



**Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirsztfelda**

**Polska Akademia Nauk we Wrocławiu**

**Laboratorium Glikobiologii**

Anna Urbaniak

**Wpływ białka indukowanego prolaktyną na apoptozę  
komórek raka gruczołu piersiowego wywołaną doxorubicyną**

The role of Prolactin Induced Protein in breast cancer cells apoptosis  
induced by doxorubicin

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem:

**prof. dr hab. n. med. Piotra Dzięgiela** w Laboratorium Glikobiologii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu oraz zakładzie Histologii i Embriologii, katedry Morfologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

*Niniejszą pracę dedykuję mężowi Dariuszowi oraz moim córkom Oli i Marysi  
za miłość i wsparcie*

**Serdeczne podziękowania składam wszystkim tym, którzy przyczynili się do powstania niniejszej rozprawy doktorskiej.**

Szczególnie dziękuję:

**Prof. dr hab. Piotrowi Dzięgielowi i prof. dr hab. Maciejowi Ugorskiemu**

za poświęcony czas, zaproponowanie tematu badań oraz merytoryczną pomoc w trakcie pisania niniejszej rozprawy;

**Prof. dr hab. Marcinowi Czerwińskiemu** za umożliwienie przeprowadzenia badań i wsparcie merytoryczne.

**Koleżankom i Kolegom z:**

Katedry Biochemii i Biologii Molekularnej, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej,  
Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu,

Zakładu Histologii i Embriologii, Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu,

Laboratorium Glikobiologii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN,

za codzienną życzliwość i pomoc.

Badania były finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, w ramach projektu **2016/23/B/NZ5/02647** pt.: „Rola białka Indukowanego Prolaktyną (ang. *Prolactin-Induced Protein-PIP*) w progresji raka gruczołu piersiowego przy zastosowaniu terapii adjuwantowej”.

## Spis treści

Streszczenie.....	6
1. Wstęp.....	11
1.1. Wprowadzenie .....	11
1.2 Ekspresja PIP w stanach fizjologicznych i patologicznych .....	12
1.3 Białko PIP i regulacja jego ekspresji.....	13
1.4. Rola biologiczna białka PIP .....	18
1.5. Rola białka PIP w progresji raka gruczołu piersiowego .....	19
1.6. Apoptoza .....	22
1.7. Molekularne mechanizmy działania doksorubicyny .....	26
1.7.1. Indukowanie apoptozy w wyniku działania doksorubicyny .....	27
2. Cel pracy .....	29
3. Materiały i metody.....	31
3.1. Odczynniki.....	31
3.2. Bufory i roztwory.....	31
3.3. Enzymy .....	33
3.6. Wektory.....	37
3.7. Szczepy bakteryjne.....	38
3.8. Przeciwciała .....	39
3.9. Standardy DNA .....	39
3.10. Standardy białek .....	39
3.11. Podłoża do hodowli bakteryjnych.....	40
3.12. Podłoża do hodowli komórek eukariotycznych P10 Pasożyta <i>Leishmania tarentolae</i> .....	40
3.13. Pożywki hodowlane i roztwory stosowane w pracy z komórkami eukariotycznymi .....	41
3.14. Linie komórkowe.....	42
3.15. Zwierzęta doświadczalne .....	43
3.16. Metody biologii molekularnej .....	44
3.16.1. Izolacja plazmidowego DNA na małą skalę za pomocą zestawu „Plasmid miniprep DNA purification kit ” .....	44
3.16.2. Izolacja plazmidowego DNA na dużą skalę za pomocą zestawu „Plasmid maxi kit Qiagen”.....	45
3.16.3. Izolacja całkowitego RNA z komórek eukariotycznych .....	46

3.16.4. Synteza cDNA na matrycy RNA.....	46
3.16.5. Oznaczanie ilości i czystości RNA.....	47
3.16.6. Rozdział elektroforetyczny DNA i RNA w żelu agarozowym .....	47
3.16.7. Izolacja DNA z żelu agarozowego za pomocą zestawu GeneMatrix Agarose-Out DNA Purification kit .....	47
3.16.8. Reakcja ligacji .....	48
3.16.9. Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi .....	48
3.16.10. Łącuchowa reakcja polimerazy (PCR).....	49
3.16.11. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym (qPCR).....	50
3.16.12. Przygotowanie chemikompetentnych bakterii .....	51
3.16.13. Transformacja bakterii.....	52
3.16.15. Transfekcja i Transdukcja komórek eukariotycznych.....	53
3.16.16 Sekwencjonowanie DNA .....	54
<b>3.17. Hodowle komórkowe .....</b>	<b>54</b>
3.17.1 Prowadzenie hodowli komórek adherentnych.....	54
3.17.2. Prowadzenie hodowli komórek nieadherentnych P10 pasożyta <i>Leishmania tarentolae</i> .....	55
3.17.3. Zamrażanie i rozmrażanie eukariotycznych komórek adherentnych .....	55
3.17.4. Zamrażanie i rozmrażanie komórek P10 <i>Leishmania tarentolae</i> .....	56
3.17.5. Prowadzenie hodowli komórek adherentnych w obecności czynników stresowych .....	56
<b>3.18. Testy komórkowe <i>in vitro</i> .....</b>	<b>56</b>
3.18.1 Oznaczanie żywotności komórek za pomocą testu MTT .....	56
3.18.2. Cytometria przepływowa.....	57
3.18.3 Analiza cyklu komórkowego z użyciem jodku propidyny.....	57
3.18.4 Wykrywanie komórek apoptotycznych poprzez pomiar poziomu aktywnych kaspaz 3/7. ....	58
3.18.5 Wykrywanie komórek apoptotycznych na podstawie oznaczenia aneksyny V .....	59
<b>3.19. Metody biochemiczne i immunochemiczne .....</b>	<b>59</b>
3.19.1 Przygotowanie lizatów komórkowych .....	59
3.19.2. Izolacja białek membranowych z ludzkich linii komórkowych raka gruczołu piersiowego.....	60
3.19.3 Ekspresja i oczyszczanie białka rekombinowanego PIP-LEXSY.....	61

3.19.4. Oznaczanie ilościowe białka metodą biscynchoninową (BCA) wg. Smith i wsp., 1985) .....	61
3.19.5 Elektroforeza w żelu poliakryloamidowym (wg Laemmliego i wsp. 1970). 62	
3.19.6. Wykrywanie białek metodą immunoblotingu (Western blotting wg. Towbin i wsp. 1979) .....	63
3.19.7. Pobieranie materiału .....	64
3.19.8. Reakcje immunohistochemiczne i Metoda TUNEL.....	65
<b>3.20. Badania <i>in vivo</i>.....</b>	<b>67</b>
3.20.1 Przeszczep ortotopowy ludzkich komórek raka gruczołu piersiowego myszom bezgrasicznym szczepu Balb/c <sup>nu/nu</sup> .....	67
3.20.2 Pomiar objętości guzów nowotworowych.....	67
3.20.3 Badanie wpływu białka PIP na przeszczepiane guzy ludzkiego raka gruczołu piersiowego w modelu myszy bezgrasicznych leczonych doksorubicyną.....	67
<b>3.21. Analiza statystyczna.....</b>	<b>68</b>
<b>4. Wyniki.....</b>	<b>70</b>
<b>4.1. Charakterystyka linii komórkowych ludzkiego raka gruczołu piersiowego pod względem ekspresji PIP.....</b>	<b>70</b>
<b>4.2. Utworzenie komórek MDA-MB-231 z neoekspresją białka PIP .....</b>	<b>71</b>
<b>4.3. Utworzenie komórek T47D z zahamowaną ekspresją białka PIP.....</b>	<b>76</b>
<b>4.3.1. Otrzymanie komórek T47D z zahamowaną ekspresją <i>PIP</i> za pomocą shRNA komplementarnego do mRNA <i>PIP</i>.....</b>	<b>76</b>
<b>4.4. Przeżywalność oraz podatność na apoptozę ludzkich komórek T47D i MDA-MB-231 raka gruczołu piersiowego z różną ekspresją PIP poddawanych działaniu wybranych cytostatyków stosowanych w terapii raka gruczołu piersiowego.....</b>	<b>78</b>
4.4.1. Doksorubicyna.....	78
4.4.2. 4-hydroksycyklofosfamid.....	82
4.4.3. Paklitaksel.....	85
<b>4.5. Potencjał proliferacyjny komórek T47D i MDA-MB-231 z różną ekspresją białka PIP.....</b>	<b>89</b>
<b>4.5. Badania <i>in vivo</i>.....</b>	<b>95</b>
4.5.1. Zdolność komórek MDA-MB-231/puro i MDA-MB-231/PIP do wzrostu w postaci guzów po ich ortotopowym przeszczepieniu myszom nu/nu, które poddawano leczeniu za pomocą doksorubicyny .....	95
<b>4.6. Otrzymanie rekombinowanego białka PIP w systemie pLEXY wykorzystującego komórki P10, <i>Leishmania terantolae</i> .....</b>	<b>101</b>

4.7. Wiązanie białka PIP do powierzchni komórek MDA-MB-231 raka gruczołu piersiowego oraz jego działanie pro-apoptotyczne w obecności dokсорubicyny.. 103

<b>Dyskusja.....</b>	<b>107</b>
<b>Wnioski .....</b>	<b>115</b>
<b>Literatura .....</b>	<b>116</b>

## Wykaz używanych skrótów

**AIF** – czynnik indukujący apoptozę (*ang. apoptosis inducing factor*)

**AKT/PKB** – kinaza białkowa B (*ang. protein kinase B*)

**AMF** – współczynnik aktywności autokrynej (*ang. autocrine motility factor*)

**Apaf -1** – czynnik aktywujący proteazy w apoptozie (*ang. apoptosis protease activating factor-1*)

**AP1**- białko aktywujące 1 (*ang. activator protein 1*)

**ATP** – adenozy-5'-trifosforan

**Bad** – białko proapoptotyczne z podrodziny *BH3-only* (*ang. Bcl-2-associated death promoter*)

**Bak** – białko proapoptotyczne z podrodziny Bax (*ang. Bcl-2 homologous antagonist killer*)

**Bax** – białko proapoptotyczne z rodziny Bcl-2 (*ang. Bcl-2-associated X protein*)

**BCA** – kwas bicynchoninowy

**Bcl-2** – rodzina białek pro- i antyapoptotycznych oraz białko antyapoptotyczne (*ang. B-cell lymphoma 2*)

**Bcl-xL** – inhibitorowe białko apoptozy (*ang. B-cell lymphoma-extra large*)

**Bcl-xS** – białko proapoptotyczne (*ang. B-cell lymphoma-extra small*)

**BH1-4** – domeny homologii z Bcl-2 (*ang. Bcl-2 homology domain*)

**Bid** – białko proapoptotyczne z podrodziny *BH3-only* (*ang. BH3 interacting-domain death agonist*)

**Bik** – białko proapoptotyczne (*ang. Bcl-2-interacting killer*)

**BIR** – domena białek IAP (*ang. baculoviral IAP-like repeats*)

**CARD** – (*ang. caspase activation and recruitment domains*)

**cDNA** – komplementarny DNA (*ang. complementary DNA*)

**CD4** – glikoproteina zbudowana z czterech podjednostek D1-D4 (*ang. cluster of differentiation 4*)



**CREB 1** – czynnik transkrypcyjny, białko regulujące ekspresję genów zależnych od cAMP.

**DAXX** – białko wiążące domenę śmierci DD (*ang. death-associated protein 6*)

**DD** – domena śmierci (*ang. death domain*)

**DED** – efektorowa domena śmierci (*ang. death effector domain*)

**DISC** – kompleks sygnału indukującego śmierć (*ang. death inducing signaling complex*)

**DMSO** – dimetylosulfotlenek

**DNA** – kwas deoksyrybonukleinowy (*ang. deoxyribonucleic acid*)

**DOX** – doksorubicyna (*ang. Doxorubicin*)

**DR 3** – receptor śmierci 3 (*ang. death receptor 3*)

**DRB** – daunorubicyna (*ang. Daunorubicin*)

**ER** – retikulum endoplazmatyczne (*ang. endoplasmatic reticulum*)

**ERK1/2** – kinazy 1/2 regulowane zewnątrzkomórkowo (*ang. extracellular regulated kinase 1 and 2*)

**EP-GP** – glikoproteina ślinianek (*ang. extra-parotid glycoprotein, EP-GP*)

**FACS** – cytometria przepływowa (*ang. fluorescence activated cell sorting*)

**FADD** – domena śmierci związana z receptorem Fas (*ang. Fas-associated death domain*)

**Fas/CD95** – (*ang. cluster of differentiation 95*)

**FBS** – płodowa surowica bydlęca (*ang. fetal bovine serum*)

**FITC** – izotiocyanian fluoresceiny (*ang. fluorescein isothiocyanate*)

**GCDFP-15** – białko treści torbieli zmian włóknisto-torbielowatych gruczołu piersiowego (*ang. gross cystic disease fluid protein 15, GCDFP-15*)

**gp-17** – glikoproteina-17 (*ang. glycoprotein-17, gp-17*)

**HER-2/ ErbB2** – receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 (*ang. human epidermal growth factor receptor 2*)

**HIV** – ludzki wirus niedoboru odporności (*ang. human immunodeficiency virus*)

**HRK** – białko aktywujące apoptozę (hara-kiri) (*ang. activator of apoptosis hara-kiri*)

**HRP** – peroksydaza chrzanowa (*ang. horseradish peroxidase*)

**IAP** – białko z rodziny inhibitorów apoptozy (*ang. inhibitory apoptosis proteins*)

**ICE** – nazwa pochodzi od pierwszej w komórkach ssaków zidentyfikowanej kaspazy konwertującej interleukinę 1 $\beta$  (*ang. interleukin-1 $\beta$  converting enzyme*)

**ILK1** – kinaza 1 związana z integryną (*ang. integrin linked kinase 1*)

**IHC** – immunohistochemia (*ang. immunohistochemistry*)

**JNK** – kinaza białkowa fosforylująca N-koniec białka Jun (*ang. c-Jun N-terminal kinase*)

**LEXSY** – eukariotyczny system ekspresji w pasożycie *Leishmania tarentolae* (*ang. eukaryotic protein expression in Leishmania tarentolae*)

**MAPK** – kinaza aktywowana mitogenem (*ang. mitogen activated protein kinase*)

**MDR1** – białko oporności wielolekowej 1 (*ang. multidrug resistance protein 1*)

**MDM2** – E3 ligaza ubikwitynowa (*E3 ubiquitin-protein ligase, Mdm2*)

**MMP2** – metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 2 (*ang. matrix metalloproteinase 2*)

**mRNA** – matrycowy RNA (*ang. messenger RNA*)

**MSK** – kinaza MSK (*ang. mitogen and stress activated kinase*)

**MTT** – (*ang. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*)

**NAIP** – białko należące do rodziny inhibitorów apoptozy IAP (*ang. neuronal apoptosis inhibitory protein*)

**NF- $\kappa$ B** – czynnik transkrypcyjny zidentyfikowany w limfocytach B zaangażowany w ekspresję łańcucha lekkiego typu kappa immunoglobulin (*ang. nuclear factor kappa activated B cells*)

**NOXA** – białko proapoptotyczne z podrodziny *BH3-only* (od łacińskiego słowa ‘*noxae*’ – uszkodzenie)

**PCR** – reakcja łańcuchowa polimerazy (*ang. polymerase chain reaction*)

**PI3-K** – kinaza fosfatidyloinozytolu 3 (*ang. phosphatidylinositol-3-kinase*)

**PKB** – kinaza białkowa B (*ang. protein kinase B*)

**PRL** – *human* Prolactin

**qPCR** – reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym

**pNTR75** – receptor neurotrofin (*ang. p75 neurotrophin receptor/low affinity nerve growth factor receptor*)

**PUMA** – białko proapoptyczne z podrodziny *BH3-only* (*ang. p53 upregulated modulator of apoptosis*)

**Rb** – białko retinoblastoma (*ang. retinoblastoma protein*)

**RIP** – białko oddziałujące z receptorem Fas; kinaza ser/thr (*ang. receptor interacting protein*)

**RNA** – kwas rybonukleinowy (*ang. ribonucleic acid*)

**ROS** – reaktywne formy tlenu (*ang. reactive oxygen species*)

**RSK** – kinazy rybosomalne S6 (*ang. ribosomal protein S6*)

**RUNX 2** – czynnik transkrypcyjny RUNX2 (*ang. runt-related transcription factor 2 gene*)

**SABP** – białko nasienia wiążące aktynę (*ang. seminal actin-binding protein*)

**SDS** – sól sodowa siarczuanu dodecyłu

**Smac/DIABLO** – (*ang. second mitochondria-derived activator of caspases*)

**STAT5** – czynnik transkrypcyjny 5 (*ang. signal transduced and activator of transcription 5*)

**T/EDTA** – roztwór trypsyna/etylenodiaminotetraoctan

**TRADD** – (*ang. tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein*)

**TRAF** – białka adaptorowe (*ang. TNF receptor-associated factor*)

**TRAIL-R1** –receptor dla liganda martwicy nowotworu indukującego apoptozę (*ang. TNF-related apoptosis-inducing ligand-receptor*)

**TUNEL** – (*ang. terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*)

**TNFR1** –receptor czynnika martwicy nowotworu (*ang. tumor necrosis factor receptor*)

**VEGF** – czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (*ang. vascular endothelial growth factor*)

**VEGFR** – receptor czynnika wzrostu śródbłónka naczyniowego (*ang. vascular endothelial growth factor receptor*)

**XIAP** – inhibitor apoptozy sprzężony z chromosomem X (*ang. X chromosome-linked inhibitor of apoptosis*)

**XIAF** –XAF1 – czynnik 1. związany z XIAP; antagonist IAP (*ang. XIAP-associated factor 1*)

**ZAG** –  $\alpha$ -2-glikoproteiną zależną od cynku (*ang. zinc-alpha-2-glycoprotein*)

## Streszczenie

### **Wpływ białka indukowanego prolaktyną na apoptozę komórek raka gruczołu piersiowego wywołaną doksorubicyną**

*Anna Urbaniak*

Ostatnie badania Jabłońskiej i wsp. (2016 - zespołu prof. Dziegiela) wykazały, że białko indukowane prolaktyną (*ang. Prolactin Induced Protein, PIP*) może być pozytywnym czynnikiem rokowniczym w raku gruczołu piersiowego oraz, może mieć swój udział w odpowiedzi tego nowotworu na chemioterapię. Pokazano, że guzy pacjentek z brakiem lub niskim poziomem PIP w komórkach nowotworowych są znacznie bardziej odporne na leczenie doksorubicyną i cyklofosfamidem niż guzy od pacjentek z wysokim poziomem jego ekspresji (Jabłońska i wsp., 2016). Dodatkowo wykazano, iż poziomy ekspresji mRNA *PIP* jak i białka, zmniejszają się wraz ze wzrostem stopnia złośliwości G a jego ekspresja jest najniższa w przypadku potrójnie negatywnych raków gruczołu piersiowego (ER-, PR-, HER 2-) o złym rokowaniu (Jabłońska i wsp., 2016). Z klinicznego punktu widzenia istotny jest również fakt, iż przypadki z wyższą ekspresją PIP charakteryzowały się dłuższymi przeżyciami wolnymi od wznowy oraz wolnymi od przerzutów (Hähnel i wsp., 1996, Jabłońska i wsp., 2016).

Podsumowując, dane te sugerują iż PIP może bezpośrednio wpływać na odpowiedź raków gruczołu piersiowego, na standardową chemioterapię. W celu weryfikacji powyższej hipotezy podjęto badania, których przedmiotem było określenie wpływu tego białka na przeżywalność komórek raka gruczołu piersiowego i apoptozę indukowaną wybranymi cytostatykami tj. doksorubicyną, 4-hydroksycyklofosfamidem i paklitakselem. Badania te przeprowadzono przy użyciu komórek raka gruczołu piersiowego MDA-231/PIP z neoekspresją białka PIP reprezentującego model funkcjonalny (*ang. gain of function phenotype*) oraz komórek T47Dpuro/shPIP z wyciszoną ekspresją tego białka PIP reprezentujących model niefunkcjonalny (*ang. loss of function phenotype*).

Uzyskane wyniki *in vitro* wykazały, że komórki raka gruczołu piersiowego MDA-231/PIP z neoekspresją PIP charakteryzują się zwiększoną wrażliwością na stosowane ww. cytostatyki w porównaniu do komórek kontrolnych MDA-231/PURO bez ekspresji tego białka. Z drugiej strony komórki T47D raka gruczołu piersiowego z wyciszoną ekspresją PIP (T47Dpuro/shPIP) były mniej wrażliwe na zastosowane cytostatyki w porównaniu do komórek kontrolnych (T47Dpuro/ctrlsh) z wysoka ekspresją PIP.

Badania te potwierdzono w wykonanym eksperymencie *in vivo* na modelu myszy bezgrasiczych. Myszy z nowotworami ortotopowymi utworzonymi przez przeszczepione ludzkie komórki (MDA-231/PIP) lepiej reagowały na leczenie doksorubicyną w porównaniu z myszami obciążonymi nowotworami utworzonymi przez komórki kontrolne (MDA-231/PURO) bez ekspresji tego białka. Podsumowując, badania te potwierdziły dane kliniczne i wykazały, że PIP jest bezpośrednio odpowiedzialny za zwiększenie wrażliwości komórek raka gruczołu piersiowego na apoptozę indukowaną przez leki cytotoksyczne.

Rola białka PIP w progresji raka gruczołu piersiowego nie została w pełni wyjaśniona. Jak dotąd większość badań koncentrowała się na zaangażowaniu PIP w mechanizm proliferacji komórek raka gruczołu piersiowego, jednak wyniki te okazały się niespójne. Dlatego przy użyciu obu modeli komórkowych przeprowadzono analizę cyklu komórkowego i nie stwierdzono różnic w proliferacji między komórkami raka gruczołu piersiowego z wysokim poziomem PIP (MDA-231/PIP i T47Dpuro/ctrlsh) a komórkami raka gruczołu piersiowego bez ekspresji PIP (MDA-231/PURO i T47Dpuro /shPIP). Dane te nie potwierdziły tezy dotyczącej kluczowej roli PIP w proliferacji komórek raka gruczołu piersiowego i są zgodne z naszą sugestią dotyczącą zaangażowania PIP w apoptozę tych komórek.

Ogólnie przyjmuje się, że PIP jest białkiem wydzielniczym i działa jako białko zewnątrzkomórkowe. Dlatego właśnie wykorzystano rekombinowane białko PIP (PIP-LEXSY), aby zademonstrować wiązanie PIP do powierzchni komórek raka gruczołu piersiowego. Za pomocą cytometrii przepływowej stwierdzono, że PIP wiąże się specyficznym z powierzchnią komórek MDA-MB-231, a stosując technikę western blot wykazano również, że PIP wiąże się z białkiem błonowym o przypuszczalnej masie cząsteczkowej około 55 kD, które prawdopodobnie reprezentuje jego specyficzny receptor. Funkcjonalną rolę PIP jako białka wydzielniczego potwierdzono również eksperymentalnie, wykazując, że rozpuszczalne białko PIP zwiększa wrażliwość

komórek MDA-MB-231 na dokсорubicynę. Podsumowując, po raz pierwszy wykazaliśmy, że PIP wpływa bezpośrednio na komórki raka gruczołu piersiowego w indukowaniu apoptozy przez leki cytotoksyczne. Według naszych danych rola PIP w progresji raka gruczołu piersiowego wydaje się bardziej związana z jego właściwościami proapoptotycznymi niż pro-proliferacyjnymi. Potwierdziliśmy również, że PIP działa jako białko wydzielnicze i po raz pierwszy wykazaliśmy jego wiązanie ze specyficznym białkiem błony komórkowej. Jednak zrozumienie dokładnego mechanizmu molekularnego działania PIP wymaga jeszcze dalszych badań.

## The role of Prolactin Induced Protein in breast cancer cells apoptosis induced by doxorubicin

*Anna Urbaniak*

Studies by Jabłońska et al. (2016 – team of prof. Dziegiel) shown that Prolactin Induced Protein (PIP) can be a positive prognostic factor in breast cancer (BC) and plays role in breast cancer cell response to chemotherapy. It was shown that tumors from patients with low level or lack of PIP expression are significantly more resistant to doxorubicin and cyclophosphamide therapy than tumors from patients with high level of PIP (Jabłońska et al., 2016). Additionally, it was shown that the levels of PIP mRNA and protein decrease along with increasing tumor malignancy grade G and that its expression is the lowest in triple-negative (ER-, PR-, HER-2-) patients with poor prognosis (Jabłońska et al., 2016). From clinical point of view, it is also important that cases with high PIP expression were characterized by longer disease-free and overall survival (Hähnel et al., 1996; Jabłońska et al., 2016). Taken together, this data suggest that PIP may directly affect the sensitivity of breast cancers to adjuvant chemotherapy. Therefore, the present studies were undertaken to verify this hypothesis and define the role of PIP in breast cancer cell survival and apoptosis induced by cytostatics: doxorubicin, 4-hydroxycyclophosphamide and paclitaxel. These studies were conducted using breast cancer MDA-MB-231 cells with neoexpression of PIP, representing *gain of function phenotype*, and breast cancer T47D cells with suppressed expression of PIP, representing *loss of function phenotype*. Our *in vitro* results showed that breast cancer MDA-MB-231 cells with high PIP expression (MDA-231/PIP) were characterized by increased sensitivity to these cytotoxic drugs than control MDA-MB-231 cells with no expression of this protein (MDA-231/PURO). On the other hand, breast cancer T47D cells with suppressed expression of PIP (T47D puro/shPIP) were less sensitive to cytostatics than control T47D with high expression of PIP (T47D puro/ctrlsh).

This data was confirmed by *in vivo* experiments using nude mice model. Mice with orthotopically tumors formed by transplanted MDA-231/PIP cells with high expression of PIP responded better to doxorubicin treatment in comparison to mice bearing tumors formed by transplanted MDA-231/PURO with no expression of this



protein. In summary, these experimental studies confirmed the clinical data, and revealed that PIP is directly responsible for increased sensitivity of breast cancer cells to apoptosis induced by cytotoxic drug.

The role of the PIP protein in the progression of breast cancer has not been fully explained. The majority of studies, so far, concentrated on the involvement of PIP in proliferation pathway of breast cancer cells, however, these studies brought inconsistent results. Therefore, using both cellular models cell cycle analysis was performed, and no differences in proliferation between breast cancer cells expressing high level of PIP (MDA-231/PIP and T47Dpuro/ctrlsh) and breast cancer cells without expression of PIP (MDA-231/PURO and and T47Dpuro/shPIP) were found. This data did not confirmed the previous proposal on the key role of PIP in the proliferation of breast cancer cells and are in agreement with our proposal on the involvement of PIP in apoptosis of these cells.

It is generally accepted that PIP is a secretory protein and act as a extracellular protein. Therefore, that's why using the recombinant PIP protein (PIP-LEXSY), to demonstrate the binding of PIP to the surface of breast cancer cells. It was found using flow cytometry that PIP binds specifically to the surface of MDA-MB-231 cells and, using western blotting, it was also shown that PIP binds to membrane protein of supposed molecular mass about 55 kD, which probably represent its specific receptor. The functional role of PIP as secretory protein was also confirmed by experiment showing that soluble PIP protein increased the sensitivity of MDA-MB-231 cells to doxorubicin.

In summary, we have shown for the first time that PIP plays direct role in the induction of apoptosis in breast cancer cells by cytotoxic drugs. According to our data, PIP role in breast cancer progression seems more related to its pro-apoptotic than pro-proliferative properties. We have also confirmed that PIP acts as secretory protein and showed for the first time its binding to specific cell membrane protein. However, understanding the exact molecular mechanism of PIP action await further studies.

## 1. Wstęp

### 1.1. Wprowadzenie

Jedną z głównych przyczyn niepowodzeń w leczeniu chorych na nowotwory złośliwe jest oporność ich komórek na chemioterapię. Zmiany nowotworowe w wielu wypadkach wykrywane są w późnym stadium zaawansowania, a komórki tworzące guz są heterogenne, co sprawia, że ich wrażliwość na chemioterapeutyki, nawet na etapie guza *in situ*, jest zróżnicowana. Część z tych komórek ulega apoptozie, ale wiele z nich jedynie spowalnia swój podział lub przechodzi do puli komórek nie dzielących się, określanych jako „komórki o potencjale komórek macierzystych nowotworowych”. Obecność takich komórek w obrębie guza może prowadzić do oporności na stosowane cytostatyki i po zaprzestaniu leczenia powodować ponowny wzrost guza (Wilson GD 2001). Dlatego tak istotna w ostatnich czasach stała się identyfikacja profili genowych, które mogłyby określać podatność danego nowotworu na zastosowane leczenie. Analiza funkcji genów wytypowanych jako swoiste pozytywne markery predykcyjne w leczeniu raka gruczołu piersiowego pozwala podzielić je na dwie grupy. Jedną z nich to geny, których ekspresja wzmacnia działanie leków cytotoksycznych w sposób bezpośredni, poprzez aktywację szlaków programowanej śmierci komórki. Drugą grupą to geny, których ekspresja powoduje uwrażliwienie nowotworu na działanie danego cytostatyku (Halett i wsp., 2012).

W przypadku raka gruczołu piersiowego wykazano, że pacjentki, u których stwierdzono brak lub niski poziom ekspresji białka indukowanego prolaktyną (*ang. prolactin induced protein, PIP*) odpowiadają w sposób istotnie słabszy na leczenie doksorubicyną i cyklofosfamidem (Jabłońska i wsp., 2016).

Jak na to wskazują liczne badania, białko PIP odgrywa istotną rolę w rozwoju i progresji raka gruczołu piersiowego (Naderi wsp., 2012, 2015; Baniwal i wsp., 2013), jednak jego rola w tych procesach jest niejasna i dotąd nie w pełni wyjaśniona.

## 1.2 Ekspresja PIP w stanach fizjologicznych i patologicznych

Pod koniec XX wieku w płynie wypełniającym torbiele gruczołu piersiowego wykryto i opisano grupę białek, wśród których zidentyfikowano białko, które nazwano białkiem treści torbieli zmian włóknisto-torbielowatych gruczołu piersiowego (*ang. gross cystic disease fluid protein 15, GCDFP-15*) (Haagensen i wsp., 1979; Mazoujan i wsp., 1983, 1984, 1989). Jednocześnie, Shiu i Iwasiow (1985) zidentyfikowali i opisali kwaśne białko o masie cząsteczkowej 16,5 kDa występujące w dużych ilościach w pożywce znad hodowli komórek T47D raka gruczołu piersiowego. Zaobserwowali oni, że poziom tego białka istotnie wzrasta po indukcji prolaktyną (*ang. Prolactin, PRL*), co ostatecznie przyczyniło się do nadania mu nazwy białko indukowane prolaktyną (*ang. prolactin-induced protein, PIP*). Białko PIP okazało się tożsame z białkiem GCDFP-15 (Shiu i Iwasiow, 1985; Murphy i wsp., 1987). W krótkim czasie po tych pierwszych doniesieniach, obecność PIP, ale pod takimi nazwami jak glikoproteina-17 (*ang. glycoprotein-17, gp-17*), białko nasienia wiążące aktynę (*ang. seminal actin-binding protein, SABP*) i glikoproteina ślinianek (*ang. extra-parotid glycoprotein, EP-GP*) wykryto w różnych płynach ustrojowych i tkankach (Akiyama i wsp., 1990; Schaller i wsp., 1991; Schenkels i wsp., 1997; Caputo i wsp., 1999). Dotychczas białko PIP zidentyfikowano w nasieniu, ślinie, mleku, łzach, wydzielinie usznej, wydzielinie gruczołów potowych, w płynie owodniowym, łożysku oraz we krwi ciężarnych kobiet (Haagensen i wsp., 1980; Rathman i wsp., 1989; Schaller i wsp., 1991). Obecność mRNA *PIP* wykrywano najczęściej w gruczołach ślinowych (59%) i gruczołach łzowych (16,2%), a więc narządach posiadających funkcję wydzielniczą, rzadziej w gruczole krokowym (8,3%), mięśniach (2,87%) oraz innych narządach (10,67%) (Hassan i wsp., 2009). Ponadto, wykorzystując technikę RT-qPCR, niską ekspresję mRNA *PIP* stwierdzono również w mózgu i płynie mózgowo-rdzeniowym, płucach, jajnikach, śledzionie, sercu, żołądku i pęcherzu moczowym (Tian i wsp., 2004)

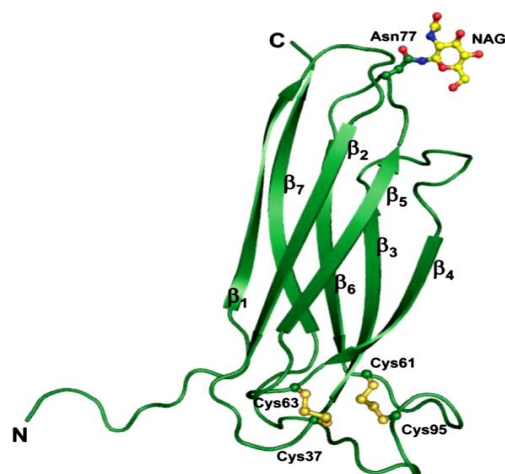
Liczne publikacje wskazują na wysoki poziom ekspresji PIP w nowotworach typu apokrynowego (Mazoujan i wsp., 1983), przy czym zwiększony poziom białka PIP obserwowano przede wszystkim w raku gruczołu piersiowego (Gangadharan i wsp., 2018). Podwyższone ilości tego białka stwierdzono również w rakach gruczołu krokowego, gruczołów potowych i gruczołów ślinowych (Tian i wsp., 2004). Należy podkreślić, że informacje dotyczące ekspresji PIP w prawidłowych i zmienionych

nowotworowo tkankach gruczołu piersiowego są do pewnego stopnia sprzeczne. We wczesnych badaniach wykazywano, że w prawidłowym nabłonku gruczołu piersiowego PIP jest nieobecny lub jego ekspresja jest bardzo niska, podczas gdy w raku gruczołu piersiowego PIP jest obecny w dużych ilościach (Myal i wsp., 1998). Z kolei, późniejsze badania pokazały, że ekspresja PIP jest niższa w zaawansowanym raku gruczołu piersiowego typu apokrynowego i raku inwazyjnym w porównaniu z rakiem *in situ* i sąsiadującą tkanką prawidłową (Naderi i wsp., 2012), i maleje ona wraz ze stopniem zaawansowania nowotworu (Gangadharan i wsp., 2018).

### 1.3 Białko PIP i regulacja jego ekspresji

Ludzkie białko PIP jest syntezowane w postaci białka prekursorowego utworzonego ze 146 aminokwasów (Hassan i wsp., 2008, 2009), które po odcięciu peptydu sygnałowego zbudowanego z 28 aminokwasów, tworzy białko sekrecyjne o teoretycznej masie cząsteczkowej (masa cząsteczkowa aminokwasów bez komponenty cukrowej) równej 13,506 kDa. Ponieważ białko PIP jest glikoproteina, jego względna masa cząsteczkowa, wyznaczona za pomocą elektroforezy SDS-PAGE, wynosi 14 - 20 kDa i zależy od pochodzenia tkankowego tego białka (Schaller i wsp., 1991). Łańcuch N-glikanu, przyłączony do reszty asparaginy w pozycji 77 (Asn77), stanowi około 8 - 22% masy tej glikoproteiny i utworzony jest przez reszty mannozy, galaktozy, fukozy, N-acetylogalaktozaminy, N-acetyloglukozaminy oraz kwasu sjałowego (Schaller i wsp., 1991; Wiegandt i wsp., 2018). W zależności od pochodzenia tkankowego, ma ono strukturę dwu- lub trzy-antenową i zakończone jest resztą/resztami fukozy i kwasu sjałowego (Toth i wsp., 1988; Rathman et al. 1989; Wiegandt i wsp., 2018). Konsekwencją tej post-translacyjnej modyfikacji jest występowanie białka PIP w dwóch glikoformach o masach cząsteczkowych: 16,5 kDa i 14 kDa (Shiu i Iwasiow, 1985). Glikoformy te są obecne w ślinie oraz pożywce znad hodowli komórek T47D raka gruczołu piersiowego (Shiu i Iwasiow, 1985; Caputo i wsp., 2003). PIP jest białkiem o punkcie izoelektrycznym 4,8 – 5,47, na którego N-końcu znajduje się cykliczna pochodna glutaminy – piroglutaminy (Schaller i wsp., 1991; Hassan i wsp., 2008). Może ono tworzyć dimery w ślinie i tetrametry w ludzkim płynie nasiennym oraz wydzielinie z torbieli gruczołu piersiowego (Autiero i wsp., 1995).

W 2008 roku Hassan i wsp. (2008) określili strukturę przestrzenną kompleksu PIP z  $\alpha$ -2-glikoproteiną zależną od cynku (*ang. Zinc-Alpha-2-Glycoprotein, ZAG*) (Hassan i wsp., 2008) (**Ryc.1**). Wykazali oni, że łańcuch polipeptydowy PIP zbudowany jest z siedmiu nici  $\beta$  i siedmiu  $\beta$ -skrętów tworzących razem strukturę  $\beta$ -harmonijki zorganizowanej w postaci „kanapki”, ze względu na wysoce hydrofobowy charakter reszt aminokwasowych, z pustą przestrzenią wewnątrz (Hassan i wsp., 2008). PIP swoją budową przestrzenną przypomina siódmą domenę fibronektyny typu III, aczkolwiek jest ona tylko w 13% identyczna z sekwencją aminokwasową białka PIP. Analiza struktury trzeciorzędowej białka PIP wykazała obecność dwóch mostków dwusiarczkowych utworzonych pomiędzy resztami cystein 37 i 63 oraz 61 i 95 (Schaller i wsp., 1991; Hassan i wsp., 2008).



**Ryc. 1 Model białka PIP.** Białko PIP zbudowane jest z siedmiu  $\beta$  nici i siedmiu  $\beta$ -skrętów tworzących strukturę typu  $\beta$ -harmonijki. Łańcuch N-glikanu przyłączony jest do asparaginy w pozycji 77 (Asn77). Białko to w swojej strukturze trzeciorzędowej posiada dwa mostki dwusiarczkowe utworzone pomiędzy resztami Cys37 i Cys63 oraz Cys61 i Cys95 (Hassan i wsp., 2008; Xie i wsp., 2009).

Lokalizację chromosomalną genu *PIP* i jego sekwencję nukleotydową opisali po raz pierwszy Myal i wsp., którzy w swoich badaniach wykorzystali komórki T47D raka gruczołu piersiowego. Gen *PIP* zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 7 w pozycji q32-36 (Myal i wsp., 1991). Co ciekawe, mutacje w obrębie chromosomu 7 należą do najczęstszych nieprawidłowości cytogenetycznych stwierdzanych w ludzkim

raku gruczołu piersiowego. Chromosom 7 posiada wiele miejsc wrażliwych na złamanie, na przykład FRA 7G, FRA 7H, czy FRA 7I (Autiero i wsp., 1999, Autiero i wsp., 2002, Ciullo M., i wsp., 2002). Miejsca te znajdują się w rejonach: 7q32.2, 7q33.3 i 7q35 (Mishmar i wsp., 1998; Ciullo i wsp., 2002; Auteiro i wsp., 2002). Zaproponowano, że złamanie chromosomu 7 w pozycji FRA 7I było przyczyną powstania palindromowej duplikacji genu *PIP* i wzmożonej konstytutywnej ekspresji tego białka obserwowanej w komórkach T47D (Ciullo i wsp., 2002; Autiero i wsp., 2002).

Gen *PIP* obejmujący 7000 nukleotydów i zbudowany z czterech egzonów oraz trzech intronów ulega transkrypcji jako jeden, 591 nukleotydowy, mRNA (Myal i wsp. 1991). Istnieje niewiele doniesień na temat ewolucyjnego pochodzenia genu *PIP*. Jego sekwencja u małp naczelnych: szympanśów (*Pan troglodytes*), goryli (*Gorilla gorilla*), orangutanów (*Pongo pygmaeus*) i gibona (*Hylobates agilis*) sugeruje, że gen ten mógł powstać jako wynik pozytywnej selekcji na skutek działania układu odpornościowego i patogenów (Osawa i wsp., 2004).

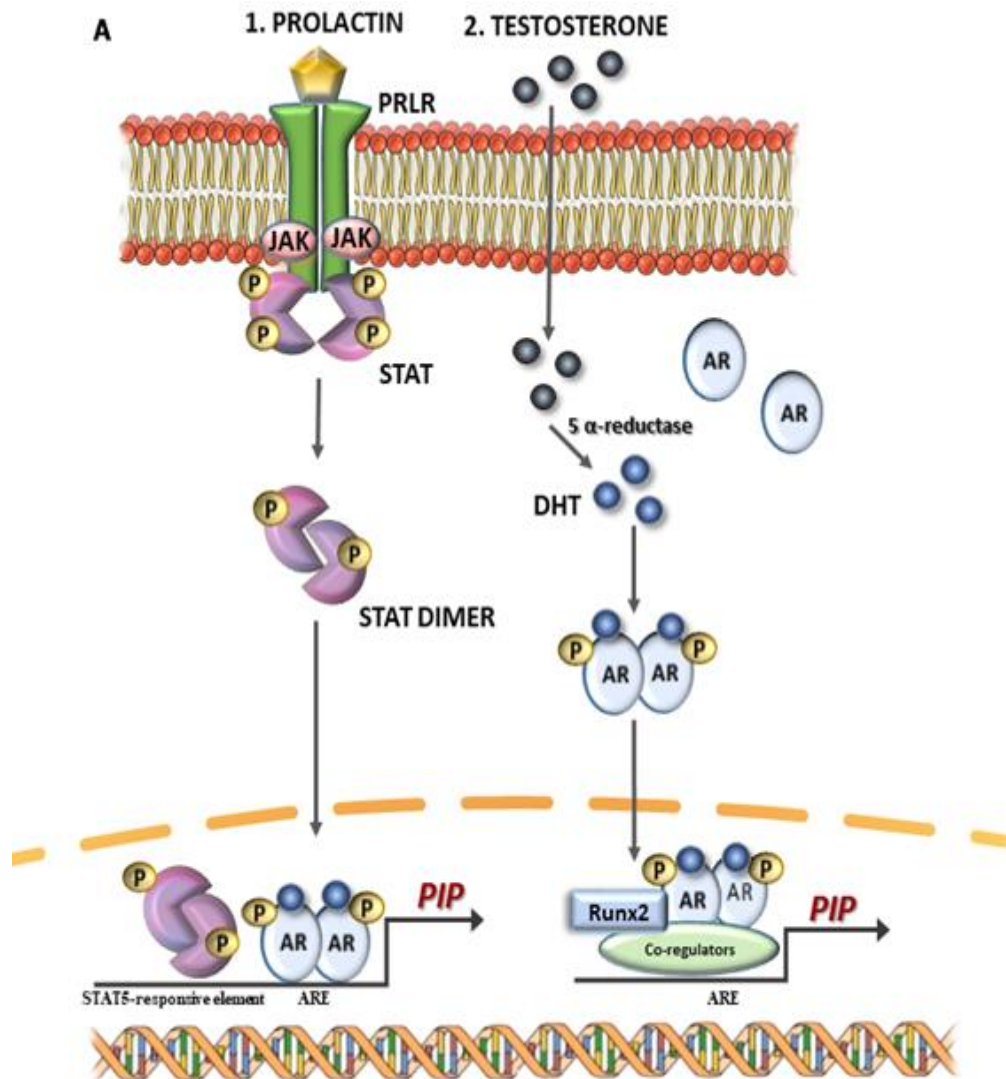
Mechanizm regulacji ekspresji genu *PIP* nie został jeszcze w pełni wyjaśniony. Jego ekspresja zarówno w tkance prawidłowej, jak i w tkance zmienionej nowotworowo jest regulowana przez wiele hormonów i cytokin. Androgeny, glikokortykosteroidy, prolaktyna oraz cytokiny (IL-1 $\alpha$ , IL-4 i IL-13) wpływają na zwiększenie ekspresji, natomiast estrogeny i IL-6 na obniżenie poziomu ekspresji *PIP* (Shiu i Iwasiow., 1985; Dauvois i wsp., 1990; Pagani i wsp., 1994; Blais i wsp., 1994; Blais i wsp., 1995; Myal i wsp., 1998; Loos i wsp., 1999; Carsol i wsp., 2002).

