

Uniwersytet Medyczny
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Wydział Nauk o Zdrowiu

Aleksandra Głodek

**Szlaki sygnałne indukowane przez podjednostkę beta
ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej
w komórkach nowotworowych**

Praca doktorska
wykonana pod kierunkiem
dr hab. Anny Jankowskiej, prof. UM
w Katedrze i Zakładzie Biologii Komórki

Poznań 2013

Spis treści

1. Wstęp	12
1.1. Budowa i ekspresja ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej i jej podjednostek	12
1.2. Rola ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej i jej podjednostek	18
1.3. Mechanizmy działania ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej	21
1.4. Szlak kinazy ERK	23
1.5. Szlak kinazy AKT	26
2. Cel pracy	31
3. Materiały i metody	32
3.1. Materiał	32
3.2. Metody	32
3.2.1. Hodowla komórek	32
3.2.2. Przygotowanie wektora kodującego gen <i>CGB5</i>	32
3.2.2.1. Odwrotna transkrypcja	33
3.2.2.2. Amplifikacja genu <i>CGB5</i>	33
3.2.2.3. Cięcie enzymami restrykcyjnymi i ligacja	35
3.2.3. Transformacja komórek kompetentnych wektorem kodującym gen <i>CGB5</i>	36
3.2.4. Namnażanie wektora kodującego gen <i>CGB5</i>	37
3.2.5. Transfekcja komórek linii OVCAR-3 i SKOV-3	38
3.2.6. Analiza ekspresji genów na poziomie mRNA	39
3.2.6.1. Izolacja całkowitego RNA	39
3.2.6.2. Odwrotna transkrypcja	39
3.2.6.3. qPCR	40
3.2.7. Ocena wpływu rekombinowanego białka podjednostki beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (rCGB) na komórki linii OVCAR-3 i SKOV-3	43

3.2.8. Ocena wpływu rekombinowanego białka podjednostki beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (rCGB) na komórki linii OVCAR-3 i SKOV-3 z jednoczesnym zablokowaniem kinaz MEK i PI3K	44
3.2.9. Analiza aktywności wybranych genów na poziomie białka i poziomu fosforylacji kinaz ERK i AKT	44
3.2.9.1. Izolacja białek	44
3.2.9.2. Elektroforetyczny rozdział i transfer białek	45
3.2.10. Ocena cyklu życiowego komórek z zastosowaniem techniki cytometrii przepływowej	46
3.2.11. Barwienie fluorescencyjne komórek OVCAR-3 i SKOV-3 z zastosowaniem barwników Hoechst 33342 i jodku propidionowego	47
3.2.12. Ocena wzrostu liczby komórek transfekowanych genem <i>CGB5</i> w czasie rzeczywistym	47
4. Wyniki	49
4.1. Ocena stopnia nadekspresji <i>CGB</i> w transfekowanych genem <i>CGB5</i> komórkach OVCAR-3 i SKOV-3	50
4.1.1. Ocena stopnia nadekspresji <i>CGB</i> w transfekowanych genem <i>CGB5</i> komórkach OVCAR-3	50
4.1.2. Ocena stopnia nadekspresji <i>CGB</i> w transfekowanych genem <i>CGB5</i> komórkach SKOV-3	52
4.2. Ocena ekspresji genów kodujących podjednostkę alfa gonadotropiny kosmówkowej (<i>CGA</i>) oraz receptora dla hormonu luteinizującego i gonadotropiny kosmówkowej (<i>LHCGR</i>) w komórkach OVCAR-3 i SKOV-3 transfekowanych genem <i>CGB5</i>	53
4.2.1. Ocena ekspresji <i>CGA</i> i <i>LHCGR</i> w transfekowanych genem <i>CGB5</i> komórkach OVCAR-3	53
4.2.2. Ocena ekspresji <i>CGA</i> i <i>LHCGR</i> w transfekowanych genem <i>CGB5</i> komórkach SKOV-3	54
4.3. Ocena ekspresji kinaz białkowych ERK i AKT w komórkach OVCAR-3 i SKOV-3 poddanych transfekcji genem <i>CGB5</i>	55
4.3.1. Ocena wpływu nadekspresji <i>CGB</i> na poziom kinazy ERK w komórkach linii OVCAR-3	55
4.3.2. Ocena wpływu nadekspresji <i>CGB</i> na poziom kinazy AKT w komórkach linii OVCAR-3	56
4.3.3. Ocena wpływu nadekspresji <i>CGB</i> na poziom kinazy ERK w komórkach linii SKOV-3	58

4.3.4. Ocena wpływu nadekspresji <i>CGB</i> na poziom kinazy AKT w komórkach linii SKOV-3	59
4.4. Ocena wpływu nadekspresji <i>CGB</i> na biologię komórek OVCAR-3 i SKOV-3	61
4.4.1. Ocena wpływu nadekspresji <i>CGB</i> na cykl życiowy komórek linii OVCAR-3	61
4.4.2. Ocena wpływu nadekspresji <i>CGB</i> na przyrost liczby komórek linii OVCAR-3	62
4.4.3. Ocena wpływu nadekspresji <i>CGB</i> na apoptozę i nekrozę komórek linii OVCAR-3	63
4.4.4. Ocena wpływu nadekspresji <i>CGB</i> na poziom ekspresji genu markera proliferacji <i>MKI67</i> i genów kodujących czynniki regulujące apoptozę komórek: <i>BCL2</i> , <i>BAX</i> i <i>BIRC5</i> w komórkach linii OVCAR-3	64
4.4.5. Ocena wpływu nadekspresji <i>CGB</i> na cykl życiowy komórek linii SKOV-3	66
4.4.6. Ocena wpływu nadekspresji <i>CGB</i> na przyrost liczby komórek linii SKOV-3	67
4.4.7. Ocena wpływu nadekspresji <i>CGB</i> na apoptozę i nekrozę komórek linii SKOV-3	68
4.4.8. Ocena wpływu nadekspresji <i>CGB</i> na poziom ekspresji genu markera proliferacji <i>MKI67</i> i genów kodujących czynniki regulujące apoptozę komórek: <i>BCL2</i> , <i>BAX</i> i <i>BIRC5</i> w komórkach linii SKOV-3	68
4.5. Ocena wpływu nadekspresji <i>CGB</i> na aktywację kinaz ERK i AKT w komórkach linii OVCAR-3 i SKOV-3	70
4.5.1. Aktywacja kinaz ERK w transfekowanych komórkach linii OVCAR-3	70
4.5.2. Aktywacja kinaz AKT w transfekowanych komórkach linii OVCAR-3	71
4.5.3. Aktywacja kinazy ERK w transfekowanych komórkach linii SKOV-3	72
4.5.4. Aktywacja kinazy AKT w transfekowanych komórkach linii SKOV-3	73
4.6. Ocena aktywacji kinaz ERK i AKT w komórkach linii OVCAR-3 i SKOV-3 pod wpływem inkubacji komórek z rekombinowaną podjednostką beta gonadotropiny kosmówkowej	74
4.6.1. Wpływ rCGB na aktywację kinazy ERK w komórkach linii OVCAR-3	74
4.6.2. Wpływ rCGB na aktywację kinazy AKT w komórkach linii OVCAR-3	75
4.6.3. Wpływ rCGB na aktywację kinazy ERK w komórkach linii SKOV-3	75
4.6.4. Wpływ rCGB na aktywację kinazy AKT w komórkach linii SKOV-3	76

4.7. Ocena aktywacji kinaz ERK i AKT w komórkach linii OVCAR-3 i SKOV-3 pod wpływem rekombinowanej podjednostki beta CG w obecności inhibitorów kinaz MEK (U0126) i PI3K (LY294002)	77
4.7.1. Stymulacja komórek linii OVCAR-3 rCGB z zablokowaniem kinazy MEK	77
4.7.2. Stymulacja komórek linii OVCAR-3 rCGB z zablokowaniem kinazy PI3K	77
4.7.3. Stymulacja komórek linii SKOV-3 rCGB z zablokowaniem kinazy MEK	78
4.7.4. Stymulacja komórek linii SKOV-3 rCGB z zablokowaniem kinazy PI3K	78
5. Dyskusja	80
6. Wnioski	100
7. Bibliografia	101
8. Streszczenie	118
9. Summary	120

Wykaz skrótów stosowanych w pracy

skrót	opis (ang.)	opis (pol.)
2RA	human transformed lung fibroblasts	ludzkie transformowane fibroblasty wywodzące się z płuc
AC	adenylate cyclase	cyklaza adenylanowa
AKAP	cAMP-dependent protein kinase (A-kinase) anchoring proteins	cAMP-zależne białko kotwiczące kinazę A
AKAP18 γ	cAMP-dependent protein kinase (A-kinase) anchoring protein 18 γ	cAMP-zależne białko 18 γ kotwiczące kinazę A
AKAP250	cAMP-dependent protein kinase (A-kinase) anchoring protein 250	cAMP-zależne białko 250 kotwiczące kinazę A
AKAP350	cAMP-dependent protein kinase (A-kinase) anchoring protein 350	cAMP-zależne białko 350 kotwiczące kinazę A
AKAP79	cAMP-dependent protein kinase (A-kinase) anchoring protein 79	cAMP-zależne białko 79 kotwiczące kinazę A
AKAP95	cAMP-dependent protein kinase (A-kinase) anchoring protein 95	cAMP-zależne białko 95 kotwiczące kinazę A
AKT1 (PKB α),	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase1	kinaza białkowa B, izoforma α
AKT2 (PKB β)	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase2	kinaza białkowa B, izoforma β
AKT3 (PKB γ)	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase3	kinaza białkowa B, izoforma γ
AP1	activator protein 1	czynnik transkrypcyjny AP1
AP2	activator protein 2	czynnik transkrypcyjny AP2
AP-2 α	activator protein-2 α	czynnik transkrypcyjny AP-2 α
ATF-1	activating transcription factor 1	czynnik transkrypcyjny ATF-1
BAD	BCL-associated death promoter	białko proapoptotyczne należące do rodziny białek BCL
BAK	Bcl-2 antagonist <i>killer</i> 1	białko inhibujące apoptozę z rodziny białek BCL
BAX	Bcl-2 associated protein X	białko apoptotyczne należące do rodziny białek BCL
BCL	B-cell lymphoma	białka inhibitorowe apoptozy z rodziny białek BCL, z rodziny białek BCL
BCL2	B-cell lymphoma 2	białko inhibitorowe apoptozy
BCLW (BCL2L2)	Bcl-2-like protein 2	białko antyapoptotyczne należące do rodziny BCL
BCIXL	B-cell lymphoma-extra large	białko antyapoptotyczne należące do rodziny białek BCL
BIM	Bcl-2 interacting mediator of cell death	białko proapoptotyczne należące do rodziny BCL
BIP	binding immunoglobulin protein	opiekuńcze białko wiążące z rodziny Hsp70

skrót	opis (ang.)	opis (pol.)
BIRC5	baculoviral IAP repeat-containing protein 5	gen kodujący białko surwiwinę
BOK	BCL2-related ovarian killer	białko proapoptotyczne należące do rodziny BCL-2
cAMP	cyclic adenosinomonophosphate	cykliczny adenozymonofosforan
CBT	canine brain tumor cell lines	linia komórkowa glejaka mózgu
CDK4	cyclin-dependent kinase 4	kinaza 4. zależna od cyklin
CDKs	cyclin-dependent kinases	kinazy zależne od cyklin
C-FOS	proto-oncogene proteins involved in growth related transcriptional control	protoonkogen, czynnik transkrypcyjny C-FOS
CG	human chorionic gonadotropin	ludzka gonadotropina kosmówkowa
CGBcf	CGB core fragment	fragment korowy CGB
CGn	nicked chorionic gonadotropin	„nacięta” gonadotropina kosmówkowa
C-JUN	proto-oncogene and transcription factor	protoonkogen , czynnik transkrypcyjny C-JUN
COS-7	green monkey kidney fibroblast-like cell line	linia komórkowa fibroblastów z nerki małpy zielonej
COX2	cyclooxygenase-2	cyklooksygenaza
Cr	concentration ratio	stosunek natężenia ekspresji genu badanego względem ekspresji genu referencyjnego
CRE	cAMP-responsive element	element regulatorowy promotora regulowany przez cAMP
CREB-1	cAMP responsive element binding protein 1	czynnik transkrypcyjny, białko regulujące ekspresję genów zależnych od cAMP
CREM	cAMP-responsive element modulator	modulator transkrypcji zależnej od cAMP
CTMP	carboxyl-terminal modulator protein	białko modulujące
CTP	C-terminal peptide	karbosylowy koniec peptydu
EGF	epidermal growth factor	nabłonkowy czynnik wzrostu
EGFR	epidermal growth factor receptor	receptor nabłonkowego czynnika wzrostu
ELK1	ETS domain-containing protein Elk-1	aktywator transkrypcji należący do rodziny białek ETS
ERK	extracellular signal-regulated kinases	kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym
ERK1 (p44)	kinaz ERK1	kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym – izoforma 1
ERK2 (p42)	kinaz ERK2	kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym – izoforma 2
ERp72	endoplasmic reticulum resident protein 72	białko opiekuńcze retikulum endoplazmatycznego

skrót	opis (ang.)	opis (pol.)
ERp94	endoplasmic reticulum resident protein 94	białko opiekuńcze retikulum endoplazmatycznego
ETS-2	protein C-ets-2 (E-twenty six) family member	czynn timeranskrypcyjny ETS-2
FASL	FAS ligand	ligand receptora FAS
FOXO1	forkhead box protein O1	czynn timeranskrypcyjny FOXO1
FOXO3a	forkhead box O3a	czynn timeranskrypcyjny FOXO3a
FSH	follicle-stimulating hormone	folikulotropina , hormon folikulotropowy
GDP	guanosine diphosphate	guanozynodifoforan
GEF	guanine nucleotide exchange factor	czynn timerwymiany nukleotydu guaninowego
GPCRs	G protein-coupled receptors	receptory sprzężone z białkiem G
GRB2	growth factor receptor-bound protein 2	białko wiążące receptor czynn timerwzrostu
GSK-3	glycogen synthase kinase 3	3 kinaza syntazy glikogenowej
GTP	guanosine-5'-triphosphate	guanozyno-5'-trifosforan
H-CG	hyperglycosylated CG	hiperglikozylowana gonadotropina kosmówkowa
H-CGB	hyperglycosylated CGB	hiperglikozylowana wolna podjednostka beta
hGL5	human granulosa-lutein <i>cell line</i>	ludzka linia komórowowa wiodząca się z komórek ziarnistych jajnika
IGFBP1	insulin-like growth factor-binding protein 1	białko wiążące czynn timerinsulinopodobny
ILK	integrin-linked kinase	kinaza ILK
JNK	c-Jun N terminal/stress activated protein kinase	kinaza białkowa fosforylująca N-koniec białka Jun
JRF	junctional regulatory factor	czynn timerregulujący połączenia
KI67	Ki-67 protein	antygen proliferacyjny Ki67
LHB	lutropin subunit beta	podjednostka beta lutropiny
LHCGR	lutropin-choriogonadotropic hormone receptor	receptor dla lutropiny I gonadotropiny kosmówkowej
LIF	leukemia inhibitory factor	czynn timerhamujący białaczkę, interleukina 6
MAP	mitogen activated protein	białko aktywowane przez mitogen
MAPK	mitogen-activated protein kinase	kinaza białka aktywowanego przez mitogen
MAPKAP2	MAPK-activated protein kinase 2	aktywowana kinazami MAP kinaza – izoforma 2
MAPKAPKs	MAPK-activated protein kinases	aktywowana kinazami MAP kinaza
MAPKK	mitogen activated protein kinase kinase	kinaza kinazy białkowej aktywowanej przez mitogeny

skrót	opis (ang.)	opis (pol.)
MAPKKK	an activated MAPK kinase kinase	kinaza kinazy kinazy MAP
MCL1	myeloid cell leukemia sequence 1	gen MCL1
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor 1	czynnik stymulujący powstawanie kolonii makrofagów
MDM2	mouse double minute 2 homologue/ E3 ubiquitin-protein ligase	ligaza ubikwitynowa MDM2-E3
MEK	mitogen-activated protein kinase kinase	kinaza kinazy aktywanej mitogenem
MK2/3	MAPK-activated protein kinase 2/3	aktywowane MAP kinazami białkowe kinazy 2/3
MK5	MAPK-activated protein kinase 5	aktywowane MAP kinazami białkowe kinazy 5
MKI67	proliferation-related Ki-67 antigen	gen kodujący Ki67
MMP-1	matrix metalloproteinase-1	metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej 1
MMP-2	matrix metalloproteinase-2	metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej 2
MMP-9	matrix metalloproteinase 9	metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej 9
MNKs	MAPK-interacting kinases	kinazy oddziałujące z kinazami MAP
MSKs	mitogen- and stress-activated kinases	kinazy aktywowane mitogenami i stresem
mTORC2	mammalian target of rapamycin complex 2	kompleks 2 kinazy serynowo-treoninowej mTOR
MYT1	myelin transcription factor 1	mielinowy czynnik transkrypcyjny
NGF	nerve growth factor	czynnik wzrostu nerwu
NK	natural killerscells	komórki NK
O-CGA	O-glycosylated CGA	O-glikozylowana wolna podjednostka alfa
OCT3/4	octamer-binding transcription factor 3/4	czynnik transkrypcyjny Oct-3/4
OVCAR-3	human ovarian carcinoma cell line	ludzka nowotworowa linia komórkowa wywodząca się z jajnika
P27 KIP1	gene encoding cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	gen kodujący zależny od cyklin inhibitor kinazy
P27 WAT1/CIP1	cyclin-dependent kinase inhibitor	zależny od cyklin inhibitor kinazy
P38	P38 mitogen-activated protein kinase	kinaza P38 aktywowana mitogenami
P53	P53protein	białko supresorowe P53
PAP7	PAP7 A-kinase anchoring protein	białko kotwiczące kinazę A
PDGF	platelet-derived growth factor	płytkopochodny czynnik wzrostu
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor	receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu
PDK1	phosphoinositide-dependent kinase 1	kinaza 1 zależna od fosfatydyloinozytolu

skrót	opis (ang.)	opis (pol.)
PDK2	phosphoinositide-dependent kinase 2	kinaza 2 zależna od fosfatydyloinozytolu
PH	pleckstrin homology domain	domena homologiczna do domeny plekstryny, oddziałująca z fosfatydyloinozytlofosforanami
PHLPP	PH domain and Leucine rich repeat Protein Phosphatases	fosfataza PHLPP
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase	kinaza fosfatydylo-3-inozytolu
PIP3	phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate	trójfosforan-3,4,5-fosfatydyloinozytolu
PKA	protein kinase A	kinaza białkowa A
PKB	protein kinase B	kinaza białkowa B
PP2A	protein phosphatase type 2A	fosfataza białkowa 2A
PPAR γ	peroxisome proliferator-activated receptor- γ	czynnik transkrypcyjny
RB	retinoblastoma protein	białko retinoblastoma
PTEN	phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten	fosfataza PTEN
RAF	RAF protein	białko RAF
RAS	RAS protein	białko RAS
rCGB	recombinant chorionic gonadotropin beta-subunit	rekombinowana wolna podjednostka beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej
RSKs	ribosomal S6 kinases	kinazy rybosomalne S6
RTKs	receptor tyrosine kinases	receptor o aktywności kinazy tyrozynowej
Rv	Raw volume	natężenie sygnału w obrębie pola immunoreaktywnego prążka
SAP-1	serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory subunit 1	podjednostka 1 serynowo/treoninowej fosfatazy 6.
SAP1A	serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory subunit 1A	podjednostka 1A serynowo/treoninowej fosfatazy 6.
SKOV-3	human ovarian carcinoma cell line	ludzka linia komórkowa raka jajnika
SMAD	Protein kinase SMAD	kinaza białkowa SMAD
SNP	single nucleotide polymorphism	polimorfizm pojedynczego nukleotydu
SOS	son of sevenless	białko SOS
SP1	Specificity Protein 1	czynnik transkrypcyjny SP1
SP3	Specificity Protein 3	czynnik transkrypcyjny SP3
TCF	Ternary Complex Factor	czynnik transkrypcyjny TCF
TGF β	transforming growth factor	transformujący czynnik wzrostu β
TGFBR	transforming growth factor-beta receptor	receptor transformującego czynnika wzrostu β

skrót	opis (ang.)	opis (pol.)
TGFBR2	transforming growth factor-beta receptor type 2	receptor transformującego czynnika wzrostu β typu drugiego
TIF-IA	transcription initiation factor	czynnik inicjacji transkrypcji
TRB3	tribbles homolog 3	białko TRB3
VEGF	vascular endothelial growth factor	czynnik wzrostu śródbłonna naczyń
WEE1	WEE1-like protein kinase	WEE1-podobna kinaza
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein	białko antyapoptotyczne
α CBF	α CCAAT-binding factor	czynnik transkrypcyjny α CBF

1. Wstęp

1.1. Budowa i ekspresja ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej i jej podjednostek

Ludzka gonadotropina kosmówkowa, nazywana hormonem ciążowym, w warunkach fizjologicznych produkowana jest przez komórki trofoblastu. Podobnie jak pozostałe hormony gonadotropowe: lutropina (LH), folikulotropina (FSH), tyreotropina (TSH), gonadotropina kosmówkowa (CG) zbudowana jest z dwóch podjednostek: alfa i beta. Mimo różnych funkcji pełnionych przez poszczególne gonadotropiny podjednostka alfa jest dla nich wspólna. Ze względu na swoją unikatowość o specyficzności danego hormonu, a więc także i własnościach CG, decyduje podjednostka beta [Pierce i Parsons 1981].

