano dla 3 pacjentów z rakiem krtani (4,2% pacjentów, ogólnie w grupie HNSCC: 12/279, 4,3% przypadków). Amplifikacja genu *SERPINH1* występowała u 1/72 pacjentów z rakiem krtani (1,4%, ogółem w HNSCC: 13/279, 4,3%), natomiast dla genu *CDK1* odnotowano amplifikację u 2/279 pacjentów, ale u żadnego z nich nie stwierdzono nowotworu krtani.

Wykazano także delecję genu *FUT3* w dwóch przypadkach (0,7%) analizowanych w badaniu, jednak żaden z pacjentów nie chorował na raka krtani.

Jednocześnie, w analizowanych genach, wykazano niski procent występowania mutacji zmieniających sekwencję białka (typu missense) lub skracających produkt białkowy. Występowanie takich mutacji odnotowano u 0,4 - 1,8% przypadków, co odpowiada 1 - 5 spośród 279 badanych pacjentów (Rycina 8).

W bazie danych COSMIC odnotowano mutacje występujące w genach *FUT3* oraz *NETO2*. W przypadku obu genów mutacja była substytucją zmiany sensu i występowała u 1 pacjenta; oba geny analizowane były w 26 spośród 512 prób zgromadzonych w bazie. Dla pozostałych genów nie obserwowano żadnych zmian w sekwencji DNA.

Primary Tumor Site			
ATAD2	• •	10%	
CDK1	0 0 0	0.7%	
LAPTM4B	0 0 0	4%	
SERPINH1	0 0	6%	
CEACAM6	000	0.4%	
CLCA4	•	1.4%	
FUT3	° °	1.1%	
Genetic Alteration			Missense Mutation (unknown significance) Truncating Mutation (unknown significance) Amplification Deep Deletion No alterations
Primary Tumor Site		I	Hypopharynx Larynx Oral Cavity Oropharynx

Rycina 8. Wyniki analizy przeprowadzonej w oparciu o bazę danych cBioPortal. W ramki ujęto poszczególne grupy analizowanych genów: Zielona ramka obejmuje geny, dla których w niniejszej pracy wykazano podwyższoną ekspresję; czerwona ramka - geny, dla których obserwowano obniżenie poziomu ekspresji. Wartości procentowe odnoszą się do sumy wszystkich zmian obserwowanych dla danego genu.

Poprzez analizę *in silico* wykazano potencjalną zmianę liczby kopii DNA genów *ATAD2* i *LAPTM4B* w płaskonabłonkowym raku krtani. Uzyskanie wyniki nie wskazują na obecność istotnych mutacji aktywujących lub inaktywujących geny, mogących wpływać na poziom ich ekspresji.

5. Analizy genu *CDK1* - potencjalnego onkogenu

Do dalszej, szczegółowej analizy pod kątem charakteru onkogennego w płaskonabłonkowym raku krtani wytypowano gen *CDK1*. W wyborze genu

kierowano się także danymi literaturowymi, jednoznacznie wskazującymi na istotną rolę genu w regulacji i kontroli cyklu komórkowego. Dane wskazujące na potencjalne zmiany w liczbie kopii genów *ATAD2* i *LAPTM4B* przedstawione w bazie danych cBioPortal pochodzą z 2015 roku, a więc ukazały się już po dokonaniu selekcji.

5.1. Western blot

Analiza Western blot miała na celu potwierdzenie podwyższonej ekspresji genu *CDK1* w liniach komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani w porównaniu z nienowotworową próbą kontrolną na poziomie białka. Dodatkowo zbadano obecność białka CDK1 w formie aktywnej - posiadającej ufosforylowaną treoninę w pozycji 161 (phospho T161). Przeanalizowano także skutki obecności polimorfizmu rs3212319 w sekwencji genu *CDK1*. Kontrola nałożenia - GAPDH dała wynik pozytywny we wszystkich próbach w każdej z wykonanych analiz Western blot. Zarówno dla CDK1 jak i GAPDH obserwowano obecność jednego prążka o wielkości specyficznej dla każdego z analizowanych białek.

Wykorzystując przeciwciało anty-CDK1 wiążące się do C-końca białka wykazano obecność białka CDK1 we wszystkich 25 analizowanych liniach komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani. Wyniki porównano z ilością białka CDK1 obecnego w lizatach z prawidłowej tkanki obrębu głowy i szyi. W komercyjnie dostępnym lizacie oraz kontrolnych próbach: K6, K12, K13 i K14 obecne były śladowe ilości białka CDK1. W próbach kontrolnych: K2, K3, K15 nie zaobserwowano obecności białka CDK1 (Rycina 9).





Rycina 9. Western blot - anty-CDK1: przeciwciało przeciwko końcowi C białka. Górny panel: linie komórkowe płaskonabłonkowego raka krtani. Liczby odpowiadają numerom linii komórkowych LSCC; L - lizat z prawidłowej tkanki krtani; J - lizat z linii komórkowej Jurkat (kontrola pozytywna). Dolny panel: lizaty z prawidłowej tkanki obrębu głowy i szyi izolowanych bezpośrednio z tkanki oraz pierwotnych linii komórkowych wyprowadzonych w Zakładzie Genetyki Nowotworów PAN. Podkreślono numery próbek, w których obserwowano śladowe ilości białka CDK1.

Analiza Western blot z użyciem przeciwciała skierowanego przeciwko ufosforylowanej formie białka CDK1 (phospho T161 anti-CDK1) przeprowadzona została na 24 liniach komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani. Wykazano obecność ufosforylowanej formy białka w 22 liniach komórkowych. W jednej linii komórkowej (UT-SCC-49) białko obecne było w śladowych ilościach, natomiast w jednej linii (UT-SCC-57) białka nie wykryto (Rycina 10).



Rycina 10. Western blot - anty-phospho-CDK1: przeciwciało przeciwko ufosforylowanej formie białka. Liczby odpowiadają numerom linii komórkowych LSCC; HeLa - lizat z linii komórkowej HeLa stanowiący kontrolę pozytywną.

Trzecie z zastosowanych przeciwciał skierowane było przeciwko końcowi N białka CDK1. Jego obecność analizowano w siedmiu liniach komórkowych, różniących się wariantami polimorfizmów sekwencji genu *CDK1*. Nie wykazano zmian w wielkości produktu białkowego w liniach komórkowych (Rycina 11).



Rycina 11. Western blot - anty- CDK1 przeciwko końcowi N białka. Liczby odpowiadają numerom linii komórkowych LSCC.

Z wykorzystaniem techniki Western blot wykazano znacznie podwyższony poziom kumulacji białka CDK1 w liniach komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani w porównaniu do prawidłowego, zdrowego nabłonka krtani oraz całkowitej tkanki krtani. Wykazano także, że w liniach komórkowych LSCC występuje białko w postaci jednej izoformy o prawidłowej masie molekularnej (34 kDa).

5.2. Analiza stopnia akumulacji białka CDK1 w guzach pierwotnych - barwienie immunohistochemiczne

Analiza ekspresji białka CDK1 w badanych grupach wykazała ekspresję badanego antygenu w 100% guzów pierwotnych N(0) (20/20), w 100% guzów pierwotnych N(+) (20/20) oraz w 100% (18/18) przypadków prawidłowej błony śluzowej (Rycina 12). W połowie przypadków białko zlokalizowane było w jądrze komórkowym: 9 przypadków N(0) i 11 przypadków N(+). W pozostałych przypadkach obserwowano wyłącznie cytoplazmatyczną lokalizację białka CDK1.

Wykazano niższe wartości poziomu akumulacji białka CDK1 u pacjentów bez przerzutów do węzłów chłonnych (wynik w skali IRS: N0 = 107) w porównaniu z grupą pacjentów, u których przerzuty do węzłów były obecne (wynik w skali IRS: N+=115) oraz wartościami ekspresji CDK1 w obszarze prawidłowej błony śluzowej (w skali IRS: Kontrola = 108). Zaobserwowano również niewielki wzrost ekspresji wraz ze stopniem zajęcia węzłów chłonnych (w skali IRS: N0 = 107 vs. IRS N+=115).

Obserwowane zmiany w poziomie akumulacji białka CDK1 nie wykazują różnicy istotnej statystycznie w utkaniu guza pierwotnego pomiędzy grupą bez przerzutów i z przerzutami do węzłów chłonnych (p = 0.82) oraz pomiędzy ekspresją CDK1 w obszarze guza w porównaniu z grupą kontrolną (p = 0.96). Podsumowanie wyników znajduję się w Tabeli 11.



Rycina 12. Barwienie immunohistochemiczne przedstawiające obecność białka CDK1 w analizowanych fragmentach nowotworu krtani i prawidłowej śluzówce krtani. Prawidłowa śluzówka krtani: A, B; rak płaskonabłonkowy krtani: C i D - u pacjentów bez przerzutów SCC do węzłów chłonnych oraz E i F - u pacjentów z przerzutami SCC do węzłów chłonnych. Pierwotne powiększenie obiektywu: 10x.

Tabela 11. Podsumowanie wyników z analizy akumulacji białka CDK1 techniką barwienia immunohistochemicznego. n - liczba prób, w których obserwowano ekspresję CDK1; nc - całkowita liczba pacjentów, sd - odchylenie standardowe.

CDK1	N [n/nc]	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	sd	Р
N0 guz pierwotny	100% [20/20]	109,09	107	60	140	20,77	n - 0.92
N+ guz pierwotny	100% [20/20]	107,36	115	55	148	29,33	μ = 0,82
Kontrola	100% [18/18]	112,10	108	92	135	15	p = 0,96

5.3. Sekwencjonowanie DNA techniką Sangera - gen CDK1

W analizowanych próbach DNA z linii komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani wykazano obecność dwóch polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (Single Nucleotite Polymorphism, SNP).

Polimorfizm rs3212319 w pozycji chr10:62551816-62551816 jest delecją cytozyny w pozycji +5 intronu 6 (NC_000010.10: g.62551816delC; NM_001786.4: c.653+5delC; GRCh37/hg19). Spośród 15 prób DNA, w których występował ten polimorfizm, 13 było heterozygotami (C/-) natomiast u dwóch wystąpiła delecja homozygotyczna nukleotydu (-/-). W pozostałych 10 próbach DNA występował genotyp homozygotyczny allelu macierzystego (Rycina 13, Tabela 12).





Rycina 13. Przykład chromatogramów uzyskanych w analizie sekwencjonowania genu *CDK1* w liniach komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani - polimorfizm rs3212319. Zaprezentowano wyniki uzyskane dla genotypów: homozygotycznego allelu macierzystego (linia UT-SCC-49), heterozygotycznego (UT-SCC-116) oraz homozygotycznego allelu pochodnego (UT-SCC-35). W sekwencji referencyjnej wielkie litery oznaczają ekson, małe litery: intron. W ramkę ujęto zmianę sekwencji DNA.

Polimorfizm rs1871446 w pozycji chr10:62553763-62553763 (GRCh37/hg19 jest substytucją A>G, zlokalizowaną jest w rejonie 3'UTR genu (NC_000010.10: g.62553763A>G; NM_001786.4: c.*30A>G; UCSC; GRCh37/hg19). W 4/25 badanych prób polimorfizm ten występował w układzie heterozygotycznym (A/G), natomiast w 20/25 występował genotyp homozygotyczny allelu pochodnego (G/G). W jednej próbie DNA zidentyfikowano genotyp homozygotyczny allelu macierzystego (A/A) (Rycina 14, Tabela 12).



Rycina 14. Przykład chromatogramów uzyskanych w analizie sekwencjonowania genu *CDK1* w liniach komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani - polimorfizm rs1871446. Zaprezentowano wyniki uzyskane dla genotypów: homozygotycznego allelu macierzystego (linia UT-SCC-49), heterozygoty (UT-SCC-116) oraz homozygotycznego allelu pochodnego (UT-SCC-35). W ramkę ujęto zmianę sekwencji DNA.

Częstości genotypów oraz alleli obu analizowanych polimorfizmów genu *CDK1* w badanej grupie linii komórkowych LSCC porównano z częstościami obserwowanymi w populacjach fińskiej (ze względu na pochodzenie linii komórkowych) i europejskiej (dane z bazy 1000 Genomes). Częstości zarówno genotypów jak i alleli były porównywalne dla wszystkich badanych grup (Tabela 12). Wykazano brak istotnych różnic w rozkładzie zarówno genotypów jak i alleli badanych polimorfizmów genu pomiędzy analizowaną grupą i obiema grupami populacyjnymi (test χ^2 , p>0,05, Tabela 13).

Analiza korelacji poziomu ekspresji genu *CDK1* z wariantami polimorfizmu (genotypu homozygotycznego allelu macierzystego *versus* grupa heterozygot i genotypu homozygotycznego allelu pochodnego) nie wykazała zmian w poziomie ekspresji genu zależnych od obserwowanych polimorfizmów. Wartość p (test U Manna-Whitney'a) uzyskana dla polimorfizmu rs3212310 wynosiła 0,88, natomiast dla polimorfizmu rs1871446 nie było możliwe wykonanie obliczenia, jako że genotyp homozygotyczny allelu macierzystego występował tylko w jednej linii komórkowej (Tabela 13).

Tabela 12. Podsumowanie wyników analizy polimorfizmów obserwowanych w poszczególnych liniach komórkowych. Różowym kolorem zaznaczono genotyp homozygotyczny allelu pochodnego, zielonym - genotyp homozygotyczny allelu macierzystego.

Linia harriánharra	Polim	orfizm
Linia komorkowa	rs3212319	rs1871446
UT-SCC-6A	C/C	A/G
UT-SCC-6B	C/C	A/G
UT-SCC-8	C/-	G/G
UT-SCC-11	C/-	G/G
UT-SCC-13	C/C	G/G
UT-SCC-19A	C/-	G/G
UT-SCC-19B	C/-	G/G
UT-SCC-22	C/C	G/G
UT-SCC-23	C/C	G/G
UT-SCC-29	C/-	G/G
UT-SCC-34	C/C	G/G
UT-SCC-35	-/-	G/G
UT-SCC-38	C/-	G/G
UT-SCC-42B	C/C	A/G
UT-SCC-49	C/C	A/A
UT-SCC-50	-/-	G/G
UT-SCC-57	C/C	G/G
UT-SCC-75	C/-	G/G
UT-SCC-106A	C/-	G/G
UT-SCC-106B	C/-	G/G
UT-SCC-107	C/C	G/G
UT-SCC-108	C/-	G/G
UT-SCC-113	C/-	G/G
UT-SCC-116	C/-	A/G
UT-SCC-117	C/-	G/G

Tabela 13. Częstości poszczególnych alleli i genotypów polimorfizmów rs3212319 oraz rs1871446 w analizowanych liniach komórkowych (LSCC) oraz populacjach fińskiej (FIN) i europejskiej (EUR). Dane populacyjne pochodzą z bazy danych 1000 Genomes. Test χ^2 dla częstości genotypów wykonano porównując genotyp homozygotyczny allelu macierzystego z grupą heterozygot i genotypu homozygotycznego allelu pochodnego. U test został wykonany dla porównania poziomu ekspresji genu *CDK1* (RT-qPCR) w liniach różniących się wariantem polimorfizmu - genotyp homozygotyczny allelu macierzystego *versus* grupa heterozygot i genotypu homozygotyczny allelu macierzystego *versus* grupa heterozygot i genotypu homozygotyczny allelu macierzystego *versus* grupa heterozygot i genotypu homozygotycznego allelu pochodnego.

	Wariant polimorfizmu	LSCC	FIN	EUR
	rs	3212319		
	GC	0,66	0,58	0,64
CZĘSTOSCI	G-	0,34	0,42	0,36
anen	χ²p		0,41	0,82
	C/C	0,4	0,31	0,42
C- a sta (si	C/-	0,52	0,53	0,43
	-/-	0,08	0,16	0,15
genotypow	χ² p		0,41	0,82
	U test p		0,879	
	rs	1871446		
Creataíai	A	0,12	0,12	0,21
Częstosci alleli	G	0,88	0,88	0,79
unen	χ²p		0,94	0,14
	A/A	0,04	0,03	0,06
C	A/G	0,16	0,17	0,3
CZĘSTOSCI	G/G	0,8	0,8	0,65
Schotypow	χ² p		0,57	0,71
	U test p		n/a	

Wyniki uzyskane w powyższych analizach nie potwierdzają związku polimorfizmów genu *CDK1*: rs3212319 oraz rs1871446 z patogenezą płaskonabłonkowego raka krtani.

5.4. Wyciszanie genu *CDK1* poprzez interferencję RNA (RNAi) oraz testy funkcjonalne

Do wyciszenia genu *CDK1* w liniach komórkowych LSCC zastosowano w początkowym etapie analizy trzy dupleksy siRNA wyciszające gen *CDK1* (siRNA-A, siRNA-B i siRNA-C). Kontrolę stanowiła ta sama linia komórkowa transfekowana siRNA kontrolnym o nonsensownej sekwencji (siRNA-N). W celu wytypowania

dupleksu siRNA najskuteczniej wyciszającego gen wykonano reakcję RT-qPCR (RNA izolowane po upływie 24 godzin od transfekcji) a następnie Western blot (białka wyizolowane po upływie 48 godzin po transfekcji). Wykazano, iż wszystkie zastosowane dupleksy siRNA powodują obniżenie poziomu ekspresji genu *CDK1* we wszystkich analizowanych liniach komórkowych. Wyciszenie genu obserwowane było zarówno na poziomie mRNA jak i białka. Wyciszenie ekspresji genu na poziomie mRNA przekraczało 70% przy inkubowaniu linii komórkowej UT-SCC-34 z dupleksem siRNA-A, linii 106A: siRNA-A i siRNA-B oraz linii UT-SCC-107 dupleksami siRNA-A, -B i -C (Rycina 15).



Rycina 15. Porównanie efektywności wyciszenia genu *CDK1* w poszczególnych liniach komórkowych LSCC z użyciem różnych dupleksów siRNA. Panel górny: wykres prezentuje poziom wyciszenia genu *CDK1* jaki uzyskano z zastosowaniem poszczególnych dupleksów siRNA szacowany na poziomie mRNA (RT-qPCR) oraz białka (Western blot). Panel dolny: wyniki analizy Western blot przedstawiające obniżony poziom akumulacji białka CDK1 w badanych liniach komórkowych transfekowanych poszczególnymi dupleksami siRNA. A, B, C - linie komórkowe transfekowane dupleksami siRNA-A, -B, -C; N - linia komórkowa transfekowana siRNA-N.

Poziom białka CDK1 obniżony został o ponad 70% w linii UT-SCC-34 z użyciem dupleksu siRNA-A, w linii UT-SCC-106A: dupleksem siRNA-A oraz w linii UT-SCC-107 dupleksami siRNA-A i -B (Rycina 15). Szczegółowe wyniki analizy poziomu wyciszenia genu CDK1 z użyciem dupleksów siRNA z zastosowaniem techniki RTqPCR oraz Western blot przedstawiono w Tabeli 14.

Tabela 14. Szczegółowe wyniki analizy poziomu wyciszenia genu CDK1 z użyciem dupleksów siRNA z zastosowaniem techniki RT-qPCR oraz Western blot. A, B, C - linie komórkowe transfekowane dupleksami siRNA-A, -B, -C; N - linia komórkowa transfekowana dupleksem siRNA-N; CDK/GAPDH - względny poziom akumulacji białka CDK1 w próbie., sd - odchylenie standardowe

		RT-qF	PCR		Western blot						
	Poziom ekspresji	sd	Ekspresja [%]	Wyciszenie [%]	GAPDH/CDK1	Ekspresja [%]	Wyciszenie [%]				
				UT-SCC-34							
Α	1,00	0,10	1,79	98,21	0,07	14	86				
В	45,14	4,13	80,77	19,23	0,42	84	16				
С	21,21	4,62	37,95	62,05	0,36	72	28				
Ν	55,89	6,66			0,50						
	UT-SCC-107										
Α	1,00	0,50	0,18	99,82	0,16	27	73				
В	2,57	1,20	0,46	99,54	0,11	18	82				
С	17,74	4,00	3,14	96,86	0,34	57	43				
Ν	564,18	151,20			0,60						
				UT-SCC-1064	A						
Α	1,00	0,12	20,20	79,80	0,07	11	89				
В	1,69	0,22	34,14	65,86	0,25	39	61				
С	3,47	0,54	70,10	29,90	0,46	72	28				
Ν	4,95	0,93			0,64						

Do dalszej analizy wykorzystano dupleksy siRNA-A do wyciszenia genu *CDK1* we wszystkich trzech analizowanych liniach komórkowych.

Przeanalizowano także czas trwania wyciszenia genu analizowanych *CDK1* w liniach komórkowych. W tym celu wykonano izolację RNA oraz białek po 24, 48 oraz 72 godzinach po przeprowadzeniu transfekcji. Wykazano, że wyciszenie genu najwyższe jest po 48 lub 72 godzinach od wprowadzenia siRNA do komórek (Rycina 16 i Tabela 15).



Rycina 16. Analiza czasu trwania wyciszenia genu *CDK1* w liniach komórkowych LSCC Panel górny: wykres prezentuje poziom wyciszenia genu *CDK1* jaki uzyskano z zastosowaniem dupleksu siRNA-A szacowany na poziomie mRNA (RT-qPCR) oraz białka (Western blot) w poszczególnych punktach czasowych. Panel dolny: wyniki analizy Western blot przedstawiające obniżony poziom akumulacji białka CDK1 w badanych liniach komórkowych w poszczególnych punktach czasowych. A - linia komórkowa transfekowana dupleksem siRNA-A; N - linia komórkowa transfekowana dupleksem siRNA-N; 24h, 48h 72h - czas hodowli komórek po transfekcji.

Tabela 15. Szczegółowe wyniki analizy poziomu wyciszenia genu *CDK1* z użyciem siRNA z zastosowaniem techniki RT-qPCR oraz Western blot. A - linia komórkowa transfekowana dupleksem siRNA-A; N - linia komórkowa transfekowana dupleksem siRNA-N; 24h, 48h 72h - czas hodowli komórek po transfekcji; CDK/GAPDH - względny poziom akumulacji białka CDK1 w próbie, sd - odchylenie standardowe.

		RT-0	qPCR		Western blot				
				UT-SCCC-34	•				
	Ekspresja <i>CDK1</i>	sd	Poziom ekspresji [%]	Wyciszenie [%]	CDK1/GAPDH	Poziom ekspresji [%]	Wyciszenie [%]		
24 A	1,00	0,15	Б	05	0,21	10	52		
24 N	19,75	0,06	C	33	0,44	40	52		
48 A	7,15	1,60	26	74	0,08	22	79		
48 N	27,17	3,51	20	/4	0,36	22	78		
72 A	3,31	0,40	11	80	0,06	10	Q1		
72 N	29,02	4,89	11	89	0,31	19	81		
	UT-SCC-107								
24 A	2,61	0,58	22	77	0,40	82	10		
24 N	11,41	1,54	23		0,49	02	10		
48 A	1,45	0,13	10	Q1	0,30	55	15		
48 N	7,46	0,47	19	01	0,55	55	45		
72 A	1,00	0,29	16	ол	0,14	25	75		
72 N	6,36	0,67	10	04	0,56	25	75		
				UT-SCC-106A	A				
24 A	2,33	0,16	70	27	0,81	C A	26		
24 N	3,19	0,19	/3	21	1,27	04	50		
48 A	1,12	0,11	46	E4	0	0	100		
48 N	2,43	0,26	40	54	0,11	U	100		
72 A	1,00	0,12	40	го	0,09	20	61		
72 N	2,37	0,12	42	58	0,23	39	01		

5.4.1. Analiza skutków wyciszenia genu *CDK1* w liniach komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani - mikromacierze ekspresyjne

Przed analizą ekspresji genu metodą opartą o mikromacierze (wykonawca: firma Atlas Biolabs) skuteczność wyciszenia genu *CDK1* potwierdzono stosując techniki Western blot oraz PCR w czasie rzeczywistym. Wyniki przedstawiono w Tabeli 16.

Uzyskane wyniki wskazują na skuteczne wyciszenie genu *CDK1* w analizowanych liniach komórkowych, zarówno na poziomie RNA jak i białka.

Tabela 16. Poziom ekspresji genu *CDK1* analizowany z użyciem RT-qPCR i Western blot w liniach komórkowych poddanych transfekcji z użyciem dupleksów siRNA wyciszającego gen *CDK1* (siRNA-A) i kontrolnego (siRNA-N) w liniach komórkowych LSCC wykorzystanych do wykonania mikromacierzy ekspresyjnej; CDK/GAPDH - względny poziom akumulacji białka CDK1 w próbie, sd - odchylenie standardowe.

		RT-qPC	R	Western blot							
UT-SCCC-34											
	Ekspresja <i>CDK1</i>	sd	Poziom ekspresji [%]	Wyciszenie [%]	CDK1/GAPDH	Poziom ekspresji [%]	Wyciszenie [%]				
siRNA-A	1,00	0,17	10	07	0,04	16	84				
siRNA-N	5,58	0,61	10	02	0,25	10					
				UT-SCC-107							
siRNA-A	3,12	0,80	26	64	0,19	20	71				
siRNA-N	8,64	1,01	50	04	0,65	29	/1				

6. Analiza wyników uzyskanych z mikromacierzy ekspresyjnej - selekcja genów

Spośród 54675 tagów zlokalizowanych na mikromacierzy wytypowano początkowo 159 tagów przypisanych do 157 genów spełniających kryteria przedstawione w rozdziale *Metody* (podrozdział 5.4.2.1.).

Dla uzyskanej w ten sposób grupy genów przeprowadzono drugi etap selekcji: analizę funkcjonalną w celu sprecyzowania procesów biologicznych, w których powyższe geny mogą być zaangażowane. Analiza z użyciem następujących narzędzi bioinformatycznych: GO, DAVID oraz GOrilla wskazała szereg funkcji i procesów w jakie mogą być zaangażowane wytypowane geny, jednakże wartość współczynnika FDR (ang. *False Discovery Rate*) dla wszystkich otrzymanych procesów była wyższa od przyjętego kryterium wynoszącego 0,05.

Poprzez analizę z użyciem bazy danych STRING zidentyfikowano trzy procesy biologiczne (FDR = 0,0114 dla każdej z analiz):

- ścieżka sygnałowa, w której bierze udział receptor Fc-gamma zaangażowana w fagocytozę (GO.0038096) obejmująca geny: CDC42, DOCK1, FYN, MYO1C, PTK2, WASF2,
- ścieżka sygnałowa, w której bierze udział receptor Fc (GO. 0038093) w skład której wchodzą: CDC42, CDK1, DOCK1, ERBB2, FYN, MYO1C, PTK2, TSC2, WASF2,

 ścieżka sygnałowa z udziałem receptora naczyniowego czynnika wzrostu śródbłonka (GO.0048010) złożona z genów: CDC42, CDK1, DOCK1, FYN, PTK2, SHB, WASF2.

Geny zaangażowane w wyżej wymienionych ścieżkach sygnałowych zostały wytypowane do analizy RT-qPCR w celu potwierdzenia zmiany poziomu ich ekspresji w liniach komórkowych LSCC poddanych wyciszaniu *CDK1*.

Drugą grupę genów wytypowanych do analizy RT-qPCR stanowiły geny, dla których na podstawie bazy danych STRING zaobserwowano oddziaływanie z *CDK1*. Były to: *CALD1*, *CDC42*, *CDK6*, *FYN*, *HELLS*, *HIST1H1C*, *HIST1H2BJ*, *MYBL2*, *RUNX1*, *SMARCA4*, *SMC1A*, *TMEM67*, *TSC2* oraz *UBE2I*.

W analizie międzybiałkowych interakcji CDK1 z wykorzystaniem bazy danych bioGRID wykazano 424 oddziaływania fizyczne z 212 białkami. Spośród nich, dla trzech: *FYN*, *RUNX1* oraz *UBE21* obserwowano minimum dwukrotną zmianę poziomu ekspresji w liniach komórkowych poddanych wyciszeniu genu *CDK1*. Nie wykazano żadnych interakcji genetycznych.

Na schemacie (Rycina 17) przedstawiono kolejne etapy selekcji genów potencjalnie zależnych od *CDK1*. Sieć zależności pomiędzy genami/białkami o zmienionym poziomie ekspresji w liniach komórkowych poddanych wyciszaniu genu *CDK1* przedstawia Rycina 18.

Ostatecznie, do analizy wytypowano 20 genów, z których dla 6 obserwowano podwyższenie a dla 14 obniżenie poziomu ekspresji w liniach komórkowych poddanych wyciszaniu genu *CDK1* (Rycina 19 Tabele 17 i 18).



Rycina 17. Schemat przedstawiający poszczególne etapy selekcji genów wybranych do analizy spośród genów o zmienionym profilu ekspresji w liniach komórkowych LSCC poddanych wyciszaniu genu *CDK1*. Punkt wyjścia stanowiły wyniki analizy ekspresji genów z użyciem mikromacierzy ekspresyjnej Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix).



Rycina 18. Sieć zależności i podobieństw między białkami uzyskana dzięki bazie danych STRING. Analizie poddano wszystkie geny, dla których obserwowano przynajmniej dwukrotną zmianę poziomu ekspresji w liniach poddanych wyciszaniu genu CDK1 (157 genów). Dla zwiększenia przejrzystości rycina pozbawiona jest genów, które nie wykazywały interakcji z żadnym innym genem z analizowanej grupy (string-db.org ver. 10.5, zachowany średni minimalny wymagany wynik interakcji równy 0,4).