W pierwszym doniesieniu odnoszącym się do regulacji ekspresji genu *PIP* na poziomie molekularnym wykazano, że w komórkach ZR-75-1 raka gruczołu piersiowego ekspresja genu *PIP* regulowana jest synergistycznie poprzez aktywację receptora androgenowego (AR) i receptora prolaktynowego (PRLR) za pomocą, odpowiednio, prolaktyny i 5 $\alpha$ -dihydrotestosteronu (5 $\alpha$ DHT) (Carsol i wsp., 2002). Aktywacja PRLR prowadzi do aktywacji (fosforylacji) czynników transkrypcyjnych STAT5A i STAT5B, które wiążą się do promotora genu *PIP* wspólnie z aktywnym receptorem AR, co w konsekwencji prowadzi do zwiększenia transkrypcji mRNA *PIP* (Debily i wsp., 2009; Naderi i wsp., 2012; Naderi i wsp., 2014) (**Ryc. 2A**).

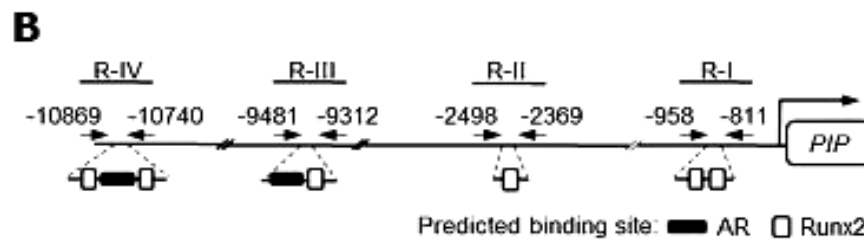
W podobny sposób, aktywny receptor AR wspólnie z białkiem RUNX2, po związaniu obu do promotora genu *PIP*, zwiększają jego ekspresję (Baniwal i wsp., 2013). Ponadto *PIP* w mechanizmie zwrotnym może aktywować receptor androgenowy (AR) w

cytoplazmie i powodować jego translokację do jądra komórkowego, gdzie następuje ekspresja genów androgeno-zależnych (Naderi i wsp., 2012).

W komórkach raka gruczołu piersiowego nie posiadających ekspresji receptora estrogenowego (ER-), ekspresja genu *PIP* regulowana jest przez dodatnią pętlę zwrotną pomiędzy szlakiem sygnałowym receptora androgenowego (AR) a ścieżkami sygnałowymi kinaz ERK1/2 i AKT/PKB (**Ryc. 3**)



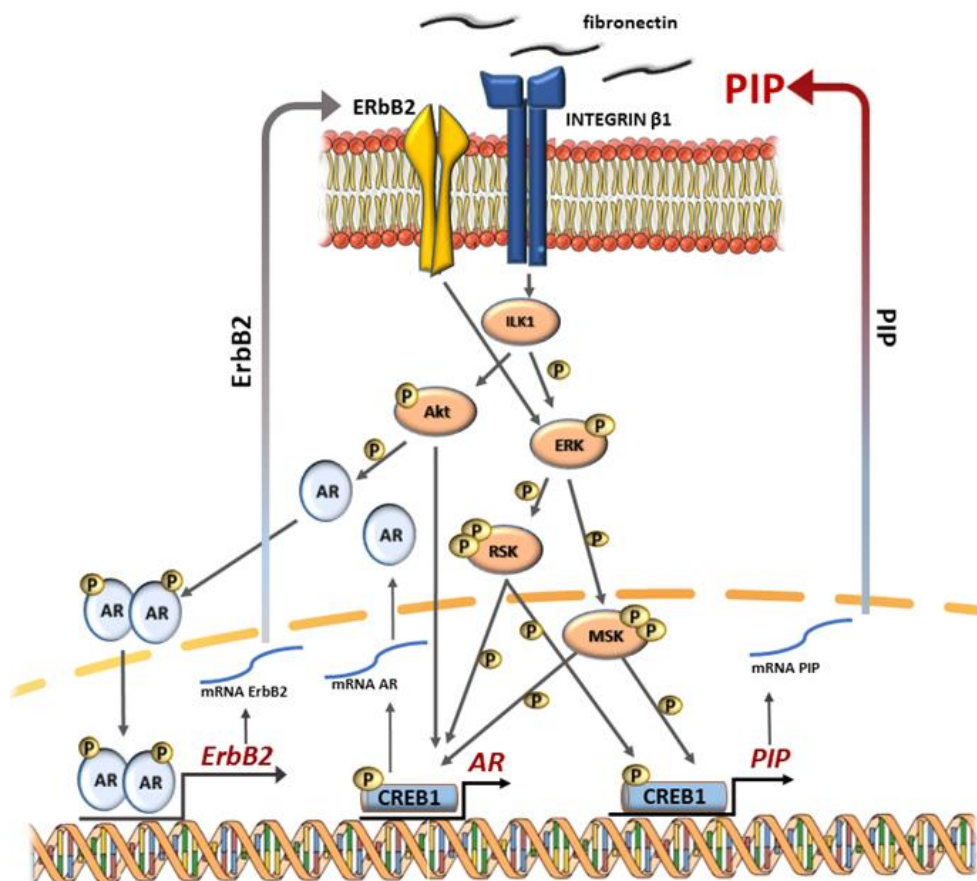
**Ryc. 2A** Mechanizm regulacji ekspresji *PIP* po indukcji prolaktyną i testosteronem. Rycinę wykonała dr Karolina Jabłońska (Urbaniak A i wsp.2018)



**Ryc. 2B** Mechanizm regulacji ekspresji *PIP* przez receptor androgenowy AR i białko RUNX2 ( Urbaniak A., i wsp., 2018)

W tym mechanizmie, białko *PIP* pełni rolę autoregulacyjną, trawiąc białko macierzy zewnątrzkomórkowej – fibronektynę - do krótkich fragmentów peptydowych (patrz rozdz.1.5), które aktywują integryny  $\beta 1$ , co umożliwia im związanie białka ILK1 (*ang. integrin-linked kinase1*) oraz receptora ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 (*ang. epidermal growth factor receptor 2*, *ErbB2/HER2*). To w konsekwencji prowadzi do aktywacji kinaz ERK1/2 i kinazy AKT/PKB, które aktywują kinazy RSK i MSK, a te z kolei aktywują czynnik transkrypcyjny CREB1, który wiąże się do promotora genu *PIP*, wpływając na zwiększenie jego ekspresji (Chia i wsp., 2010; Naderi i wsp., 2012; Naderi i wsp., 2015). Co ciekawe, CREB1 w komórkach estrogeno-negatywnych zwiększa również ekspresję receptora androgenowego AR, który z kolei aktywuje ekspresję receptora naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 HER-2, co również przyczynia się do wzrostu ekspresji *PIP* (Naderi i wsp., 2012, **Ryc. 3**).





**Ryc. 3** Mechanizm regulacji ekspresji PIP (Urbaniak A., i wsp. 2018) rycinę wykonała dr Karolina Jabłońska.

#### 1.4. Rola biologiczna białka PIP

Analiza sekwencji białka PIP *in silico* wykazała obecność motywu wiążącego aktyne oraz dwóch motywów wiążących fibronektynę (obejmujących reszty aminokwasów 42-57 i 109-118) (Tellam i wsp., 1989; Caputo i wsp., 2003). Białko PIP *ex vivo* wiąże keratynę, miozynę, tropomiozynę,  $\beta$ -tubulinę, ludzką albuminę surowiczą oraz hydroksyapatyt (Schenkels i wsp., 1997; Kumar i wsp., 2012; Naderi i wsp., 2014). Ponadto, PIP wykazuje powinowactwo do receptora CD4 obecnego na komórkach układu immunologicznego (limfocytach T, monocytach/makrofagach, komórkach dendrytycznych) oraz do fragmentu Fc immunoglobulin IgG (Autiero i wsp., 1995; Caputo i wsp., 1998; Gaubin i wsp., 1999; Caputo i wsp., 2000; Basmaciogullari i wsp., 2000). Co więcej, ludzkie białko SABP (PIP) obecne w ślinie, mleku i nasieniu wiąże się do bakterii z rodzaju *Gemella*, *Streptococcus* i *Staphylococcus*, (Schenkels i wsp., 1997).

Podobne właściwości wykazuje mysie białko mPIP, wiążąc się do bakterii z rodzaju *Streptococcus* ( Lee i wsp., 2002; Nistor i wsp., 2009). Białko PIP jest białkiem sekrecyjnym i posiada aktywność proteazy aspartylowej (Caputo i wsp., 2000). Funkcja ta wynika z obecności reszty asparaginanu w pozycji 22 (Asp22), podobnie jak w przypadku innych znanych proteaz aspartylowych, takich jak katepsyna D, pepsyna, czy renina. Jedynym znanym substratem PIP jest fibronektyna (Caputo i wsp., 2000). Przypuszcza się, iż białko PIP poprzez aktywność proteolityczną, bierze udział w degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej, a tym samym bierze udział w progresji raka gruczołu piersiowego (Caputo i wsp., 2003; Naderi i wsp., 2012).

Caputo i wsp., (2003) opisali różnice we właściwościach biologicznych białka PIP izolowanego z komórek raka gruczołu piersiowego, a białkiem wydzielanym przez prawidłowe tkanki (ślina i nasienie). Wykazali oni, że PIP wydzielany przez komórki T47D wiązał się z mniejszym powinowactwem do receptora CD4 w porównaniu z białkiem PIP pochodzącym z nasienia, co autorzy wiążą z różnicami w strukturze *N*-glikanów (Caputo i wsp., 2003). Natomiast obie formy białka PIP wiązały się z podobnym powinowactwem do fibronektyny, co w każdym przypadku wymagało obecności łańcuchów cukrowych. Dane te sugerują, iż w zależności od mikrośrodowiska, w którym białko PIP ulega ekspresji, może ono w sposób odmienny oddziaływać z tymi samymi cząsteczkami (Caputo i wsp., 2003).

### **1.5. Rola białka PIP w progresji raka gruczołu piersiowego**

Najnowsze badania poświęcone białku PIP wykazały wysoki poziom jego ekspresji w rakach gruczołu piersiowego typu apokrynowego (stanowiący dość niski odsetek nowotworów tego gruczołu), wykazujących brak receptora estrogenowego (ER-), przy obecności receptora androgenowego (AR+) oraz w rakach gruczołu piersiowego typu luminalnego A, charakteryzujących się następującym profilem ekspresji markerów: (ER+), (HER 2-), Ki-67 < 14%, PR+> 20% komórek nowotworowych. Natomiast niski poziom ekspresji lub brak ekspresji PIP obserwowano w raku gruczołu piersiowego potrójnie negatywnym (*ang. triple negative*) charakteryzującym się brakiem receptorów ER, PR i HER-2 (Baniwal i wsp., 2014; Naderi i wsp., 2015; Dai i wsp 2017; Sciarra i wsp., 2017). Podwyższony poziom PIP we krwi obwodowej u 40% pacjentek z zaawansowanym rakiem gruczołu piersiowego wskazuje na potencjalne pozytywne prognostyczne znaczenie PIP jako markera

nowotworowego (Naderi i wsp., 2015). Interesującym jest fakt, że w przypadku pacjentek z przerzutami raka gruczołu piersiowego, stężenie PIP we krwi jest szczególnie wysokie i dochodzi nawet do 70,000 ng/ml (Haagensen i wsp., 1979; Pasquinelli i wsp., 1999).

Badania Dzięgiela i wsp. (2016) wykazały, iż wysoki poziom ekspresji PIP pozytywnie koreluje z odpowiedzią pacjentek z rakiem gruczołu piersiowego na standardową chemioterapię adjuwantową (doksorubicyna + cyklofosfamid), co wskazuje na związek pomiędzy niskim poziomem lub brakiem ekspresji PIP, a opornością komórek raka gruczołu piersiowego na chemioterapię wykorzystującą te leki przeciwnowotworowe (Jabłońska i wsp., 2016). Dodatkowo wykazano, iż zarówno poziom białka PIP, jak i mRNA *PIP* spada wraz ze wzrostem stopnia złośliwości G i jest on najniższy w przypadku potrójnie negatywnych raków gruczołu piersiowego (ER-, PR-, HER-2 -) o złym rokowaniu (Jabłońska i wsp., 2016). Z klinicznego punktu widzenia istotny jest również fakt, iż przypadki z wyższą ekspresją PIP charakteryzowały się dłuższymi przeżyciami wolnymi od wznowy oraz wolnymi od przerzutów (Hähnel i wsp., 1996, Jabłońska i wsp., 2016).

Jak dotąd, rola białka PIP w progresji raka gruczołu piersiowego nie została do końca wyjaśniona i co więcej część badań na ten temat przyniosła niespójne, czy wręcz sprzeczne wyniki. Najwięcej uwagi poświęcono roli białka PIP w proliferacji komórek raka gruczołu piersiowego. I tak, oczyszczone z nasienia białko PIP promowało proliferację komórek MCF-7, BT474, MDA-MB-231 i T47D tego nowotworu (Cassoni i wsp., 1995). Na rolę PIP w promowaniu proliferacji komórek raka gruczołu piersiowego wskazują również badania Naderi i wsp. (2012, 2014), którzy wykazali, że w przypadku linii komórkowych wyżej wymienionych nowotworów reprezentujących typ luminalny A i B oraz typ apokrynowy, obecność białka PIP była niezbędna do progresji fazy G1 cyklu komórkowego, mitozy oraz cytokinezy. Jak wskazują dotychczasowe badania, stymulujący wpływ PIP na proliferację komórek jest niezależny od statusu receptorów estrogenowych (ER). Baniwal i wsp. (2012, 2014) pokazali, że zahamowanie ekspresji genu *PIP* hamuje proliferację komórek T47D charakteryzujących się ekspresją receptora estrogenowego (ER+). Z kolei Naderi i wsp. (2012) pokazali, iż ekspresja PIP jest niezbędna do proliferacji komórek MDA-MB-453 cechujących się brakiem receptorów estrogenowych (ER-). Badania *in vitro* nad molekularnymi mechanizmami leżącymi u podstaw działania PIP wykazały, że wyciszenie ekspresji genu *PIP* w komórkach T47D uniemożliwia aktywację przez czynniki surowicze („*serum factors*”) kinaz AKT/PKB,

ERK1/2 i JNK1/2 biorących udział w głównych szlakach przekazywania sygnałów związanych z proliferacją komórkową (Baniwal i wsp., 2014). W przeciwieństwie do dotychczas omówionych badań, analiza ekspresji genów prowadzona za pomocą macierzy ekspresyjnych RNA wykazała, że w liniach komórkowych raka gruczołu piersiowego z wysokim poziomem PIP, istotnie wzrasta poziom ekspresji genów odpowiedzialnych za apoptozę i hamowanie podziałów komórkowych w porównaniu z komórkami tego nowotworu nie wykazującymi ekspresji tej glikoproteiny (Debily i wsp., 2009). Rezultaty ostatnich badań *in vivo* uzyskanych przez Edechi CA (2019a), w których myszom Balb/c przeszczepiano komórki mysie 4T1 (reprezentujące model *triple negative*) z nadekspresją mysiego białka mPIP oraz komórki kontrolne 4T1 z pustym wektorem pokazały opóźniony wzrost guza dla komórek 4T1/mPIP w stosunku do komórek kontrolnych 4T1/puro (Edechi C.A 2019a).

Niejasny pozostaje również, sposób działania białka PIP na komórki. Z jednej strony pokazano, że białko PIP dodawane do hodowli komórek raka gruczołu piersiowego stymuluje ich proliferację, co wskazuje na jego zewnątrzkomórkowe działanie (Cassoni i wsp., 1995). Z drugiej strony stwierdzono, że ko-hodowla komórek T47D z wyciszoną ekspresją białka PIP z komórkami T47D (typu dzikiego) wydzielającymi duże ilości PIP nie stymuluje proliferacji tych pierwszych. Zdaniem autorów, wskazuje to na wewnątrzkomórkowy mechanizm działania PIP w promowaniu proliferacji, bowiem wyciszenie ekspresji genu *PIP* w komórkach T47D skutkowało zahamowaniem ich proliferacji (Baniwal i wsp., 2012).

Wyciszenie ekspresji mRNA *PIP* w komórkach BT-474 raka gruczołu piersiowego obniżało ich adhezję typu komórka - komórka i komórka - macierz (bogata w fibronektynę), co sugeruje, że PIP mógłby zwiększać oddziaływania międzykomórkowe i oddziaływania typu komórka - macierz zewnątrzkomórkowa. Jakkolwiek, w przypadku komórek T47D i MFM-223 raka gruczołu piersiowego, wyciszenie ekspresji PIP nie zmieniało w znaczący sposób właściwości adhezyjnych tych komórek (Vanneste i Naderi, 2015). Wskazano również na prawdopodobny udział białka PIP w procesie tworzenia podosomów bogatych w  $\alpha$ -aktynę, co może jednak wynikać nie ze zdolności PIP do bezpośredniego wiązania aktyny w komórce, ale aktywacji receptorów integrynowych  $\beta 1$  z pośrednim udziałem białka PIP poprzez generowanie wiązanych przez nie fragmentów fibronektyny. Być może aktywacja receptora dla

integryn jest czynnikiem wpływającym na zmianę reorganizacji cytoszkieletu aktynowego (Sreenivasappa i wsp. 2014)

## 1.6. Apoptoza

Na początku lat siedemdziesiątych XX wieku, John Kerr, Andrew Wyllie i Adrian Curie wykazali, istnienie ściśle regulowanego procesu prowadzącego do samounicestwienia się komórek, który nazwali programowaną śmiercią komórki (*ang. programmed cell death*, apoptoza) (Kerr i wsp., 1972). Apoptoza (*gr. apoptosis* – opadanie lub spadanie liści) może przebiegać dwoma głównymi szlakami: wewnętrznym i zewnętrznym. Szlak apoptotyczny związany z mitochondriami i kontrolowany przez białko p53 i białka z rodziny bcl-2 (*ang. B cell lymphoma 2 protein*) nazywany jest klasycznym **szlakiem wewnętrznym**. Szlak apoptotyczny rozpoczynający się od aktywacji receptorów śmierci przez zewnątrzkomórkowe ligandy nazywany klasycznym **szlakiem zewnętrznym**. Ponadto, apoptoza może przebiegać poprzez szlak związany z retikulum endoplazmatycznym (**szlak siateczkowy** - związany ze stresem komórkowym) oraz szlak tzw. **pseudoreceptorowy** związany z perforynami i grzybem B (Green DR., i wsp., 2015). Niezależnie od rodzaju szlaku w aktywacji apoptozy jej integralnym elementem jest aktywacja proteaz cysteinowych z rodziny ICE (*ang. interleukin -1 $\beta$  converting enzyme* - nazwa pochodzi od pierwszej w komórkach ssaków zidentyfikowanej kaspazy konwertującej interleukinę 1 $\beta$ ) zwanych kaspazami. Dzielimy je na kaspazy indukujące (kaspazy aktywatorowe, sygnałowe - 2, 8, 9, 10, 12) oraz kaspazy efektorowe (kaspazy wykonawcze – 3, 7, 6). Kaspazy indukujące są aktywne jako dimery. Kaspazy wykonawcze występują w cytoplazmie komórki jako nieaktywne zymogeny (tzw. prokaspazy), które aktywowane są w wyniku proteolizy z udziałem kaspaz indukujących, już po zainicjowaniu procesu apoptozy. Wszystkie kaspazy tną łańcuch białkowy pomiędzy Asp i Gly w sekwencji aminokwasowej Asp-Glu-Val-Asp-Gly. Enzymy te degradują zarówno białka strukturalne, jak i enzymatyczne. Jednym z kluczowych białek ulegających cięciu przez kaspazy jest polimeraza poli(ADP -rybozy), która w warunkach prawidłowych odpowiedzialna jest za naprawę DNA. Trawieniu ulegają również takie białka jak retinoblastomy (Rb), istotne w regulacji cyklu komórkowego, białko MDM2 odpowiedzialne za wiązanie i stabilizację białka p53, czy białka cytoszkieletu komórkowego. Sygnał przenoszony przez kaspazy prowadzi do

aktywacji czynników transkrypcyjnych, takich jak AP1 (*ang. activator protein 1*) oraz NF- $\kappa$ B (*ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). W konsekwencji prowadzi to do pojawienia się zaburzeń struktury i funkcji metabolicznej komórki, i w efekcie powoduje jej śmierć.

Cechą charakterystyczną komórek apoptotycznych jest obecność fosfatydyloseryny na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej. Chromatyna jądrowa ulega zagęszczeniu i gromadzi się wokół otoczki jądrowej. W miarę obkurczania się komórki, chromatyna zaczyna wypełniać całe jądro komórkowe, cytoplazma staje się gęsta z ciasno upakowanymi organelami. Następnie jądro komórkowe ulega fragmentacji i pojawiają się tzw. ciała apoptotyczne. Są to fragmenty zagęszczonej cytoplazmy, chromatyny i organeli komórkowych otoczone błoną komórkową. Ich zawartość nie wydostaje się na zewnątrz, tym samym nie wywołuje reakcji zapalnej. W ostatnim etapie fragmenty apoptotycznych komórek ulegają fagocytozie przez makrofagi lub otaczające komórki (Hacker i wsp., 2000; Pistritto i wsp., 2016)

**Szlak wewnętrzny apoptozy** może zostać zainicjowany np.: podwyższeniem poziomu reaktywnych form tlenu (*ang. reactive oxygen species, ROS*), zaburzeniami transportu jonów wapnia do cytoplazmy, zaburzeniami cyklu komórkowego, działaniem leków cytotoksycznych, czynników fizycznych, czy nieprawidłowo sfałdowanych białek. W procesie inicjacji apoptozy biorą udział zarówno szlaki związane z promowaniem apoptozy jak i szlaki związane z jej hamowaniem. Wpływają one finalnie na aktywację kaspaz, przepuszczalność błony mitochondrium i interakcje z białkami pośredniczącymi w rozpadzie komórki.

W wewnątrzkomórkowym szlaku apoptozy kluczową rolę odgrywają białka z rodziny Bcl-2. Do białek proapoptotycznych z rodziny Bcl-2 należą Bax, Bak, Bad, Bid, Bik, które występują głównie w cytoplazmie, natomiast antyapoptotyczne białka z rodziny Bcl-2, takie jak Bcl-2, Bcl-xL (Pistritto i wsp., 2016), w większości to integralne białka błonowe obecne w zewnętrznej błonie mitochondrium, oraz błonach retikulum endoplazmatycznego. Białka z rodziny Bcl-2 wykazują homologie strukturalne, ze względu na występowanie w nich konserwatywnych domen BH (*ang. Bcl-2 homology domain*) (Petros i wsp., 2004, Pistritto i wsp., 2016). Domeny te w trakcie zainicjowania procesu apoptozy umożliwiają tym białkom tworzenie hetero- i homodimerów odpowiedzialnych za odpowiedź pro- lub antyapoptotyczną. W warunkach stresu białko p53 przemieszcza się z cytoplazmy do zewnętrznej błony mitochondrium, tam wiąże się

do kompleksu białek antyapoptotycznych Bcl-2/Bcl-xL, co ułatwia tworzenie w niej porów i uwolnienie cytochromu c, prowadząc do programowanej śmierci komórki.

Z kolei wbudowanie proapoptotycznych białek Bax i Bad w zewnętrzną błonę mitochondrium powoduje takie zaburzenia w jej strukturze, że prowadzi to do uwalniania nie tylko cytochromu c do cytozolu, ale również uwalniane są białka Smac/DIABLO (z ang. *secondary mitochondria-derived activator of caspases*) / (z ang. *Direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI*), czynnik AIF (ang. *apoptosis inducing factor*) i endonukleazy G, pełniących rolę regulatorów aktywacji kaspaz (Delavallee L i wsp. 2011, Rathore R i wsp., 2017). W cytoplazmie, cytochrom c łączy się z ATP oraz enzymem Apaf-1 (Rathore R i wsp., 2017), który na swoim N-końcu zawiera domenę rekrutującą kaspazę - CARD (ang. *caspase activation and recruitment domain*) (Hofmann K i wsp., 2019). Poprzez domenę CARD do tego kompleksu białkowego zostaje przyłączona kaspaza 9, co prowadzi do utworzenia apoptosomu będącego heptamerem kompleksów białkowych obejmujących cytochrom c, Apaf-1 i kaspazę-9 (Rathore R i wsp., 2017). Dodatkowym elementem przyłączanym do apoptosomu jest kompleks białek Bcl-2/Bcl-xL pełniący funkcję regulatorową. Do niego wiążą się białka o funkcji pro-apoptotycznej Bak, Bax, Bid, Bik. W rezultacie prowadzi to do unieczynnienia kompleksu Bcl-2/Bcl-xL i aktywacji kaspazy 9, która uruchamia kaskadę kaspaz wykonawczych 3, 6 i 7. Aktywacja kaspazy 3, pełniącej rolę dominującą w tym procesie, polega na jej proteolizie i utworzeniu dimeru aktywującego kaspazy 6 i 7.

Do zahamowania procesu apoptozy może dojść w wyniku tworzenia przez białka Bcl-2 lub Bcl-xL heterodimerów z takimi białkami proapoptotycznymi jak Bak, Bax, Bid, Bik. Ponadto białka te po przyłączeniu do Apaf-1 uniemożliwiają tworzenie apoptosomu, hamując tym samym aktywację kaspazy 9 i kaspaz wykonawczych. Ostatecznie o przeżyciu lub śmierci komórki decyduje równowaga pomiędzy aktywnością białek pro- i antyapoptotycznych (Ola i wsp., 2011; Czabotar i wsp., 2014).

Do zahamowania procesu apoptozy może również dojść poprzez aktywność białek z rodziny IAP (ang. *inhibitor of apoptosis protein*) i XIAP (ang. *human X chromosome-encoded IAP*), które charakteryzują się obecnością co najmniej jednej domeny BIR (ang. *baculoviral IAP repeat*). Domena BIR 2 wchodzi w skład białek IAP1, IAP2, XIAP oraz NAIP i jest w stanie zahamować aktywność kaspaz wykonawczych 3 i 7. Z kolei domena BIR 3 hamuje aktywność kaspazy 9 (Deveraux i wsp., 1999). W białku surwiwinie, należącej do tej rodziny białek, istnieje tylko jedna domena BIR, która

hamuje aktywność kaspaz wykonawczych 3 i 7, natomiast w białku liwinie pojedyncza domena BIR jest w stanie zahamować aktywność kaspazy 9 i kaspaz wykonawczych 3, 6 i 7 (Shin i wsp., 2001). Oprócz domen BIR, w białkach z rodziny IAP funkcję hamującą aktywność kaspaz pełnią sekwencje łączące domeny BIR, jak również domena RING o strukturze palca cynkowego (*ang. really interesting new gene*). Odpowiadają one za ubikwitynację i trawienie nieaktywnych kompleksów białka IAP i kaspazy przez proteasomy. Naturalnymi inhibitorami białek IAP są białka Smac/DIABLO i XAF1. W przypadku białka XAF1 dla jego proapoptotycznej funkcji istotny jest fragment C-końcowy. XAF1 blokuje XIAP i uniemożliwia dalsze hamowanie kaspazy-3. Pokazano, że związanie XIAP poprzez XAF1 ma pozytywny wpływ na chemioterapię. Smac/DIABLO występuje głównie w mitochondriach, skąd jest uwalniany pod wpływem czynników stresu. Razem z uwolnionym z mitochondriów cytochromem c wchodzi w interakcje z białkami IAP, blokując ich działanie. Białko Smac/DIABLO może łączyć się ze wszystkimi IAP (Du i wsp., 2000)

**Szlak zewnętrzny apoptozy** może zostać aktywowany poprzez ograniczenie ilości czynników wzrostowych i substancji odżywczych, działanie cytokin i hormonów, działanie leków cytostatycznych jak i działanie czynników fizycznych tj.: promieniowanie UV i temperatura (Kulms D i wsp., 2000, Vydra N i wsp., 2006). W komórkach szlak ten aktywowany jest przez receptory zawierające domenę śmierci (*ang. death domain, DD*). Pierwszymi opisanymi receptorami śmierci były receptory z rodziny TNF (TNFR1, p75NTR, Fas/APO1/CD95, TRAIL-R1). Formą aktywną receptorów śmierci z rodziny TNFR jest trimer. Ligandami dla tych receptorów są TNF, FASL, TRAIL. Receptor po związaniu odpowiedniego ligandu zmienia konformację co pozwala na związanie białka adaptorowego FADD (*ang. Fas Associated Death Domain*) i aktywację domeny cytoplazmatycznej zwanej domeną śmierci. Białko FADD może aktywować domenę śmierci samodzielnie lub przy udziale białek pośredniczących (DAXX, TRADD, TRAF 1 i 2) i następnie aktywować kaspazę-8 w kompleksie DISC (*ang. Death Inducing Signaling Complex*). Z kolei, kaspaza 8 aktywuje kaspazy 6, 7 i 3 co ostatecznie prowadzi do apoptozy komórki (Fulda i wsp., 2006; Sayers i wsp., 2011). Aktywna kaspaza 8 poprzez aktywację proapoptotycznego białka Bid może zapoczątkować wewnątrzkomórkowy szlak apoptozy. Oba szlaki, zewnętrzny i wewnętrzny, łączą się więc w jeden tor wykonawczy prowadzący do programowanej śmierci komórki (Fulda i wsp., 2006; Sayers i wsp., 2011).



**Szlak pseudoreceptorowy apoptozy** jest aktywowany przez białka o aktywności cytotoksycznej, wydzielane przez komórki układu odpornościowego (limfocyty T, neutrofile, komórki NK), do których należą grazymy i perforyny. Cytotoksyczne komórki efektorowe wiążą się do komórek docelowych, co prowadzi do przemieszczenia ziarnistości wewnątrzkomórkowych zawierających substancje cytotoksyczne w kierunku komórki docelowej, następnie ich degranulację i uwalnianie perforyn, które wbudowują się w błonę komórki docelowej i tam w procesie zależnym od jonów wapnia  $Ca^{2+}$  ulegają polimeryzacji tworząc kanały o średnicy 14 nm, zbudowane z 20 podjednostek. Umożliwia to wnikanie do komórki grzymów powodujących proteolizę struktur komórkowych (Greenberg i wsp., 1997).

**Szlak siateczkowy apoptozy** wywoływany jest głównie przez zaburzenie równowagi jonów wapnia w komórce oraz nagromadzenie się nieprawidłowo sfałdowanych i zmodyfikowanych białek w komórce. Zaburzenia te powodują, że białka te nie są transportowane do siateczki śródplazmatycznej, dochodzi do aktywacji kaspazy 12, która aktywuje kaspazy efektorowe 3, 7, 6 (Travers i wsp., 2000, Breckenridge D.G. i wsp., 2003).

### 1.7. Molekularne mechanizmy działania doksorubicyny

Antybiotyki antracyklinowe stosowane są od ponad 40 lat w leczeniu chorób nowotworowych. Pierwsze takie związki: doksorubicynę (DOX) i daunorubicynę (DRB) wyizolowano w latach sześćdziesiątych XX wieku ze szczepu *Streptomyces peucetius* var *caesius* (Arcamone F i wsp., 1969, Arcamone F i wsp., 1964, Di Marco A i wsp. 1964). Najlepiej poznanym mechanizmem cytotoksycznego działania antracyklin jest ich wpływ na aktywność topoisomerazy typu II oraz bezpośrednie interakcje z DNA obejmujące tworzenie kompleksów interkalacyjnych, wiązań kowalencyjnych, modyfikacje zasad azotowych oraz działanie wolnych rodników i reaktywnych form tlenu (Damiani RM., i wsp., 2016). Prowadzi to do zaburzenia takich procesów jak replikacja i transkrypcja, a następnie uruchomienia mechanizmów naprawy DNA lub indukcji apoptozy (Damiani RM., i wsp., 2016).

Doksorubicyna tworzy kompleksy interkalacyjne z DNA oddziałując z sekwencjami 5'-GC-3', 5'-CG-3' (Chaires i wsp., 1996, Jawad B i wsp., 2019), co w konsekwencji powoduje wydłużanie helisy DNA i zniekształcenia jego struktury. Ważną

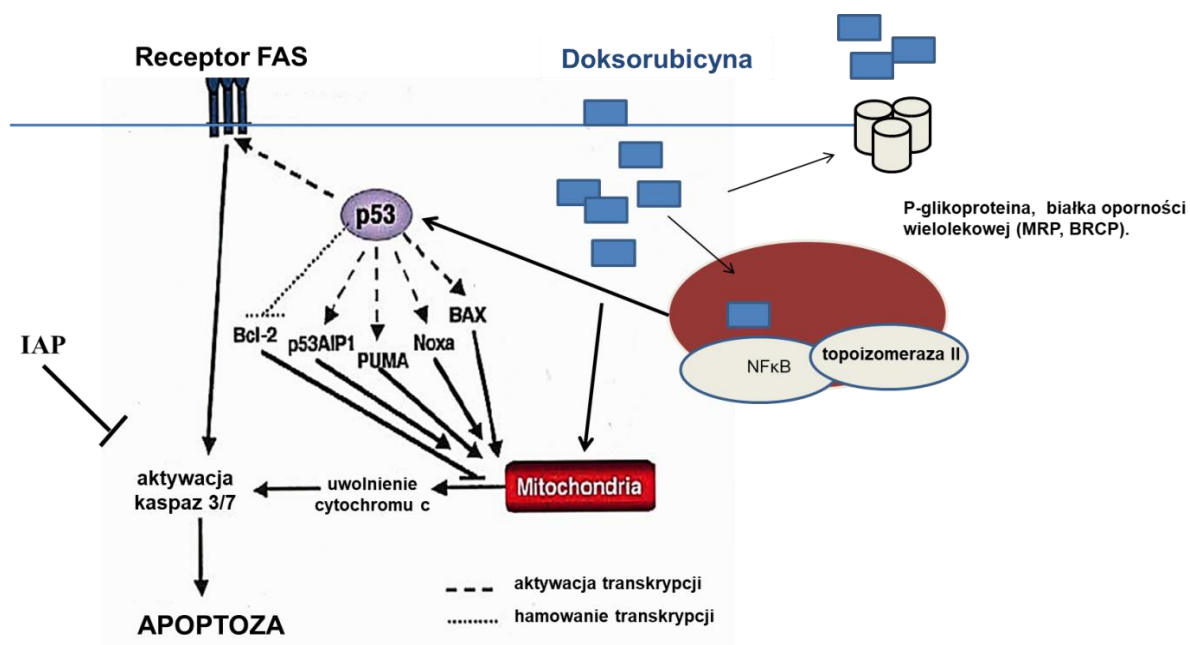
rolę w stabilizowaniu kompleksów antracyklin z DNA odgrywają wiązania wodorowe z zasadami azotowymi, w których uczestniczą cząsteczki wody. Antracykliny, które nie mają grupy –OH w pozycji C-9 nie są zdolne do tworzenia wiązań wodorowych z udziałem tej grupy, a tym samym pozbawione są aktywności przeciwnowotworowej (Gniazdowski M i wsp., 2003). W powstawaniu wiązań kowalencyjnych DOX z DNA uczestniczy formaldehyd (CH<sub>2</sub>O) (Taates i wsp., 1999). W układzie *in vitro*, źródłem formaldehydu jest TRIS, który jest utleniany do CH<sub>2</sub>O przez rodniki hydroksylowe (HO<sup>·</sup>) powstające z udziałem Fe<sup>2+</sup> w reakcji redukcji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (reakcja Fentona) (Damiani RM., i wsp., 2016). *In vivo*, źródłem formaldehydu jest autokatalityczna oksydacja w pozycji C-13 DOX z udziałem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (reakcja Bayera-Villigera) (Taates i wsp., 1996) i utlenianie przez rodniki hydroksylowe związanych z DNA poliamin (Taates i wsp., 1997). Każdy z tych mechanizmów jest związany ze zdolnością DOX do wiązania jonów Fe<sup>3+</sup> i od komórkowego potencjału redukcyjnego (Damiani RM., i wsp., 2016).

Cytotoksyczne działanie doksorubicyny jest także związane z hamowaniem aktywności topoizomeraz typu II-go. Topoizomerazy typu II nacinają obie nici DNA i odpowiadają za dodawanie superskrętów. Antracykliny wiążą się do DNA w chwili kiedy topoizomeraza II przecina podwójną nić, co przeszkadza w ponownym łączeniu wolnych końców DNA i przyczynia się do fragmentacji DNA. Skutkuje to blokowaniem procesu replikacji i w konsekwencji śmiercią komórki (Damiani RM., i wsp., 2016).

### 1.7.1. Indukowanie apoptozy w wyniku działania doksorubicyny

Miarą skuteczności działania leków przeciwnowotworowych oprócz hamowania proliferacji jest zdolność do indukowania apoptozy. Istnieje wiele mechanizmów prowadzących do apoptozy wywoływanej przez doksorubicynę (**Ryc. 4**). Szlaki te powiązane są z aktywnością kinaz MAPK poprzez aktywację kinaz p38 (Chen K.L., i wsp. 2018), jak również przez aktywację kinaz JNK1/2 i czynników transkrypcyjnych c-jun i AP1. Doksorubicyna może wpływać na uwalnianie cytochromu c z mitochondriów, tym samym indukując apoptozę bez wpływu na strukturę DNA. Istnieje wiele doniesień wskazujących na rolę doksorubicyny w regulowaniu aktywności białek z rodziny Bcl-2, zarówno białek proapoptotycznych jak i anty-apoptotycznych (Bax, Bak, Bik) (Pilco-Ferreto i wsp., 2016). Wykazano, iż doksorubicyna zmniejsza poziom białka Bcl-2 w komórkach MDA-MB-231 i jednocześnie podnosi poziom białka proapoptotycznego Bax. Białko Bax tworząc homodimery (Bax/Bax) lub blokując białko antyapoptotyczne

Bcl-xL w heterodimerach (Bax/Bcl-xL) może kontrolować proces apoptozy komórki nowotworowej (Liu J i wsp. 2019).



**Ryc. 4** Schemat obrazujący proapoptotyczne działanie doksorubicyny. Pietenpol i wsp. 2002.

## 2. Cel pracy

W badaniach nad rolą białka PIP w raku gruczołu piersiowego wykazano, że jego ekspresja jest niższa w zaawansowanym raku apokrynowym i raku inwazyjnym w porównaniu z rakiem *in situ* oraz sąsiadującą prawidłową tkanką (Naderi i wsp., 2012) i maleje wraz ze stopniem zaawansowania nowotworu (Gangadharan i wsp., 2018). A także, że jego ekspresja spada wraz ze wzrostem stopnia złośliwości G i jest najniższa w potrójnie negatywnych rakach gruczołu piersiowego (ER-, PR-, HER2 -) o złym rokowaniu (Jabłońska i wsp., 2016). Koreluje to z krótszymi przeżyciami wolnymi od wznowy oraz wolnymi od przerzutów (Hähnel i wsp., 1996, Jabłońska i wsp. 2016). Wykazano również, iż wysoki poziom ekspresji PIP pozytywnie koreluje z odpowiedzią pacjentek z rakiem gruczołu piersiowego na standardową chemioterapię adjuwantową (doksorubicyna + cyklofosfamid), co wskazuje na związek pomiędzy niskim poziomem lub brakiem ekspresji PIP, a opornością komórek raka gruczołu piersiowego na chemioterapię (Darb -Esfahani i wsp., 2014; Jabłońska i wsp., 2016).

Powyższe badania sugerują, że białko PIP może spowalniać progresję raka gruczołu piersiowego i co ważne z punktu widzenia terapii tego nowotworu, zwiększać wrażliwość komórek nowotworowych na chemioterapię. Tymczasem inne dane literaturowe dotyczące udziału PIP w progresji nowotworowej pokazują, że białko to zwiększa potencjał proliferacyjny i inwazyjność komórek raka gruczołu piersiowego w modelu *in vitro* (Cassoni P i wsp., 1995, Naderi A i wsp., 2014), co pozostaje w sprzeczności z obserwacjami klinicznymi przytoczonymi powyżej. **Stąd, ogólnym celem realizowanych w niniejszej pracy badań było określenie roli białka PIP w oporności komórek tego nowotworu na cytotoksyczne działanie leków przeciwnowotworowych, ze szczególnym uwzględnieniem doksorubicyny.**

Biorąc pod uwagę fakt, że efekt terapeutyczny leków przeciwnowotworowych stosowanych w leczeniu pacjentek z rakiem gruczołu piersiowego oparty jest przede wszystkim na indukcji apoptozy, **głównym celem zaplanowanych badań było określenie roli białka PIP w programowanej śmierci komórek raka gruczołu piersiowego na drodze apoptozy indukowanej doksorubicyną, paklitakselem i 4-hydroksycyklofosfamidem.** Ich realizacja wymagała odpowiedzi na następujące pytania:

- 1) Czy ekspresja białka PIP nasila apoptozę komórek raka gruczołu piersiowego indukowaną wybranymi cytostatykami?
- 2) Czy białko PIP wpływa na potencjał proliferacyjny komórek raka gruczołu piersiowego?
- 3) Czy białko PIP wpływa na zdolność komórek raka gruczołu piersiowego do wzrostu w postaci guza w badaniach *in vivo* w modelu myszy bezgrasiczych?
- 4) Czy doksorubicyna wpływa na zdolność komórek raka gruczołu piersiowego o zróżnicowanej ekspresji białka PIP do wzrostu w postaci guza w badaniach *in vivo* w modelu myszy bezgrasiczych?
- 5) Czy białko PIP wpływa na apoptozę komórek raka gruczołu piersiowego działając w mechanizmie wewnątrz- czy zewnątrzkomórkowym?