Podjednostka alfa CG (CGA) kodowana jest przez pojedynczy gen *CGA* zlokalizowany na chromosomie 6. *CGA* jest modelowym genem eukariotycznym posiadającym kasetę TATA, a jego ekspresja regulowana jest przede wszystkim aktywnością czynników transkrypcyjnych zależnych od cyklicznego 3',5'-adenozynomonofosforanu (cAMP). Wśród podstawowych czynników regulatorowych *CGA* wymienia się CREM, CREB-1 i ATF-1. Badania nad promotorem genu *CGA* dowodzą, że jego ekspresję regulują również takie czynniki transkrypcyjne jak: TSEB, AP- α , α CBF, JRF oraz OCT3/4 [Liu i wsp. 1996; Jameson i wsp. 1989].

Podjednostka beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej, która decyduje o specyficzności hormonu, kodowana jest przez osiem allelicznych genów zlokalizowanych na chromosomie 19. oznaczonych jako: *CGB1*, *CGB2*, *CGB3*, *CGB5*, *CGB6*, *CGB7*, *CGB8*, *CGB9* [Talmadge i wsp. 1984]. Geny podjednostki beta gonadotropiny kosmówkowej powstały jako rezultat duplikacji przodka genu kodującego podjednostkę beta hormonu luteinizującego (*LHB*). Procesowi ewolucji genów *CGB* u człowieka towarzyszyło nagromadzenie wysokiej liczby polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNPs). Największą ich liczbę odnotowuje się w genach *CGB3* i *CGB7* oraz *LHB*. Jednak, jak dotąd nie udowodniono, aby występowanie poszczególnych SNPs miało wpływ na ekspresję *CGB* czy biologię komórek ją wydzielających [Hallast i wsp. 2005; Rull i wsp. 2008 b].

Za najbardziej aktywne transkrypcyjnie geny uważa się *CGB5*, a także *CGB8* i *CGB3*. Geny *CGB7* i *CGB6* ulegają znacznie słabszej ekspresji. Oprócz łożyska i rozrostów trofoblastu, również liczne tkanki prawidłowe i nowotworowe mogą produkować CGB [Cocquebert i wsp. 2012; Li i wsp. 2008; Iles 2007; Hotakainen i wsp. 2007; Rull i Laan 2005]. Aktywność genów *CGB1* i *CGB2*, uważanych do niedawna za pseudogeny, wykrywana jest jedynie na poziomie transkryptów w łożysku [Rull i Laan 2005; Bo i Boime 1992], przysadce [Dirnhofer i wsp. 1996], jądrach [Berger i wsp. 1994] i raku piersi [Giovangrandi i wsp. 2001].

Białka syntetyzowane na bazie mRNA genów *CGB3-9* różnią się tylko jednym aminokwasem w pozycji 117. W przypadku genów *CGB7* i *CGB9* w pozycji tej występuje alanina, natomiast w produktach białkowych *CGB3*, *CGB6*, *CGB5* i *CGB8* kwas asparaginowy. Wydaje się jednak, że ten polimorfizm nie wpływa znacząco na funkcjonalność produkowanego białka [Talmadge i wsp. 1984].

Stosunkowo duże podobieństwo poszczególnych alleli *CGB* utrudnia szczegółową analizę regulacji ich ekspresji. Ponadto w ich rejonie promotorowym brak klasycznych sekwencji regulatorowych. W przeciwieństwie do *CGA* geny kodujące podjednostkę beta CG nie posiadają kasety TATA i, mimo że ich ekspresja również zależy od poziomu cAMP, w żadnym z genów *CGB* nie zidentyfikowano konsensusowej sekwencji CRE. Niemniej jednak dowiedziono, że w obrębie promotora *CGB5* następuje wiązanie czynników takich jak CREB-1 i ATF-1 [Jameson i wsp. 1989]. Do innych elementów potencjalnie regulujących transkrypcję *CGB* należą: ETS-2, SP3, AP2 a także OCT3/4, PPAR γ , czy P53. Przypuszcza się, że newralgiczne miejsca regulatorowe genów *CGB* mogą sięgać nawet siedmiuset par zasad powyżej punktu startu transkrypcji [Fournier i wsp. 2011; Sohr i wsp. 2011; Knöfler i wsp. 2004, 2000; Ghosh i wsp. 2003; Liu i Roberts 1996].

Znaczący udział w aktywacji transkrypcji *CGB* mają również specyficzne zmiany wzoru metylacji obszarów promotorowych tych genów. Dowiedziono, że komórki łożyska, a także nowotwory trofoblastu charakteryzują się hipometylacją klastra CGB [Uusküla i wsp. 2011]. Miejscową demetylację rejonów promotorowych genów *CGB* odnotowano również dla komórek nowotworowych produkujących CGB pochodzenia nietrofoblastycznego – linii glejaka (CBT), a także niewykazujących ekspresji CGB fibroblastów linii 2RA [Grigoriu i wsp. 2011; Campain i wsp. 1993].

Mimo iż synteza podjednostek alfa i beta gonadotropiny kosmówkowej zachodzi niezależnie od siebie, to jest doskonale zsynchronizowana. Pierwszy zaktywowany zostaje

promotor *CGA*, a co za tym idzie, początkowo pojawia się białko podjednostki alfa [Albanese i wsp. 1991]. Co więcej, dowiedziono, że niezależnie od etapu ciąży i stopnia zróżnicowania komórek łożyska, *CGA* zawsze produkowana jest w nadmiarze w stosunku do *CGB*. Stosunek ilości wytwarzanej *CGA* do *CGB* rośnie wraz z postępem ciąży od około 1,7:1 w pierwszym trymestrze do 12:1 w okresie okołoporodowym. Ze względu na fakt, iż do utworzenia funkcjonalnego hormonu niezbędne są obie podjednostki, poziom białka *CGB* uznaje się za czynnik limitujący ilość powstającego heterodimeru *CG* [Boothby i wsp. 1983]. Sugeruje się, że czynnikiem decydującym o ilości powstającego funkcjonalnego białka *CGB* jest obróbka potranskrypcyjna kodującego go mRNA oraz modyfikacje potranslacyjne białka. Analiza porównawcza komórek cytotrofoblastu wykazała bowiem, iż zwiększenie syntezy mRNA *CGB* nie zawsze wiąże się z odpowiednim wzrostem produkcji białka [Handsuh i wsp. 2009].

Synteza polipeptydów *CGA* i *CGB* zachodzi w polisomach szorstkiego retikulum endoplazmatycznego. Powstające pierwotnie cząsteczki, zwane pre-alfa i pre-beta, posiadają sekwencje sygnałne o długości odpowiednio dwudziestu czterech i dwudziestu aminokwasów. Fragmenty sygnałne odcinane są przez peptydazy zanim cząsteczki opuszczą kompleks rybosomów [Huth i wsp. 1992; Peters i wsp. 1984]. Modyfikacje, polegające na skróceniu łańcucha polipeptydowego, mają istotne znaczenie zwłaszcza w przypadku *CGB*, gdyż wówczas następuje odsłonięcie aminokwasów C-końca (CTP) podjednostki beta, który decyduje m.in. o okresie półtrwania ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej we krwi, a także o wiązaniu się cząsteczki hormonu z receptorem dla gonadotropiny kosmówkowej i hormonu luteinizującego (LHCGR) [Cole 2012 a].

Nowo zsyntetyzowane polipeptydy *CGA* i *CGB*, zbudowane odpowiednio z dziewięćdziesięciu dwóch i stu czterdziestu pięciu aminokwasów, przechodzą następnie do światła retikulum endoplazmatycznego, gdzie podlegają fałdowaniu i modyfikacjom potranslacyjnym. Dzięki potencjałowi oksydacyjnemu i obecności disulfidoizomeras w świetle retikulum endoplazmatycznego w obrębie podjednostek *CG* dochodzi do utworzenia mostków dwusiarczkowych. Wykazano, że pierwsze fałdowaniu podlega białko *CGA*. Zwijanie się podjednostki alfa zachodzi szybciej w porównaniu do *CGB*. W łańcuchu polipeptydowym *CGA* tworzą się wówczas trzy pętle stabilizowane pięcioma mostkami dwusiarczkowymi pomiędzy cysteinami: 7. a 31., 59. a 87., 10. a 60., 28. a 82., oraz 32. a 84. Obecność wiązań dwusiarczkowych w *CGA* warunkuje powstanie struktury tzw. węzła cysteinowego [Xing i wsp. 2001].

Konformacja podjednostki beta CG również zależy od utworzenia wiązań dwusiarczkowych. W przeciwieństwie do CGA proces ten zachodzi stopniowo i związany jest z tworzeniem się specyficznych stanów przejściowych struktury CGB [Wilken i wsp. 2007; Huth i wsp. 1992]. Pierwszy tworzy się mostek pomiędzy cysteinami 34. i 88., a zaraz po nim wiązanie między cysteiną 38. i 57. W miarę postępowania procesu fałdowania podjednostki beta CG pojawiają się kolejne mostki dwusiarczkowe, pomiędzy cysteinami 9. a 90. i 23. a 72. Te ostatnie wiązania są prawdopodobnie odpowiedzialne za stabilizację utworzonej w tym samym czasie lokalnej struktury beta kartki w obrębie CGB. W następnych etapach, gdy dochodzi do stopniowego dopasowania podjednostek alfa i beta, w polipeptydzie beta zostaje utworzony mostek dwusiarczkowy pomiędzy resztami 93. i 100. Ostatnie pojawia się wiązanie pomiędzy cysteinami 26. i 110. Mostki pomiędzy aminokwasami 93. i 100. oraz 26. i 110. stabilizują ważny dla składowania i aktywności biologicznej hormonu C-koniec białka CGB [Huth i wsp. 1992]. Usunięcie części aminokwasów w tym rejonie sprawia, że cząsteczki CG stają się biologicznie nieaktywne lub całkowicie uniemożliwia utworzenie heterodimeru [Jablonka-Shariff i Boime 2009; Cole i wsp. 1991].

Z uwagi na pojawiające się liczne strukturalne stany przejściowe przyjmowane przez podjednostkę beta CG podczas fałdowania i tworzenia mostków dwusiarczkowych, proces ten wymaga obecności białek opiekuńczych takich jak: BIP, ERP72 i ERP94 [Feng i wsp. 1996]. Przypuszcza się, że funkcję opiekuńczą pełni również sama podjednostka alfa hormonu, stanowiąc dla CGB swoistego rodzaju rusztowanie [Xing i wsp. 2004; Ruddon i Bedows 1997].

Zmiany strukturalne, jakim podlegają obie podjednostki podczas składowania hormonu, ponadto doprowadzają do przewleczenia aminowego końca CGA przez jedną z pętli CGB, zwaną pasem bezpieczeństwa, obejmującą aminokwasy 93. i 110. i ustabilizowaną dzięki mostkowi dwusiarczkowemu pomiędzy aminokwasami 26. i 110. Takie zapętlenie podjednostek podnosi trwałość utworzonej przestrzennej struktury hormonu [Xing i wsp. 2001].

Oprócz przyjęcia prawidłowej konformacji kluczowe znaczenie dla nadania cząsteczce CG swoistych właściwości biologicznych ma glikozylacja obu podjednostek hormonu [Ruddon i wsp. 1987]. Ze względu na fakt, iż w typie połączeń i liczbie przyłączanych reszt cukrowych obserwuje się istotne różnice, wyróżnia się aż piętnaście rodzajów cząsteczek gonadotropiny kosmówkowej i jej pochodnych. Odnaleźć je można w surowicy i moczu ciężarnych kobiet, ale także w nowotworach trofoblastu i licznych

nowotworach niefoblastycznych [Cole 2012 a i b]. Pięć podstawowych i najbardziej znaczących biologicznie cząsteczek to: gonadotropina kosmówkowa (CG), hiperglikozylowana gonadotropina kosmówkowa (H-CG), hiperglikozylowana wolna podjednostka beta (H-CGB), wolna podjednostka alfa (CGA) i O-glikozylowana wolna podjednostka alfa (O-CGA). Pozostałe typy cząsteczek takie jak „nacięta” gonadotropina kosmówkowa (CGn) oraz fragment korowy CGB (CGBcf), powstające na skutek rozpadu i degradacji hormonu, wydają się nie mieć żadnego lub niewielkie znaczenie biologiczne [Cole 2012 a i b].

Podstawowy wariant gonadotropiny kosmówkowej – CG jest białkiem o całkowitej masie około 38 kDa, z czego 70% masy przypada na łańcuchy polipeptydowe, a 30% na przyłączone do nich reszty cukrowe. W tym wariantcie na powierzchni podjednostki beta występują dwuantenarne cukrowce przyłączone do dwóch reszt asparaginy wiązaniami N-glikozydowymi i trójantenarne reszty cukrowe połączone z czterema resztami seryny wiązaniami O-glikozydowymi. Glikozylowane aminokwasy CGB znajdują się głównie na C-końcu polipeptydu, a modyfikacja tego fragmentu białka jest jednym z elementów warunkującym immunogenność i specyficzność hormonu. Sugeruje się również, że związane z obecnością określonych cukrowców własności końca karboksylowego podjednostki beta decydują o szybkiej sekrecji hormonu poza komórkę, a zarazem o jego okresie półtrwania [Jablonka-Shariff i Boime 2009]. W podstawowym wariantcie hormonu podjednostka alfa również ulega glikozylacji, jednak tylko poprzez wiązania N-glikozydowe i przyłączenie cukrów dwuantenarnych do dwóch reszt asparaginy. W cząsteczce CGA nie obserwuje się cukrowców przyłączonych do reszt seryny [Cole 2009].

Hiperglikozylowana gonadotropina kosmówkowa (H-CG) jest cząsteczką większą od podstawowego wariantu CG, a elementem decydującym o jej masie (38,5–40 kDa) są dodatkowe, bardziej złożone reszty cukrowe [de Medeiros i Norman 2009]. Różnice w sposobie glikozylacji gonadotropiny kosmówkowej mogą dotyczyć wszystkich reszt cukrowych obecnych w białku, choć odnotowano, iż to cukry przyłączone wiązaniem O-glikozydowym wykazują największą zmienność. I tak w H-CG ulegające glikozylacji seryny wzbogacone zostają o reszty cukrowe składające się z sześciu jednostek monosacharydów, natomiast reszty asparaginy o tzw. trójantenarne reszty cukrowe [Cole 2012 a i b].

Analizy struktury pierwszorzędowej podjednostek dowiodły, iż CG o podstawowej glikozylacji i H-CG budują te same polipeptydy. Brak jednak danych na temat wpływu

stopnia glikozylacji CG na ewentualne zmiany konformacyjne białka [Lu i wsp. 2012]. Niemniej sugeruje się, że obecność dodanych zaraz po rozpoczęciu translacji białka cukrów na aminowym końcu beta podjednostki CG może mieć wpływ na proces tworzenia mostków dwusiarczkowych w tej cząsteczce [Feng i wsp. 1995; Merz i wsp. 2007]. Z kolei glikozylacja karboksylowego końca CGB, która odbywa się na późniejszych etapach, wpływa na dalszą obróbkę białka i jego zwijanie [Garcia-Campayo i wsp. 2002].

Przyjęcie prawidłowej konformacji przez podjednostki hormonu i ich wstępne modyfikacje potranslacyjne są warunkiem koniecznym, aby białka mogły opuścić retikulum endoplazmatyczne. Kolejne etapy dojrzewania podjednostek CG, które obejmują m.in. dodatkowe zmiany w sposobie glikozylacji takie jak sjalizacja, zachodzą już w aparacie Golgiego. Ze względu na fakt, iż CG jak i cząsteczki jej pochodne podlegają eksportowi na zewnątrz komórki, w ostatnich fazach obróbki pakowane są w pęcherzyki i transportowane do błony komórkowej [Peters i wsp. 1984].

Jak już wspomniano, podjednostki alfa i beta CG mogą występować w organizmie również w stanie niezwiązanym. Wiele nowotworów produkujących gonadotropinę kosmówkową charakteryzuje się syntezą wolnej CGB oraz wolnej hiperglikozylowanej CGB [Cole 2012 a i b; Iles 2007; Jankowska i wsp. 2008 a]. Strukturę i sposób glikozylacji wolne podjednostki beta mają podobne do tego obserwowanego w podjednostkach obecnych odpowiednio w podstawowym wariantcie hormonu i hiperglikozylowanym heterodimerze CG [Valmu i wsp. 2006]. Dowiedziono jednak, że wolna podjednostka beta, a także wolna podjednostka alfa poddawane są odmiennemu i szybszemu przetwarzaniu potranslacyjnemu niż polipeptydy CGB i CGA tworzące heterodimery [Merz i wsp. 2007; Peters i wsp. 1984].