Rycina 19. Tagi i przypisane im geny wybrane z mikromacierzy na podstawie zmian w poziomie ekspresji mRNA w liniach komórkowych LSCC poddanych wyciszaniu genu *CDK1*. 34A, 107A - linie komórkowe poddane przejściowej transfekcji dupleksem siRNA-A; 34N, 107N - kontrolne linie komórkowe poddane przejściowej transfekcji dupleksem siRNA-A; 34N, 107N - kontrolne linie komórkowe poddane przejściowej transfekcji dupleksem siRNA-A; 34N, 107N - kontrolne linie komórkowe poddane przejściowej transfekcji dupleksem siRNA-A; 34N, 107N - kontrolne linie komórkowe poddane przejściowej transfekcji dupleksem siRNA-A; 34N, 107N - kontrolne linie komórkowe poddane przejściowej transfekcji dupleksem siRNA-A; 34N, 107N - kontrolne linie komórkowe poddane przejściowej transfekcji dupleksem siRNA-A; 34N, 107N - kontrolne linie komórkowe poddane przejściowej transfekcji dupleksem siRNA-A; 34N, 107N - kontrolne linie komórkowe poddane przejściowej transfekcji dupleksem siRNA-A; 34N, 107N - kontrolne linie komórkowe poddane przejściowej transfekcji dupleksem siRNA-A; 34N, 107N - kontrolne linie komórkowe poddane przejściowej transfekcji dupleksem siRNA-A; 34N, 107N - kontrolne linie komórkowe poddane przejściowej transfekcji dupleksem siRNA-A; 34N, 107N - kontrolne linie komórkowe poddane przejściowej transfekcji dupleksem siRNA-A; 34N, 107N - kontrolne linie komórkowe poddane przejściowej transfekcji dupleksem siRNA-A; 34N, 107N - kontrolne linie komórkowe poddane przejściowej transfekcji dupleksem siRNA-A; 34N, 107N - kontrolne linie komórkowe poddane przejściowej transfekcji dupleksem siRNA-A; 34N, 107N - kontrolne linie komórkowe poddane przejściowej transfekcji dupleksem siRNA-A; 34N, 107N - kontrolne linie komórkowe poddane przejściowej transfekcji dupleksem siRNA-A; 34N, 107N - kontrolne linie komórkowe poddane przejściowej transfekcji dupleksem siRNA-A; 34N, 107N - kontrolne linie komórkowe poddane przejściowej transfekcji dupleksem siRNA-A; 34N, 107N - kontrolne linie komórkowe poddane przejściowej transfekcji dupleksem siRNA-A;

Tabela 17. Analiza zmiany poziomu ekspresji genów wywołanej wyciszeniem genu *CDK1* w linii komórkowej LSCC - UT-SCC-107 (dane z mikromacierzy ekspresyjnych). UT-SCC-107A - linia transfekowana dupleksem siRNA-A; UT-SCC-107N- kontrolna linia komórkowa transfekowana dupleksem siRNA-N; P - potwierdzenie ekspresji transkryptu.

			UT-SCC-107A			UT-SCC-107	N	
Gen	Tag	Poziom ekspresji	Detekcja ekspresji	lstotność statystyczna detekcji	Poziom ekspresji	Detekcja ekspresji	lstotność statystyczna detekcji	Krotność zmiany poziomu ekspresji
ERBB2	234354_x_at	16,69	Р	0,001	41,65	Р	0,038	0,40
HIST1H1C	209398_at	451,78	Р	0,000	923,44	Р	0,000	0,49
HIST1H2BJ	210387_at	41,74	Р	0,001	156,81	Р	0,000	0,27
MYBL2	201710_at	116,97	Р	0,003	237,11	Р	0,004	0,49
MYO1C	225080_at	242,24	Р	0,001	773,03	Р	0,001	0,31
MYO1C	32811_at	88,15	Р	0,001	211,47	Р	0,000	0,42
PTK2	241453_at	174,49	Р	0,000	361,49	Р	0,000	0,48
RUNX1	217263_x_at	25,07	Р	0,019	71,02	Р	0,002	0,35
SHB	204657_s_at	275,66	Р	0,000	569,79	Р	0,000	0,48
SMARCA4	212520_s_at	36,54	Р	0,008	107,82	Р	0,001	0,34
SMC1A	239688_at	43,23	Р	0,000	108,06	Р	0,000	0,40
TMEM67	238229_at	407,09	Р	0,000	887,16	Р	0,000	0,46
TSC2	215735_s_at	94,24	Р	0,001	210,18	Р	0,000	0,45
UBE2I	213536_s_at	53,37	Р	0,003	117,01	Р	0,000	0,46
WASF2	224563_at	29,87	Р	0,004	62,17	Р	0,004	0,48
CALD1	201617_x_at	1879,56	Р	0,001	843,00	Р	0,001	2,23
CDC42	214230_at	103,43	Р	0,000	39,06	Р	0,006	2,65
CDK6	235287_at	94,15	Р	0,000	33,32	Р	0,024	2,83
DOCK1	241708_at	162,54	Р	0,001	71,77	Р	0,004	2,26
FYN	212486_s_at	82,10	Р	0,001	26,53	Р	0,024	3,09
HELLS	234040_at	61,55	Р	0,001	25,07	Р	0,002	2,46

Tabela 18. Analiza zmiany poziomu ekspresji genów wywołanej wyciszeniem genu *CDK1* w linii komórkowej LSCC UT-SCC-34 (dane z mikromacierzy ekspresyjnych). UT-SCC-34A - linia komórkowa transfekowana dupleksem siRNA-A; UT-SCC-34N - linia komórkowa transfekowana dupleksem siRNA-N; P - potwierdzenie ekspresji transkryptu.

		UT-SCC-34A UT-SCC-34N			N			
Gen	Тад	Poziom ekspresji	Detekcja ekspresji	lstotność statystyczna detekcji	Poziom ekspresji	Detekcja ekspresji	lstotność statystyczna detekcji	Krotność zmiany poziomu ekspresji
ERBB2	234354_x_at	20,88	Р	0,046	48,81	Р	0,003	0,43
HIST1H1C	209398_at	698,00	Р	0,001	1671,07	Р	0,001	0,42
HIST1H2BJ	210387_at	69,29	Р	0,000	155,92	Р	0,000	0,44
MYBL2	201710_at	155,40	Р	0,011	346,42	Р	0,003	0,45
MYO1C	225080_at	237,58	Р	0,000	652,47	Р	0,001	0,36
MYO1C	32811_at	105,79	Р	0,001	261,14	Р	0,000	0,41
РТК2	241453_at	182,33	Р	0,000	433,92	Р	0,000	0,42
RUNX1	217263_x_at	13,70	Р	0,014	56,92	Р	0,000	0,24
SHB	204657_s_at	130,28	Р	0,001	339,57	Р	0,000	0,38
SMARCA4	212520_s_at	37,32	Р	0,046	92,86	Р	0,024	0,40
SMC1A	239688_at	26,01	Р	0,002	116,91	Р	0,000	0,22
TMEM67	238229_at	176,55	Р	0,001	765,74	Р	0,000	0,23
TSC2	215735_s_at	110,28	Р	0,000	235,12	Р	0,000	0,47
UBE2I	213536_s_at	105,78	Р	0,000	237,46	Р	0,000	0,45
WASF2	224563_at	37,78	Р	0,011	106,02	Р	0,003	0,36
CALD1	201617_x_at	471,45	Р	0,002	230,15	Р	0,024	2,05
CDC42	214230_at	187,04	Р	0,000	90,52	Р	0,001	2,07
CDK6	235287_at	75,73	Р	0,001	27,62	Р	0,000	2,74
DOCK1	241708_at	74,52	Р	0,006	20,50	Р	0,046	3,64
FYN	212486_s_at	579,42	Р	0,000	228,62	Р	0,000	2,53
HELLS	234040_at	56,65	Р	0,001	17,27	Р	0,007	3,28

7. Potwierdzanie wyników uzyskanych z mikromacierzy z wykorzystaniem ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (RT-qPCR)

Dla 20 genów wytypowanych na podstawie wyników z mikromacierzy zaprojektowano startery oraz przeprowadzono reakcję PCR w czasie rzeczywistym. Wykorzystano RNA uzyskane z trzech linii komórkowych poddanych wyciszaniu genu *CDK1* z wykorzystaniem dupleksu siRNA-A oraz linii transfekowanych kontrolnym dupleksem siRNA (siRNA-N). Izolację RNA wykonano po upływie 48 godzin od momentu transfekcji.

W odniesieniu do przyjętych wartości odcięcia (przedstawionych w rozdziale *Metody* (podrozdział 6.4.2.1.)), zaobserwowano podwyższony poziom ekspresji genu *CDK6* we wszystkich trzech badanych liniach komórkowych oraz genów *FYN* i *CALD1* w liniach UT-SCC-107 i UT-SCC-34. Krotność zmiany poziomu ekspresji genu *FYN* w linii UT-SCC-106A wynosiła 1,5, plasując się na granicy wartości odcięcia. Spadek poziomu ekspresji obserwowano w przypadku genów: *HIST1H2BJ* w linii komórkowej UT-SCC-107, *RUNX1* w UT-SCC-106A oraz *MYO1C* w liniach: UT-SCC-106A oraz UT-SCC-107. Dodatkowo, wartości zmiany poziomu ekspresji zbliżone do wartości odcięcia wykazano w linii UT-SCC-34 dla genów: *MYO1C* (0,72), *SHB* (0,75), *HIST1H2BJ* (0,74) oraz *HIST1H1C* (0,73). Dla pozostałych genów wyniki RT-qPCR nie potwierdziły wyników uzyskanych z użyciem mikromacierzy ekspresyjnych (Tabele 19 i 20).

Tabela 19. Analiza zmiany poziomu ekspresji genów wywołana wyciszeniem genu *CDK1* w liniach płaskonabłonkowego raka krtani - wzrost poziomu ekspresji (dane uzyskane z analizy RT-qPCR); kolorem czerwonym oznaczono dwukrotną zmianę poziomu ekspresji genu. A - linia komórkowa poddana transfekcji dupleksem siRNA-A; N - kontrolna linia komórkowa poddana transfekcji dupleksem siRNA-N., sd - odchylenie standardowe

				CDC42		CDK6			
Linia komórkowa	Poziom ekspresji genu	sd	Krotność zmiany poziomu ekspresji genu	Poziom ekspresji genu	sd	Krotność zmiany poziomu ekspresji genu	Poziom ekspresji genu	sd	Krotność zmiany poziomu ekspresji genu
106A_A	182,2	16,81	1.2	6,4	0,37	1.2	8,0	0,50	1.0
106A_N	142,7	11,95	1,5	5,5	0,43	1,2	4,2	0,61	1,9
107A	388,3	20,14	1 0	3,0	0,13	1 1	5,8	0,41	17
107N	219,6	29,07	1,0	2,7	0,11	1,1	3,5	0,22	1,7
34A	3,2	0,35	2 7	1,3	0,07	1.2	2,6	0,16	2.6
34N	1,0	0,07	5,2	1,0	0,16	1,3	1,0	0,08	2,0
		DOCK1			HELLS			FYN	
Linia komórkowa	Poziom ekspresji genu	DOCK1 sd	Krotność zmiany poziomu ekspresji genu	Poziom ekspresji genu	HELLS sd	Krotność zmiany poziomu ekspresji genu	Poziom ekspresji genu	FYN sd	Krotność zmiany poziomu ekspresji genu
Linia komórkowa 106A_A	Poziom ekspresji genu 6,1	DOCK1 sd 0,90	Krotność zmiany poziomu ekspresji genu	Poziom ekspresji genu 73,9	HELLS sd 6,82	Krotność zmiany poziomu ekspresji genu	Poziom ekspresji genu 189,1	FYN sd 9,38	Krotność zmiany poziomu ekspresji genu
Linia komórkowa 106A_A 106A_N	Poziom ekspresji genu 6,1 6,2	DOCK1 sd 0,90 0,74	Krotność zmiany poziomu ekspresji genu 1,0	Poziom ekspresji genu 73,9 58,9	HELLS sd 6,82 4,41	Krotność zmiany poziomu ekspresji genu 1,3	Poziom ekspresji genu 189,1 126,3	FYN sd 9,38 7,11	Krotność zmiany poziomu ekspresji genu 1,5
Linia komórkowa 106A_A 106A_N 107A	Poziom ekspresji genu 6,1 6,2 1,7	DOCK1 sd 0,90 0,74 0,09	Krotność zmiany poziomu ekspresji genu 1,0	Poziom ekspresji genu 73,9 58,9 2,3	HELLS sd 6,82 4,41 0,51	Krotność zmiany poziomu ekspresji genu 1,3	Poziom ekspresji genu 189,1 126,3 2,2	FYN sd 9,38 7,11 0,12	Krotność zmiany poziomu ekspresji genu 1,5
Linia komórkowa 106A_A 106A_N 107A 107N	Poziom ekspresji genu 6,1 6,2 1,7 1,4	DOCK1 sd 0,90 0,74 0,09 0,09	Krotność zmiany poziomu ekspresji genu 1,0 1,2	Poziom ekspresji genu 73,9 58,9 2,3 3,1	HELLS sd 6,82 4,41 0,51 0,30	Krotność zmiany poziomu ekspresji genu 1,3 0,8	Poziom ekspresji genu 189,1 126,3 2,2 1,2	FYN sd 9,38 7,11 0,12 0,08	Krotność zmiany poziomu ekspresji genu 1,5 1,7
Linia komórkowa 106A_A 106A_N 107A 107N 34A	Poziom ekspresji genu 6,1 6,2 1,7 1,4 1,0	DOCK1 sd 0,90 0,74 0,09 0,09 0,09 0,014	Krotność zmiany poziomu ekspresji genu 1,0 1,2	Poziom ekspresji genu 73,9 58,9 2,3 3,1 1,0	HELLS sd 6,82 4,41 0,51 0,30 0,16	Krotność zmiany poziomu ekspresji genu 1,3 0,8	Poziom ekspresji genu 189,1 126,3 2,2 1,2 45,4	FYN sd 9,38 7,11 0,12 0,08 4,64	Krotność zmiany poziomu ekspresji genu 1,5 1,7

Tabela 20. Analiza zmiany poziomu ekspresji genów wywołana wyciszeniem genu *CDK1* w liniach płaskonabłonkowego raka krtani - spadek poziomu ekspresji (dane uzyskane z analizy RT-qPCR); kolorem czerwonym oznaczono dwukrotną zmianę poziomu ekspresji genu. A - linia komórkowa poddana transfekcji z użyciem dupleksu siRNA-A; N - kontrolna linia komórkowa poddana transfekcji dupleksem siRNA-N, sd - odchylenie standardowe.

Linia	ERBB2				ST1H1C	HIST1H2BJ			
komórkowa	Poziom	Sd	Krotność zmiany poziomu	Poziom	sd	Krotność zmiany poziomu	Poziom	sd	Krotność zmiany poziomu
	ekspresji genu		ekspresji genu	ekspresji genu		ekspresji genu	ekspresji genu		ekspresji genu
106A_A	3,6	0,43	1 2	5,7	0,57	1.6	10,5	0,65	17
106A_N	3,1	0,36	1,2	3,5	0,52	1,0	6,2	0,28	1,7
107A	2,7	0,19	1 0	1,5	0,29	0.9	1,0	0,05	0.6
107N	1,5	0,09	1,0	1,9	0,68	0,8	1,6	0,12	0,0
34A	1,1	0,13	1 1	2,0	0,21	0.7	2,1	0,12	0.7
34N	1,0	0,05	1,1	2,8	0,59	0,7	2,8	0,18	0,7
Linia		1	ЛYBL		N	1Y01C			РТК2
Linia	Poziom	l cd	//YBL Krotność zmiany poziomu	Poziom	M cd	IYO1C Krotność zmiany poziomu	Poziom	cd	PTK2 Krotność zmiany poziomu
Linia komórkowa	Poziom ekspresji genu	sd	//YBL Krotność zmiany poziomu ekspresji genu	Poziom ekspresji genu	N sd	IYO1C Krotność zmiany poziomu ekspresji genu	Poziom ekspresji genu	sd	PTK2 Krotność zmiany poziomu ekspresji genu
Linia komórkowa 106A_A	Poziom ekspresji genu 6,0	sd 0,59	AYBL Krotność zmiany poziomu ekspresji genu	Poziom ekspresji genu 1,7	№ sd 0,13	IYO1C Krotność zmiany poziomu ekspresji genu	Poziom ekspresji genu 2,9	sd 0,16	PTK2 Krotność zmiany poziomu ekspresji genu
Linia komórkowa 106A_A 106A_N	Poziom ekspresji genu 6,0 4,6	sd 0,59 0,46	MYBL Krotność zmiany poziomu ekspresji genu 1,3	Poziom ekspresji genu 1,7 2,9	№ sd 0,13 0,43	IYO1C Krotność zmiany poziomu ekspresji genu 0,6	Poziom ekspresji genu 2,9 2,8	sd 0,16 0,37	PTK2 Krotność zmiany poziomu ekspresji genu 1,0
Linia komórkowa 106A_A 106A_N 107A	Poziom ekspresji genu 6,0 4,6 1,4	sd 0,59 0,46 0,07	AYBL Krotność zmiany poziomu ekspresji genu 1,3	Poziom ekspresji genu 1,7 2,9 1,2	V sd 0,13 0,43 0,20	IYO1C Krotność zmiany poziomu ekspresji genu 0,6	Poziom ekspresji genu 2,9 2,8 1,0	sd 0,16 0,37 0,07	PTK2 Krotność zmiany poziomu ekspresji genu 1,0
Linia komórkowa 106A_A 106A_N 107A 107N	Poziom ekspresji genu 6,0 4,6 1,4 1,2	sd 0,59 0,46 0,07 0,09	AYBL Krotność zmiany poziomu ekspresji genu 1,3 1,1	Poziom ekspresji genu 1,7 2,9 1,2 2,1	№ sd 0,13 0,43 0,20 0,19	IYO1C Krotność zmiany poziomu ekspresji genu 0,6 0,6	Poziom ekspresji genu 2,9 2,8 1,0 1,0	sd 0,16 0,37 0,07 0,08	PTK2 Krotność zmiany poziomu ekspresji genu 1,0 1,0
Linia komórkowa 106A_A 106A_N 107A 107N 34A	Poziom ekspresji genu 6,0 4,6 1,4 1,2 1,1	sd 0,59 0,46 0,07 0,09 0,06	MYBL Krotność zmiany poziomu ekspresji genu 1,3 1,1	Poziom ekspresji genu 1,7 2,9 1,2 2,1 1,0	sd 0,13 0,43 0,20 0,19 0,04	IYO1C Krotność zmiany poziomu ekspresji genu 0,6 0,6	Poziom ekspresji genu 2,9 2,8 1,0 1,0 1,0	sd 0,16 0,37 0,07 0,08 0,18	PTK2 Krotność zmiany poziomu ekspresji genu 1,0 1,0

Tabela 20.cd

Linia		UNX1	SHB			SMARCA4				
Linia	Poziom	cd	Krotność zmiany poziomu	Poziom	cd	Krotność zmiany poziomu	Poziom	cd	Krotność zmiany poziomu	
KUIIIOI KOWa	ekspresji genu	su	ekspresji genu	ekspresji genu	sa	ekspresji genu	ekspresji genu	sa	ekspresji genu	
106A_A	3,6	0,59	0.6	3,6	0,33	1 0	13,0	2,57	1 0	
106A_N	5,9	0,64	0,0	3,1	0,40	1,2	11,1	0,46	1,2	
107A	24,7	6,25	1.0	2,8	0,37	1,0	1,6	0,07	0.0	
107N	24,2	6,48	1,0	3,0	0,24		1,7	0,11	0,9	
34A	1,1	0,22	1 1	1,0	0,07	0.7	1,3	0,09	1.2	
34N	1,0	0,06	1,1	1,3	0,11	0,7	1,0	0,08	1,5	
		MC1A	TMEM67			TSC2				
Linia	Poziom	a al	Krotność zmiany poziomu	Poziom	a al	Krotność zmiany poziomu	Poziom	a al	Krotność zmiany poziomu	
котогкоwa	ekspresji genu	sa	ekspresji genu	ekspresji genu	sa	ekspresji genu	ekspresji genu	sa	ekspresji genu	
106A_A	23,5	2,76	1 1	6,5	0,41	1 0	10,0	1,70	17	
106A_N	22,1	1,87	1,1	5,5	0,17	1,2	5,9	1,25	1,7	
107A	1,0	0,08	0.9	1,4	0,08	1.0	1,0	0,12	0.0	
107N	1,2	0,15	0,8	1,4	0,06	1,0	1,1	0,11	0,9	
34A	1,1	0,14	1.0	1,1	0,08	1 1	1,2	0,16	1 1	
34N	1,0	0,12	1,0	1,0	0,09	⊥,⊥	1,0	0,28	1,1	
		Ľ	JBE2I	WASF2				_		
Linia	Poziom		Krotność zmiany poziomu	Poziom		Krotność zmiany poziomu				
Komorkowa	ekspresji genu	sa	ekspresji genu	ekspresji genu	sa	ekspresji genu				
106A_A	4,7	0,21	1.0	2,7	0,16					
106A_N	4,8	0,55	1,0	2,5	0,31	⊥,⊥				
107A	1,0	0,08	0.0	1,2	0,10	1.0				
107N	1,1	0,08	0,9	1,2	0,09	1,0				
34A	1,3	0,08	0.0	1,0	0,05	1.0				
34N	1,4	0,08	0,9	1,0	0,05	I,U				

8. Analiza bioinformatyczna uzyskanych wyników

W celu określenia interakcji białkowych a także podobieństw pomiędzy genami w kontekście ich funkcjonalnej charakterystyki przeprowadzono analizę z wykorzystaniem bazy danych STRING (string-db.org) (Rycina 20). Danymi wejściowymi dla bazy był zbiór genów o zmienionym poziomie ekspresji w liniach komórkowych poddanych wyciszaniu genu *CDK1*: *FYN*, *CDK6*, *CALD1*, *HIST1H2BJ*, *RUNX1*, *MYO1C*, *SHB* oraz *HIST1H1C*. Określono i przeanalizowano interakcje oraz fizyczne oddziaływania pomiędzy białkami kodowanymi przez powyższe geny a także określono szlaki sygnałowe w jakie są zaangażowane.



Rycina 20. Analiza oddziaływań i interakcji genów/białek o potwierdzonej zmianie poziomu ekspresji w liniach komórkowych LSCC poddanych wyciszaniu genu *CDK1* (STRING). Panel górny: A - Geny o podwyższonej ekspresji po wyciszeniu CDK1; B - Geny o obniżonej ekspresji po wyciszeniu CDK1; C - wszystkie geny o zmienionym poziomie ekspresji. Panel dolny: legenda do schematów.

W przypadku genów analizowanych w niniejszej pracy, wykazano, że wspólną cechą funkcjonalną genów, które charakteryzują się podwyższonym poziomem ekspresji po wyciszeniu genu *CDK1* jest ich powiązanie z cytoszkieletem komórkowym. Trzy z białek: FYN, CDK6 oraz CDK1, charakteryzują się obecnością domen kinaz białkowych i domen wiążących ATP. Dodatkowo, białko CDK6 zostało wskazane jako posiadające, podobnie jak CDK1, aktywność białkowej kinazy serynowo/treoninowej zależnej od cyklin. Szczegółowe dane dotyczące analizy funkcji genów oraz szlaków sygnałowych, w których uczestniczą z użyciem bazy STRING przedstawia Tabela 21.

Tabela 21. Wyniki analizy wzbogacenia funkcjonalnego sieci zależności pomiędzy genami (białkami) w oparciu o bazę danych STRING. FDR - spodziewany odsetek wyników fałszywie dodatnich (ang. *false discovery rate*).

	Baza danych	Identyfikator szlaku (pathway ID)	Szlak sygnałowy (pathway)	FDR	Białka
Funkcja molekularna (Molecular Function)	GO	GO.0004693	Aktywność białkowej kinazy serynowo- treoninowej zależnej od cyklin	0,0292	CDK1, CDK6
Domeny białkowe	InterPro	IPR000719	Domena kinazy białkowej	0,00689	CDK1, CDK6, FYN
i funkcje (Protein		IPR011009	Domena białkowa kinazopodobna	0,00689	CDK1, CDK6, FYN
Domains and Features)		IPR017441	Kinaza białkowa, miejsce wiązania ATP	0,00689	CDK1, CDK6, FYN
Organellum komórkowe (Cellular Component)	GO	GO.0044430	Cytoszkielet	0,0228	CALD1, CDK1, CDK6, FYN

Dla zbioru genów o obniżonej ekspresji w liniach komórkowych z obecnym wyciszeniem *CDK1* zaobserwowano interakcje białka CDK1 z HIST1H2BJ oraz HIST1H1C, jednakże nie zaobserwowano znaczącego wzbogacenia funkcjonalnego. Brak istotnego wzbogacenia funkcjonalnego odnotowano także dla analizy z wykorzystaniem wszystkich genów, dla których wyniki z mikromacierzy potwierdzono poprzez RT-qPCR (Rycina 20).

8.1.1. Analiza skutków wyciszenia genu *CDK1* w liniach komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani - testy funkcjonalne

8.1.1.1. Analiza tempa proliferacji komórek - monitoring przyżyciowy

Tempo proliferacji komórek badano poprzez analizę z wykorzystaniem monitoringu przyżyciowego. Tempo proliferacji komórek ustalono na podstawie pomiarów ich konfluencji w poszczególnych punktach czasowych po wykonaniu transfekcji.

Wykazano 11% obniżenie tempa proliferacji komórek linii komórkowej UT-SCC-106A poddanej wyciszaniu genu *CDK1* w porównaniu z linią kontrolną. Wynik nie był istotny statystycznie: wartości p dla punktów czasowych 24, 48 i 72 godziny od momentu transfekcji wynosił odpowiednio 0,81, 0,26, 0,25 (test T dla danych sparowanych). Obserwowany dla tej linii komórkowej poziom wyciszenia genu *CDK1* wynosił 76% (sd = 3,41) (Rycina 21).



Rycina 21. Analiza skutków wyciszania genu *CDK1* w LSCC - analiza tempa proliferacji komórek: linia komórkowa UT-SCC-106A. Lewy panel - wykres prezentujący zmiany konfluencji badanej linii komórkowej transfekowanej dupleksami siRNA: wyciszającym gen *CDK1* (niebieska linia) i kontrolnym (czerwona linia) w poszczególnych punktach czasowych od transfekcji. Jako punkt 0h oznaczono moment transfekcji. Wyniki przedstawione jako średnia z dwóch powtórzeń z odchyleniem standardowym. Prawy panel - wyniki analizy Western blot potwierdzające wyciszenie genu *CDK1* w badanej linii komórkowej. siRNA - linia komórkowa transfekowana dupleksem siRNA-A; kontrola - linia komórkowa transfekowana dupleksem siRNA-N.

Dla pozostałych dwóch linii komórkowych - UT-SCC-34 i UT-SCC-107 nie wykazano zmian tempa proliferacji (Rycina 22), pomimo wykazanego techniką Western blot znacznego stopnia wyciszenia genu *CDK1* - odpowiednio 64% (sd = 4,20) i 51% (sd = 0,62). Szczegółowe wyniki analizy przedstawione są w Tabeli 22.



Rycina 22. Analiza skutków wyciszania genu *CDK1* w LSCC - analiza tempa proliferacji komórek: linie komórkowe UT-SCC-107 i UT-SCC-34. Lewy panel - wykresy prezentujące zmiany konfluencji badanych linii komórkowych transfekowanych dupleksami siRNA: wyciszającym gen *CDK1* (niebieska linia) oraz kontrolnym (czerwona linia) w poszczególnych punktach czasowych od transfekcji. Jako punkt 0h oznaczono moment transfekcji. Wyniki przedstawione jako średnia z dwóch powtórzeń z odchyleniem standardowym. Prawy panel - wyniki analizy Western blot potwierdzające wyciszenie genu *CDK1* w badanych liniach komórkowych. siRNA - linia komórkowa transfekowana dupleksem siRNA-A; kontrola - linia komórkowa transfekowana dupleksem siRNA-N.

Tabela 22. Podsumowanie zmian tempa proliferacji linii komórkowych podanych wyciszaniu genu *CDK1*. siRNA – linia komórkowa transfekowana dupleksem siRNA-A; kontrola -linia komórkowa transfekowana siRNA-N. Wartości oznaczają procent konfluencji komórek, sd - odchylenie standardowe.

Cros inkubasii [h]	Konfluencja [%]						
	siRNA	sd	Kontrola	sd			
UT-SCC-106A							
0	53	1,45	52	2,32			
12	78	8,54	76	4,42			
24	86	7,39	88	2,86			
36	89	2,28	97	3,68			
48	91	5,50	99	1,27			
60	90	4,90	100	0,08			
72	90	6,15	100	0,32			
Tempo proliferacji	37		48				
Zmiana tempa proliferacji			11				
	UT-SCC-34						
0	53	2,37	53	1,92			
12	75	4,39	70	0,81			
24	87	6,78	81	2,12			
36	93	3,13	90	3,68			
48	98	2,26	96	0,63			
60	99	0,70	97	2,02			
72	100	0,25	98	1,57			
Tempo proliferacji	47		45				
Zmiana tempa proliferacji			-2				
	UT-SCC-107						
0	51	4,43	51	0,96			
12	70	1,83	68	8,54			
24	89	2,35	88	1,56			
36	96	0,49	94	4,50			
48	99	0,81	98	1,44			
60	99	0,53	99	0,57			
72	100	0,59	100	0,14			
Tempo proliferacji	49		49				
Zmiana tempa proliferacji			0				
Poprzez analizę tempa proliferacji komórek z użyciem monitoringu przyżyciowego nie wykazano istotnych różnic pomiędzy liniami komórkowymi, w których wyciszono gen *CDK1* a liniami kontrolnymi.

8.1.1.2. Analiza żywotności komórek - test kolorymetryczny

Żywotność komórek linii LSCC poddanych wyciszeniu genu *CDK1* oraz komórek kontrolnych została wyliczona z wykorzystaniem testu kolorymetrycznego (CCK8), na podstawie wartości absorbancji. Porównano wyniki uzyskane dla każdej z linii komórkowej w trzech punktach czasowych: po upływie 24, 48, 72 godzin od transfekcji. Dla linii UT-SCC-34 żywotność komórek analizowana po 24, 48 i 72 godzinach wynosiła odpowiednio: 86%, 88% oraz 92%. Żywotność linii UT-SCC-106A po 24 godzinach wynosiła 98% a w kolejnych punktach czasowych 100 i 101%. Wyniki uzyskane dla poszczególnych linii nie są istotne statystycznie.

Po zakończeniu wykonaniu pomiarów kolorymetrycznych wykonano analizę Western blot w celu potwierdzenia wyciszenia genu *CDK1*. Ustalono, że poziom wyciszenia genu w linii UT-SCC-34 wynosił 75% (sd = 12), dla linii UT-SCC-106A 58% (sd = 5,2).