### 3. Materiały i metody

#### 3.1. Odczynniki

#### 3.2. Bufory i roztwory.

Nazwa	Skład
Bufor do transferu	25 mM Tris; 192 mM glicyna; 0,4 % SDS; 20 % CH <sub>3</sub> OH; pH 8,3
Bufor do “strippingu”	1,5 % glicyna; 0,1% SDS; 1% Tween 80; pH 2,2
Bufor do elektroforezy w warunkach denaturujących SDS-PAGE	25 mM Tris; 192 mM glicyna; 0,1% SDS; pH 8,3
Bufor lizujący RIPA(Sigma, USA)	50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 0,1% SDS; 1% IGEPAL CA-630; 0,5% deoksycholan sodu; pH 8,0
Bufor próbkowy (4x stężony) do elektroforezy SDS-PAGE	62,5 mM Tris-HCl; 2% SDS; 10% glicerol; 5% β-merkaptotanol; 0,015% błękit bromofenolowy
Bufor próbkowy do elektroforezy DNA (6x stężony)	0,09 % błękit bromofenolowy 0,09 % cyjanian ksylenu 60% glicerol 60 mM EDTA
Bufor próbkowy purpurowy 6x stężony do elektroforezy DNA <i>New England Biolabs, UK</i>	2,5% Fikol-400 10 mM EDTA 3,3 mM Tris-HCl 0,02% barwnik 1 0,001% barwnik 2; pH= 8,0
PBS (bufor fosforanowy z dodatkiem NaCl)	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH=7,5

### 3. Materiały i metody

Bufor do elektroforezy w żelu agarozowym (TAE)	40 mM Tris; 20 mM CH <sub>3</sub> COOH; 1 mM EDTA; pH=8,0
Bufor Tris z dodatkiem NaCl (TBS)	50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; pH=7,5
Bufor Tris z dodatkiem NaCl i Tween 20 (TBST).	50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 0,05% Tween 20; pH=7,5
Bufor Transformujący II	100 mM chlorek rubidu 75 mM chlorek wapnia (II) 20 mM MOPS 15 % glicerol v/v; pH6,4
Bufor Transformujący I	100 mM chlorek rubidu 50 mM chlorek manganu (II) 30 mM kwas octowy 100 mM chlorek wapnia (II), 15% glicerol (v/v); pH 5,8
Roztwór błękitu brylantowego	0,25% błękit brylantowy ,Coomassie R-250 50% metanol 10% kwas octowy
Ekstrakt drożdżowy	1% MOPS 0,05% NaCl 20 mM glukoza 2,5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; pH 7,0

## 3.3. Enzymy

Nazwa	Producent
<b>Polimerazy</b>	
• OptiTaq polimeraza	EurX, Polska
• Hifidelity polimeraza	Life Technologies, USA
• Prime starGLX polimeraza	Takara Biotech, Japonia
<b>Ligaza</b>	
• Ligaza T4	EurX, Polska
<b>Odwrotna transkryptaza</b>	
• Multiscribe Reverse transcriptase	Affymetrix, USA
<b>Enzymy restrykcyjne</b>	
• MluI	Bufor „Tango”, Thermofisher Scientific, USA
• EcoRI	Bufor ”EcoRI”, Thermofisher Scientific, USA
• XbaI	Bufor „Tango”, Thermofisher Scientific, USA
• NheI	Bufor ”Tango”, New England Biolabs, UK
• SmaI	Bufor ”Orange”, Thermofisher Scientific, USA
DNAza	EurX, Polska
<b>N-glikozydaza F</b>	Uzyskana od prof. dr hab. Mariusza Olczaka, Uniwersytet Wrocławski
<b>Lektyna ConA</b> biotynylowana	Biovector, Francja
<b>Ekstrawidyna alkaliczna fosfataza</b>	Sigma-Aldrich, USA



**3.4. Gotowe zestawy odczynników**

Nazwa	Producent
Zestaw do izolacji całkowitego RNA Gene Matrix Uniwersal RNA purification kit	EurX, Polska
Zestaw do reakcji odwrotnej transkrypcji High Capacity c DNA Reverse Transcription kit	Applied Biosystem, USA
Zestaw do oczyszczania DNA z żeli agarozowych „Agarose-Out”GeneMatrix Agarose-Out DNA Purification kit	EurX, Polska
Zestaw do izolacji DNA plazmidowego mini skala GeneMatrix plasmid Miniprep DNA purification kit	EurX, Polska
Zestaw do izolacji DNA plazmidowego maxi skala Qiagen plasmid Maxi kit	Qiagen, Niemcy
Zestaw do oznaczania stężenia białka metodą bicynchoninową Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit	Sigma-Aldrich, USA
Zestaw substratów do chemiluminescencji SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermofisher, USA
Zestaw do wykrywania komórek apoptotycznych CaspGLOW™ Fluorescein Active Caspase-3/7 Staining Kit	eBioscience, USA
Zestaw do wykrywania komórek apoptotycznych Annexin V/ FITC staining kit	Becton Dickinson, USA
Zestaw do oznaczania żywotności komórek Cell Cytotoxicity/Proliferation Reagent (MTT)	Sigma-Aldrich, USA
Zestaw do transfekcji komórek eukariotycznych X-fect Transfection Reagent	TakaraBiotech, Japonia

### 3. Materiały i metody

FxCyclecycle PI/RNase solution	Thermofisher Scientific, USA
Zestaw do izolacji białek membranowych	Thermofisher, USA
PierceTMCCell Surface Protein Isolation kit.	

## 3.5. Oligonukleotydy

<b><i>ACTBfor/PCR</i></b>	ACCACACCTTCTACAATGAGC
<b><i>ACTBrev/PCR</i></b>	GATAGCACAGCCTGGATAGC
<b><i>PIPfor/PCR</i></b>	CACATTGCCTTCTGTTTTCT
<b><i>PIPprev/PCR</i></b>	GGTGTGGCAAACAGACA
<b><i>PIP</i></b> <b><i>qReal-Time PCR</i></b>	<i>TagMan/(HS01114172_m1)</i>
<b><i>SDHA</i></b> <b><i>qReal-Time PCR</i></b>	<i>TagMan(HS00188166_m1)</i>
<b><i>PIPforEcoRI</i></b> <i>klonowanie cDNA</i> <i>PIP neoekspresja</i>	GGAATTCCACATTGCCTTCTGTTTTCT
<b><i>PIPprevMluI</i></b> <i>klonowanie cDNA</i> <i>PIP neoekspresja</i>	GAACGCGTGGTGTGGCAAACAGACA
<b><i>PIPforXbaI</i></b> <i>klonowanie cDNA</i> <i>PIP-LEXSY forma</i> <i>sekrecyjna</i>	AAAATCTAGACCAGGACAACACTCGGAAG
<b><i>PIPprevNheI</i></b> <i>klonowanie cDNA</i> <i>PIP-LEXSY forma</i> <i>sekrecyjna</i>	AAAAGCTAGCTTCTACCTTTAGGATTTCAATA

### 3.6. Wektory

#### Neoekspresja białka PIP

- **pRRL-cppt-CMV-PIP-ires-PURO-X2-PRE-SIN-** wektor zawierający promotor CMV wykorzystywany do konstytutywnej ekspresji w systemie lentiwirusowym III generacji. Otrzymano od dr Didiera Trono (laboratorium TronoLab, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lozanna, Szwajcaria).

#### Wyciszenie ekspresji PIP za pomocą interferencji RNA

- **pLKO.1-puro1, 2, 3, 4, 5** – wektory ekspresyjne zawierające promotor U6 i shRNA komplementarne do mRNA PIP (shPIP1, shPIP2, shPIP3, shPIP4, shPIP5) w systemie lentiwirusowym III generacji (Sigma-Aldrich, USA).
- **pLKO.1-puro-** kontrolny wektor zawierający promotor U6 i shRNA o sekwencji skierowanej na żaden znany ludzki gen wykorzystywany w systemie lentiwirusowym III generacji (Sigma-Aldrich, USA).

Wektory pakujące do systemu lentiwirusowego III generacji.

- **pMDL-g/p-RRE, pRSV-Rev, pMk-VSVG (CMV)** - Otrzymano od dr Didiera Trono (laboratorium TronoLab, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lozanna, Szwajcaria).

#### Ekspresja białka rekombinowanego PIP

- **pLEXSY-neo2.0-** wektor do konstytutywnej ekspresji białka rekombinowanego z metką sześciu histydyn na C-końcu w komórkach linii P10 pasożyta *Leishmania Tarentolae* (Jena Bioscience, Niemcy).



### 3.8. Przeciwciała

Nazwa	Producent
Królicze przeciwciała monoklonalne klasy IgG skierowane przeciwko ludzkiemu białku PIP, Nr.kat.ab62363, klon [EP1582Y]	Abcam, Wielka Brytania
Mysie przeciwciała monoklonalne klasy IgG skierowane przeciwko ludzkiej $\beta$ -aktynie, Nr.kat. 14968S	CellSignaling, Holandia
Mysie przeciwciała monoklonalne klasy IgG anty-HisTag Nr.kat. MA1-21315 [HIS:H8].	Thermofisher, USA
Mysie przeciwciała monoklonalne klasy IgG anty-Ki 67 Dako Products [MIB-1]	Agilent, USA
Królicze przeciwciała monoklonalne klasy IgG anty- cyklina D1, nr.kat. 2978 klon [92G2]	Cell Signaling, USA
Mysie przeciwciała monoklonalne klasy IgG anty-cyklina B1 Nr.kat. 4135 klon [V152]	Cell Signaling, USA
Królicze przeciwciała poliklonalne klasy IgG anty-ERK1/2 Nr.kat.9102	Cell Signaling, USA
Królicze przeciwciała poliklonalne klasy IgG anty ufosforylowana-ERK1/2 nr.kat.9101 [Thr202, Tyr 204]	Cell Signaling, USA
Ośle przeciwciała poliklonalne klasy IgG skierowane przeciwko króliczym IgG sprzężone z peroksydazą chrzanową Nr.kat. 711-035-152.	Jackson ImmunoResearch, USA
Kozie przeciwciała poliklonalne klasy IgG skierowane przeciwko mysim IgG sprzężone z peroksydazą chrzanową Nr.kat. ab205719.	Abcam, USA

### 3.9. Standardy DNA

Nazwa	Producent
GeneRuler™ DNA Ladder Mix Nr.kat SM0333	Thermofisher, USA
GeneRuler™ 100bp Ladder Mix Nr.kat SM0331	Thermofisher, USA

### 3.10. Standardy białek

Nazwa	Producent
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder Nr. kat. 226619	Thermofisher, USA
Perfect™ Tricolor Prestained Protein Ladder Nr.kat. E3210-01	EurX, Polska
BSA – V frakcja albuminy surowicy bydłowej Nr. kat. 05479	Sigma-Aldrich, USA

### 3.11. Podłoża do hodowli bakteryjnych

**Pożywka LB** (*Luria-Bertani*) : 1% bakto-trypton, 1% NaCl.

**Pożywka SB** (*South-Broth*) : 3% bakto-trypton, 2% ekstrakt drożdżowy.

**Pożywka SOC** (*Super Optimal Catabolite repression*) : 2% bakto-trypton, 0,5% ekstrakt drożdżowy.

Pożywka **LB** zestalona agarem: żywka LB z dodatkiem 1,5% agaru.

Pożywka **SB** zestalona agarem: żywka SB z dodatkiem 1,5% agaru.

Pożywki sterylizowano w autoklawie przez 30 min w temperaturze 120°C.

Do takich podłoży schłodzonych do temperatury 40°C-50°C dodawano ampicylinę o stężeniu końcowym w r-rze (100 µg/ml).

### 3.12. Podłoża do hodowli komórek eukariotycznych P10 Pasożyta

*Leishmania tarentolae*

#### Pożywka płynna BHI

- 8% wyciąg sercowo-mózgowy
- 5% hydrolizat pepsynowy tkanki zwierzęcej
- 16% trzustkowy hydrolizat kazeiny
- 5% chlorek sodu
- 2% glukoza
- 2,5% wodorofosforan disodowy
- hemina w 50% trietanolaminie (stężenie końcowe-5µg/ml)
- penicylina 10000 U /ml /streptomycyna 10000 µg/ml
- neomycyna (50µg/ml).

Pożywka **BHI** zestalona agarem: żywka BHI z dodatkiem 1,5% agaru i 10% FBS.

Pożywki sterylizowano w autoklawie przez 15 min w temperaturze 121°C. Do takiego podłoża schłodzonego do temperatury pokojowej dodawano mieszaninę penicyliny/streptomycyny (stężenie końcowe 100 µg/ml).

### 3.13. Pożywki hodowlane i roztwory stosowane w pracy z komórkami eukariotycznymi

- **Pożywka  $\alpha$ -MEM** ( *$\alpha$ -Minimal Essential Medium*) [Biowest, Laboratorium Chemii Ogólnej IITD PAN, Polska].
- **Pożywka  $\alpha$ -MEM pełna** – żywka  $\alpha$ -MEM z dodatkiem 10% FBS, 2 mM L-glutaminy i mieszaniny antybiotyków (100  $\mu$ g/ml - streptomycyny i penicyliny). [Biowest, Laboratorium Chemii Ogólnej IITD PAN, Polska].
- **Pożywka RPMI 1640** [Biowest, Laboratorium Chemii Ogólnej IITD PAN, Polska].
- **Pożywka RPMI 1640 pełna** – RPMI 1640 z dodatkiem 10% FBS, 2 mM L-glutaminy i mieszaniny antybiotyków (stężenie końcowe 100  $\mu$ g/ml streptomycyny i penicyliny) [Biowest, Laboratorium Chemii Ogólnej IITD PAN, Polska].
- **Pożywka DMEM High Glucose** z dodatkiem 4,5 g glukozy [Biowest, Laboratorium Chemii Ogólnej IITD PAN, Polska]
- **Pożywka DMEM High Glucose pełna** z dodatkiem 4,5 g glukozy i 10% FBS, 2mM L-glutaminy i mieszaniny antybiotyków (stężenie końcowe 100  $\mu$ g/ml streptomycyny i penicyliny) [Biowest, Laboratorium Chemii Ogólnej IITD PAN, Polska] (**DMEM High Glucose- Pełna**)
- **Roztwór Trypsyny/EDTA** – roztwór wodny 0,05% trypsyny i 0,02% EDTA [Biowest, Laboratorium Chemii Ogólnej IITD PAN, Polska]
- **Płodowa surowica bydlęca (FBS)** [Biowest, EurX, Polska]
- **Roztwór L-glutaminy 200 mM** [Biowest, Bioshop, Polska]
- **Roztwór PEN/STREP** – Penicylina/Streptomycyna (10.000 U/ml; 10 mg/ml, Biowest, Bioshop, Polska)
- **Roztwór puromycyny 10 mg/ml** roztwór (Gibco, Wielka Brytania).



### 3.14. Linie komórkowe

#### Linia komórek pakujących LentiX-293FT

Linie komórek pakujących LentiX-293FT zakupiono w firmie Clontech, USA. Komórki te wywodzą się z ludzkich pierwotnych, embrionalnych komórek nerki HEK293 (*ang. human embryonic kidney cells*), które uzyskano poprzez transdukcję DNA ludzkiego adenowirusa typu 5 i cDNA dla antygeny T (*ang. larger T antygen*). Białko E1A adenowirusa odpowiada za transaktywację niektórych promotorów wirusowych, a obecność antygeny T pochodzącego z wirusa SV40 zapobiega integracji wektorów z genomem komórek pakujących. Po modyfikacjach genetycznych wyselekcjonowano klon komórkowy charakteryzujący się dużą wydajnością transfekcji i produkcją wysokiego miana lentiwirusów, który nazwano LentiX-293FT.

#### Ludzkie linie komórkowe raka gruczołu piersiowego

- a) Linia komórkowa **T47D** ludzkiego raka gruczołu piersiowego – harmonozależny gruczolakorak piersi. Komórki tej linii wykazują ekspresję receptorów dla estrogeny (ER), progesteronu (PR) oraz naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 (HER-2). Cechą charakterystyczną tej linii jest palindromowa duplikacja genu *PIP* stąd linia ta wykazuje wzmożoną konstytutywną ekspresją tego białka (ECACC, Wielka Brytania).
- b) Linia komórkowa **MDA-MB-453** ludzkiego raka gruczołu piersiowego- komórki tej linii wykazują ekspresję receptorów androgenowych (AR). Wyprowadzono z hormono-zależnego gruczolakoraka (ATCC, USA).
- c) Linia komórkowa **MDA-MB-231** ludzkiego raka gruczołu piersiowego - komórki tej linii wyprowadzono z gruczolakoraka gruczołu piersiowego, nie wykazują one ekspresji receptorów dla estrogeny (ER), progesteronu (PR) i naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 (HER-2). Komórki te charakteryzują się brakiem ekspresji białka PIP jak również mRNA na poziomie mierzalnym ( ATCC, USA).

- d) Linia komórkowa **MCF-7** ludzkiego raka gruczołu piersiowego - komórki tej linii wywodzą się z wysięku jamy opłucnowej kobiety cierpiącej na estrogenozależnego gruczolakoraka gruczołu piersiowego. Charakteryzują się obecnością receptorów estrogenowych (ER) jak i progesteronowych (PR) (IITD PAN, Wrocław).
- e) Linia komórkowa **SKBR-3** ludzkiego raka gruczołu piersiowego - komórki tej linii wykazują nadekspresję receptora naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 (HER-2), przy braku ekspresji receptorów dla progesteronu (PR) oraz estrogenu (ER). Komórki te są zdolne do tworzenia nisko zróżnicowanych nowotworów w modelu myszy bezgranicznych (IITD PAN, Wrocław).
- f) Linia komórkowa **BT-474** ludzkiego raka gruczołu piersiowego - komórki tej linii wywodzą się z litego raka przewodowego gruczołu piersiowego. Linia ta wykazuje nadekspresję receptora naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 (HER-2) ( IITD PAN, Wrocław).
- g) Linia komórkowa **ZR-75-1** ludzkiego raka gruczołu piersiowego - komórki ZR-75-1 wywodzą się z wysięku jamy brzusznej pacjentki obarczonej gruczolakorakiem gruczołu piersiowego. Wykazują ekspresję receptorów estrogenowych (ER) (IITD PAN, Wrocław).

#### **Linia komórkowa P10 pasożyta *Leishmania tarentolae*.**

Linia komórkowa P10 pasożyta *Leishmania tarentolae* (Nr. Kat. LT-101) została pozyskana z Hiszpańskiego Gekona murowego (Jena Bioscience, Niemcy).

#### **3.15. Zwierzęta doświadczalne**

W doświadczeniach *in vivo* wykorzystano, 6-7 tygodniowe samice wsobnego szczepu Balb/c Crl:NU-Foxn1<sup>tm</sup>, które zakupiono w firmie Charles River (USA). Szczep tych

myszy otrzymano w National Institute of Health (USA). Do badań udzielono zgodę nr 26/2016 z poprawką nr 022/2019 przez I Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach we Wrocławiu według wytycznych opisanych w „*Interdisciplinary Principles and Guidelines for the Use of Animals in Research, Marketing and Education*” New York Academy of Sciences ad Hoc Committee on Animal Research. Doświadczenia prowadzono w warunkach SPF (*Specific Pathogen Free* - wolne od patogenów), przy uwzględnieniu obowiązujących norm higienicznych i etycznych. Myszy hodowane były z dostępem do wody i paszy *ad libitum*.

#### **3.16. Metody biologii molekularnej**

##### **3.16.1. Izolacja plazmidowego DNA na małą skalę za pomocą zestawu „Plasmid miniprep DNA purification kit ”**

Hodowlę bakterii prowadzono w 6 ml pożywki LB (rozdz. 3.4) z dodatkiem ampicyliny (100 µg/ml) przez noc w temperaturze 37°C, z wytrząsaniem. Następnie 1,5 ml zawiesiny bakterii przenoszono do próbówki i wirowano przez 5 min przy 3000 x g. Supernatant zlewano, a do próbówki dodawano kolejną porcję zawiesiny bakterii i ponownie wirowano w takich samych warunkach. Po zlaniu supernatantu, osad bakteryjny zawieszano w 250 µl buforu do zawieszania Cell R (rozdz. 3.4). Następnie bakterie lizowano poprzez dodanie 200 µl buforu lizującego Lysis Blue (rozdz. 3.4) Po wymieszaniu przez kilkukrotne odwrócenie próbówki, dodawano 350 µl buforu Neutral B (rozdz. 3.4), następnie ponownie dokładnie i powoli mieszano zawartość próbówki poprzez kilkukrotne odwracanie, aż do całkowitego zaniku niebieskiej barwy zawiesiny i wytrąceniu genomowego DNA oraz SDS-u (rozdz. 3.1). Następnie wirowano przez 7 min z prędkością ok 12000 x g. Supernatant наносzono na uprzednio zaktywowaną poprzez dodanie 40 µl buforu PL kolumnę znajdującą się w próbówce odbierającej i wirowano przez 1min z prędkością 10000 x g. Następnie przesącz zlewano a kolumnę ze związanym DNA płukano 500 µl buforu płuczącego PLX1 i wirowano 1 min z prędkością 10000 x g. Dalej ponownie zlewano przesącz i płukano powtórnie kolumnę 650 µl buforu PLX2 i wirowano 1min. 10000 x g. Następnie przesącz zlewano i wirowano ponownie na tych samych obrotach jeszcze przez 2 min w celu pozbycia się resztek zanieczyszczeń

i buforu płuczącego. Ostatecznie, związane DNA eluowano wodą wolną od nukleaz. Tak oczyszczone DNA przechowywano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  do dalszych analiz.

#### **3.16.2. Izolacja plazmidowego DNA na dużą skalę za pomocą zestawu „Plasmid maxi kit Qiagen”.**

Izolację DNA w maxi skali prowadzono z wykorzystaniem zestawu „Plasmid Maxi kit Qiagen” według dostarczonego protokołu producenta (rozdz. 3.4).

Pożywkę LB (4 ml) z dodatkiem ampicyliny (100  $\mu\text{g/ml}$ ) inokulowano pojedynczą kolonią bakterii, i hodowano przez 6 godzin w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$ . Następnie, całą objętością tej hodowli szczepiono 400 ml świeżej pożywki LB z dodatkiem ampicyliny (100  $\mu\text{g/ml}$ ), i bakterie hodowano przez noc, w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$ , z wytrząsaniem. Taką zawiesinę komórek bakteryjnych wirowano przez 10 min przy 6000 x g w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$ . Uzyskany osad bakteryjny zawieszano w 10 ml schłodzonego do  $4^{\circ}\text{C}$  buforu P1, następnie dodawano 10 ml buforu P2 w celu lizy komórek bakteryjnych. Po wymieszaniu przez kilkukrotne odwracanie próbki i 5 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej, do próbek dodawano 10 ml schłodzonego do temperatury  $4^{\circ}\text{C}$  buforu P3, i całość pozostawiano w temperaturze topniejącego lodu przez okres 20 min. Po tym czasie próbkę wirowano przez 30 minut przy 20000 x g w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$  i klarowny supernatant nanoszono na uprzednio zrównoważoną 10 ml buforu QBT, kolumnę dostarczoną przez producenta, wypełnioną złożem wiążącym DNA. Po grawitacyjnym usunięciu niezwiązanego materiału, kolumnę przepłukiwano dwukrotnie 30 ml roztworu QC, a związane DNA wmywano 15 ml roztworu QF. DNA wytrącano poprzez dodanie do próby 10,5 ml izopropanolu. Po wymieszaniu, całość wirowano przez 30 minut, w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$ , przy 15000 x g. Supernatant zlewano, a osad plazmidowego DNA przepłukiwano 5 ml 70 % etanolu, wirując próbki przez 5 minut przy 14000 x g. Supernatant ponownie zlewano, a próbkę DNA suszono i ostatecznie rozpuszczano w 500  $\mu\text{l}$  wody wolnej od nukleaz.

### 3.16.3. Izolacja całkowitego RNA z komórek eukariotycznych

Do izolacji mRNA z komórek eukariotycznych wykorzystywano zestaw „GeneMatrix Universal RNA Purification kit” (EurX, Polska), postępując zgodnie z zaleceniami producenta. Komórki hodowano na płytkach 6-dołkowych (Greiner Bio One, USA) tak, aby w dniu izolacji pokrywały 60 % powierzchni dołka hodowlanego. W celu izolacji RNA, komórki odrywano od dna studzienki za pomocą roztworu Trypsyna/EDTA (rozdz. 3.13) i po dwukrotnym przepłukaniu PBS, zawieszano w 350  $\mu$ l buforu lizującego RL z dodatkiem  $\beta$ -merkaptoetanolu (10  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptoetanolu/1 ml buforu RL). Następnie, lizat komórkowy наносono na kolumnkę dostarczoną przez producenta, którą wirowano przez 2 min 14000 x g. Do tak uzyskanego przesączu dodawano 250  $\mu$ l 70 % etanolu. Po dokładnym wymieszaniu, całość наносono na kolejną kolumnkę, którą również wirowano przez 1 min przy 11000 x g. W kolejnym etapie, kolumnkę przepłukiwano, kolejno, buforem DN1 (400  $\mu$ l) celem pozbycia się śladów DNA oraz dwukrotnie buforem RBW (650  $\mu$ l i 350  $\mu$ l), wirując za każdym razem przez 1 min, przy 11000 x g. W celu usunięcia resztek buforu, kolumnkę ponownie wirowano przez 1 min przy 11000 x g. Związane ze złożem RNA ostatecznie wymywano 50  $\mu$ l wody wolnej od RNAz. Oczyszczone RNA służyło jako matryca do syntezy pierwszej nici cDNA (rozdz. 3.4) i wykorzystywane było od razu po wymyciu z kolumny. Pozostałą ilość RNA przechowywano w  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.16.4. Synteza cDNA na matrycy RNA

Do syntezy pierwszej nici cDNA wykorzystywano gotowy zestaw „High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit” (Applied Biosystem, USA). W pierwszej kolejności, do wolnej od RNAz próbki dodawano 2,5  $\mu$ g całkowitego RNA (rozdz. 3.4) oraz 2  $\mu$ l r-ru startera dostarczanego przez producenta. Próbkę mieszano i dodawano 2  $\mu$ l buforu reakcyjnego (5 x stężonego), 0,8  $\mu$ l roztworu dNTP (Mix) (100 mM) oraz 1  $\mu$ l roztworu odwrotnej transkryptazy Multiscribe oraz 1  $\mu$ l inhibitora RNAz i po wymieszaniu, zwirowaniu, próbkę inkubowano w temperaturze  $25^{\circ}\text{C}$  przez 10 minut następnie  $37^{\circ}\text{C}$  przez 120 min. Reakcję przerywano przez pozostawienie próbki przez 5 minut w temperaturze  $85^{\circ}\text{C}$ . Część uzyskanego cDNA wykorzystywana była do dalszych eksperymentów, bezpośrednio po jego wyizolowaniu, natomiast niewykorzystana część przechowywana była w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.16.5. Oznaczanie ilości i czystości RNA

Pomiarów ilości i czystości RNA dokonywano w spektrofotometrze „NanoDrop2000” (Thermofisher, USA), poprzez pomiary absorbancji (A) przy długości fal 260 i 280 nm. Czystość RNA określano na podstawie stosunku  $A_{260}/A_{280}$ . Preparat RNA uznawano za czysty, tzn. wolny od zanieczyszczeń białkami i DNA, kiedy stosunek  $A_{260}/A_{280}$  wynosił 1,8-2,0. Jeżeli próbka RNA zanieczyszczona była DNA to stosunek  $A_{260}/A_{280}$  był wyższy niż 1,8, natomiast jeżeli próbka zanieczyszczona była białkami to stosunek  $A_{260}/A_{280}$  był niższy niż 1,8. Integralność wyizolowanego RNA oceniano poprzez rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym (rozd. 3.1).

### 3.16.6. Rozdział elektroforetyczny DNA i RNA w żelu agarozowym

Roztwór agarozowy 2% - owy przygotowywano poprzez rozpuszczenie 0,6 g agarozy w 30 ml buforu TAE (rozd. 3.2). Po schłodzeniu, do rozpuszczonej agarozy dodawano 1,2  $\mu$ l bromku etydyny 10 mg/ml. Do próbek DNA i RNA, przed naniesieniem na żel, dodawano buforu obciążającego w stosunku objętościowym 5:1, a do poszczególnych studzienek w żelu agarozowym наносono około 1  $\mu$ g DNA w objętości 25  $\mu$ l lub 4  $\mu$ g RNA w 25  $\mu$ l. Elektroforeza prowadzona była w 1 % buforze TAE, przy napięciu 100 V, przez 30 minut. W celu wykrycia rozdzielonych prążków DNA lub RNA, żel po zakończonej elektroforezie przenoszony był do czytnika UV (Syngene Image Analyser G:BOX, Wielka Brytania), gdzie wykonywano również zdjęcie cyfrowe żelu.

### 3.16.7. Izolacja DNA z żelu agarozowego za pomocą zestawu GeneMatrix Agarose-Out DNA Purification kit

Izolację DNA z żelu agarozowego prowadzono według protokołu dostarczonego przez producenta (rozd. 3.4). Wycięte sterylnym skalpelem bloczki agarozy zawierające właściwe fragmenty DNA, przenoszono do probówek (1,5ml) dodawano 0,6 ml roztworu (Orange A) i ogrzewano próbki do temperatury 55°C, aż do całkowitego rozpuszczenia agarozy. Następnie, całość наносono na kolumnkę ze złożem wiążącym DNA, którą wirowano przez 60 sekund przy 10000 x g. Kolumnkę przepłukiwano, kolejno, 500  $\mu$ l buforu płuczającego A1 i 650  $\mu$ l buforu AX2, wirując ją za każdym razem przez 1 minutę, przy 10000 x g. W celu usunięcia resztek buforu, kolumnkę ponownie wirowano przez

1 min, przy 10000 x g. Związane ze złożem DNA wmywano, 55  $\mu$ l wody wolnej od DNAaz. DNA przechowywano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **3.16.8. Reakcja ligacji**

Reakcję łączenia różnych fragmentów DNA prowadzono w temperaturze  $16^{\circ}\text{C}$  przez 16 godzin z wykorzystaniem enzymu ligazy faga T4. (EurX, Polska). Skład mieszaniny reakcyjnej stosowano zgodnie z załączonym protokołem producenta. Całość próby wykorzystywano do transformacji bakterii. Najczęściej reakcję ligacji prowadzono przy stosunku molowym insertu do wektora 3:1.

#### **3.16.9. Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi**

Trawienie DNA prowadzono z wykorzystaniem enzymów restrykcyjnych zgodnie z zaleceniami producenta, w końcowej objętości 50  $\mu$ l. Mieszanina reakcyjna zawierała 1  $\mu$ g DNA (plazmidowe DNA lub fragment DNA uzyskany w reakcji PCR), odpowiedni enzym restrykcyjny (10 U), właściwy bufor stężony 10 razy (dostarczony przez producenta) oraz wodę destylowaną. Trawienie DNA prowadzono w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$  przez 2 godziny lub całą noc (ThermoFisher, USA)

**3.16.10. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)**

Amplifikację fragmentów DNA metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) prowadzono przy użyciu polimerazy OptiTaq (rozdz. 3.3) oraz GLX (rozdz. 3.3) zgodnie z załączonymi protokołami producenta. Jako matryce wykorzystywano wektory oraz uprzednio zsyntetyzowane cDNA. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki w jakich prowadzono reakcje przedstawiono w **tabelach poniżej**.

Tab. 1a Skład mieszaniny reakcyjnej dla jednej próby w reakcji PCR

<b>Składnik mieszaniny reakcyjnej</b>	<b>Objętość</b>
Matryca cDNA	1 $\mu$ l
dNTP MIX (10 mM)	1 $\mu$ l
Starter F (10 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Starter R (10 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Polimeraza <b>OptiTaq</b>	0,5 $\mu$ l
Bufor C	2,5 $\mu$ l
Woda wolna od DNaz	18 $\mu$ l
<b>Objętość całkowita</b>	<b>25 <math>\mu</math>l</b>

Tab. 1b Warunki reakcji PCR

Warunki reakcji	<b>Wstępna denaturacja</b>	<b>Denaturacja</b>	<b>Przyłączanie starterów</b>	<b>Elongacja</b>	<b>Końcowa elongacja</b>
<b>Temperatura</b>	95°C	95°C	46°C	72°C	72°C
<b>Czas</b>	3 min	30 s	30 s	45 s	3 min
<b>Gradient temperatury</b>	2°C/s	2°C/s	2°C/s	2°C/s	2°C/s
<b>Liczba cykli</b>	1	29	29	29	1



Tab. 1c Skład mieszaniny reakcyjnej dla jednej próby w reakcji PCR

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Objętość
Matryca cDNA 10 ng	2 $\mu$ l
dNTP MIX	1 $\mu$ l
Starter F (10 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Starter R (10 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Polimeraza <b>GLX</b>	1 $\mu$ l
Bufor	5 $\mu$ l
Woda wolna od DNAz	14 $\mu$ l
<b>Objętość całkowita</b>	<b>25 <math>\mu</math>l</b>

Tab. 1d Warunki reakcji PCR

Warunki reakcji	Denaturacja	Przylączenie starterów	Elongacja
<b>Temperatura</b>	98°C	60°C	68°C
<b>Czas</b>	10 s	15 s	120 s
<b>Liczba cykli</b>	30	30	30

Generalnie, jako temperaturę przyłączenia starterów przyjmowano temperaturę o dwa stopnie niższą niż średnia z temperatur topnienia starterów. Czas syntezy DNA zależał od długości amplifikowanego fragmentu DNA. Zgodnie z zaleceniami producenta stosowano 60 sekund na każde 1000 pz produktu PCR. Liczba cykli zależała głównie od początkowej ilości matrycowego DNA. Celem minimalizacji ryzyka powstawania mutacji, nie przekraczano liczby cykli 30.

### 3.16.11. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym (qPCR)

Reakcję PCR w czasie rzeczywistym (Real-Time-PCR, qPCR) prowadzono w aparacie 7500 (Applied Biosystem, USA) z użyciem specyficznych starterów znakowanych sondą TagMan (rozd. 3.1.4). Skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki dla pojedynczej reakcji przedstawiono w **tabelach poniżej**. Jako matryce wykorzystywano uprzednio zsyntetyzowane cDNA (rozd. 3.2.8), natomiast jako gen

referencyjny wykorzystano gen *SDHA* kodujący dehydrogenazę bursztynianową. Reakcję prowadzono przez 40 cykli. Poziom ekspresji badanych genów analizowano za pomocą oprogramowania udostępnionego przez producenta Applied Biosystem (Qant-Studio Real Time PCR, USA).

Tab. 2a Skład mieszaniny reakcyjnej dla jednej próby w reakcji PCR w czasie rzeczywistym

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Objętość
iTag Master Mix wraz z polimerazą	10 $\mu$ l
Matryca cDNA	1 $\mu$ l
TagMan (10 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Woda destylowana	7 $\mu$ l
<b>Końcowa objętość</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>

Tab. 2b Warunki PCR w czasie rzeczywistym

Warunki reakcji	Wstępna denaturacja	Denaturacja	Synteza DNA	Krzywa topnienia		
				Temperatura	Czas	Gradient temp.
<b>Temperatura</b>	95°C	95°C	60°C	95°C	60°C	95°C
<b>Czas</b>	10 min	15 s	60 s	15 s	60 s	15 s
<b>Gradient temp.</b>	1°C/s	1°C/s	1°C/s	2,63°C/s	2,42°C/s	0,05°C/s
<b>Liczba cykli</b>	1	40	40	1	1	1

### 3.16.12. Przygotowanie chemikompetentnych bakterii

Bakterie *E. coli* szczepu DH5 $\alpha$  (rozd. 3.7) wysiewano na pożywkę LB zestaloną 1,5 % agarem (rozd. 3.1). Hodowlę prowadzono w temperaturze 37°C przez 16 godzin, do momentu pojawienia się pojedynczych kolonii bakteryjnych, które

przenoszono indywidualnie do 10 ml płynnej pożywki LB, kontynuując hodowlę przez noc. Następnie, 4 ml takiej kultury bakteryjnej przenoszono do 300 ml płynnej pożywki LB, prowadząc hodowlę do momentu, aż zawiesina bakterii uzyska  $OD_{600} = 0,5$ . Następnie, bakterie wirowano przy 2500 x g, przez 10 minut, w temperaturze 4°C, a następnie ich osad zawieszano w 32 ml buforu „transformującego” I (schłodzonego do temperatury 4°C) (rozdz. 3.2.) i ponownie wirowano przy 2500 x g przez 10 minut. Uzyskany osad bakterii ponownie zawieszano w 9 ml buforu „transformującego” II (rozdz. 3.2.), po czym 100 µl takiej zawiesiny bakterii przenoszono do próbek, mrożono w ciekłym azocie które przetrzymywano w temperaturze -80°C.

#### **3.16.13. Transformacja bakterii**

Do 100 µl zawiesiny chemikompetentnych bakterii *E. coli* szczepu DH5α (rozdz. 3.7) dodawano 100 ng plazmidowego DNA i pozostawiano je na lodzie na okres 20 minut. Następnie bakterie przenoszono do temperatury 42°C na okres 50 sekund i ponownie przekładano na lód, tym razem na okres 10 minut. Następnie do próbek z bakteriami dodawano 500 µl pożywki SOC (rozdz. 3.12) umieszczano ją na wytrząsarce, w temperaturze 37°C, na dwie godziny. Po tym czasie, bakterie wirowano przy 2000 x g przez 5 min, ponownie zawieszano w 50 µl pożywki SOC i całość wysiewano na płytkę Petriego pokrytą pożywką LB zestaloną dodatkiem agaru (rozdz. 3.12) z dodatkiem ampicyliny w stężeniu 100 µg/ml. Hodowlę bakterii prowadzono przez noc w temperaturze 37°C. Oporne na antybiotyki kolonie bakterii, które przyjęły plazmidowe DNA, wykorzystywano do dalszych badań.

**3.16.15. Transfekcja i Transdukcja komórek eukariotycznych**

Komórki pakujące HEK 293FT (rozdz. 3.14.) hodowano w butelkach T-75 w taki sposób, aby w dniu eksperymentu komórki porastały około 70 % powierzchni dna naczynia hodowlanego. Komórki te transfekowano wektorami składającymi się na system lentiwirusowy trzeciej generacji (rozdz. 3.6):

Wektor ekspresyjny	20 µg
pMDL-g/p-RPE	10 µg
pRSV-REV	5 µg
pMk-VSVG	5 µg
PEI	50 µl
Dopełniano do 1000 µl PBS	

W tym celu wektory plazmidowe, w ilościach podanych w **Tabeli 3 powyżej**, rozpuszczano w 900 µl PBS do których dodawano 50 µl roztworu polietylenoiminy o stężeniu 1 mg/ml. Przygotowaną mieszaninę transfekcyjną наносono kroplami na powierzchnię pożywki znad komórek HEK 293FT, tak aby równomiernie rozprowadzić go po całej powierzchni i hodowle kontynuowano przez kolejnych 16 godzin. Po tym czasie, pożywkę z dodatkiem odczynnika transfekcyjnego wymieniano na pełną pożywkę  $\alpha$ -MEM. Po następnych 48 godzinach hodowli, kiedy widoczny był efekt w postaci zmiany kształtu komórek i uwidocznieniem się charakterystycznych syncytiów, wywołany uwalnianiem cząstek pseudowirusa, pożywkę znad komórek zbierano do próbki 15 ml i wirowano w temperaturze 4°C, przez 10 min, przy 500 x g. W celu izolacji uwolnionych do nadsąca cząstek wirusa, pożywkę wstępnie oczyszczano z użyciem filtrów strzykawkowych 0,2 µm (Millipore), a następnie preparat wirusowy zagęszczano na filtrach „Amicon Ultra-15 100kDa” (Millipore), wirując próby przez 10 minut w temperaturze pokojowej przy 2460 x g. W ten sposób z 10 ml nadsąca wirusowego uzyskiwano 150 µl zagęszczonego preparatu zawierającego infekcyjne cząstki wirusa. W celu transdukcji, do  $3 \times 10^4$  komórek zawieszonych w 900 µl pożywki bez surowicy, dodawano zazwyczaj 150 µl zagęszczonego preparatu wirusowego, następnie próbki wirowano przez 2,5 godziny przy 2460 x g, w temperaturze 23°C. Po tym czasie supernatant zlewano, a osad komórek zawieszano w pełnej pożywce

odpowiedniej do danej linii komórkowej i wysiewano do studzienek płytki 6 - dołkowej. Hodowlę prowadzono, w obecności puromycyny 1  $\mu\text{g/ml}$  celem selekcji komórek, które przyjęły obce DNA.

#### **3.16.16 Sekwencjonowanie DNA**

Sekwencjonowania DNA wykonywała firma „Genomed” Sp. z o.o (Warszawa, Polska). Do sekwencjonowania wykorzystywane były startery identyczne ze starterami służącymi do amplifikacji fragmentów DNA metodą PCR (rozdz. 3.16.11) lub startery, dostarczane przez firmę „Genomed”, (Warszawa, Polska).