Wolna podjednostka alfa, podobnie jak CGB, również może występować w organizmie w kilku formach. Obok podstawowego wariantu CGA, który buduje heterodimer CG, wyróżnia się wolną podjednostkę alfa o zwiększonej glikozylacji na resztach asparaginy, a także cząsteczki charakteryzujące się obecnością cukrów na resztach seryny – tzw. O-glikozylowana CGA. Hiperglikozylowana, a zwłaszcza O-glikozylowana CGA wykazują znacząco obniżony potencjał do tworzenia heterodimerów CG w warunkach *in vitro* [Krause i wsp. 2007; Merz i wsp. 2007]. Zakłada się jednak, że zmiany w glikozylacji podjednostki alfa nie stanowią czynnika limitującego ilość powstającego heterodimeru w komórkach, gdyż modyfikacje te zachodzą dopiero w aparacie Golgiego, a pierwsze etapy składania hormonu dokonują się już w retikulum endoplazmatycznym. Stąd uważa się, że określone warianty podjednostek alfa i beta

hormonu z założenia predestynowane są tworzyć pulę białek niewiązanych w heterodimer [Merz i wsp. 2007].

Poza glikozylacją wolna podjednostka alfa gonadotropiny kosmówkowej może podlegać również fosforylacji, choć zjawisko to rzadko dotyczy białek przeznaczonych na eksport do macierzy zewnątrzkomórkowej. Nie ma natomiast żadnych doniesień na temat fosforylacji podjednostki beta CGB. Znaczenie tej modyfikacji dla aktywności hormonu nie zostało jak dotąd wyjaśnione [Beebe i wsp. 1989].

Badania nad czynnikami należącymi do rodziny białek posiadających motyw wężła cysteinowego dowodzą, że obok składania heterodimerów, jedną z ich cech charakterystycznych jest zdolność tworzenia również homodimerów [McDonald i wsp. 1993]. Jak pokazują wybrane publikacje, także podjednostki alfa i beta CG mogą łączyć się w homodimery: CGA/CGA i CGB/CGB. Oba rodzaje homodimerów wydają się być produkowane wyłącznie przez komórki nowotworowe, niewiele jednak wiadomo o funkcji jaką pełnią [Cole i wsp. 1984; Krause i wsp. 2007; Merz i wsp. 2007]. Z nielicznych badań wynika, że homodimery CGB/CGB są aktywne biologicznie i podobnie jak wolna podjednostka beta mogą oddziaływać na komórki w sposób autokrynowy, wpływając na zwiększenie ich liczebności [Butler i wsp. 1999; Lobel i wsp. 1999; Butler i Iles 2004]. Brak natomiast doniesień o efektach działania dimerów CGA/CGA.

1.2. Rola ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej i jej podjednostek

W warunkach fizjologicznych jedną z podstawowych funkcji gonadotropiny kosmówkowej jest zahamowanie luteolizy i podtrzymanie produkcji progesteronu przez ciało żółte w okresie ciąży. Utrzymanie funkcjonalnego *corpus luteum* jest istotne ze względu na fakt, iż progesteron, podobnie jak estrogeny, zapewnia między innymi odpowiednią receptywność endometrium i powstanie tzw. okna implantacyjnego [Srisuparp i wsp. 2003; Psychoyos 1986].

Pierwsze transkrypty genów kodujących *CGB* wykrywane są już na etapie 6-8 komórek zarodka, natomiast cały hormon pojawia się około siódmego dnia po zapłodnieniu [Jurisicova i wsp. 1999; Bonduelle i wsp. 1988; Lopata i Hay 1989]. Ilość hormonu w surowicy krwi kobiet ciężarnych początkowo rośnie wraz z postępem ciąży tak, iż w pierwszym trymestrze jego poziom podwaja się średnio co 48–72 godziny, przy czym jego najwyższe stężenie obserwuje się około 11–13 tygodnia. Następnie ilość

hormonu spada, lecz jego stosunkowo wysoki poziom utrzymuje się aż do porodu [Cole 2009; Yoshida 2005].

Produkcja CG o tzw. podstawowym stopniu glikozylacji charakteryzuje przede wszystkim syncytiotrofoblast, a udział tego wariantu hormonu w całej puli CG rośnie wraz z postępowaniem ciąży. Z kolei w pierwszych tygodniach ciąży dominującą formą produkowanego hormonu jest hiperglikozylowana CG (H-CG). Synteza H-CG zachodzi głównie w cytotrofoblastie i wiąże się ze zmianą fenotypu zewnątrzkosmowego trofoblastu na inwazyjny, co warunkuje prawidłową implantację zarodka [Cole i Butler 2011]. Wykazano, że hiperglikozylowana gonadotropina kosmówkowa, a zwłaszcza jej wolna podjednostka beta, pełni podobną funkcję również w nowotworach. Zarówno w nowotworach trofoblastycznych np.: w zaściadzie groniastym jak i wielu nowotworach niewywodzących się z trofoblastu ekspresja H-CG i H-CGB związana jest często z inwazyjnym fenotypem komórek, a także większym potencjałem guza do tworzenia przerzutów [Cole i wsp. 2006; Cole 2012 b]. Stąd można wnioskować, że zarówno w ciąży jak i stanach nowotworowych H-CG i H-CGB są jednymi z najbardziej aktywnych biologicznie form hormonu. Tym niemniej sugeruje się, że warianty te wraz z CG o podstawowym stopniu glikozylacji działają na komórki w sposób synergistyczny [Cole 2012 a].

Z badań nad rolą gonadotropiny kosmówkowej w ciąży fizjologicznej wynika, że hormon może wpływać bezpośrednio na funkcje wydzielnicze nabłonka gruczołowego endometrium, stymulując syntezę m.in.: LIF, MMP9, COX2, prostaglandyny i prolaktyny oraz obniżając natomiast poziom IGFBP1 i M-CSF. Zmiany na poziomie błony śluzowej zachodzące pod wpływem CG prowadzą do różnicowania doczesnego endometrium [Licht i wsp. 2001; Han i wsp. 1999]. Procesowi temu towarzyszy zależne od CG zwiększenie przepuszczalności naczyń krwionośnych i przekrwienie błony śluzowej macicy, a także wzrost tętnic spiralnych. Gonadotropina kosmówkowa pełni w ciąży również ważną funkcję czynnika angiogenego. Regulacja procesów angiogenezy w łożysku przez CG odbywa się między innymi poprzez aktywację czynnika wzrostu śródbłonka naczyń (VEGF) i angiopoetyny [Zygmunt i wsp. 2003; Herri i wsp. 2007].

Badania nad angiogenezą nowotworów dowodzą, że podobnie jak w ciąży również przypadku guzów gonadotropina kosmówkowa przyczynia się do neowaskularyzacji. Wykazano, że hormon obecny w surowicy krwi pacjentów cierpiących na nowotwory germinalne jąder promuje wzrost naczyń krwionośnych guza. CG wzmacnia także

ekspresję angiopoetyny w komórkach linii raka jajnika [Pietrowski i wsp. 2010; Arrieta i wsp. 2009].

Kolejna funkcja pełniona przez CG w ciąży związana jest z ochroną komórek przed apoptozą [Lovely i wsp. 2005]. Zjawisko to początkowo zaobserwowane dla komórek endometrium, potwierdzone zostało także w komórkach nowotworowych. Badania przeprowadzone w liniach komórkowych raka szyjki macicy pokazały, że komórki w których wyciszano podjednostkę beta CG, umierały na drodze apoptozy [Hamada i wsp. 2005; Jankowska i wsp. 2008 b]. Wyniki te potwierdzają wcześniejsze doniesienia, które sugerują, że wzrost liczby komórek pod wpływem CGB nie jest wynikiem ich zwiększonej proliferacji, a raczej blokowania sygnałów proapoptotycznych [Butler i wsp. 2000].

W ciąży obecność gonadotropiny kosmówkowej warunkuje również tolerancję układu immunologicznego matki wobec płodu. Za sprawą hormonu dochodzi do modulacji aktywności makrofagów, które oprócz funkcji obronnych i fagocytozy apoptotycznych komórek łożyska osłabiają również odpowiedź matczynego układu odpornościowego na ojcowskie antygeny eksponowane przez płód [Tsampalas i wsp. 2010; Wan i wsp. 2007]. Zapewnienie immunotolerancji w ciąży wymaga również obecności na granicy łożysko/płód wybranych subpopulacji limfocytów regulatorowych. Napływ do łożyska komórek $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ warunkowany jest m.in. obecnością i chemoatrakcyjnymi własnościami gonadotropiny kosmówkowej. Jednocześnie pod wpływem CG zredukowana zostaje aktywacja limfocytów T efektorowych i produkcja cytokin. Co więcej, CG wydaje się stymulować proliferację łożyskowych komórek NK, natomiast redukować aktywność cytotoksycznych NK obecnych w krwi obwodowej [Bansal i wsp. 2012; Schumacher i wsp. 2009]. Przepuszczalnie podobne procesy immunomodulujące, prowadzące do uniewrażliwienia układu immunologicznego chorego na komórki guza mogą pod wpływem CG zachodzić w procesie nowotworzenia, jednak dotychczas brak doniesień potwierdzających tę hipotezę.

Obecność wolnej podjednostki alfa, a zwłaszcza jej glikozylowanych wariantów również nie pozostaje obojętna dla komórek. Dowiedziono, że wolna CGA stymuluje komórki endometrium do różnicowania w doczesną, a także do produkcji prolaktyny. Ponadto wykazano, że wyższy niż obserwowany w zdrowej ciąży poziom wolnej CGA związany jest z objawami preeklampsji w ostatnim trymestrze ciąży [Krause i wsp. 2007; Nemansky i wsp. 1998; Moodley i wsp. 1995; Blithe i wsp. 1991; Beebe i wsp. 1989; Peters i wsp. 1989]. Z kolei u mężczyzn obniżenie poziomu wysoce glikozylowanej wolnej

podjednostki alfa w płynie nasiennym związane jest nieprawidłowościami parametrów nasienia [Zenzmaier i wsp. 2011].

Mimo licznych badań dokumentujących ekspresję poszczególnych genów *CGB* na poziomie mRNA, a także doniesień potwierdzających obecność białka wolnej *CGB* w łożysku, surowicy krwi i moczu ciężarnych kobiet brak publikacji na temat roli, jaką wolna podjednostka beta *CG* odgrywa w okresie ciąży [Cocquebert i wsp. 2012; Rull i wsp. 2008 a; Valmu i wsp. 2006]

1.3. Mechanizmy działania ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej

Obserwowany w ciąży klasyczny mechanizm działania gonadotropiny kosmówkowej na komórki, zakłada interakcję hormonu z receptorem wspólnym dla hormonu luteinizującego i gonadotropiny kosmówkowej. *LHCGR* jest białkiem o siedmiu domenach transbłonowych i należy do rodziny receptorów podobnych do rodopsyny. Jednocześnie zalicza się do grupy receptorów sprzężonych z białkiem G (*GPCR*) [McFarland i wsp. 1989].

Oprócz łożyska ekspresję tego receptora potwierdzono w jądrach i jajnikach, a także szeregu tkanek pozagonadalnych takich jak: endometrium, miometrium, jajowód, szyjka macicy, pępowina, prostata, najądrze, mózg, skóra, nadnercze i limfocyty [Banerjee i Fazleabas 2011; Zięćik i wsp. 2007; Lei i Toth 1993].

Różnorodność tkanek charakteryzujących się ekspresją *LHCGR*, a także odmienne funkcje jakie pełnią w organizmie *LH* i *CG* sugerują, że hormony te mogą aktywować receptor w odmienny sposób. Dowiedziono, że wiązanie *LH* i *CG* do *LHCGR* odbywa się poprzez różne domeny receptora [Galet i Ascoli 2005]. W przypadku *CG* połączenie z receptorem następuje poprzez domeny znajdujące się blisko N-końca białka *LHCGR*. Co ciekawe, tak istotny dla nadania specyficzności hormonu karboksylowy koniec podjednostki beta wydaje się nie mieć istotnego znaczenia podczas wiązania i aktywacji receptora [el Deiry i wsp. 1989]. Z kolei kluczowym dla integracji z receptorem jest C-koniec podjednostki alfa *CG*. W warunkach fizjologicznych dla związania oraz pełnej i specyficznej aktywacji *LHCGR* niezbędny jest heterodimer *CG* [Pierce i Parsons 1981].

Połączenie się hormonu z receptorem prowadzi do zmian konformacyjnych obu cząsteczek, a w konsekwencji do wtórnego kontaktu związanej już z receptorem cząsteczki *CG* z innymi częściami *LHCGR*. Stanowi to decydujący moment aktywacji receptora [Puett i wsp. 1996; Ryu i wsp. 1996]. Następstwem pobudzenia receptora, zarówno pod

wpływem CG jak i LH, jest aktywacja białka G, która prowadzi do stymulacji kolejnego ogniwa kaskady jakim jest cyklaza adenylowa (AC). Na skutek działania AC wzrasta w komórce stężenie wtórnego przekaźnika informacji w postaci cAMP. Interesującym jest fakt, iż stymulacja komórek wykazujących stabilną ekspresję LHCGR (COS-7/LHCGR i hGL5/LHCGR) ekwimolarnymi ilościami LH i CG w warunkach *in vitro* prowadzi do silniejszej stymulacji AC w przypadku zastosowania gonadotropiny kosmówkowej. Mechanizm tego zjawiska nie został jak dotąd wyjaśniony [Casarini i wsp. 2012; Segaloff i Ascoli 1993].

Jednym z efektów zwiększenia puli cyklicznego adenozynomonofosforanu w komórce jest wzrost aktywności kinazy białkowej A (PKA). W ciąży zwiększona aktywność ścieżki sygnałnej związanej z cAMP i PKA towarzyszy procesom fuzji komórek trofoblastu. Specyficzność działania gonadotropiny kosmówkowej na łożysko poprzez receptor LHCGR i szlak AC/cAMP/PKA zapewnia m.in. specyficzna tkankowo ekspresja izoform i wariantów splicingowych poszczególnych podjednostek kinazy A. Przyczynia się do tego również aktywność białek kotwiczących kinazę A (AKAPs), swoistych dla łożyska, takich jak: PAP7, AKAP18 γ , AKAP350, AKAP79, AKAP95, AKAP250. Białka AKAP mogą być zlokalizowane w różnych częściach komórki i stanowią rusztowanie dla kinazy A, a także innych białek takich jak fosfodiesterazy, fosfatazy czy inne kinazy. Następstwem połączenia aktywnej PKA z odpowiednim AKAP jest zatem czasowa i przestrzenna sekwestracja utworzonego kompleksu. Zakotwiczona w kompleksie z AKAP kinaza A może aktywować specyficzne dla siebie substraty oraz wpływać na ekspresję genów zależnych od poziomu cAMP. Fosforylacja czynników transkrypcyjnych takich jak CREB zachodzi poprzez katalityczne podjednostki PKA, które odłączają się od kompleksu i ulegają translokacji do jądra komórkowego [Weedon-Fekjær i Taskén 2012; Potgens i wsp. 2002].

W warunkach fizjologicznych wygaszenie sygnałów pochodzących od aktywnego LHCGR zachodzi dzięki internalizacji kompleksu hormon-receptor [Abramowitz i Birnbaumer 1982]. Badania nad regulacją ekspresji LHCGR pokazały również, że długotrwała stymulacja komórek gonadotropiną kosmówkową prowadzi do spadku ekspresji receptora na poziomie mRNA. Mechanizm odpowiedzialny za te procesy związany jest ze sprzężeniem sygnałów szlaku AC/cAMP/PKA oraz kinaz ERK1/2 [Menon i wsp. 2011].

Sugeruje się ponadto, że niektóre zależne od aktywacji LHCGR procesy biologiczne takie jak proliferacja, różnicowanie czy przeżycie komórek związane są także

z uruchomieniem dodatkowych ścieżek sygnałnych. Dowiedziono, że stymulacja receptora LHCGR przez CG promuje wzrost komórek jajnika poprzez aktywację kinaz ERK1/2 oraz kinaz szlaku fosfatydyloinozytolu – AKT [Palaniappan i Menon 2010; Seger i wsp. 2001]. Z kolei stymulacja komórek trofoblastu gonadotropiną kosmówkową prowadzi do aktywacji kinazy AKT promującej inwazyjność komórek. Natomiast w komórkach endometrium fosforylacja kinazy ERK pod wpływem CG warunkuje produkcję prostaglandyn [Prast i wsp. 2008; Srisuparp i wsp. 2003]. W podobny, zależny od kinaz AKT i ERK, sposób aktywacji receptora LHCGR przez CG w komórkach Leydiga wpływa na proliferację i apoptozę tych komórek [Tai i wsp. 2009; Martinelle i wsp. 2004].

Mechanizm działania gonadotropiny kosmówkowej i jej wolnych podjednostek alfa i beta w nowotworzeniu nie został poznany. Badania ostatnich lat dowodzą, że nie wszystkie nowotwory, które produkują gonadotropinę kosmówkową charakteryzują się ekspresją receptora LHCGR [Jankowska i wsp. 2008 a; Davies i wsp. 2000]. Co więcej, mimo iż w wielu przypadkach podstawową formą hormonu produkowanego przez komórki nowotworowe jest wolna podjednostka beta CG, do tej pory nie wykazano, by CGB lub wolna podjednostka alfa były zdolne wiązać receptor LHCGR. Brak też danych na temat mechanizmu, przez który efekt biologiczny wywiera homodimer CGB/CGB [Butler i Iles 2004; Butler i wsp. 1999].

Fakty te skłaniają do rozważenia alternatywnych mechanizmów działania ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej, a zwłaszcza jej wolnej podjednostki beta CG na komórki nowotworowe. Nie można wykluczyć, że podobnie jak w steroidogenezie i folikulogenezie mechanizmem odpowiedzialnym za wywierany przez CGB efekt biologiczny w nowotworach jest aktywacja szlaków sygnałnych, w których białka efektorowe stanowią kinazy ERK1/2 i AKT. Hipoteza ta wydaje się wysoce prawdopodobna tym bardziej, że kinazy te zaangażowane są w regulację proliferacji i apoptozy komórek, a rozregulowanie szlaków przez nie kontrolowanych jest cechą wielu nowotworów różnego pochodzenia [Los i wsp. 2009; Junttila i wsp. 2008; Steinmetz i wsp. 2004].

1.4. Szlak kinazy ERK

Kinaza ERK to enzym aktywowany pod wpływem sygnałów zewnątrzkomórkowych, który zaliczany jest do grupy określanej mianem kinaz MAP. Jest to klasa kinaz serynowo-treoninowych, wśród których wyróżnia się trzy rodziny, definiowane na podstawie tzw. kinazy efektorowej. I tak obok szlaku kinazy ERK wyróżnia się również

szlak kinazy JNK i szlak kinazy P38. W każdej ścieżce sygnałnej kinaza efektorowa kontrolowana jest przez kinazę „wyższego rzędu”. Razem tworzą one kaskadę enzymatyczną tzn. układ, w którym kolejne białka są aktywowane w wyniku fosforylacji poprzedniego [Craig i wsp. 2008; Pearson i wsp. 2001].