Dla linii UT-SCC-107 dwa z wykonanych powtórzeń testu nie powiodły się. Jak wykazano poprzez Western blot, w tych przypadkach nie obserwowano wyciszenia genu *CDK1*, stąd zostały one wykluczone z analizy. Wyniki przedstawione dla linii UT-SCC-107 w niniejszej pracy uzyskane zostały w jednym powtórzeniu i wynosiły odpowiednio dla poszczególnych punktów czasowych: 91%, 101%, 116%. Obniżenie ekspresji genu *CDK1* (na poziomie białka) w linii transfekowanej dupleksem siRNA wyciszającym gen wynosiło 60%. Niepowodzenie w wyciszaniu genu *CDK1* wynikać może ze zbyt długiej hodowli linii komórkowej UT-SCC-107 w stosunku do zalecanego przez producenta odczynnika do transfekcji (<20 pasaży). Z przyczyn technicznych niemożliwe było uzyskanie w trakcie analiz innych komórek tej samej linii.

Uzyskane wyniki przedstawione są na Rycinie 23, natomiast szczegółowe dane dotyczące absorbancji i żywotności komórek zebrano w Tabeli 23.

Uzyskane dla badanych linii komórkowych wyniki nie wykazały wpływu wyciszenia genu *CDK1* na żywotność komórek płaskonabłonkowego raka krtani.



Rycina 23. Analiza żywotności komórek - test kolorymetryczny. Po lewej przedstawiono wykresy przedstawiające wartości absorbancji zmierzonej po upływie 24, 48 i 72h od momentu transfekcji służące do określenia żywotności komórek. Po prawej - wyniki Western blot potwierdzające wyciszenie genu *CDK1* w analizowanych liniach komórkowych LSCC. Wyniki przedstawiono jako średnią wartość trzech pomiarów z odchyleniem standardowym (linie UT-SCC-34 i UT-SCC-106A). Dla linii UT-SCC-107 przedstawiono jeden pomiar. siRNA - linia komórkowa transfekowana dupleksem siRNA-A; kontrola - linia komórkowa transfekowana kontrolnym dupleksem siRNA.

Tabela 23. Szczegółowe wyniki uzyskane w analizie żywotności komórek z wykorzystaniem testu kolorymetrycznego. siRNA - linia komórkowa transfekowana dupleksem siRNA-A; kontrola - linia komórkowa transfekowana dupleksem siRNA-N; Średnia - średnia absorbancja z trzech powtórzeń badania; n/a – brak danych (badanie wykonano w jednym powtórzeniu), sd - odchylenie standardowe.

Cros inkubasii		Absor	Żywotność komórek [%]			
[h]	siRNA	sd	Kontrola	sd	Średnia	sd
			UT-SCC-34			
24	1,48	0,37	1,71	0,18	86	12,51
48	1,83	0,27	2,08	0,17	88	12,90
72	1,85	0,14	2,01	0,02	92	7,37
UT-SCC-106A						
24	1,86	0,03	1,89	0,08	98	2,72
48	2,09	0,11	2,09	0,07	100	2,13
72	2,13	0,07	2,12	0,09	101	1,00
UT-SCC-107						
24	1,53	n/a	1,68	n/a	91	n/a
48	1,57	n/a	1,56	n/a	101	n/a
72	1,59	n/a	1,38	n/a	116	n/a

W powyższej części analizy nie wykazano różnic w żywotności komórek LSCC z wyciszonym genem *CDK1* a liniami kontrolnymi.

9. Analizy dla wytypowanego potencjalnego genu supresji nowotworowej-CEACAM6

Z uwagi na podwyższoną metylację DNA regionu promotorowego genu *CEACAM6* w liniach komórkowych LSCC, gen ten może być potencjalnym genem supresji nowotworowej. Wykonano analizy mające na celu ocenę zmiany poziomu ekspresji genu w liniach komórkowych LSCC na skutek inhibicji metylacji DNA.

9.1. Hamowanie metylacji DNA regionu promotorowego genu *CEACAM6* przy użyciu decytabiny w liniach komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani

Dla obu badanych linii komórkowych - UT-SCC-11 oraz UT-SCC-29 średni poziom metylacji DNA regionu promotorowego genu oraz poziom jego ekspresji osiągnął wartości porównywane w obu użytych próbach kontrolnych (komórki linii hodowanej zwykłym medium hodowlanym oraz w medium z dodatkiem kwasu octowego). Tym samym wykazano, że obserwowane zmiany wywołane są wyłącznie działaniem decytabiny (DAC), natomiast kwas octowy nie wpływa na hodowle komórkowe. Analiza wyników oparta została o porównania wyników uzyskanych dla linii indukowanych decytabiną oraz inkubowanych z kwasem octowym.

W pierwszym etapie oceniono zmiany w poziomie globalnej metylacji DNA poprzez analizę poziomu metylacji sekwencji LINE-1. Wykazano, że dla obu linii, globalny poziom metylacji, mierzony jako średnia ze wszystkich analizowanych dinukleotydów CG dla danej próby został obniżony. Spadek poziomu metylacji w linii UT-SCC-29 wynosił 8% w przypadku indukcji 0,3 µM DAC i 12% w linii indukowanej 0,1 µM DAC. Analogiczne porównanie wykonane dla linii UT-SCC-11 wykazało spadek o 19% (0,3 µM DAC) i 21% (0,1 µM DAC). Wykazano tym samym efektywną inhibicję metylacji DNA na skutek działania DAC w analizowanych liniach komórkowych LSCC. Szczegółowe wyniki przedstawione są na Rycinie 24, natomiast wartości liczbowe zebrano w Tabeli 24.

Tabela 24. Analiza zmiany poziomu metylacji DNA sekwencji LINE-1 w liniach komórkowych UT-SCC-11 i UT-SCC-29 pod wpływem decytabiny. CG - poszczególne dinukleotydy CG; DAC 0,1, DAC 0,3 - stężenia DAC zastosowane w teście, odpowiednio: 0,1 i 0,3 μM; AA 0,1, AA 0,3 - próby kontrolne dla odpowiednich stężeń DAC (komórki inkubowane z kwasem octowym); mock - komórki inkubowane w medium bez dodatków; FM - próba kontrolnego DNA w pełni metylowanego; UM - próba kontrolnego DNA niemetylowanego,

	Poziom metylacji DNA poszczególnych dinukleotydów CG [%]				Średnia metylacja sd	Obniżenie poziomu metylacii [%]		
	CG1	CG2	CG3	CG4	[%]		(AA - DAC)	
	UT -SCC-11							
DAC 0,1	13	9	13	16	13	2,87	21	
AA 0,1	43	23	31	40	34	9,17		
DAC 0,3	15	9	13	18	14	3,72	19	
AA 0,3	42	23	31	35	33	8,15		
МОСК	44	24	33	39	35	8,88		
UT-SCC-29								
DAC 0,1	8	6	9	9	8	1,57	10	
AA 0,1	22	15	24	20	20	3,94	12	
DAC 0,3	12	8	13	12	11	2,21	Q	
AA 0,3	21	15	23	19	20	3,77	ð	
МОСК	22	15	24	20	20	3,92		
Kontrole								
FM	84	45	55	56	60	16,81		
UM	2	1	3	5	3	1,56		



Rycina 24. Wykres prezentujący zmiany poziomu metylacji DNA sekwencji LINE-1 w liniach komórkowych UT-SCC-29 i UT-SCC-11 pod wpływem decytabiny. Wyniki przedstawiono jako średnia z dwóch powtórzeń z odchyleniem standardowym. DAC 0,1, DAC 0,3 - stężenia DAC zastosowane w teście, odpowiednio: 0,1 i 0,3 µM; AA 0,1, AA 0,3 - próby kontrole dla odpowiednich stężeń DAC (komórki inkubowane z kwasem octowym); mock - komórki inkubowane w medium bez dodatków; FM - kontrolna próba DNA w pełni metylowanego; UM - kontrolna próba DNA niemetylowanego.

Poziom średniej metylacji DNA regionu promotorowego genu *CEACAM6* w komórkach linii UT-SCC-11 hodowanych w obecności decytabiny obniżył się o 60% niezależnie od zastosowanego stężenia DAC. Jednocześnie zaobserwowano ponad trzykrotny wzrost poziomu ekspresji genu w liniach inkubowanych z decytabiną w odniesieniu do prób kontrolnych. Krotność zmiany wynosiła 3,18 oraz 3,71 odpowiednio dla 0,1 μ M i 0,3 μ M roztworu DAC.

W linii UT-SCC-29 obniżenie średniej metylacji DNA wynosiło odpowiednio 23% oraz 18% dla DAC w stężeniu 0,1 i 0,3 µM. Jak wykazano, w linii tej jeden z dinukleotydów CG nie ulega metylacji (por. rozdział *Wyniki*, podrozdział 4.2.). Dla drugiego dinukleotydu obniżenie poziomu metylacji wynosiło odpowiednio 44% oraz 38%. W linii tej obserwowano wzrost poziomu ekspresji genu *CEACAM6*: 1,71 - krotny

w przypadku linii inkubowanej z 0,1M DAC oraz 3,33 - krotny przy inkubacji w 0,3 μ M roztworze decytabiny.

Wyniki przeanalizowano z wykorzystaniem testu korelacji Pearsona, wykazując silną negatywną korelację (R = -0.9644, p = 0.0082) dla linii UT-SCC-11, lecz brak istotnej korelacji dla linii UT-SCC-29 (R = -0.6456, p = 0.239). Jednakże, należy odnotować, iż jeden z dinukleotydów CG nie ulega metylacji w linii UT-SCC-29, co prawdopodobnie wpływa na obserwowany brak korelacji.

W przedstawionej analizie obserwowano spadek poziomu metylacji DNA regionu promotorowego genu *CEACAM6* oraz podwyższenie jego ekspresji na skutek działania czynnika blokującego metylację DNA - DAC. Poziom ekspresji i metylacji DNA wykazywał silną negatywną korelację w linii UT-SCC-11. Szczegółowe wyniki przedstawiono na Rycinach 25 i 26, natomiast wyniki liczbowe zebrano w Tabeli 25.



Rycina 25. Wykres prezentujący zmiany poziomu metylacji DNA genu *CEACAM6* w liniach komórkowych UT-SCC-29 i UT-SCC-11 pod wpływem decytabiny. Wyniki przedstawiono jako średnia z dwóch powtórzeń z odchyleniem standardowym. DAC 0,1, DAC 0,3 - stężenia DAC zastosowane w teście, odpowiednio: 0,1 i 0,3 μM; AA 0,1, AA 0,3 - próby kontrole dla odpowiednich stężeń DAC (komórki inkubowane z kwasem octowym); mock - komórki inkubowane w medium bez dodatków; FM - próba kontrolnego DNA w pełni metylowanego; UM - próba kontrolnego DNA niemetylowanego.



Rycina 26. Wykres prezentujący zmiany poziomu ekspresji genu *CEACAM6* w liniach komórkowych UT-SCC-29 i UT-SCC-11 pod wpływem decytabiny. Wyniki przedstawiono jako średnia z dwóch powtórzeń z odchyleniem standardowym. DAC 0,1, DAC 0,3 - stężenia DAC zastosowane w teście, odpowiednio: 0,1 i 0,3 μ M; AA 0,1, AA 0,3 - próby kontrolne dla odpowiednich stężeń DAC (komórki inkubowane z kwasem octowym); mock - komórki inkubowane w medium bez dodatków.

Tabela 25. Analiza zmian poziomu metylacji DNA oraz poziomu ekspresji genu *CEACAM6* w liniach komórkowych UT-SCC-11 i UT-SCC-29 pod wpływem decytabiny. Wartości metylacji DNA przedstawione są w procentach. Czerwonym kolorem oznaczono zmianę poziomu metylacji dinukleotydu CG2 w linii UT-SCC-29. DAC 0,1, DAC 0,3 - stężenia DAC zastosowane w teście, odpowiednio: 0,1 i 0,3 μ M; AA 0,1, AA 0,3 - kontrole dla odpowiednich stężeń DAC (komórki inkubowane z kwasem octowym); mock - kontrola inkubowana w medium bez dodatków; FM - kontrolne DNA o pełnej metylacji; UM - kontrolne DNA niemetylowane, sd - odchylenie standardowe.

	Po metyl poszcz dinukl CO	vziom acji DNA ególnych eotydów G [%]	Średnia metylacja [%]	sd	Obniżenie poziomu metylacji [%] (AA - DAC)	Względny poziom ekspresji genu	sd	Krotność zmiany DAC/AA
	CG1	CG2						
				UT-SCC	2-11			
DAC 0,1	27	43	35	11,37	60	3,65	0,67	2 10
AA 0,1	94	97	95	1,76	60	1,15	0,18	5,10
DAC 0,3	30	40	35	7,33	60	4,91	0,92	3,71
AA 0,3	94	96	95	1,58		1,32	0,05	
MOCK	95	96	96	0,81		1,33	0,09	
UT-SCC-29								
DAC 0,1	15	4	9	8,23	23	2,60	0,98	1 71
AA 0,1	59	5	32	38,63	44	1,52	0,48	1,/1
DAC 0,3	21	3	12	12,67	18	6,34	3,24	2 22
AA 0,3	60	2	31	40,57	38	1,90	0,89	3,33
МОСК	62	3	32	42,35		2,43	1,23	
Kontrole								
FM	95	50	72	32,11				
UM	2	2	2	0,32				

Wyniki uzyskane dla wszystkich analiz wykonanych w trakcie przygotowywania niniejszej pracy doktorskiej zebrane są w Tabeli 26. Wyniki badań zmierzających do potwierdzenia onkogennego charakteru genu *CDK1* i supresorowego potencjały *CEACAM6* przedstawiono w Tabeli 27.

Tabela 26. Tabela zbiorcza przedstawiająca wyniki uzyskane w toku wykonywania niniejszej pracy doktorskiej.

	Analizow	Wynik (dla LSCC vs kontrole)	
Technika	Podwyższona ekspresja genu w LSCC Obniżona ekspresja genu w LSCC		
Mikromacierze ekspresyjne	ATAD2, CDK1, LAPTM4B, SERPINH1, SNAI2, NETO2	CEACAM6, CLCA4, FUT3, SFRP2	Zmiana poziomu ekspresji genów w LSCC
PCR w czasie rzeczywistym	ATAD2, CDK1, LAPTM4B, SERPINH1, SNAI2, NETO2	CEACAM6, CLCA4, FUT3, SFRP2	Potwierdzenie zmiany ekspresji genu w LSCC: ATAD2, CDK1, LAPTM4B, SERPINH1, CEACAM6, CLCA4, FUT3
Porównawcza Hybrydyzacja Genomów (a-CGH)	ATAD2, CDK1, LAPTM4B, SERPINH1	CEACAM6, CLCA4, FUT3	Brak zmian liczby kopii DNA genu
Zmiana liczby kopii genu i mutacje <i>in silico</i>	ATAD2, CDK1, LAPTM4B, SERPINH1	CEACAM6, CLCA4, FUT3	Potencjalna amplifikacja genów ATAD2 i LAPTM4B Brak zmian liczby kopii DNA pozostałych genów Brak mutacji DNA
Metylacja DNA regionu promotorowego	ATAD2, CDK1, LAPTM4B, SERPINH1	CEACAM6, CLCA4, FUT3	Hypermetylacja <i>CEACAM6,</i> pozostałe geny - brak zmian
	Selekcja potencjalnego onko		

Tabela 27. Wyniki analiz wykonanych dla genu CDK1 wytypowanego jako potencjalny onkogen i genu CEACAM6 wytypowanego jako potencjalny gen supresorowy.

Technika	Uzyskany wynik			
Potencjalny onkogen: CDK1				
Western blot	Wykazano podwyższony poziom akumulacji białka w LSCC,			
Western blot	Obecne białko w formie ufosforylowanej: phospho T161			
Barwienie immunohistochemiczne	Potwierdzono obecność białka CDK1 w guzach LSCC			
Sakwancianawania tachnika Sangara	Wskazano polimorfizmy: rs1871446 i rs3212319,			
Sekwencjonowanie techniką sangera	Brak zmian częstości ich występowania w grupie LSCC vs populacje fińska i europejska			
Wyciszanie genu techniką siRNA i testy funkcjonalne:	Wyciszenie genu CDK1			
Analiza tempa proliferacji komórek - monitoring	Prak zmian www.chanych ww.ciczoniam.gonu.CDK1			
przyżyciowy	Brak Zinian wywolanych wyciszeniem gena czkr			
Analiza żywotności komórek - test kolorymetryczny	Brak zmian wywołanych wyciszeniem genu CDK1			
Potencjalny gen supresorowy: CEACAM6				
Hamowanie aktywności metylotransferazy DNA	Wykazano obniżenie poziomu metylacji DNA regionu promotorowego genu			
Pirosekwencjonowanie	Wykazano spadek poziomu metylacji DNA regionu promotorowego genu			
PCR w czasie rzeczywistym	Wykazano wzrost poziomu ekspresji genu			

VI. DYSKUSJA

Płaskonabłonkowy rak krtani (LSCC) stanowi poważny problem medyczny i społeczny. Ze względu na słabo specyficzne objawy rozwijającej się choroby jest ona stosunkowo późno rozpoznawana. W związku z tym, leczenie jest wprowadzane wobec zaawansowanej choroby i wymaga drastyczniejszych metod, z laryngektomią całkowitą włącznie. Skutkuje to trudnościami w mówieniu i odżywianiu, co znacznie obniża jakość życia pacjenta. Współczynnik 5-letniego przeżycia wśród pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem krtani utrzymuje się na stosunkowo niskim poziomie 50% [1]. Jednocześnie obserwuje się stały poziom zachorowań i zgonów na przestrzeni lat.

Stworzenie panelu genów o zmienionej ekspresji w nowotworze krtani może uprościć i przyspieszyć stawianie diagnozy. Identyfikacja nowych onkogenów i genów supresji nowotworowej deregulowanych w LSCC może przyczynić się do precyzyjniejszej diagnostyki tych nowotworów. Poznanie korelacji pomiędzy zmianą poziomu ekspresji genu a parametrami określającymi stopień zaawansowania histologicznego i danymi klinicznymi nowotworu/pacjenta może mieć znaczenie w określaniu rokowania dla danego pacjenta, jak choćby ryzyka wystąpienia przerzutów. Ze względu na wysoką heterogenność nowotworów głowy i szyi istotne jest wytypowanie nowych genów - potencjalnych markerów specyficznych dla nowotworu krtani.

Obszarem zainteresowania w niniejszej pracy były geny o istotnie zmienionym poziomie ekspresji w płaskonabłonkowym raku krtani: *ATAD2*, *CDK1*, *CLCA4*, *CEACAM6*, *FUT3*, *LAPTM4B*, *NETO2*, *SERPINH1*, *SFRP2*, *SNAI2*. Zostały one wybrane na podstawie wyników globalnej analizy poziomu ekspresji genów z wykorzystaniem mikromacierzy. W momencie ich selekcji w literaturze brakowało doniesień na temat ich udziału w rozwoju raka krtani. Dla każdego z wybranych genów przeprowadzono analizę poziomu ekspresji genów z wykorzystaniem techniki PCR w czasie rzeczywistym a także wykonano analizę korelacji uzyskanych wyników z parametrami histologiczno-klinicznymi nowotworu. Podjęto także próbę identyfikacji molekularnych mechanizmów prowadzącego do obserwowanych zmian. Wytypowano również po jednym z genów o podwyższonej i obniżonej ekspresji do szczegółowych analiz, w celu doświadczalnego potwierdzenia bądź wykluczenia ich onkogennego lub supresyjnego charakteru.

Geny o podwyższonym poziomie ekspresji w LSCC

Na podstawie analizy wyników uzyskanych z mikromacierzy ekspresyjnej genów: LAPTM4B, ATAD2, CDK1, SERPINH1, SNAI2. wytypowano 6 *NETO2 o* istotnie podwyższonym poziomie ekspresji w LSCC w odniesieniu do grupy kontrolnej złożonej z trzech prób RNA wyizolowanych z tkanek obrębu głowy i szyj wolnych od nowotworu. Aby potwierdzić uzyskane wyniki, wykonano PCR w czasie rzeczywistym (RT-qPCR). Wykorzystując dane uzyskane dla grupy kontrolnej (RNA uzyskane z trzech nienowotworowych tkanek obrębu głowy i szyi), ustalono wartość odcięcia - poziom względnej ekspresji genu, powyżej której zmianę uznawano za istotną i przyjmowano jako potwierdzenie podwyższonej ekspresji genu. W ten sposób wykazano podwyższenie ekspresji 4 genów: LAPTM4B (w 18/25 linii komórkowych), ATAD2 (14/25 linii), CDK1 (9/25 linii) oraz SERPINH1 (1/25 linii). Poziom ekspresji genów: SNAI2 oraz NETO2 we wszystkich analizowanych liniach komórkowych plasował się poniżej wartości odcięcia.

Rozbieżność wyników obu analiz jest prawdopodobnie skutkiem zastosowania różnego zestawu prób kontrolnych, co z uwagi na heterogenność tkanek i narządów zaliczanych do obrębu głowy i szyi może mieć znaczenie. Wykonanie obu analiz z wykorzystaniem tego samego zestawu prób kontrolnych było niemożliwe ze względu na ich ograniczoną dostępność. Odniesienie wyników uzyskanych w reakcji RT-qPCR przeprowadzonej na liniach komórkowych w stosunku tylko do kontrolnego RNA z całkowitej krtani - jedynej wspólnej próby kontrolnej dla mikomacierzy i RT-qPCR - wskazuje na zwiększony poziom ekspresji genów: *ATAD2*, *CDK1*, *LAPTM4B* i *NETO2* w 25/25, *SERPINH1* w 23/25 oraz *SNAI2* w 22/25 analizowanych linii komórkowych. Jednakże, ze względu na kryteria selekcji genów przyjęte w niniejszej pracy, geny *SNAI2* oraz *NETO2* zostały wykluczone z dalszej analizy.

Obserwowana nadekspresja genów w liniach komórkowych raka krtani nie wynikała ze zmian liczby kopii genu. Duplikacja/amplifikacja genu w liniach komórkowych LSCC została wykluczona poprzez analizę z użyciem mikromacierzy opartych o porównawczą hybrydyzację genomów (array-CGH). Wyniki własne uzupełniono o dane dostępne w bazie danych cBioPortal [64], [65], dla dużej grupy pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem głowy i szyi obejmującej 279 próbek HNSCC (w tym: 72 z rakiem krtani). Najczęściej wskazywane aberracje dotyczyły amplifikacji genu *ATAD2* obserwowanej u 7/72 oraz *LAPTM4B* u 3/72 pacjentów z nowotworem

krtani. Wyniki dla liczby kopii DNA genu przedstawione w bazie danych nie są więc zgodne są z wynikami uzyskanymi w niniejszej pracy. Różnice mogą wynikać z różnego podejścia do analizy danych. Baza cBioPortal prezentuje potencjalne zmiany liczby kopii (ang. *putative copy-number alterations*) wyznaczone z pomocą algorytmu GISTIC2.0 (ang. *Genomic Identification of Significant Targets in Cancer*). Algorytm ten analizuje zmiany liczby kopii regionów DNA. W trakcie wykonywania rozprawy analizowano dane z mikromacierzy badając wartości log2ratio dla dokładnie wyznaczonych regionów DNA, w których zlokalizowane są badane geny. W takim ujęciu, podejście zastosowane w pracy pozwala na precyzyjniejsze oszacowanie liczny kopii DNA badanego genu. Tym niemniej, amplifikacja może być potencjalnym mechanizmem prowadzącym do nadekspresji genów *ATAD2* i *LAPTM4B* w płaskonabłonkowym raku krtani.

W oparciu o dane dostępne w bazie cBioPortal przeprowadzono także analizę *in silico* sekwencji DNA pod kątem występowania potencjalnych mutacji aktywujących. Wykazano obecność mutacji wpływającej na zmianę sekwencji lub długości produktu białkowego. Mutacje tego typu występują w niskim procencie w analizowanej grupie pacjentów (0,4 - 1,8% przypadków co odpowiada 1 - 5 pacjentom). Również dane zawarte w bazie COSMIC wskazują na niski procent występowania mutacji w analizowanych genach: mutację zmiany sensu obecną w genie *NETO2* wykazano w 1/26 prób płaskonabłonkowego raka krtani. Pozwala to na założenie, że w przypadku nowotworów głowy i szyi, amplifikacje i mutacje badanych genów nie mogą być uznawane za główne mechanizmy powodujące ich nadekspresję.

Przeanalizowano także poziom metylacji DNA regionów promotorowych wybranych genów w poszukiwaniu hipometylacji w liniach komórkowych LSCC. Obniżony poziom metylacji w kontekście nowotworów najczęściej rozpatrywany jest jako mechanizm dotyczący części pozagenowej genomu, prowadzący do niestabilności genomowej na skutek aktywacji retrotranspozonów oraz sekwencji powtarzających się [23], [24]. Globalną hipometylację genomu prowadzącą do aktywacji onkogenów potwierdzono w przewlekłej białaczce limfocytowej (CLL), raku jelita grubego i piersi [80], [81]. Hipometylacja regionów promotorowych może stanowić także jeden z mechanizmów aktywacji onkogenów [82]. Jednakże jak wykazano w toku badań prowadzonych w niniejszej pracy doktorskiej, w przypadku wszystkich badanych genów poziom metylacji w liniach komórkowych jest porównywalny z kontrolnymi próbami DNA z wymazów z wnętrza policzka. W związku z tym, mechanizm

prowadzący do podwyższenia ekspresji analizowanych genów pozostaje w dalszym ciągu niewyjaśniony. Przyczyną obserwowanych zmian może być zwiększona ekspresja bądź podwyższona aktywność genów indukujących geny badane w pracy, takich jak wzmacniacze transkrypcji (enhancery) czy czynniki transkrypcyjne. Wpływ mogą mieć także czynniki epigenetyczne inne niż metylacja DNA: acetylacja histonów, czy obniżona ekspresja mikroRNA oddziałującego z genami.

Wyniki analizy poziomu ekspresji uzyskane dzięki RT-qPCR poddano analizie statystycznej (test U Manna-Whitney'a). Wykazano istotne statystycznie podwyższenie ekspresji genów *LAPTM4B*, *ATAD2* i *CDK1* w liniach komórkowych (n = 25) w porównaniu do grupy kontrolnej (n = 3), (U-test, odpowiednio: p = 0,003, p = 0,001, p = 0,016). Zmiana poziomu ekspresji wymienionych genów w stosunku do grupy kontrolnej obserwowana była zarówno w liniach komórkowych wyprowadzonych z guzów pierwotnych (n = 16, odpowiednio wartości p = 0,002, p = 0,002, p = 0,033) jak i wznów (n = 8, odpowiednio: p = 0,048, p = 0,024, p = 0,024). Poziom ekspresji genu *SERPINH1* nie wykazywał różnic istotnych statystycznie pomiędzy badanymi liniami komórkowymi a liniami kontrolnymi (p = 0,07).

Podwyższony poziom ekspresji genu LAPTM4B zaobserwowano w guzach wysoko zróżnicowanych (stadium G1 i G2, n = 20, p = 0,001), ale nie nisko zróżnicowanych (G3, n = 5, p = 0.143) w odniesieniu do grupy kontrolnej (n = 3). Jednocześnie obniżenie ekspresji genu względem prób kontrolnych obserwuje się w liniach komórkowych niezależnie od parametrów opisujących wielkość guza (T) czy stopień zaawansowania wezłowego (N). Może to świadczyć o potencjalnej roli genu LAPTM4B na wczesnych etapach procesu nowotworzenia, związanego z różnicowaniem komórek w obrębie objętym procesem nowotworowym. Jednocześnie zmiana utrzymuje się przez kolejne stadia choroby. Jak wykazano, gen ten zaangażowany jest w proces autofagocytozy: jedną z reakcji komórki na stres i niedobory pokarmowe. Komórki nowotworowe wykorzystują ten proces jako sposób na uzyskanie źródła dodatkowej energii pozwalającej na rozwój nowotworu, zapobiegając wejściu w stan anoikis, co ułatwia przetrwanie po odłączeniu od macierzy zewnątrzkomórkowej i tworzenie przerzutów [83]. Jak wykazano, nadekspresja genu LAPTM4B w komórkach nowotworowych wpływa na żywotność komórek poprzez zwiększenie tolerancji na stres, wzmożoną autofagocytozę, blokowanie ścieżek apoptotycznych wykorzystujących lizosomy [84], [85]. Możliwe jest więc, że zwiększenie ekspresji genu LAPTM4B we wczesnych stadiach nowotworzenia pozwala na rozwój komórek

nowotworowych dzięki ominięciu systemów obronnych komórki. Wykazano także pozytywną korelację ekspresji *LAPTM4B* i receptora nabłonkowego czynnika wzrostu - *EGFR* [86] w raku żołądka. Sugeruje się tym samym pośrednią rolę LAPTM4B w aktywowaniu EGFR [87], co może stymulować rozwój nowotworu. Co istotne, u pacjentów z gruczolakorakiem płuc (lung adenocarcinoma) zaobserwowano dodatnią korelację ekspresji genu z paleniem tytoniu [88] - jedną z głównych przyczyn rozwoju raka krtani.

Poziom ekspresji genu *ATAD2* był istotnie podwyższony w LSCC (p<0,05), niezależnie od parametrów histopatologicznych nowotworu. To sugeruje jego zaangażowanie w proces nowotworzenia na wszystkich jego etapach. Gen ten stanowi kofaktor dla onkogenu *MYC* przyczyniając się do gorszego rokowania, w tym obniżonego czasu przeżycia pacjentów. Podwyższona ekspresja genu związana jest agresywnymi nowotworami piersi [89], endometrium [90] oraz nerki [91]. W niniejszej pracy nie zaobserwowano korelacji ekspresji genu *ATAD2* z czasem przeżycia pacjentów, od których wyprowadzono linie komórkowe. Jednakże, badania przedstawione w cytowanych publikacjach obejmują większe grupy badane (55 i więcej próbek), co w porównaniu z 25 próbami analizowanymi w niniejszej pracy może mieć istotne znacznie.

Reasumując, w niniejszej pracy wykazano istotnie podwyższony poziom ekspresji genów *LAPTM4B*, *ATAD2* i *CDK1* w LSCC w odniesieniu do grupy nienowotworowych tkanek kontrolnych z obrębu głowy i szyi. Ponieważ znacząco podwyższony poziom ekspresji genów obserwowany jest w liniach wyprowadzonych z guzów o niskim stopniu zaawansowania oraz guzów pierwotnych, mogą one potencjalnie znaleźć zastosowanie w diagnostyce nowotworu krtani.