#### **3.17. Hodowle komórkowe**

##### **3.17.1 Prowadzenie hodowli komórek adherentnych**

Hodowle komórek eukariotycznych prowadzono w naczyniach plastikowych o powierzchni 25 cm<sup>2</sup> (T-25), 75 cm<sup>2</sup> (T-75) lub 175 cm<sup>2</sup> (T-175) (Greiner BioOne, USA), w pełnej pożywce  $\alpha$ -MEM, RPMI 1640 lub DMEM w temperaturze 37°C i atmosferze zawierającej 5 % CO<sub>2</sub>. Pełne pożywki do hodowli komórkowych przechowywano w temperaturze 4°C przez okres jednego miesiąca, a przed użyciem ogrzewano je do temperatury 37°C. Hodowlę prowadzono zmieniając pożywkę średnio co 3 dni, do momentu porośnięcia przez komórki około 80 % powierzchni naczynia hodowlanego. W celu podtrzymania hodowli, pożywkę zlewano, naczynie hodowlane płukano 2-krotnie roztworem PBS o temperaturze 37°C i komórki odrywano od dna naczynia traktując je 4 ml roztworu Trypsyna/EDTA (rozdz. 4.1.12) przez 5 min. Następnie, dodawano 5 ml pełnej pożywki w celu inaktywacji trypsyny a zawiesinę komórek przenoszono do probówki wirówkowej o objętości 15 ml (Falcon, BD, USA). Po odwirowaniu prób (300 x g przez 5 min), supernatant zlewano, komórki zawieszano w 1 ml medium pełnego i odpowiednie ich ilości ponownie wysiewano do butelki celem kontynuacji hodowli. Żywotność komórek sprawdzano raz w tygodniu za pomocą barwienia 0,1 % r-rem błękitu trypanu i zliczano je w komorze Bürkera.

### **3.17.2. Prowadzenie hodowli komórek nieadherentnych P10 pasożyta *Leishmania tarentolae*.**

Statyczną hodowlę komórek *Leishmania tarentolae* prowadzono w niedherentnych naczyniach plastikowych o powierzchni 25 cm<sup>2</sup> (T-25), 75 cm<sup>2</sup> (T-75) (Greiner Bio One, USA), w pełnej pożywce BHI (rozdz. 3.12) w temperaturze 26°C bez dopływu światła i CO<sub>2</sub>. Pełną pożywkę do hodowli komórek P10 przechowywano w temperaturze 4°C bez dostępu światła przez okres jednego miesiąca, a przed użyciem ogrzewano ją do temperatury 26°C. Hodowlę prowadzono zmieniając pożywkę średnio co 3 dni, do momentu osiągnięcia przez komórki gęstości optycznej OD=1,4, co odpowiada liczbie komórek 6 x 10<sup>7</sup>/ml. Następnie pożywkę zbierano, zawiesinę komórek przenoszono do probówki wirówkowej o objętości 15 ml (Falcon, BD, USA). Po odwirowaniu (300 x g przez 5 min), supernatant zlewano, a komórki zawieszano w świeżym medium hodowlanym BHI z dodatkiem neomycyny 50 µg/ml. Hodowlę prowadzono w kolbach o pojemności 500 ml umożliwiających dopływ powietrza (Nalgen, USA), w temperaturze 26°C, z wytrząsaniem orbitalnym 140 obrotów/min, bez dostępu światła. Wyjściowo, hodowlę zaszczipiano 10 ml zawiesiny komórek P10 o gęstości optycznej OD=1,4, znajdujących się w fazie logarytmicznego wzrostu. Po 72 h hodowli zawiesinę komórek P10, wirowano 2460 x g przez 40 min w temperaturze 4°C a supernatant zbierano celem izolacji rekombinowanego białka PIP (rozdz. 3.19.3). Zebrany supernatant dializowano do buforu fosforanowego pH=7.5. Bufor dializacyjny wymieniano co 24h. Tak przygotowany supernatant przechowywano w 4°C, nie dłużej niż 3 dni przed oczyszczeniem na złożu NiNT-agaroz (Thermofisher, USA).

### **3.17.3. Zamrażanie i rozmrażanie eukariotycznych komórek adherentnych**

Komórki eukariotyczne inkubowano z roztworem trypsyno-wersenu przez 5 min, po zakończonej inkubacji komórki przepłukiwano w pełnym medium, wirowano, i osad (w liczbie 2,5 x 10<sup>6</sup> komórek) zawieszano w 1,0 ml pełnej pożywki z dodatkiem DMSO, w krioprobówkach o pojemności 1,5 ml (Greiner Bio One, USA), które umieszczano w krionaczyniu wypełnionym izopropanolem w temperaturze -80°C. Po 24 godzinach przenoszono je do pojemnika z ciekłym azotem.

Komórki rozmrażano przez dodanie do krioprobówki 1,5 ml odpowiedniej pełnej pożywki o temperaturze 37°C następnie przenoszono do probówek wirówkowych o objętości 15 ml (BectonDickinson, USA) i objętość prób uzupełniało do 5 ml odpowiednią pełną pożywką. Próbkę wirowano przy 300 x g przez 5 min i po usunięciu supernatantu, komórki zawieszano w świeżej pełnej pożywce i wysiewano do butelki hodowlanej T-25 (BectonDickinson, USA). Następnego dnia pożywkę hodowlaną wymieniano na świeżą i hodowlę kontynuowano.

#### **3.17.4. Zamrażanie i rozmrażanie komórek P10 *Leishmania tarentolae***

Zawiesinę komórek P10 ( $6 \times 10^7$ ) o gęstości optycznej równej OD = 1,4 wirowano (300 x g przez 5 min) a ich osad zawieszano w 2 ml pełnej pożywki BHI z dodatkiem 10 % glicerolu. Następnie taką zawiesinę komórek pozostawiano na 10 min w temperaturze pokojowej i 60 min w temperaturze topniejącego lodu. Po tym czasie umieszczano probówkę w temperaturze -20°C na całą noc, a następnie przenoszono do -80°C.

#### **3.17.5. Prowadzenie hodowli komórek adherentnych w obecności czynników stresowych**

Hodowle komórek prowadzono w płytkach 6- lub 96- dołkowych (Greiner Bio One, USA) do momentu porośnięcia przez nie około 50 % powierzchni studzienki. Następnie pożywkę wymieniano na świeżą, a komórki hodowano w obecności wybranego cytostatyku w takich ilościach, aby stężenie końcowe doksorubicyny, paklitakselu wynosiło: 0,005; 0,05; 0,5; 1,0; 2  $\mu$ M, a dla 4-hydroksycyklofosfamidu wynosiło 0,5; 1,0; 10; 20; 30  $\mu$ M. Hodowle w obecności cytostatyków prowadzono przez kolejnych 24, 48, 72 godziny w inkubatorze o temperaturze 37°C i atmosferze zawierającej 5 % CO<sub>2</sub>.

### **3.18. Testy komórkowe *in vitro***

#### **3.18.1 Oznaczanie żywotności komórek za pomocą testu MTT**

Do oceny aktywności metabolicznej komórek, a tym samym ich żywotności, wykorzystywano test MTT (rozdz. 3.18.1), który polega na redukcji przez komórkowe dehydrogenazy soli tetrazolowej do barwnego formazanu. Ilość powstającego barwnika

formazanu jest wprost proporcjonalna do liczby metabolicznie aktywnych komórek w hodowli. Komórki, w liczbie  $3-6 \times 10^3$ , wysiewano do studzienek 96-dołkowych płytek hodowlanych (Grainer BioOne, USA) i prowadzono hodowle w pełnej pożywce  $\alpha$ -MEM, RPMI 1640 z dodatkiem cytotatyków przez 24, 48 i 72 godziny. Następnie, do każdego z dołków dodawano 30  $\mu$ l MTT (Sigma, USA) o stężeniu 5 mg/ml inkubowano w temperaturze 37°C przez 4 godziny w atmosferze zawierającej 5 % CO<sub>2</sub>. Następnie, dodawano DMSO celem rozpuszczenia kryształów formazanu. Pomiarów absorbancji przy długości fali  $\lambda_{550}$  (maximum absorbancji dla MTT) i  $\lambda_{620}$  (absorbancja tła) dokonywano przy użyciu czytnika płytkowego „EnSpire 2300 Multilabel Reader” firmy (Perkin-Elmer, USA). Dane analizowano za pomocą programu „EnSpire 9,0” (Perkin-Elmer, USA).

#### **3.18.2. Cytometria przepływowa**

Komórki do testu przepłukiwano dwukrotnie buforem PBS, a następnie odrywano od dna naczynia hodowlanego za pomocą roztworu Trypsyna/EDTA. Po ponownym przepłukaniu, zawieszono je w 100  $\mu$ l roztworu odpowiedniego pierwszorzędowego przeciwciała (rozd. 3.8) w buforze PBS (1:50) i inkubowano przez 45 minut w temperaturze pokojowej. Następnie, próby wirowano przy 300 x g przez 5 min i komórki przepłukiwano trzykrotnie buforem PBS, zawieszając je w 100  $\mu$ l drugorzędowego przeciwciała skonjugowanego z FITC (rozd. 3.8) rozcieńczonego 1: 200 buforem PBS. Po inkubacji próbki przez 45 min w temperaturze pokojowej przepłukiwano ją ponownie, trzy razy, buforem PBS. Ostatecznie komórki zawieszano w 0,4 ml buforu PBS i przenoszono do probówek służących do pomiaru fluorescencji. Pomiarów fluorescencji dokonywano na cytometrze LRSFortessa (Becton Dickinson, USA) z użyciem kanału FL1. Zebrane dane analizowano z użyciem programu „Flowing Software2.0” (Turku, Finlandia) i przedstawiono w postaci histogramu (Samani F.S i wsp., 2014).

#### **3.18.3 Analiza cyklu komórkowego z użyciem jodku propidyny**

Do oceny proliferacji komórek wykorzystywano cytometr przepływowy LRSFortessa, (Becton Dickinson, USA). Analizy wyników dokonano za pomocą programu (ModFitLT™5.0, USA). Dla każdej z badanych próbek określono odsetek



jąder komórkowych w fazie cyklu komórkowego. Wyniki obrazowano za pomocą jednowymiarowych wykresów (histogramów) zależności odsetka jąder komórkowych od intensywności fluorescencji. Intensywność fluorescencji jest wprost proporcjonalna do zawartości DNA w komórkach. Komórki wysiewano na płytki 6 dołkowe w ilości 250 tys. komórek na dołek i hodowano 24, 48, 72 godziny. Następnie komórki odklejało za pomocą r-ru Trypsyna/EDTA i wirowano 5 min 500 x g. Płukano zimnym PBS trzykrotnie i wirowano 500 x g. Zawieszono w 1000 µl zimnym wodnym 70 % roztworze alkoholu etylowego mieszając. Tak przygotowane próby przechowywano nie dłużej niż 5 dni do analizy w celu utrwalenia i permabilizacji komórek. Następnie wirowano komórki 500 x g 4°C w celu pozbycia się etanolu i dalej płukano dwukrotnie zimnym PBS i wirowano 500 x g. Dodawano 200 µl odczynnika (rozdz. 3.4) zawierającego Jodek Propidyny i RNAzę A, przenoszono do probówek typu FACS inkubowano 30 min w temp 37°C bez dopływu światła. Odczyt w cytometrze przepływowym wykonano przy użyciu oprogramowania FACS Diva 3.0 (Becton Dickinson, USA).

#### **3.18.4 Wykrywanie komórek apoptotycznych poprzez pomiar poziomu aktywnych kaspaz 3/7.**

Komórki apoptotyczne wykrywano za pomocą zestawu „CaspGLOW Fluorescein Active Caspase-3/7 Staining Kit” (rozdz. 3.4) opartego na oznaczaniu aktywnych form kaspaz-3 i 7 za pomocą cytometrii przepływowej z wykorzystaniem terapeptydu DEVD-FMK (Asp-Glu-Val-Asp-fluorometyloketon) skoniugowanego z FITC (FITC-DEVD-FMK) wykonywano zgodnie z załączonym protokołem producenta. Komórki, po oderwaniu od dna naczynia hodowlanego za pomocą r-ru Trypsyna/EDTA (rozdz. 3.13), przenoszono do probówek pomiarowych (Becton Dickinson, USA) o pojemności 5 ml i wirowano przez 3 min, przy 300 x g. Następnie, osad komórek zawieszano w 0,5 ml buforu PBS z dodatkiem 1 µl gotowego roztworu koniugatu FITC-DEVD-FMK i inkubowano w temperaturze 37°C przez 60 min. Następnie próby ponownie wirowano jak wyżej, osad komórek dwukrotnie płukano 1 ml buforu „Wash” wchodzącego w skład zestawu i ostatecznie zawieszano w 0,5 ml buforu „Wash”. Analizę tak przygotowanych prób prowadzono w cytometrze przepływowym "LRSFortessa" (Becton Dickinson, USA), mierząc poziom fluorescencji w paśmie FL1 lasera niebieskiego dla

fluorochromu FITC. Dane analizowano za pomocą programu "Flowing Software 2,0" (Turku, Finlandia) (Samani F.S i wsp., 2014).

#### **3.18.5 Wykrywanie komórek apoptotycznych na podstawie oznaczenia aneksyny V**

Komórki apoptotyczne wykrywano za pomocą zestawu „AnnexinV/FITC kit” (BD, USA) (rozdz. 3.4) opartego na zdolności do selektywnego wiązania się aneksyny V do fosfatydyloseryny na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej, komórek apoptotycznych. Komórki ( $1 \times 10^6$ ) po oderwaniu od dna naczynia hodowlanego za pomocą roztworu Trypsyna/EDTA (rozdz. 3.13), przenoszono do probówek pomiarowych (Becton Dickinson, USA) o pojemności 5 ml i wirowano przez 3 min, przy 300 x g. Następnie, osad komórek zawieszano w 0,5 ml buforu wiążącego z dodatkiem 5  $\mu$ l gotowego roztworu koniugatu aneksyny V/FITC oraz 2,5  $\mu$ l jodku propidyny i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 min. Analizę tak przygotowanych prób prowadzono w cytometrze przepływowym "LRSFortessa" (Becton Dickinson, USA), mierząc poziom fluorescencji w paśmie FL1 lasera niebieskiego dla fluorochromu FITC oraz FL2 dla jodku propidyny. Dane analizowano za pomocą programu "Flowing Software 2,0" (Turku, Finlandia).

### **3.19. Metody biochemiczne i immunochemiczne**

#### **3.19.1 Przygotowanie lizatów komórkowych**

Komórki odklejano od dna naczynia hodowlanego poprzez użycie r-ru Trypsyna/EDTA, a następnie wirowano przy 300 x g przez 5 min w temperaturze 4°C i 2-krotnie płukano PBS. Osad komórek zawieszano w 60-100  $\mu$ l buforu do lizy RIPA (rozdz. 3.1) z dodatkiem gotowego 1 mM roztworu inhibitorów proteaz (rozdz. 3.1) i pozostawiano w temperaturze topniejącego lodu przez 30 min. Następnie lizat komórkowy wirowano przy 10000 x g przez 10 min w temperaturze 4°C. Po wirowaniu supernatant przenoszono do nowej probówki, jednocześnie pobierając z niej odpowiednią jego objętość do oznaczenia stężenia białka (rozdz. 3.19.4). Po oznaczeniu stężenia białka całkowitego, pobierano odpowiednią objętość supernatantu i po dodaniu buforu próbkowego (rozdz. 3.5) w stosunku 1:5 (1 objętość buforu do 5 objętości supernatantu)

próby pozostawiano w temperaturze 100°C przez 10 min. Następnie próbki lizatów komórkowych poddawano elektroforezie w żelu poliakryloamidowym (rozdz. 3.1).

#### **3.19.2. Izolacja białek membranowych z ludzkich linii komórkowych raka gruczołu piersiowego**

Komórki wysiewano do 4 butelek hodowlanych T-75 i hodowano do osiągnięcia przez nie 90 % powierzchni naczynia hodowlanego. Następnie pożywkę hodowlaną zlewano, komórki płukano dwukrotnie PBS i do każdej z butelek hodowlanych dodawano po 10 ml buforu zawierającego sulfo-NHS-SS-biotynę. Biotynylację prowadzono w temperaturze 4°C przez 60 min, przy ciągłym mieszaniu. Reakcję przerywano przez dodanie 500 µl roztworu „Quenching solution” dostarczonego przez producenta. Następnie komórki delikatnie zdrapywano i przenoszono do sterylnej próbówki o objętości 50ml, następnie naczynia hodowlane dodatkowo przepłukano 10 ml zimnego TBS. Całość wirowano w temperaturze 4°C, 500 x g przez 5 min. Osad komórek przepłukiwano dwukrotnie zimnym TBS i wirując próbki za każdym razem jak wyżej. Zbiotynylowane komórki lizowano przez 30 min w temperaturze topniejącego lodu, dołączonym przez producenta buforem zawierającym mieszaninę inhibitorów proteaz. Podczas lizy, co 5 min komórki poddawano działaniu ultradźwięków. Po upływie tego czasu, próby wirowano przez 2 min w temperaturze 4°C przy 10000 x g. W celu izolacji białek błonowych, kolumnę ze złożem agarozowym z przyłączoną streptawidyną (dostarczoną przez producenta) wirowano wstępnie przez 1 min 1000 x g a następnie płukano czterokrotnie 500 µl buforu „Wash” zawierającego mieszaninę inhibitorów proteaz, stosując wirowanie j.w. Na tak przygotowaną kolumnę nanoszono lizat komórkowy i pozostawiono na 60 min w temperaturze 4°C delikatnie mieszając. Po upływie tego czasu, kolumnę wirowano przez 1 min 1000 x g, i płukano cztero-krotnie 500 µl buforu „Wash” zawierającego mieszaninę inhibitorów proteaz, wirując za każdym razem jak wyżej. Związane ze streptawidyną, biotynylowane białka błonowe wymywano z kolumny, traktując je buforem zawierającym 1 M DTT przez 1 godzinę, w temperaturze 4°C z delikatnym mieszaniem. Ostatecznie, usuwano je z kolumny przez wirowanie w warunkach j.w i przechowywano w temperaturze -20°C.

### 3.19.3 Ekspresja i oczyszczanie białka rekombinowanego PIP-LEXSY.

Celem otrzymania rekombinowanego białka PIP, hodowlę komórek *Leishmania tarentolae* prowadzono w kolbach o pojemności 500 ml (Nalgen, USA) z dopływem powietrza w temperaturze 26°C z wytrząsaniem 140 rpm bez dostępu światła. Wyjściowo 500 ml medium BHI szczepiono 10 ml zawiesiny komórkowej (komórek P10 znajdujących się w fazie logarytmicznego wzrostu) o gęstości optycznej OD=1.4. Po 72 h hodowli zawiesinę zbierano, wirowano 2400 x g przez 30 min w 4°C, a pożywkę hodowlaną zbierano a następnie dializowano do buforu fosforanowego (rozdz. 3.2) przez okres pięciu dni. Bufor dializacyjny wymieniano co 24 godziny. Tak przygotowaną spulowaną pożywkę hodowlaną przechowywano w 4°C nie dłużej niż 3 dni przed oczyszczeniem na złożu NiNT-agarozu. W drugim etapie nanoszono zagęszczoną i poddaną dializie pożywkę hodowlaną o objętości ok. 350 ml na 1-2 ml odpowiednio zrównoważonego złoża NiNT-agarozu umieszczonego w kolumnie o łącznej pojemności 10 ml. Po związaniu białek do złoża NiNT-agarozu przez kolumnę przepuszczano 50 ml buforu „Wash” celem odpłukania białek związanych niespecyficycznie ze złożem. Natomiast elucję związanych ze złożem białek prowadzono z użyciem buforu fosforanowego z dodatkiem wzrastającego stężenia imidazolu (od 10 mM, 20 mM, 30 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM oraz 500 mM). Tak oczyszczoną pulę białka rekombinowanego PIP znajdującego się we frakcji buforu fosforanowego z dodatkiem imidazolu o stężeniu 100 mM i 200 mM ponownie dializowano do buforu TBS o pH=7,5 a następnie zagęszczano do objętości 1ml (średnio uzyskiwano stężenie 0,5 mg/L białka PIP-lexsy o stopniu czystości 90 % ).

### 3.19.4. Oznaczanie ilościowe białka metodą biscynchoninową (BCA) wg. Smith i wsp., 1985

Stężenie białka w próbach oznaczano przy użyciu zestawu "Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit" (rozdz. 3.4) według protokołu producenta (SigmaAldrich, USA). Do 200 µl mieszaniny roztworu kwasu biscynchoninowego i siarczanu miedzi w stosunku objętościowym 50:1 (v/v) dodawano 1 µl lizatu komórkowego oraz 9 µl wody MiliQ. Próbę „ślepa” stanowiło 10 µl wody MiliQ. Tak przygotowane próby inkubowano przez

30 min w temperaturze 37°C. Absorbancję mierzono wobec próby „ślepej” przy długości fali 562 nm w spektrofotometrze "Enspire" (Perkin Elmer, USA). Do wyznaczenia krzywej standardowej wykorzystywano kolejne rozcieńczenia standardu BSA (rozd. 3.1) (0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 mg/ml).

#### **3.19.5 Elektroforeza w żelu poliakryloamidowym (wg Laemmliego i wsp. 1970)**

Elektroforezę w żelu poliakryloamidowym prowadzono w warunkach denaturujących wg. Laemmli'ego (SDS-PAGE) (Laemmli UK, i wsp., 1970). W tym celu przygotowywano żel poliakryloamidowy o stężeniu 4 %, (tzw. żel zagęszczający) oraz żel 15 %-owy, (tzw. Rozdzielający). Skład mieszanin do przygotowania obu żeli podano w **tabeli nr. 4**. Na żel nanoszono próbki lizatów komórkowych o całkowitej ilości białka wynoszącej 50 µg. Nanoszono również po 4 µl standardu masy „PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder” (rozd. 3.10). Rozdział elektroforetyczny prowadzono w buforze do elektroforezy (rozd. 3.4) przy napięciu 80 V, do momentu wniknięcia próbek w żel rozdzielający, podwyższając następnie napięcie do 110 V. Elektroforezę prowadzono przez około 1,5 godziny.

**Tab. nr 4** Skład mieszanin do przygotowania żelu rozdzielającego i zagęszczającego w metodzie SDS-PAGE wg. Laemmli i wsp. (1970)

Składniki	10 ml żelu rozdzielającego 15% Objętość [ml]	3 ml żelu zagęszczającego 4% Objętość [ml]
H <sub>2</sub> O	2,3	2,1
30% roztwór akrylamid/bis-akrylamid (29:1 v/v)	5,0	0,5
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5	-
1,0M Tris (pH=6,8)	-	0,38
10% SDS	0,1	0,03
10% APS	0,1	0,03
TEMED	0,004	0,003

### 3.19.6. Wykrywanie białek metodą immunoblotingu (western blot wg. Towbin i wsp. 1979)

Białka po rozdiale elektroforetycznym, przenoszono na membranę nitrocelulozową (rozdz. 3.1.12) metodą elektroblotingu wg. Towbin (Towbin i wsp. 1979). Transfer białek prowadzono w buforze do transferu (rozdz. 3.1.2) przy natężeniu prądu równym 300 mA, przez 60 min. Następnie, membranę pozostawiano w 5 % roztworze odtłuszczonego mleka w proszku (rozdz. 3.1.1) w buforze TBS (rozdz. 3.1.2), aby zapobiec niespecyficznemu wiązaniu przeciwciał przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie membranę płukano w buforze TBST (rozdz. 3.1.2) przez 10 min i inkubowano z odpowiednim I-rzędowym przeciwciałem rozcieńczonym buforem TBST z dodatkiem 5 % odtłuszczonego mleka w proszku, przez noc w temperaturze 4°C. Po tym czasie, membranę płukano 3-krotnie buforem TBST i inkubowano przez 1 godzinę z roztworem drugorzędowego przeciwciała skoniugowanego z peroksydazą chrzanową, usuwając niezwiązane przeciwciała poprzez trzykrotne płukanie membrany buforem TBST. Związane z membraną przeciwciała wykrywano za pomocą mieszaniny

substratów (1:1 v/v) wchodzących w skład zestawu do chemiluminescencji „SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate” (rozdz. 3.1.4). Chemiluminescencję obrazowano i archiwizowano w postaci plików cyfrowych za pomocą aparatu G:Box (Syngene, Niemcy).

Ponowne użycie membrany nitrocelulozowej wymagało usunięcia przyłączonych już przeciwciał. W tym celu membranę płukano 2-krotnie buforem do „strippingu” (rozdz. 3.1.2), 2-krotnie PBS i 3-krotnie buforem TBST, za każdym razem przez 10 min, a następnie membranę pozostawiano w 5 % roztworze odtłuszczonego mleka w proszku w buforze TBS, przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Tak przygotowana membrana nitrocelulozowa mogła zostać wykorzystana do ponownej inkubacji z odpowiednim przeciwciałem pierwszorzędowym. W przypadku metody far-western blotting, zamiast przeciwciał pierwszorzędowych do wykrywania białek związanych z nitrocelulozą wykorzystywano białko PIP-lexsy, następnie takie związane do nitrocelulozy białko rekombinowane PIP wykrywano za pomocą króliczego monoklonalnego przeciwciała anty-PIP i obrazowano za pomocą drugorzędowego przeciwciała anty-królik konjugowanego z HRP za pomocą chemiluminescencyjnego substratu (rozdz.3.8)

#### **3.19.7. Pobieranie materiału**

Zwierzęta uśmiercano metodą przerwania rdzenia w okolicy kręgów szyjnych po uprzednim wprowadzeniu zwierząt w stan anestezji. Pobierano narządy: węzły chłonne pachowe, płuca, serce, wątrobę, nerki oraz śledzionę, które natychmiast utrwalano w zbuforowanym, 4% roztworze formaliny. Pobierano również guz nowotworowy wraz z przyległymi tkankami prawidłowymi. Fragmenty tkanki umieszczano w plastikowych kasetkach histologicznych i zanurzano w 4% roztworze formaliny. Następnie, płukano pobrane tkanki i organy w wodzie bieżącej przez 24 godziny i odwadniano poprzez przeprowadzenie przez szereg alkoholowy o wzrastającym stężeniu procentowym 70% → 96% → 100%. Tak przygotowane fragmenty tkanek i organów zatapiano w parafinie. Przygotowane ww. sposób bloczki parafinowe cięto na skrawki grubości 4 µm przy użyciu mikrotomu RM2165 (Leica, Niemcy). Skrawki umieszczano na szkiełkach podstawowych, a następnie inkubowano w temperaturach: 65°C (30 minut) i 37°C (24 godziny). Przygotowane preparaty barwiono hematoksyliną i eozyną (H&E), celem

weryfikacji oraz oceny histopatologicznej pobranych tkanek i następnie wykorzystano do przeprowadzenia reakcji immunohistochemicznych (IHC).

#### **3.19.8. Reakcje immunohistochemiczne i metoda TUNEL.**

Reakcje immunohistochemiczne przeprowadzone z użyciem przeciwciał anty Ki-67 (rozdz.3.8) oraz metodę TUNEL – na skrawkach parafinowych, wykonały (mgr Natalia Glatzel-Plucińska i dr Karolina Jabłońska, Zakład Histologii i Embriologii, UM, Wrocław). Do wykrycia związanych do epitopów białek przeciwciał anty Ki-67 użyto systemu *EnVision™ FLEX+, Mouse, High pH* (Dako, USA). Szkiełka ze skrawkami tkankowymi inkubowano w buforze *Target Retrieval Solution* o pH = 6,1 (Dako, USA) w temp. 100°C w urządzeniu *PT Link* (Dako, USA) przez 20 minut w celu deparafinizacji, uwodnienia oraz odsłonięcia determinant antygenowych i studzono w buforze płuczącym TBST (TBS z 0,1% Tween 20) przez 3 minuty. Endogenną peroksydazę blokowano poprzez inkubację 5 minut w *EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent* (Dako, USA). Preparaty inkubowano z pierwszorzędowym przeciwciałem w rozcieńczeniu 1:100 przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Resztki przeciwciała usuwano poprzez płukanie w buforze TBST. Następnie szkiełka ze skrawkami tkankowymi inkubowano z przeciwciałem drugorzędowym znakowanym peroksydazą chrzanową *EnVision™ FLEX/HRP* (Dako, USA) przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Resztki przeciwciała usuwano poprzez płukanie w buforze TBST. Po 5 minutowej inkubacji szkiełek w buforze TBST, dodawano substrat dla peroksydazy chrzanowej – 3,3'-diaminobenzodynę *EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen* (Dako, USA) rozcieńczony buforem *EnVision™ FLEX Substrate Buffer* (Dako, USA) przygotowanym bezpośrednio przed reakcją. Resztki odczynnika usuwano poprzez przepłukanie w buforze TBST. W celu uwidocznienia jąder komórkowych i struktury tkanki wykonano barwienie kontrastujące przez 7 minutową inkubację z *Automation Hematoxylin* (Dako, USA). Resztki odczynnika odpłukiwano w wodzie destylowanej. Następnie skrawki tkankowe na szkiełkach odwadniono przez przeprowadzenie przez szereg alkoholowy o wzrastającym stężeniu procentowym (70%, 96%, 100% ) oraz w ksylenie. Procedury barwienia wykonano automatycznie z wykorzystaniem aparatu *Autostainer Link 49* (Dako, USA). Szkiełka zaklejano w *SUB-X Mounting Medium* (Dako, USA) za pomocą urządzenia *Coverslipper* (Dako,USA).



Do wykrywania apoptozy w tkankach guzów nowotworowych wykorzystano zestaw ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Millipore, USA). Szkiełka odparafinowywano poprzez 15 minutową inkubację w ksylenie, a następnie uwadniano przez przeprowadzenie przez szereg alkoholowy o malejącym stężeniu (100% , 96%, 70%). Po przepłukaniu w wodzie destylowanej oraz w buforze PBS, szkiełka inkubowano z proteinazą K (Dako, USA) przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie, szkiełka płukano trzykrotnie po 3 minuty w buforze PBS, po czym blokowano endogenną peroksydazę poprzez 5 minutową inkubację w 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w buforze PBS. Po płukaniu w buforze PBS, szkiełka inkubowano w buforze preinkubacyjnym *Equilibration Buffer* przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Reakcję deoksyrybonukleotydylotransferazy prowadzono przez godzinę w roztworze *TdT Enzyme* w buforze *Reaction Buffer* w proporcji 33:77 w temperaturze 37°C. Następnie, reakcję zatrzymywano poprzez umieszczenie szkiełek ze skrawkami tkankowymi w buforze płuczającym (Stop/Wash Buffer), rozcieńczonym wodą destylowaną w stosunku 1:35 i inkubację przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Po płukaniu buforem PBS preparaty inkubowano z przeciwciałem antydioksygenina skoniugowanym z peroksydazą chrzanową *Anti-Digoxigenin-Peroxidase* przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Po płukaniu w PBS dodawano substrat dla peroksydazy chrzanowej w postaci 3,3'-diaminobenzydyny (Dako, USA). Resztki odczynnika usuwano poprzez przepłukanie w wodzie destylowanej. Barwienie kontrastowe i kolejne procedury przeprowadzono identycznie jak w przypadku badań antygenu Ki-67. Ocenę reakcji immunohistochemicznych (ekspresja antygenu Ki-67) oraz nasilenia apoptozy (metoda TUNEL) przeprowadzono z wykorzystaniem mikroskopu świetlnego „Olympus BX-42” wyposażonego w tor wizyjny oraz kamerą z oprogramowaniem „CellD” do komputerowej analizy obrazu. Liczbę komórek wykazujących pozytywną reakcję barwną (ekspresja jądrowa) zliczano w trzech hotspot -miejscach wykazujących potencjalnie najwyższą nasilenie reakcji IHC oraz TUNEL pozytywnych pod powiększeniem 400x z użyciem ww. oprogramowania. Otrzymane wyniki w postaci odsetka komórek nowotworowych wykazujących reakcję barwną w stosunku do wszystkich komórek nowotworowych, poddano analizie statystycznej.

### 3.20. Badania *in vivo*

#### 3.20.1 Przeszczep ortotopowy ludzkich komórek raka gruczołu piersiowego myszom bezgrasicznym szczepu Balb/c<sup>nu/nu</sup>

Doświadczenia na myszach zostały zatwierdzone przez komisję Etyczną ds. doświadczeń na zwierzętach we Wrocławiu (nr zgody: 026/2016 z poprawką 022/2019) i były wykonywane zgodnie z zaleceniami Ustawy o Ochronie Zwierząt Dz.U.Nr.13/2007. Ludzkie komórki MDA-231/PIP, MDA-231/PURO oraz MDA-231 ( $2,5 \times 10^6$ ) zawieszono w 50  $\mu$ l mieszaniny matrigel płyn Hangsa 1:3 (rozdz. 3.4) szczepiono ortotopowo pod prawy sutek igłą o średnicy 0,3 mm i strzykawką o pojemności 1 ml.

#### 3.20.2 Pomiar objętości guzów nowotworowych

Zakładając, że guz nowotworowy to elipsoida obrotowa, jego pomiarów dokonywano w dwóch wymiarach: poprzecznym (a) i podłużnym (b), a jego objętość wyliczano w  $\text{mm}^3$  stosując wzór:

$$TV[\text{mm}^3] = a^2 \times b / 2$$

gdzie TV (*tumor volume*) to objętość guza. Pomiaru średnic dokonywano za pomocą elektronicznej suwmiarki, w odstępach kilku dniowych, począwszy od drugiego tygodnia po przeszczepieniu komórek nowotworowych myszom. Ponadto dokonywano pomiarów masy ciała oraz ogólnych obserwacji zwierząt.

#### 3.20.3 Badanie wpływu białka PIP na przeszczepiane guzy ludzkiego raka gruczołu piersiowego w modelu myszy bezgrasicznych leczonych doksorubicyną

Podawanie myszom doksorubicyny (Pfizer, Niemcy) rozpoczynano w momencie, kiedy guzy nowotworowe osiągały objętość  $75 \text{ mm}^3$  dla MDA-231/PIP i objętość  $30 \text{ mm}^3$  MDA-231/PURO w 35 dniu od przeszczepienia komórek nowotworowych (rozdz. 3.1.4). Lek podawano dożylnie (do żyły ogonowej i.v) w dawce 1,5 mg/kg.m.c stosując igłę o średnicy 0,4 mm. Doksorubicynę podawano dwukrotnie, w odstępie 6 dni. Grupę kontrolną placebo stanowiły myszy, którym podawano w analogiczny sposób sól fizjologiczną. Działanie przeciwnowotworowe doksorubicyny i PIP wyrażano jako procent o jaki została zmniejszona objętość guza w stosunku do kontroli placebo, który wyliczano na podstawie wzoru:

$$\text{TGI [\%]} = 100 - \text{TV}_T(\text{DOX}) / \text{TV}_C(\text{PLACEBO}) \times 100\%$$

gdzie: TGI- (*ang. tumor growth inhibition*) to zahamowanie wzrostu guza,  $\text{TV}_T$  (*ang. Tumor volume Test*) – średnia objętość guza myszy badanych otrzymujących doksorubicynę,  $\text{TV}_C$  (*ang. Tumor volume Control*) – średnia objętość guza myszy kontrolnych- otrzymujących placebo.

Wartości dodatnie TGI wskazują na zahamowanie wzrostu guza w grupie badanej w stosunku do kontroli, natomiast wartości ujemne TGI oznaczają stymulację wzrostu guza wartość zero oznacza brak efektu zastosowanego preparatu na wzrost guza w porównaniu do kontroli (Simeoni M., i wsp., 2004)

### 3.21. Analiza statystyczna

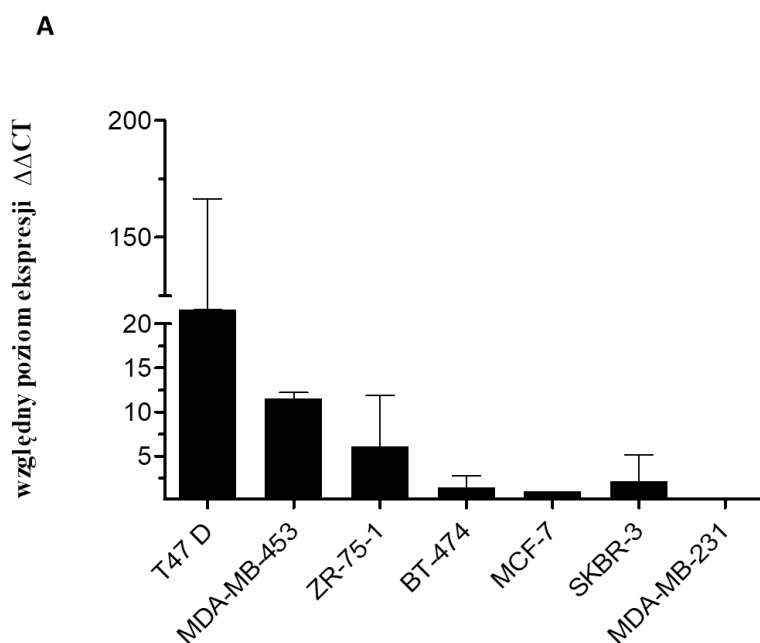
Uzyskane dane zestawiono i interpretowano za pomocą programów: „MS Office Excel”, „Flowing Software2.0.(Turku, Finland) Analizy statystyczne oraz graficzne zobrazowanie wyników przeprowadzono z wykorzystaniem programu „GraphPad Prism 5”. W przypadku danych o charakterze ilościowym wyniki opisano przy użyciu następujących parametrów: wartość średnia, mediana, odchylenie standardowe: minimum i maksimum. Do porównania występowania wartości oczekiwanych i częstości występowania zmiennych w poszczególnych grupach zastosowano test Chi-kwadrat. Do porównania średnich dwóch grup zastosowano parametryczny test istotności różnic *t*-Studenta w przypadku rozkładów zmiennych normalnych oraz nieparametryczny test *Annova two way* z poprawką Bonferoniego w przypadku, gdy rozkład zmiennych był różny od rozkładu normalnego. Przy weryfikacji wszystkich hipotez statystycznych za istotny przyjęto wartość  $p < 0,05$ . W większości przypadków dane otrzymane w badaniach *in vitro* nie spełniały założenia testów parametrycznych (brak rozkładu normalnego) dlatego zastosowano testy nieparametryczne: Two-way ANOVA oraz test służący do wielokrotnych porównań danych z poprawką Bonfferoniego , *Multiple Comparisons p values (2-tailed)*, za pomocą którego przeprowadzono szczegółową analizę danych. Analizę statystyczną dla wyników uzyskanych w badaniach *in vivo* przeprowadzono również z użyciem testów nieparametrycznych: Two-way ANOVA Dunett post-test oraz *Multiple Comparisons p values (2-tailed)*. Dodatkowo w celu

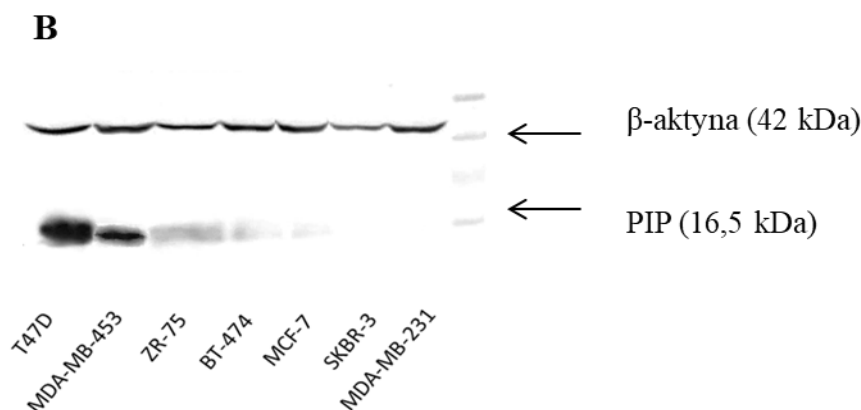
dokładniejszego porównania ze sobą dwóch grup wykorzystano Mann-Whitney U test. Szczegóły analiz umieszczono pod rycinami.

## 4. Wyniki

### 4.1. Charakterystyka linii komórkowych ludzkiego raka gruczołu piersiowego pod względem ekspresji PIP

Poziom białka PIP oznaczano w następujących siedmiu liniach komórkowych raka gruczołu piersiowego: T47D, ZR-75-1, BT-474, MCF-7, SKBR-3, MDA-MB-231 i MDA-MB-453. Analiza ekspresji genu *PIP* metodą PCR w czasie rzeczywistym, wykazała wysoki poziom ekspresji mRNA *PIP* w komórkach T47D, co pozostaje w zgodzie z danymi literaturowymi (Shiu i Iwasiow, 1985), stosunkowo wysoki jego poziom w komórkach MDA-MB-453 i niski w komórkach raka ZR-75-1, BT-474, SKBR-3 i MCF-7 (**Ryc. 6A**). Brak ekspresji mRNA *PIP* stwierdzono w komórkach MDA-MB-231. Poziom PIP oznaczano również na poziomie białka metodą western blot, uzyskując w większości przypadków wyniki zbieżne z uzyskanymi metodą ilościowego PCR (**Ryc. 6B**). I tak, zdecydowanie najwyższe ilości białka PIP wykazano w komórkach T47D, miernie wysoką jego ilość obserwowano w komórkach MDA-MB-453 oraz stosunkowo niski poziom w komórkach ZR-75-1, BT-474 i MCF-7, przy jego braku w komórkach MDA-MB-231. Jedynie w przypadku komórek SKBR-3 brak było białka przy resztkowej ekspresji mRNA.





**Ryc. 6 A)** Ekspresja mRNA *PIP* w komórkach T47D, MDA-MB-453, ZR-75-1, BT-474, MCF-7, SKBR-3 i MDA-MB-231 ludzkiego raka gruczołu piersiowego. Względny poziom ekspresji mRNA *PIP* oznaczono metodą PCR w czasie rzeczywistym. Poziom ekspresji mRNA w komórkach MCF-7 przyjęto jako 1. Jako gen referencyjny wykorzystano *SDHA* kodujący dehydrogenazę bursztynianową. **B)** Ekspresja białka PIP w lizatach komórek T47D, MDA-MB-453, ZR-75-1, BT-474, MCF-7, SKBR-3 i MDA-MB-231. Białko PIP wykrywano metodą western blotting z użyciem monoklonalnych króliczych przeciwciał anti-PIP. Elektroforezę SDS-PAGE prowadzono w 15% żelu rozdzielającym, nanosząc na ścieżkę 50 µg białka.