W szlaku sygnałnym kinaz MAP enzymy oznacza się kolejno: MAPKKK (MAP3K, kinaza kinazy kinazy MAP), MAPKK (MAP2K, kinaza kinazy MAP) i MAPK (kinaza MAP), która jest jednocześnie kinazą efektorową. Podstawową kaskadę sygnałną kinaz MAP tworzy zespół białek RAF/MEK/ERK, który określa się jako główną ścieżkę wzrostu i różnicowania komórek [Craig i wsp. 2008].

Sygnał inicjujący kaskadę może pochodzić od czynników wzrostu takich jak: PDGF, EGF, NGF, hormonów białkowych np.: insuliny, neuroprzekaźników oraz chemokin czy estrów forbolu. Pierwszym ogniwem łańcucha są receptory o charakterze kinaz tyrozynowych (RTKs) lub receptory sprzężone z białkiem G (GPCRs) [McCubrey i wsp. 2007; Xu i wsp. 2006; Pyne i wsp. 2003; Stehr i wsp. 2003].

W przypadku RTKs przyłączenie liganda do receptora powoduje jego dimeryzację i autofosforylację na resztach tyrozynowych w obrębie domeny cytozolowej. Ufosforylowane aminokwasy stają się miejscem wiązania licznych białek, w tym GRB2. GRB2 jest białkiem adaptorowym, które poprzez interakcje z białkiem SOS, należącym do grupy białek GEF, promuje wymianę GDP na GTP, wiązanego przez kolejny element kaskady – białko RAS. Po związaniu GTP białko RAS jest zdolne oddziaływać bezpośrednio z czynnikami efektorowymi, w tym z białkiem RAF. RAF będące kinazą kinazy kinazy MAP (MAPKKK) po aktywacji fosforyluje kinazę MEK (MAPKK), a ta następnie efektorową kinazę ERK [Pyne i wsp. 2003; Buday i wsp. 1994].

Aktywność kinazy ERK jest w rzeczywistości wypadkową aktywności jej dwóch form homologicznych: ERK1 (P44) i ERK2 (P42). Kinazy ERK1 i ERK2 w 83% składają się z tych samych aminokwasów, a ich ekspresję potwierdzono we wszystkich typach tkanek, pośród których tkanka mózgowa, mięśnie szkieletowe, grasica i serce charakteryzują się najwyższym poziomem ekspresji [Roskoski 2012]. Geny *ERK1* i *ERK2* posiadają także dodatkowe warianty splicingowe, oznaczane odpowiednio ERK1b, ERK1c i ERK2b. Powstające z alternatywnie składanych mRNA polipeptydy są fosforylowane w podobny sposób, jaki obserwuje się w przypadku podstawowych wariantów splicingowych ERK1 i ERK2, jednak ich mechanizm działania nie jest do końca poznany [Shaul i wsp. 2009; Yung i wsp. 2000; Gonzalez i wsp. 1992].

Kinaza ERK posiada wiele białek efektorowych, które fosforyluje będąc w stanie aktywnym. Mimo różnic w strukturze pierwszorzędowej, białka ERK1 i ERK2 posiadają powinowactwo do tych samych substratów. Wśród nich znaleźć można liczne czynniki transkrypcyjne jak również inne kinazy określane jako kinazy białkowe aktywowane przez MAPK (MAPKAPKs, MAPK-activated protein kinases) [Gaestel 2008; Shaul i Seger i wsp. 2007].

W komórce niepoddawanej działaniu bodźców zewnętrznych białka ERK, dzięki połączeniu z kinazą MEK, zakotwiczone są w cytoplazmie siecią mikrotubul. Mitogeny indukują natomiast dwufazową aktywację ERK1 i ERK2. Ufosforylowanie reszt tyrozynowych i treoninowych ERK1/2 pozwala na ich dysocjację od MEK. W pierwszych dziesięciu minutach od aktywacji pojawia się zazwyczaj gwałtowny wzrost aktywacji kinaz, po którym następuje druga, słabsza fala aktywności, podtrzymywana w czasie fazy G1, trwająca nawet do sześciu godzin. W ciągu piętnastu minut od aktywacji następuje translokacja ERK1/2 do jądra. Przedłużona aktywność kinazy do późnej fazy G1 niezbędna jest zatem do przygotowania komórki do wejścia w fazę S cyklu [Lidke i wsp. 2010; Chambard i wsp. 2007]. Translokacja ERK1/2 do jądra komórkowego może zachodzić w dwojaki sposób. Białka mogą przedostawać się na teren jądra dzięki dyfuzji monomerów lub przez aktywny transport dimerów [Horgan i Stork 2003].

Na terenie jądra kinazy fosforylując czynniki transkrypcyjne takie jak: ELK1, SAP1A czy TIF-IA wpływają na ekspresję wielu genów związanych z regulacją cyklu komórkowego. Jednym z genów, którego ekspresję reguluje czynnik ELK1 jest protoonkogen C-FOS, który wpływa na wzrost komórek, ich różnicowanie i któremu przypisuje się udział w patogenezie wielu chorób [de Cremoux i Robert 2012; Cargnello i Roux 2011].

Do efektorów ERK zalicza się również czynniki transkrypcyjne TCF (Ternary Complex Factor), które regulują tzw. geny natychmiastowej odpowiedzi takie jak: *C-FOS* i *C-MYC*. Te z kolei indukują ekspresję genów późnej odpowiedzi, które odpowiedzialne są za przeżycie komórki oraz jej podziały. Co więcej, ERK1/2 stabilizuje białko C-FOS przez jego bezpośrednią fosforylację, co pozwala na asocjację z C-JUN i utworzenie kompleksu AP1 niezbędnego dla ekspresji cykliny D1 [Cargnello i Roux 2011; Kim i Cochran 2000].

Oprócz czynników transkrypcyjnych grupa białek regulowanych przez ERK obejmuje inne kinazy m.in. kinazy rybosomalne S6 (RSKs), kinazy aktywowane mitogenami i stresem (MSKs), kinazy oddziałujące z kinazami MAP (MNKs),

aktywowane kinazami MAP białkowe kinazy 2/3 (MK2/3) i 5 (MK5) [Roux i Blenis 2004].

Uważa się także, że poprzez RSK1, RSK2 i RSK3 kinaza ERK promuje przeżycie komórek regulując aktywność proapoptotycznego białka BAD [Bonni i wsp. 1999]. Ufosforylowanie białka BAD blokuje jego działanie, które polega na wypieraniu z kompleksu BCL/BAX białka BAX i połączenia się z BCLXL [Roskoski 2012; Eisenmann i wsp. 2003].

Jednym z substratów kinazy ERK1/2 jest również czynnik FOXO3a, który indukuje ekspresję inhibitora CDKs – P27 (KIP1). Na skutek fosforylacji FOXO3a zostaje natychmiast skierowany do proteosomów. Niedobór FOXO3a powoduje zmniejszenie aktywności czynników proapoptotycznych takich jak BIM i FASL. FOXO obniża także ekspresję cyklin D1 i D2, co wiąże się z kolei z upośledzeniem funkcji CDK4. Gdy kinaza ta posiada potencjał do efektywnej fosforylacji substratu jakim jest RB, promowane jest przejście komórki w fazę S cyklu [Balmanno i Cook 2009; Yang i wsp. 2008; Burgering i Medema 2003; Schmidt i wsp. 2002].

Zmieniające się relacje między czynnikami antyapoptotycznymi a proapoptotycznymi na korzyść tych pierwszych doprowadzają do zwiększenia tempa proliferacji i promują wzrost guza.

Nadmierna aktywacja szlaku RAS/RAF/MEK/ERK może prowadzić do wzrostu ekspresji inhibitorów kinazy zależnej od cyklin (CDK), co prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego. W momencie samego przejścia z fazy G1 do fazy S ERK1/2 zostają gwałtownie zdezaktywowane. Gdy tylko ulegną defosforylacji są natychmiast przenoszone z powrotem do cytoplazmy dzięki procesom aktywnego transportu, w których znaczący udział ma kinaza MEK wychytująca cząsteczki ERK w nukleoplazmie [Chambard i wsp. 2007; Yao i Seger 2004].

1.5. Szlak kinazy AKT

Kolejną kinazą regulującą proliferację i apoptozę komórek jest serynowo-treoninowa kinaza AKT, zwana także kinazą białkową B (PKB), będącą kluczowym ogniwem w szlaku sygnałnym 3-kinazy fosfatydyloinozytolu (PI3K). Jest to jeden z najbardziej wszechstronnych enzymów ludzkiego kinomu, który odpowiada za regulację wielu podstawowych procesów komórkowych takich jak transkrypcja, metabolizm, proliferacja, migracja czy apoptoza [Altomare i Khaled 2012].

U ssaków występują trzy podstawowe izoformy kinazy AKT, stanowiące produkty ekspresji różnych genów zlokalizowanych na chromosomach: 14q32, 19q13, 1q44. Produkty białkowe tych genów określane są odpowiednio jako: AKT1 (PKB α), AKT2 (PKB β) i AKT3 (PKB γ). Dodatkowo wyróżnia się jeszcze kinazę AKT3-(γ 1), będącą produktem alternatywnego składowania mRNA AKT3 [Tschopp i wsp. 2005].

Rodzina kinaz AKT to grupa blisko spokrewnionych, wysoce konserwatywnych białek. Poszczególne izoformy AKT wykazują wysoki stopień podobieństwa zarówno sekwencji jak i struktury. Mimo wielu cech wspólnych, które zauważalne są również na poziomie funkcjonalnym, homologi AKT nie tylko wykazują dodatkowe odmienne biologiczne funkcje, to cechuje je również odmienny tkankowo-specyficzny profil ekspresji [Datta i wsp. 1999].

Obecność pierwszej izoformy AKT charakteryzuje takie tkanki i narządy jak: mózg, serce i płuca, a brak jej ekspresji w komórkach podczas rozwoju zarodkowego prowadzi między innymi do ograniczenia rozwoju płodu, może decydować o upośledzeniu funkcji łożyska i obniżonej waskularyzacji, jak również promować procesy apoptotyczne w komórkach. Uznaje się, że spośród wszystkich trzech izoform to AKT1 w największym stopniu decyduje o przeżyciu i proliferacji komórek [Yang i wsp. 2003; Chen i wsp. 2001; Cho i wsp. 2001].

Tkanki charakteryzujące się ekspresją AKT2 to tkanki wykazujące wrażliwość na działanie insuliny, m.in. brązowa tkanka tłuszczowa, tkanka mięśniowa [Altomare i wsp. 2002]. Dowiedziono, że zablokowanie ekspresji AKT2 w komórkach mięśniowych, a także hepatocytach wpływa na rozwój insulinooporności [Cho i wsp. 2001]. Mechanizm regulujący homeostazę glukozy, dla której poziom AKT2 w komórkach ma decydujące znaczenie, jest jednak złożony i zależny nie tylko od poziomu kinazy, ale również od relacji ilościowych i jej bezpośrednich interakcji z innymi czynnikami [Lu i wsp. 2012].

Ekspresja trzeciego izotypu kinazy – AKT3 jak dotąd została potwierdzona w mózgu, jądrach, gruczole piersiowym, sercu, nerkach, płucach i mięśniach szkieletowych [Dummler i Hemmings 2007]. Najważniejszą funkcją tej izoformy wydaje się być udział w rozwoju centralnego układu nerwowego, czego dowiedziono poprzez badania myszy z nokautem genu *AKT3*, który związany był z upośledzeniem rozwoju mózgowia. Spowolnienie wzrostu zwierząt obserwowano jednak dopiero w okresie postnatalnym [Tschopp i wsp. 2005].

Każdy z członków rodziny kinaz AKT posiada charakterystyczną domenę PH wykazującą homologię do plekstryny na końcu aminowym białka oraz linker w postaci

alfa helisy i domenę kinazową na C-końcu. Domena PH obecna jest również w wielu innych białkach, w tym zależnej od fosfatydyloinozytolu kinazie 1 (PDK1), będącej bezpośrednim aktywatorem AKT, odpowiedzialnym za zakotwiczenie białka w błonie komórkowej [Haslam i wsp. 1993].

W warunkach fizjologicznych enzym nie ulega aktywacji dopóki komórka nie zostanie pobudzona przez czynniki wzrostu lub inne ligandy. W komórkach niestymulowanych kinaza AKT utrzymywana jest w stanie niereaktywnym w kompleksie z PDK1 rezydującym na terenie cytoplazmy. Aktywacja AKT zachodzi równolegle z procesem translokacji kompleksu do błony komórkowej, a zakotwiczenie AKT–PDK1 w plazmalemmie ma miejsce dzięki wspomnianej już domenie PH i trójfosforanowi 3,4,5-fosfatydyloinozytolu (PIP3). Cały proces musi być zatem poprzedzony zwiększeniem puli PIP3, powstającej dzięki podwyższonej aktywności kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K) na skutek pobudzenia przez receptory dla czynników wzrostu, o charakterze kinaz tyrozynowych [Scheid i wsp. 2005].

Translokacji AKT–PDK1 do błony komórkowej towarzyszą zmiany konformacyjne AKT i fosforylacja przez PDK1 reszty treoniny w pozycji 308. białka AKT [Calleja i wsp. 2007]. Pełna aktywność AKT zostaje osiągnięta jednak dopiero po fosforylacji seryny 473. Za reakcję tę odpowiedzialna jest jedna z kinaz zaliczanych do grupy określanej jako PDK2. Sugeruje się, że proces ten zachodzi najczęściej dzięki kompleksowi mTORC, choć w tej roli wymienia się także kinazę IL (ILK) oraz aktywowaną przez kinazy MAP białkową kinazę 2 (MAPKAP2) [Calleja i wsp. 2007; Dong i Liu 2005].

Aby efektywnie oddziaływać z AKT obie kinazy PDK1 i PDK2 muszą znajdować się w stanie aktywnym tzn. ufosforylowanym [Casamayor i wsp. 1999]. Mechanizm, który wyjaśniałby, w jaki sposób dochodzi do aktywacji PDK2 pod wpływem czynników wzrostu, nie został dotąd poznany.

Ścieżka, w której podstawowym efektem jest kinaza AKT znajduje się pod ścisłą kontrolą szeregu czynników komórkowych, oddziałujących na wielu poziomach. Jednym z nich jest fosfataza odpowiedzialna za defosforylację PIP3 – PTEN. Niski poziom PIP3 sprawia, że AKT nie ulega translokacji do błony komórkowej, a co za tym idzie, nie może zostać efektywnie ufosforylowana [Hopkin i wsp. 1998].

Enzymem, który bezpośrednio hamuje aktywność kinazy AKT jest z kolei PP2A. Jest to powszechnie występująca w komórkach serynowo-treoninowa fosfataza, posiadająca szerokie spektrum substratów w tym AKT, ale także RAF czy MEK

[Gao i wsp. 2005]. Drugą fosfatazą zdolną częściowo dezaktywować kinazę AKT jest PHLPP, która defosforyluje krytyczną dla aktywności enzymu serynę 473. [Gao i wsp. 2005]. Innymi czynnikami, które mogą potencjalnie blokować aktywność AKT jest białko CTMP, a także TRB3. Dowiedziono, że białka te niezależnie od siebie zdolne są bezpośrednio łączyć się z kinazą PKB i tym samym uniemożliwiać jej fosforylację [Du i wsp. 2003; Maira i wsp. 2001]

Obserwowana w komórkach nowotworowych zwiększona aktywność AKT prowadzi do zwiększenia stanu ufosforylowania jej licznych substratów – w tym białek związanych z blokowaniem ścieżki proapoptotycznej. W konsekwencji zmienione nowotworowo komórki zyskują możliwość zignorowania sygnałów indukujących programowaną śmierć komórki i wejścia na tzw. ścieżkę przeżycia. Kinaza ta jest bowiem krytycznym mediatorem zależnego od czynników wzrostowych sygnału antyapoptotycznego [Yao i Cooper 1995].

Rozregulowaniu procesu apoptozy poprzez wzmożoną fosforylację takich czynników, jak wspomniane już XIAP, FOXO1, BIM, MDM2, BAD i kaspaza 9. towarzyszą również zmiany w aktywności białek regulujących cykl komórkowy i proliferację komórek. Czynniki WEE1 [Katayama i wsp. 2005], MYT1 [Okumura i wsp. 2002], P27 KIP1 [Liang i wsp. 2002], P27 WAT1/CIP1 czy GSK3 [Rössig i wsp. 2001], stanowiące kluczowe ogniwa dla progresji cyklu komórkowego to przykłady enzymów, których aktywność modulowana jest przez AKT. Sugeruje się zatem, że w sposób pośredni AKT inicjuje przejście komórek zarówno przez punkty kontrolne G1/S jak i G2/M.

Istotne znaczenie aktywacji szlaków pośredniczonych przez kinazy efektorowe ERK i AKT umożliwiających proliferację i promujących przeżycie komórek nowotworowych jak również ich udziału w patogenezie wielu guzów jest dobrze udokumentowane [Los i wsp. 2009; Junttila i wsp. 2008].

Jednym z czynników, który w warunkach fizjologicznych, zdolny jest aktywować zarówno ścieżkę kinaz MAP jak i fosfatydyloinozytolu jest gonadotropina kosmówkowa [Palaniappan i Menon 2010; Tai i wsp. 2009; Martinelle i wsp. 2004; Seger i wsp. 2001].

Jak wskazują badania nad rolą wolnej podjednostki beta gonadotropiny kosmówkowej, której syntezą charakteryzuje się szereg nowotworów różnego pochodzenia, może ona spełniać unikalną funkcję polegającą na stymulacji wzrostu guza i hamowaniu programowanej śmierci komórki [Jankowska i wsp. 2008 b; Hamada i wsp. 2005; Butler i Iles 2004; Butler i wsp. 1999; Lobel i wsp. 1999]. Mechanizm oddziaływania CGB na komórki nowotworowe nie jest jednak do końca poznany.

Zważywszy na fakt, iż w części guzów syntetyzujących CG i wolne podjednostki hormonu brak receptora dla ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej, przez który mogłaby wywierać biologiczny efekt, oraz że dotychczas nie wykazano wiązania wolnych podjednostek CG z LHCGR należy rozważyć możliwość alternatywnego mechanizmu działania hormonu [Jankowska i wsp. 2008 a].

Analiza czynności komórek steroidogennych gonady męskiej regulowanych przez gonadotropiny dowodzi, że CG wpływa na produkcję sterydów oraz na proliferację i apoptozę komórek w mechanizmie związanym z aktywacją ERK i AKT [Tai i wsp. 2009; Martinelle i wsp. 2004]. Podobnie regulując poziom receptora naskórkowego czynnika wzrostu i aktywując ERK i AKT gonadotropiny promują także wzrost komórek nabłonkowych jajnika [Palaniappan i Menon 2010; Seger i wsp. 2001].

Aktywacja przez CG szlaków sygnałowych, w których kinazami efektorowymi są ERK1/2 i AKT regulujące procesy proliferacji i apoptozy komórek w gonadach sugeruje, że prawdopodobnie także w komórkach nowotworowych hormon i jego wolne podjednostki mogą indukować szlaki przekazywane przez te kinazy.