Potencjalny onkogen LSCC - CDK1

Gen *CDK1* został wytypowany jako potencjalny onkogen w LSCC ze względu na jego nadekspresję obserwowaną w LSCC a także na podstawie funkcji jaką pełni w komórkach. Jego najważniejsza rola polega na regulowaniu poszczególnych faz cyklu komórkowego. Stanowi podjednostkę katalityczną kompleksu MPF (ang. *Maturation Promoting Factor*) stymulującego podziały komórkowe: mitozę i mejozę. Kompleks ma zdolność fosforylacji szeregu białek umożliwiających progresję cyklu komórkowego, w tym białek odpowiedzialnych za tworzenie i rozpad wrzeciona kariokinetycznego, kondensację chromosomów (fosforylacja histonów H1), rozpad otoczki jądrowej i błon retikulum endoplazmatycznego (fosforylacja lamin) oraz fragmentację aparatów Golgiego [92]. Ponadto wykazano interakcję CDK1 z czynnikami transkrypcyjnymi (miedzy innymi POU5F1) oraz modulatorami epigenetycznymi (enzym EZH2 metylotransferaza wchodząca w skład kompleksu regulatorowego Polycomb, metylująca lizyny histonu H3 w pozycjach K27 i K9) [93].

O istotności tego genu dla funkcjonowania komórki świadczy fakt, iż kodowana przez niego kinaza zależna od cyklin jest jedyną kinazą wystarczającą do wejścia komórki w stan mitozy [42]. W przeciwieństwie do pozostałych białek z rodziny CDK, funkcje CDK1 nie mogą być przejęte przez inne białka. Jednocześnie CDK1 może przejmować funkcje innych białek interfazowych z rodziny CDK: CDK2, CDK4, CDK6 tworząc funkcjonalne kompleksy z odpowiednimi cyklinami [42], [94]. W mysich zarodkach pozbawionych genu *CDK1* podziały komórkowe ustają we wczesnych etapach rozwoju blastocysty: poniżej 10 dnia rozwoju zarodkowego [95]. Myszy, u których gen *CDK1* został warunkowo wyłączony (ang. *conditional knockout*) są żywe, jednakże zauważono, że komórki narządów z wyłączonym genem nie są zdolne wejść w stadium mitozy. Komórki wątroby z warunkowo wyłączonym *CDK1* zatrzymują się w fazie G2 cyklu komórkowego [95], natomiast w komórkach jajnika oocyty pozbawione genu zatrzymują się w profazie pierwszego podziału mejotycznego, na skutek czego myszy pozostają bezpłodne [96].

Onkogenny charakter innych kinaz serynowo - treoninowych, do których zaliczany jest gen *CDK1*, takich jak *PIM-1* czy *C-RAF*, postulowany był wcześniej w innych nowotworach [97]-[99], co dodatkowo sugeruje istotną rolę tej grupy genów w procesie kancerogenezy.

Uzyskane w toku niniejszej pracy wyniki wskazują na udział genu *CDK1* w rozwoju i przebiegu płaskonabłonkowego raka krtani. Jak już wspomniano powyżej, podwyższona ekspresja genu wykazana została w analizie z wykorzystaniem mikromacierzy a następnie potwierdzona poprzez PCR w czasie rzeczywistym. Ponadto, wykazano, że w odniesieniu do grupy kontrolnej ekspresja genu była wyższa zarówno w liniach wyprowadzonych z guzów pierwotnych jak i wznów. Jako że wzrost ekspresji genu w liniach komórkowych w porównaniu z grupą kontrolną obserwowano niezależnie od wielkości guza, zdolności do tworzenia przerzutów (wg klasyfikacji TNM) oraz stopnia zróżnicowania komórek (G), wydaje się, że nadekspresja *CDK1* występuje już na wczesnych etapach nowotworzenia i utrzymuje się w trakcie progresji.

Podobne wyniki - nadekspresję genu *CDK1* w nowotworze krtani w odniesieniu do tkanki otaczającej przedstawiono już wcześniej [100]. W cytowanej pracy, podobnie jak w niniejszej rozprawie doktorskiej, nie zaobserwowano istotnego związku pomiędzy poziomem ekspresji genu *CDK1* (analizowanego z wykorzystaniem mikromacierzy) a zdolnością do tworzenia przerzutów. Także w innego typu nowotworach odnotowano nadekspresję genu *CDK1*. Postuluje się udział *CDK1* w rozwoju między innymi płaskonabłonkowego raka jamy ustnej [101], nowotworu piersi [102], nabłonkowego raka jajnika [103].

W celu potwierdzenia zmian ekspresji genu obserwowanych na poziomie mRNA, wykonano dwie analizy poziomu akumulacji białka CDK1 w komórkach LSCC. Stosując technikę Western blot wykazano obecność białka we wszystkich analizowanych liniach komórkowych. W tkankach kontrolnych (prawidłowa tkanka całej krtani oraz nabłonek krtani) nie obserwowano obecności białka lub występowało ono w ilości śladowej. Zastosowano także przeciwciało przeciwko białku CDK1 ufosforylowanemu w pozycji 161 treoniny potwierdzając jego obecność w 22/24 badanych linii komórkowych LSCC. Sugeruje to, że badane białko posiada aktywność kinazy, aczkolwiek, do jej jednoznacznego potwierdzenia wymagane są inne analizy, takie jak: potwierdzenie defosforylacji w białka w pozycjach 14 treoniny i 15 tyrozyny, obecność kompleksu CDK1-Cyklina B.

Dodatkowo wykonano barwienie immunohistochemiczne mające na celu uwidocznienie lokalizacji białka CDK1 w guzach pierwotnych LSCC (materiale klinicznym) w postaci bloczków parafinowych. Analiza akumulacji białka CDK1 wykazała jego obecność zarówno w tkankach nowotworowych, jak i materiale kontrolnym. Stwierdzono zróżnicowaną lokalizację białka CDK1 w skrawkach na obszarze zajętym przez LSCC. Białko CDK1 jako związane z proliferującymi komórkami występuje głównie w komórkach dzielących się [103]. Krtań pokryta jest nabłonkiem wielowarstwowym płaskim nierogowaciejącym i nabłonkiem walcowatym migawkowym typu oddechowego [104]. Najintensywniejsza proliferacja zachodzi w komórkach warstwy podstawnej - najgłębiej położonej warstwy nabłonka. W związku z tym, w tkankach kontrolnych białko uwidocznione było w postaci jednolitego pasma utworzonego przez komórki walcowate. W komórkach kolejnych (bardziej zewnętrznych) warstw i poza warstwą nabłonka kumulacja białka CDK1 była zdecydowanie niższa. W analizowanych skrawkach uzyskanych od pacjentów w

utkaniu guza, warstwowa budowa nabłonka ulega zaburzeniu, stąd intensywnie dzielące się komórki nowotworowe rozproszone są w całym obszarze.

Sprzeczność wyników uzyskanych dla prób kontrolnych użytych w obu technikach (Western blot i IHC) można wytłumaczyć także różnicami w sposobie ich uzyskania jak na przykład sposób cięcia fragmentu tkanki. W zależności od liczby komórek pochodzących z warstwy podstawnej nabłonka, udział komórek dzielących się może się różnić. Próby kontrolne dostępne do wykonania Western blot pochodziły od osób zdrowych, bez cech nowotworowych. W lizatach uzyskanych z krótkotrwałej hodowli bądź też bezpośrednio z nabłonka krtani śladowe ilości białka były widoczne. Skrawki tkanek użyte do analizy IHC stanowiły marginesy pooperacyjne nabłonka krtani, pobrane minimum 2 cm od utkania guza, a więc tkanki precyzyjnie wyselekcjonowanej przed analiza; jednak był to fragment tkanki narządu objętego procesem nowotworowym. Zostało udowodnione, iż marginesy operacyjne, nawet o potwierdzonym histopatologicznie nienowotworowym charakterze, stanowią miejsce akumulacji wielu mutacji, a w konsekwencji zaburzonej/zmienionej ekspresji białek. Białko CDK1 może być obecne w marginesach operacyjnych, a nawet charakteryzować się nadekspresją prowadzącą do wznowy [105], [106]. Fakt, iż komórki nowotworowe obecne są w prawidłowym histologicznie nabłonku narządów głowy i szyi zaobserwował już 1953 D. Slaughter [107]. Stworzył on podwaliny teorii (ang. field cancerization) - niezależnego kancerogenezy płaszczyznowej wieloogniskowego powstawania nowotworu, prowadzącego do częstego tworzenia wznów i drugich pierwotnych nowotworów. Z biegiem lat teoria ta ulegała modyfikacjom wraz z rozwojem technik biologii molekularnej [108], jednak możliwość występowania w marginesie operacyjnym i poza nim komórek mogących zainicjować rozwój nowego nowotworu jest bezsprzecznie przyjmowana przez badaczy nowotworów głowy i szyi.

Aby wyjaśnić mechanizm prowadzący do obserwowanej nadekspresji genu *CDK1* w płaskonabłonkowym raku krtani, przeanalizowano wyniki uzyskane z mikromacierzy opartej o porównawczą hybrydyzację genomów (Array-CGH). Wykazano brak zmian liczby kopii DNA genu dla wszystkich analizowanych linii komórkowych, wykluczając w ten sposób obecność duplikacji lub amplifikacji genu. Wyniki te zgodne są z danymi dostępnymi w bazie cBioPortal, gdzie jedyna zmiana liczby kopii - amplifikacja genu - obserwowana była u 2/279 (0,7%) pacjentów z HNSCC – obaj pacjenci zdiagnozowani byli jako chorzy na nowotwór inny niż rak krtani. Następnie przeanalizowano poziom

metylacji DNA regionu promotorowego genu. Jak wykazano, poziom metylacji DNA obserwowany zarówno dla linii komórkowych wyprowadzonych z LSCC jak i guzów pierwotnych jest na niskim poziomie, porównywalnym z badanymi nienowotworowymi próbami kontrolnymi obrębu głowy i szyi. Wykluczono w ten sposób hipometylację DNA jako mechanizm aktywujący gen.

Kolejne podejście stanowiła próba identyfikacji mutacji aktywującej gen. Poprzez wykonanie sekwencjonowania techniką Sangera wykryto dwa polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP). Pierwszy, rs1871446 zlokalizowany był w obrębie 3'UTR (chr10:62553763-62553763, GRCh37/hg19). W przypadku 20/25 linii komórkowych LSCC występował genotyp homozygotyczny allelu macierzystego a w 4 kolejnych - w genotyp heterozygotyczny. Próba porównania poziomu ekspresji genu *CDK1* w liniach komórkowych różniących się wariantem polimorfizmu nie powiodła się ze względu na zbyt małą grupę linii w których zidentyfikowano genotyp homozygotyczny allelu macierzystego. Jednocześnie wg bazy danych 1000 Genomes, częstości alleli dla badanych linii komórkowych są identyczne jak w populacji fińskiej (A: 0,12, G: 0,88) i porównywalne do częstości obserwowanej w populacji europejskiej, odpowiednio: A: 0,21, G: 0,79. Nie obserwowano także różnic w rozkładzie alleli i genotypów polimorfizmu w liniach komórkowych LSCC w porównaniu do grup populacyjnych. W związku z powyższymi danymi, uznano, że polimorfizm rs1871446 nie wpływa na patogenezę LSCC.

Drugi ze zidentyfikowanych polimorfizmów CDK1: rs3212319 (chr10:62551816-62551816, GRCh37/hg19) to delecja cytozyny w pozycji +5 intronu 6. Spośród badanych linii zmiana występowała w 13/25 linii komórkowych w układzie natomiast w 2/25 heterozygotycznym linii komórkowych wykryto delecje homozygotyczna. Częstości poszczególnych alleli w badanych liniach komórkowych LSCC (GC: 0,66, G-: 0,34) były porównywalne z częstościami obserwowanymi zarówno dla populacji fińskiej (GC: 0,58, G-: 0,42) jak i europejskiej (GC: 0,64, G-: 0,36). Nie obserwowano różnic w rozkładzie alleli i genotypów polimorfizmu w badanych liniach komórkowych LSCC w porównaniu do żadnej z grup populacyjnych. Analiza statystyczna nie wykazała istotnej korelacji pomiędzy ekspresją genu a obecnością zidentyfikowanych polimorfizmów (test U Manna-Whitney'a, p = 0.88). Polimorfizm rs3212319 stanowi wariant regionu splicingowego i może wpływać na prawidłowe składanie produktu białkowego genu. Aby sprawdzić, czy delecja wpływa na wielkość białka wykonany został Western blot z wykorzystaniem

przeciwciała skierowanego przeciwko końcowi N białka. Pozwoliło to na ewentualną detekcję zarówno formy prawidłowej, jak i skróconej na skutek delecji. Jednakże w żadnej z analizowanych linii komórkowych nie wykryto skróconej formy białka. W liniach komórkowych, w których wykazano genotyp homozygotyczny allelu macierzystego polimorfizmu w analizie Western blot wykazano obecność białka prawidłowej wielkości, co dodatkowo sugeruje brak wpływu polimorfizmu na długość kodowanego białka.

Analizy mające na celu ustalenie przyczyny obserwowanej nadekspresji genu *CDK1* w liniach komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani nie pozwoliły na wytypowanie jednego mechanizmu molekularnego. Być może, jak w przypadku pozostałych genów analizowanych w niniejszej pracy, powodem obserwowanej zmiany jest nadekspresja innych genów wpływających na *CDK1* lub zmiany epigenetyczne inne niż metylacja DNA.

Często występujący w nowotworach podwyższony poziom ekspresji genu *CDK1* oraz rola jaką pełni w komórce predysponuje go jako potencjalny cel dla terapii celowanej. Inaktywacja genu *CDK1* ma także dodatkowe znaczenie w terapii przeciwnowotworowej. Potwierdzono związek pomiędzy obniżeniem ekspresji genu *CDK1* a wrażliwością na cisplatynę - jeden z ważniejszych leków stosowanych w leczeniu nowotworów głowy i szyi. Po wyciszeniu genu z użyciem siRNA oraz roskowityny zaobserwowano obniżoną proliferację komórek złośliwego międzybłoniaka opłucnej wraz ze zwiększoną wrażliwością na cisplatynę [109]. Także komórki nabłonkowego raka jajnika wykazują wyższą podatność na działanie cisplatyny po wyciszeniu genu *CDK1* z zastosowaniem shRNA [103].

W niniejszej pracy przeanalizowano wpływ wyciszenia genu *CDK1* w płaskonabłonkowym raku krtani na ekspresję innych genów - potencjalnie zależnych od *CDK1* oraz proliferację i żywotność komórek. Jak dotąd, badania takie nie były prowadzone w raku krtani.

Do analizy skutków wyciszenia genu *CDK1* z użyciem siRNA w LSCC wytypowano trzy linie komórkowe różniące się poziomem ekspresji genu: UT-SCC-34 (poziom ekspresji genu poniżej wartości odcięcia ustalonej na podstawie ekspresji *CDK1* w grupie nienowotworowych kontroli), UT-SCC-107 (poziom ekspresji powyżej wartości odcięcia) oraz UT-SCC-106A (najniższa ekspresja genu). W pierwszym etapie dwie linie komórkowe: UT-SCC-34, UT-SCC-107 poddano przejściowej transfekcji a RNA z nich wyizolowane przeanalizowano z użyciem mikromacierzy ekspresyjnej.

Wytypowano 157 genów o dwukrotnie podwyższonym lub obniżonym poziomie ekspresji w liniach komórkowych LSCC poddanych wyciszeniu genu CDK1 w porównaniu z linią kontrolną (ta sama linia komórkowa transfekowana dupleksem siRNA o sekwencji nonsensownej). Spośród nich wybrano geny, których zmianę poziomu ekspresji potwierdzano poprzez RT-qPCR. Geny te zostały wyselekcjonowane w oparciu o dane uzyskane dzięki analizom z użyciem narzędzi bioinformatycznych. Pierwszą grupę stanowiły geny wchodzące wspólnie z CDK1 w szlaki sygnałowe (według bazy danych STRING, FDR<0,05): ścieżka sygnałowa, w której bierze udział receptor Fc (geny: CDC42, CDK1, DOCK1, ERBB2, FYN, MYO1C, PTK2, TSC2, WASF2) oraz ścieżka sygnałowa z udziałem receptora naczyniowego czynnika wzrostu śródbłonka (CDC42, CDK1, DOCK1, FYN, PTK2, SHB, WASF2). Dodatkowo wykazano zaangażowanie genów: CDC42, DOCKI, FYN, MYOIC, PTK2, WASF2 w ścieżkę sygnałową związana z fagocytozą, w której bierze udział receptor Fc-gamma. Spośród wymienionych genów, ekspresja CDC42, DOCK1, FYN, była podwyższona w liniach komórkowych z wyciszonym genem CDK1, podczas gdy ekspresja pozostałych genów uległa obniżeniu. Drugą grupę genów analizowanych poprzez RTqPCR składała się z czternastu genów (białek) potencjalnie oddziałujących z CDK1. Dla dziewięciu z genów: HIST1H1C, HIST1H2BJ, MYBL2, RUNXI, SMARCA4, SMC1A, TMEM67, TSC2, UBE2I, obserwowano spadek poziomu ekspresji. Poziom ekspresji pozostałych pięciu: CALD1, CDC42, CDK6, FYN oraz HELLS był podwyższony w liniach poddanych wyciszaniu genu CDK1.

Poprzez analizę RT-qPCR potwierdzono podwyższenie poziomu ekspresji dla genów *CDK6* i *FYN* we wszystkich trzech analizowanych liniach komórkowych LSCC oraz *CALD1* w liniach UT-SCC-34 i UT-SCC-107. Wykazano także obniżenie ekspresji genów *HIST1H1C* w linii UT-SCC-34, *HIST1H2BJ* w liniach UT-SCC-34 i UT-SCC-107, *MYO1C* we wszystkich trzech analizowanych liniach komórkowych, *RUNX1* w linii UT-SCC-106A oraz *SHB* w linii UT-SCC-34. Wyniki uzyskane dla pozostałych genów nie potwierdziły zmian poziomu ekspresji obserwowanego w badaniu z wykorzystaniem mikromacierzy. Nie potwierdzono tym samym istotnego wpływu *CDK1* na analizowane ścieżki sygnałowe.

Wykorzystując bazę danych STRING ponownie przeanalizowano interakcje pomiędzy genami *CALD1*, *CDK6*, *FYN*, *HIST1H1C*, *HIST1H2BJ*, *MYO1C*, *RUNX1*, *SHB* i *CDK1*. Nie obserwowano istotnego wzbogacenia funkcjonalnego dla grupy analizowanych genów, gdy analizowano wszystkie geny oraz gdy grupę ograniczono do genów o obniżonej ekspresji. Dla wszystkich genów o podwyższonej ekspresji wykazano istotne wzbogacenie funkcjonalne w zakresie organellum komórkowego - powiązanie z cytoszkieletem komórkowym a także domen białkowych i funkcji molekularnych: obecność domen kinaz białkowych i kinazopodobnych (CDK6, FYN) oraz aktywność białkowej kinazy serynowej (CDK6). Uzyskane w tej części pracy wyniki sugerują istotny, bezpośredni wpływ obniżenia ekspresji *CDK1* na wzrost ekspresji genów *CALD1*, *CDK6* oraz *FYN*.

Należy jednak zauważyć, iż w badaniach wykonywanych w ramach niniejszej pracy skupiono się wyłącznie na genach bezpośrednio oddziałujących z genem CDK1 badź wchodzących z nim we wspólne szlaki sygnałowe. Nie można zatem wykluczyć, że zmiana poziomu ekspresji pozostałych genów jest pośrednim skutkiem wyciszenia genu CDK1. Analiza sieci interakcji między białkami jaka uzyskano dzięki bazie danych STRING na etapie selekcji genów potencjalnie zależnych od CDK1 potwierdziła złożoność interakcji między białkami kodowanymi przez geny o zmienionym poziomie ekspresji w analizowanych liniach komórkowych (Rycina 18). Dane literaturowe wskazują, iż CDK1 oddziałuje z szerokim spektrum genów/białek. W komórkach drożdzy (Saccharomyces cerevisiae) wykazano interakcję Cdk1 z 75 genami [43], u człowieka - z 213 genami (baza danych bioGRID, stan z dnia 01.12.2017). Biorac pod uwagę ten fakt a także złożoność szklaków sygnałowych możliwe jest, iż przynajmniej część z genów pominiętych w niniejszej rozprawie jest warta uwagi w badaniach prowadzonych w przyszłości.

Aby przeanalizować rolę genu *CDK1* pełnioną w komórkach nowotworowych oraz zweryfikować jego potencjalnie onkogenny charakter w nowotworze krtani, wykonano testy funkcjonalne z użyciem linii komórkowych LSCC. Wykorzystano dwa testy: kolorymetryczny do analizy żywotności komórek oraz monitoring przyżyciowy do badania proliferacji komórek raka krtani po wyciszeniu genu *CDK1*. Pomimo znacznego wyciszenia ekspresji genu *CDK1* (ponad 50%) nie wykazano istotnych zmian w żywotności komórek ani tempie ich proliferacji. Aby potwierdzić właściwy dobór testów do analizy i warunków ich przeprowadzenia wykonano analogiczne analizy z wykorzystaniem linii komórkowej HeLa (linia komórkowa wywodząca się z raka szyjki macicy). W badaniu tym wykazano istotne obniżenie żywotności komórek poddanych wyciszaniu (Suplement 1). Tym samym wykazano, że wyniki uzyskane dla linii komórkowych LSCC są specyficzne dla raka krtani.

Wyniki testów funkcjonalnych uzyskane w toku analiz opartych o wyciszanie genu *CDK1* w liniach komórkowych LSCC można wyjaśnić na kilka sposobów. Jednym z nich może być zbyt niski stopień wyciszenia genu. Pomimo, iż ekspresja *CDK1* po zastosowaniu dupleksu siRNA wyciszającego gen została znacznie obniżona, to jednak poziom aktywności genu był wystarczający do utrzymania procesów proliferacji i żywotności na niezmienionym poziomie w LSCC. Dodatkowo, obniżenie ekspresji *CDK1* mogłoby być, w pewnym stopniu, kompensowane poprzez podwyższenie poziomu ekspresji innych genów. Jak wykazano, geny o podwyższonym poziomie ekspresji w liniach komórkowych poddanych wyciszaniu *CDK1: CDK6, CALD1, FYN* zaangażowane są w regulację cyklu komórkowego. Jednakże ich aktywność przypada w innych jego punktach.

Geny *CDK6* i *FYN* należą do kinaz białkowych. *CDK6* (ang. *Cyclin Dependent Kinase 6*), podobnie jak *CDK1* jest białkową kinazą serynowo - treoninową. Białko CDK6 stanowi katalityczną podjednostkę kompleksu białkowego odpowiedzialnego za progresję fazy G1 oraz przejście fazy G1 w S w trakcie cyklu komórkowego. Podjednostką regulatorową kompleksu jest cyklina D. Kompleks ten pełni istotną rolę w regulacji cyklu komórkowego i proliferacji. Wykazano, że odpowiada on za inaktywację białka RB poprzez jego monofosforylację we wczesnej fazie G1 cyklu komórkowego. W późnej fazie G1 aktywowane zostają kolejne kompleksy białkowe: Cyklina E-CDK2 oraz Cyklina A-CDK2, które odpowiadają za dopełnienie fosforylacji białka RB w pozostałych miejscach fosforylacji. W efekcie RB ulega inaktywacji i komórka może wejść w fazę S cyklu komórkowego [110], [111].

Gen *FYN* (ang. *FYN proto-oncogene*, *Src family tyrosine kinase*) jest protoonkogenem z rodziny Src białkowych kinaz tyrozynowych, zaliczanych do kinaz niereceptorowych. Białka te zaangażowane są w procesy proliferacji, migracji, inwazji i adhezji komórek a także w podziały komórkowe [112], [113]. Jak wykazano, białko FYN zlokalizowane jest w mikrotubulach wrzeciona kariokinetycznego w trakcie podziałów mitotycznych i mejotycznych, wpływa na zwiększoną polimeryzację mikrotubul oraz ich stabilizację, dzięki czemu przyspiesza progresję fazy M cyklu komórkowego. Za fosforylację aktywującą białko w trakcie mitozy odpowiada CDK1 [114]-[116]. Dodatkowo udowodniono, że ekspresja genu *FYN* wzrasta ponad 100krotnie w linii komórkowej ludzkich keratynocytów po transdukcji konstrukcją z genem H-Ras na skutek aktywacji ścieżki sygnałowej Ras/PI3K/Akt. Nadekspresja genu przyczynia się do zwiększenia zdolności komórek do migracji i inwazji [117].

Gen *CALD1* (ang. *Caldesmon 1*) koduje białko kaldesmon. Dzięki możliwości wiązania się z miozyną, tropomiozyną, kalmoduliną i aktyną funkcjonuje jako regulator skurczu mięśni gładkich i ruchu w komórkach niemięśniowych. Poprzez oddziaływania i reorganizację cytoszkieletu aktynowego wpływa na migrację, adhezję, inwazję i proliferację komórek [118]. Kaldesmon fosforylowany jest przez CDK1 w kompleksie z cykliną A2 i B1 oraz, w mniejszym stopniu, CDK2 z cyklinami A2 i E1. Oddziaływanie z kaldesmonu z CDK1, podobnie jak kompleksu CDK6 z cykliną K, umożliwia rozłączenie mikrofilamentów w trakcie mitozy [119].

Inną przyczyną braku zmian proliferacji i żywotności komórek po wyciszeniu genu CDK1 może być kontekst genetyczny-inne zmiany występujące w genomie analizowanych linii komórkowych. Jako przykład takiej interakcji może służyć zależność poziomu ekspresji genu MYC. W liniach od komórkowych charakteryzujących się podwyższoną ekspresji genu MYC po wyciszaniu genu CDK1 z wykorzystaniem siRNA lub związków chemicznych, takich jak RO-3306 czy CGP74514A obserwowano znaczaco zwiększoną apoptozę i obniżoną żywotność komórek linii komórkowych raka piersi [120], [121]. Wykazano wpływ blokowania genu przez niskocząsteczkowe inhibitory kinaz zależnych od cyklin takich jak roskowityna i purvalanol A. Obniżenie ekspresji CDK1 prowadzi wówczas do obniżenia ekspresji genu *BIRC5* kodującego surwiwinę - inhibitor apoptozy fosforylowany przez CDK1, co prowadzi do indukcji apoptozy komórek, w których występowała nadekspresja genu MYC [122]. Dodatkowo, wrażliwość na inhibitory genów z rodziny CDK jest proporcjonalna do poziomu ekspresji MYC. Prawidłowość tę zauważył zespół kierowany przez Gogę zarówno dla nietransformowanych fibroblastów, komórek nabłonkowych jak i różnego typu nowotworów [122]. W badaniach prowadzonych w ramach niniejszej pracy nie analizowano szczegółowo korelacji poziomu ekspresji CDK1 i MYC, ponieważ analiza mikromacierzy ekspresyjnych nie wskazywała na podwyższoną ekspresję genu MYC w liniach komórkowych LSCC (Suplement 2). Z kolei jak wykazała grupa badaczy pod kierunkiem Xiao, zastosowanie siRNA do wyciszenia genu CDK1 w linii komórkowej HeLa nie wywołało wzmożonej apoptozy a jedynie spowodowało zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M cyklu komórkowego [123].

W celu dokładniejszej analizy roli genu *CDK1* w rozwoju nowotworu, należałoby prześledzić skutki jego indukowanej nadekspresji w liniach komórkowych prawidłowego (nienowotworowego) nabłonka lub modelu mysim.

Uzyskane w toku badań w ramach niniejszej pracy wyniki nie potwierdziły wpływu genu *CDK1* na tempo proliferacji oraz żywotność komórek nowotworowych pochodzących z linii komórkowych raka krtani. Tym samym, gen nie może zostać uznany za onkogen zaangażowany w rozwój płaskonabłonkowego raka krtani.

Geny o obniżonym poziomie ekspresji w LSCC

Analiza wyników uzyskanych z mikromacierzy ekspresyjnej pozwoliła na wybranie 4 genów o istotnie obniżonym poziomie ekspresji w LSCC: *CLCA4*, *CEACAM6*, *FUT3* oraz *SFRP2*. Obserwowaną zmianę potwierdzono poprzez RT-qPCR w 22/25 (*CLCA4*) 18/25, (*FUT3*), 14/25 linii komórkowych (*CEACAM6*). Poziomu ekspresji genu *SFRP2* nie udało się zanalizować pomimo użycia trzech par starterów o różnej lokalizacji. Sekwencje jednej z par starterów pochodziły z publikacji [63]. Produktu PCR nie uzyskano zarówno w próbkach analizowanych linii komórkowych jak i próbkach kontrolnych obrębu głowy i szyi. Dodatkowa analiza wykonana z wykorzystaniem zestawu prób cDNA uzyskanych linii komórkowych innych niż LSCC oraz limfocytów krwi obwodowej potwierdziła prawidłową optymalizację warunków reakcji. W związku z niemożnością przeprowadzenia reakcji RT-qPCR z użyciem badanego materiału, gen *SFRP2* został wykluczony z dalszej analizy.

Wykonano analizy zmierzające do ustalenia mechanizmu odpowiedzialnego za obserwowane zmiany. Z pomocą porównawczej hybrydyzacji genomów wykluczono delecję regionów, w których zlokalizowane są badane geny. Wyniki te potwierdza analiza przeprowadzona w oparciu o bazę danych cBioPortal. Delecję genu FUT3 potwierdzono w przypadku 2/279 pacjentów z nowotworem głowy i szyi zgromadzonych w bazie. Dla pozostałych genów nie obserwowano zmian liczby kopii mogących wpływać na obniżenie poziomu ekspresji. Na podstawie wyników z tej samej bazy wykluczono również znaczący udział mutacji w obniżeniu poziomu ekspresji analizowanych genów. Zidentyfikowano mutacje w obrębie genu CLCA4 u 3/279 oraz w genie CEACAM6 u 1/279 pacjentów, jednak żaden z nich nie chorował na raka krtani. Także baza COSMIC potwierdza obecność 1 mutacji zmiany sensu w genie FUT3 zanotowanej w 1/26 analizowanych prób płaskonabłonkowego raka krtani. W bazie tej brak informacji na temat obecności mutacji w pozostałych genach.