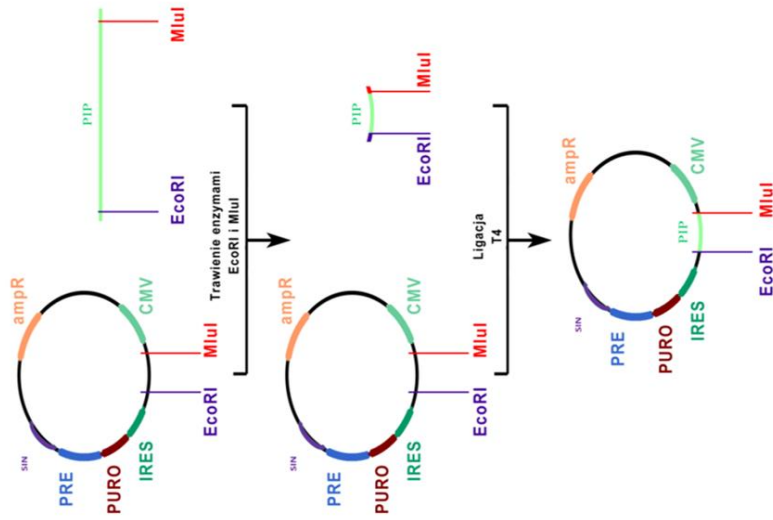
#### 4.2. Utworzenie komórek MDA-MB-231 z neoekspresją białka PIP

W celu utworzenia komórek raka gruczołu piersiowego z neoekspresją *PIP* (model funkcjonalny, *ang. gain of function phenotype*), mając na uwadze wyniki dotyczące poziomu PIP w liniach komórkowych raka gruczołu piersiowego (**rozdz. 4.1**), wybrano komórki MDA-MB-231 charakteryzujące się całkowitym brakiem ekspresji *PIP* zarówno na poziomie mRNA jak i brakiem białka PIP.

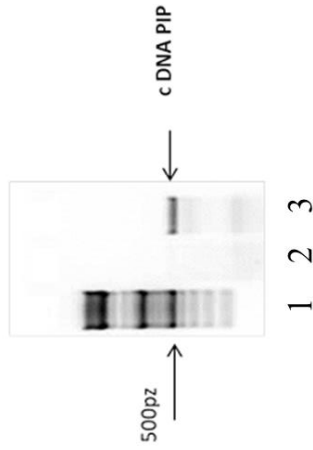
Wektor ekspresyjny zawierający cDNA *PIP* uzyskano wg. schematu przedstawionego na **Ryc. 7A**. W pierwszym etapie, za pomocą metody RT-PCR otrzymano cDNA *PIP* wykorzystując jako matrycę mRNA izolowane z komórek T47D oraz parę starterów forPIP-EcoRI i revPIP-MluI (**rozdz. 4.1.5, Ryc. 7B**). Następnie produkt PCR o długości 470 pz klonowano do wektora pRRL-cppt-CMV-IRES-PURO-PRE-sin, wykorzystując miejsca restrykcyjne dla enzymów EcoRI i MluI. W tym celu, zarówno cDNA *PIP* jak i wektor traktowano enzymami EcoRI i MluI, a następnie insert oraz zlinearyzowany wektor łączono ze sobą, poddając je działaniu ligazy faga T4. Taką

mieszaniną „poligacyjną” transformowano bakterie *E. coli* szczepu DH5 $\alpha$  (**rozdz. 4.1.8**) i wysiewano na płytki Petriego z pożywką LB zestaloną 1,5% agarem. Następnie po całonocnej inkubacji w 37°C zbierano pojedyncze kolonie bakteryjne, z których po namnożeniu bakterii, izolowano plazmidowe DNA. Celem analizy poprawności sekwencji przyjętego przez szczep *E. coli* DH5 $\alpha$  konstrukt, wyizolowane plazmidowe DNA poddawano analizie restrykcyjnej enzymami EcoRI oraz MluI (**Ryc. 7C**), a następnie sekwencjonowaniu w firmie Genomed S.A, Polska. Uzyskany wektor ekspresyjny nazwano pRRL-cppt-CMV-PIP-IRES-PURO-PRE-sin.

A



B



C

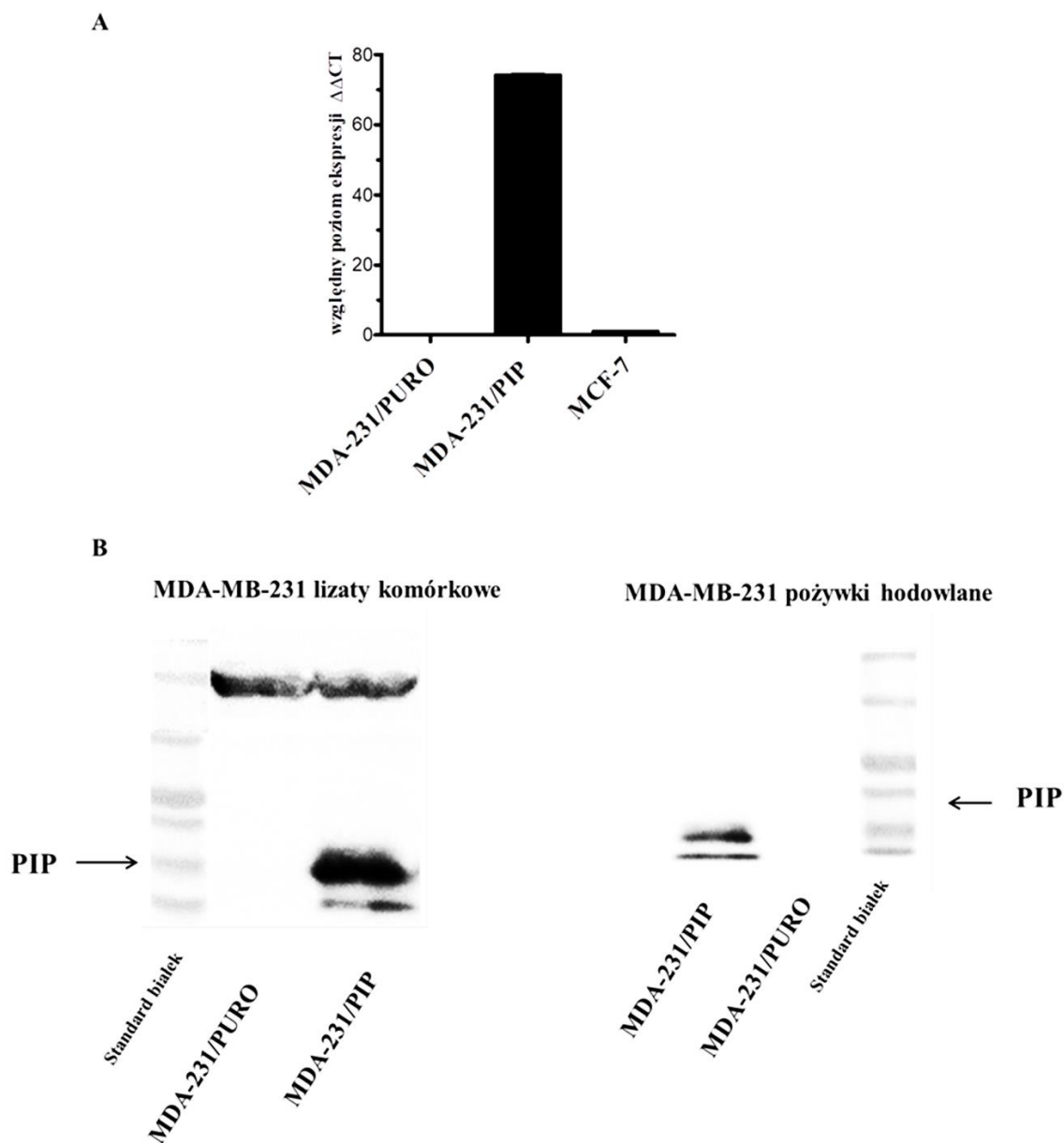


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

**Ryc. 7 A) Schemat uzyskania wektora ekspresyjnego pRRL-*cppt*-CMV-PIP-IRES-PURO-PRE-*sin*.** B) Elektroforeza w 2% żelu agarozowym cDNA PIP otrzymanego w reakcji PCR z wykorzystaniem jako matrycy mRNA izolowanego z komórek T47D i specyficznych starterów zawierających miejsca restrykcyjne EcoRI i MluI. Ścieżka 1 - standard DNA GeneRuler™ 1000 bp Plus Ladder (Fermentas), ścieżka 2 - kontrola negatywna bez matrycy, ścieżka 3 - cDNA PIP. C) Elektroforeza w 2% żelu agarozowym fragmentów DNA uzyskanych po trawieniu wektora pRRL-CMV-PIP-IRES-PURO enzymami restrykcyjnymi MluI i EcoRI. Ścieżka 1 - standard DNA GeneRuler™ 1000 bp Plus Ladder (Fermentas), ścieżki 2-14 - plazmidowe DNA izolowane z pojedynczych kolonii bakteryjnych po trawieniu enzymami restrykcyjnymi MluI oraz EcoRI.



Wektor pRRL-cppt-CMV-PIP-IRES-PURO-PRE-sin, razem z pozostałymi wektorami systemu lentiwirusowego III generacji: pMDL-g/p-RPE, pRSV-REV, pMk-VSVG (**rozd. 4.1.7**), wykorzystano do ko-transfekcji komórek HEK 293FT celem uzyskania infekcyjnych cząstek pseudowirusa, które posłużyły do transdukcji komórek MDA-MB-231. Po transdukcji, komórki MDA-MB-231 hodowano w pełnej pożywce  $\alpha$ -MEM z dodatkiem puromycyny (1  $\mu$ g/ml), aż do uzyskania klonów komórek opornych na antybiotyki, które analizowano pod kątem ekspresji białka PIP (**Ryc. 8A**). Ze względu na fakt, że PIP jest białkiem sekrecyjnym, jego obecność wykrywano zarówno w lizatach komórkowych jak i pożywce hodowlanej (**Ryc. 8B**). Do dalszych badań wybrano klon komórkowy o wysokiej ekspresji PIP zarówno na poziomie mRNA jak i białka, który nazwano MDA-231/PIP. Kontrolne komórki MDA-MB-231, które transdukowano wektorem pRRL-cppt-CMV-IRES-PURO-PRE-sin nie zawierającym cDNA PIP zostały nazwane MDA-231/PURO.



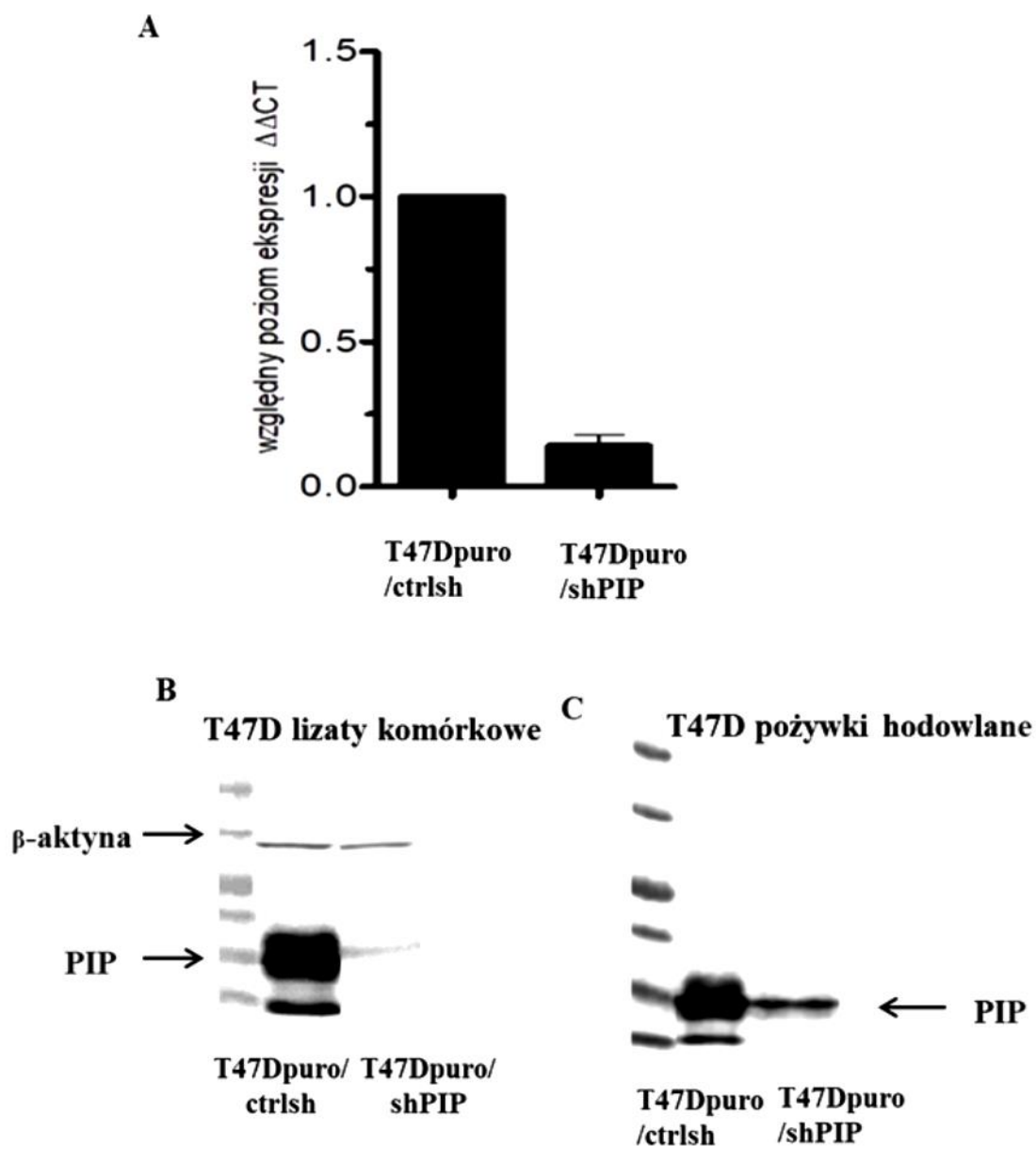
**Ryc. 8A)** Ekspresja mRNA PIP w komórkach MDA-MB-231 transdukowanych „pustym” wektorem pRRL-cppt-CMV-IRES-PURO-PRE-sin” (MDA-231/PURO) i w komórkach MDA-MB-231 transdukowanych wektorem pRRL-cppt-CMV-PIP-IRES-PURO-PRE-sin zawierającym cDNA PIP (MDA-231/PIP). Poziom ekspresji mRNA PIP oznaczono metodą PCR w czasie rzeczywistym względem komórek MCF-7. Jako gen referencyjny wykorzystano *SDHA*. **B)** Poziom białka PIP w lizatach i pożywkach hodowlanych kontrolnych komórek MDA-231/PURO i komórek MDA-231/PIP. Białko PIP wykrywano metodą western blotting z wykorzystaniem króliczego monoklonalnego przeciwciała anti-PIP.

### 4.3. Utworzenie komórek T47D z zahamowaną ekspresją białka PIP

Do utworzenia modelu komórek raka gruczołu piersiowego z zahamowaną ekspresją PIP wybrano komórki T47D charakteryzujące się naturalną nadekspresją PIP (**rozdz. 3.14**). Przy tworzeniu tzw. modelu niefunkcjonalnego (ang. lost of function phenotype) wykorzystano zjawisko interferencji RNA (iRNA) (Napoli i wsp., 1990).

#### 4.3.1. Otrzymanie komórek T47D z zahamowaną ekspresją *PIP* za pomocą shRNA komplementarnego do mRNA *PIP*

Do zahamowania ekspresji *PIP* wykorzystano gotowe wektory ekspresyjne pLKO.1shPIP1, pLKO.1shPIP2, pLKOshPIP3, pLKO.1shPIP4 i pLKO.1shPIP5 zawierające wklonowane sekwencje shDNA komplementarne do mRNA *PIP* oraz wektor pLKO.1shctrl z shDNA o przypadkowej sekwencji nukleotydów (**rozdz. 3.6**). Wektory te, wraz z pozostałymi wektorami systemu lentiwirusowego III generacji: pMDL-g/p-RPE, pRSV-REV i pMk-VSVG wykorzystano do ko-transfekcji komórek HEK 293FT celem uzyskania infekcyjnych cząstek pseudowirusa, które posłużyły do transdukcji komórek T47D. Po transdukcji, komórki T47D hodowano w pełnej pożywce RPMI z dodatkiem puromycyny (1 µg/ml), aż do uzyskania klonów komórek opornych na antybiotyki. Podobnie jak w przypadku komórek z neoekspresją PIP, w kolejnym etapie badań, klony te analizowano pod kątem ekspresji PIP na poziomie mRNA (**Ryc. 9A**) i białka, wykrywając w tym drugim przypadku, jego obecność zarówno w lizatach komórkowym jak i pożywkach hodowlanych (**Ryc. 9B, C**). Do dalszych badań wybrano komórki T47D transdukowane wektorem pLKO.1shPIP5, w których doszło do zahamowania ekspresji białka PIP na poziomie 95%. Nazwano je T47Dpuro/shPIP. Jako komórki kontrolne wykorzystano komórki T47D transdukowane wektorem pLKO.1shctrl, ekspresjonujące PIP na takim samym jak komórki rodzicielskie, które nazwano T47Dpuro/ctrlsh.



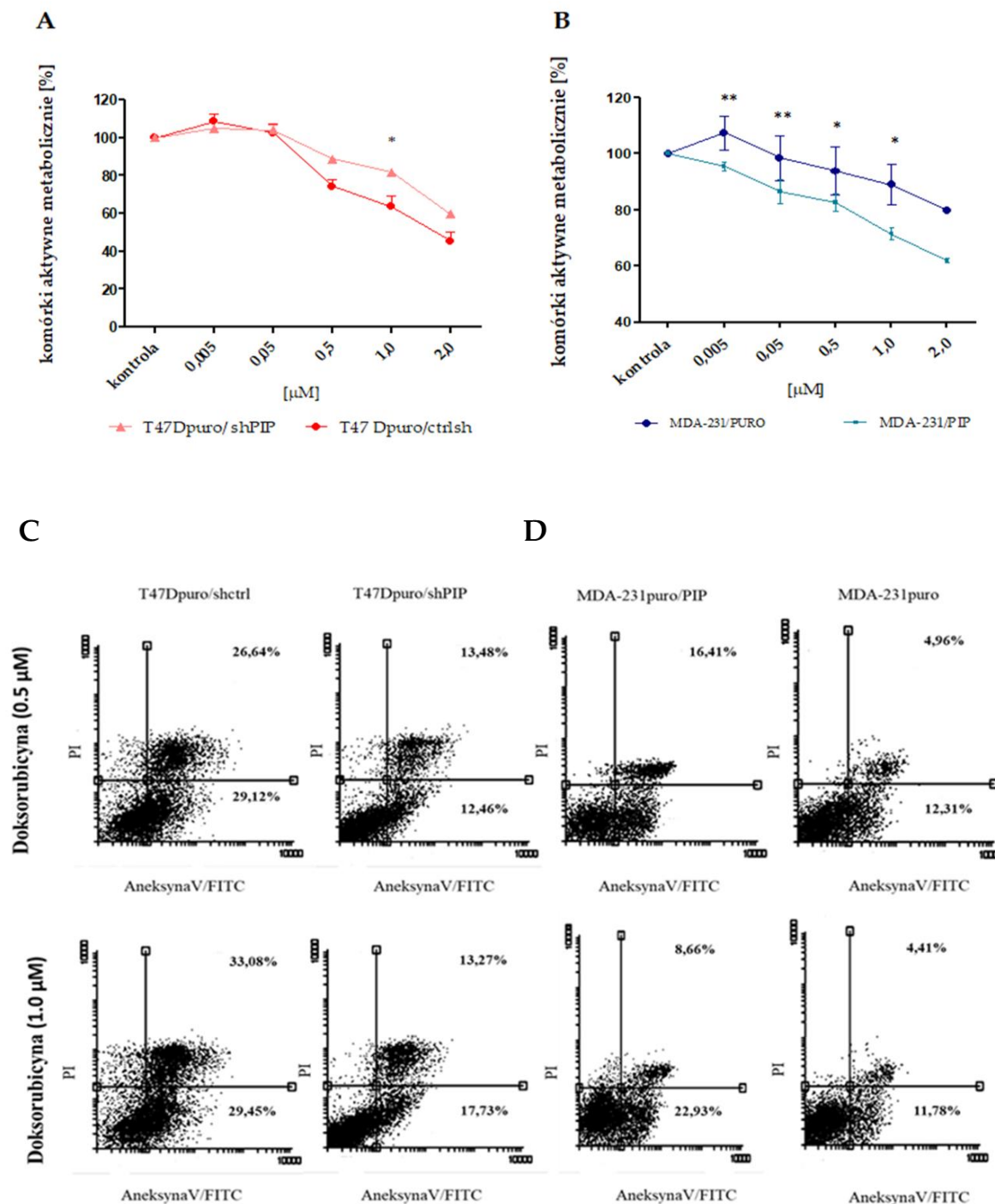
**Ryc. 9.** **A)** Ekspresji mRNA *PIP* w komórkach kontrolnych T47Dpuro/ctrlsh transdukowanych wektorem pLKO.1shctrl z shDNA o przypadkowej sekwencji nukleotydów i komórkach T47Dpuro/shPIP transdukowanych wektorem pLKO.1.shPIP5 zawierającym shDNA komplementarne do mRNA *PIP*. Poziom ekspresji mRNA *PIP* wyznaczono metodą PCR w czasie rzeczywistym. Jako gen referencyjny wykorzystano gen *SDHA*. **B)** Ekspresji białka *PIP* w lizatach i pożywkach hodowlanych komórek T47D, kontrolnych komórek T47Dpuro/ctrlsh oraz komórek T47Dpuro/shPIP. Białko *PIP* wykrywano metodą western blotting z wykorzystaniem króliczego monoklonalnego przeciwciała anti-*PIP* (rozdz.3.8)

#### 4.4. Przeżywalność oraz podatność na apoptozę ludzkich komórek T47D i MDA-MB-231 raka gruczołu piersiowego z różną ekspresją PIP poddawanych działaniu wybranych cytostatyków stosowanych w terapii raka gruczołu piersiowego

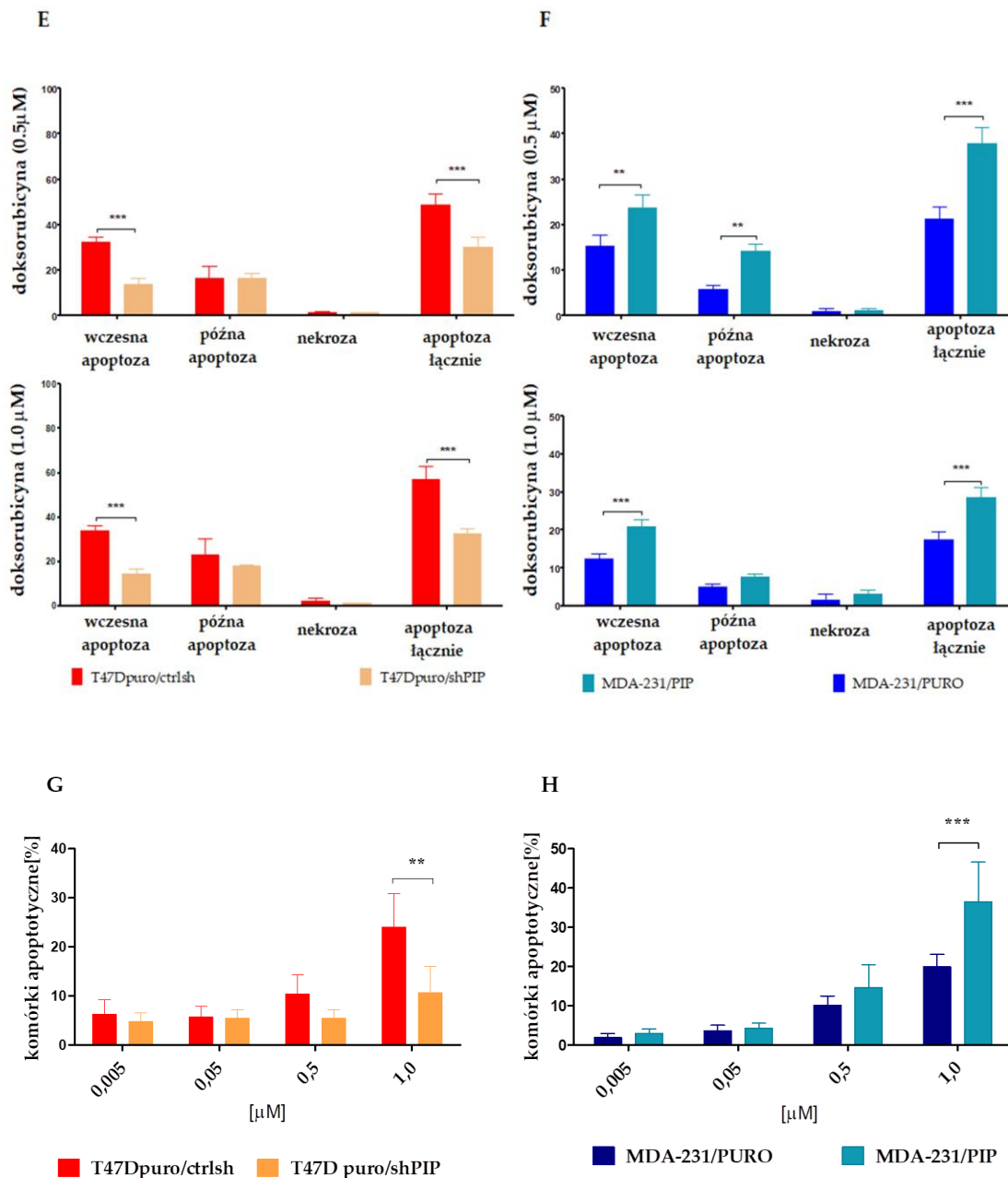
W opublikowanych ostatnio przez Jabłońską i wsp. (2016) badaniach wykazano, że wysoki poziom ekspresji PIP w komórkach raka gruczołu piersiowego pozytywnie koreluje z odpowiedzią pacjentek z tym nowotworem na standardową chemioterapię adjuwantową (doksorubicyna-cyklofosfamid). Uzyskane wyniki sugerują, że niski poziom ekspresji PIP może być związany z opornością komórek raka gruczołu piersiowego na chemioterapię. Celem weryfikacji tej hipotezy ww. komórki o różnej ekspresji *PIP* analizowano pod kątem ich przeżywalności i oporności/podatności na apoptozę indukowaną chemioterapeutykami (*doksorubicyna*, *4-hydroksycyklofosfamid* i *paklitaksel*) wykorzystywanymi standardowo w leczeniu raka gruczołu piersiowego.

##### 4.4.1. Doksorubicyna

Komórki hodowano przez 48 godzin w obecności wzrastających stężeń doksorubicyny (0,005  $\mu\text{M}$ ; 0,05  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  i 2  $\mu\text{M}$ ). Wykorzystując test MTT, stwierdzono, że w obecności doksorubicyny, począwszy od stężenia 0,5  $\mu\text{M}$ , liczba aktywnych metabolicznie komórek T47Dpuro/ctrlsh z naturalną nadekspresją PIP była niższa w porównaniu z komórkami T47Dpuro/shPIP z zahamowaną ekspresją PIP, przy czym przy stężeniu 1  $\mu\text{M}$  różnica ta była statystycznie istotna (**Ryc. 10A**). Natomiast w przypadku komórek MDA-231/puro nie wykazujących ekspresji PIP, procent aktywnych metabolicznie komórek był istotnie wyższy w porównaniu z komórkami MDA-231/PIP z nadekspresją PIP począwszy od stężenia doksorubicyny - 0,005  $\mu\text{M}$  (**Ryc. 10B**).



**Ryc. 10** A) Przeżywalność komórek T47Dpuro/ctrlsh i T47Dpuro/shPIP, B) komórek MDA-231/PURO i MDA-231/PIP hodowanych w obecności doxorubicyny przez 48 godzin. Do oceny żywotności komórek wykorzystywano test MTT. Dane prezentowane są jako wartości średnie  $\pm$  SD z pięciu pomiarów wykonanych w każdym z dwóch niezależnych eksperymentów ( $n=10$ ). \*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  po zastosowaniu testu two-way Anova z poprawką Bonfferoniego. C) Podatność na apoptozę komórek T47Dpuro/ctrlsh, T47Dpuro/shPIP, D) Podatność na apoptozę komórek MDA-231/PURO i MDA-231/PIP hodowanych w obecności doxorubicyny przez 48 godzin. Procent komórek apoptotycznych określono za pomocą cytometrii przepływowej barwiąc komórki jodkiem propidyną oraz aneksyną V skoniugowaną z FITC.



**E) Podatność na apoptozę komórek T47Dpuro/ctrlsh i T47Dpuro/shPIP oraz F) komórek MDA-231/PURO i MDA-231/PIP hodowanych w obecności doxorubicyny przez 48 godzin.** Procent komórek apoptotycznych oznaczano jak wyżej. Dane prezentowane są jako wartości średnie  $\pm$  SD z dwóch pomiarów wykonanych w każdym z trzech niezależnych eksperymentów ( $n=6$ ).  $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$  po zastosowaniu testu two-way Annowa z poprawką Bonfferoniego. **G) Komórki T47Dpuro/ctrlsh i T47Dpuro/shPIP oraz H) komórki MDA-231/PURO i MDA-231/PIP hodowane w obecności doxorubicyny przez 48 godzin.** Komórki apoptotyczne wykrywano za pomocą zestawu „CaspGLOW™ Fluorescein Active Caspase-3/7 Staining Kit” opartego na oznaczaniu aktywnej form kaspaz-3/7 za pomocą cytometrii przepływowej. Dane prezentowane są jako wartości średnie  $\pm$  SD z dwóch pomiarów wykonanych każdym z trzech niezależnych eksperymentów ( $n=6$ ).  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ , po zastosowaniu testu Annowa two-way z poprawką Bonfferoniego.

W celu wyjaśnienia, czy różnice w przeżywalności komórek raka gruczołu piersiowego o różnej ekspresji *PIP* hodowanych w obecności doksorubicyny są związane z indukcją procesu apoptozy, komórki hodowano przy dwóch stężeniach tego związku (0,5  $\mu\text{M}$  i 1,0  $\mu\text{M}$ ), a następnie po 48 godzinach oznaczano procent komórek apoptotycznych. W tym celu komórki barwiono jodkiem propidyny i aneksyną V skoniugowaną z FITC, co pozwoliło na odróżnienie komórek znajdujących się we wczesnym etapie apoptozy (wiążących tylko aneksynę V) od komórek w późnej fazie apoptozy (barwionych zarówno aneksyną V jak i jodkiem propidyny) oraz identyfikację komórek nekrotycznych (barwiących się tylko jodkiem propidyny). Stosując cytometrię przepływową wykazano, iż procent wszystkich (w fazie wczesnej i późnej) komórek apoptotycznych był istotnie wyższy w przypadku komórek T47Dpuro/ctrlsh i wynosił średnio dla stężeń doksorubicyny 0,5  $\mu\text{M}$  i 1,0  $\mu\text{M}$ , odpowiednio 48,7% i 57,05% w porównaniu z komórkami T47DshPIP z zahamowaną ekspresją białka PIP, kiedy hodowano je w obecności doksorubicyny o tym samym stężeniu, i wynosił odpowiednio 30,13% oraz 32,79% (**Ryc. 10 C, E**).

Z kolei, w przypadku komórek MDA-231/PURO bez ekspresji PIP stwierdzono iż procent wszystkich komórek (w fazie wczesnej i późnej) apoptotycznych był istotnie niższy dla stężeń doksorubicyny 0,5  $\mu\text{M}$  oraz 1  $\mu\text{M}$  i wynosił odpowiednio 37,95% oraz 28,49% w porównaniu z komórkami MDA-231/PIP z nadekspresją białka PIP, gdzie procent komórek apoptotycznych przy tych samych stężeniach doksorubicyny wynosił odpowiednio 21,17% oraz 17,46% (**Ryc. 10 D, F**). W przypadku obu linii komórkowych obserwowano tylko znikomy procent komórek nekrotycznych.

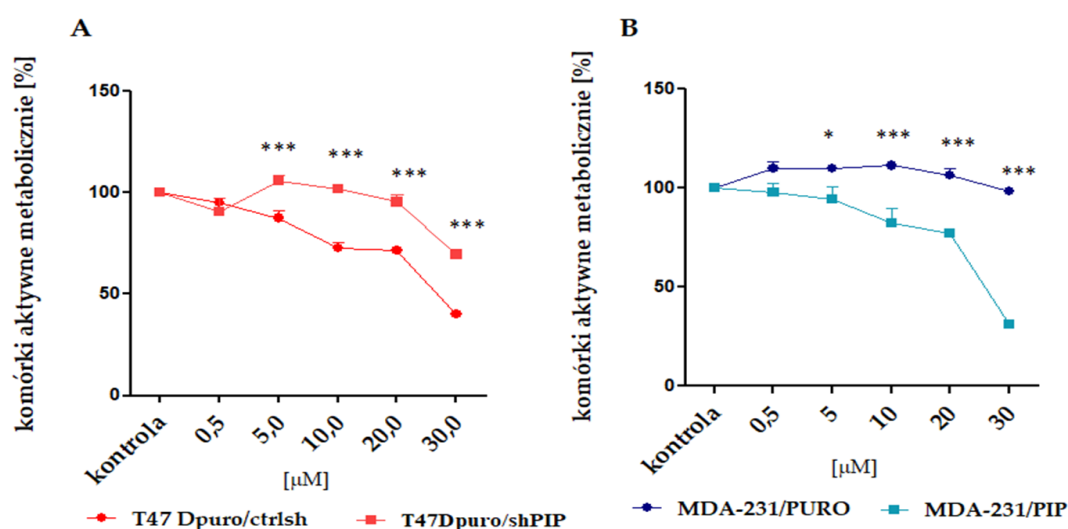
W celu wykazania, iż apoptoza komórek T47D i MDA-MB-231 indukowana doksorubicyną jest zależna od aktywacji kaspaz 3 i 7, posłużono się zestawem „CaspGLOW Fluorescein Active Caspase-3 Staining Kit” opartym na cytometrii przepływowej, w której do wykrywania komórek apoptotycznych wykorzystywano tetrapeptyd DEVD-FITC skoniugowany z FITC. Stwierdzono, że w przypadku komórek T47Dpuro/shPIP z wyhamowaną ekspresją *PIP*, procent komórek apoptotycznych był niższy, kiedy hodowano je w obecności doksorubicyny o stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  i 1  $\mu\text{M}$  przez 48 godzin i wynosił odpowiednio 6% oraz 8,11% w porównaniu z komórkami kontrolnymi T47Dpuro/ctrlsh, gdzie procent komórek apoptotycznych przy tych samych stężeniach leku wynosił odpowiednio 11,84% oraz 21,74%, przy czym przy stężeniu 1  $\mu\text{M}$  różnica ta była statystycznie istotna (**Ryc. 10G**). Natomiast, w przypadku komórek



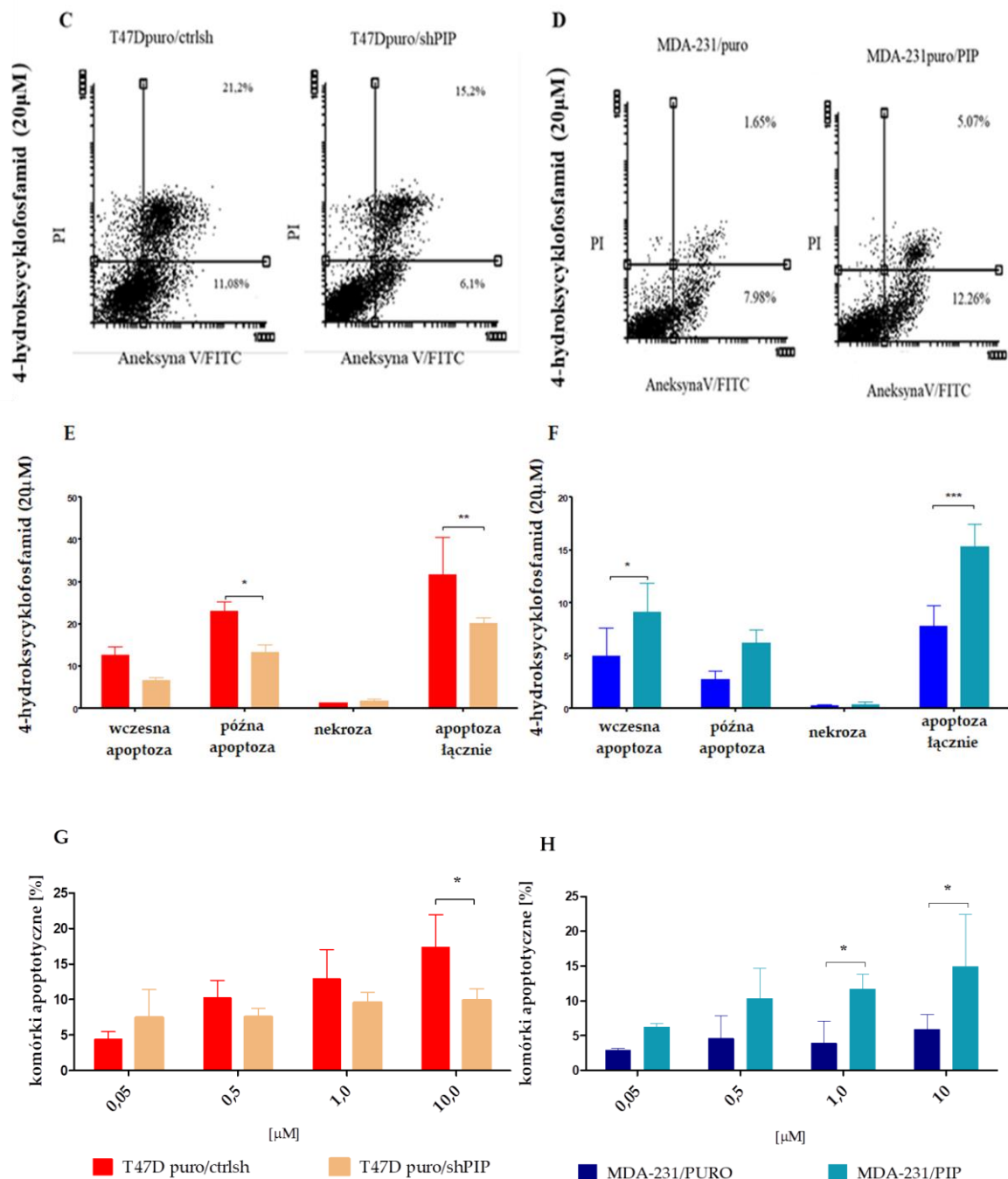
MDA-231/PIP z neoekspresją białka PIP procent komórek apoptotycznych był wyższy, kiedy hodowano je w obecności dokсорubicyny o stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  i 1  $\mu\text{M}$  i wynosił odpowiednio 14,59% oraz 36,5% w porównaniu z komórkami kontrolnymi MDA-231/puro, u których brak jest ekspresji PIP i gdzie procent komórek apoptotycznych przy tych samych stężeniach dokсорubicyny wynosił odpowiednio 10,15% oraz 19,94%, przy czym przy stężeniu 1  $\mu\text{M}$  różnica ta była statystycznie istotna (**Ryc. 10 H**).

#### 4.4.2. 4-hydroksycyklofosfamid

Komórki, hodowano przez 48 godzin w obecności 4-hydroksycyklofosfamid o stężeniu 0,005  $\mu\text{M}$ , 0,05  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  i 30  $\mu\text{M}$ . Stwierdzono, że liczba aktywnych metabolicznie komórek T47Dpuro/ctrlsh z naturalną nadekspresją PIP była istotnie niższa w porównaniu z komórkami T47Dpuro/shPIP, kiedy hodowano je w obecności 4-hydroksycyklofosfamid, począwszy od stężenia 5  $\mu\text{M}$  (**Ryc 11 A**). Również w przypadku linii komórkowej MDA-MB-231, procent żywych komórek MDA-231/PIP z nadekspresją PIP był istotnie mniejszy w porównaniu z komórkami MDA-231/PURO bez ekspresji PIP, kiedy hodowano je w obecności tego związku, począwszy od stężenia 5  $\mu\text{M}$  (**Ryc. 11 B**).



**Ryc. 11 A)** Przeżywalność komórek T47Dpuro/ctrlsh i T47Dpuro/shPIP oraz **B)** MDA-231/PURO i MDA-231/PIP hodowanych w obecności 4-hydroksycyklofosfamid przez 48 godzin. Do oceny żywotności komórek wykorzystywano test MTT. Dane prezentowane są jako wartości średnie  $\pm$ SD z pięciu pomiarów wykonanych w każdym z dwóch niezależnych eksperymentów (n=10). \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (test two-way Annowa z poprawką Bonfferoniego).



formy kaspazy-3/7 za pomocą cytometrii przepływowej. Dane prezentowane są jako wartości średnie  $\pm$ SD z dwóch pomiarów wykonanych w każdym w trzech niezależnych eksperymentów ( $n = 6$ ). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (test two-way Anova z poprawką Bonferroniego).

Podobnie jak w przypadku dokсорubicyny, aby wykazać, że różnice we wrażliwości komórek o różnej ekspresji PIP na 4-hydroksycyklofosfamid są związane z indukcją procesu apoptozy, hodowano je w obecności 20  $\mu$ M tego związku, a następnie po 48 godzinach oznaczano procent komórek apoptotycznych jak wyżej. Stosując cytometrię przepływową wykazano, iż procent wszystkich (w fazie wczesnej i późnej) komórek apoptotycznych był istotnie wyższy w przypadku komórek T47Dpuro/ctrlsh i wynosił 31,62% w porównaniu z komórkami T47DshPIP z zahamowaną ekspresją białka PIP, gdzie wynosił on 20,08% (**Ryc. 11 C, E**). I odwrotnie, w przypadku komórek MDA-231/PURO bez ekspresji białka PIP procent wszystkich (w fazie wczesnej i późnej) komórek apoptotycznych był niższy w przypadku komórek MDA-231/PURO i wynosił 7,77% porównaniu z komórkami MDA-231/PIP z nadekspresją PIP, gdzie wynosił on 15,29% (**Ryc. 11 D, F**).