2. Cel pracy

Celem zaplanowanych badań było wykazanie działania podjednostki beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (CGB) przez stymulację kinaz białkowych regulowanych sygnałem zewnątrzkomórkowym (ERK) i kinaz aktywowanych w szlaku fosfatydyloinozytolu (AKT).

Jako model raka w badaniach *in vitro* wykorzystano dwie linie komórkowe wywodzące się z raka jajnika: SKOV-3 charakteryzującą się brakiem ekspresji receptora dla gonadotropiny kosmówkowej i hormonu lueinizującego oraz OVCAR-3 wykazującą ekspresję tego receptora.

Założony cel realizowano poprzez:

1. Uzyskanie nadekspresji CGB w komórkach obu linii poprzez transfekcję wektorem ekspresyjnym z wklonowanym genem kodującym wolną podjednostkę ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (CGB5).
2. Ocenę wpływu nadekspresji CGB5 na komórki (analiza cyklu życiowego, proliferacji, apoptozy).
3. Analizę aktywności kinaz ERK i AKT w komórkach poddanych działaniu CGB.

3. Materiały i metody

3.1. Materiał

Materiał do badań stanowiły dwie linie komórkowe raka jajnika SKOV-3 (HTB-77TM, ATCC) i OVCAR-3 (HTB-161TM, ATCC), charakteryzujące się odpowiednio brakiem i obecnością receptora dla ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej – LHCGR.

3.2. Metody

3.2.1. Hodowla komórek

Komórki linii OVCAR-3 utrzymywane były w hodowli według zaleceń dystrybutora – ATCC, w pełnym medium hodowlanym RPMI (PAN-Biotech GmbH) z 0,01 mg/ml insuliny bydlęcej (Gibco), 10% surowicy cielęcej (Gibco), 2 mmol/l L-glutaminy (Gibco), 100 U/ml penicyliny (Gibco) i 100 µg/ml streptomycyny (Gibco).

Druga z analizowanych linii komórkowych – SKOV-3, hodowana była w medium McCoy (CytoGen) z dodatkiem 10% surowicy cielęcej (Gibco), 2 mmol/l L-glutaminy (Gibco), 100 U/ml penicyliny (Gibco) i 100 µg/ml streptomycyny (Gibco).

Komórki obu linii hodowano w inkubatorze w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂ i 100% wilgotności.

3.2.2. Przygotowanie wektora kodującego gen *CGB5*

W celu przygotowania wektora ekspresyjnego zawierającego sekwencję kodującą CGB użyto całkowity RNA wyizolowany z łożyska, pochodzący z archiwum Katedry i Zakładu Biologii Komórki Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. RNA wykorzystano do syntezy cDNA, na matrycy którego, z zastosowaniem specyficznych genowo starterów, stosując technikę PCR powielono sekwencję genu *CGB5*. Otrzymany produkt PCR stanowił insert, który wklonowano do wektora ekspresyjnego pcDNA3 (Invitrogen).

3.2.2.1. Odwrotna transkrypcja

Do syntezy cDNA używano 1 µg RNA oraz uniwersalny starter oligo(dT). Mieszaninę inkubowano w temperaturze 60°C 10 minut, po czym umieszczano na lodzie na około 5 minut. Następnie dodawano odwrotną transkryptazę (Roche Diagnostics), mieszaninę deoksyrybonukleotydów, bufor do odwrotnej transkrypcji oraz inhibitor RNaz – RNasin. Do syntezy cDNA używano odczynników firmy Roche Diagnostics. Szczegółowy opis stężeń poszczególnych składników mieszaniny reakcyjnej do syntezy cDNA, której całkowita objętość wynosiła 20 µl opisano w tabeli pierwszej.

Tabela 1. Zestawienie składników używanych do reakcji odwrotnej transkrypcji.

składnik	ilość/stężenie końcowe
całkowity RNA	1 µg
starter oligo(dT) ₁₀ (Genomed)	5 pmol/µl
mieszanina dNTP (Novazym)	5 pmol/µl
inhibitor RNaz – RNase Inhibitor (Roche Diagnostics)	1 U
bufor do odwrotnej transkrypcji (Roche Diagnostics)	1X
odwrotna transkryptaza – Transcriptor (Roche Diagnostics)	20 U
woda wolna od RNaz	do objętości 20 µl

Odwrotna transkrypcja przeprowadzana była w następujących warunkach:

1. hybrydyzacja startera (25°C, 10 minut);
2. reakcja enzymatycznej syntezy cDNA na matrycy RNA (55°C, 30 minut);
3. inaktywacja enzymu (85°C, 10 minut).

Po zakończeniu reakcji syntezy uzyskane cDNA przenoszono na lód lub przechowywano w temperaturze -20°C do czasu wykonania PCR.

3.2.2.2. Amplifikacja genu *CGB5*

Produkt reakcji odwrotnej transkrypcji był wykorzystany jako matryca w łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) z użyciem specyficznych starterów (syntetyzowanych przez TibMolBiol), dobranych w taki sposób, aby produkt reakcji stanowił kompletne komplementarne DNA genu *CGB5*, a zarazem by na końcach 5' i 3' produktu wprowadzić miejsca rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne *BamHI* i *HindIII*.

Gen *CGB5* [NCBI: NM_000737] został wybrany do doświadczeń ze względu na fakt, iż w komórkach syntetyzujących CGB charakteryzuje się wysoką ekspresją [Hotakainen i wsp. 2007; Rull i Laan 2005].

Charakterystykę starterów i warunki PCR przedstawiają tabele druga i trzecia. Profil termiczny prowadzonej reakcji zamieszczono w tabeli czwartej.

Tabela 2. Sekwencje starterów użytych do amplifikowania genu *CGB5*.

nazwa startera	sekwencja startera
<i>CGB5_HindIII_sensowy</i>	5'-CAAAGCTTAGATGTTCCAGGGGCTG-3'
<i>CGB5_BamHI_antysensowy</i>	5'-GGGATCCTTGTGGGAGGATCGGGGTG-3'

Tabela 3. Zestawienie składników wymaganych do reakcji PCR, powielającej *CGB5*.

składnik	stężenie końcowe
starter <i>CGB5_HindIII_sensowy</i> (Tib MolBiol)	400 nM
starter <i>CGB5_BamHI_antysensowy</i> (Tib MolBiol)	400 nM
mieszanina deoksyrybonukleotydów (Novazym)	400 nM
enhancer (Bioline)	1X
bufor (Bioline)	1X
MgCl ₂ (Bioline)	3 mM
polimeraza BioXAct (Bioline)	1 U
woda wolna od DNaz	dopełniona do 25 µl

Tabela 4. Profil temperaturowy zastosowany w reakcji PCR amplifikacji genu *CGB5*.

etap	temperatura	czas	liczba cykli
wstępna denaturacja	95°C	10 min	1
denaturacja	95°C	30 s	40
hybrydyzacja starterów	57°C	30 s	
elongacja	72°C	30 s	
elongacja	72°C	5 min	1

Otrzymane produkty PCR zostały sprawdzone pod względem jakościowym poprzez rozdział w żelu agarowym, a następnie oczyszczone z zastosowaniem zestawu AxyPrep PCR Clean-up Kit (Axygen) według następującej procedury:

1. dodanie do produktu PCR 100 µl buforu PCR-A i mieszanie poprzez wytrząsanie;
2. przeniesienie przygotowanej mieszaniny na kolumnkę z filtrem umieszczoną w probówce typu eppendorf, a następnie wirowanie (12000 g, 1 min);
3. odrzucenie przesączu i przemycie kolumnki 700 µl buforu W2, wirowanie (12000 g, 1 min);

4. odrzucenie filtratu i ponowne przemycie kolumnienki 400 μ l buforu W2, wirowanie (12000 g, 1 min);
5. przeniesienie kolumnienki do nowej probówki typu eppendorf;
6. podanie na kolumnienkę 30 μ l wody wolnej od DNaz (podgrzanej uprzednio do temperatury 65°C) i inkubacja w temperaturze pokojowej przez 1 minutę;
7. wirowanie (12000 g, 1 min) i zebranie filtratu, który zawierał oczyszczony produkt PCR.

3.2.2.3. Cięcie enzymami restrykcyjnymi i ligacja

Oczyszczony produkt PCR poddany został jednoczesnemu cięciu enzymami restrykcyjnymi FastDigest: *BamHI* (Fermentas) i *HindIII* (Fermentas) przez 5 minut w 37°C. W tych samych warunkach restrykcji z jednoczesną defosforylacją poddany został również plazmid pcDNA3 użyty w procedurze klonowania. Charakterystykę obu reakcji przedstawia tabela piąta.

Tabela 5. Zestawienie składników wymaganych do reakcji cięcia restrykcyjnego.

składnik	ilość dodana podczas cięcia DNA plazmidowego	ilość dodana podczas cięcia produktu PCR
bufor FastDigest 10X	2 μ l	2 μ l
DNA	1 μ g	10 μ l
enzym FastDigest <i>BamHI</i>	1 U	1 U
enzym FastDigest <i>HindIII</i>	1 U	1 U
enzym FastAP (alkaliczna fosfataza) (Fermentas)	1 μ l	-
woda wolna od nukleaz	dopełnione do 20 μ l	dopełnione do 30 μ l

Cięty enzymami restrykcyjnymi produkt PCR oczyszczano z zastosowaniem zestawu AxyPrep PCR Clean-up Kit i procedury opisanej powyżej, natomiast poddany restrykcji plazmid oczyszczano z zastosowaniem zestawu High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Diagnostics) stosując następującą procedurę:

1. przeniesienie mieszaniny reakcyjnej na kolumnienkę GeneJET™ umieszczoną w probówce zbiorczej typu eppendorf, wirowanie (12000 g, 1 min);
2. odrzucenie supernatantu i naniesienie na kolumnienkę 500 μ l buforu przemywającego, wirowanie (12000 g, 1 min);

3. odrzucenie filtratu i ponowne przemycie kolumnienki 500 μ l buforem myjącym, wirowanie (12000 g, 1 min);
4. odrzucenie filtratu i przeniesienie kolumnienki do nowej probówki zbiorczej typu eppendorf;
5. podanie na kolumnienkę 50 μ l wody wolnej od DNaz i wirowanie (12000 g, 1 min);
6. zebranie filtratu zawierającego oczyszczony plazmid.

Oczyszczony plazmid i produkt PCR połączono w procesie ligacji prowadzonej przez godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie enzym inaktywowano w 65°C przez 10 minut. Warunki reakcji przedstawia tabela szоста.

Tabela 6. Zestawienie składników wymaganych do reakcji ligacji.

składnik	ilość dodana
bufor do ligacji 10X (Fermentas)	2 μ l
DNA plazmidowe	200 ng
produkt PCR	40 ng
enzym T4 DNA Ligase (Fermentas)	5 U
woda wolna od nukleaz	dopełniona do objętości 20 μ l

3.2.3. Transformacja komórek kompetentnych wektorem kodującym gen *CGB5*

W celu namnożenia wektora zawierającego insert kodujący *CGB5* komórki kompetentne *E. coli* szczepu TG1 (Zymo Research) transformowano przygotowanym (tak jak opisano to powyżej) plazmidem metodą szoku cieplnego według następującej procedury:

1. rozmrożenie komórek kompetentnych na lodzie (10 min);
2. dodanie do mieszaniny komórek kompetentnych 100 ng plazmidowego DNA;
3. inkubacja mieszaniny na lodzie (10 min);
4. szok cieplny (42°C, 2 min);
5. inkubacja na lodzie (10 min);
6. dodanie do bakterii 1 ml pożywki LB (1% bakto-trypton, Becton Dickinson; 0,5% wyciąg drożdżowy, Becton Dickinson; 0,5% NaCl, POCH; 1 mM NaOH, POCH), niezawierającej antybiotyków selekcyjnych;
7. inkubacja bakterii w temperaturze 37°C z wytrząsaniem przez 1,5 godziny;

8. wirowanie komórek (850 rpm, 3 min);
9. odrzucenie supernatantu i pozostawienie około 100 µl osadu bakteryjnego;
10. przeniesienie bakterii na płytkę Petriego z zestalonym podłożem LB z 1,7% agarem (Becton Dickinson) z dodatkiem 100 µg/ml ampicyliny (BioRad);
11. hodowla bakterii w temperaturze 37°C przez noc.

3.2.4. Namnażanie wektora kodującego gen *CGB5*

Po zakończeniu hodowli bakteryjnej na płytkach Petriego (Sarstedt) pojedyncze kolonie przenoszono do 5 ml pożywki płynnej LB z 100 µg/ml ampicyliny i wytrząsając hodowano w 37°C. Po osiągnięciu przez komórki bakteryjne fazy wzrostu logarytmicznego mieszaninę wirowano (3500 g, 10 min, 4°C), a osad komórek bakteryjnych wykorzystano do izolacji DNA plazmidowego przy użyciu zestawu do izolacji High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Diagnostics) stosując następującą procedurę:

1. zawieszenie osadu w 250 µl buforu z RNazą A;
2. dodanie 250 µl buforu do lizy i delikatne mieszanie poprzez odwracanie probówki;
3. dodanie 350 µl roztworu neutralizującego i mieszanie (jak wyżej);
4. wirowanie (12000 g, 5 min);
5. przeniesienie supernatantu na kolumnkę GeneJET™ umieszczoną w probówce typu eppendorf;
6. wirowanie (12000 g, 1 min);
7. odrzucenie supernatantu i naniesienie na kolumnkę 500 µl buforu myjącego;
8. wirowanie (12000 g, 1 min)
9. odrzucenie filtratu i ponowne przemycie kolumnki 500 µl buforem myjącym połączonym z wirowaniem (12000 g, 1 min);
10. odrzucenie filtratu i przeniesienie kolumnki do nowej probówki typu eppendorf
11. podanie na kolumnkę 50 µl wody wolnej od DNaz i wirowanie (12000 g, 1 min);
12. zebranie filtratu zawierającego oczyszczony plazmid i przeniesienie go do nowej probówki.

Wyizolowane plazmidy sprawdzano pod względem jakościowym i ilościowym stosując rozdział elektroforetyczny w 0,8% żelu agarozowym i ocenę spektrofotometryczną. Obecność insertu potwierdzono za pomocą cięcia enzymami restrykcyjnymi *BamHI* i *HindIII* i rozdziału mieszaniny reakcyjnej w żelu agarozowym. Ponadto poprawność klonowania sprawdzano poprzez sekwencjonowanie konstruktów w Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza, zarówno ze starterem sensowym jak i antysensowym wykorzystanymi do klonowania produktów opisanych w tabeli drugiej.

Tak przygotowane plazmidy posłużyły do transfekcji komórek raka jajnika linii SKOV-3 i OVCAR-3.

3.2.5. Transfekcja komórek linii OVCAR-3 i SKOV-3

Aby wprowadzić do komórek linii OVCAR-3 i SKOV-3 konstrukt kodujący gen *CGB5* zastosowano nośnik liposomalny TurboFect (Fermentas). Dzień przed planowaną transfekcją komórki pasażowano na płytki sześciodołkowe (średnica 35 mm, Sarstedt), podając 100 tysięcy komórek do każdego dołka tak, aby następnego dnia uzyskać konfluencję 80%.

Procedura transfekcji przebiegała zgodnie z procedurą dostarczoną przez producenta nośnika liposomalnego i polegała na zwieszeniu 2 µg przygotowanego wcześniej DNA plazmidowego (z wklonowanym genem *CGB5*) w 200 µl medium hodowlanego RPMI lub McCoy bez surowicy, a następnie dodaniu do mieszaniny 3 µl roztworu TurboFect i wymieszaniu. Mieszaninę inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Po upływie tego czasu mieszaninę podawano na płytki z komórkami, zawierające 2 ml świeżego pełnego medium hodowlanego.

W celu monitorowania wydajności transfekcji, stosując opisaną powyżej procedurę, wykonywano równoległą transfekcję komórek plazmidem z genem reporterowym kodującym białko zielonej fluorescencji (EGFP) zakupionym z kolekcji Invitrogen. Tym samym wydajność transfekcji komórek oceniano na podstawie fluorescencji białka EGFP w komórkach kontrolnych. Transfekowane komórki analizowano po dwudziestu czterech, czterdziestu ośmiu i siedemdziesięciu dwóch godzinach od momentu transfekcji.

3.2.6. Analiza ekspresji badanych genów na poziomie mRNA

3.2.6.1. Izolacja całkowitego RNA

Po zakończonej hodowli – dwadzieścia cztery, czterdzieści osiem lub siedemdziesiąt dwie godziny po transfekcji – całkowity RNA z komórek izolowano używając odczynnika TriPure Isolation Reagent (Roche Diagnostics) według następującej procedury:

1. usunięcie medium z nad komórek;
2. zawieszenie komórek na płytce hodowlanej w 0,5 ml TriPure Isolation Reagent i inkubacja (5 min, 21°C), zebranie lizatu komórkowego do probówek;
3. dodanie 0,1 ml chloroformu, wytrząsanie 15 sekund i inkubacja 3 minuty w temperaturze pokojowej;
4. wirowanie (12000 g, 15 min, 4°C);
5. przeniesienie odseparowanej górnej wodnej fazy do nowej probówki oraz precypitacja RNA poprzez dodanie 0,5 ml alkoholu izopropylowego i inkubację przez 10 minut w temperaturze pokojowej;
6. wirowanie (12000 g, 15 min, 4°C);
7. usunięcie supernatantu i przemywanie osadu RNA 1 ml 75% alkoholu etylowego;
8. wirowanie (12000 g, 10 min, 4°C);
9. usunięcie supernatantu i suszenie osadu na powietrzu przez około 10 minut;
10. rozpuszczenia RNA w 20 µl wolnej od RNaz wody i inkubacja 10 minut w 60°C.

Uzyskany w ten sposób RNA analizowano jakościowo i ilościowo poprzez pomiar spektrofotometryczny i rozdział elektroforetyczny 1% żelu agarozowym w warunkach denaturujących i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu dalszych analiz.

3.2.6.2. Odwrotna transkrypcja

RNA wyizolowane z transfekowanych komórek OVCAR-3 i SKOV-3 poddano reakcji odwrotnej transkrypcji według procedury opisanej w punkcie 3.2.2.1.

3.2.6.3. qPCR

Wpływ nadekspresji *CGB* na komórki linii SKOV-3 i OVCAR-3 oceniano na podstawie analizy poziomu ekspresji genów kodujących kinazy ERK (*ERK1*, *ERK2*) i AKT (*AKT1*, *AKT2*, *AKT3*), a także genów *CGA*, *LHCGR*, *MKI67*, *BIRC5*, *BAX* i *BCL2*. W tym celu przeprowadzono łańcuchową reakcję polimerazy DNA z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym (qPCR). Zastosowanie tej techniki pozwoliło też oszacować osiągnięty względny poziom nadekspresji *CGB*.

Jako matrycy do amplifikacji fragmentów wybranych genów użyto cDNA uzyskanego w reakcji odwrotnej transkrypcji i specyficznych genowo starterów opisanych w tabeli siódmej.

Względny poziom ekspresji wszystkich genów, za wyjątkiem genu *CGA*, oceniany był w reakcji qPCR przy użyciu specyficznych sond i przyrównywany do ekspresji genu referencyjnego *HPRT* kodującego fosforybozylotransferazę hipoksantynowo-guaninową, którego poziom również oceniano stosując odpowiednią sondę. Ekspresję genu *CGA* oceniano natomiast na podstawie reakcji qPCR z użyciem fluorochromu SybrGreen i przyrównywano do ekspresji genu *HPRT* mierzonej tą samą techniką.