Częstym mechanizmem inaktywacji genów jest hipermetylacja DNA ich regionów promotorowych. Poprzez pirosekwencjonowanie wykazano, iż w przypadku genu *CEACAM6* poziom metylacji jest podwyższony w liniach komórkowych w stosunku do grupy kontrolnej o średnio 34%. W związku z tym, gen ten wytypowano do bardziej szczegółowej analizy, co zostanie omówione w kolejnym rozdziale. Dla pozostałych dwóch genów nie zaobserwowano różnicy w poziomie metylacji genu w liniach komórkowych w odniesieniu do grupy kontrolnej.

Tym samym nie wskazano mechanizmu odpowiedzialnego za obniżenie ekspresji genów *FUT3* i *CLCA4*. Przyczyną może być zmieniony poziom ekspresji i aktywności genów, od których zależna jest ekspresja analizowanych genów - wyciszaczy transkrypcji (silencerów), czynników transkrypcyjnych oraz innych genów wchodzących we wspólne ścieżki z *FUT3* i *CLCA4*. Nie można także pominąć oddziaływań epigenetycznych, jak np. podwyższony poziom mikroRNA oddziałujących z badanymi genami czy deacetylacja histonów.

Geny *CLCA4* i *FUT3* nie były, jak dotąd, badane w kontekście rozwoju nowotworu krtani, aczkolwiek znane są nieliczne doniesienia o ich udziale w innych nowotworach głowy i szyi. Jak dotąd, dostępne publikacje dotyczące udziału genu *CLCA4* w nowotworach głowy i szyi wskazują na obniżoną jego ekspresję w raku języka [124] i jamy ustnej [125]. Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie wskazują na istotne obniżenie poziomu ekspresji w guzach o niskim stopniu zaawansowania T1/2 (n = 15) oraz G1/2 (n = 20) względem grupy kontrolnej (n = 3) (test U Manna-Whitney'a, odpowiednio p = 0,005 i p = 0,008). Jednocześnie, obserwowana była różnica w poziomie ekspresji genu w liniach wyprowadzonych z nowotworów dających przerzuty (N+, n = 6) jak niedających przerzutów (N0, n = 19) w stosunku do grupy kontrolnej (test U Manna-Whitney'a, odpowiednio p = 0,021 i p = 0,028) jak i obu grup linii względem siebie (N0 *vs* N+, p = 0,038), wskazując na niższy poziom ekspresji genu w grupie linii wyprowadzonych z guzów dających przerzuty.

Analizując wyniki uzyskane dla genu FUT3 wykazano obniżenie poziomu jego w guzach o parametrach histopatologicznych ekspresji sugerujących wysoką agresywność. W odniesieniu do grupy kontrolnej, istotna zmiana poziomu ekspresji obserwowana była w liniach komórkowych wyprowadzonych ze wznów, guzów o wysokim stopniu zaawansowania - G3 (n = 5) oraz dających przerzuty (N+,n = 6): test U Manna-Whitney'a, odpowiednio p = 0,036 i p = 0,024. Rola tego genu w procesie tworzenia przerzutów nowotworów głowy i szyi była badana wcześniej.

Yadav i współpracownicy badali rolę wolno krążących komórek endotelialnych pochodzących z naczyń okołonowotworowych w przerzutach. Komórki te. charakteryzujące się nadekspresją genu BCL2 pełnią rolę ochronną dla komórek nowotworowych i poprzez E-selektyne ułatwiają ich adhezje. Badania *in vivo* u myszy wykazały, że brak E-selektyny w komórkach endotelialnych lub FUT3 w komórkach nowotworowych (płaskonabłonkowy rak języka) podanych do układu krwionośnego myszy obniża zdolność tworzenia przerzutu HNSCC do płuc [126]. Badania dotyczące udziału genu FUT3 W powstawaniu przerzutów w kontekście tworzenia nowotworowych komórek macierzystych (ang. Cancer Stem Cells, CSC) wykonał Desiderio wraz ze współpracownikami [127]. Wykazał on podwyższenie ekspresji genu w orosferach w odniesieniu do ich adherentnych odpowiedników linii komórkowych raka jamy ustnej. Obie publikacje razem mogą tłumaczyć sprzeczność uzyskanych wyników z dotychczas przedstawionymi badaniami. Po pierwsze - materiał badawczy pochodzący z innej lokalizacji (krtań versus jama usta). Po drugie - nadekspresja genu obserwowana była w komórkach nie związanych z podłożem. W pracy zespołu kierowanego przez Desiderio wykazano bardzo niską ekspresję genu FUT3 w komórkach adherentnych. Na takich też komórkach opierają się prace prowadzone w toku badań do niniejszej rozprawy. W żadnej z do tej pory opublikowanych prac nie wskazano na różnice w poziomie ekspresji genu w nowotworze głowy i szyi w odniesieniu do prawidłowej tkanki nabłonkowej z tego regionu.

Znacząco obniżony poziom ekspresji genu *CLCA4* w liniach komórkowych LSCC wyprowadzonych z guzów pierwotnych i guzów o niskim stopniu zaawansowania w odniesieniu do nienowotworowych prób kontrolnych może zostać wykorzystany jako czynnik diagnostyczny w rozpoznawaniu raka krtani. Jednocześnie jako iż obserwowano istotną różnicę w ekspresji genów pomiędzy liniami wyprowadzonymi z guzów dających przerzuty (N+) i nie dających przerzutów (N0) można wskazać jego potencjalne zastosowanie prognostyczne. Także *FUT3* mógłby zostać wykorzystany w ocenie rokowań pacjenta, ze względu na obniżenie poziomu ekspresji liniach wyprowadzonych ze wznów oraz wysoko zaawansowanych guzów.

Potencjalny gen supresji nowotworowej - CEACAM6

CEACAM6 należy do grupy genów kodujących białko będące CEA-podobną cząsteczką adhezyjną. CEA (antygen karcynoembrionalny, ang. *carcinoembryonic*

antygen) stanowi glikoproteinę zlokalizowaną na powierzchni ludzkich komórek, pełniąc rolę w ich adhezji. CEACAM6 występuje głównie w prawidłowych komórkach nabłonka, w tym nabłonka występującego w narządach głowy i szyi (język, ślinianki, migdałki) oraz w granulocytach [128].

Na podstawie uzyskanych wyników, spośród analizowanych genów wytypowano CEACAM6 jako gen o największym potencjale supresorowym. W większości analizowanych linii komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani (14/25) obserwowano istotne obniżenie poziomu jego ekspresji. Zmiana dotyczyła głównie wznów oraz guzów o wysokim stopniu zaawansowania: T3/4 (n = 10, test U Manna-Whitney'a, p = 0,049) oraz G3 (n = 5, test U Manna-Whitney'a, p = 0,036). Wynik ten wydaje się sprzeczny z danymi prezentowanymi w dostępnej literaturze, ponieważ wcześniejsze badania wskazują na jego onkogenny charakter. Podwyższony poziom ekspresji genu obserwowano w raku jelita grubego, trzustki, prostaty i piersi [129]-[131]. Poziom ekspresji CEACAM6 koreluje pozytywnie ze stopniem zaawansowania nowotworów żołądka i trzustki [131], [132], zaburzoną polaryzacją i różnicowaniem komórek oraz podwyższonym ryzykiem wystąpienia wznowy i skróceniem czasu wolnego od choroby u pacjentów z nowotworem jelita grubego [129], [133]. Nadekspresja genu pozytywnie wpływa na promocję procesu EMT (ang. Epithelial to Mesenchymal Transition) oraz inwazję in vitro i tworzenie przerzutów in vivo w modelach raka trzustki [134]. Z drugiej strony, komórki raka piersi o potwierdzonej ekspresji genu (*CEACAM6*⁺, głównie rak HER2-dodatni) charakteryzują się niższym potencjałem proliferacyjnym oraz niższą zdolnością do wywołania nowotworu w modelu mysim w porównaniu do komórek, w których ekspresja CEACAM6 nie występowała (głównie typ podstawny raka) [135]. Jednocześnie wykazano, że wyciszenie aktywności CEACAM6, na przykład z wykorzystaniem zjawiska interferencji RNA (siRNA) obniża zdolność komórek linii komórkowej raka jelita grubego do tworzenia przerzutów [129] oraz zwiększa wrażliwość komórek raka trzustki na anoikis [136]. Dostępne dane wskazują więc na zależność pomiędzy działaniem genu, pełnioną przez niego rolą a miejscem rozwoju nowotworu. Można więc domniemywać, że obniżona ekspresja CEACAM6 w LSCC może jednocześnie pozytywnie wpływać na zwiększenie rozmiarów guza, hamować różnicowanie komórek i negatywnie wpływać na tworzenie przerzutów, na przykład poprzez zwiększoną śmiertelność komórek raka krtani po oderwaniu od guza.

Na silną tkankową specyficzność genu CEACAM6 wskazuje także fakt, iż jego ekspresja jest zróżnicowana w różnych typach nowotworów oraz prawidłowych komórek, nawet zlokalizowanych w tym samym narządzie. Poziom ekspresji CEACAM6 w raku gruczołowym płuc jest wyższy niż w raku płaskonabłonkowym [130], w prawidłowym nabłonku pęcherzyka płucnego i oskrzeli znacznie wyższy niż w przydance podśluzówkowej [137]. Ważny jest także kontekst genetyczny - obecność innych zmian w genomie, np. powstawanie genów fuzyjnych, zmieniona ploidia komórek. W dziecięcej ostrej białaczce limfoblastycznej typu B (BCP-ALL) ekspresja CEACAM6 obserwowana była wyłącznie w przypadkach, gdzie potwierdzono fuzję genów BCR-ABL, natomiast brak ekspresji CEACAM6 obserwowano w przypadkach, gdzie występowały geny chimeryczne: ETV6-RUNX1, MLL-AF4, MLL-AF9, MLL-ENL lub E2A-PBX1. U pacjentów, u których nie występowała fuzja genów charakterystyczna dla tego typu białaczki, ekspresja CEACAM6 występowała częściej u pacjentów, u których obserwowano ekspresję CRLF2 oraz hiperploidię (więcej niż 51 chromosomów) [138]. Wykazano także zmienną ekspresję genu CEACAM6 w liniach komórkowych wyprowadzonych z regionów głowy i szyi. Grupa prowadzona przez Cameron przeprowadziła analizę porównującą poziom ekspresji genu w prawidłowych keratynocytach naskórka z liniami komórkowymi wyprowadzonymi z regionu głowy i szyi. Wspomniani badacze wykazali znacznie podwyższony poziom ekspresji genu w dwóch liniach komórkowych: Detroit 526 (wyprowadzona z komórek wysięku opłucnowego; przerzut raka gardła) oraz linii Cal27 pochodzącej z raka języka. Jednocześnie, w innych liniach komórkowych wyprowadzonych z raka języka (SCC25, SCC15, SCC9) oraz gardła (FaDu) poziom ekspresji genu w liniach był obniżony. [78]. Ta sama grupa zauważyła także, że nadekspresja u pacjentów z HNSCC ma charakter ogniskowy (ang. *focal*). Analizujac wyniki barwienia immunohistochemicznego wykazała obecność intensywnie wybarwionych skupisk komórek, otoczonych komórkami pozbawionymi białka CEACAM6. To sugeruje dodatkowy poziom zmienności nowotworu - wewnątrznowotworową heterogenność (ang. intratumoural heterogeneity). Obserwacja ta zgodna jest także z jednym z wariantów teorii kancerogenezy płaszczyznowej, zakładającej istnienie różnych klonów komórek w obrębie nowotworu, z których jeden zyskuje przewagę and pozostałymi i daje początek nowemu guzowi [108], [139]. Także dane dostępne w bazie Protein Atlas (www.proteinatlas.org version 17) wskazują na różnice w poziomie ekspresji CEACAM6 w nowotworach głowy i szyi. Stosując barwienie immunohistochemiczne

z wykorzystaniem dwóch różnych przeciwciał, analizowano obecność białka CEACAM6 u ośmiu pacjentów ze zdiagnozowanymi nowotworami głowy i szyi (4 raki płaskonabłonkowe i 4 gruczolakoraki). Obecność białka potwierdzono u dwóch pacjentów - 1 rak płaskonabłonkowy i 1 gruczakolakorak ślinianki [140], [141]. Podobne zróżnicowanie poziomu ekspresji było widoczne także w toku badań niniejszej pracy. W porównaniu z poziomem ekspresji obserwowanym dla prawidłowej krtani, w jednej z linii komórkowych (UT-SCC-106A) obserwowano ponad czterokrotnie wyższy poziom ekspresji, podczas gdy dla pozostałych 24 linii obserwowano znaczne obniżenie ekspresji. W niniejszej pracy porównywano poziom ekspresji genu w liniach komórkowych wyprowadzonych z płaskonabłonkowego raka krtani z nabłonkiem oskrzeli i tchawicy oraz całej krtani. Prawdopodobne jest więc, że wysoki poziom ekspresji *CEACAM6* w prawidłowych nabłonkach narządów obrębu głowy i szyi ulega istotnemu obniżeniu na skutek procesu nowotworzenia.

Spośród analizowanych w niniejszej pracy genów, *CEACAM6* był jedynym, dla którego wykazano istotną zmianę poziomu metylacji DNA regionu promotorowego w liniach komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani w odniesieniu do nienowotworowych prób kontrolnych (test U Manna-Whitney'a, p = 0,000003).

Hipermetylacja genu CEACAM6 i obniżenie jego ekspresji wcześniej obserwowane było w podtypie podstawnym nowotworu piersi [142], [143]. W niniejszej pracy doktorskiej nie zaobserwowano istotnej korelacji pomiędzy poziomem metylacji genu a jego ekspresją w LSCC, co może być spowodowane zbyt niską liczbą badanych prób (25 linii komórkowych). Mimo to, uznano, iż hipermetylacja DNA regionu promotorowego może być mechanizmem prowadzącym do obniżenia ekspresji genu w raku krtani. Aby potwierdzić tę hipotezę, wykonano analizę wpływu związku hamujacego metylacje DNA - Decytabiny (5-Aza- 2'-deoksycytydyna, DAC) na poziom metylacji DNA i ekspresję genu w płaskonabłonkowym raku krtani. Dwie linie komórkowe LSCC hodowano w obecności DAC w medium hodowlanym, wykonano izolację DNA i RNA a następnie przeprowadzono analizę poziomu metylacji DNA poprzez pirosekwencjonowanie oraz analizę ekspresji metodą PCR w czasie rzeczywistym. W efekcie obserwowano obniżony poziom metylacji DNA regionu promotorowego genu po inkubacji z Decytabiną i jednocześnie wzrost poziomu jego ekspresji. To sugeruje, że hipermetylacja genu CEACAM6 może odpowiadać za obniżenie poziomu jego ekspresji w płaskonabłonkowym raku krtani. Aczkolwiek, należy pamiętać, iż zastosowany w pracy odczynnik (DAC) powoduje globalną

inhibicję metylacji DNA. Tym samym pozwala na uaktywnienie wcześniej zablokowanych czynników wpływających na aktywność genu, np. czynników transkrypcyjnych. W związku z czym, nie można wykluczyć, że gen ulega obniżonej ekspresji na skutek dodatkowych czynników, innych niż metylacja DNA, jak choćby interakcje międzybiałkowe czy inne modyfikacje epigenetyczne. Precyzyjnych informacji na temat roli *CEACAM6* w komórkach dostarczyłaby analiza skutków wyciszenia lub wyłączenia genu w linii komórkowej prawidłowego nabłonka na drodze inżynierii genetycznej.

Reasumując, ze względu na brak korelacji pomiędzy poziomem metylacji DNA genu i jego ekspresji niemożliwe jest jednoznaczne *CEACAM6* jako genu supresji nowotworowej w płaskonabłonkowym raku krtani.

VII. PODSUMOWANIE

W niniejszej pracy analizowano grupę genów: *ATAD2*, *CDK1*, *CEACAM6*, *CLCA4*, *FUT3*, *LAPTM4B*, *NETO2*, *SERPINH1*, *SFRP2*, *SNAI2* pod kątem ich potencjalnego charakteru onkogennego lub supresorowego w rozwoju/przebiegu płaskonabłonkowego raka krtani. Geny wybrano na podstawie zmienionego poziomu ich ekspresji w LSCC. Następnie potwierdzono obserwowane zmiany poziomu ekspresji: *ATAD2*, *CDK1*, *CLCA4*, *CEACAM6*, *FUT3*, *LAPTM4B*, *SERPINH1* oraz podjęto próbę identyfikacji mechanizmu molekularnego mogącego być za nie odpowiedzialnym.

Przeanalizowano korelacje zmian poziomu ekspresji analizowanych genów z parametrami histologiczno-klinicznymi nowotworu. Wskazano potencjalne zaangażowanie poszczególnych genów w różnym stadium choroby:

- obniżony poziom ekspresji genów FUT3 oraz CEACAM6 liniach komórkowych wyprowadzonych ze wznów (porównaniu z grupą kontrolną) oraz niski poziom ekspresji genu FUT3 w guzach dających przerzuty mogą sugerować ich znaczenie w zaawansowanych nowotworach krtani,
- zmieniony w stosunku do grupy kontrolnej poziom ekspresji genów: LAPTM4B, ATAD2, CDK1, CLCA4 w liniach komórkowych wyprowadzonych z guzów o niskim stopniu zaawansowania (T1/2 i G1/2) sugeruje ich udział we wczesnych stadiach rozwoju nowotworu,
- istotne różnice w poziomie ekspresji genu CLCA4 pomiędzy liniami komórkowymi wyprowadzonymi z guzów dających przerzuty (N+) i niedających przerzutów (N0) wskazują na jego udział w tworzeniu przerzutów raka krtani do węzłów chłonnych.

Jako potencjalny onkogen wytypowany został gen *CDK1*. Potwierdzono jego zwiększoną ekspresję w LSCC w odniesieniu do prawidłowej krtani oraz innych tkanek obrębu głowy i szyi zarówno na poziomie mRNA jak i białka. Przeanalizowano skutki jego wyciszenia w komórkach nowotworowych, wskazując brak zmian w żywotności i proliferacji komórek nowotworowych w liniach o obniżonym poziomie CDK1. Uzyskane wyniki nie były wystarczające, aby *CDK1* uznać za onkogen w analizowanym typie nowotworu. Ponadto wytypowano geny o istotnie zmienionej ekspresji w liniach komórkowych poddanych wyciszaniu *CDK1*: *CDK6*, *FYN* oraz *CALD1* jako potencjalnie od niego zależne i, być może, kompensujące niedobory *CDK1* w komórkach płaskonabłonkowego raka krtani.

Spośród 10 genów jedynie dla genu *CEACAM6* ustalono potencjalną przyczynę obniżonej ekspresji w LSCC. Ze względu na obserwowaną hipermetylację DNA w liniach komórkowych LSCC w stosunku do nienowotworowych prób kontrolnych gen ten uznany został za potencjalny gen supresji nowotworowej w tym typie raka. Jednakże uzyskane w toku pracy wyniki, między innymi brak korelacji pomiędzy poziomem metylacji DNA genu a poziomem jego ekspresji, nie pozwoliły na jednoznaczne potwierdzenie tej hipotezy.

Dla pozostałych genów nie ustalono przyczyny obserwowanej zmiany poziomu ekspresji. Na podstawie badań in silico - opartych na analizie informacji zebranych w bazie danych cBioPortal jako potencjalną przyczynę nadekspresji genów ATAD2 i LAPTM4B wskazano ich amplifikację. Jednakże wyniki własne uzyskane w toku niniejszej pracy nie potwierdzaja zmiany liczby kopii DNA wymienionych genów. Obserwowane zmiany w poziomie ekspresji pozostałych genów mogą być wynikiem zmian w aktywności i profilu ekspresji innych genów zaangażowanych w te same ścieżki sygnałowe co badane geny. Istotny jest zwłaszcza poziom ekspresji i aktywności ich potencjalnych inhibitorów bądź aktywatorów, wzmacniaczy i wyciszaczy transkrypcji oraz czynników transkrypcyjnych. Zmiany mogą również wynikać ze zmian epigenetycznych, innych niż metylacja DNA, jak na przykład acetylacja histonów lub oddziaływania z mikroRNA. Także profil ekspresji mikroRNA w LSCC istotnie wpływa na profil ekspresji genów. Tym niemniej, obserwowana istotność zmian poziomu ekspresji genów ATAD2, CDK1, CEACAM6, CLCA4, FUT3, LAPTM4B, SERPINH1 w liniach komórkowych LSCC w odniesieniu do prób kontrolnych sugeruje ich zaangażowanie w rozwój płaskonabłonkowego raka krtani.

VIII. WNIOSKI

1. Wyniki badań wskazują na potencjalny udział genów: *ATAD2*, *CDK1*, *CEACAM6*, *CLCA4*, *FUT3*, *LAPTM4B*, w patogenezie płaskonabłonkowego raka krtani.

2. Korelacja poziomu ekspresji genów: *ATAD2*, *CDK1*, *CEACAM6*, *CLCA4*, *FUT3*, *LAPTM4B* z danymi histopatologiczno-klinicznymi nowotworu (w oparciu o klasyfikacje TNM oraz G) wskazuje na:

- A. zaangażowanie genów: *ATAD2*, *CDK1*, *CLCA4*, *LAPTM4B*, we wczesnym etapie nowotworzenia,
- B. obniżenie ekspresji genów CEACAM6 i FUT3 w zaawansowanych nowotworach krtani,
- C. udział genu CLCA4 w tworzeniu przerzutów raka krtani do węzłów chłonnych.

3. Wskazano hipermetylację DNA regionu promotorowego genu *CEACAM6* jako potencjalną przyczynę obniżenia jego ekspresji w LSCC. Jednocześnie wykluczono zmiany liczby kopii DNA badanych genów oraz mutacje w sekwencji DNA jako czynniki wpływające na obserwowane zmiany poziomu ich ekspresji w płaskonabłonkowym raku krtani.

- 4. Uzyskane w toku niniejszej pracy wyniki:
- A. nie pozwalają na jednoznaczne uznanie genu *CEACAM6* za gen supresji nowotworowej w płaskonabłonkowym raku krtani,
- B. nie potwierdzają onkogennej roli genu CDK1 w płaskonabłonkowym raku krtani,
- C. sugerują występowanie mechanizmu kompensacji niedoboru białka CDK1 w komórkach płaskonabłonkowego raka krtani, który pozwala na utrzymanie niezmienionego tempa proliferacji i żywotności komórek. Wskazano trzy potencjalne geny dla dopełniania funkcji CDK1: *CALD1, CDK6* i *FYN*.

IX. STRESZCZENIE

Płaskonabłonkowe nowotwory głowy i szyi (LSCC, ang. *Laryngeal Squamous Cell Carcinoma*), stanowią znaczący problem medyczno-społeczny. Pomimo rozwoju medycyny - zarówno w zakresie diagnostyki jak i terapii, zapadalność na ten typ nowotworu oraz śmiertelność utrzymują się od lat na wysokim poziomie. Duże nadzieje pokłada się w badaniach genetycznych prowadzących do identyfikacji potencjalnych markerów nowotworowych oraz wskazania celów molekularnych dla terapii personalizowanej. Liczne badania zmierzające do poznania kontekstu genetycznego LSCC pozwoliły na wytypowanie onkogenów (np. *PIK3CA, EGFR*) i genów supresji nowotworowej (np. *TP53, RB1*) zaangażowanych w proces kancerogenezy w obrębie tkanek głowy i szyi.

Nowotwory głowy i szyi stanowią złożoną i heterogenną grupę. Pomimo, iż rozwijają się w tym samym regionie organizmu ich biologia i genetyka jest odmienna. Z tego powodu, w niniejszej pracy skupiono się na nowotworach rozwijających się w jednej lokalizacji, a mianowicie krtani. Identyfikacja zmian specyficznych dla kancerogenezy zachodzącej w tym regionie ma znaczenie dla diagnostyki, terapii i określania rokowań dla pacjenta.

W niniejszej rozprawie doktorskiej analizowano udział wybranych genów pod kątem ich potencjału onkogennego lub supresorowego w LSCC. Geny zostały wytypowane na podstawie zmienionego poziomu ich ekspresji w liniach komórkowych raka krtani w stosunku do grupy nienowotworowych prób kontrolnych. Do analizy wybrano 6 genów charakteryzujących się podwyższoną ekspresją: *ATAD2, CDK1, LAPTM4B, NETO2, SERPINH1, SNAI2,* a także 4 geny o obniżonym poziomie ekspresji: *CEACAM6, CLCA4, FUT3* oraz *SFRP2.* Analiza korelacji obserwowanych zmian profilu ich ekspresji z parametrami histologiczno-klinicznymi nowotworów, z których wyprowadzono linie komórkowe, pozwoliła na wskazanie genów: *ATAD2, CDK1, CEACAM6, CLCA4, FUT3* oraz *LAPTM4B,* jako potencjalnie zaangażowane w patogenezę płaskonabłonkowego raka krtani w różnych stadiach zaawansowania choroby. Aby potwierdzić udział analizowanych genów w poszczególnych etapach rozwoju choroby, uzyskane w toku niniejszej pracy badania powinny w przyszłości zostać uzupełnione o analizy z wykorzystaniem materiału klinicznego (fragmentów guzów krtani).

W ramach rozprawy podjęto także próbę identyfikacji mechanizmu molekularnego odpowiedzialnego za deregulację ekspresji badanych genów. Przeprowadzono analizę poziomu metylacji DNA regionów promotorowych genów, wykazując hipermetylację genu *CEACAM6* w liniach komórkowych LSCC. Sens biologiczny wyniku potwierdzono poprzez zastosowanie czynnika blokującego metylację DNA (Decytabina), dowodząc, że wraz ze spadkiem poziomu metylacji DNA przywrócona zostaje ekspresja *CEACAM6*. Na podstawie uzyskanych wyników, gen ten został wytypowany jako potencjalny gen supresji nowotworowej w LSCC. Jednakże w toku badań prowadzonych w niniejszej pracy nie udało się jednoznacznie potwierdzić jego supresorowego charakteru.

Dodatkowo, poprzez analizę *in silico* informacji zebranych w bazie danych cBioPortal wskazano amplifikację genów *ATAD2* i *LAPTM4B* jako potencjalny mechanizm prowadzący do ich nadekspresji. Jednak ocena liczby kopii DNA uzyskana dzięki zastosowaniu mikromacierzy (porównawcza hybrydyzacja genomów) nie potwierdza tej obserwacji. Także dla pozostałych z analizowanych w niniejszej pracy genów nie wykazano zmian liczby kopii DNA. Analiza *in silico* informacji zebranych w bazach danych cBioPortal i COSMIC pozwoliła na wykluczenie mutacji w sekwencji DNA badanych genów jako przyczyny sprawczej zmian. W związku z tym, molekularny mechanizm prowadzący do zmiany poziomu ekspresji analizowanych genów pozostał nieustalony.

Ze względu na podwyższoną ekspresję w liniach komórkowych LSCC oraz funkcje pełnione w komórce, jako potencjalny onkogen wytypowano *CDK1*. Aby poznać znaczenie genu w nowotworze krtani przeanalizowano skutki jego wyciszenia w liniach komórkowych. Pomimo, iż gen ten zaangażowany jest w regulację cyklu komórkowego, nie zaobserwowano obniżenia żywotności i tempa proliferacji komórek. Tym samym nie można potwierdzić onkogennego charakteru genu *CDK1* w rozwoju LSCC. Jako przyczynę braku zmian tych parametrów zaproponowano kompensację niedoboru *CDK1* poprzez inne geny. Jako najbardziej prawdopodobne wytypowano *CDK6, CALD1, FYN*, ponieważ poziom ich ekspresji został istotnie zwiększony po wyciszeniu *CDK1*.

Reasumując, w niniejszej pracy doktorskiej przeanalizowano grupę genów o zmienionym poziomie ekspresji w LSCC. Wskazano korelację poziomu ich ekspresji ze stopniem zaawansowania nowotworu krtani oraz mechanizmy mogące wpływać na poziom ich ekspresji. Badania zostały przeprowadzone głównie na liniach
komórkowych LSCC. Z tego powodu, w celu potwierdzenia wykrytych korelacji niezbędna jest analiza z wykorzystaniem większej liczby guzów nowotworowych uzyskanych bezpośrednio od pacjentów. Ponadto, dla potwierdzenia potencjału onkogennego i supresorowego wytypowanych genów należałoby rozszerzyć badania funkcjonalne o analizy z użyciem nienowotworowej linii komórkowej nabłonka płaskiego lub modelu zwierzęcego.

X. SUMMARY

Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) is an important medical and social problem. Despite development in medicine, including better diagnostic and therapy methods, the morbidity as well as mortality rates associated with this type of cancer remain still high. Application of molecular techniques for a better understanding of cancer genetics, identification of potential markers of carcinogenesis or targets for personalized therapy is a promising approach for diagnosis and treatment. So far, numerous studies have been conducted to expand the knowledge of cancer development and progression. Numerous genes were indicated as oncogenes (like *PIK3CA*, *EGFR*) or tumor suppressor genes (such as *TP53*, *RB1*) involved in head and neck carcinogenesis.

Head and neck tumors are very heterogeneous group of cancers. Although they arise in the same site of the body, their biology and genetics is different. Thus, in the current thesis, the studies were focused on tumors developed only in larynx. Identification of alterations specific for carcinogenesis of this site is crucial for diagnosis, therapy and prognosis of patients.

In the current thesis, a group of genes was analyzed in terms of their involvement in laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) pathogenesis and regarding their oncogenic or suppressive potential. Genes were selected based on significant changes in their expression level observed in laryngeal squamous cell carcinoma cell lines as compared to non-cancer control samples. Six genes with increased expression level, namely: *LAPTM4B*, *ATAD2*, *CDK1*, *SERPINH1*, *SNA12*, *NETO2* and four genes with decreased expression level: *CLCA4*, *FUT3*, *CEACAM6* and *SFRP2* were selected. The correlation of gene expression with clinicopathological data of patients, whose tumors were used to establish the cell lines, allowed to analyze the involvement of genes: *ATAD2*, *CDK1*, *CEACAM6*, *CLCA4*, *FUT3* and *LAPTM4B* in different stages of laryngeal cancer pathogenesis.

To determine the molecular mechanisms leading to the observed gene deregulation several techniques were applied. Changes in gene promoter DNA methylation level were analyzed by bisulfite pyrosequencing for each of the genes and *CEACAM6* was found to be hypermethylated in LSCC cell lines. Next, using DNA demethylating agent (DAC) it was shown that demethylation of *CEACAM6* in LSCC cell lines results in gene expression restoration. However, the results obtained in the current study were insufficient to confirm the potential suppressor function of *CEACAM6* in LSCC.