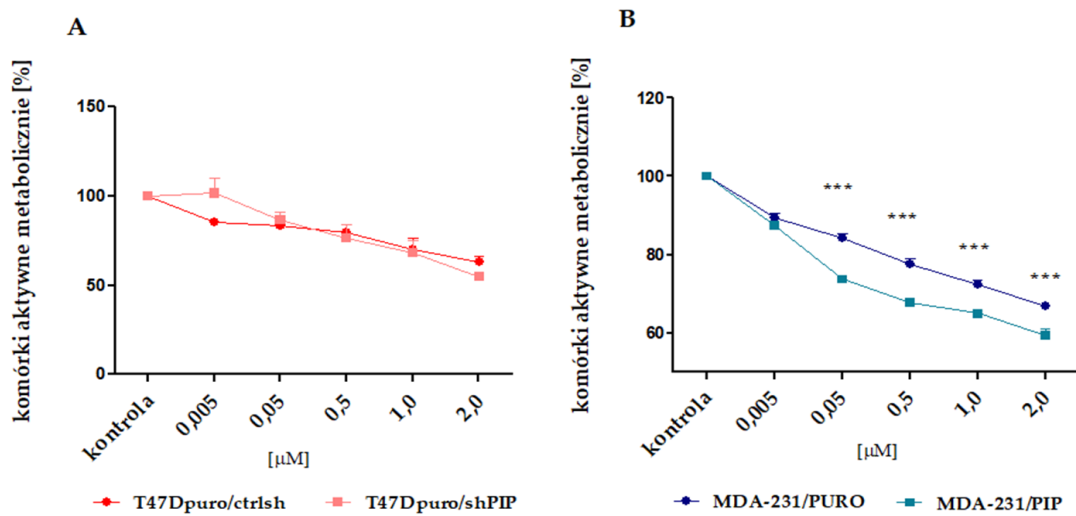
Podatność komórek T47D i MDA-MB-231 o różnej ekspresji PIP na apoptozę indukowaną 4-hydroksycyklofosfamidem określano również posługując się zestawem „CaspGLOW Fluorescein Active Caspase-3 Staining Kit” opartym na oznaczaniu aktywnych form kaspazy-3/7 za pomocą cytometrii przepływowej. Stwierdzono, że w przypadku komórek T47Dpuro/shPIP z zahamowaną ekspresją PIP, które hodowano w obecności 4-hydroksycyklofosfamidu o stężeniu 10  $\mu$ M, procent komórek apoptotycznych był istotnie niższy i wynosił 7,9% w porównaniu z kontrolnymi komórkami T47Dpuro/ctrlsh, w przypadku których procent komórek apoptotycznych wynosił 18,54% (**Ryc. 11 G**). Z kolei, w przypadku komórek MDA-231/PIP, przy stężeniach tego leku 1,0 i 10  $\mu$ M, procent komórek apoptotycznych były istotnie wyższy (odpowiednio 12,46% i 17,89%) w porównaniu z kontrolnymi komórkami MDA-231/PURO (odpowiednio 4,75% i 7,5%) (**Ryc. 11 H**).

### 4.4.3. Paklitaksel

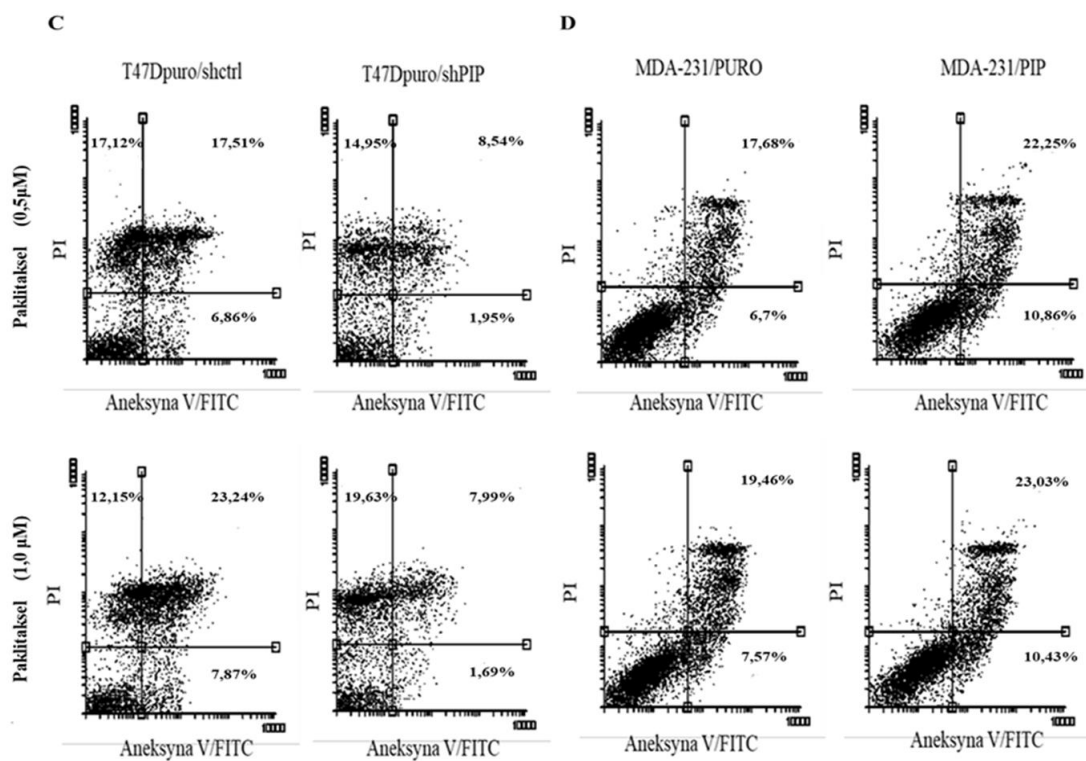
Komórki hodowano przez 48 godzin w obecności następujących stężeń paklitakselu: 0,005  $\mu\text{M}$ , 0,05  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  i 2  $\mu\text{M}$ . Posługując się testem MTT, stwierdzono, że w przypadku komórek T47D ekspresja PIP nie zmienia ich wrażliwości na ten związek, ponieważ procent żywych komórek T47Dpuro/ctrlsh z naturalną ekspresją PIP był porównywalny z procentem żywych komórek T47Dpuro/shPIP z zahamowaną ekspresją PIP (**Ryc. 12A**). Natomiast ekspresja PIP w znaczący sposób wpływała na przeżywalność komórek MDA-MB-231 hodowanych w obecności paklitakselu, bowiem procent aktywnych metabolicznie komórek MDA-231/PIP z nadekspresją PIP był istotnie mniejszy w porównaniu z kontrolnymi komórkami MDA-231/PURO, począwszy od stężenia 0,05  $\mu\text{M}$  (**Ryc. 12B**).

Podobnie jak w przypadku pozostałych cytostatyków, aby wykazać, że różnice we wrażliwości na paklitaksel komórek o różnej ekspresji PIP są związane z indukcją procesu apoptozy, hodowano je w obecności dwóch stężeń tego związku: 0,5  $\mu\text{M}$  i 1  $\mu\text{M}$ , a następnie po 48 godzinach oznaczano procent komórek apoptotycznych jak wyżej. Stosując cytometrię przepływową wykazano, iż procent wszystkich (w fazie wczesnej i późnej) komórek apoptotycznych był istotnie wyższy w przypadku komórek T47Dpuro/ctrlsh w porównaniu z komórkami T47Dpuro/shPIP. Dla komórek T47Dpuro/ctrlsh hodowanych w obecności stężeń paklitakselu 0,5  $\mu\text{M}$  i 1,0  $\mu\text{M}$  wynosił on, odpowiednio, 29,31% i 34,99%, natomiast dla komórek T47Dpuro/shPIP z zahamowaną ekspresją białka PIP wynosił, odpowiednio, 10,66% oraz 10,59% (**Ryc. 12 C, E**). W przypadku komórek T47D, paklitaksel powodował powstawanie wysokiego odsetka komórek nekrotycznych, przy czym dla stężenia paklitakselu 0,5  $\mu\text{M}$  nie obserwowano statystycznie istotnych różnic w odsetku komórek nekrotycznych pomiędzy kontrolnymi komórkami T47Dpuro/ctrlsh a komórkami T47Dpuro/shPIP z zahamowaną ekspresją PIP. Z kolei, przy stężeniu paklitakselu 1,0  $\mu\text{M}$  procent nekrotycznych komórek T47Dpuro/shPIP był istotnie wyższy (21,8%) w porównaniu z kontrolnymi komórkami T47Dpuro/ctrlsh (14,6%), co może tłumaczyć brak różnic w przeżywalności pomiędzy komórkami T47Dpuro/ctrlsh a T47Dpuro/shPIP traktowanymi paklitakselem obserwowany w teście MTT. W przypadku komórek MDA-231/PURO bez ekspresji białka PIP, procent wszystkich (w fazie wczesnej i późnej) komórek apoptotycznych był istotnie niższy w przypadku komórek MDA-231/PURO i wynosił dla

stężeń paklitakselu 0,5  $\mu\text{M}$  i 1,0  $\mu\text{M}$ , odpowiednio. 24,38% i 23,2%. Z kolei, dla komórek MDA-231/PIP z nadekspresją PIP procenty komórek apoptotycznych wynosiły, odpowiednio, 35,7% oraz 32,9% (Ryc. 12 D i F).

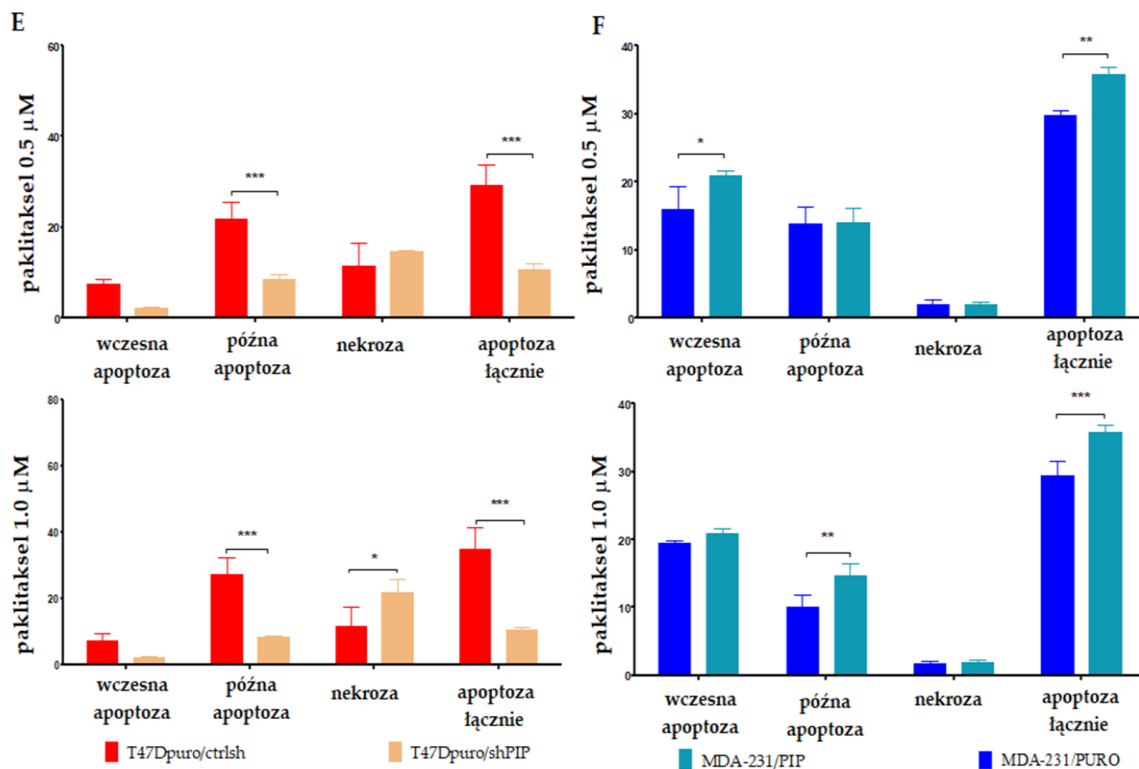


**Ryc. 12 A) Przeżywalność komórek T47Dpuro/ctrlsh i T47Dpuro/shPIP oraz B) MDA-231/PURO i MDA-231/PIP hodowanych w obecności paklitakselu przez 48 godzin.** Do oceny żywotności komórek wykorzystywano test MTT. Dane prezentowane są jako wartości średnie  $\pm$ SD z pięciu pomiarów w dwóch niezależnych eksperymentach ( $n=10$ ). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (test two-way Annowa z poprawką Bonfferoniego).

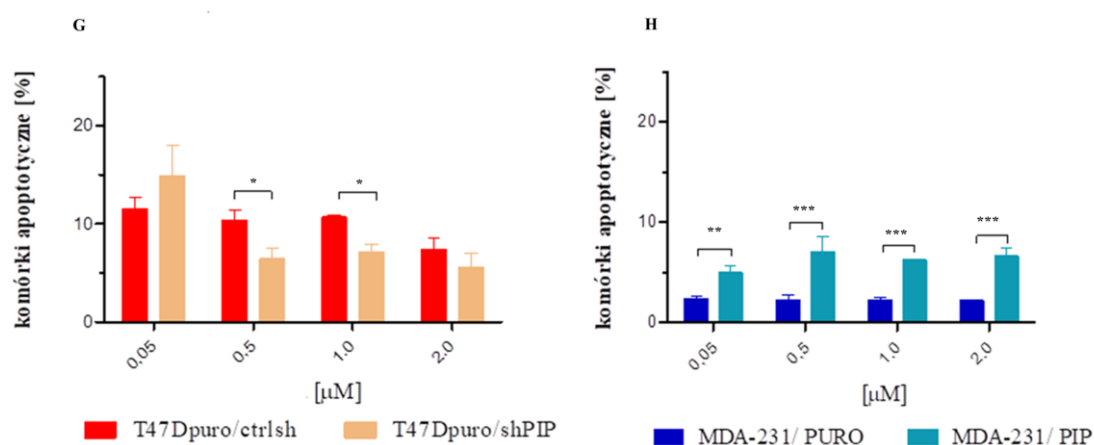


**C) Podatność na apoptozę komórek T47Dpuro/ctrlsh i T47Dpuro/shPIP oraz D) Podatność na apoptozę komórek MDA-231/PURO i MDA-231/PIP hodowanych w obecności paklitakselu przez 48**

**godzin.** Procent komórek apoptotycznych określano za pomocą cytometrii przepływowej barwiąc komórki jodkiem propidyny oraz aneksyną V skoniugowaną z FITC



**E) Podatność na apoptozę komórek T47Dpuro/ctrlsh i T47Dpuro/shPIP oraz F) komórek MDA-231/PURO i MDA-231/PIP hodowanych w obecności 1 μM paklitakselu przez 48 godz.** Procent komórek apoptotycznych określano jak wyżej. Dane prezentowane są jako wartości średnie ±SD z dwóch pomiarów wykonanych w każdym z trzech niezależnych eksperymentów (n=6). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  (test two-way Anova z poprawką Bonfferoniego). **G) Komórki T47Dpuro/ctrlsh i T47Dpuro/shPIP**

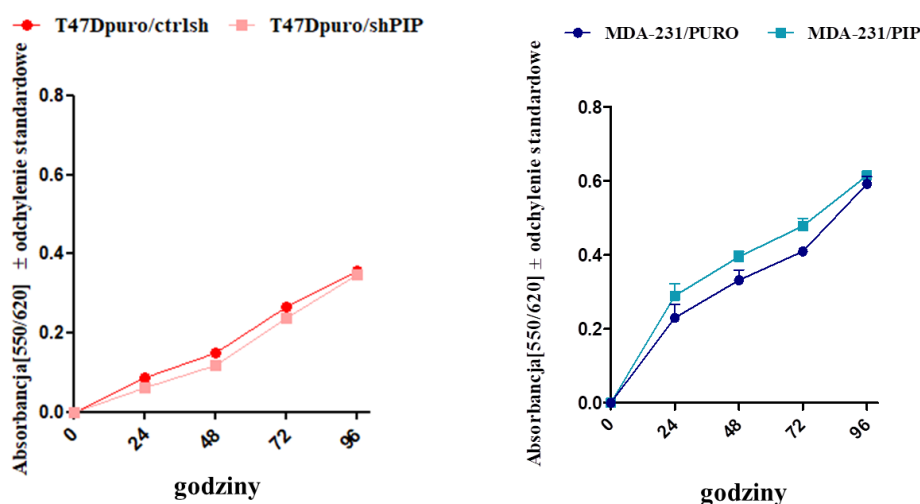


**H) MDA-231/PURO i MDA-231/PIP hodowanych w obecności paklitakselu przez 48 godzin.** Komórki apoptotyczne wykrywano za pomocą zestawu „CaspGLOW™ Fluorescein Active Caspase-3 Staining Kit” opartego na oznaczaniu aktywnej formy kaspaz-3/7 za pomocą cytometrii przepływowej. Dane prezentowane są jako wartości średnie  $\pm$ SD z dwóch pomiarów wykonanych w każdym z trzech niezależnych eksperymentów ( $n = 6$ ). \*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (test two-way Anova z poprawką Bonfferoniego).

Podatność komórek T47D i MDA-MB-231 o różnej ekspresji PIP na apoptozę indukowaną paklitakselem analizowano również posługując się zestawem „CaspGLOW Fluorescein Active Caspase-3 Staining Kit” opartym na oznaczaniu aktywnych form kaspaz-3/7 za pomocą cytometrii przepływowej. Stwierdzono, że w przypadku komórek T47Dpuro/shPIP z zahamowaną ekspresją białka PIP procent komórek apoptotycznych był istotnie niższy, kiedy hodowano je w obecności paklitakselu o stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  i 1,0  $\mu\text{M}$  przez 48 godzin i wynosił odpowiednio 6,42% oraz 7,06% w porównaniu z komórkami kontrolnymi T47Dpuro/ctrlsh, gdzie procent komórek apoptotycznych przy tych samych stężeniach leku wynosił odpowiednio 10,36% oraz 10,67% (**Ryc. 12 G**). Natomiast, w przypadku komórek MDA-231/PIP z neoekspresją białka PIP, procent komórek apoptotycznych był istotnie wyższy w porównaniu z komórkami kontrolnymi MDA-231/puro, kiedy hodowano je w obecności paklitakselu począwszy od stężenia 0,05  $\mu\text{M}$  (**Ryc. 12 H**).

#### 4.5. Potencjał proliferacyjny komórek T47D i MDA-MB-231 z różną ekspresją białka PIP

Wcześniejsze badania sugerowały, że białko PIP zwiększa potencjał proliferacyjny komórek raka gruczołu piersiowego (Cassoni i wsp., 1995; Naderi A i wsp. 2012, Baniwal S.K i wsp. 2013), jakkolwiek nie znajduje to potwierdzenia we wszystkich pracach (Debily i wsp., 2009). W związku z powyższym, w celu sprawdzenia, czy białko PIP zmienia potencjał proliferacyjny komórek MDA-231/PIP z nadekspresją PIP w porównaniu z kontrolnymi komórkami MDA-231/PURO oraz komórek T47D/ctrlsh z naturalną nadekspresją PIP w porównaniu z komórkami T47Dpuro/shPIP z zahamowaną ekspresją PIP, wykonano testy MTT. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w przebiegu krzywych przeżycia (pośrednio krzywych proliferacyjnych komórek MDA-MB-231 i T47D z i bez ekspresji PIP, co wskazuje, że białko to nie zwiększa *in vitro* proliferacji komórek raka gruczołu piersiowego (Ryc. 13).

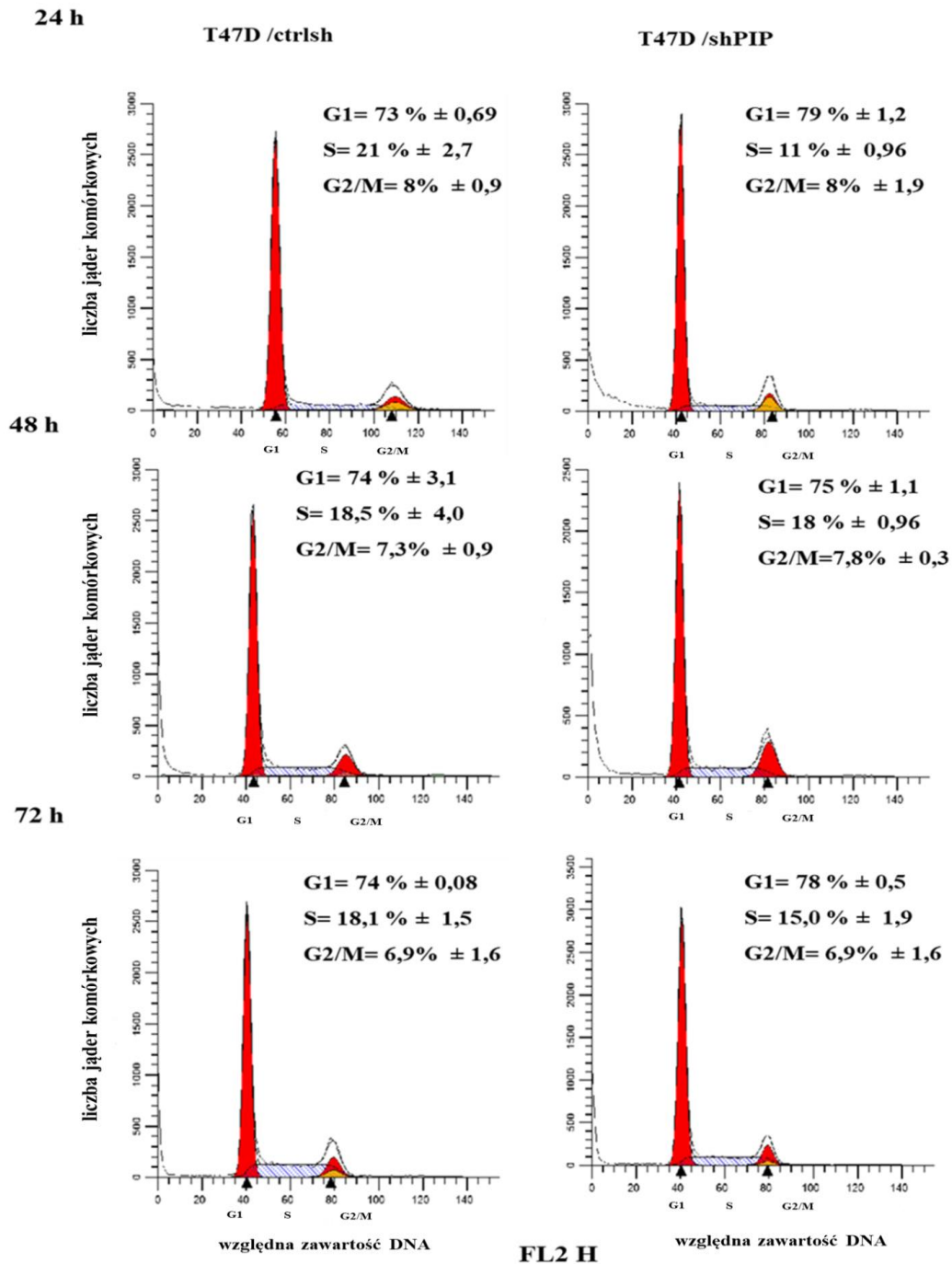


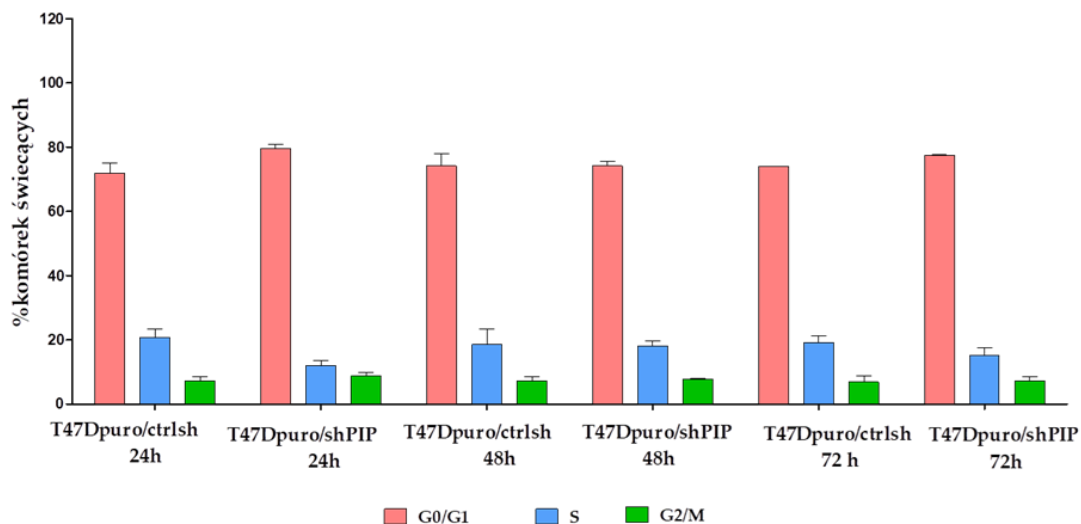
**Ryc. 13** Potencjał proliferacyjny komórek T47Dpuro/ctrlsh i T47Dpuro/shPIP oraz MDA-231/PURO i MDA-231/PIP. Do oceny żywotności komórek wykorzystywano test MTT. Dane prezentowane są jako wartości średnie  $\pm$ SD z pięciu pomiarów wykonanych w każdym z dwóch niezależnych eksperymentów (n= 10).

W drugim etapie badań analizowano przebieg faz cyklu komórkowego w komórkach T47D i MDA-MB-231 charakteryzujących się różną ekspresją białka PIP za pomocą cytometrii przepływowej, barwiąc komórki odczynnikami „FxCycle PI/RNase solution” (rozd.3.4). Analiza wyników za pomocą testów Kruskal Wallis, One-way Anova Dunne post-test i chi-kwadrat nie wykazała statystycznie istotnych różnic w przebiegu fazy G1, S i G2/M pomiędzy komórkami T47Dpuro/ctrlsh i

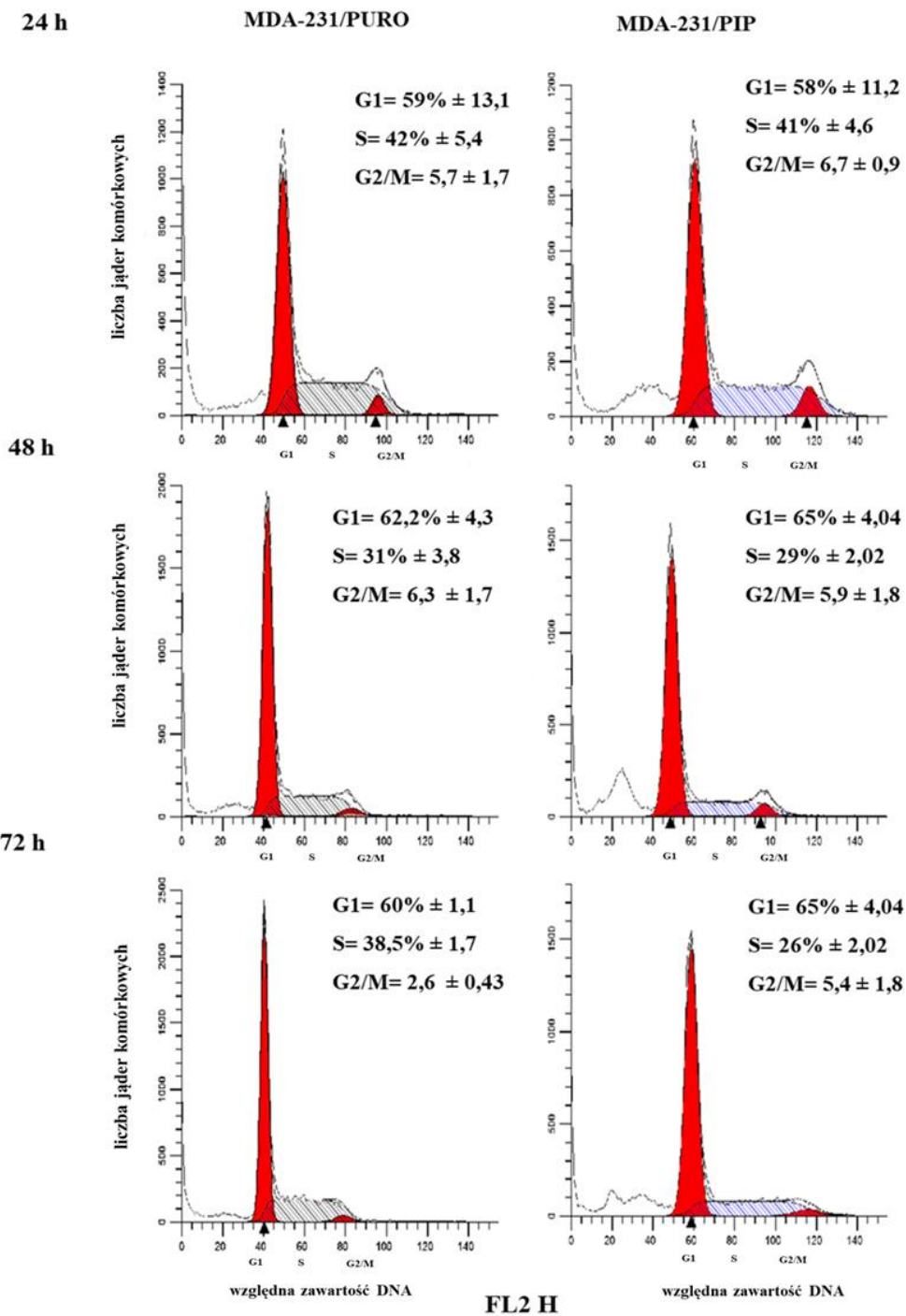


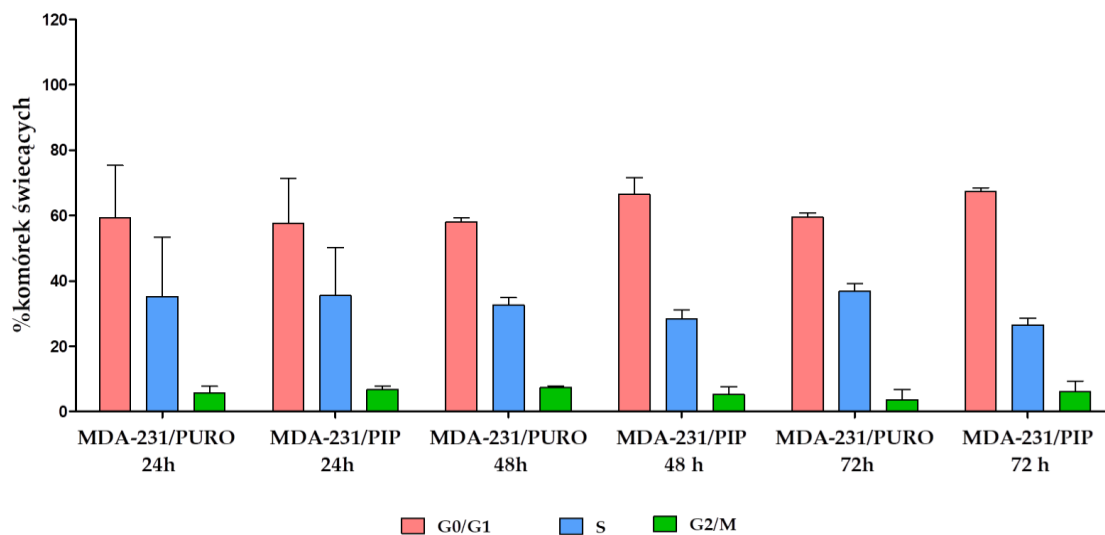
T47Dpuro/shPIP oraz komórkami MDA-231/PURO i MDA-231/PIP po 24, 48 i 72 godzinach hodowli (**Ryc. 14 A i B**). W trzecim etapie badań, analizowano dodatkowo poziom ekspresji białek odpowiedzialnych za przebieg cyklu komórkowego, takich jak cyklina D1, cyklina B1 oraz kinaz pERK1/2 i ERK1/2 metodą western blotting. Zgodnie z wynikami uzyskanymi w pierwszym i drugim etapie badań, nie stwierdzono różnic w poziomach ich ekspresji w komórkach różniących się od siebie poziomem białka PIP (**Ryc. 14 C**).



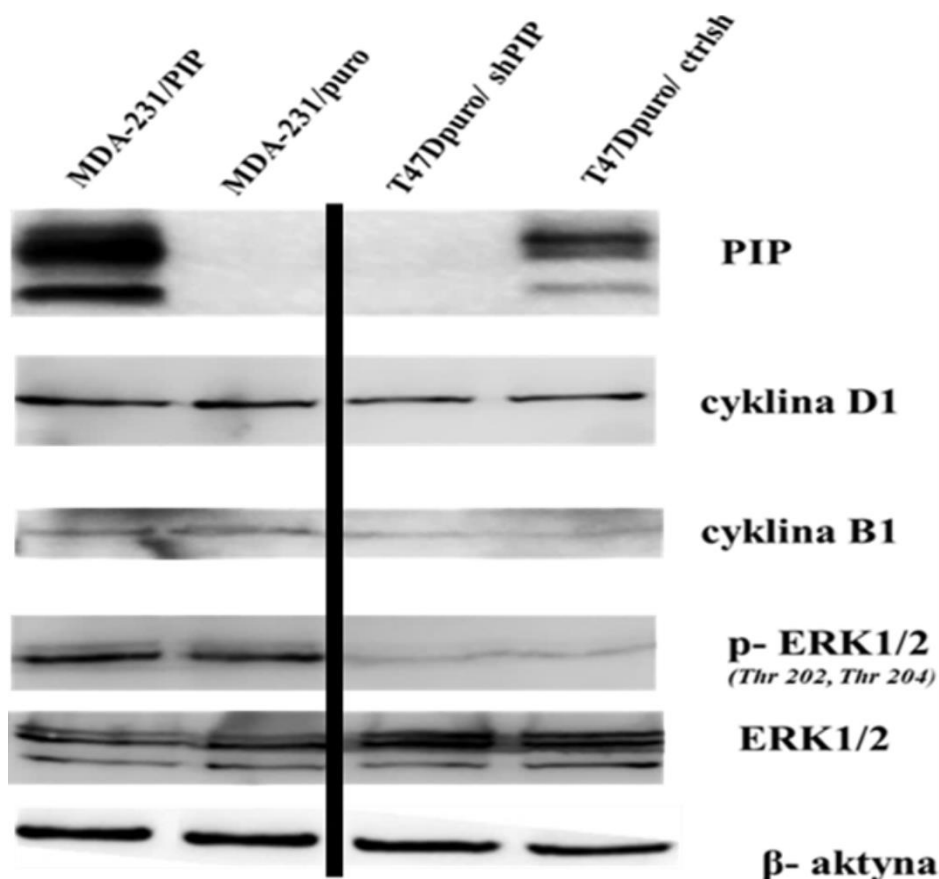


**Ryc. 14 A)** Przebieg cyklu komórkowego w komórkach T47Dpuro/ctrlsh i T47Dpuro/shPIP Liczbę jąder w komórkach znajdujących się w danej fazie cyklu komórkowego obliczano za pomocą cytometrii przepływowej po wybarwieniu komórek odczynnikiem „FxCycle PI/RNase solution”. Dane analizowano z wykorzystaniem programu ModFit5.0. **oraz Wykres obrazujący liczbę jąder w komórkowych znajdujących się w danej fazie cyklu.** Dane prezentowane jako średnia z trzech niezależnych pomiarów.





**Ryc. 14 B) Przebieg cyklu komórkowego w komórkach MDA-231/PURO i MDA-231/PIP.** Liczbę jąder w komórkach znajdujących się w danej fazie cyklu komórkowego obliczano za pomocą cytometrii przepływowej po wybarwieniu komórek odczynnikiem „FxCycle PI/RNase solution”. Dane analizowano z wykorzystaniem programu ModFit5.0 **oraz Wykres obrazujący liczbę jąder w komórkowych znajdujących się w danej fazie cyklu.** Dane prezentowane jako średnia z trzech niezależnych pomiarów.



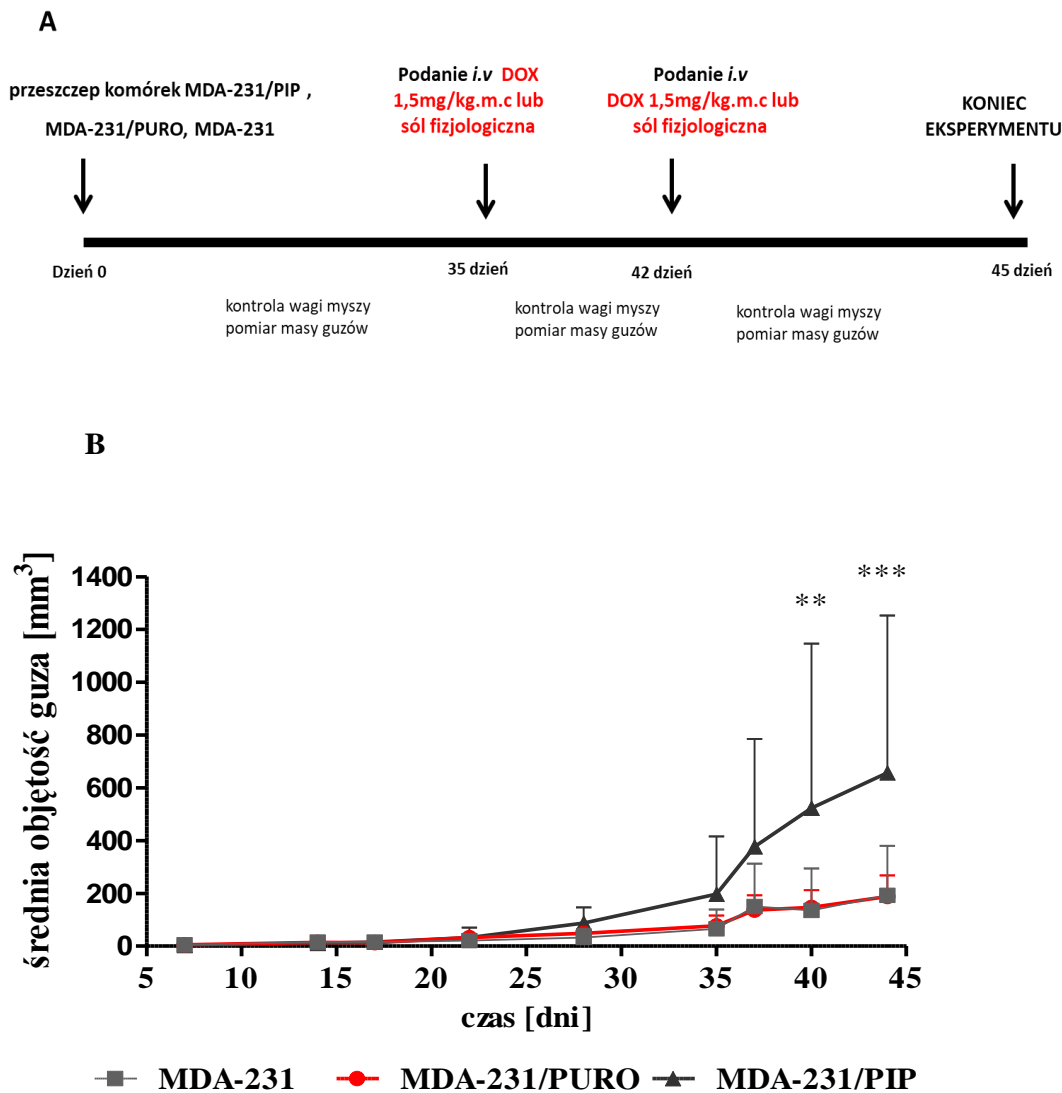
**Ryc. 14 C)** Ekspresja PIP, cykliny D1, cykliny B1 oraz kinaz ERK1/2 i ich fosforylowanych form (pERK1/2 Thr 202, Tyr 204) w komórkach MDA-231/PURO i MDA-231/PIP oraz T47D puro/ctrlsh i T47D puro/shPIP. Białka wykrywano metodą western blotting z użyciem króliczych przeciwciał monoklonalnych anty-cyklina D1, anty-cyklina B1, anty-pERK1/2, anty-ERK1/2, anty-PIP. Elektroforezę SDS-PAGE prowadzono w 15% żelu poliakrylamidowym, nanosząc na ścieżkę 25  $\mu$ g białka. Wyniki normalizowano wobec  $\beta$ -aktyny wykrywanej za pomocą króliczego monoklonalnego przeciwciała anty- $\beta$  aktyna.

#### 4.5. Badania *in vivo*

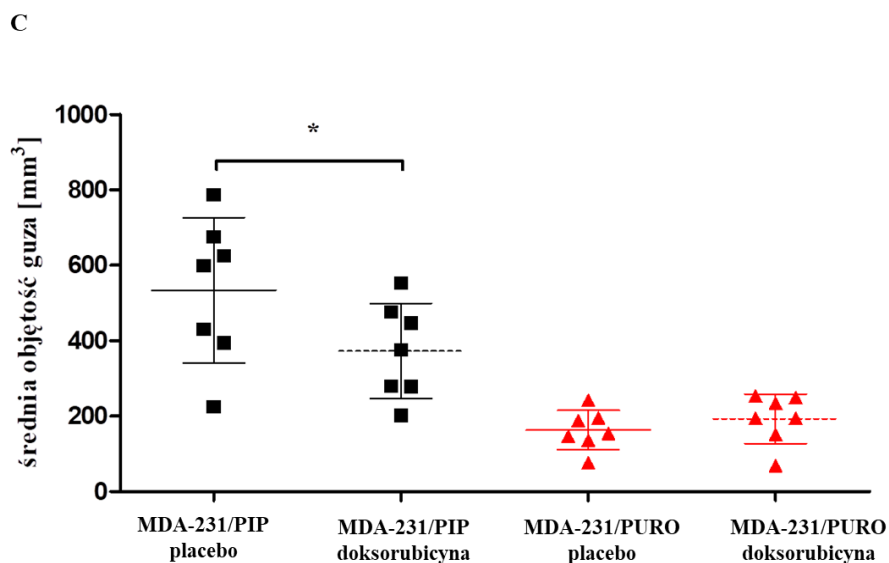
##### 4.5.1. Zdolność komórek MDA-MB-231/puro i MDA-MB-231/PIP do wzrostu w postaci guzów po ich ortotopowym przeszczepieniu myszom nu/nu, które poddawano leczeniu za pomocą doksorubicyny

Myszom szczepu Balb/c Crl:NU-Foxn1<sup>nu/nu</sup> przeszczepiano ortotopowo komórki MDA-MB-231, kontrolne komórki MDA-231/PURO transdukiowane samym wektorem oraz komórki MDA-231/PIP ekspresjonujące PIP, a następnie dwukrotnie podawano im dożylnie roztwór soli fizjologicznej i doksorubicyny 1,5mg/kg.mc w 35 i 42 dniu eksperymentu (**Ryc. 15 A**). Pomiarów objętości powstających guzów nowotworowych dokonywano co 4 dni, począwszy od dnia 7 po podaniu komórek nowotworowych (**Ryc.**

**15 B).** Stwierdzono, że objętości guzów utworzonych przez rodzicielskie komórki MDA-MB-231 (średnia objętość  $77 \text{ mm}^3$ ) i kontrolne komórki MDA-231/PURO (średnia objętość  $79 \text{ mm}^3$ ) są istotnie mniejsze ( $p < 0,001$ ) w porównaniu z guzami tworzonymi przez komórki MDA-231/PIP (średnia objętość  $177 \text{ mm}^3$ ).