Warunki reakcji qPCR z użyciem Light Cycler TaqMan Master i sond hydrolizujących przedstawiają tabele ósma i dziewiąta, natomiast warunki i profil temperaturowy reakcji z użyciem SybrGreen przedstawiają tabele dziesiąta i jedenasta.

Wydajność reakcji qPCR określano na podstawie krzywych wzorcowych generowanych dla każdego z analizowanych genów i genu referencyjnego zarówno w reakcji z zastosowaniem sond hydrolizujących jak i SybrGreen. Krzywe wzorcowe wyznaczono przez wykonanie serii kolejnych rozcieńczeń cDNA otrzymanego w reakcji odwrotnej transkrypcji z użyciem uniwersalnego startera oligo(dT)₁₀ z całkowitego RNA wyizolowanego z łożyska. Dziesiętne rozcieńczenia cDNA obejmowały zakres od 1 do 1:100 000. Przygotowane w ten sposób rozcieńczenia matrycy poddano amplifikacji zgodnie z procedurami opisanymi w tabelach 8–11.

Otrzymane podczas qPCR dane analizowano stosując oprogramowanie LightCycler® Data Analysis Software wer. 4.0.5.415., a wygenerowane w postaci Cr (stosunek natężenia ekspresji genu badanego względem ekspresji genu referencyjnego) wyniki opisano w pracy jako względny poziom ekspresji genów.

Tabela 7. Charakterystyka starterów i sond użytych do reakcji qPCR.

gen	sekwencja startera sensowego	sekwencja startera antysensowego	Sonda
<i>AKT1</i>	5'-GGCTATTGTGAAGGAGGGTTG-3'	5'-TCCTTGTAGCCAATGAAGGTG-3'	#69 (Roche Diagnostics UPL)
<i>AKT2</i>	5'-TGGATTCTCCAGACGAGAGG-3'	5'-ACTTGTAGTCCATGGGGTCCT-3'	#57 (Roche Diagnostics UPL)
<i>AKT3</i>	5'-CAGATGTCTCCAGTGGACTACTGTT-3'	5'-GGATAGCTTCTGCCATTCTTCC-3'	#6 (Roche Diagnostics UPL)
<i>ERK1</i>	5'-CCCTAGCCCAGACAGAGATC-3'	5'-GCACAGTGTCCATTTTCTAACAGT-3'	#57 (Roche Diagnostics UPL)
<i>ERK2</i>	5'-CCGTGACCTGAAGCCTTC-3'	5'-GCCAGGCCAAAGTCACAG-3'	#62 (Roche Diagnostics UPL)
<i>MKI67</i>	5'-AGTAACGCGGAGTGTCAAGAG-3'	5'-TCACTGTCCCTATGACTTCTGG-3'	#30 (Roche Diagnostics UPL)
<i>BAX</i>	5'-ATGTTTTCTGACGGCAACTTC-3'	5'-ATCAGTTCCGGCACCTTG-3'	#57 (Roche Diagnostics UPL)
<i>BCL2</i>	5'-TACCTGAACCGGCACCTG-3'	5'-GCCGTACAGTTCCACAAAGG-3'	#75 (Roche Diagnostics UPL)
<i>BIRC5</i>	5'-TCTGCTTCAAGGAGCTGGA 3'	5'-AAAGTGCTGGTATTACAGGCGTA-3'	#36 (Roche Diagnostics UPL)
<i>CGB</i>	5'-TACTGCCCCACCATGACC-3'	5'-CACGGCGTAGGAGACCAC-3'	#71 (Roche Diagnostics UPL)
<i>LHCGR</i>	5'-CACTCGACTATCATCTGCCTACCTCC-3'	5'-GAAAAGCATTTCTGGTATGGTGG-3'	6FAM-CAGGCATCAGAAAGTTTCCAGATGTTACGA-BBQ (TIB MOLBIOL)
<i>HPRT</i>	Human HPRT Gene Assay Cat. No. 05 046 157 001 (Roche Diagnostics)		
<i>CGA</i>	5'-CTGATGTGCAGGATTGCC-3'	5'-CCCCATTACTGTGACCCTGTTATATG-3'	-
<i>HPRT</i>	5'-TGAAGAGCTATTGTAATGACCAGT-3'	5'-CAAATCCAACAAAGTCTGGC-3'	-

Tabela 8. Warunki reakcji qPCR przeprowadzone przy użyciu Light Cycler TaqMan Master i sond hydrolizujących.

składnik	stężenie końcowe
cDNA	5 µl
mieszanina starterów sensowego i antysensowego	0,5 pmol/µl
sonda hydrolizująca	0,1 µM
mieszanina LightCycler FastStart TaqMan Reaction Mix zawierająca polimerazę, dNTPs, MgCl ₂	1x
woda	dopełnione do objętości 20 µl

Tabela 9. Profil temperaturowy reakcji qPCR z użyciem Light Cycler TaqMan Master i sond hydrolizujących.

liczba cykli	etap	warunki reakcji w poszczególnych etapach	pomiar fluorescencji
1	preinkubacja	95°C, 10 min	brak
45	denaturacja	95°C, 10 s	brak
	hybrydyzacja starterów z jednoczesną elongacją	60°C, 20 s	brak
	pomiar fluorescencji	72°C, 1 s	pojedynczy
1	chłodzenie	40°C, 30 s	brak

Tabela 10. Warunki reakcji qPCR przeprowadzone przy użyciu SybrGreen.

składnik	stężenie końcowe
cDNA	2 µl
mieszanina starterów sensowego i antysensowego	0,5 pmol/l
jony Mg ²⁺	3,5 mmol/l
mieszanina LightCycler FastStart DNA zawierająca polimerazę, SybrGreen, dNTPs, MgCl ₂	1X
woda	dopełnione do objętości 20 ul

Tabela 11. Profil temperaturowy reakcji qPCR z użyciem SybrGreen dla genów *CGA* i *HPRT*.

liczba cykli	etap	warunki reakcji w poszczególnych etapach	
		HPRT	CGA
1	preinkubacja	95°C, 10 min	
45	denaturacja	95°C, 10 s	
	hybrydyzacja starterów	54°C, 5 s	55°C, 5 s
	elongacja	72°C, 9 s	72°C, 8 s
	pomiar fluorescencji	88°C, 2 s	
1	krzywa topnienia (pomiar ciągły co 0,2 s, rampling 20 °C/s)	od 65°C do 95°C	
1	chłodzenie	40°C, 30 s	

3.2.7. Ocena wpływu rekombinowanego białka podjednostki beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (rCGB) na komórki linii OVCAR-3 i SKOV-3

W celu oceny wpływu egzogennej podjednostki beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej na aktywację kinaz ERK i AKT komórki linii OVCAR-3 i SKOV-3 inkubowano z rekombinowanym białkiem CGB (rCGB) (Sigma Aldrich).

Dwadzieścia cztery godziny przed planowaną stymulacją komórki pasażowano na płytki sześciodołkowe. Następnie hodowano przez dwanaście godzin w pełnym medium w warunkach opisanych w punkcie 3.2.1. Przez kolejne dwanaście godzin komórki hodowano w medium pozbawionym surowicy, a po upływie tego czasu do medium dodawano roztwór białka rCGB tak, aby uzyskać stężenie końcowe 100 ng/ml. Komórki OVCAR-3 i SKOV-3 inkubowano z rCGB przez pięć, piętnaście i trzydzieści minut, a następnie zbierano w celu izolacji białek.

Czas inkubacji komórek z rCGB i jego stężenie dobrano na podstawie danych literaturowych [Hudelist i wsp. 2010; Prast i wsp. 2008].

3.2.8. Ocena wpływu rekombinowanego białka podjednostki beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (rCGB) na komórki linii OVCAR-3 i SKOV-3 z jednoczesnym zablokowaniem kinaz MEK i PI3K

Aby potwierdzić specyficzność aktywacji kinaz ERK i AKT w komórkach poddawanych stymulacji rekombinowanym białkiem CGB zastosowano specyficzne inhibitory kinaz MEK i PI3K fosforylujących odpowiednio ERK i AKT. Inkubację komórek OVCAR-3 i SKOV-3 z rCGB przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 3.2.7., jednak godzinę przed podaniem rekombinowanego białka CGB do medium hodowlanego dodawano inhibitory kinaz MEK – U0126 (Cell Signaling) i PI3K – LY294002 (Cell Signaling) o stężeniach końcowych odpowiednio 10 μ M i 50 μ M.

3.2.9. Analiza aktywności wybranych genów na poziomie białka i poziomu fosforylacji kinaz ERK i AKT

Ekspresję białek CGB, ERK, AKT a także stopień ufosforylowania kinaz ERK (p-ERK) i AKT (p-AKT) oceniano metodą western blot z specyficznymi przeciwciałami.

3.2.9.1. Izolacja białek

Po zakończonej hodowli – dwudziestu czterech, czterdziestu ośmiu i siedemdziesięciu dwóch godzinach po transfekcji lub pięciu, piętnastu, trzydziestu minutach po stymulacji rCGB – płytki z komórkami umieszczano na lodzie, medium nad komórek usuwano, a szalki przemywano 500 μ l zimnego PBS (PAN-Biotech GmbH). Następnie, w obecności 1 ml świeżego zimnego PBS komórki zbierano z szalek i przenoszono do probówek typu eppendorf. Zawiesinę komórek wirowano (1000 rpm, 5 min, 20°C), supernatant usuwano, a do osadu dodawano 50 μ l mieszaniny PBS z dodatkiem 10% buforu RIPA (Millipore) i 10% inhibitora proteaz (Sigma Aldrich). Mieszaninę wytrząsano (15 min, 4°C), a następnie wirowano (14000 g, 15 min, 4°C). Supernatant zawierający białka przenoszono do nowych probówek.

Pomiar stężenia białek w uzyskanym ekstrakcie białkowym mierzono metodą Bradford wykorzystując odczynnik Quick Start Bradford Dye Reagent (BioRad) według zaleceń producenta. Próby przechowywano w -20°C do czasu dalszych analiz.

3.2.9.2. Elektroforetyczny rozdział i transfer białek

Przygotowane ekstrakty białkowe poddawane były rozdzielaniu elektroforetycznemu w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących, którego charakterystykę podano w tabeli dwunastej.

Tabela 12. Charakterystyka żelu poliakrylamidowego do elektroforezy białek.

składnik	żel zagęszczający	żel rozdzielający
mieszanka akrylamidu (39%) i bisakrylamidu (1%)	1,3 ml	6,0 ml
bufor do żelu zagęszczającego (0,5 M Tris/HCl, Sigma Aldrich; pH 6,8)	2,5 ml	–
bufor do żelu rozdzielającego (1,5 M Tris/HCl, Sigma Aldrich; pH 8,8)	–	5,0 ml
siarczan dodecyłu sodu 10% (Sigma Aldrich)	100 µl	200 µl
woda	6,0 ml	8,7 ml
nadsiarczan amonu 10% (Sigma Aldrich)	50 µl	100 µl
<i>N,N,N',N'</i> -tetrametyloetylenodiamina (Sigma Aldrich)	10 µl	10 µl

Przed nałożeniem na żel każdą próbkę białka, w ilości 30 µg, mieszano z buforem obciążającym do elektroforezy białek (Laemmli, Sigma Aldrich) i inkubowano w bloku grzejmym w temperaturze 85°C przez 10 minut. Rozdział prowadzono w buforze do elektroforezy białek (o składzie: 2,5 mM Tris/HCl, Sigma Aldrich; 19,2 mM glicyna, POCH; Sigma Aldrich; 0,01% siarczan dodecyłu sodu, Sigma Aldrich) przez 45 minut przy napięciu 200V przy użyciu zestawu Mini-PROTEAN (BioRad).

Po zakończonej elektroforezie białka przenoszone były na zaktywowaną metanolem membranę z polifluorku winylidenu (Millipore) na drodze elektrotransferu w buforze do elektroforezy białek z 20% metanolem (POCH) 90 minut przy natężeniu 350 mA.

Następnie membranę inkubowano przez godzinę w buforze blokującym (Blocking Buffer, Sigma Aldrich) w temperaturze pokojowej, na mieszadle orbitalnym. Po tym czasie błonę poddawano godzinnej inkubacji z odpowiednimi przeciwciałami pierwszorzędowymi rozcieńczonymi do odpowiedniego stężenia w buforze blokującym.

Po inkubacji bufor z przeciwciałami usuwano, a membranę przemywano trzykrotnie buforem TBS-T (0,1%, Tween-20, Sigma Aldrich; 2,4% Tris/HCl, Sigma Aldrich; 8% NaCl, Sigma Aldrich). W następnym kroku membranę inkubowano godzinę z przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z peroksydazą chrzanową w odpowiednim rozcieńczeniu, również w buforze blokującym. Charakterystykę przeciwciał

wykorzystanych w pracy podano w tabeli trzynastej.

Niezwiazane przeciwciała odpłukiwano trzykrotnie buforem TBS-T. W celu uwidocznienia immunoreaktywnych prążków użyto substratu dla peroksydazy chrzanowej – Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz).

Do analizy densytometrycznej wykorzystano system G:BOX (Syngene) i program GeneSys (Syngene). Intensywność chemiluminescencji oceniana była względem tła. Uzyskane dla badanych białek i białka referencyjnego dehydrogenazy aldehydu fosfoglicerynowego (GAPDH) dane wyrażone w postaci Rv (natężenie sygnału w obrębie pola immunoreaktywnego prążka) analizowano następnie w programie Microsoft Excel. Wyniki stanowiące stosunek Rv białka badanego względem Rv białka referencyjnego opisano w pracy jako względną ekspresję/fosforylację białka.

Tabela 13. Charakterystyka stosowanych przeciwciał.

antygen	typ przeciwciała pierwszorzędowego	rozcieńczenie	typ przeciwciała drugorzędowego	rozcieńczenie
CGB	poliklonalne królicze anti-CGB (A0231, Dako)	1:1000	poliklonalne kozie antykrólicze sprzężone z peroksydazą chrzanową (A0448, Dako)	1:2000
ERK	poliklonalne królicze anti-ERK (sc-153, Santa Cruz)	1:1000	poliklonalne kozie antykrólicze sprzężone z peroksydazą chrzanową (A0448, Dako)	1:1000
AKT	poliklonalne królicze anti-AKT (sc-8312, Santa Cruz)	1:500	poliklonalne kozie antykrólicze sprzężone z peroksydazą chrzanową (A0448, Dako)	1:200
p-ERK	monoklonalne mysie anti-p-ERK (sc-7383, Santa Cruz)	1:200	poliklonalne kozie antymysie sprzężone z peroksydazą chrzanową (sc-2031, Santa Cruz)	1:500
p-AKT	poliklonalne królicze anti-p-AKT (sc-7985, Santa Cruz)	1:200	poliklonalne kozie antykrólicze sprzężone z peroksydazą chrzanową (A0448, Dako)	1:500
GAPDH	poliklonalne królicze anti-GAPDH (sc-25778, Santa Cruz)	1:1000	poliklonalne kozie antykrólicze sprzężone z peroksydazą chrzanową (A0448, Dako)	1:1000

3.2.10. Ocena cyklu życiowego komórek z zastosowaniem techniki cytometrii przepływowej

W celu oceny zmian w cyklu życiowym komórek OVCAR-3 i SKOV-3 poddanych transfekcji genem *CGB5* wykorzystano metodę cytometrii przepływowej. Transfekowane komórki oraz komórki grupy kontrolnej odtrawiano od podłoża roztworem trypsyny (0,05%, Gibco), następnie wirowano (3000 g, 5 min, 4°C) i dwukrotnie przemywano

zimnym roztworem PBS (PAN Biotech GmbH). W celu utrwalenia komórek osad komórkowy zawieszano w 1 ml 70% etanolu i inkubowano przez noc w 4°C. Po tym czasie komórki ponownie wirowano i zawieszono w 0,5 ml PBS. Aby oczyścić próbę z RNA do osadu dodano RNazę A (100 µg/µl, Sigma Aldrich) i całość inkubowano 30 minut w temperaturze pokojowej. Następnie komórki ponownie wirowano a supernatant usuwano. W celu wybarwienia DNA osad komórkowy zawieszono w roztworze jodku propidionowego (50 µg/ml, Sigma Aldrich) i inkubowano godzinę w temperaturze 4°C. Oceny cyklu komórkowego dokonano stosując cytometr przepływowy BD FACS Calibur (Becton Dickinson). Procentowy udział poszczególnych faz cyklu komórkowego: apoptozy, G0/G1, S i G2/M wyznaczano w grupie nie mniejszej niż 10 000 komórek, wykorzystując oprogramowanie BD Cell Quest™ Pro ver. 5.2.1.

3.2.11. Barwienie fluorescencyjne komórek OVCAR-3 i SKOV-3 z zastosowaniem barwników Hoechst 33342 i jodku propidionowego

W celu oceny liczby komórek apoptotycznych, nekrotycznych oraz komórek niezmiennych zastosowano metodę wykorzystującą dwa barwniki fluorescencyjne wiążące kwasy nukleinowe: jodek propidionowy i Hoechst 33342. Barwniki te różni możliwość penetracji przez błonę komórkową. O ile Hoechst przenika przez nieprzerwane błony komórkowe, barwiąc jądro na kolor niebieski, to jodek propidionowy wnika do komórek dopiero po uszkodzeniu integralności plazmalemmy i barwi jądra na kolor czerwony. Komórki po transfekcji konstruktem kodującym gen *CGB5* i komórki kontrolne wybarwiano mieszaniną zawierającą Hoechst (0,1 µg/ml, Sigma Aldrich) i jodek propidionowy (0,125 µg/ml, Sigma Aldrich). Barwienie umożliwiło ocenę kondensacji i/lub fragmentacji chromatyny jądrowej, świadczących o zachodzeniu procesu apoptozy (wybarwienie jądra na kolor niebieski) oraz przzerwania ciągłości błony komórkowej w procesie nekrozy (wybarwienie jądra na kolor czerwony). Proces apoptozy w komórkach transfekowanych i kontrolnych oceniano przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego wyposażonego w filtry UV-2A i FITC/FLUO-3 (Nikon Eclipse TE 200).

3.2.12. Ocena wzrostu liczby komórek transfekowanych genem *CGB5* w czasie rzeczywistym

Ocenę wzrostu liczby komórek w czasie rzeczywistym przeprowadzono stosując system xCELLigence (Roche Diagnostics), który monitoruje przyrost komórek na podstawie zmian impedancji elektrod umieszczonych w podłożu płytki hodowlanej. W celu analizy komórki pasażowano na szesnastodołkowe płytki xCELLigence E-Plate 16

(Roche Diagnostics), podając cztery tysiące komórek do każdego dołka. Komórki hodowano następnie przez 24 godziny, a po tym czasie transfekowano je plazmidem kodującym gen *CGB5*. Wzrost komórek kontrolnych i transfekowanych monitorowano przez kolejne siedemdziesiąt dwie godziny. Analizę wyników prowadzono używając oprogramowanie systemu xCELLigence – RTCA Software (Roche Diagnostics).