146

In silico data mining based on cBioPortal database indicated putative copy number alteration of *ATAD2* and *LAPTM4B* genes. However, analysis of data from microarraybased DNA copy number analysis (array-CGH) obtained during the presented study do not support this observation. Also, for the remaining genes analyzed in presented study, no changes of DNA copy number were shown. *In silico* analysis of data collected in the cBioPortal and COSMIC databases made it possible to exclude DNA sequence mutations of analyzed genes as the causative factor of changes in their expression. Therefore, the molecular mechanism causing the observed gene deregulation remained undetermined.

Based on the significantly increased expression of the *CDK1* gene in laryngeal cancer, as well as its function in the cell, *CDK1* was selected as a potential oncogene. To understand its significance in laryngeal carcinoma the consequences of *CDK1* silencing by siRNA in LSCC cell lines were analyzed. Despite the involvement of CDK1 protein in cell cycle control neither the decrease in cell viability nor in proliferation was observed. Thus, the oncogenic potential of *CDK1* was not confirmed in LSCC cell line model. As a reason for the lack of expected effects of *CDK1* silencing, a compensation of CDK1 deficiency by the activity of other genes was proposed. Among the genes most likely involved: *CDK6*, *CALD1*, *FYN* were indicated, as their expression level was highly increased in cell lines following *CDK1* knockdown.

In conclusion, in the current thesis the group of genes with altered gene expression level was analyzed and the potential mechanisms leading to observed gene deregulation were indicated. Presented studies were performed mostly with the use of LSCC cell lines. Therefore, to extend the understanding of the role of the selected genes in the process of carcinogenesis, the analysis of the tumors samples (clinical material) appears to be the next and obligatory step. Moreover, to confirm the oncogenic and suppressor potential of respective genes, functional studies should be extended to include analysis using a non-cancer epithelial cell line or animal model.

XI. WYKAZ SKRÓTÓW

array-CGH, a-CGH - (ang. *microarray Comparative Genomic Hybridization*) Porównawcza Hybrydyzacja Genomowa

DAC- 5-Aza-2'-deoksycytydyna, Decytabina

G - (ang. Grading) stopień dojrzałości histologicznej, zróżnicowania guza:

- G1: raki wysoko zróżnicowane, wysoko dojrzałe, nisko złośliwe
- G2: raki średnio zróżnicowane, średnio dojrzałe
- G3: raki nisko zróżnicowane, nisko dojrzałe, wysoko złośliwe

HNSCC - (ang. *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*) płaskonabłonkowe nowotwory głowy i szyi

LSCC - (ang. *Laryngeal Squamous Cell Carcinoma*) płaskonabłonkowe nowotwory krtani

RT-qPCR - PCR w czasie rzeczywistym - (ang. *real-time PCR*) wykorzystujący jako matrycę cDNA

siRNA-A - dupleks siRNA wyciszający gen CDK1

siRNA-N - kontrolny dupleks siRNA o nonsensownej sekwencji

TNM - klasyfikacja zaawansowania klinicznego nowotworu (TNM, Tumor-Node-Metastasis):

- T: Ocena zaawansowania ogniska pierwotnego; T0 brak klinicznych cech guza pierwotnego; T1 T4: kolejne stopnie wzrostu guza pierwotnego
- N: Ocena węzłów chłonnych szyi; N0 brak przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych; N1 - N3: kolejne stopnie zajęcia węzłów chłonnych szyi zarówno pod kątem ich liczby jak i wielkości ogniska nowotworowego
- M: Ocena przerzutów w odległych narządach; MX- przerzuty odległe nie są ocenione, M0 przerzuty odległe nieobecne, M1 przerzuty odległe obecne

Rozwinięcie nazw genów wymienianych w pracy:

ABL: ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase; AF4: AF4/FMR2 family member 1; AF9: MLLT3, super elongation complex subunit; BAX: BCL2 associated X, apoptosis regulator; BCL-2: BCL2, apoptosis regulator; CALD1: caldesmon 1; CCNA1: cyclin A1; CCNB1: cyclin B1; CCNB2: cyclin B2; CCND1: cyclin D1; CCNL1: cyclin L1; CDC42: cell division cycle 42; CDK4: cyclin dependent kinase 4; CDK6: cyclin dependent kinase 6; CDKN2A: cyclin dependent kinase inhibitor 2A; C-RAF: Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase; CRLF2: cytokine receptor like factor 2; CSMD1: CUB and Sushi multiple domains 1; CTTN: cortactin; DOCK1: dedicator of cytokinesis 1; E2A: transcription factor 3; EGF: epidermal growth factor; EGFR: epidermal growth factor receptor; ENL: MLLT1, super elongation complex subunit; ERB: estrogen receptor 2; ERBB2: erb-b2 receptor tyrosine kinase 2; ETV6: ETS variant 6; FADD: Fas associated via death domain; FGR: FGR proto-oncogene, Src family tyrosine kinase; FHIT: fragile histidine triad; FOS: Fos protooncogene, AP-1 transcription factor subunit; FYN: FYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase; HELLS: helicase, lymphoid specific; HIST1H1C: histone cluster 1 H1 family member c; HIST1H2BJ: histone cluster 1 H2B family member j; HRAS: HRas proto-oncogene, GTPase; JUN: Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; KRAS: HRas protooncogene, GTPase; MDM2: MDM2 proto-oncogene; MET: MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase; *MGMT*: O-6-methylguanine-DNA methyltransferase; *MYBL2*: MYB protooncogene like 2; *MYC*: MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor; *MYO1C*: myosin IC; *NETO1*: neuropilin and tolloid like 1; *NRAS*: NRAS proto-oncogene, GTPase; *ORAOV1*: LTO1, ABCE1 maturation factor; *PARP1*: poly(ADP-ribose) polymerase 1; *PBX1*: PBX homeobox 1; *PIK3CA*: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha; *PIM1*: Pim-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase; *PTEN*: phosphatase and tensin homolog; *PTK2*: protein tyrosine kinase 2; *RASSF1A*: Ras association domain-containing protein 1; *RB1*: RB transcriptional corepressor 1; *RUNX1*: runt related transcription factor 1; *SHB*: SH2 domain containing adaptor protein B; *SMAD4*: SMAD family member 4; *SMARCA4*: SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4; *SMC1A*: structural maintenance of chromosomes 1A; *SRC*: SRC protooncogene, non-receptor tyrosine kinase; *TMEM67*: transmembrane protein 67; *TP53*: tumor protein p53; *TP63*: tumor protein p63; *TSC2*: TSC complex subunit 2; *UBE21*: ubiquitin conjugating enzyme E2 I; *VEGF*: vascular endothelial growth factor A; *VEGFR*: vascular endothelial growth factor receptor 2; *WASF2*: WAS protein family member 2;

XII. SPISY RYCIN I TABEL

1. Spis Rycin

Rycina 1. Model Califano, zmodyfikowany przez B. Perez-Ordoñez i współpracowników [13], przedstawiający model progresji nowotworów głowy i szyi w powiązaniu z poszczególnym aberracjami genetycznymi
Rycina 2. Sieć zależności między białkiem CDK1 a innymi białkami w komórce ludzkiej (źródło: baza danych www.string-db.org)
Rycina 3. Schemat przedstawiający poszczególne etapy selekcji genów do analizy w niniejszej pracy
Rycina 4. Poziom ekspresji analizowanych genów (mikromacierze ekspresyjne) w liniach komórkowych LSCC w odniesieniu do nienowotworowych prób kontrolnych
Rycina 5. Poziom ekspresji analizowanych genów (mikromacierze ekspresyjne) w materiale z guzów pierwotnych raka krtani w odniesieniu do nienowotworowych prób kontrolnych 69
Rycina 6. Wykresy przedstawiające poziom ekspresji analizowanych genów w liniach komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani (RT-qPCR)
Rycina 7. Analiza poziomu metylacji regionu promotorowego genu <i>CEACAM6</i> w liniach komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani (UT-SCC) i próbach kontrolnych - wymazach z jamy ustnej (W1 - W10)
Rycina 8. Wyniki analizy przeprowadzonej w oparciu o bazę danych cBioPortal
Rycina 9. Western blot - anty-CDK1: przeciwciało przeciwko końcowi C białka 81
Rycina 10. Western blot - anty-phospho-CDK1: przeciwciało przeciwko ufosforylowanej formie białka
Rycina 11. Western blot - anty- CDK1 przeciwko końcowi N białka 82
Rycina 12. Barwienie immunohistochemiczne przedstawiające obecność białka CDK1 w analizowanych fragmentach nowotworu krtani i prawidłowej śluzówce krtani
Rycina 13. Przykład chromatogramów uzyskanych w analizie sekwencjonowania genu <i>CDK1</i> w liniach komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani - polimorfizm rs3212319
Rycina 14. Przykład chromatogramów uzyskanych w analizie sekwencjonowania genu <i>CDK1</i> w liniach komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani - polimorfizm rs1871446
Rycina 15. Porównanie efektywności wyciszenia genu CDK1 w poszczególnych liniach komórkowych LSCC z użyciem różnych dupleksów siRNA

Rycina 20. Analiza oddziaływań i interakcji genów/białek o potwierdzonej zmianie poziomu ekspresji w liniach komórkowych LSCC poddanych wyciszaniu genu *CDK1* (STRING). 104

Rycina 23. Analiza żywotności komórek - test kolorymetryczny...... 110

2. Spis Tabel

Tabela 1. Podsumowanie materiału badanego i prób kontrolnych wykorzystanych w
poszczególnych analizach wykonywanych w niniejszej pracy 25
Tabela 2. Startery wykorzystane w reakcji PCR w czasie rzeczywistym
Tabela 3. Lista starterów wykorzystanych w reakcjach pirosekwencjonowania 40
Tabela 4. Lista starterów wykorzystanych w reakcjach sekwencjonowania genu CDK1 49
Tabela 5. Sekwencje starterów wykorzystanych w reakcji PCR w czasie rzeczywistym 55
Tabela 6. Startery wykorzystane w reakcji PCR w czasie rzeczywistym 59
Tabela 7. Analiza korelacji poziomu ekspresji analizowanych genów z typem nowotworu krtani z jakiego zostały wyprowadzone linie komórkowe

Tabela 8. Analiza korelacji poziomu ekspresji genów z parametrami histologiczno-klinicznymi w klasyfikacjach TNM oraz G i czasem przeżycia pacjentów
Tabela 9. Średnie wartości log2ratio dla regionów, w których zlokalizowane są badane geny. 75
Tabela 10. Średni poziom metylacji DNA regionów promotorowych poszczególnych genów, obserwowany dla linii komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani oraz prób kontrolnych.78
Tabela 11. Podsumowanie wyników z analizy akumulacji białka CDK1 techniką barwienia immunohistochemicznego
Tabela 12. Podsumowanie wyników analizy polimorfizmów obserwowanych w poszczególnych liniach komórkowych
Tabela 13. Częstości poszczególnych alleli i genotypów polimorfizmów rs3212319 orazrs1871446 w analizowanych liniach komórkowych (LSCC) oraz populacjach fińskiej (FIN)i europejskiej (EUR).88
Tabela 14. Szczegółowe wyniki analizy poziomu wyciszenia genu CDK1 z użyciem dupleksów siRNA z zastosowaniem techniki RT-qPCR oraz Western blot
Tabela 15. Szczegółowe wyniki analizy poziomu wyciszenia genu <i>CDK1</i> z użyciem siRNA z zastosowaniem techniki RT-qPCR oraz Western blot
Tabela 16. Poziom ekspresji genu <i>CDK1</i> analizowany z użyciem RT-qPCR i Western blot w liniach komórkowych poddanych transfekcji z użyciem dupleksów siRNA
Tabela 17. Analiza zmiany poziomu ekspresji genów wywołanej wyciszeniem genu CDK1w linii komórkowej LSCC - UT-SCC-10798
Tabela 18. Analiza zmiany poziomu ekspresji genów wywołanej wyciszeniem genu CDK1 w linii komórkowej LSCC UT-SCC-34
Tabela 19. Analiza zmiany poziomu ekspresji genów wywołana wyciszeniem genu <i>CDK1</i> w liniach płaskonabłonkowego raka krtani - wzrost poziomu ekspresji
Tabela 20. Analiza zmiany poziomu ekspresji genów wywołana wyciszeniem genu <i>CDK1</i> w liniach płaskonabłonkowego raka krtani - spadek poziomu ekspresji
Tabela 21. Wyniki analizy wzbogacenia funkcjonalnego sieci zależności pomiędzy genami (białkami) w oparciu o bazę danych STRING
Tabela 22. Podsumowanie zmian tempa proliferacji linii komórkowych podanych wyciszaniu genu <i>CDK1</i>
Tabela 23. Szczegółowe wyniki uzyskane w analizie żywotności komórek z wykorzystaniem testu kolorymetrycznego. 111
Tabela 24. Analiza zmian poziomu metylacji DNA sekwencji LINE-1 w liniach komórkowych UT-SCC-11 i UT-SCC-29 pod wpływem decytabiny

Tabela 25. Analiza zmian poziomu metylacji DNA oraz poziomu ekspresji genu *CEACAM6* w liniach komórkowych UT-SCC-11 i UT-SCC-29 pod wpływem decytabiny...... 116

XIII. LITERATURA

- [1] "Wojciechowska Urszula, Didkowska Joanna. Zachorowania i zgony na nowotwory złośliwe w Polsce. Krajowy Rejestr Nowotworów.".
- [2] R. Talhout, T. Schulz, E. Florek, J. van Benthem, P. Wester, and A. Opperhuizen, "Hazardous compounds in tobacco smoke," *Int. J. Environ. Res. Public. Health*, vol. 8, no. 2, pp. 613-628, Feb. 2011.
- [3] K. Szyfter, "Rola czynnika genetycznego w powstawaniu i przebiegu płaskonabłonkowego raka krtani," *Postępy* W *Chir. Głowy SzyiAdvances Head Neck Surg.*, vol. 1, no. 1, pp. 5-19, Jul. 2003.
- [4] "Zatonski, T. Z., W. (2002). 'Epidemiologia nowotworów złośliwych krtani.' Rak krtani i gardla dolnego pod red. Janczewsk.".
- [5] D. Majszyk, A. Bruzgielewicz, and E. Osuch-Wójcikiewicz, "Rak krtani epidemiologia i etiologia," *Pol. Przegląd Otorynolaryngologiczny*, vol. 3, no. 4, pp. 186-188, Październik 2014.
- [6] D. Jurkiewicz, K. Dzaman, and P. Rapiejko, "[Laryngeal cancer risk factors]," *Pol. Merkur. Lek. Organ Pol. Tow. Lek.*, vol. 21, no. 121, pp. 94-98, Jul. 2006.
- [7] M. L. Bondy *et al.*, "Association between family history of cancer and mutagen sensitivity in upper aerodigestive tract cancer patients," *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.*, vol. 2, no. 2, pp. 103-106, Apr. 1993.
- [8] S. Syrjänen, "Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer," J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol., vol. 32 Suppl 1, pp. S59-66, Mar. 2005.
- [9] C. de Martel, M. Plummer, J. Vignat, and S. Franceschi, "Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type," *Int. J. Cancer*, vol. 141, no. 4, pp. 664-670, 15 2017.
- [10] K. Kiwerska, D. Mielcarek-Kuchta, M. Jarmuz-Szymczak, and K. Szyfter, "[The HPV infection as an alternative to tobacco smoking way of head and neck tumors development--what are the implications for patients?]," ., vol. 69, no. 10, pp. 1074-1078, 2012.
- [11] "Janusz A. Siedlecki, Choroby nowotworowe w "Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej" pod red. J. .".
- [12] J. Califano *et al.*, "Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization," *Cancer Res.*, vol. 56, no. 11, pp. 2488-2492, Jun. 1996.
- [13] B. Perez-Ordoñez, M. Beauchemin, and R. C. K. Jordan, "Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck," *J. Clin. Pathol.*, vol. 59, no. 5, pp. 445-453, May 2006.
- [14] "Szyfter K. 'Molekularne podstawy kancerogenezy w nowotworach głowy i szyi' w 'Nowotwory w otolaryngologii' pod red W. Sz.".
- [15] C. R. Leemans, B. J. M. Braakhuis, and R. H. Brakenhoff, "The molecular biology of head and neck cancer," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 11, no. 1, pp. 9-22, Jan. 2011.
- [16] M. Jarmuz-Szymczak *et al.*, "Heterogeneity of 11q13 region rearrangements in laryngeal squamous cell carcinoma analyzed by microarray platforms and fluorescence in situ hybridization," *Mol. Biol. Rep.*, vol. 40, no. 7, pp. 4161-4171, Jul. 2013.
- [17] A. G. Knudson, "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 68, no. 4, pp. 820-823, Apr. 1971.
- [18] M. A. Pierotti, G. Sozzi, and C. M. Croce, "Mechanisms of oncogene activation," 2003.
- [19] S. D. Meredith *et al.*, "Chromosome 11q13 amplification in head and neck squamous cell carcinoma. Association with poor prognosis," *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, vol. 121, no. 7, pp. 790-794, Jul. 1995.

- [20] A. Gerbitz *et al.*, "Deregulation of the proto-oncogene c-myc through t(8;22) translocation in Burkitt's lymphoma," *Oncogene*, vol. 18, no. 9, pp. 1745-1753, Mar. 1999.
- [21] P. C. Nowell, "The minute chromosome (Phl) in chronic granulocytic leukemia," *Blut*, vol. 8, pp. 65-66, Apr. 1962.
- [22] N. Stransky *et al.*, "The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma," *Science*, vol. 333, no. 6046, pp. 1157-1160, Aug. 2011.
- [23] S. M. Bakhtiar, A. Ali, and D. Barh, "Epigenetics in head and neck cancer," *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 1238, pp. 751-769, 2015.
- [24] S. Demokan and N. Dalay, "Role of DNA methylation in head and neck cancer," *Clin. Epigenetics*, vol. 2, no. 2, pp. 123-150, Aug. 2011.
- [25] M. G. Sabbir, A. Roy, S. Mandal, A. Dam, S. Roychoudhury, and C. K. Panda, "Deletion mapping of chromosome 13q in head and neck squamous cell carcinoma in Indian patients: correlation with prognosis of the tumour," *Int. J. Exp. Pathol.*, vol. 87, no. 2, pp. 151-161, Apr. 2006.
- [26] D. J. Lee *et al.*, "Multiple tumor-suppressor genes on chromosome 3p contribute to head and neck squamous cell carcinoma tumorigenesis," *Cancer Biol. Ther.*, vol. 10, no. 7, pp. 689-693, Oct. 2010.
- [27] A. L. Reed *et al.*, "High Frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) Inactivation in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma," *Cancer Res.*, vol. 56, no. 16, pp. 3630-3633, Aug. 1996.
- [28] S. Ohta *et al.*, "Alterations of p16 and p14ARF genes and their 9p21 locus in oral squamous cell carcinoma," *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontology*, vol. 107, no. 1, pp. 81-91, Stycze 2009.
- [29] D. Martin *et al.*, "The head and neck cancer cell oncogenome: a platform for the development of precision molecular therapies," *Oncotarget*, vol. 5, no. 19, pp. 8906-8923, Nov. 2014.
- [30] D. KOUTSIMPELAS, W. PONGSAPICH, U. HEINRICH, S. MANN, W. J. MANN, and J. BRIEGER, "Promoter methylation of MGMT, MLH1 and RASSF1A tumor suppressor genes in head and neck squamous cell carcinoma: Pharmacological genome demethylation reduces proliferation of head and neck squamous carcinoma cells," *Oncol. Rep.*, vol. 27, no. 4, pp. 1135-1141, Apr. 2012.
- [31] H. S. Kim *et al.*, "Inactivation of p16INK4a in primary tumors and cell lines of head and neck squamous cell carcinoma," *Mol. Cells*, vol. 10, no. 5, pp. 557-565, Oct. 2000.
- [32] N. K. Cervigne *et al.*, "Identification of a microRNA signature associated with progression of leukoplakia to oral carcinoma," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 18, no. 24, pp. 4818-4829, Dec. 2009.
- [33] S. G. O'Brien *et al.*, "Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia," *N. Engl. J. Med.*, vol. 348, no. 11, pp. 994-1004, Mar. 2003.
- [34] K. L. Blackwell *et al.*, "Overall survival benefit with lapatinib in combination with trastuzumab for patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer: final results from the EGF104900 Study," *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 30, no. 21, pp. 2585-2592, Jul. 2012.
- [35] F. Pezzuto et al., "Update on Head and Neck Cancer: Current Knowledge on Epidemiology, Risk Factors, Molecular Features and Novel Therapies," Oncology, vol. 89, no. 3, pp. 125-136, 2015.
- [36] E. Larkins *et al.*, "FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Recurrent or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma with Disease Progression on or After Platinum-Containing Chemotherapy," *The Oncologist*, vol. 22, no. 7, pp. 873-878, Jul. 2017.

- [37] M. Ciró *et al.*, "ATAD2 Is a Novel Cofactor for MYC, Overexpressed and Amplified in Aggressive Tumors," *Cancer Res.*, vol. 69, no. 21, pp. 8491-8498, Nov. 2009.
- [38] F. Boussouar, M. Jamshidikia, Y. Morozumi, S. Rousseaux, and S. Khochbin, "Malignant genome reprogramming by ATAD2," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.*, vol. 1829, no. 10, pp. 1010-1014, Październik 2013.
- [39] A. S. Revenko, E. V. Kalashnikova, A. T. Gemo, J. X. Zou, and H.-W. Chen, "Chromatin Loading of E2F-MLL Complex by Cancer-Associated Coregulator ANCCA via Reading a Specific Histone Mark," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 30, no. 22, pp. 5260-5272, Nov. 2010.
- [40] H. L. Ford and A. B. Pardee, "Cancer and the cell cycle," J. Cell. Biochem., vol. 75, no. S32, pp. 166-172, Stycze 1999.
- [41] M. Pagano, R. Pepperkok, F. Verde, W. Ansorge, and G. Draetta, "Cyclin A is required at two points in the human cell cycle.," *EMBO J.*, vol. 11, no. 3, p. 961, Mar. 1992.
- [42] D. Santamaría *et al.*, "Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle," *Nature*, vol. 448, no. 7155, pp. 811-815, Aug. 2007.
- [43] J. M. Enserink and R. D. Kolodner, "An overview of Cdk1-controlled targets and processes," *Cell Div.*, vol. 5, p. 11, May 2010.
- [44] S. Atherton-Fessler, L. L. Parker, R. L. Geahlen, and H. Piwnica-Worms, "Mechanisms of p34cdc2 regulation.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 13, no. 3, pp. 1675-1685, Mar. 1993.
- [45] "Czepczyńska-Krężel H., Krop-Wątorek A. (2012) Rodzina ludzkich białek antygenu karcynoembrionalnego, struktura i funkcja.".
- [46] J. B. Rose *et al.*, "The Role of Biliary Carcinoembryonic Antigen-Related Cellular Adhesion Molecule 6 (CEACAM6) as a Biomarker in Cholangiocarcinoma," *PLoS ONE*, vol. 11, no. 3, Mar. 2016.
- [47] M. S. Duxbury, H. Ito, E. Benoit, T. Waseem, S. W. Ashley, and E. E. Whang, "A novel role for carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 as a determinant of gemcitabine chemoresistance in pancreatic adenocarcinoma cells," *Cancer Res.*, vol. 64, no. 11, pp. 3987-3993, Jun. 2004.
- [48] K. Pawłowski, M. Lepistö, N. Meinander, U. Sivars, M. Varga, and E. Wieslander, "Novel conserved hydrolase domain in the CLCA family of alleged calcium-activated chloride channels," *Proteins*, vol. 63, no. 3, pp. 424-439, May 2006.
- [49] "Kaczmarek R. (2010) Zmiany ekspresji antygenów grupowych układu Lewis w komórkach nowotworowychPostepy Hig Med Dosw (onl.".
- [50] G.-Z. Shao *et al.*, "Molecular cloning and characterization of LAPTM4B, a novel gene upregulated in hepatocellular carcinoma," *Oncogene*, vol. 22, no. 32, pp. 5060-5069, 2003.
- [51] X. Liu, F. Xiong, X. Wei, H. Yang, and R. Zhou, "LAPTM4B-35, a novel tetratransmembrane protein and its PPRP motif play critical roles in proliferation and metastatic potential of hepatocellular carcinoma cells," *Cancer Sci.*, vol. 100, no. 12, pp. 2335-2340, Grudzie 2009.
- [52] H. Stöhr, C. Berger, S. Fröhlich, and B. H. F. Weber, "A novel gene encoding a putative transmembrane protein with two extracellular CUB domains and a low-density lipoprotein class A module: isolation of alternatively spliced isoforms in retina and brain," *Gene*, vol. 286, no. 2, pp. 223-231, Mar. 2002.
- [53] L. Hu *et al.*, "Upregulation of NETO2 expression correlates with tumor progression and poor prognosis in colorectal carcinoma," *BMC Cancer*, vol. 15, Dec. 2015.
- [54] J. Zhu, G. Xiong, H. Fu, B. M. Evers, B. P. Zhou, and R. Xu, "Chaperone Hsp47 Drives Malignant Growth and Invasion by Modulating an ECM Gene Network," *Cancer Res.*, vol. 75, no. 8, pp. 1580-1591, Apr. 2015.
- [55] M. Tasab, L. Jenkinson, and N. J. Bulleid, "Sequence-specific recognition of collagen triple helices by the collagen-specific molecular chaperone HSP47," J. Biol. Chem., vol. 277, no. 38, pp. 35007-35012, Sep. 2002.

- [56] "Koziński Kamil, Dobrzyń Agnieszka (2013) Szlak sygnałowy Wnt i jego rola w regulacji metabolizmu komórki, Postepy Hig Me.".
- [57] K. M. Hajra, D. Y.-S. Chen, and E. R. Fearon, "The SLUG zinc-finger protein represses Ecadherin in breast cancer," *Cancer Res.*, vol. 62, no. 6, pp. 1613-1618, Mar. 2002.
- [58] E. Casas, J. Kim, A. Bendesky, L. Ohno-Machado, C. J. Wolfe, and J. Yang, "Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis," *Cancer Res.*, vol. 71, no. 1, pp. 245-254, Jan. 2011.
- [59] M. Jarmuz, W. Golusinski, R. Grénman, and K. Szyfter, "Analysis of chromosome aberrations in cell lines derived from laryngeal cancer in relation to tumor progression," *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol. Off. J. Eur. Fed. Oto-Rhino-Laryngol. Soc. EUFOS Affil. Ger. Soc. Oto-Rhino-Laryngol. - Head Neck Surg.*, vol. 259, no. 5, pp. 269-273, May 2002.
- [60] M. Jarmuz, R. Grenman, W. Golusinski, and K. Szyfter, "Aberrations of 11q13 in laryngeal squamous cell lines and their prognostic significance," *Cancer Genet. Cytogenet.*, vol. 160, no. 1, pp. 82-88, Jul. 2005.
- [61] P. Chomczynski and N. Sacchi, "The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on," *Nat. Protoc.*, vol. 1, no. 2, pp. 581-585, 2006.
- [62] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Anal. Biochem.*, vol. 72, pp. 248-254, May 1976.
- [63] H. Zou *et al.*, "Aberrant methylation of secreted frizzled-related protein genes in esophageal adenocarcinoma and Barrett's esophagus," *Int. J. Cancer*, vol. 116, no. 4, pp. 584-591, Sep. 2005.
- [64] J. Gao *et al.*, "Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal," *Sci. Signal.*, vol. 6, no. 269, p. pl1, Apr. 2013.
- [65] E. Cerami *et al.*, "The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data," *Cancer Discov.*, vol. 2, no. 5, pp. 401-404, May 2012.
- [66] T. C. G. A. Network, "Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas," *Nature*, vol. 517, no. 7536, p. 576, Jan. 2015.
- [67] S. A. Forbes *et al.*, "COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution," *Nucleic Acids Res.*, vol. 45, no. D1, pp. D777-D783, Jan. 2017.
- [68] U. K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4," *Nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680-685, Aug. 1970.
- [69] M. Bodnar, Ł. Szylberg, W. Kaźmierczak, and A. Marszałek, "Immunohistochemical expression of p27(kip1) in metastatic laryngeal squamous cell carcinoma," Adv. Med. Sci., vol. 59, no. 2, pp. 206-212, Sep. 2014.
- [70] M. Ashburner *et al.*, "Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium," *Nat. Genet.*, vol. 25, no. 1, pp. 25-29, May 2000.
- [71] The Gene Ontology Consortium, "Expansion of the Gene Ontology knowledgebase and resources," *Nucleic Acids Res.*, vol. 45, no. D1, pp. D331-D338, Jan. 2017.
- [72] D. W. Huang, B. T. Sherman, and R. A. Lempicki, "Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources," *Nat. Protoc.*, vol. 4, no. 1, pp. 44-57, 2009.
- [73] D. W. Huang, B. T. Sherman, and R. A. Lempicki, "Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists," *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, no. 1, pp. 1-13, Jan. 2009.
- [74] E. Eden, R. Navon, I. Steinfeld, D. Lipson, and Z. Yakhini, "GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists," *BMC Bioinformatics*, vol. 10, p. 48, Feb. 2009.
- [75] E. Eden, D. Lipson, S. Yogev, and Z. Yakhini, "Discovering motifs in ranked lists of DNA sequences," *PLoS Comput. Biol.*, vol. 3, no. 3, p. e39, Mar. 2007.