**Ryc.15 A)** Schemat eksperymentu. **B)** Kinetyka wzrostu guzów nowotworowych po ortotopowym przeszczepieniu rodzicielskich komórek MDA-MB-231, kontrolnych komórek MDA-231/PURO i komórek MDA-231/PIP ekspresjonujących PIP myszom szczepu Crl:NU-Foxn1<sup>null</sup>, odpowiednio  $n=6$ ,  $n=8$ ,  $n=7$ . \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ , test Anova two-way z poprawką Bonferroniego. Gwiazdkami oznaczono poziom istotności statystycznej różnic pomiędzy odpowiednimi punktami na krzywych.



C) Średnie objętości guzów nowotworowych w 45 dniu eksperymentu po ortotopowym przeszczepieniu komórek MDA-231/PIP lub kontrolnych komórek MDA-231/PURO myszom, którym podawano doksorubicynę (MDA-231/PIP doksorubicyna i MDA-231/PURO doksorubicyna) lub sól fizjologiczną (MDA-231/PIP placebo i MDA-231/PURO placebo). \* $p < 0,05$ , test Anova two-way z poprawką Bonferroniego.

W celu wykazania związku pomiędzy ekspresją PIP a podatnością/opornością komórek raka gruczołu piersiowego na chemioterapię prowadzoną przy użyciu doksorubicyny, myszom obciążonym guzami podawano dożylnie, roztwór doksorubicyny w dawce 1,5 mg/kg.m.c. i analogicznie jak wyżej wykonywano pomiary objętości guzów (**Ryc. 15 A**). W ostatnim dniu eksperymentu, w przypadku kontrolnych komórek MDA-231/PURO nie stwierdzono różnic w wielkości guzów pomiędzy grupą myszy, które otrzymywały sól fizjologiczną (MDA-231/PURO placebo), a grupą myszy, którym podawano doksorubicynę (MDA-231/PURO doksorubicyna). Natomiast, w przypadku myszy obciążonych guzami utworzonymi przez komórki MDA-231/PIP, wielkości guzów nowotworowych u zwierząt leczonych doksorubicyną były istotnie mniejsze (\* $p < 0,05$ ) w porównaniu ze zwierzętami, którym podawano sól fizjologiczną (**Ryc. 15 C**).

Skuteczność przeciwnowotworowego działania doksorubicyny i PIP wyrażano jako procent zahamowania wzrostu guza TGI (*Tumor Growth Inhibition*) (rozdz. 3.20.1). Wartości TGI w wybranych dniach eksperymentu przedstawia **Tabela 5**. W 35 dniu, guzy nowotworowe utworzone przez komórki MDA-231/PURO i komórki MDA-231/PIP z ekspresją białka PIP miały taką samą wartość TGI równą 10, co oznacza, że przed podaniem doksorubicyny średnia masa guzów w grupach placebo i badanych, była taka



sama. Wyliczone ujemne wartości TGI wskazują na brak hamowania wzrostu guzów u myszy obarczonych guzami MDA-231/PURO bez ekspresji PIP, którym podawano dokсорubicynę w porównaniu ze zwierzętami, którym podawano sól fizjologiczną. Natomiast dodatnie wartości TGI w przypadku myszy z guzami MDA-231/PIP ekspresjonującymi białko PIP świadczą o hamowaniu wzrostu guzów przez ten cytostatyk w obecności białka PIP.

**Tabela 5.** Efekt współdziałania białka PIP i dokсорubicyny na wzrost guzów nowotworowych wyrażony wartościami TGI

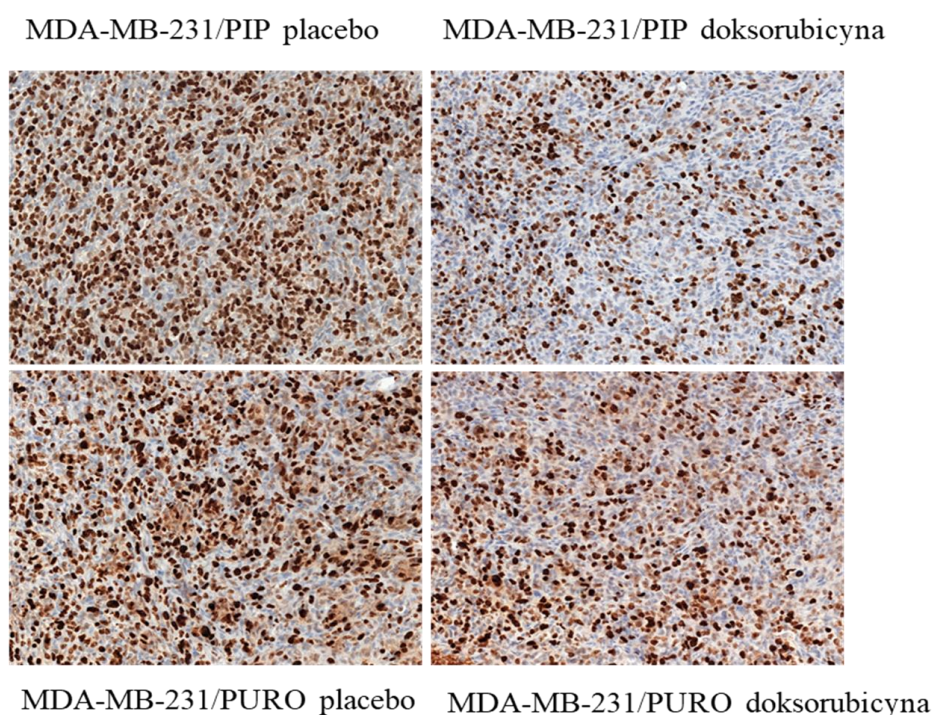
DZIEŃ	TGI	
	MDA-231/PURO	MDA-231/PIP
35	10	10
37	-26,1	35
38	-10,9	29,5
40	-32,6	37,3
42	-20,1	28,5
43	-2,9	29,5
44	-34,9	29,8

Skrawki tkankowe pochodzące z guzów nowotworowych utworzonych przez komórki MDA-231/PURO pochodzące od myszy, którym podawano sól fizjologiczną (MDA-231/PURO placebo) lub dokсорubicynę (MDA-231/PURO dokсорubicyna) i guzy nowotworowe utworzone przez komórki MDA-231/PIP, którym podawano sól fizjologiczną (MDA-231/PIP placebo) lub dokсорubicynę (MDA-231/PIP dokсорubicyna) poddawano reakcji immunohistochemicznej w celu wykrycia antygenu Ki-67, będącego powszechnie stosowanym markerem proliferacji. Stosując mysie monoklonalne przeciwciało skierowane przeciwko antygenowi Ki-67 nie stwierdzono różnic w ekspresji tego markera pomiędzy guzami utworzonymi przez komórki MDA-

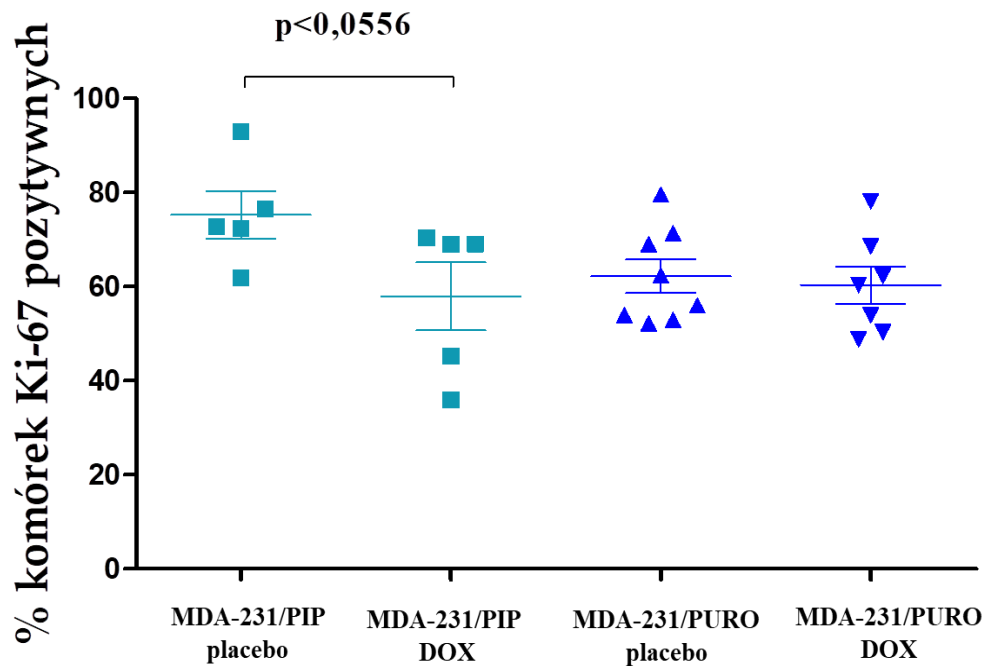
231/PURO pochodzące od myszy, którym podawano sól fizjologiczną lub doksorubicynę. Wykazano natomiast wyższy ( $p < 0,0556$ ) poziom ekspresji antygenu Ki-67 w skrawkach guzów tworzonych przez komórki MDA-231/PIP pochodzących od myszy, którym podawano sól fizjologiczną w porównaniu z guzami utworzonymi przez komórki MDA-231/PIP, które pochodziły od myszy otrzymujących doksorubicynę (**Ryc. 17 A i B**). Nie stwierdzono różnic w apoptozie oznaczanej na skrawkach guzów z wykorzystaniem metody TUNEL zarówno dla guzów utworzonych przez komórki kontrolne MDA-231/PURO, którym podawano sól fizjologiczną lub doksorubicynę jak i dla komórek MDA-231/PIP. (**Ryc. 17**)

Świadczyć to może po pierwsze o zbyt późnym podaniu myszom doksorubicyny tj. w momencie, kiedy różnice w wielkości guzów pomiędzy grupą zwierząt, z przeszczepionymi komórkami MDA-231/PIP a grupą zwierząt z przeszczepionymi komórkami MDA-231/PURO były widoczne. Po drugie podanie dwóch dawek leku mogło okazać się niewystarczające do zaobserwowania znaczących różnic w odpowiedzi na leczenie przy tak szybko rosnącym guzie.

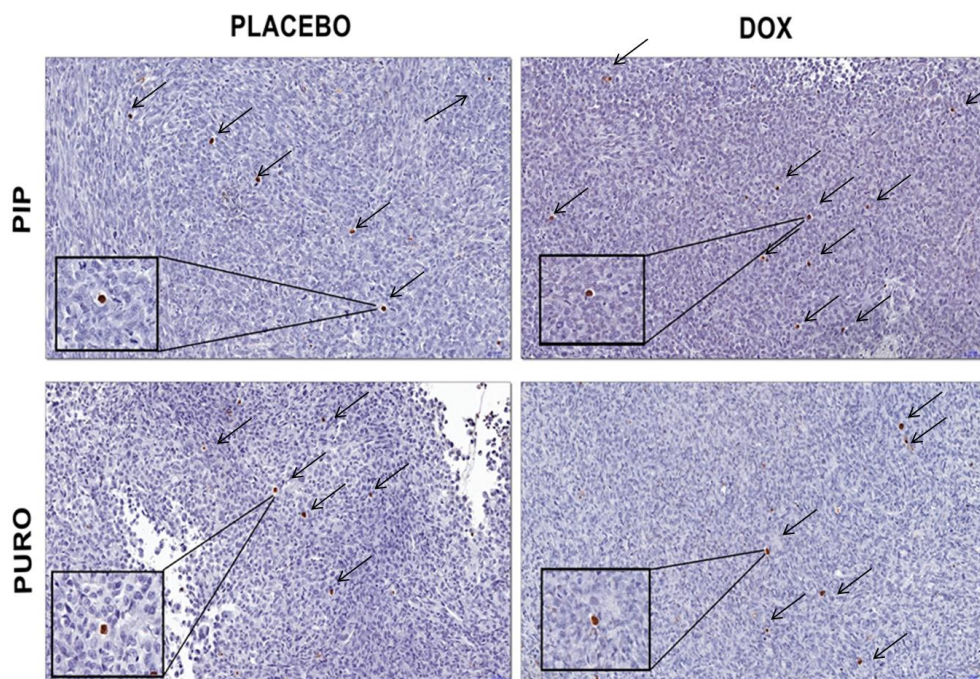
**A)**



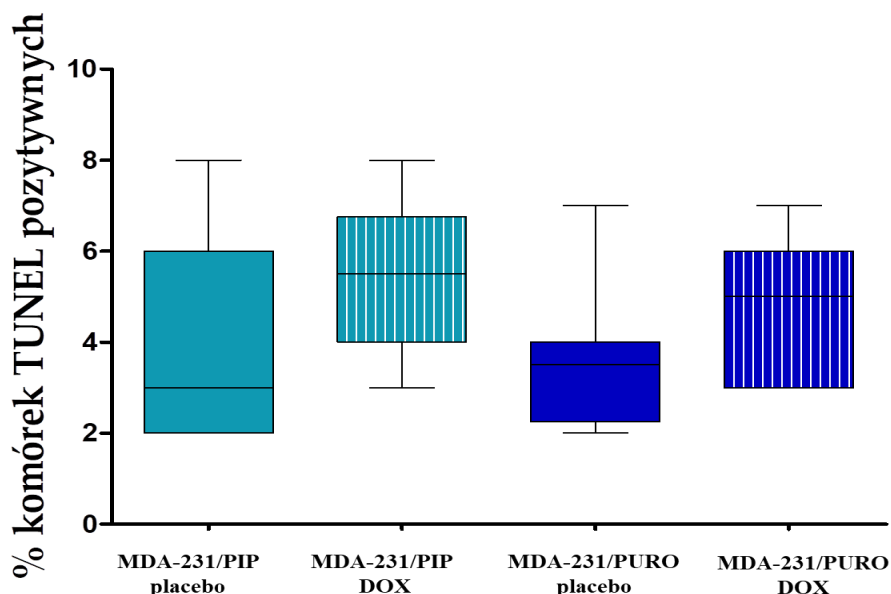
**Ryc. 16 A)** Reakcja immunohistochemiczna obrazująca ekspresję antygenu Ki-67 w guzach MDA-231/PIP i MDA-231/PURO pochodzących od myszy, którym podawano dożylnie albo doksorubicynę albo sól fizjologiczną. Powiększenie 200x



. B) Procent komórek Ki-67 pozytywnych w guzach MDA-231/PIP i MDA-231/PUR pochodzących od myszy, którym podawano dożylnie albo doksorubicynę albo sól fizjologiczną.  $p < 0,0556$ ; U-Man Whitney test.



**Ryc. 17 A)** Metoda TUNEL obrazująca apoptozę w guzach MDA-231/PIP i MDA-231/PURO pochodzących od myszy, którym podawano dożylnie albo doksorubicynę albo sól fizjologiczną. Powiększenie 20x



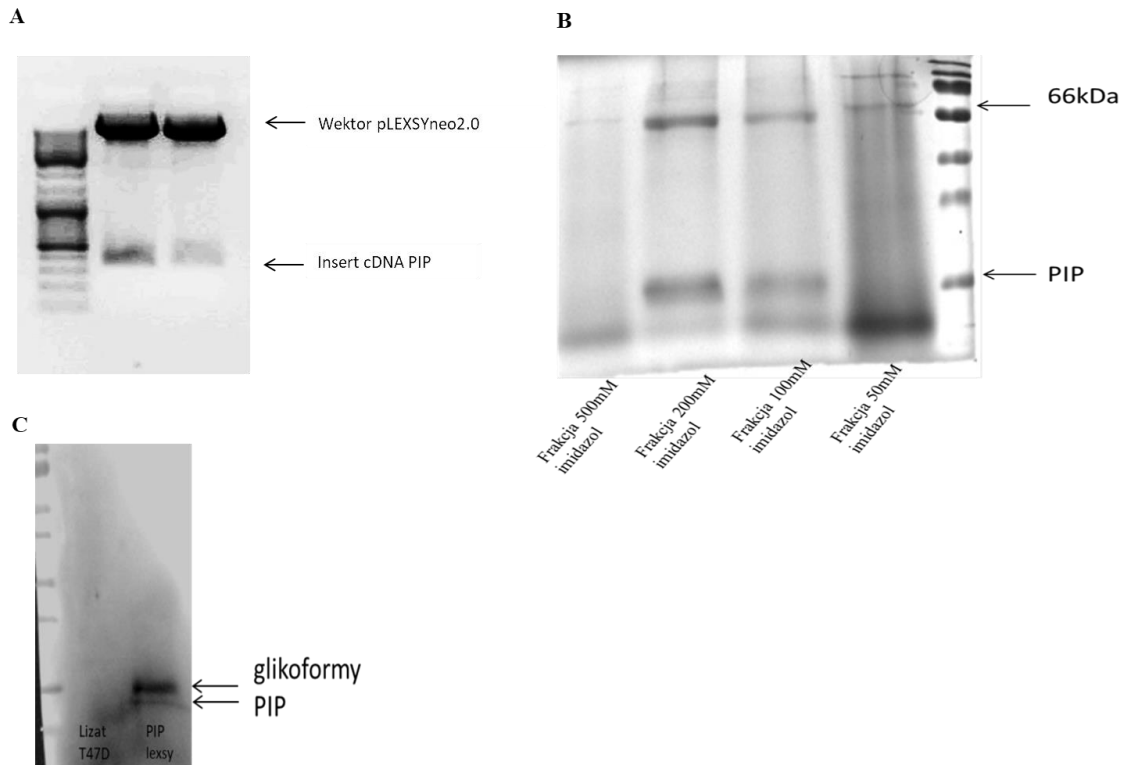
**B) Procent komórek TUNEL pozytywnych w guzach MDA-231/PIP i MDA-231/PURO pochodzących od myszy, którym podawano dożylnie albo doksorubicynę albo sól fizjologiczną.**

#### **4.6. Otrzymanie rekombinowanego białka PIP w systemie pLEXY wykorzystującego komórki P10, *Leishmania terantolae***

Komórki P10neo/PIP otrzymano poprzez transformację komórek P10 za pomocą zlinearyzowanej kasy ekspresyjnej będącej częścią wektora pLEXY-neo2.0, która zawiera cDNA białka PIP z sekwencją kodującą sześć histydyn na C końcu, sekwencję peptydu sygnałowego umożliwiającego sekrecję białka PIP do pożywki hodowlanej oraz sekwencje warunkujące integrację tej kasy z genomem komórek P10 w miejscu gdzie kodowany jest gen dla mniejszej podjednostki rybosomu.

cDNA kodujące białko PIP otrzymano metodą RT-PCR wykorzystując jako matrycę mRNA pochodzące z komórek T47D i parę starterów ForXbaIPIP i RevNheI PIP (**rozdz. 3.3**). Następnie produkt PCR o długości 420 pz zakończony sekwencjami odpowiadającymi miejscom restrykcyjnym dla enzymów XbaI or NheI klonowano do wektora pLEXY2.0neo na te same miejsca restrykcyjne. Tak otrzymanym wektorem ekspresyjnym transformowano bakterie *E. coli* szczepu DH5 $\alpha$ , które wysiewano na płytki Petriego z pożywką LB zestaloną 1,5% agarem z dodatkiem ampicyliny. Po całonocnej hodowli w temperaturze 32°C zbierano pojedyncze kolonie bakteryjne, z których po namnożeniu bakterii izolowano plazmidowe DNA. Celem analizy poprawności

sekwencji, wyizolowane rekombinowane cząsteczki DNA poddawano najpierw analizie restrykcyjnej enzymami XbaI oraz NheI (**Ryc. 18A**), a następnie sekwencjonowaniu. Uzyskany wektor ekspresyjny nazwano pLEXSY-neo/PIP.



**Ryc. 18 A)** Elektroforeza w żelu agarozowym fragmentów DNA uzyskanych po trawieniu wektora pLEXSY-neo/PIP enzymami restrykcyjnymi XbaI oraz NheI. Ścieżka 1 – standard DNA GeneRuler™ 1000 bp Plus Ladder (Fermentas), ścieżki 2 i 3 - plazmidowe DNA po trawieniu enzymami restrykcyjnymi XbaI oraz NheI. **B)** Wykrywanie obecności białka PIP-lexsy w pożywce hodowlanej znad komórek P10 *Leishmania tarentolae* metodą western blot wykorzystując mysie monoklonalne przeciwciała skierowane przeciwko metce His-tag. **C)** Elektroforeza SDS-PAGE kolejnych frakcji zawierających białka PIP-lexsy otrzymanych podczas oczyszczania PIP z pożywki hodowlanej za pomocą chromatografii powinowactwa na złożu NiNT-agaroza. Żel barwiono 0,025% roztworem błękitu kumazyny R-250. Markery mas: (B) PageRulerPlus Prestained #226619 i (C) Perfect Tricolor Protein Ladder E3210-01.

Wektorem ekspresyjnym pLEXSY-neo/PIP transformowano komórki P10-neo2.0 *Leishmania tarentolae*, otrzymując w ten sposób komórki P10-neo2.0-PIP, które następnie analizowano pod kątem produkcji i sekrecji rekombinowanego białka PIP, nazwanego PIP-lexsy. Wykorzystując metodę western blot wykazano obecność w pożywce pochodzącej z hodowli tych komórek znaczne ilości PIP-lexsy występujące w postaci dwóch pasm białkowych o pozornej masie cząsteczkowej 16,5 kDa i 14 kDa (**Ryc. 18B**). W kolejnym etapie, białko PIP, ze względu na obecność metki His-tag, izolowano

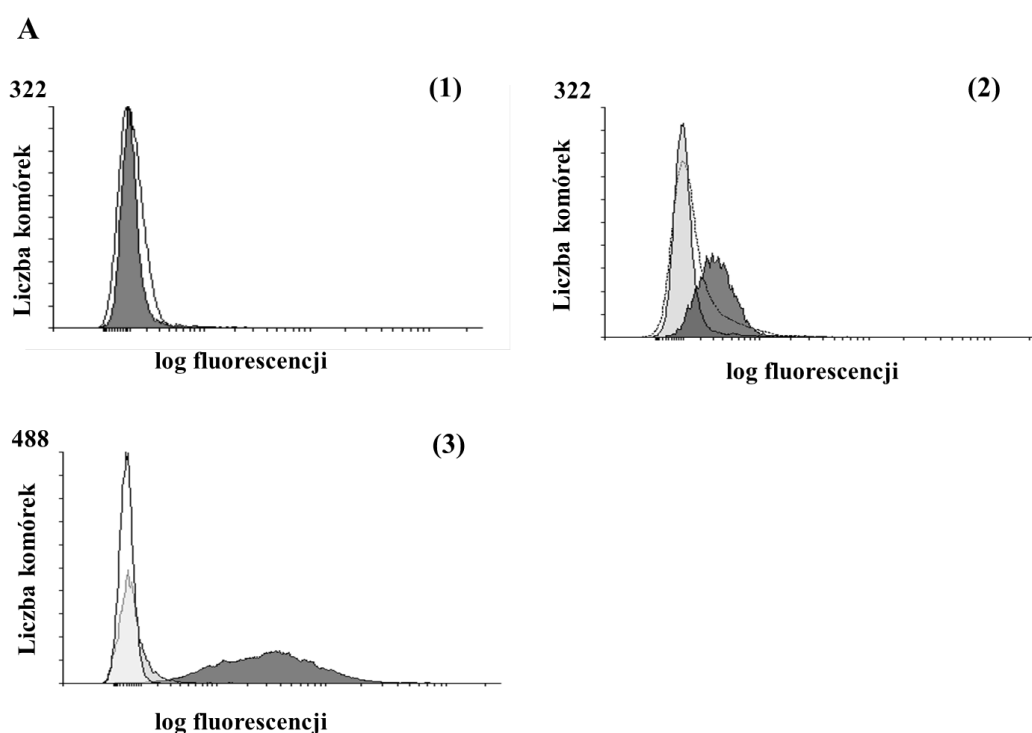
z płynu hodowlanego metodą chromatografii powinowactwa na złożu NiNT-agarozu i czystość uzyskanego preparatu sprawdzano za pomocą elektroforezy SDS-PAGE. Obok spodziewanych dwóch prążków białkowych o pozornych masach cząsteczkowych 16,5 kDa i 14 kDa, stwierdzono obecność dodatkowego pasma o pozornej masie cząsteczkowej ok 66 kDa, reprezentującej najprawdopodobniej tetramer białka PIP (Caputo E i wsp., 2003) (**Ryc. 18C**).

#### **4.7. Wiązanie białka PIP do powierzchni komórek MDA-MB-231 raka gruczołu piersiowego oraz jego działanie pro-apoptotyczne w obecności doksorubicyny**

Dotychczasowe badania wskazują, że PIP jako białko sekrecyjne, (lokalizacja w pęcherzykach sekrecyjnych) (Mazoujian i wsp., 1984) oraz obecność N-glikanów w jego strukturze (Caputo i wsp., 2003), może pełnić swoją funkcję zewnątrzkomórkowo wiążąc się do powierzchni komórek raka gruczołu piersiowego (Cassoni i wsp., 1995). Jakkolwiek, ostatnie rezultaty badań sugerują, że PIP zwiększa potencjał proliferacyjny komórek działając wewnątrzkomórkowo (Baniwal i wsp., 2014; Nader i wsp., 2014). Stąd, w celu wykazania, że mechanizm działania PIP jako białka wydzielniczego jest związany z działaniem zewnątrzkomórkowym, analizowano jego wiązanie do powierzchni komórek raka gruczołu piersiowego, a następnie badano, czy zewnątrzkomórkowy PIP zmienia wrażliwość tych komórek na apoptozę indukowaną doksorubicyną.

Wiązanie białka PIP do powierzchni komórek raka gruczołu piersiowego analizowano za pomocą cytometrii przepływowej, wykorzystując do wykrywania PIP królicze monoklonalne przeciwciała anti-PIP oraz mysie przeciwciała skierowane przeciwko IgG królika skoniugowane z FITC. W tym celu, komórki MDA-MB-231, które pozbawione są białka PIP (w tych komórkach PIP nie jest ekspresjonowany) inkubowano z pożywką pochodzącą z hodowli komórek MDA-231/PIP z nadekspresją PIP i wykazano, że znaczny procent komórek MDA-MB-231 inkubowanych wcześniej z tym nadsączem wiąże przeciwciała anti-PIP (**Ryc. 19A- 1**). Ten wynik potwierdzono następnie, inkubując komórki MDA-MB-231 z rekombinowanym białkiem PIP-lexsy (**Ryc. 19A-3**)

Aby sprawdzić, czy za wiązanie białka PIP do powierzchni komórek MDA-MB-231 odpowiedzialny jest specyficzny receptor, białka powierzchniowe poddawno biotynylacji, a następnie z takich komórek izolowano frakcję białek błonowych metodą chromatografii powinowactwa na złożu z awidyną. Białka te następnie rozdzielano za pomocą elektroforezy SDS-PAGE i przenoszono na membranę nitrocelulozową. W celu wykrycia białka receptorowego, membranę inkubowano z rekombinowanym białkiem PIP. Obecność związanego do membrany białka PIP wykrywano za pomocą króliczych przeciwciał anti-PIP. Stwierdzono, że wiąże się ono do prążka białkowego o masie cząsteczkowej 55 kDa (**Ryc. 19B**).

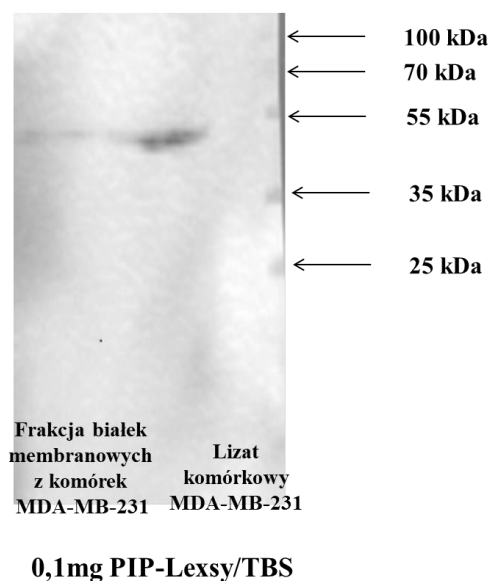


**Ryc. 19 A) Wiązanie białka PIP do powierzchni komórek MDA-MB-231.**

(1) Pożywka hodowlana znad kontrolnych komórek MDA-231/PURO; (2) pożywka hodowlana znad komórek MDA-231/PIP z nadekspresją białka PIP. (3) białko rekombinowane PIP-Lexsy. Biały histogram: komórki kontrolne, jasnoszary histogram komórki + przeciwciała II rządowe, czarny histogram PIP + przeciwciała I rządowe + przeciwciała II rządowe.

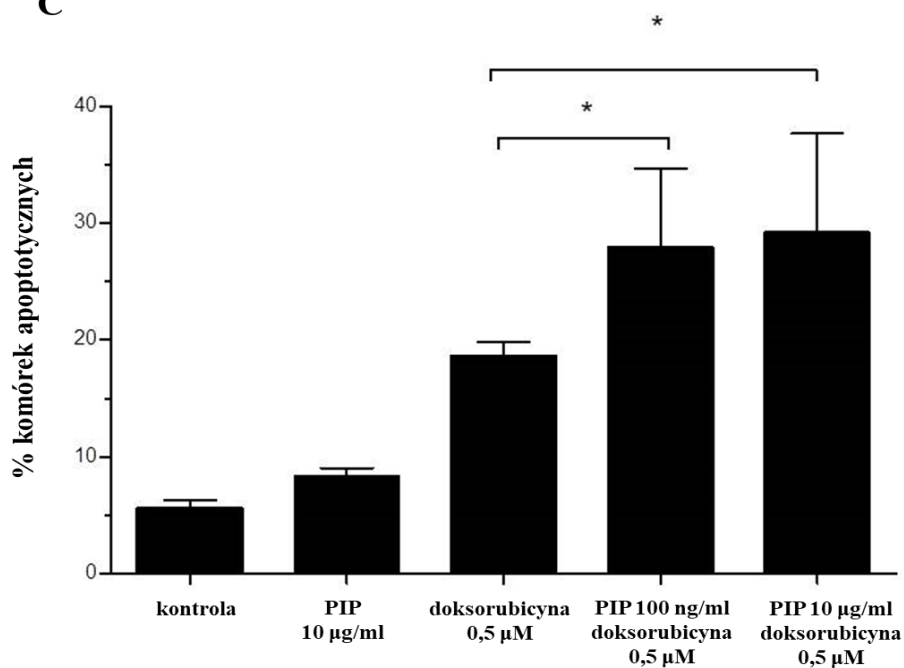
Związane białko PIP zarówno z nadsącza jak i rekombinowane PIP-LEXSY wykrywano za pomocą cytometrii przepływowej wykorzystując królicze przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko białku PIP).

B



**B) Wiązanie rekombinowanego białka PIP-lexsy do frakcji białek błonowych izolowanych z komórek wyjściowych MDA-MB-231.** Białko PIP wykrywano metodą far-western blotting wykorzystując przeciwciało monoklonalne anty PIP i II-rzędowe przeciwciało skoniugowane z peroksydazą chrzanową.

C



**C) Podatność na apoptozę komórek MDA-MB-231 hodowanych w obecności doksorubicyny o stężeniu 0,5 µM i białka PIP-Lexsy (100 ng/ml i 10 µg/ml).** Komórki apoptotyczne wykrywano za pomocą zestawu „CaspGLOW™ Fluorescein Active Caspase-3/7 Staining Kit.” Dane prezentowane są jako wartości średnie ±SD, n = 3, \**p* < 0,05; Anova One-way Dunnet post-test.



W celu wykazania, że zewnątrzkomórkowy PIP może zmieniać wrażliwość komórek raka gruczołu piersiowego na apoptozę indukowaną dokсорubicyną, komórki MDA-MB-231 hodowano w obecności wzrastających stężeń rekombinowanego białka PIP-lexsy (100ng/ml i 10µg/ml) przez 24 godziny, a następnie również dokсорubicyny o stężeniu, 0,5 µM, przez kolejnych 48 godzin. Po tym czasie oznaczano procent komórek apoptotycznych w oparciu o oznaczanie aktywnych formy kaspaz 3 i 7 za pomocą cytometrii przepływowej. Stwierdzono, że procent komórek apoptotycznych jest istotnie niższy (\* $p < 0,05$ ) w przypadku komórek MDA-MB-231 traktowanych tylko dokсорubicyną w porównaniu z komórkami MDA-MB-231, które hodowano najpierw w obecności rekombinowanego białka PIP, a następnie dokсорubicyny w tej samej dawce (**Ryc. 19C**).

## Dyskusja

W latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku wprowadzono (neoadjuwantowe) przedoperacyjne leczenie cytostatykami u pacjentek z rakiem gruczołu piersiowego, gdzie zabieg operacyjny był niewskazany ze względu na duże zaawansowanie choroby nowotworowej. Po zabiegu zaś kontynuowano (adjuwantowe) leczenie cytostatykami. Obecnie podawanie cytostatyków przed zabiegiem operacyjnym stało się powszechną praktyką zwiększającą szanse chorych na przeżycie poprzez zmniejszenie zaawansowania choroby. Według obowiązujących rekomendacji, przy wyborze schematu chemioterapii należy kierować się przede wszystkim oceną wrażliwości komórek raka gruczołu piersiowego na leczenie stosowanymi cytostatykami oraz oceną stopnia klinicznego zaawansowania choroby.

Dlatego tak istotne jest poszukiwanie czynników predykcyjnych, które mogłyby wskazać, czy dany typ nowotworu będzie wrażliwy na stosowaną terapię. Jednym z takich czynników może być białko PIP, na co wskazują badania Jabłońskiej i wsp. (2016), którzy wykazali, że wysoki poziom tego białka w komórkach raka gruczołu piersiowego pozytywnie koreluje z odpowiedzią pacjentek z tym nowotworem na standardową chemioterapię adjuwantową (doksorubicyna + cyklofosfamid).

Co prawda, w badaniach wykonanych dwa lata wcześniej przez Darb-Esfahani i wsp. (2014), przeprowadzonych na grupie 602 pacjentek chorych na raka gruczołu piersiowego, nie wykazano istotnej korelacji pomiędzy ekspresją PIP a odpowiedzią na leczenie cytostatykami (docetaksel, doksorubicyna i cyklofosfamid). Jednakże wykazano, że u tych pacjentek z rakiem gruczołu piersiowego, u których poziom PIP był wyższy, obserwowano dłuższe przeżycia wolne od wznowy oraz przerzutów, co potwierdziło wcześniejsze badania innych autorów. I tak, Pagani i wsp. (1994) po raz pierwszy pokazali, że wysoka ekspresja PIP koreluje z dłuższymi przeżyciami pacjentek wolnymi od wznowy, a także, że ekspresja PIP w guzach jest pozytywnym czynnikiem rokowniczym i koreluje z brakiem przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych. Kolejne badania także potwierdziły, że pacjentki z wyższą ekspresją PIP charakteryzowały się dłuższymi przeżyciami wolnymi od wznowy i przerzutów (Hahnel i wsp., 1996; Fritzsche i wsp., 2007). Wykazano również, że poziom ekspresji PIP spada wraz ze wzrostem stopnia złośliwości G i jest on najniższy w przypadku potrójnie negatywnych raków gruczołu piersiowego z brakiem ekspresji receptorów

estrogenowych, progesteronowych i naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 (ER-, PR- i HER-2-) o złym rokowaniu (Fritzsche i wsp., 2007; Jabłońska i wsp., 2016; Gangadharan i wsp., 2018). W rzadkim inwazyjnym typie raka gruczołu piersiowego jakim jest typ apokrynowy wykazano wysoką ekspresję PIP skorelowaną z wysoką ekspresją receptora androgenowego AR i dalej pokazano iż duże guzy tego typu charakteryzują się obniżoną ekspresją tego białka (Baniwal S.K. i wsp.2012).

Powyższe wyniki badań sugerują, że białko PIP może z jednej strony zwiększać wrażliwość komórek raka gruczołu piersiowego na chemioterapię, a z drugiej, może spowalniać progresję tego nowotworu.

Ostatnie rezultaty badań *in vivo*, uzyskane przez Edechi w 2019 roku, w których myszy Balb/c z przeszczepionymi komórkami mysiego raka gruczołu mlekowego 4T1 (reprezentującymi model *triple negative*) z nadekspresją mysiego białka mPIP, wykazywały opóźniony wzrost guza w porównaniu do myszy z przeszczepionymi kontrolnymi komórkami 4T1/puro. Ponadto, u tych zwierząt odnotowano zwiększony poziom limfocytów  $T_{NK}$ , komórek dendrytycznych i limfocytów  $CD4^+ IL4^+ T$  ale równocześnie zwiększoną liczbę przerzutów do płuc w porównaniu do myszy z guzami utworzonymi przez komórki kontrolne 4T1/puro.

Jakkolwiek, przeszczepione myszom Balb/c komórki raka gruczołu mlekowego E0771 z nadekspresją mPIP (reprezentujące model luminal A) nie wykazywały różnic w wielkości guza w porównaniu do komórek kontrolnych E0771/puro. Nie odnotowano także u tych zwierząt różnic w ilości limfocytów  $T_{NK}$ , komórek dendrytycznych i komórek  $CD4^+ IL4^+ T$ , jak również nie wykazano różnic w ilości przerzutów do płuc. Mimo, iż w mysie białko mPIP posiada tylko 51% identyczności z ludzkim PIP i nie ulega ekspresji w wyżej wymienionych liniach komórkowych 4T1 i E0771, badania te mogą wskazywać, że obecność PIP w komórkach raka gruczołu mlekowego reprezentujących różne typy tego nowotworu może być związana z różnorodną rolą tego białka w procesie nowotworowym (Edechi C.A i wsp. 2019a)

Biorąc pod uwagę fakt, że efekt terapeutyczny leków przeciwnowotworowych stosowanych w terapii raka gruczołu piersiowego, oparty jest przede wszystkim na indukcji apoptozy, ważne było przeprowadzenie badań, których celem było określenie roli białka PIP w apoptozie indukowanej wybranymi lekami przeciwnowotworowymi (stosowanymi klinicznie), takimi jak doksorubicyna, paklitaksel i 4-hydroksycyklofosfamid (pochodna cyklofosfamidu aktywna *in vitro*).

Badania te zrealizowałam wykorzystując dwa modele eksperymentalne. Pierwszy, nazwany modelem funkcjonalnym (*gain of function phenotype*), obejmował komórki MDA-MB-231 z neoekspresją PIP (komórki MDA-231/PIP). Drugi, określony mianem modelu afunkcjonalnego (*loss of function phenotype*), obejmował komórki T47D, w których za pomocą interferencji RNA wyciszono ekspresję genu *PIP* (komórki T47D puro/shPIP). Wyboru komórek służących do stworzenia obu modeli dokonałam w oparciu o wykonaną wcześniej analizę poziomu PIP w komercyjnie dostępnych ludzkich liniach komórkowych raka gruczołu piersiowego. Najwyższy poziom białka PIP, zgodnie z oczekiwaniami, obserwowałam w komórkach T47D, które zgodnie z danymi literaturowymi posiadają naturalną jego ekspresję (Myal Y i wsp. 1991). Natomiast brak białka PIP stwierdziłam w komórkach MDA-MB-231, które odpowiadają typowi molekularnemu potrójnie negatywnemu (*triple negative*), gdyż nie wykazują ekspresji receptorów dla estrogenu (ER-), progesteronu (PR-) i naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 (HER-2). Posługując się metodą MTT wykazałam, że komórki raka gruczołu piersiowego z wysoką ekspresją PIP (T47D puro/ctrlsh i MDA-231/PIP), charakteryzują się niższą opornością na cytotoksyczne działanie dokсорubicyny, 4-hydroksycyklofosfamidu oraz paklitakselu w porównaniu z komórkami, które naturalnie nie wytwarzają PIP (MDA-231/PURO) lub, w których doszło do zahamowania ekspresji PIP (T47D puro/shPIP). Jedynie w przypadku paklitakselu, nie obserwowałam różnic dla komórek T47D puro/ctrlsh i T47D puro/shPIP, co może być związane z ich wysoką letalnością w wyniku nekrozy wywołanej działaniem tego leku. Ta zwiększona wrażliwość komórek z wysoką ekspresją PIP, na działanie ww. cytostatyków spowodowana jest ich zwiększoną podatnością na apoptozę, co pokazałam wykorzystując do badań test z aneksyną V. Co więcej, wykorzystując test oparty na wykrywaniu aktywnych form kaspaz 3 i 7 wykazałam, że apoptoza tych komórek zachodzi poprzez ich aktywację. Podsumowując, w efekcie przeprowadzonych eksperymentów *in vitro*, po raz pierwszy pokazałam, że ekspresja PIP w komórkach raka gruczołu piersiowego prowadzi do ich zwiększonej podatności na apoptozę wywołaną działaniem wybranych leków cytotoksycznych.

Należy dodać, że nieliczne doniesienia wskazują na możliwy udział białka PIP w apoptozie komórek raka gruczołu piersiowego. Mianowicie, we wczesnych badaniach Laponite i wsp. (1999) pokazali, że zwiększenie ekspresji PIP wywołane działaniem 5 $\alpha$ -dihydrotestosteronu (5 $\alpha$ DHT), związane było ze znacznym spadkiem ekspresji anty-

apoptotycznego białka Bcl-2 w komórkach ZR-75-1 raka gruczołu piersiowego. Również Debilly i wsp. (2009) wykazali za pomocą funkcjonalnej genomiki, że wzrost poziomu ekspresji PIP w komórkach T47D raka gruczołu piersiowego i prawidłowych komórkach VH1 nabłonka gruczołu piersiowego, wywołany działaniem 5 $\alpha$ DHT związany jest z obniżeniem poziomu ekspresji białka Bcl-2. Badania ostatnich lat przeprowadzone przez Edechi CA i wsp. (2018), na myszach z nokautem genu *PIP* wskazują, że utrata białka PIP jest związana z defektem w funkcjonowaniu limfocytów

Th1 odgrywających kluczową rolę w immunologicznej odpowiedzi antynowotworowej.