4. Wyniki

Wpływ wolnej podjednostki beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej na biologię komórek nowotworowych analizowano wykorzystując linie raka jajnika OVCAR-3 i SKOV-3 poddane transfekcji plazmidem z wklonowanym genem *CGB5*. Gen ten został wybrany do badań, ponieważ w komórkach wydzielających gonadotropinę kosmówkową, z grupy sześciu genów kodujących CGB, jest on jednym z najbardziej aktywnych transkrypcyjnie [Cocquebert i wsp. 2012; Hotakainen i wsp. 2007; Rull i Laan 2005].

Efekt nadekspresji CGB i jej oddziaływanie na komórki nowotworowe oceniano po dwudziestu czterech, czterdziestu ośmiu i siedemdziesięciu dwóch godzinach od transfekcji przeprowadzając następujące analizy:

1. poziomu nadekspresji CGB na poziomie RNA (ocenianego metodą qPCR) i białka (ocenianego metodą western blot);
2. relatywnej ekspresji podjednostki alfa gonadotropiny kosmówkowej (*CGA*) oraz receptora dla CG (*LHCGR*) na poziomie RNA (ocenianej metodą qPCR);
3. względnej ekspresji poszczególnych izoform kinaz ERK (*ERK1*, *ERK2*) i AKT (*AKT1*, *AKT2*, *AKT3*) na poziomie RNA (ocenianej metodą qPCR) oraz całkowitych frakcji białek ERK i AKT (ocenianej metodą western blot);
4. apoptozy i nekrozy komórek na podstawie oceny specyficznych cech morfologicznych (barwienie jodkiem propidionowym i Hoechst 33342);
5. cyklu komórkowego za pomocą techniki cytometrii przepływowej;
6. przyrostu liczby komórek korzystając systemu xCELLigence;
7. ekspresji markera proliferacji *MKI67* oraz czynników pro- i antyapoptotycznych: *BCL2*, *BAX*, *BIRC5* na poziomie mRNA (ocenianej metodą qPCR);
8. aktywacji kinaz białkowych ERK i AKT na podstawie densytometrycznej oceny stopnia fosforylacji tych białek przeprowadzonej metodą western blot.

Ponadto w celu sprawdzenia efektu aktywacji szlaków kinaz pod wpływem egzogenego działania CGB komórki linii OVCAR-3 i SKOV-3 inkubowano z rekombinowanym białkiem podjednostki beta gonadotropiny kosmówkowej (rCGB). Stopień fosforylacji kinaz badano po pięciu, piętnastu i trzydziestu minutach od podania rCGB do medium hodowlanego, a analizę przeprowadzono metodą western blot z przeciwciałami rozpoznającymi ufosforylowane formy kinaz ERK i AKT.

Dodatkowo, aby potwierdzić specyficzność aktywacji badanych kinaz pod wpływem rCGB zastosowano inhibitor kinazy MEK (U0126) i inhibitor kinazy PI3K (LY294002), odpowiedzialnych za fosforylację odpowiednio ERK w szlaku RAS/RAF/MEK/ERK i AKT w szlaku PI3K/AKT.

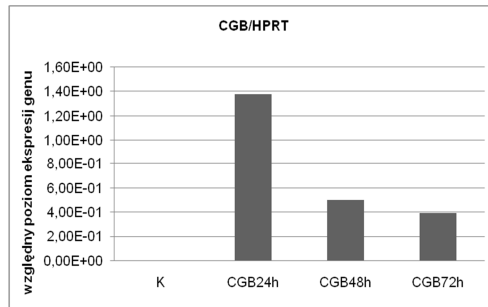
Wszystkie przedstawione w niniejszej pracy wyniki stanowią uśrednione wartości pochodzące z trzech niezależnych eksperymentów przeprowadzonych dla każdego typu analizy.

4.1. Ocena stopnia nadekspresji CGB w transfekowanych genem *CGB5* komórkach OVCAR-3 i SKOV-3

W celu oceny stopnia nadekspresji CGB w komórkach linii OVCAR-3 i SKOV-3 transfekowanych konstruktami z wklonowanym genem *CGB5* przeprowadzono analizy ekspresji badanego genu na poziomie RNA i białka.

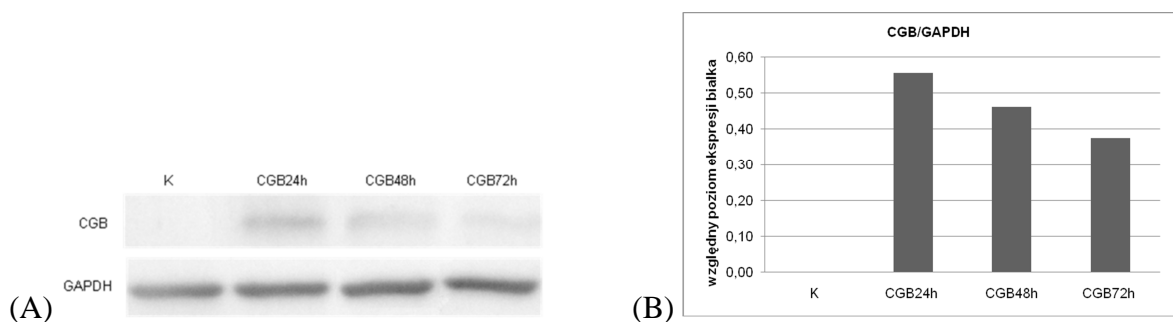
4.1.1. Ocena stopnia nadekspresji CGB w transfekowanych genem *CGB5* komórkach OVCAR-3

Transfekcja komórek linii OVCAR-3 konstruktami kodującymi gen *CGB5*, na poziomie RNA, pozwoliła osiągnąć maksymalnie prawie pięć tysięcy razy wyższą ekspresję podjednostki beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej niż w komórkach kontrolnych. Najwyższy poziom względnej ilości transkryptów *CGB* charakteryzował komórki analizowane po dwudziestu czterech godzinach od momentu transfekcji. Poziom syntetyzowanych transkryptów *CGB* w transfekowanych komórkach spadał w kolejnych godzinach trwania eksperymentu, jednak czterdzieści osiem i siedemdziesiąt dwie godziny po transfekcji był nadal średnio około półtora tysiąca razy wyższy w porównaniu do komórek kontrolnych, w których poziom ekspresji CGB wynosił $2,81 \times 10^{-4}$ (Ryc. 1).



Ryc. 1. Względny uśredniony poziom ekspresji genów *CGB* przyrównany do ekspresji genu referencyjnego *HPRT* w komórkach linii OVCAR-3 transfekowanych genem *CGB5* i komórkach kontrolnych (K – komórki kontrolne, nietransfekowane; CGB24h – komórki transfekowane oceniane po dwudziestu czterech godzinach; CGB48h – komórki transfekowane oceniane po czterdziestu ośmiu godzinach; CGB72h – komórki transfekowane oceniane po siedemdziesięciu dwóch godzinach).

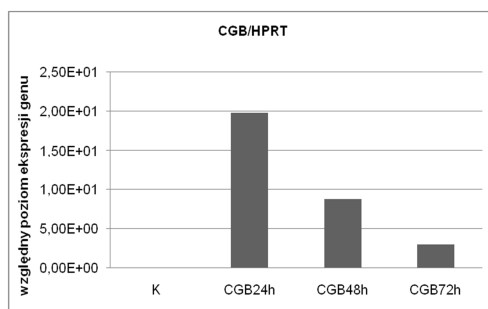
Poziom ekspresji białka podjednostki beta gonadotropiny kosmówkowej w nietransfekowanych komórkach OVCAR-3 był na tyle niski, iż niemożliwym było zmierzenie jego ilości metodą western blot połączoną z półilościową analizą densytometryczną. Próby wyizolowane z komórek transfekowanych konstruktem kodującym gen *CGB5*, analizowane metodą western blot odznaczały się natomiast wzrostem ilości produkowanego białka, wyrażającego się wyraźnym immunoreaktywnym sygnałem pojedynczego prążka o masie 32 kDa, charakterystycznego dla wolnej podjednostki beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej [Butler i Iles 2004]. Dowodzi to, że poziom tego białka znacząco wzrósł na skutek transfekcji komórek. Najwyższą ekspresję CGB odnotowano w dwudziestej czwartej godzinie po transfekcji. Poziom tego białka nieznacznie malał w czterdziestej ósmej godzinie trwania eksperymentu, a w siedemdziesiątej drugiej godzinie był półtorarazy niższy niż w próbach izolowanych z komórek dwadzieścia cztery godziny po transfekcji (Ryc. 2).



Ryc. 2. Analizowany metodą western blot (A) i oceniany densytometrycznie (B) względny uśredniony poziom białka CGB, przyrównany do ekspresji białka referencyjnego GAPDH w komórkach OVCAR-3 (K – komórki kontrolne, nietransfekowane; CGB24h – komórki transfekowane oceniane po dwudziestu czterech godzinach; CGB48h komórki transfekowane oceniane po czterdziestu ośmiu godzinach; CGB72h – komórki transfekowane oceniane po siedemdziesięciu dwóch godzinach).

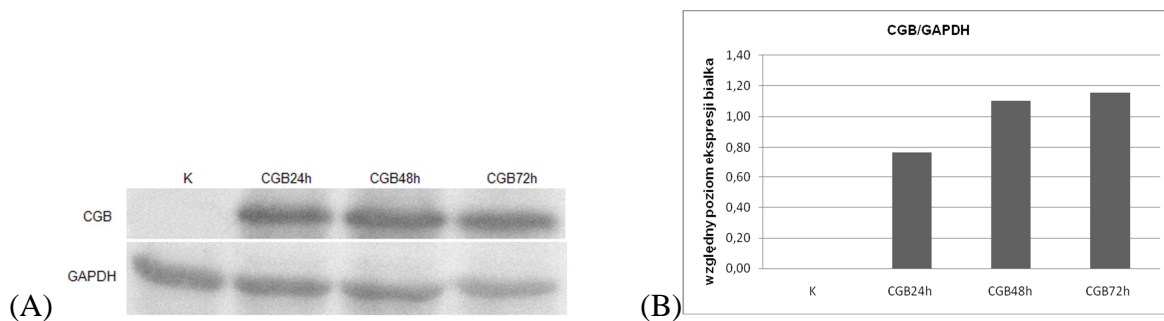
4.1.2. Ocena stopnia nadekspresji CGB w transfekowanych genem *CGB5* komórkach SKOV-3

Analiza ekspresji *CGB* metodą qPCR wykazała, że już w dwudziestej czwartej godzinie po wprowadzeniu konstruktów ekspresja genów kodujących podjednostkę beta gonadotropiny kosmówkowej w transfekowanych komórkach SKOV-3 była średnio ponad czternaście tysięcy razy wyższa niż w komórkach kontrolnych niepoddawanych transfekcji. Uzyskany poziom nadekspresji podjednostki beta CG w komórkach transfekowanych stopniowo malał, jednak przez cały czas trwania eksperymentu utrzymywał się na poziomie wyższym niż w kontroli tak, że w czterdziestej ósmej i siedemdziesiątej drugiej godzinie od momentu wprowadzenia do komórek konstruktów kodujących *CGB5*, był odpowiednio ponad sześć tysięcy i dwa tysiące razy wyższy niż w kontroli. Średni poziom ekspresji *CGB* w komórkach kontrolnych wynosił $1,4 \times 10^{-3}$ (Ryc. 3).



Ryc. 3. Względny uśredniony poziom ekspresji genów *CGB* przyrównany do ekspresji genu referencyjnego HPRT w komórkach linii SKOV-3 transfekowanych genem *CGB5* i komórkach kontrolnych (K – komórki kontrolne, nietransfekowane; CGB24h – komórki transfekowane oceniane po dwudziestu czterech godzinach; CGB48h – komórki transfekowane oceniane po czterdziestu ośmiu godzinach; CGB72h – komórki transfekowane oceniane po siedemdziesięciu dwóch godzinach).

O ile w komórkach kontrolnych SKOV-3 poziom białka podjednostki beta gonadotropiny kosmówkowej był na tyle niski, iż niemożliwym było wykazanie obecności *CGB* stosowaną metodą western blot, to komórki transfekowane charakteryzowały się podwyższonym poziomem tego białka, który utrzymywał się przez cały czas trwania eksperymentu. Jednocześnie między próbami zebrnymi dwadzieścia cztery godziny po transfekcji i zebrnymi po czterdziestu ośmiu i siedemdziesięciu dwóch godzinach od wprowadzenia konstruktów, wykazano wzrostową tendencję ilości produkowanego białka. Komórki oceniane po czterdziestu ośmiu i siedemdziesięciu dwóch godzinach od transfekcji miały półtora razy wyższy poziom białka *CGB* niż komórki zebrane po dwudziestu czterech godzinach od podania plazmidu (Ryc. 4).



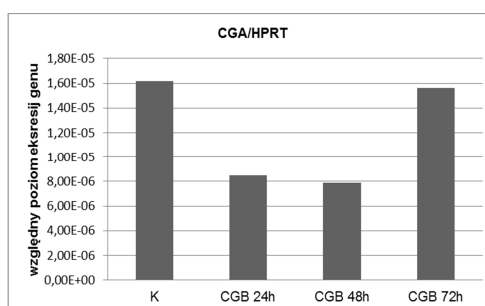
Ryc. 4. Analizowany metodą western blot (A) i oceniany densytometrycznie (B) względny uśredniony poziom białka CGB, przyrównany do ekspresji białka referencyjnego GAPDH w komórkach SKOV-3 (K – komórki kontrolne, nietransfekowane; CGB24h – komórki transfekowane oceniane po dwudziestu czterech godzinach; CGB48h komórki transfekowane oceniane po czterdziestu ośmiu godzinach; CGB72h – komórki transfekowane oceniane po siedemdziesięciu dwóch godzinach).

4.2. Ocena ekspresji genów kodujących podjednostkę alfa gonadotropiny kosmówkowej (CGA) oraz receptora dla hormonu luteinizującego i gonadotropiny kosmówkowej (LHCGR) w komórkach OVCAR-3 i SKOV-3 transfekowanych genem CGB5

Ekspresję genów *CGA* i *LHCGR* w badanych liniach komórkowych poddanych transfekcji plazmidem kodującym *CGB5* analizowano na poziomie RNA stosując metodę PCR w czasie rzeczywistym (qPCR).

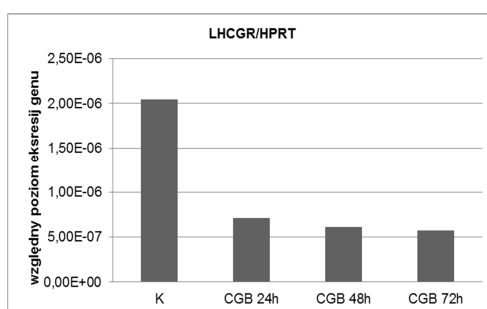
4.2.1. Ocena ekspresji *CGA* i *LHCGR* w transfekowanych genem *CGB5* komórkach OVCAR-3

W komórkach OVCAR-3 poddanych transfekcji genem kodującym podjednostkę beta CG zaobserwowano spadek aktywności genu *CGA* w dwudziestej czwartej i czterdziestej ósmej godzinie po transfekcji. Poziom ekspresji *CGA* był wówczas dwukrotnie niższy niż w kontroli. W siedemdziesiątej drugiej godzinie trwania eksperymentu powrócił on jednak do poziomu zbliżonego do tego obserwowanego w komórkach nietransfekowanych (Ryc. 5).



Ryc. 5. Względny uśredniony poziom ekspresji genu *CGA* przyrównany do ekspresji genu referencyjnego HPRT w komórkach linii OVCAR-3 transfekowanych genem *CGB5* i komórkach kontrolnych (K – komórki kontrolne, nietransfekowane; CGB24h – komórki transfekowane oceniane po dwudziestu czterech godzinach; CGB48h – komórki transfekowane oceniane po czterdziestu ośmiu godzinach; CGB72h – komórki transfekowane oceniane po siedemdziesięciu dwóch godzinach).

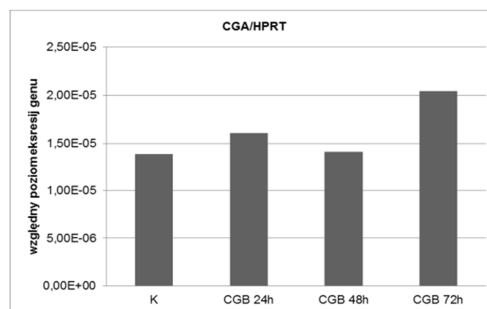
Linia komórkowa OVCAR-3 posłużyła w badaniach jako model komórek nowotworowych ponieważ posiada potwierdzoną ekspresję receptora dla gonadotropiny kosmówkowej [Gebauer i wsp. 2004]. Analiza RNA uzyskanego z komórek OVCAR-3 z nadekspresją *CGB* wykazała, że wysoki poziom wolnej podjednostki beta związany jest ze spadkiem względnego poziomu transkryptów genu kodującego receptor *LHCGR*. Przez cały czas trwania eksperymentu ekspresja tego genu w komórkach transfekowanych utrzymywała się na trzykrotnie niższym poziomie w porównaniu do komórek kontrolnych (Ryc. 6).



Ryc. 6. Względny uśredniony poziom ekspresji genu *LHCGR* przyrównany do ekspresji genu referencyjnego *HPRT* w komórkach linii OVCAR-3 transfekowanych genem *CGB5* i komórkach kontrolnych (K – komórki kontrolne, nietransfekowane; CGB24h – komórki transfekowane oceniane po dwudziestu czterech godzinach; CGB48h – komórki transfekowane oceniane po czterdziestu ośmiu godzinach; CGB72h – komórki transfekowane oceniane po siedemdziesięciu dwóch godzinach).

4.2.2. Ocena ekspresji *CGA* i *LHCGR* w transfekowanych genem *CGB5* komórkach SKOV-3

Analizy przeprowadzone metodą qPCR pokazały, że w linii komórkowej SKOV-3 zwiększona ekspresja *CGB* ma nieznaczny wpływ na poziom transkryptów podjednostki alfa gonadotropiny kosmówkowej w komórkach. O ile w dwudziestej czwartej i czterdziestej ósmej godzinie po transfekcji względny poziom ekspresji *CGA* był niemal identyczny z poziomem obserwowanym dla prób kontrolnych, to w siedemdziesiątej drugiej godzinie średni poziom ekspresji *CGA* był półtora razy wyższy niż w kontroli (Ryc. 7).



Ryc. 7. Względny uśredniony poziom ekspresji genu *CGA* przyrównany do ekspresji genu referencyjnego *HPRT* w komórkach linii SKOV-3 transfekowanych genem *CGB5* i komórkach kontrolnych (K – komórki kontrolne, nietransfekowane; CGB24h – komórki transfekowane oceniane po dwudziestu czterech godzinach; CGB48h – komórki transfekowane oceniane po czterdziestu ośmiu godzinach; CGB72h – komórki transfekowane oceniane po siedemdziesięciu dwóch godzinach).