- [76] D. Szklarczyk *et al.*, "The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible," *Nucleic Acids Res.*, vol. 45, no. D1, pp. D362-D368, Jan. 2017.
- [77] D. Szklarczyk *et al.*, "STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life," *Nucleic Acids Res.*, vol. 43, no. Database issue, pp. D447-452, Jan. 2015.
- [78] S. Cameron *et al.*, "Focal overexpression of CEACAM6 contributes to enhanced tumourigenesis in head and neck cancer via suppression of apoptosis," *Mol. Cancer*, vol. 11, p. 74, 2012.
- [79] J. Paluszczak *et al.*, "Frequent hypermethylation of WNT pathway genes in laryngeal squamous cell carcinomas," *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.*, vol. 43, no. 9, pp. 652-657, Oct. 2014.
- [80] A. S. Wilson, B. E. Power, and P. L. Molloy, "DNA hypomethylation and human diseases," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1775, no. 1, pp. 138-162, Jan. 2007.
- [81] S. Sharma, T. K. Kelly, and P. A. Jones, "Epigenetics in cancer," *Carcinogenesis*, vol. 31, no. 1, pp. 27-36, Jan. 2010.
- [82] W. Sun *et al.*, "TKTL1 is activated by promoter hypomethylation and contributes to head and neck squamous cell carcinoma carcinogenesis through increased aerobic glycolysis and HIF1alpha stabilization," *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 16, no. 3, pp. 857-866, Feb. 2010.
- [83] Z. Su, Z. Yang, Y. Xu, Y. Chen, and Q. Yu, "Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis," *Mol. Cancer*, vol. 14, Feb. 2015.
- [84] Y. Li *et al.*, "Lysosomal transmembrane protein LAPTM4B promotes autophagy and tolerance to metabolic stress in cancer cells," *Cancer Res.*, vol. 71, no. 24, pp. 7481-7489, Dec. 2011.
- [85] Y. Li, J. D. Iglehart, A. L. Richardson, and Z. C. Wang, "The amplified cancer gene LAPTM4B promotes tumor growth and tolerance to stress through the induction of autophagy," *Autophagy*, vol. 8, no. 2, pp. 273-274, Feb. 2012.
- [86] M. Zimmermann, A. Zouhair, D. Azria, and M. Ozsahin, "The epidermal growth factor receptor (EGFR) in head and neck cancer: its role and treatment implications," *Radiat. Oncol. Lond. Engl.*, vol. 1, p. 11, May 2006.
- [87] M. Tian, Y. Chen, D. Tian, X. Qiao, Z. Ma, and J. Li, "Beclin1 antagonizes LAPTM4Bmediated EGFR overactivation in gastric cancer cells," *Gene*, vol. 626, pp. 48-53, Aug. 2017.
- [88] Y. Maki *et al.*, "LAPTM4B is associated with poor prognosis in NSCLC and promotes the NRF2-mediated stress response pathway in lung cancer cells," *Sci. Rep.*, vol. 5, p. 13846, Sep. 2015.
- [89] M. Ciró *et al.*, "ATAD2 is a novel cofactor for MYC, overexpressed and amplified in aggressive tumors," *Cancer Res.*, vol. 69, no. 21, pp. 8491-8498, Nov. 2009.
- [90] M. B. Raeder *et al.*, "Integrated genomic analysis of the 8q24 amplification in endometrial cancers identifies ATAD2 as essential to MYC-dependent cancers," *PloS One*, vol. 8, no. 2, p. e54873, 2013.
- [91] D. Chen, M. Maruschke, O. Hakenberg, W. Zimmermann, C. G. Stief, and A. Buchner, "TOP2A, HELLS, ATAD2, and TET3 Are Novel Prognostic Markers in Renal Cell Carcinoma," Urology, vol. 102, p. 265.e1-265.e7, Apr. 2017.
- [92] G. M. Cooper, "The Events of M Phase," 2000.
- [93] S. Lim and P. Kaldis, "Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation," *Development*, vol. 140, no. 15, pp. 3079-3093, Aug. 2013.
- [94] M. Peyressatre, C. Prével, M. Pellerano, and M. C. Morris, "Targeting cyclin-dependent kinases in human cancers: from small molecules to Peptide inhibitors," *Cancers*, vol. 7, no. 1, pp. 179-237, Jan. 2015.

- [95] M. K. Diril *et al.*, "Cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1) is essential for cell division and suppression of DNA re-replication but not for liver regeneration," *Proc. Natl. Acad. Sci.* U. S. A., vol. 109, no. 10, pp. 3826-3831, Mar. 2012.
- [96] D. Adhikari *et al.*, "Cdk1, but not Cdk2, is the sole Cdk that is essential and sufficient to drive resumption of meiosis in mouse oocytes," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 21, no. 11, pp. 2476-2484, Jun. 2012.
- [97] M. J. Garnett and R. Marais, "Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene," *Cancer Cell*, vol. 6, no. 4, pp. 313-319, Październik 2004.
- [98] R. Schreck and U. R. Rapp, "Raf kinases: Oncogenesis and drug discovery," Int. J. Cancer, vol. 119, no. 10, pp. 2261-2271, Nov. 2006.
- [99] N. M. Santio *et al.*, "The PIM1 kinase promotes prostate cancer cell migration and adhesion via multiple signalling pathways," *Exp. Cell Res.*, vol. 342, no. 2, pp. 113-124, Mar. 2016.
- [100] M. Lian *et al.*, "Microarray gene expression analysis of tumorigenesis and regional lymph node metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma," *PloS One*, vol. 8, no. 12, p. e84854, 2013.
- [101] J. T. Chang *et al.*, "Identification of differentially expressed genes in oral squamous cell carcinoma (OSCC): overexpression of NPM, CDK1 and NDRG1 and underexpression of CHES1," *Int. J. Cancer J. Int. Cancer*, vol. 114, no. 6, pp. 942-949, May 2005.
- [102] S. W. Chae *et al.*, "Overexpressions of Cyclin B1, cdc2, p16 and p53 in human breast cancer: the clinicopathologic correlations and prognostic implications," *Yonsei Med. J.*, vol. 52, no. 3, pp. 445-453, May 2011.
- [103] Q. Xi *et al.*, "The expression of CDK1 is associated with proliferation and can be a prognostic factor in epithelial ovarian cancer," *Tumor Biol.*, vol. 36, no. 7, pp. 4939-4948, Apr. 2015.
- [104] "Stevens Alan, Lowe James S. (2000) 'Histologia Człowieka' pod red. M. Zabla Wydawnictwo Lekarskie PZWL.".
- [105] J.-Q. Yang, H.-X. Liu, Z. Liang, Y.-M. Sun, and M. Wu, "Over-expression of p53, p21 and Cdc2 in histologically negative surgical margins is correlated with local recurrence of laryngeal squamous cell carcinoma," *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, vol. 7, no. 7, pp. 4295-4302, 2014.
- [106] X. Chen *et al.*, "The clinical significance of CDK1 expression in oral squamous cell carcinoma," *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal*, vol. 20, no. 1, pp. e7-12, Jan. 2015.
- [107] D. P. Slaughter, H. W. Southwick, and W. Smejkal, "Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin," *Cancer*, vol. 6, no. 5, pp. 963-968, Sep. 1953.
- [108] M. G. C. T. van Oijen and P. J. Slootweg, "Oral Field Cancerization: Carcinogen-induced Independent Events or Micrometastatic Deposits?," *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 9, no. 3, pp. 249-256, Mar. 2000.
- [109] A. Linton *et al.*, "An RNAi-based screen reveals PLK1, CDK1 and NDC80 as potential therapeutic targets in malignant pleural mesothelioma," *Br. J. Cancer*, vol. 110, no. 2, pp. 510-519, Stycze 2014.
- [110] C. J. Sherr, D. Beach, and G. I. Shapiro, "Targeting CDK4 and CDK6: From Discovery to Therapy," *Cancer Discov.*, vol. 6, no. 4, pp. 353-367, Apr. 2016.
- [111] A. M. Narasimha, M. Kaulich, G. S. Shapiro, Y. J. Choi, P. Sicinski, and S. F. Dowdy, "Cyclin D activates the Rb tumor suppressor by mono-phosphorylation," *eLife*, vol. 3, Jun. 2014.
- [112] M. T. Brown and J. A. Cooper, "Regulation, substrates and functions of src," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1287, no. 2-3, pp. 121-149, Jun. 1996.
- [113] B. Sen and F. M. Johnson, "Regulation of Src Family Kinases in Human Cancers," JournalofSignalTransduction,2011.[Online].Available:https://www.hindawi.com/archive/2011/865819/.[Accessed: 05-Dec-2017].

- [114] S. C. Ley, M. Marsh, C. R. Bebbington, K. Proudfoot, and P. Jordan, "Distinct intracellular localization of Lck and Fyn protein tyrosine kinases in human T lymphocytes," J. Cell Biol., vol. 125, no. 3, pp. 639-649, May 1994.
- [115] N. I. Pathan, R. L. Geahlen, and M. L. Harrison, "The protein-tyrosine kinase Lck associates with and is phosphorylated by Cdc2," J. Biol. Chem., vol. 271, no. 44, pp. 27517-27523, Nov. 1996.
- [116] M. Okamoto, Y. Nakayama, A. Kakihana, R. Yuki, N. Yamaguchi, and N. Yamaguchi, "Fyn Accelerates M Phase Progression by Promoting the Assembly of Mitotic Spindle Microtubules," J. Cell. Biochem., vol. 117, no. 4, pp. 894-903, Apr. 2016.
- [117] V. Yadav and M. F. Denning, "Fyn is induced by Ras/PI3K/Akt signaling and is required for enhanced invasion/migration," *Mol. Carcinog.*, vol. 50, no. 5, pp. 346-352, May 2011.
- [118] T. Mayanagi and K. Sobue, "Diversification of caldesmon-linked actin cytoskeleton in cell motility," *Cell Adhes. Migr.*, vol. 5, no. 2, pp. 150-159, Apr. 2011.
- [119] M. E. Cuomo, A. Knebel, G. Platt, N. Morrice, P. Cohen, and S. Mittnacht, "Regulation of microfilament organization by Kaposi sarcoma-associated herpes virus-cyclin.CDK6 phosphorylation of caldesmon," J. Biol. Chem., vol. 280, no. 43, pp. 35844-35858, Oct. 2005.
- [120] J. Kang, C. M. Sergio, R. L. Sutherland, and E. A. Musgrove, "Targeting cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) but not CDK4/6 or CDK2 is selectively lethal to MYC-dependent human breast cancer cells," *BMC Cancer*, vol. 14, p. 32, 2014.
- [121] Y. Liu *et al.*, "Triple negative breast cancer therapy with CDK1 siRNA delivered by cationic lipid assisted PEG-PLA nanoparticles," J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc., vol. 192, pp. 114-121, Oct. 2014.
- [122] A. Goga, D. Yang, A. D. Tward, D. O. Morgan, and J. M. Bishop, "Inhibition of CDK1 as a potential therapy for tumors over-expressing MYC," *Nat. Med.*, vol. 13, no. 7, pp. 820-827, Lipiec 2007.
- [123] H. Xiao *et al.*, "The role of CDK1 siRNA interference in cell cycle and cell apoptosis," *Front. Med. China*, vol. 3, no. 4, p. 384, Dec. 2009.
- [124] H. Ye *et al.*, "Transcriptomic dissection of tongue squamous cell carcinoma," *BMC Genomics*, vol. 9, p. 69, Feb. 2008.
- [125] S. Bundela, A. Sharma, and P. S. Bisen, "Potential Therapeutic Targets for Oral Cancer: ADM, TP53, EGFR, LYN, CTLA4, SKIL, CTGF, CD70," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 7, Jul. 2014.
- [126] A. Yadav, B. Kumar, J.-G. Yu, M. Old, T. N. Teknos, and P. Kumar, "Tumor-Associated Endothelial Cells Promote Tumor Metastasis by Chaperoning Circulating Tumor Cells and Protecting Them from Anoikis," *PLoS ONE*, vol. 10, no. 10, Oct. 2015.
- [127] V. Desiderio *et al.*, "Increased fucosylation has a pivotal role in invasive and metastatic properties of head and neck cancer stem cells," *Oncotarget*, vol. 6, no. 1, pp. 71-84, Jan. 2015.
- [128] S. Schölzel, W. Zimmermann, G. Schwarzkopf, F. Grunert, B. Rogaczewski, and J. Thompson, "Carcinoembryonic Antigen Family Members CEACAM6 and CEACAM7 Are Differentially Expressed in Normal Tissues and Oppositely Deregulated in Hyperplastic Colorectal Polyps and Early Adenomas," Am. J. Pathol., vol. 156, no. 2, pp. 595-605, Feb. 2000.
- [129] K. S. Kim *et al.*, "Overexpression and clinical significance of carcinoembryonic antigenrelated cell adhesion molecule 6 in colorectal cancer," *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.*, vol. 415, pp. 12-19, Jan. 2013.
- [130] R. D. Blumenthal, E. Leon, H. J. Hansen, and D. M. Goldenberg, "Expression patterns of CEACAM5 and CEACAM6 in primary and metastatic cancers," *BMC Cancer*, vol. 7, p. 2, Jan. 2007.
- [131] M. S. Duxbury et al., "CEACAM6 Is a Novel Biomarker in Pancreatic Adenocarcinoma and PanIN Lesions," Ann. Surg., vol. 241, no. 3, pp. 491-496, Mar. 2005.

- [132] X. Deng, P. Liu, Y. Zhao, and Q. Wang, "Expression profiling of CEACAM6 associated with the tumorigenesis and progression in gastric adenocarcinoma," *Genet. Mol. Res. GMR*, vol. 13, no. 3, pp. 7686-7697, Sep. 2014.
- [133] C. Ilantzis, L. Demarte, R. A. Screaton, and C. P. Stanners, "Deregulated Expression of the Human Tumor Marker CEA and CEA Family Member CEACAM6 Disrupts Tissue Architecture and Blocks Colonocyte Differentiation," *Neoplasia N. Y. N*, vol. 4, no. 2, pp. 151-163, Mar. 2002.
- [134] J. Chen *et al.*, "CEACAM6 induces epithelial-mesenchymal transition and mediates invasion and metastasis in pancreatic cancer," *Int. J. Oncol.*, vol. 43, no. 3, pp. 877-885, Sep. 2013.
- [135] E. Balk-Møller, J. Kim, B. Hopkinson, V. Timmermans-Wielenga, O. W. Petersen, and R. Villadsen, "A Marker of Endocrine Receptor-Positive Cells, CEACAM6, Is Shared by Two Major Classes of Breast Cancer: Luminal and HER2-Enriched," Am. J. Pathol., vol. 184, no. 4, pp. 1198-1208, Apr. 2014.
- [136] M. S. Duxbury, H. Ito, M. J. Zinner, S. W. Ashley, and E. E. Whang, "CEACAM6 gene silencing impairs anoikis resistance and *in vivo* metastatic ability of pancreatic adenocarcinoma cells," *Oncogene*, vol. 23, no. 2, pp. 465-473, Jan. 2004.
- [137] E. Klaile *et al.*, "Carcinoembryonic antigen (CEA)-related cell adhesion molecules are coexpressed in the human lung and their expression can be modulated in bronchial epithelial cells by non-typable Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis, TLR3, and type I and II interferons," *Respir. Res.*, vol. 14, no. 1, p. 85, 2013.
- [138] N. Kiyokawa *et al.*, "Significance of CD66c expression in childhood acute lymphoblastic leukemia," *Leuk. Res.*, vol. 38, no. 1, pp. 42-48, Jan. 2014.
- [139] G. C. Bedi, W. H. Westra, E. Gabrielson, W. Koch, and D. Sidransky, "Multiple head and neck tumors: evidence for a common clonal origin," *Cancer Res.*, vol. 56, no. 11, pp. 2484-2487, Jun. 1996.
- [140] "The Human Protein Atlas." [Online]. Available: https://www.proteinatlas.org/. [Accessed: 31-Oct-2017].
- [141] M. Uhlen *et al.,* "Towards a knowledge-based Human Protein Atlas," *Nat. Biotechnol.,* vol. 28, no. 12, pp. 1248-1250, Dec. 2010.
- [142] J. D. Roll, A. G. Rivenbark, W. D. Jones, and W. B. Coleman, "DNMT3b overexpression contributes to a hypermethylator phenotype in human breast cancer cell lines," *Mol. Cancer*, vol. 7, p. 15, Jan. 2008.
- [143] J. D. Roll et al., "Dysregulation of the epigenome in triple-negative breast cancers: basal-like and claudin-low breast cancers express aberrant DNA hypermethylation," *Exp. Mol. Pathol.*, vol. 95, no. 3, pp. 276-287, Dec. 2013.

XIV. ZAŁĄCZNIKI

1. Spis Rycin - Załącznik

Rycina Z1. Poziom metylacji DNA promotorów analizowanych genów w LSCC 172

2. Spis Tabel - Załącznik

Tabela Z1. Charakterystyka linii komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani oraz dane Tabela Z2. Charakterystyka histologiczno-kliniczna guzów oraz pacjentów, od których uzyskano materiał pierwotny - płaskonabłonkowe raki krtani......164 Tabela Z6. Poziom ekspresji genów wybranych do analizy w liniach komórkowych LSCC (analiza z wykorzystaniem mikromacierzy ekspresyjnych)......167 Tabela Z7. Poziom ekspresji wybranych genów guzach pierwotnych, uzyskany z wykorzystaniem mikromacierzy ekspresyjnych......168 Tabela Z8. Względny poziom ekspresji genów analizowany metodą PCR w czasie rzeczywistym - geny o podwyższonej ekspresji. 169 Tabela Z9. Względny poziom ekspresji genów analizowany metodą PCR w czasie rzeczywistym - geny o obniżonej ekspresji...... 170 Tabela Z10. Szczegółowe wyniki analizy liczby kopii DNA badanych genów. 171 Tabela Z11. Wyniki pomiarów konfluencji mierzonej w poszczególnych punktach czasowych w trakcie monitoringu przyżyciowego linii komórkowej HeLa poddanej wyciszaniu genu Tabela Z12. Wyniki analizy zmiany tempa proliferacji komórek pod wpływem wyciszenia genu CDK1 w linii komórkowej HeLa z wykorzystaniem testu kolorymetrycznego (CCK8)....... 177 Tabela Z13. Analiza ekspresji genu MYC w liniach komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani (wyniki uzyskane z mikromacierzy ekspresyjnej)......179

Tabela Z1. Charakterystyka linii komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani oraz dane histologiczno-kliniczne guzów i pacjentów, od których zostały wyprowadzone. TNM - klasyfikacja określająca stopień zaawansowania klinicznego guza; G - stopień zróżnicowania komórek nowotworu; K - kobieta; M - mężczyzna; rec - wznowa; pri - guz pierwotny; DWD - śmierć z powodu choroby; DNE - śmierć z innych przyczyn niż LSCC; ANE - żywy, bez objawów LSCC.

Numer linii	Płeć	Wiek [lata]	Lokalizacja guza pierwotnego	TNM	Miejsce pobrania próbki	Typ zmiany	G	Przyczyna zgonu i czas przeżycia [miesiące]
UT-SCC-6A	К	51	supraglottic larynx	T2N1M0	larynx	rec	1	DWD 31
UT-SCC-6B	К	51	supraglottic larynx	T2N1M0	neck	met	1	DWD 31
UT-SCC-8	М	42	supraglottic larynx	T2N0M0	larynx	pri	1	DWD 35
UT-SCC-11	М	58	glottic larynx	T1N0M0	larynx	rec	2	DNE > 60
UT-SCC-13	М	53	supraglottic larynx	T3N0M0	larynx	rec	2	DWD 11
UT-SCC-19A	М	44	glottic larynx	T4N0M0	larynx	pri	2	DNE > 60
UT-SCC-19B	М	44	glottic larynx	T4N0M0	larynx	pri (per)	2	DNE > 60
UT-SCC-22	М	79	glottic larynx	T1N0M0	larynx	rec	2	DWD 28
UT-SCC-23	М	66	transglottica	T3N0M0	larynx	pri (per)	1	DNE > 60
UT-SCC-29	М	82	glottic larynx	T2N0M0	larynx	pri	1	DNE > 60
UT-SCC-34	М	63	supraglottic larynx	T4N0M0	larynx	pri	1	DWD 10
UT-SCC-35	М	50	glottic larynx	T2N0M0	larynx	resid	2	DWD 10
UT-SCC-38	М	66	glottic larynx	T2N0M0	larynx	pri	2	DWD 16
UT-SCC-42B	М	43	supraglottic larynx	T4N3M0	neck	pri	3	DWD 2
UT-SCC-49	М	76	glottic larynx	T2N0M0	larynx	pri	2	DWD 31
UT-SCC-50	М	70	glottic larynx	T2N0;rT2N0	larynx	rec	3	ANE > 60
UT-SCC-57	М	76	glottic larynx	T2N0M0	larynx	rec	1-2	D 48
UT-SCC-75	М	56	supraglottic larynx	T2N2BM0	larynx	pri	2	DNE 30
UT-SCC-106A	М	59	plicae vocalis	T1AN0M0	larynx	pri	2	DNE 49
UT-SCC-106B	М	59	plicae vocalis	rT3N0M0	larynx	rec	3	DNE 49
UT-SCC-107	М	46	supraglottic larynx	T4N2CM0	larynx	pri	2	DWD 0.2
UT-SCC-108	М	68	supraglottic larynx	T2N0M0	larynx	pri	3	DNE 19
UT-SCC-113	М	50	supraglottic larynx	T3N0M0	larynx	pri	3	DWD 17
UT-SCC-116	М	60	supraglottic larynx	T4N1M0	larynx	pri	2	DWD 9
UT-SCC-117	М	71	larynx	rT2N0M0	larynx	rec	2	DWD 47

Tabela Z2. Charakterystyka histologiczno-kliniczna guzów oraz pacjentów, od których uzyskano materiał pierwotny - płaskonabłonkowe raki krtani. TNM - klasyfikacja określająca stopień zaawansowania klinicznego guza; G - stopień histologicznego zróżnicowania komórek nowotworu; Wiek pacjentów - zakres wieku pacjentów w latach.

	Guzy krtani wyk	orzystane do	Skrawki guza użyte do barwienia immunohistochemicznego					
		A I KNA						
Liczba pacjentów:								
Kobiety (wiek)	1 (61	L)	5 (50 - 69)					
Mężczyźni (wiek)	45 (42 -	- 84)	35 (44	4 - 75)				
	Stopień	Liczba prób	Stopień	Liczba prób				
	T1	0	T1	0				
	T2	7	T2	1				
	T3	18	Т3	27				
Klasyfikacja TNM	T4	21	T4	12				
	NO	21	NO	20				
	N+	25	N+	20				
	M0	45	M0	40				
	M+	1	M+	0				
	G1	18	G1	2				
Klasyfikacja G	G2	21	G2	28				
	G3	7	G3	1				
	Gx	0	Gx	9				

Tabela Z3. Spis urządzeń.

Urządzenie	Producent
Bioanalizator	Agilent
DNA Engine Dyad Thermal Cycler	BioRad
DNA SpeedVac	DNA100
Homogenizator kulkowy FASTPREP-24™ 5G Instrument	MP Biomedicals
Inkubator IGO150	Jouan
Spektrofotometr	NanoDrop Technologies
Termocykler Cycler iQ5	BioRad
Sekwenator ABI Prism 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Zestaw do elektroforezy białek MiniProtean	BioRad
Zestaw do transferu białek na membranę MiniProtean	BioRad

Tabela Z4. Bufory i roztwory wykorzystywane w prowadzonych badaniach.

BUFOR	SKŁAD
Medium do hodowli linii	DMEM w proszku (Gibco): 13,38g, NaHCO3 1,9g, Hepes 1M
komórkowych LSCC (1000ml)	(pH 7,4): 20,3ml, L-Glutamina (10x Gibco): 5ml, Aminokwasy
	(Non-Essential Aminoacids, 100x Gibco):10ml, Antybiotyki
	(Antibiotic Antimycotic, 100x Gibco):5ml
Trypsyna (1000ml)	NaCl: 8,15g, KCl: 0,4g, Na2HPO4x7H2O: 0,09g, KH2PO4:
	0,06g, Glukoza: 1g, NaHCO3: 0,35g, Czerwień fenolowa:
	0,01g, Trypsyna (8300U/mg, Sigma): 0,1g, K-EDTA: 0,1g
Bufor PBS, pH 7,4, (800 ml) 10 x	NaCl: 80,9g, KCl: 2,9g, Na2HPO4x7H2O: 21,48g,
	KH2PO4:2,9g
Trizol, pH 5 (1000ml)	0,8M Tiocyjanian guanidyny, 0,4M Tiocyjanian amonu, 1M
	Octan sodu pH 5, fenol wysycony wodą: 38%
Fenol do izolacji DNA	Fenol, TRIS pH~11 0,1M: 1200ml, 8-Hydroksychinolina: 0,1g
Bufor LE, pH 7,4 (1000 ml), 10 x	155mM NH ₄ Cl, 10mM KHCO ₃ , 0,1M Na ₂ EDTA
Bufor 10x SE, pH 8,0 (1000ml)	75mM NaCl, 1mM Na ₂ EDTA
Bufor do trawienia tkanek, pH	100mM NaCl, 10mM TRIS-HCl, 25mM Na ₂ EDTA, 0,5% SDS
8,0 (1000ml)	
Bufor TE 1x (pH 8,0)	10mM TRIS-HCl, 1mM EDTA
TBE, pH8 (1000ml) 10x	TRIS: 107,8g, Kwas borowy: 55g, EDTA: 7,44g
NP40	150mM NaCl, 1% Triton X-100, 50mM TRIS pH 8.0
RIPA	150mM NaCl, 1% Triton X-100, 50mM TRIS pH 8.0, 0,5%
	Sodium deoxycholate, 0,1% SDS
TRIS-Glicyna-SDS (1000ml), 5x	TRIS:15,1g, Glicyna: 64g, SDS 10%: 50ml
Bufor Towbin, pH8,3, 1000ml,	25mM TRIS, 192mM Glicyna, 20% Metanol
10x	
Ponceau S 10x	2% Ponceau S, 30% Kwas trójchlorooctowy, 30% Kwas
	sulfosalicylowy
6x Laemmli Sample Buffer	300mM TRIS-HCl pH 6,8, 0,01% Błękit bromofenolowy, 15%
	Glicerol, 6% SDS
TBS, pH 7,4 (1000ml) 10x	NaCl: 80g, KCl: 2g, TRIS: 30g
TBS-T	TBS (10x): 100ml, Woda: 900ml, Tween-20: 1ml

Producent	Odczynnik
Bioshop	Bromek etydyny, TRIS
Chempur	Alkohol izopropylowy
Invitrogen	ssDNA
Lab Empire	40% akrylamid/bisakrylamid 29:1, Agaroza, SDS. TEMED, Inhibitory proteaz (mieszanina)
Merck	Fenol, Alkohol etylowy, Alkohol izoamylowy, Chlorek sodu, Chloroform, Kwas octowy, Metanol, Wersenian dwusodowy, Wodorotlenek sodu, EDTA,
POCh	Alkohol etylowy, Alkohol izoamylowy, Chlorek sodu, Chloroform, Kwas octowy, Metanol, Wersenian dwusodowy, Wodorotlenek sodu, EDTA,
Roche	Deoksynukleozydotrifosforany (DTP)
Serva	8-hydroksychinolina, Surowica bydlęca, TRIS-HCl
Sigma Aldrich	Chlorek potasu, DEPC, EGTA, HEPES, Octan potasu, Octan sodu, Polimeraza i DNA, Polimeraza JumpStart, Proteinaza K (10 mg/ml), Trypsyna, APS, DAC, błękit trypanu
Thermo Fisher Scientific	Hi-Di Formamide

Tabela Z5. Najważniejsze odczynniki używane w pracy.

Tabela Z6. Poziom ekspresji genów wybranych do analizy w liniach komórkowych LSCC (analiza z wykorzystaniem mikromacierzy ekspresyjnych). Nienowotworowe próby kontrolne: TL - RNA z całkowitej krtani; EC - RNA z komórek nabłonka oskrzeli; LX10 - RNA z prawidłowego nabłonka marginesu operacyjnego; PE - Poziom ekspresji; DE - Detekcja ekspresji; P - Obecna ekspresja transkryptu; A - Brak ekspresji transkryptu; I - Wzrost poziomu ekspresji transkryptu hybrydyzującego z tagiem względem próby kontrolnej; D - Spadek poziomu ekspresji transkryptu hybrydyzującego z tagiem względem próby kontrolnej; N - Brak zmian ekspresji transkryptu hybrydyzującego z tagiem względem próby kontrolnej.