Dalsze eksperymenty *in vitro* Edechi C.A i wsp. (2019a), na modelu mysich linii komórkowych 4T1 i E0771 z nadekspresją mysiego białka mPIP nie wykazały różnic w proliferacji oraz migracji w stosunku do komórek kontrolnych 4T1puro i E0771puro.

W odpowiedzi na cytostatyki takie jak: doksorubicyna, etopozyd i cisplatyna z wykorzystaniem testu XTT, przeżywalność obu tych modeli komórkowych (4T1/mPIP i E0771/mPIP) dla każdego z leków w dawce: doksorubicyna- 0,5 $\mu$ M, cisplatyna-20 $\mu$ M, etopozyd-50 $\mu$ M oraz leku blokującego receptory estrogenowe (ER) tamoksifenu-10 $\mu$ M, nie wykazała znaczących różnic w stosunku do komórek kontrolnych 4T1puro i E0771puro. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, iż model mysiego raka gruczołu piersiowego z nadekspresją mysiego białka mPIP wymaga weryfikacji badań na modelu ludzkim. Określenie i porównanie stopnia przeżywalności obu tych modeli komórkowych powinno być oparte na większej liczbie dawek dla każdego z ww. leków.

Z kolei, na udział białka PIP we wrażliwości komórek raka gruczołu piersiowego na chemioterapię, wskazują badania *in vivo*, przeprowadzone w ramach niniejszej pracy, w których wykorzystalam myszy bezgrasicze nu/nu z przeszczepionymi ortotopowo ludzkimi komórkami MDA-231/PIP oraz MDA-231/PURO. Na podstawie uzyskanych rezultatów wykazano, że myszy z guzem nowotworowym utworzonym przez komórki MDA-231/PIP z wysoką ekspresją PIP, odpowiadają lepiej na stosowanie doksorubicyny podanej dożylnie niż zwierzęta z guzami utworzonymi przez komórki kontrolne MDA-231/PURO bez ekspresji PIP. W przypadku guzów utworzonych przez komórki MDA-231/PIP ich objętość była istotnie mniejsza po podaniu myszom doksorubicyny w porównaniu z guzami MDA-231/PIP u myszy, którym podawano sól fizjologiczną. Natomiast, guzy utworzone przez komórki kontrolne MDA-231/PURO nie różniły się wielkościami, kiedy myszom podawano albo doksorubicynę, albo sól fizjologiczną.

Zaobserwowano trend ( $p = 0,056$ ) w poziomie ekspresji antygenu Ki-67 pomiędzy grupą zwierząt z guzami utworzonymi przez komórki MDA-231/PIP leczonych doksorubicyną w porównaniu do grupy kontrolnej MDA-231/PIP otrzymującej placebo. Przy braku jakichkolwiek różnic w ekspresji antygenu Ki-67 dla komórek MDA-231/PURO bez względu na to czy podano im doksorubicynę czy sól fizjologiczną.

Tym niemniej, nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy grupami kontrolnymi (placebo) a grupami badanymi (doksorubicyna), w liczbie komórek apoptotycznych, w obu liniach MDA-231/PIP, MDA-231/PURO kiedy pochodzące z nich skrawki tkankowe analizowano metodą TUNEL.

Świadczyć to może po pierwsze o zbyt późnym podaniu myszom doksorubicyny tj. w 35 dniu po przeszczepieniu, kiedy różnice w wielkości guzów pomiędzy grupą zwierząt, z przeszczepionymi komórkami MDA-231/PIP a grupą zwierząt z przeszczepionymi komórkami MDA-231/PURO były widoczne. Po drugie podanie dwóch dawek leku mogło okazać się niewystarczające do zaobserwowania znaczących różnic w odpowiedzi na leczenie przy tak szybko rosnącym guzie.

Już wczesne badania nad rolą białka PIP wykazały, że inkubacja komórek raka gruczołu piersiowego z natywnym białkiem PIP, zwiększa ich potencjał proliferacyjny przy braku takiego efektu dla innych typów nowotworów (Cassoni i wsp., 1995). W późniejszych badaniach nad rolą PIP w proliferacji komórek raka gruczołu piersiowego, wykorzystano komórki z zahamowaną ekspresją tego białka. Do uzyskania modelu niefunkcjonalnego używano albo syntetyczne siRNA (Naderi i Meyer, 2012), albo shRNA generowane za pomocą systemu tet-on (z wykorzystaniem doksycykliny) wprowadzonego do komórek za pomocą lentiwirusa (Baniwal i wsp., 2012). Wykorzystując komórki T47D i MDA-MB-453 wykazano, że zahamowanie ekspresji PIP znacznie obniża ich potencjał proliferacyjny (Baniwal i wsp., 2012; Naderi i Meyer, 2012). Przy czym, w przypadku komórek T47D zwiększenie potencjału proliferacyjnego w wyniku stymulacji czynnikami wzrostu obecnymi w płodowej surowicy bydlęcej lub dihydrotestosteronem było całkowicie zależne od obecności białka PIP (Baniwal i wsp., 2012). Rozszerzając badania o kolejne linie komórkowe raka gruczołu piersiowego: BT-474, MCF-7, HCC-202, HCC-1954, SKBR-3 i MFM-223 i MDA-MB-231 wykazano, że zahamowanie ekspresji PIP w każdym przypadku związane było z obniżeniem proliferacji (Naderi i wsp., 2014). Brak ekspresji PIP powodował zatrzymanie podziału komórek w fazie G1 albo M, zaburzenia w przebiegu cytokinezy i zmiany w ekspresji

genów związanych z cyklem komórkowym, szczególnie tych, które związane są bezpośrednio z fazą mitozy (Naderi i wsp., 2014). W przypadku komórek T47D i MDA-MB-453 zahamowanie ekspresji PIP manifestowało się 10 – 20% wzrostem populacji komórek w fazie G0/G1, co korelowało z obniżeniem ekspresji genów cyklin D1 i E1, a także obniżonym poziomem fosforylacji kinaz ERK1/2. Zdaniem Naderi i wsp. (2014), to właśnie zmniejszenie ekspresji cyklin D1 i E1 spowodowane zahamowaniem ekspresji PIP, powoduje wydłużenie fazy G1 w komórkach T47D i MDA-MB-453. Z kolei, w przypadku komórek MFM-223, SKBR3, HCC-1954, HCC-202 i BT-474 zahamowanie ekspresji PIP powodowało zatrzymanie komórek w fazie G2/M i znaczący wzrost odsetka komórek aneuploidalnych, co związane było ze spadkiem ekspresji genów *CCND1* i *CCNBI*, obniżeniem ekspresji całkowitego białka cdc2 jak i jego części ufosforylowanej. W oparciu o uzyskane wyniki autorzy zaproponowali, że w przypadku komórek raka gruczołu piersiowego, PIP zwiększa ich potencjał proliferacyjny poprzez promowanie progresji cyklu komórkowego, zwłaszcza podczas fazy mitotycznej, głównie jako regulator transkrypcji kluczowych genów dla tego procesu. Według ww. autorów, PIP zwiększa potencjał proliferacyjny komórek raka gruczołu piersiowego jako zewnątrzkomórkowa proteaza trawiąca fibronektynę na peptydy aktywujące szlaki sygnałowe z udziałem  $\beta$ 1- integryn (Naderi i Meyer, 2012). Obserwacje te, biorąc pod uwagę sposób przejściowego wyciszenia ekspresji PIP w wykorzystanych przez ww. autorów modelach komórkowych, mogą wskazywać iż PIP w istocie przejściowo wpływa na proliferację komórkową ale nie odgrywa on kluczowej roli w tym procesie. Aby to wykazać oba dostępne modele komórkowe: komórki MDA-231/PIP ze stabilną ekspresją PIP i komórki T47D puro/shPIP charakteryzujące się stabilnym zahamowaniem ekspresji PIP, wykorzystałam w celu określenia roli i udziału białka PIP w potencjale proliferacyjnym komórek raka gruczołu piersiowego. W przeciwieństwie do powyżej cytowanych autorów, zarówno w przypadku modelu funkcjonalnego jak i niefunkcjonalnego, nie stwierdziłam istotnych różnic w potencjale proliferacyjnym pomiędzy komórkami z ekspresją PIP a komórkami nie wytwarzającymi tego białka. Również nie stwierdziłam istotnych różnic w przebiegu cyklu komórkowego, odpowiednio, pomiędzy komórkami MDA-231/PIP i kontrolnymi komórkami MDA-231/PURO oraz komórkami T47D puro/shPIP i kontrolnymi komórkami T47D puro/ctrlsh zarówno po 24 jak i 48 godzinach. Niewielkie różnice, jakkolwiek nieistotne statystycznie obserwowano po 72 godzinach. Nie stwierdziłam ponadto różnic w

poziomie cykliny D1 i B1 ani aktywności kinazy ERK1/2 w wykorzystywanych przeze mnie modelach komórkowych z i bez ekspresji PIP.

Moje badania wskazują, że PIP nie odgrywa istotnej roli w progresji cyklu komórkowego a obserwowany efekt mitogenny tego białka przy przejściowym jego zahamowaniu, przy dłuższym jego braku może być kompensowany w komórce tak iż, różnic tych się nie obserwuje.

Co ciekawe, ostatnio pokazano, że w przypadku komórek nowotworów głowy i szyi, PIP ma działanie odwrotne, hamuje bowiem ich proliferację i zatrzymuje cykl komórkowy w fazie G0/G1 (Wang i wsp., 2018), co pozostaje w sprzeczności z pozostałymi autorami. Na dzień dzisiejszy nie sposób wyjaśnić skąd biorą się te niezgodności, a ich wytłumaczenie będzie wymagać kolejnych badań.

Pokazano, że PIP jest białkiem sekrecyjnym obecnym w retikulum endoplazmatycznym i cysternach aparatu golgiego (Mazoujian G i wsp.1984) jako glikoproteina o dużej zawartości N-glikanów (Rathman et al. 1989, Toth et al. 1988). Wykazano także, że specyficzny efekt mitogenny wobec komórek raka gruczołu piersiowego wykazuje oczyszczone białko PIP podane zewnątrzkomórkowo (Cassoni P i wsp., 1995). Stąd, w przeprowadzonych przeze mnie badaniach, analizowano wiązanie białka PIP do powierzchni komórek MDA-MB-231, które same nie wytwarzają białka PIP, a następnie sprawdzano, czy zewnątrzkomórkowy PIP wpływa na oporność tych komórek na apoptozę indukowaną doksorubicyną. Wykazano, że zarówno białko PIP wydzielane do nadsącza hodowlanego przez komórki MDA-MB-231/PIP, jak i oczyszczone rekombinowane białko PIP produkowane przez *Leishmania terantolae* wiążą się do powierzchni komórek MDA-MB-231. Pokazano również, że rekombinowany PIP wiąże się specyficznie do białka błonowego o masie cząsteczkowej około 55 kDa, które najprawdopodobniej reprezentuje receptor dla tego białka. Co więcej, rekombinowany PIP, z którym inkubowano komórki MDA-MB-231, zwiększał ich wrażliwość na apoptotyczne działanie doksorubicyny. Wszystkie te dane eksperymentalne dowodzą, że PIP, jako sekrecyjna glikoproteina, może działać na komórki zewnątrzkomórkowo.

Podsumowując, przeprowadzone przeze mnie badania potwierdziły wcześniejsze obserwacje kliniczne, wskazujące na udział białka PIP w oporności komórek raka gruczołu piersiowego na działanie cytostatyków (Jablonska i wsp., 2016) i po raz pierwszy pokazały, że jego obecność zwiększa wrażliwość tych komórek na apoptozę



indukowaną doksorubicyną, cyklofosfamidem i paklitakselem. Natomiast, nie potwierdzono roli białka PIP jako czynnika zwiększającego potencjał proliferacyjny komórek raka gruczołu piersiowego.

## Wnioski

1. Białko PIP zwiększa wrażliwość komórek raka gruczołu piersiowego na apoptozę indukowaną cytostatykami w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*.
2. Białko PIP nie zwiększa potencjału proliferacyjnego komórek raka gruczołu piersiowego, ani nie wpływa na przebieg cyklu komórkowego.
3. Białko PIP oddziałuje na komórki raka gruczołu piersiowego zewnątrzkomórkowo, wiążąc się prawdopodobnie do białka błonowego.

## Literatura

1. **Akiyama K** and Kimura H: Isolation of a new actin-binding protein from human seminal plasma. *Biochim Biophys Acta* 1040: 206-210, 1990.
2. **Autiero M**, Camarca A, Ciullo M, et al.: Intragenic amplification and formation of extrachromosomal small circular DNA molecules from the PIP gene on chromosome 7 in primary breast carcinomas. *Int J Cancer* 99: 370-377, 2002.
3. **Autiero M**, Cammarota G, Friedlein A, et al.: A 17-kDa CD4-binding glycoprotein present in human seminal plasma and in breast tumor cells. *Eur J Immunol* 25: 1461-1464, 1995.
4. **Autiero M**, Gaubin M, Mani JC, et al.: Surface plasmon resonance analysis of gp17, a natural CD4 ligand from human seminal plasma inhibiting human immunodeficiency virus type-1 gp120-mediated syncytium formation. *Eur J Biochem* 245: 208-213, 1997.
5. **Autiero M.**, Culerrier R, Bouchier C, Basmaciogullari S, Gaubin M, El Marhomy S, Blanchet P, Paradis V, Jardin A, Guardiola J, Piatier-Tonneau D.: Abnormal restriction pattern of PIP gene associated with human primary prostate cancers. *DNA Cell Biol.* 1999; 18: 481-7.
6. **Arcamone F.**, Cassinelli G., Fantini G., Grein A., Orezzi P., Pol C., Spalla C.: Adriamycin, 14-Hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var *caesius*. *Biotechnol Bioeng.* 1969; 11:1101-10.
7. **Arcamone F.**, Franceschi G., Orezzi P., Casinelli G., Barbieri W., Mondelli R.: Daunomycin I :The structure of daunomycinone . *J.Am.Chem.Soc.* 1964; 86: 5334.
8. **Baniwal SK**, Chinge NO, Jordan VC, Tripathy D and Frenkel B: Prolactin-induced protein (PIP) regulates proliferation of luminal A type breast cancer cells in an estrogen-independent manner. *PLoS One* 8: e62361, 2013.
9. **Baniwal SK**, Little GH, Chinge NO and Frenkel B: Runx2 controls a feed-forward loop between androgen and prolactin-induced protein (PIP) in stimulating T47D cell proliferation. *J Cell Physiol* 227: 2276-2282, 2012.
10. **Basmaciogullari S**, Autiero M, Culerrier R, et al.: Mapping the CD4 binding domain of gp17, a glycoprotein secreted from seminal vesicles and breast carcinomas. *Biochemistry* 39: 5332-5340, 2000.
11. **Blais Y.**, Sugimoto K, Carriere MC, Haagensen DE, Labrie F, Simard J.: Potent stimulatory effect of interleukin-1 alpha on apolipoprotein D and gross cystic disease fluid protein-15 expression in human breast cancer cells. *Int. J. Cancer.* 1994; 59: 400-7.
12. **Blais Y**, Sugimoto K, Carrière MC, Haagensen DE, Labrie F and Simard J: Interleukin-6 inhibits the potent stimulatory action of androgens, glucocorticoids and interleukin-1 alpha on apolipoprotein D and GCDFP-15 expression in human breast cancer cells. *Int J Cancer* 62: 732-737, 1995.
13. **Blais Y**, Zhao C, Huber M, Audette M, Labrie F and Poulin R: Growth-independent induction of spermidine transport by IL-4 and IL-13 in ZR-75-1 human breast cancer cells. *Int J Cancer* 67: 532-538, 1996.
14. **Blanchard A**, Nistor A, Castaneda FE, et al.: Generation and initial characterization of the prolactin-inducible protein (PIP) null mouse: accompanying global changes in gene expression in the submandibular gland. *Can J Physiol Pharmacol* 87: 859-872, 2009.
15. **Breckenridge D.G.**, Germain M., Mathai J.P., Nguyen M., Shore G.C.: Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways” *Oncogene* 22: 8608-18, 2003.
16. **Caputo E**, Autiero M, Mani JC, et al.: Differential antibody reactivity and CD4 binding of the mammary tumor marker protein GCDFP-15 from breast cyst and its counterparts from exocrine epithelia. *Int J Cancer* 78: 76-85, 1998.

17. **Caputo E**, Camarca A, Moharram R, et al.: Structural study of GCDFP-15/gp17 in disease versus physiological conditions using a proteomic approach. *Biochemistry* 42: 6169-6178, 2003.
18. **Caputo E**, Carratore V, Ciullo M, et al.: Biosynthesis and immunobiochemical characterization of gp17/GCDFP-15. A glycoprotein from seminal vesicles and from breast tumors, in HeLa cells and in *Pichia pastoris* yeast. *Eur J Biochem* 265: 664-670, 1999.
19. **Caputo E**, Manco G, Mandrich L and Guardiola J: A novel aspartyl proteinase from apocrine epithelia and breast tumors. *J Biol Chem* 275: 7935-7941, 2000.
20. **Carsol JL**, Gingras S and Simard J: Synergistic action of prolactin (PRL) and androgen on PRL-inducible protein gene expression in human breast cancer cells: a unique model for functional cooperation between signal transducer and activator of transcription-5 and androgen receptor. *Mol Endocrinol* 16: 1696-1710, 2002.
21. **Cassoni P**, Sapino A, Haagensen DE, Naldoni C and Bussolati G: Mitogenic effect of the 15-kDa gross cystic disease fluid protein (GCDFP-15) on breast-cancer cell lines and on immortal mammary cells. *Int J Cancer* 60: 216-220, 1995.
22. **Chaires J.B.**, Satyanarayana S., Suh D., Fokt I., Przewloka T., Priebe W.: Parsing the free energy of anthracycline antibiotic binding to DNA. *Biochemistry*, 1996; 35 :2047-53.
23. **Chia SY**, Thike AA, Cheok PY and Tan PH: Utility of mammaglobin and gross cystic disease fluid protein-15 (GCDFP-15) in confirming a breast origin for recurrent tumors. *Breast* 19: 355-359, 2010.
24. **Chiu WW** and Chamley LW: Human seminal plasma prolactin-inducible protein is an immunoglobulin G-binding protein. *J Reprod Immunol* 60: 97-111, 2003.
25. **Chen K.L.**, Li L., Yang FX., Li CM., Wang YR., Wang GL.: SIRT7 depletion inhibits proliferation, migration, and increases drug sensitivity and activating p38MAPK in breast cancer cells. *J. Cell Physiol.* 2018, 233:6767-6778.
26. **Ciullo M**, Debily MA, Rozier L, et al.: Initiation of the breakage-fusion-bridge mechanism through common fragile site activation in human breast cancer cells: the model of PIP gene duplication from a break at FRA7I. *Hum Mol Genet* 11: 2887-2894, 2002.
27. **Clark JW**, Snell L, Shiu RP, et al.: The potential role for prolactin-inducible protein (PIP) as a marker of human breast cancer micrometastasis. *Br J Cancer* 81: 1002-1008, 1999.
28. **Collette J**, Hendrick JC, Jaspas JM and Franchimont P: Presence of alpha-lactalbumin, epidermal growth factor, epithelial membrane antigen, and gross cystic disease fluid protein (15,000 daltons) in breast cyst fluid. *Cancer Res* 46: 3728-3733, 1986.
29. **Czabotar P.E.**, Lessene G., Strasser A., Adams J.M.: Control of apoptosis by the BCL -2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014, 15 (1), 49–63
30. **Dai X**, Cheng H, Bai Z and Li J: Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *J Cancer* 8: 3131-3141, 2017.
31. **Damiani RM.**, Moura DJ., Viau CM., Caceres RA., Henriques JAP., Saffi J.: Pathways of cardiac toxicity: comparison between chemotherapeutic drugs doxorubicin and mitoxantrone. *Arch. Toxicol.* 2016; 90: 2063-2076.
32. **Darb-Esfahani S**, von Minckwitz G, Denkert C, et al.: Gross cystic disease fluid protein 15 (GCDFP-15) expression in breast cancer subtypes. *BMC Cancer* 14: 546, 2014.
33. **Dauvois S**, Simard J, Dumont M, Haagensen DE and Labrie F: Opposite effects of estrogen and the progestin R5020 on cell proliferation and GCDFP-15 expression in ZR-75-1 human breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 73: 171-178, 1990.
34. **Debily MA**, Marhomy SE, Boulanger V, et al.: A functional and regulatory network associated with PIP expression in human breast cancer. *PLoS One* 4: e4696, 2009.

35. **Delavallee L.**, Cabon L., Galán-Malo P, Lorenzo HK, Susin SA.: AIF mediated caspase independent necroptosis a new chance for targeted therapeutics. *IUBMB Life*. 2011; 63: 221-32.
36. **Demehri S**, Cunningham TJ, Manivasagam S, et al.: Thymic stromal lymphopoietin blocks early stages of breast carcinogenesis. *J Clin Invest* 126: 1458-1470, 2016.
37. **Deveraux QL** and Reed JC. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13: 239–252.
38. **Di Marco A.**, Gaetani M., Orezzi P., Scarpinato BM., Slivestrini R., Soldati M., Dasdia T., Valentini L.: Daunomycin a New antibiotic of the Rhodomycin grup. *Nature*, 1964; 201: 706-707.
39. **Du C**, Fang M, Li Y, Wnag X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrom c - dependent caspase activation during apoptosis. *Cell*. 2000; 102: 33-42.
40. **Edechi C.A.**: Development of transplantable mouse models to assess the role of prolactin inducible protein in breast tumorigenesis. 2019 a praca magisterska opublikowana na <https://mspace.lib.umanitoba.ca/handle/1993/34307>.
41. **Edechi C.A.**, Ikeogu N., Uzonna JE., Myal Y.: Regulation of immunity in Breast cancer. *Cancer (Basel)*, 2019 b ;11(8).
42. **Edechi CA.**, Nasr MR., Karim A., Blanchard AA., Ellison CA., Qui H., Uzonna JE., Myal Y.: The prolactin inducible protein/gross cystic disease fluid protein-15 deficient mice develop anomalies in lymphoid organs. *Immunobiology*. 2019 c; 224:811-816.
43. **Emens LA**: Breast cancer immunobiology driving immunotherapy: vaccines and immune checkpoint blockade. *Expert Rev Anticancer Ther* 12: 1597-1611, 2012.
44. **Engel T.**, Henshall D.C.: Apoptosis, Bcl -2 family proteins and caspases: The ABCs of seizure -damage and epileptogenesis? *Int J Physiol Patophysiol Pharmacol*. 2009, 1 (2), 97–115.
45. **Filip LC** and Mundy NI: Rapid evolution by positive Darwinian selection in the extracellular domain of the abundant lymphocyte protein CD45 in primates. *Mol Biol Evol* 21: 1504-1511, 2004.
46. **Fulda S.**, Debatin K.M.: Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. 2006, 25 (34), 4798–4811.
47. **Frizsche FR.**, Thomas A., Winzer K.J., Beyer B., Dankof A., Bellach J., Dahl E., Dietel M., Kristiansen G.: Co-expression and prognostic value of gross cystic disease fluid protein 15 and mammoglobin in primary breast cancer. *Histol. Histopathol*.2007; 22: 1221-30.
48. **Gangadharan A.**, Nyirenda T., Patel K., Jaimes-Delgadillo N., Coletta D., Tanaka T., Walland AC., Jameel Z., Vedantam S., Tang S., Mannion C., Lee GY., Goy A., Pecora A., Suh KS.: Prolactin Induced Protein (PIP) is a potential biomarker for erly stage and malignant breast cancer. *Breast*. 2018 , 38:101-109.
49. **Gaubin M**, Autiero M, Basmaciogullari S, et al.: Potent inhibition of CD4/TCR-mediated T cell apoptosis by a CD4-binding glycoprotein secreted from breast tumor and seminal vesicle cells. *J Immunol* 162: 2631-2638, 1999.
50. **Gniazdowski M.**, Denny W.A., Nelson SM., Czyz M.: Transcription factors as targets for DNA-interacting drugs. *Curr.Med. Chem*. 2003, 10:909-24.
51. **Green D.R.**, Llambi F.: Cell death signaling. 2015; 7(12).
52. **Greenberg A.H.**: Granzyme B -induced apoptosis. In: *Mechanisms of lymphocyte activation and immune regulation VI*. Eds: S. Gupta, J.J. Cohen.Springer, New York 1996, 219–228.
53. **Haagensen DE**, Dilley WG, Mazoujian G and Wells SA: Review of GCDFFP-15. An apocrine marker protein. *Ann N Y Acad Sci* 586: 161-173, 1990.

54. **Haagensen DE**, Gall SA, Brazy JE, Giannola J and Wells SA: Analysis of amniotic fluid, maternal plasma, and cord blood for a human breast gross cystic disease fluid protein. *Am J Obstet Gynecol* 138: 25-32, 1980.
55. **Haagensen DE**, Mazoujian G, Dilley WG, Pedersen CE, Kister SJ and Wells SA: Breast gross cystic disease fluid analysis. I. Isolation and radioimmunoassay for a major component protein. *J Natl Cancer Inst* 62: 239-247, 1979.
56. **Häcker G.**: The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* 2000, 301 (1), 5–17
57. **Hähnel R** and Hähnel E: Expression of the PIP/GCDFP-15 gene and survival in breast cancer. *Virchows Arch* 429: 365-369, 1996.
58. **Hallett RM.**, Pond G., Hassell JA.: A target based approach identifies genomic predictors of breast cancer patient response to chemotherapy. *BMC Med Genomics*, 5: 16. 2012.
59. **Hassan MI**, Bilgrami S, Kumar V, et al.: Crystal structure of the novel complex formed between zinc alpha2-glycoprotein (ZAG) and prolactin-inducible protein (PIP) from human seminal plasma. *J Mol Biol* 384: 663-672, 2008.
60. **Hassan MI**, Waheed A, Yadav S, Singh TP and Ahmad F: Prolactin inducible protein in cancer, fertility and immunoregulation: structure, function and its clinical implications. *Cell Mol Life Sci* 66: 447-459, 2009.
61. **Higdon R**, Stewart E, Stanberry L, et al.: MOPED enables discoveries through consistently processed proteomics data. *J Proteome Res* 13: 107-113, 2014.
62. **Hofmann K.**: The evolutionary origins of programmed cell death signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2019 Dec 9.
63. **Ihedioha OC**, Shiu RP, Uzonna JE and Myal Y: Prolactin-Inducible Protein: From Breast Cancer Biomarker to Immune Modulator-Novel Insights from Knockout Mice. *DNA Cell Biol* 35: 537-541, 2016.
64. **Jablonska K**, Grzegorzolka J, Podhorska-Okolow M, et al.: Prolactin-induced protein as a potential therapy response marker of adjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Am J Cancer Res* 6: 878-893, 2016.
65. **Jansen R.**, Embden J.D., Gaastra W., Schouls L.M.: Identification of that are associated with DNA repeats in procaryotes. *Mol. Microbiol.*43: 1565-75. 2002.
66. **Jawad B.**, Poudel L., Podgornik R.,Steinmetz NF., Ching W.Y.:Molecular mechanism and binding free energy of doxorubicin intercalation in DNA. *Phys. Chem chem Phys.* 2019, 21:3877-3893.
67. **Kitano T**, Tian W, Umetsu K, et al.: Origin and evolution of gene for prolactin-induced protein. *Gene* 383: 64-70, 2006.
68. **Kerr J.**, Wyllie AH., Currie AR.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br.J. Cancer.* 1972; 26:239-57.
69. **Kulms D.**, Schwarz T.: Molecular Mechanisms of UV-induced apoptosis.*Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2000; 16:195-201.
70. **Kumar S**, Tomar AK, Singh S, Saraswat M, Singh TP and Yadav S: Human serum albumin as a new interacting partner of prolactin inducible protein in human seminal plasma. *Int J Biol Macromol* 50: 317-322, 2012.
71. **Laemmli UK.**:Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 227: 680-5.
72. **Laponite J.**, Fournier A., Richard V., Labrie C.: Androgens down-regulate bcl-2 protooncogene expression in ZR-75-1 human breast cancer cells. *Endocrinology* 140: 416-21. 1999
73. **Lee B**, Bowden GH and Myal Y: Identification of mouse submaxillary gland protein in mouse saliva and its binding to mouse oral bacteria. *Arch Oral Biol* 47: 327-332, 2002.

74. **Lehmann-Che J**, Hamy AS, Porcher R, et al.: Molecular apocrine breast cancers are aggressive estrogen receptor negative tumors overexpressing either HER2 or GCDFP15. *Breast Cancer Res* 15: R37, 2013.
75. **Li J**, Liu D, Mou Z, et al.: Deficiency of prolactin-inducible protein leads to impaired Th1 immune response and susceptibility to *Leishmania major* in mice. *Eur J Immunol* 45: 1082-1091, 2015.
76. **Liu J.**, Huang Y., Liu Y., Chen Y.: Irisin enhances Doxorubicin-induced cell apoptosis in pancreatic cancer by inhibiting the PI3K/AKT/NFκB pathway. *Med.Sci Monit.*2019 25: 6085-6096.
77. **Loos S**, Schulz KD and Hackenberg R: Regulation of GCDFP-15 expression in human mammary cancer cells. *Int J Mol Med* 4: 135-140, 1999.
78. **Mazoujian G**, Bodian C, Haagensen DE and Haagensen CD: Expression of GCDFP-15 in breast carcinomas. Relationship to pathologic and clinical factors. *Cancer* 63: 2156-2161, 1989.
79. **Mazoujian G**, Pinkus GS, Davis S and Haagensen DE: Immunohistochemistry of a gross cystic disease fluid protein (GCDFP-15) of the breast. A marker of apocrine epithelium and breast carcinomas with apocrine features. *Am J Pathol* 110: 105-112, 1983.
80. **Mazoujian G**, Warhol MJ and Haagensen DE: The ultrastructural localization of gross cystic disease fluid protein (GCDFP-15) in breast epithelium. *Am J Pathol* 116: 305-310, 1984.
81. **Mishmar D.**, Rahat A, Scherer SW, Nyakatura G, Hinzmann B, Kohwi Y, Mandel-Gutfroind Y, Lee JR, Drescher B, Sas DE, Margalit H, Platzer M, Weiss A, Tsui LC, Rosenthal A, Kerem B.: Molecular characterization of a common fragile site (FRA7H) on human chromosome 7 by the cloning of a simian virus 40 integration site. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 ;95:8141-6.
82. **Murphy LC**, Tsuyuki D, Myal Y and Shiu RP: Isolation and sequencing of a cDNA clone for a prolactin-inducible protein (PIP). Regulation of PIP gene expression in the human breast cancer cell line, T-47D. *J Biol Chem* 262: 15236-15241, 1987.
83. **Myal Y**, Iwasiow B, Cosby H, et al.: Analysis of tissue- and hormone-specific regulation of the human prolactin-inducible protein/gross cystic disease fluid protein-15 gene in transgenic mice. *J Mol Endocrinol* 21: 217-223, 1998.
84. **Myal Y**, Iwasiow B, Yarmill A, Harrison E, Paterson JA and Shiu RP: Tissue-specific androgen-inhibited gene expression of a submaxillary gland protein, a rodent homolog of the human prolactin-inducible protein/GCDFP-15 gene. *Endocrinology* 135: 1605-1610, 1994.
85. **Myal Y**, Robinson DB, Iwasiow B, Tsuyuki D, Wong P and Shiu RP: The prolactin-inducible protein (PIP/GCDFP-15) gene: cloning, structure and regulation. *Mol Cell Endocrinol* 80: 165-175, 1991.
86. **Naderi A** and Meyer M: Prolactin-induced protein mediates cell invasion and regulates integrin signaling in estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Res* 14: R111, 2012.
87. **Naderi A** and Vanneste M: Prolactin-induced protein is required for cell cycle progression in breast cancer. *Neoplasia* 16: 329-342.e321-314, 2014.
88. **Naderi A**: Prolactin-induced protein in breast cancer. *Adv Exp Med Biol* 846: 189-200, 2015.
89. **Napoli C.**, Lemieux R., Jorgensen.: Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results reversible co-suppression of homologous gene in trans. *Plant Cell* 1990, 2: 279-289.

90. **Nistor A**, Bowden G, Blanchard A and Myal Y: Influence of mouse prolactin-inducible protein in saliva on the aggregation of oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 24: 510-513, 2009.
91. **Ola M.S.**, Nawaz M., Ahsan H.: Role of Bcl -2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem.* 2011, 351 (1 -2), 41–58.
92. **Osawa M**, Horiuchi H, Tian W and Kaneko M: Divergent evolution of the prolactin-inducible protein gene and related genes in the mouse genome. *Gene* 325: 179-186, 2004.
93. **Osawa M**, Seto Y, Yukawa N, Saito T and Takeichi S: A 20-kDa protein in human seminal plasma that is identical to gross cystic disease fluid protein 15 and prolactin-inducible protein. *Arch Androl* 36: 29-39, 1996.
94. **Pagani A**, Sapino A, Eusebi V, Bergnolo P and Bussolati G: PIP/GCDFP-15 gene expression and apocrine differentiation in carcinomas of the breast. *Virchows Arch* 425: 459-465, 1994.
95. **Pasquinelli R**, Barba P, Capasso I, et al.: Circulating antibodies against the breast tumor marker GCDFP-15/gp17 in mammary carcinoma patients and in patients carrying benign breast conditions. *Int J Cancer* 84: 568-572, 1999.
96. **Petros WP.**, Evans W.E.: Pharmacogenomics in cancer therapy: is host genome variability important? *Trends. Pharmacol. Sci.*, 2004; 25: 457- 64.
97. **Pilco-Ferreto N.**, Calaf GM.: Influence of doxorubicin on apoptosis and oxidative stress in breast cancer cell lines. *Int. J. Oncol.* 2016;49:753-62.
98. **Pistritto G.**, Trisciuglio D., Ceci C., Garufi A., D'Orazi G.: Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutics strategies. *Aging (Albany NY)*, 2016; 8:603-19.
99. **Rathman WM**, Van Zeyl MJ, Van den Keybus PA, Bank RA, Veerman EC and Nieuw Amerongen AV: Isolation and characterization of three non-mucinous human salivary proteins with affinity for hydroxyapatite. *J Biol Buccale* 17: 199-208, 1989.
100. **Rathore R.**, McCallum J.E., Varghese E., Florea A.M., Büsselberg D.: Overcoming chemotherapy drug resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins (IAPs). *Apoptosis*, 2017; 22; 898-919.
101. **Samani FS.**, Moore JK., Khosravani P., Ebrahimi M.: Features of free software packages in flow cytometry: a comparison between four non-commercial software sources. *Cytotechnology*. Springer; 2014;66: 555–9. doi:10.1007/s10616-013-9609-8.
102. **Sayers T.J.:** Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2011, 60 (8), 1173–1180.
103. **Schaller J**, Akiyama K, Kimura H, Hess D, Affolter M and Rickli EE: Primary structure of a new actin-binding protein from human seminal plasma. *Eur J Biochem* 196: 743-750, 1991.
104. **Schenkels LC**, Walgreen-Weterings E, Oomen LC, Bolscher JG, Veerman EC and Nieuw Amerongen AV: In vivo binding of the salivary glycoprotein EP-GP (identical to GCDFP-15) to oral and non-oral bacteria detection and identification of EP-GP binding species. *Biol Chem* 378: 83-88, 1997.
105. **Sciarra A**, Lopez G, Corti C, et al.: Columnar Cell Lesion and Apocrine Hyperplasia of the Breast: Is There a Common Origin? The Role of Prolactin-induced Protein. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2017.
106. **Shin S**, Sung BJ, Cho YS i wsp. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and-7. *Biochemistry* 2001; 40(4): 1117-23
107. **Shiu RP** and Iwasiow BM: Prolactin-inducible proteins in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 260: 11307-11313, 1985.



108. **Simard J**, Hatton AC, Labrie C, et al.: Inhibitory effect of estrogens on GCDFP-15 mRNA levels and secretion in ZR-75-1 human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 3: 694-702, 1989.
109. **Simeoni M.**, Magni P., Cammia C., Nicolao G., Croci V., Pesenti E., Germani M., Poggesi I., Rocchetti M.: Predictive pharmacokinetic- Pharmacodynamic modeling of tumour growth kinetic in xenografts models after administration of anticancer agents. *Cancer Res.* 64: 1094-1101.
110. **Smith P.K.**, Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. *Anal. Biochem.* 1985; 150: 76–85.
111. **Sreenivasappa H**, Chaki S.P, Lim S.M, Trzeciakowski J.P, Davidson M.W, Rivera G.M, Trache A.: Selective regulation of cytoskeletal tension and cell matrix adhesion by RhoA and src. *Integr. Biol.* 6: 713, 2014.
112. **Taatjes D.J.**, Gaudiano G., Koch T.H.: Production of formaldehyde and DNA-adriamycin or DNA-daunomycin adducts, initiated through redox chemistry of dithiothreitol/iron, xanthine oxidase/NADH/iron, or glutathione/iron. *Chem. Res. Toxicol.* 1997, 10: 953-61.
113. **Taatjes D.J.**, Gaudiano G., Resing K., Koch TH.: Alkylation of DNA by the anthracycline, antitumour drugs adriamycin and daunomycin. *J. Med. Chem.* 1996; 39: 4135-8.
114. **Taatjes D.J.**, Fenick D.J., Koch T.H.: Nuclear targeting and nuclear retention of anthracycline-formaldehyde conjugates implicates DNA covalent binding in the cytotoxic mechanism of anthracyclines. *Chem. Res. Toxicol.* 1999;12:588-96.
115. **Tellam RL**, Morton DJ and Clarke FM: A common theme in the amino acid sequences of actin and many actin-binding proteins? *Trends Biochem Sci* 14: 130-133, 1989.
116. **Tian W**, Osawa M, Horiuchi H and Tomita Y: Expression of the prolactin-inducible protein (PIP/GCDFP15) gene in benign epithelium and adenocarcinoma of the prostate. *Cancer Sci* 95: 491-495, 2004.
117. **Toth CA**, Haagensen DE, Davis S, Zamcheck N and Thomas P: Hepatic clearance and metabolism in the rat of a human breast cancer associated glycoprotein (GCDFP-15). *Breast Cancer Res Treat* 12: 235-243, 1988.
118. **Travers K.J.**, Patil C.K., Wodicka L., Lockhart D.J., Weissman J.S., Walter P.: Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* 101: 249-258, 2000.
119. **Urbaniak A.**, Jablonska K, Podhorska-Okolow M, Ugorski M, Dziegiel P.: Prolactin induced protein (PIP) - characterization and role in cancer progression. *Am.J.Cancer.* 2018; 8: 2150-2164.
120. **Vanneste M** and Naderi A: Prolactin-Induced Protein regulates cell adhesion in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 468: 850-856, 2015.
121. **Vydra N.**, Malusecka E., Jarzab M., Lisowska A., Glowala-Kosinska M., Benedyk K., Widlak P., Krawczyk Z., Widlak W.: Spermatocyte-specific expression of constitutively active heat shock factor 1 induces HSP70i-resistant apoptosis in male germ cells. *Cell Death and Differentiation* 2006;13: 212-222.
122. **Wiegandt A.**, Behnken HN., Meyer B.: Unusual N-type glycosylation of salivary prolactin induced protein (PIP): multiple Lewis<sup>Y</sup> epitopes generate high fucosylated glycan structures. *Glycoconj. J.* 2018; 35(3):323-332.
123. **Wilson GD.**: A new look at proliferation. *Acta Oncol.* 40: 989-94, 2001.
124. **Windass JD.**, Mullins JJ, Beecroft LJ, et al.: Molecular cloning of cDNAs from androgen-independent mRNA species of DBA/2 mouse sub-maxillary glands. *Nucleic Acids Res* 12: 1361-1376, 1984.

125. **Xie YL**, Hassan SA, Qazi AM, Tsai-Morris CH and Dufau ML: Intramolecular disulfide bonds of the prolactin receptor short form are required for its inhibitory action on the function of the long form of the receptor. *Mol Cell Biol.* 2009; 29: 2546-2555.

### 1) Sekwencja kodująca ludzkiego białka PIP

**NM\_002652.3 Homo sapiens prolactin induced protein (PIP), mRNA**

```
ACCACTTCTCTGGGACACATTGCCTTCTGTTTCTCCAGCATGCGCTTGCTCCAGCTCCTGTTCAAGG
CCAGCCCTGCCACCCTGCTCCTGGTTCTCTGCCTGCAGTTGGGGGCAACAAAGCTCAGGACAACA
CTCGGAAGATCATAATAAAGAATTTGACATTCCAAGTCAGTACGTCCAAATGACGAAGTCACTGC
AGTGCTTGCAAGTTCAAACAGAATTGAAAGAATGCATGGTGGTTAAAACTTACCTCATTAGCAGCATC
CCTCTACAAGGTGCATTTAACTATAAGTATACTGCCTGCCTATGTGACGACAATCCAAAAACCTTCTA
CTGGGACTTTTACACCAACAGAAGTGTGCAAATTGCAGCCGTCGTTGATGTTATTCGGGAATTAGGC
ATCTGCCCTGATGATGCTGCTGTAATCCCCATCAAAAAACAACCGGTTTTATACTATTGAAATCCTAAA
GGTAGAATAATGGAAGCCCTGTCTGTTGCCACACCCAGGTGATTCCTCTAAAGAACTTGGCTGG
AATTTCTGCTGTGGTCTATAAAATAAACTTCTTAACATGC
```

### 2) Sekwencja ludzkiego białka PIP

**NP\_002643.1 146aa**

```
MRLQLLFRASPATLLLVLCQLGANKAQDNTRKIIKNFDIPKSVRPNDEVTA
VAVLAVQTELKECMVVKTYLISSIPLQGFNYKYTACLDDNPKTFYWDFYTNRT
VQIAAVVDVIRELGICPDAAVPIKNNRFYTI EILKVE
```

**1-28 peptyd sygnałowy**