		UT-SCC-6B	UT-SCC-6A	UT-SCC-106A	UT-SCC-11	UT-SCC-29	UT-SCC-116	UT-SCC-19B	UT-SCC-22	UT-SCC-34	UT-SCC-57	UT-SCC-107	TL	EC LX10
Gen	Тад	PE DE TL EC	PE DE TL EC LX	PE DE TL EC	PE DE P	E DE PE DE								
	218782_s_at	331 P I I I	721 P I I I	193 P I I I	313 P I I I	312 P I I I	801 P I I I	129 P I I I	507 P I I I	315 P I I I	335 P I I I	451 P I I I	47 P 3	5 P 72 P
47402	222740_at	454 P I I I	649 P I I I	114 P I I I	269 P I I I	418 P I I I	789 P I I I	118 P I I I	569 P I I I	498 P I I I	493 P I I I	506 P I I I	38 A 34	F 90 P
ATADZ	235266_at	56 P I I N	186 P I I I	46 P I I I	93 P I I I	108 P I I I	240 P I I I	26 P N I I	169 P I I I	76 P I I I	94 P I I I	174 P I I I	19 A 1	3 A 5 A
	228401_at	262 P I I I	435 P I I I	122 P I I I	117 P I I I	259 P I I I	921 P I I I	110 P I I I	397 P I I I	178 P I I I	257 P I I I	371 P I I I	19 P 5	. P 71 P
	203214_x_at	976 P I I I	1021 P I I I	153 P I I I	357 P I I I	1063 P I I I	510 P I I I	294 P I I I	1281 P I I I	723 P I I I	798 P I I I	1069 P I I I	58 P 4	5 P 120 P
CDK1	203213_at	1841 P I I I	2052 P I I I	277 P I I N	916 P I I I	1784 P I I I	1681 P I I I	758 P I I I	2969 P I I I	1462 P I I I	1536 P I I I	1438 P I I I	59 P 13	3 P 213 P
CDKI	231534_at	150 P I I I	75 P I I I	25 P M I I	47 P I I I	113 P I I I	62 P I I I	61 P I I I	133 P I I I	55 P I I I	76 P I I I	141 P I I I	11 A 9	A 6 A
	210559_s_at	1037 P I I I	1252 P I I I	181 P I I N	398 P I I I	1285 P I I I	618 P I I I	357 P I I I	1572 P I I I	937 P I I I	978 P I I I	1273 P I I I	63 P 68	A 186 P
NETO2	222774_s_at	180 P I I I	321 P I I I	256 P I I I	715 P I I I	226 P I I I	299 P I I I	588 P I I I	549 P I I I	405 P I I I	198 P I I I	520 P I I I	27 A 5) A 80 A
NETOZ	218888_s_at	249 P I I I	327 P I I I	318 P I I I	730 P I I I	328 P I I I	408 P I I I	1189 P I I I	731 P I I I	383 P I I I	140 P I I I	556 P I I I	24 A 5	P 65 P
	1554679_a_at	1833 P I I I	1942 P I I I	1455 P I I I	795 P I I I	1191 P I I I	1482 P I I I	2254 P I I I	2451 P I I I	1270 P I I I	1055 P I I I	1934 P I I I	576 P 21	8 P 284 P
	208767_s_at	2841 P I I I	2646 P I I I	2134 P I I I	1312 P I I I	1760 P I I I	2175 P I I I	3324 P I I I	3539 P I I I	1472 P I I I	1700 P I I I	3023 P I I I	751 P 49	3 P 499 P
LAP IIVI4D	208029_s_at	1685 P I I I	2288 P I I I	2066 P I I I	1250 P I N I	1596 P I I I	2291 P I I I	2535 P I I I	3134 P I I I	1210 P I N I	1612 P I I I	2414 P I I I	512 P 110)7 P 454 P
	214039_s_at	3956 P I N I	4307 P I N I	4501 P I N I	3179 P I N I	4025 P I N I	4486 P I N I	5461 P I I I	5910 P I I I	3441 P I N I	4712 P I N I	5599 P I I I	2285 P 41	7 P 1670 P
SERPINH1	207714_s_at	660 P I I I	594 P I I I	461 P I I I	963 P I I I	486 P I I I	646 P I I I	265 P I I N	265 P I I N	227 P I I N	250 P I I N	260 P I I N	42 A 7	5 M 233 P
SNA12	213139_at	694 P I I I	916 P I I I	565 P I I I	488 P I I I	678 P I I I	1343 P I I I	813 P I I I	606 P I I I	387 P I I I	535 P I I I	596 P I I I	269 P 7	5 P 262 P
65464446	203757_s_at	414 P D D D	37 A D D D	307 P D D D	13 A D D D	9 A D D D	282 P D D D	62 P D D D	14 A D D D	18 A D D D	478 P D D D	12 A D D D	1383 P 15	02 P 1013 P
CEACAINIS	211657_at	766 P D D D	179 P D D D	713 P D D D	34 P D D D	32 P D D D	645 P D D D	153 P D D D	72 P D D D	30 P D D D	1196 P D D D	30 M D D D	3494 P 33	4 P 2112 P
CLCA4	220026_at	13 A D D D	1 A D D D	14 A D D D	3 A D D D	4 A D D D	1 A D D D	1 A D D D	1 A D D D	6 A D D D	8 A D D D	2 A D D D	1114 P 5	5 P 4105 P
	214088 s at	35 P D D D	51 P D D D	126 P D D D	21 A D D D	78 P D D D	36 P D D D	86 P D D D	74 P D D D	32 A D D D	32 P D D D	20 A D D D	304 P 51	5 P 376 P
FUI3	216010_x_at	43 A D D D	11 A D D D	39 P D D D	6 A D D D	17 A D D D	3 A D D D	31 P D D D	25 P D D D	14 A D D D	19 A D D D	22 A D D D	115 P 12	4 P 142 P
	223121_s_at	6 A D D D	2 A D D D	2 A D D D	2 A D D D	1 A D D D	2 A D D D	3 A D D D	2 A D D D	2 A D D D	2 A D D D	3 A D D D	1382 P 9	5 P 1039 P
SFRPZ	223122_s_at	110 P D D D	10 A D D D	7 A D D D	2 A D D D	2 A D D D	6 A D D D	2 A D D D	2 A D D D	9 A D D D	3 A D D D	4 A D D D	3329 P 30	1 P 3174 P

Tabela Z7. Poziom ekspresji wybranych genów guzach pierwotnych, uzyskany z wykorzystaniem mikromacierzy ekspresyjnych. Badane RNA z guzów pierwotnych: MK32, MK36, MK42, MK59, MK60; Próby kontrolne: TL - RNA z całkowitej krtani; EC - RNA z komórek nabłonka oskrzeli; LX10 - RNA z prawidłowego nabłonka marginesu operacyjnego; PE - Poziom ekspresji; DE - Detekcja ekspresji; P - Obecna ekspresja transkryptu; A - Brak ekspresji transkryptu hybrydyzującego z tagiem względem próby kontrolnej; D - Spadek poziomu ekspresji transkryptu hybrydyzującego z tagiem względem próby kontrolnej.

			М	K32				м	K36				М	K42				M	(59				M	K60			TL		EC		LX1	.0
Gen	Tag	PE	DE	TL	EC	LX10	PE	DE	TL	EC	LX10	PE	DE	TL	EC	LX10	PE	DE	TL	EC	LX10	PE	DE	TL	EC	LX10	PE	DE	PE	DE	PE	DE
	218782_s_at	164	Р	1	1	1	67	Р	Ν	1	Ν	187	Р	- I	1	1	156	Р	T	I	1	299	Р	I	I.	1	47	Р	33	Р	72	Р
ΑΤΑΠ2	222740_at	205	Р	1	1	1	73	Р	1	1	Ν	258	Ρ	1	1	1	181	Р	1	1	1	444	Ρ	1	1	1	38	А	34	Р	90	Р
	235266_at	20	Μ	Ν	MI	Ν	24	А	Ν	Ν	Ν	39	Р	Ν	1	MI	20	Р	Ν	1	Ν	33	Р	Ν	1	Ν	19	А	13	Α	5	Α
	228401_at	95	Р	1	1	1	26	Р	1	Ν	Ν	143	Р	1		1	84	Р	1	1	Ν	159	Р	1	1	- T	19	Р	51	Р	71	Р
	203214_x_at	413	Р	1	1	1	207	Р	1	1	1	720	Р	1	1	1	304	Р	1	1	1	966	Р	1	1	1	58	Р	46	Р	120	Р
CDK1	203213_at	880	Р	1	1	1	311	Р	1	1	1	1572	Р	1	1	1	527	Р	1	1	1	1871	Р	1	1	1	59	Р	133	Р	213	Р
	231534_at	72	Р		1	I.	36	A	1	1	I.	162	Р	1	1	1	54	Р	1	1	1	121	Р	1		1	11	A	9	A	6	A
	210559_s_at	452	Р			1	246	Р				866	Р			1	334	Р			1	1183	Р			-	63	Р	68	A	186	P
NETO2	222774_s_at	138	Р		1	1	314	Р		1	1	299	Р		1	1	295	Р	1	1	1	411	Р	1		1	27	Α	50	A	80	A
	218888_s_at	156	Р			1	241	Р	-			308	Р			1	217	Р			-	652	Р	-	_	-	24	A	51	Р	65	Р
	1554679_a_at	797	P		1	1	1000	Р				744	P			1	1015	Р	1			1650	P			1	576	Р	218	Р	284	Р
LAPTM4B	208767_s_at	1092	Р				1570	Р				1016	Р		1		1303	Р		1		2077	Р		1		751	Р	493	Р	499	Р
	208029_s_at	981	Р		N		1198	Р		N		831	Р		D	1	1006	Р	1	N		18/4	Р				512	Р	1107	Р	454	Р
CERDINUM	214039_s_at	2985	P	-	D		41/1	P	-	IN	-	2660	P	IN .	U		3214	P	<u> </u>			4574	P	-	IN	-	2285	P	4137	P	1670	P
SERPINHI	207714_s_at	/13	P	-		1	2487	P			-	282	P			N	1658	P	-		-	3/8	P		<u> </u>	-	42	A	75		233	P
SNAIZ	213139_at	621	Р				766	Р				637	Р			1	2024	Р	_		-	622	Р				269	Р	/5	<u>Р</u>	262	P
CEACAM6	203757_s_at	1342	P	N	N	1	286	Р	D	D	D	703	P	D	D	D	312	Р	D	D	D	541	P	D	D	D	1383	Р	1502	Р	1013	Р
	211657_at	2184	Р	D	D	N	437	Р	D	D	D	1421	Р	D	D	D	570	Р	D	D	D	991	Р	D	D	D	3494	Р	3324	Р	2112	Р
CLCA4	220026_at	122	Р	D	1	D	248	Р	D	1	D	1600	Р			D	17	Α	D	D	D	322	Р	D	1	D	1114	Р	53	Р	4105	Р
FUT3	214088_s_at	114	Р	Ν	D	D	59	Р	D	D	D	138	Р	N	D	D	40	Р	D	D	D	189	Р	Ν	D	D	304	Р	515	Р	376	Р
	216010_x_at	66	Р	D	D	D	33	A	D	D	D	90	Р	D	N	D	28	A	D	D	D	107	Р	N	Ν	Ν	115	Р	124	Р	142	Р
SFRP2	223121_s_at	649	Р	D	1	D	2172	Р		1	1	665	Р	D	1	D	1158	Р	Ν	I.	Ν	63	Р	D	Ν	D	1382	Р	95	Р	1039	Р
	223122_s_at	1825	Р	D		D	3799	Р	Ν		Ν	1774	Р	D	1	D	2526	Р	Ν		Ν	244	Р	D	D	D	3329	Р	301	Р	3174	Р

Tabela Z8. Względny poziom ekspresji genów analizowany metodą PCR w czasie rzeczywistym - geny o podwyższonej ekspresji. Kolorem czerwonym oznaczono próby, dla których poziom ekspresji przekraczał wartość progu odcięcia. HTEC, NHBE, Total Larynx - nienowotworowe próby kontrolne, sd - odchylenie standardowe.

Linia Komórkowa	NETO2	sd	LAPTM4B	sd	ATAD2	sd	SERPINH1	sd	SNAI2	sd	CDK1	sd
UT-SCC-106A	56,49	12,15	5,90	1,31	6,89	0,73	7,54	0,97	1,00	0,20	8,54	1,36
UT-SCC-106B	65,19	9,32	2,62	0,60	9,62	1,19	5,92	0,74	3,19	0,96	23,37	5,16
UT-SCC-107	150,30	21,07	5,22	0,63	32,90	7,50	3,48	0,64	6,72	1,06	50,10	8,90
UT-SCC-108	104,81	34,50	7,99	0,79	71,75	10,71	8,91	1,41	21,67	2,25	63,78	13,27
UT-SCC-11	97,79	20,66	3,16	0,80	13,56	3,21	11,36	3,55	1,67	0,76	25,55	7,19
UT-SCC-113	91,35	16,75	2,88	0,72	14,03	2,72	15,25	3,02	2,44	0,92	39,17	5,06
UT-SCC-116	27,73	3,51	4,10	0,58	19,97	3,09	4,63	0,74	6,40	0,96	10,70	1,84
UT-SCC-117	37,36	5,23	2,05	0,37	9,96	4,56	1,00	0,17	0,00	n/a	34,22	2,53
UT-SCC-13	21,30	3,99	1,76	0,39	5,68	0,99	3,45	0,56	6,59	1,02	10,33	1,64
UT-SCC-19A	83,00	12,46	7,44	1,12	28,15	3,13	6,61	0,85	2,84	0,58	63,34	9,59
UT-SCC-19B	129,64	19,45	6,81	0,93	20,37	2,58	12,06	1,73	7,63	1,14	51,33	6,73
UT-SCC-22	173,65	22,31	9,08	1,61	34,46	4,47	6,97	0,44	5,55	0,85	67,34	4,60
UT-SCC-23	91,30	9,20	2,17	0,20	8,85	0,60	9,84	1,42	1,36	0,62	6,72	0,55
UT-SCC-29	143,84	28,83	3,58	0,37	23,40	2,86	8,54	2,75	6,41	0,49	45,62	3,99
UT-SCC-34	85,23	5,08	2,72	0,16	14,79	0,88	9,38	0,87	5,61	1,03	21,56	2,92
UT-SCC-35	77,08	11,22	5,86	1,24	18,40	5,00	8,16	2,00	5,14	1,39	27,95	5,62
UT-SCC-38	101,83	18,67	6,56	0,98	36,17	6,50	10,26	0,94	8,30	2,29	40,13	5,37
UT-SCC-42B	174,65	8,31	6,08	0,40	24,85	6,80	13,75	1,02	3,39	0,10	35,55	8,40
UT-SCC-49	55,08	9,39	2,90	0,44	8,50	0,72	8,55	0,88	6,59	1,02	16,72	1,26
UT-SCC-50	74,37	10,38	1,41	0,23	8,65	1,17	7,28	1,53	2,56	0,47	20,97	2,66
UT-SCC-57	59,23	8,08	7,22	0,97	33,86	3,15	9,85	1,47	3,28	0,75	87,12	17,42
UT-SCC-6A	55,46	11,12	4,37	0,71	20,58	4,40	7,97	1,11	1,80	0,80	45,78	5,63
UT-SCC-6B	64,59	12,08	3,98	0,56	21,56	2,63	7,92	0,91	7,94	1,67	51,98	6,79
UT-SCC-75	32,33	4,69	3,63	0,50	18,15	1,74	3,53	0,30	3,76	0,86	25,78	4,91
UT-SCC-8	6,97	2,24	2,35	0,50	10,06	1,26	1,94	0,26	5,79	0,99	9,75	1,61
HTEC	55,78	10,62	1,64	0,38	1,34	0,24	2,84	0,40	10,21	2,41	1,00	0,19
NHBE	98,36	27,63	1,74	0,56	6,79	2,46	6,83	1,61	27,89	5,36	16,99	5,28
Total Larynx	2,27	0,40	1,07	0,22	1,00	0,12	2,73	0,33	1,36	0,33	1,31	0,14
Wartość odcięcia	242,81		2,81		16,54		13,85		68,40		44,42	

Tabela Z9. Względny poziom ekspresji genów analizowany metodą PCR w czasie rzeczywistym - geny o obniżonej ekspresji. Kolorem czerwonym oznaczono próby, dla których poziom ekspresji był niższy niż wartość progu odcięcia. HTEC, NHBE, Total Larynx - nienowotworowe próby kontrolne, sd - odchylenie standardowe.

Linia komórkowa	FUT3	sd	CEACAM6	sd	CLCA4	sd
UT-SCC-106A	713,28	113,53	21996,71	2852,10	61,39	7,35
UT-SCC-106B	98,13	63,01	219,29	43,59	817,46	226,91
UT-SCC-107	32,90	24,71	15,56	3,12	4,42	1,09
UT-SCC-108	16,81	4,21	6,60	5,38	10,77	1,09
UT-SCC-11	23,40	13,68	10,40	6,22	3,17	0,63
UT-SCC-113	6,57	0,84	18,04	10,98	0	n/a
UT-SCC-116	137,50	43,09	2923,20	311,71	2,63	0,47
UT-SCC-117	83,48	12,70	7,08	2,51	5,32	1,82
UT-SCC-13	43,59	9,88	10,03	3,85	8,21	3,97
UT-SCC-19A	745,29	83,11	2360,70	717,59	5,78	0,94
UT-SCC-19B	612,40	86,66	135,77	29,87	2,47	0,31
UT-SCC-22	265,03	56,37	54,82	16,39	3,80	4,66
UT-SCC-23	343,90	87,08	1298,38	156,69	482,43	90,66
UT-SCC-29	154,52	40,20	2,09	1,95	1,84	0,13
UT-SCC-34	2,56	2,15	8,77	6,19	36,38	10,71
UT-SCC-35	498,57	78,44	76,55	13,97	11,42	6,99
UT-SCC-38	357,88	80,76	321,05	71,32	4,91	9,42
UT-SCC-42B	27,25	3,03	0	n/a	0	n/a
UT-SCC-49	68,12	25,38	247,28	49,61	1,95	0,44
UT-SCC-50	148,74	13,25	38,94	7,82	2,61	1,29
UT-SCC-57	87,93	7,70	917,57	227,46	68,44	12,80
UT-SCC-6A	73,86	26,44	515,56	76,60	0	n/a
UT-SCC-6B	45,68	6,04	824,09	238,41	5,99	0,78
UT-SCC-75	43,46	12,18	3826,12	433,89	1,00	0,08
UT-SCC-8	54,51	6,59	1568,32	437,29	114,56	49,62
HTEC	314,08	91,63	9958,18	2368,07	256,00	106,36
NHBE	244,44	63,82	241,07	67,95	83,38	23,85
Total Larynx	672,47	82,16	4634,93	1807,74	2680,59	381,69
Wartość odcięcia	244,44		241,07		83,38	

Tabela Z10. Szczegółowe wyniki analizy liczby kopii DNA badanych genów. Szarym kolorem zaznaczono średnie log2ratio dla poszczególnych genów; kolorem czerwonym oznaczono zmienioną liczbę kopii DNA genu.

	Pozvcia wg	UT-												
	NCBI36/hg18	SCC-												
		106A	107	11	116	19B	22	29	34	57	6A	35	38	42B
		0,07	0,03	0,35	0,43	0,16	0,16	-0,30	0,02	-0,16	0,22	0,04	0,13	-0,04
		0,03	0,09	0,45	0,33	0,10	0,28	0,04	0,07	0,10	0,12	0,10	0,13	0,07
		0,10	0,01	0,39	0,30	0,15	0,64	-0,02	0,42	0,03	0,07	0,01	0,13	0,03
		0,18	0,15	0,37	0,41	0,14	0,27	-0,01	-0,01	0,10	0,14	0,09	0,11	0,03
47402		-0,02	-0,01	0,44	0,12	-0,11	0,44	0,04	0,23	-0,22	0,06	-0,14	0,15	0,04
ATADZ	chr8:124,401,272-	0,10	0,08		0,50	0,10		0,15		0,09	0,11	-0,01	0,09	0,15
	124,477,886	0,15	0,25		0,55	0,20		0,17		0,14	0,20	0,20	0,50	0,20
		0,17	0,10		0,40	0,19		-0,07		0,11	0,10	-0,01	0,55	0,05
		0,09	-0,15		0,10	-0,05		-0,10		-0,07	0,15	-0,45	0,11	-0,19
		0,12	0,11		0,34	0,03		-0,07		-0,23	0,11	0,05	0,21	0,04
średnie		0,32	0,32		0,45	0,25		0,15		0,21	0,17	0,23	0,05	0,15
log2ratio		0,12	0,09	0,40	0,34	0,11	0,36	-0,01	0,15	0,01	0,14	0,14	0,14	0,14
		0,05	-0,01	0,32	0,35	0,07	0,76	0,04	0,78	0,21	0,00	-0,23	0,14	-0,05
		0,22	0,11	0,48	0,45	0,13	0,29	0,07	0,12	0,07	0,19	0,10	0,22	0,13
		0,23	0,25	0,45	0,45	0,27	0,34	0,09	0,31	0,13	0,06	0,21	0,19	0,17
Ι ΔΡΤΜ4Β		0,05	0,10		0,36	0,02		-0,19		-0,06	0,06	-0,01	0,07	-0,01
LAP I WI4D	chr8:98,856,985- 98,934,006	0,24	0,31		0,44	0,26		0,14		0,17	0,25	0,26	0,33	0,10
		0,18	0,25		0,32	0,25		-0,13		0,11	0,11	0,18	0,28	0,14
		0,24	0,22		0,46	0,16		-0,12		0,18	0,11	0,12	0,19	0,18
		0,33	0,30		0,48	0,34		0,03		0,19	0,13	0,24	0,14	0,26
średnie log2ratio		0,19	0,19	0,42	0,41	0,19	0,46	-0,01	0,40	0,13	0,11	0,11	0,11	0,11
		0,14	-0,11	-0,44	-0,07	-0,16	-0,47	-0,04	0,13	-0,02	-0,12	-0,14	-0,14	-0,06
CDK1	chr10:62,209,905- 62,223,930	0,16	-0,07	-0,10	-0,13	-0,16	-0,08	-0,06	-0,01	-0,09	-0,08	-0,25	0,22	-0,09
CDRI		0,11	0,05	-0,07	0,10	-0,04	0,16	-0,08	0,34	0,13	0,16	-0,20	0,08	0,01
		0,07	0,03		0,10	-0,23		0,02		-0,05	0,00	0,00	-0,04	-0,07
średnie log2ratio		0,12	-0,03	-0,20	0,00	-0,15	-0,13	-0,04	0,15	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01
logzratio		0.12	-0.16	0.32	0.08	0.20	-0.76	0.31	0.07	0.39	-0.03	0.25	0.09	0.27
SERPINH1	chr11:74.950.818-	0.07	-0.30	0.00	-0.04	-0.10	0.00	0.03	0.12	0.22	-0.08	-0.16	0.20	0.10
średnie	74,961,494									-,				
log2ratio		0,09	-0,23	0,16	0,02	0,05	-0,38	0,17	0,10	0,31	-0,05	0,04	0,15	0,18
CEACAM6		-0,01	-0,04	-0,10	0,11	0,05	-0,52	0,02	0,22	0,20	0,00	0,04	0,04	0,04
	chr19:46,951,341-	-0,13	-0,28	0,19	-0,05	-0,03	-0,52	0,00	0,31	0,43	-0,02	-0,21	-0,09	-0,20
średnie log2ratio	46,967,953	-0,07	-0,16	0,05	0,03	0,01	-0,52	0,01	0,27	0,32	-0,01	-0,08	-0,03	-0,08
		-0.31	-0.16	0.03	-0.19	-0.08	-0.39	-0.18	-0.67	0.16	-0.04	-0.28	0.09	-0.10
FUT3		-0.20	-0.09	-,	-0.06	0.15	-,	0.03	-,	0.05	-0.02	0.13	0.08	0.08
	chr19:5,793,899-	-0.38	-0.16		-0.31	-0.08		-0.08		-0.05	-0.21	-0.13	0.08	-0.16
średnie	5,802,485	0.00		0.00	0.40	0.00	0.00	0.00	0.67	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00
log2ratio		-0,30	-0,14	0,03	-0,19	0,00	-0,39	-0,08	-0,67	0,05	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09
		-0,04	-0,01	-0,52	-0,11	-0,19	-0,18	-0,15	-0,27	-0,04	-0,12	-0,37	0,12	-0,18
		-0,01	0,09		-0,04	0,14		0,22		0,07	-0,11	0,15	0,00	0,18
CLCA4	chr1:86,785,347-	0,06	0,26		0,12	0,12		0,13		0,31	-0,08	0,00	-0,04	-0,05
	86,819,020	0,02	0,01		0,06	-0,04		0,01		0,07	-0,13	-0,13	-0,10	0,02
średnie		0.01	0.09	-0.52	0.01	0.01	-0,18	0.05	-0,27	0.10	-0.11	-0.09	0.00	-0.01
log2ratio		0,01	0,00	0,02	0,01	0,01	0,10	0,00	0,2,	0,10	0,11	0,05	0,00	0,01



Rycina Z1. Poziom metylacji DNA promotorów analizowanych genów w LSCC. Poszczególne słupki oznaczają poszczególne dinukloetydy CG genu. UT-SCC - badane linie komórkowe LSCC; KK i MK - badane próby z guzów (materiał kliniczny); W - próby kontrolne - wymazy z jamy ustnej; FM - próba kontrolna o pełnej metylacji; UM - próba kontrolna niemetylowana.



Rycina Z1. cd.



Rycina Z1.cd.



Rycina Z1

3. Suplement 1.

W celu potwierdzenia właściwego doboru technik analizy skutków wyciszania genu *CDK1* w liniach komórkowych LSCC, analogiczne doświadczenia wykonano na linii komórkowej HeLa.

Komórki zostały poddane transfekcji dupleksem siRNA wyciszającym gen *CDK1* (siRNA-A) i kontrolnym (siRNA-N) w taki sam sposób, jak wykonano to dla linii komórkowych LSCC. Następnie przeprowadzono analizy tempa proliferacji z użyciem monitoringu przyżyciowego i żywotności z wykorzystaniem testu kolorymetrycznego (CCK8). Po zakończeniu analiz, komórki poddawano lizie i wykonywano Western blot w celu oszacowania poziomu wyciszenia genu *CDK1*. Oba testy, lizę komórek i Western blot wykonano w warunkach identycznych jak dla linii komórkowych LSCC. Zachowano taki sam sposób kalkulacji tempa proliferacji oraz żywotności.

Nie wykazano różnic w tempie proliferacji analizowanej poprzez monitoring przyżyciowy. Tempo proliferacji komórek poddanych wyciszeniu genu *CDK1* było identyczne z tempem komórek kontrolnych (Tabela Z11.). Dla analizowanych komórek wykazano bardzo wysoki poziom wyciszenia genu *CDK1*: 93% (sd = 3), (Rycina 28.).



Rycina Z2. Wyniki Western blot potwierdzające wyciszenie genu *CDK1* w linii komórkowej HeLa wykorzystanej do analiz tempa proliferacji komórek z użyciem monitoringu przyżyciowego oraz testu kolorymetrycznego (CCK8). siRNA - linia komórkowa transfekowana dupleksem siRNA-A; kontrola - linia komórkowa transfekowana dupleksem siRNA-N.

Następnie wykonany został test wykorzystujący techniki kolorymetryczne do pomiaru żywotności komórek: CCK8. Wykazano, że żywotność komórek HeLa spada po wyciszeniu genu i wynosi 75% po upływie 48 godzin od transfekcji oraz 73% po 72 godzinach (Tabela Z12.). Zmiany obserwowane po 48 i 72 godzinach były istotne statystycznie (test T dla danych sparowanych odpowiednio p = 0,027 i p = 0,004).

Poziom wyciszenia genu *CDK1* w analizowanej linii komórkowej wynosił 88% (sd = 1,22) (Rycina 28).

Obserwowana rozbieżność wyników z obu technik może wynikać ze specyfiki wzrostu komórek badanej linii komórkowej (HeLa). Po uzyskaniu pełnej konfluencji komórki nadal proliferują w górę - tworząc charakterystyczne struktury przestrzenne.

Tabela Z11. Wyniki pomiarów konfluencji mierzonej w poszczególnych punktach czasowych w trakcie monitoringu przyżyciowego linii komórkowej HeLa poddanej wyciszaniu genu CDK1. siRNA - linia komórkowa transfekowana dupleksem siRNA-A; kontrola - linia komórkowa transfekowana dupleksem siRNA-N, sd - odchylenie standardowe.

HeLa														
Czas inkubacji [h]	siRNA	sd	Kontrola	sd										
0	53	0,47	53	1,13										
12	70	5,13	62	4,41										
24	83	3,99	84	6,05										
36	93	4,45	92	2,14										
48	97	3,60	98	0,78										
60	99	1,29	100	0,26										
72	100	0,47	100	0,22										
Tempo proliferacji	47		47											
Zmiana tempa proliferacji			0											

Tabela Z12. Wyniki analizy zmiany tempa proliferacji komórek pod wpływem wyciszenia genu *CDK1* w linii komórkowej HeLa z wykorzystaniem testu kolorymetrycznego (CCK8). siRNA - linia komórkowa transfekowana dupleksem siRNA-A; kontrola - linia komórkowa transfekowana dupleksem siRNA-N, sd - odchylenie standardowe.

	HeLa														
Czas		Abso	orbancja	Żywotność komórek [%]											
iiikubacji	siRNA	sd	Kontrola	sd	Średnia	sd									
24h	0,71	0,02	0,79	0,09	91	8,69									
48h	0,89	0,08	1,18	0,11	75	2,86									
72h	1,17	0,08	1,60	0,09	73	8,53									

4. Suplement 2.

Poziom ekspresji *MYC* w liniach komórkowych LSCC: UT-SCC-34, UT-SCC-106A oraz UT-SCC-107 przeanalizowano wyłącznie na podstawie wyników uzyskanych z mikromacierzy ekspresyjnej (Tabela Z13). Według bazy danych UCSC Genome Browser (NCBI36/hg18) do tego genu przypisanych jest pięć tagów, z których tylko dla jednego: 202431_s_at odnotowano obecność transkryptu (parametr detekcji sygnału określony jako "Present") zarówno w analizowanych liniach komórkowych LSCC jak i próbach kontrolnych. Ekspresja tego tagu podwyższona była w stosunku do trzech prób kontrolnych w jednej linii komórkowej - UT-SCC-34. w pozostałych liniach wzrost poziomu ekspresji obserwowano jedynie w odniesieniu do próby kontrolnej uzyskanej z komórek nabłonka oskrzeli.

Tabela Z13. Analiza ekspresji genu *MYC* w liniach komórkowych płaskonabłonkowego raka krtani (wyniki uzyskane z mikromacierzy ekspresyjnej). Kontrolne próby nienowotworowe RNA: TL - z całkowitej krtani; EC - z komórek nabłonka oskrzeli; LX10 - z prawidłowego nabłonka krtani. P - Obecna ekspresja transkryptu; A - Brak ekspresji transkryptu; I - Wzrost poziomu ekspresji transkryptu hybrydyzującego z tagiem względem próby kontrolnej; D - Spadek poziomu ekspresji transkryptu hybrydyzującego z tagiem względem próby kontrolnej.

	UT-SCC-34						UT-SCC-106A				UT-SCC-107					TL		EC		LX10	
Тад	Poziom	Detekcja i ekspresji	EC	LX10	Poziom	Detekcja	TL EC	LX10	Poziom	Detekcja	TL	EC	LX10	Poziom	Detekcja	poziom	Detekcja	Poziom	Detekcja		
	ekspresji					ekspresji	ekspresji				ekspresji	ekspresji	esji			ekspresji	ekspresji	ekspresji	ekspresji	ekspresji	ekspresji
238381_x_at	1	A	NC	NC	NC	4	Α	NC	NC	NC	14	Α	NC	NC	NC	16	А	9	Α	5	Α
238386_x_at	5	А	NC	NC	NC	10	А	NC	NC	NC	9	Α	NC	NC	NC	18	А	10	А	3	А
202431_s_at	872	Р	1	1	1	649	Р	NC	1	NC	480	Р	NC	1	NC	551	Р	729	Р	203	Р
239931_at	3	А	NC	NC	NC	2	А	NC	NC	NC	1	Α	NC	NC	NC	5	А	3	А	4	Α
244089_at	14	Α	NC	NC	NC	5	A	NC	NC	NC	1	Α	NC	NC	NC	2	A	4	A	2	A

Finansowanie badań:

Grant Narodowego Centrum Nauki nr N N403 153140, kierownik: dr hab. Małgorzata Jarmuż-Szymczak

Grant Narodowego Centrum Nauki nr 2013/11/N/NZ2/02483, Grant Preludium, kierownik: mgr Kinga Bednarek

Projekt pt. "Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski" realizowanego w latach 2011-2012 przez Wojewódzki Urząd Pracy w Poznaniu w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki finansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego.