Linie komórkową SKOV-3 wybrano do badań ze względu na fakt, iż charakteryzuje ją brak ekspresji receptora dla gonadotropiny kosmówkowej [Cui i wsp. 2011]. W celu sprawdzenia, czy nadekspresja CGB prowadzi do zmian w aktywności transkrypcyjnej genu kodującego *LHCGR* w komórkach grupy kontrolnej i tych poddawanych transfekcji oceniano w nich względną ekspresję receptora na poziomie mRNA. Analiza qPCR wykazała, że zwiększenie ekspresji genu *CGB5* nie wpływa na zmianę aktywności genu *LHCGR*. Zarówno w komórkach kontrolnych jak i komórkach transfekowanych nie stwierdzono ekspresji receptora (wyników nie przedstawiono).

4.3. Ocena ekspresji kinaz białkowych ERK i AKT w komórkach OVCAR-3 i SKOV-3 poddanych transfekcji genem *CGB5*

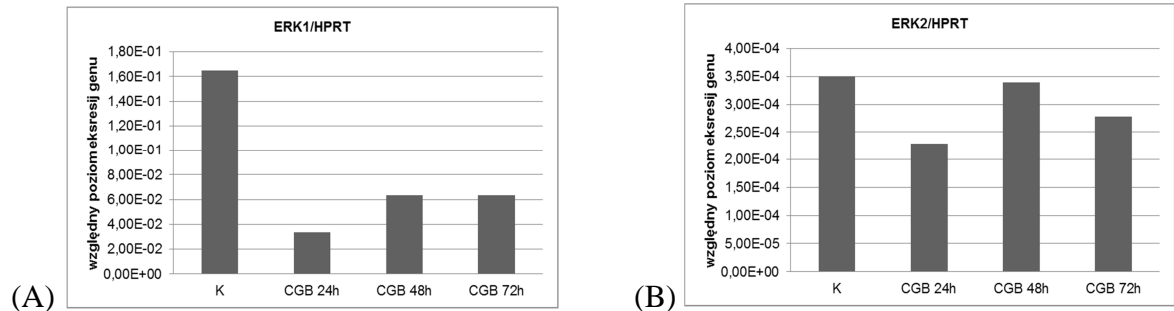
W celu oceny wpływu nadekspresji podjednostki beta gonadotropiny kosmówkowej na aktywność genów kodujących badane kinazy w transfekowanych komórkach metodą qPCR analizowano względną ekspresję genów kodujących poszczególne izoformy kinaz ERK i AKT, odpowiednio *ERK1*, *ERK2* i *AKT1*, *AKT2*, *AKT3*. Analizę ekspresji kinaz wykonano również na poziomie białka mierząc densytometrycznie poziom całkowitych białek ERK i AKT metodą western blot, z zastosowaniem przeciwciał rozpoznających wszystkie izoformy badanych enzymów.

4.3.1. Ocena wpływu nadekspresji *CGB* na poziom kinazy ERK w komórkach linii OVCAR-3

Analiza ekspresji kinaz *ERK* w komórkach OVCAR-3 poddanych transfekcji genem *CGB5* dowiodła, że nadekspresja CGB powoduje zmiany w aktywności transkrypcyjnej genów kodujących tę kinazę. Zastosowanie metody qPCR pokazało, że w dwudziestej czwartej godzinie po transfekcji ekspresja genu *ERK1* była pięciokrotnie niższa w komórkach transfekowanych niż w komórkach kontrolnych. Niski poziom ekspresji tego genu utrzymywał się również w czterdziestej ósmej i siedemdziesiątej drugiej godzinie trwania eksperymentu; był on wówczas trzykrotnie niższy niż w kontroli (Ryc. 8A).

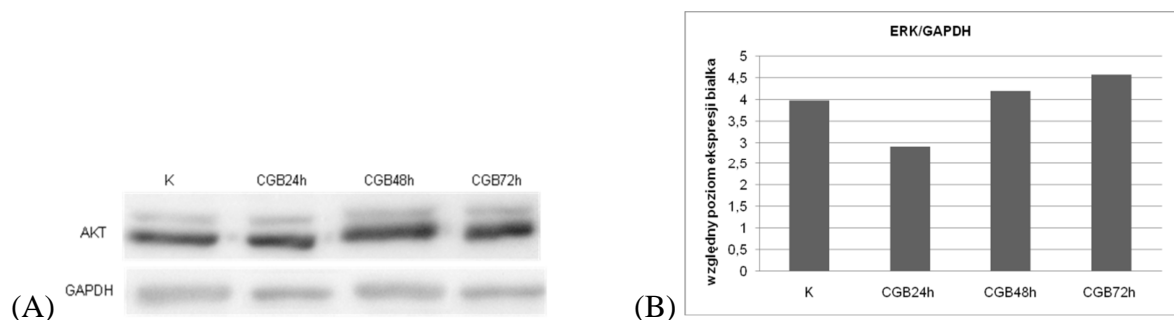
Nieznaczone zmiany w ekspresji zaobserwowano również dla izoformy 2 kinazy ERK (*ERK2*). Podobnie jak *ERK1* największy spadek ekspresji *ERK2* odnotowano w dwudziestej czwartej godzinie po transfekcji. Wówczas poziom tej izoformy był półtora razy niższy niż w komórkach nietransfekowanych. W dwudziestej czwartej godzinie po transfekcji względna ekspresja *ERK2* była na poziomie ekspresji tego genu w kontroli,

jednak w siedemdziesiątej drugiej godzinie aktywność transkrypcyjna genu ponownie nieznacznie spadła (Ryc. 8B).



Ryc. 8. Względny uśredniony poziom ekspresji genów *ERK1* (A) i *ERK2* (B) przyrównany do ekspresji genu referencyjnego HPRT w komórkach linii OVCAR-3 transfekowanych genem *CGB5* i komórkach kontrolnych (K – komórki kontrolne, nietransfekowane; CGB24h – komórki transfekowane oceniane po dwudziestu czterech godzinach; CGB48h – komórki transfekowane oceniane po czterdziestu ośmiu godzinach; CGB72h – komórki transfekowane oceniane po siedemdziesięciu dwóch godzinach).

Analiza ilości całkowitego białka ERK (ERK1/2) przeprowadzona metodą western blot połączoną z oceną densytometryczną pokazała, że poziom białka w komórkach transfekowanych genem *CGB5* nie odzwierciedlał zmian aktywności genów kodujących kinazę *ERK*, obserwowanych podczas analiz wykonanych metodą qPCR. Nadekspresja CGB nie miała znaczącego wpływu na ilość białka ERK izolowanego z badanych komórek. Co prawda, nieznaczny spadek ekspresji ERK na poziomie białka odnotowano w dwudziestej czwartej godzinie po transfekcji, jednak w czterdziestej ósmej i siedemdziesiątej drugiej godzinie poziom białek kinazy ERK był porównywalny do tego odnotowanego w komórkach kontrolnych (Ryc. 9).



Ryc. 9. Analizowany metodą western blot (A) i oceniany densytometrycznie (B) względny uśredniony poziom białka ERK, przyrównany do ekspresji białka referencyjnego GAPDH w komórkach OVCAR-3 (K – komórki kontrolne, nietransfekowane; CGB24h – komórki transfekowane oceniane po dwudziestu czterech godzinach; CGB48h komórki transfekowane oceniane po czterdziestu ośmiu godzinach; CGB72h – komórki transfekowane oceniane po siedemdziesięciu dwóch godzinach).

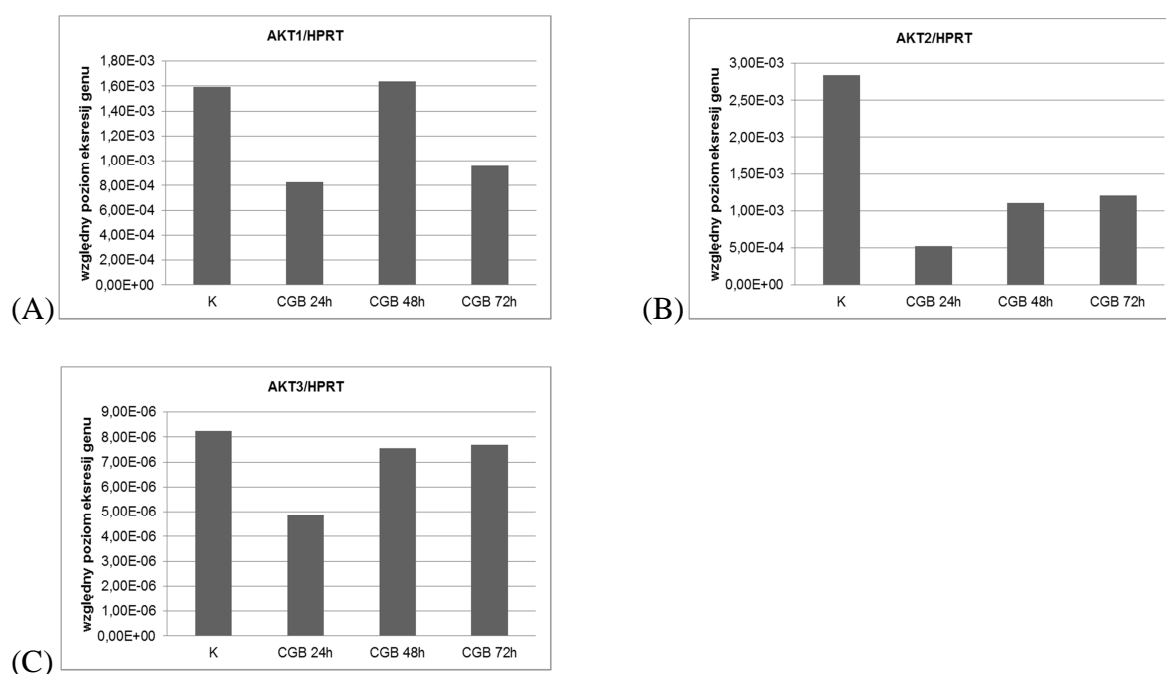
4.3.2. Ocena wpływu nadekspresji *CGB* na poziom kinazy AKT w komórkach linii OVCAR-3

Analizy prowadzone metodą qPCR dowiodły, że komórki OVCAR-3 poddawane transfekcji genem kodującym podjednostkę beta CG charakteryzował spadek ekspresji genów kodujących trzy izoformy kinazy AKT: *AKT1*, *AKT2*, *AKT3*.

W dwudziestej czwartej godzinie po transfekcji ekspresja genu *AKT1* w komórkach z nadekspresją CGB stanowiła połowę względnej ekspresji genu odnotowanej dla prób kontrolnych. Z kolei w czterdziestej ósmej godzinie trwania eksperymentu poziom mRNA tej izoforny wzrósł i był zbliżony do tego odnotowanego dla kontroli. W siedemdziesiątej drugiej godzinie względna ekspresja *AKT1* ponownie uległa obniżeniu i była prawie dwa razy niższa niż w komórkach kontrolnych (Ryc. 10A).

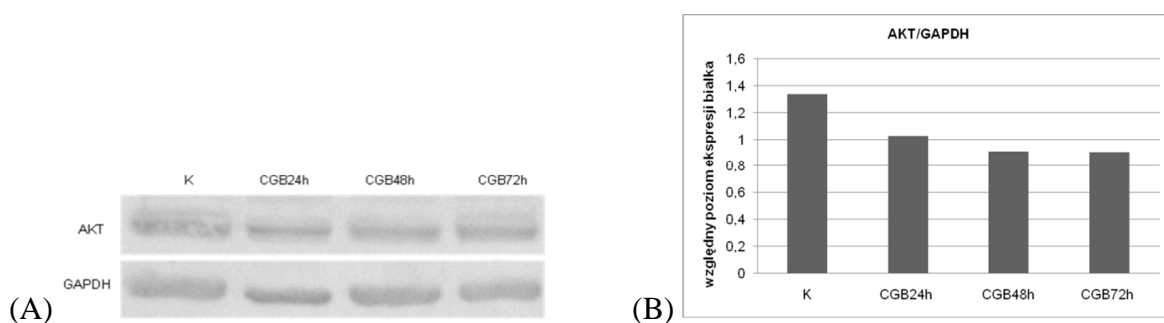
Gen *AKT2* charakteryzował się najbardziej wyraźną, spośród badanych izoform kinazy, zmianą ekspresji w komórkach OVCAR-3 wykazujących nadekspresję CGB. W dwudziestej czwartej godzinie doświadczenia odnotowano ponad pięciokrotny spadek ekspresji tego genu w porównaniu do prób kontrolnych. Natomiast w czterdziestej ósmej i siedemdziesiątej drugiej godzinie poziom *AKT2* wzrastał i był już tylko dwukrotnie niższy niż w kontroli (Ryc. 10B).

Nadekspresja CGB w komórkach OVCAR-3 związana była również ze zmianami we względnej ilości mRNA izoforny 3 kinazy AKT. W dwudziestej czwartej godzinie po transfekcji poziom ekspresji genu *AKT3* spadł niemal dwukrotnie w porównaniu do komórek nietransfekowanych, po czym w czterdziestej ósmej i siedemdziesiątej drugiej godzinie powracał do stanu porównywalnego z kontrolą (Ryc. 10C).



Ryc. 10. Względny uśredniony poziom ekspresji genów *AKT1* (A) i *AKT2* (B) i *AKT3* (C) przyrównany do ekspresji genu referencyjnego HPRT w komórkach linii OVCAR-3 transfekowanych genem *CGB5* i komórkach kontrolnych oceniany metodą qPCR (K – komórki kontrolne, nietransfekowane; CGB24h – komórki transfekowane oceniane po dwudziestu czterech godzinach; CGB48h – komórki transfekowane oceniane po czterdziestu ośmiu godzinach; CGB72h – komórki transfekowane oceniane po siedemdziesięciu dwóch godzinach).

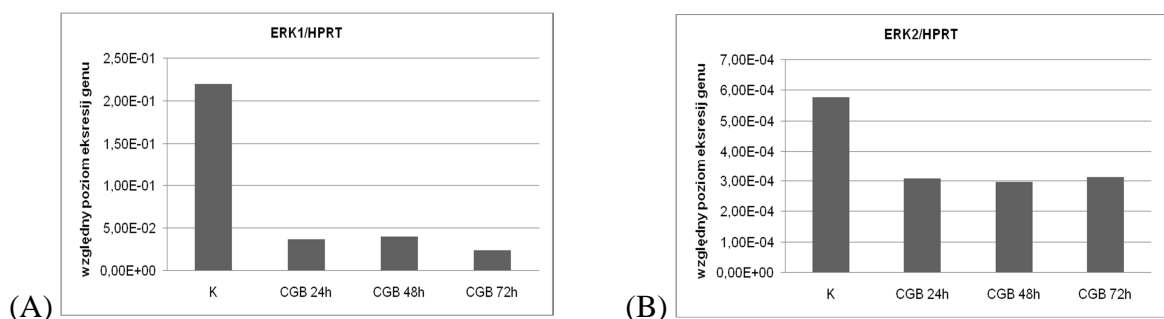
Analizy przeprowadzone na poziomie białka pokazały, że w komórkach OVCAR-3 poddawanych transfekcji genem *CGB5* badanych kinaz pokazały, że zmiany ekspresji genów *AKT* na poziomie transkrypcji przekładają się częściowo na ilość całkowitych białek AKT. Przez cały czas trwania eksperymentu poziom białka AKT oceniany metodą western blot (z przeciwciałami rozpoznającymi wszystkie trzy izoformy kinazy) był niemal półtora razy niższy niż w kontroli, czyli komórkach niepoddawanych transfekcji (Ryc. 11).



Ryc. 11. Analizowany metodą western blot (A) i oceniany densytometrycznie (B) względny uśredniony poziom białka AKT, przyrównany do ekspresji białka referencyjnego GAPDH w komórkach OVCAR-3 (K – komórki kontrolne, nietransfekowane; CGB24h – komórki transfekowane oceniane po dwudziestu czterech godzinach; CGB48h komórki transfekowane oceniane po czterdziestu ośmiu godzinach; CGB72h – komórki transfekowane oceniane po siedemdziesięciu dwóch godzinach)

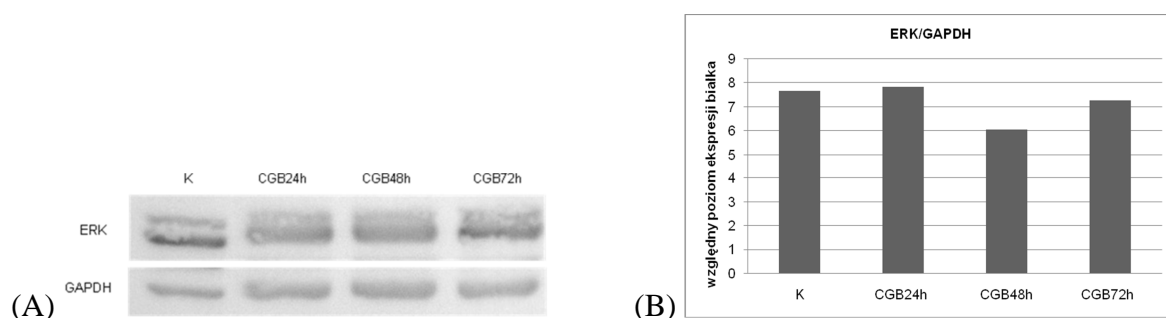
4.3.3. Ocena wpływu nadekspresji *CGB* na poziom kinazy ERK w komórkach linii SKOV-3

Analiza RNA izolowanego z transfekowanych genem *CGB5* komórek SKOV-3 wykazała, iż wzrost poziomu ekspresji podjednostki beta CG związany był z ograniczeniem aktywności transkrypcyjnej kinaz *ERK1* i *ERK2*. W komórkach z nadekspresją *CGB* odnotowano siedmiokrotny i dwukrotny spadek ekspresji genów, odpowiednio *ERK1* i *ERK2*. Obniżona ekspresja tych genów utrzymywała się przez cały czas trwania eksperymentu na tym samym poziomie (Ryc. 12).



Ryc 12. Względny uśredniony poziom ekspresji genów *ERK1* (A) i *ERK2* (B) przyrównany do ekspresji genu referencyjnego HPRT w komórkach linii SKOV-3 transfekowanych genem *CGB5* i komórkach kontrolnych oceniany metodą qPCR (K – komórki kontrolne, nietransfekowane; CGB24h – komórki transfekowane oceniane po dwudziestu czterech godzinach; CGB48h – komórki transfekowane oceniane po czterdziestu ośmiu godzinach; CGB72h – komórki transfekowane oceniane po siedemdziesięciu dwóch godzinach).

Mimo zmian w ilości mRNA efekt obniżenia ekspresji genów kodujących poszczególne izoformy *ERK* nie był zauważalny na poziomie białka. Analiza poziomu białka izolowanego z transfekowanych komórek SKOV-3 pokazała, że nadekspresja *CGB* nie ma znaczącego wpływu na ilość całkowitego białka kinazy *ERK*. Dwadzieścia cztery godziny po transfekcji poziom białek *ERK* w komórkach z nadekspresją *CGB* był porównywalny do kontroli. W czterdziestej ósmej godzinie trwania eksperymentu odnotowano spadek poziomu białka *ERK* o jedną trzecią w stosunku do kontroli, jednak siedemdziesiąt dwie godziny po transfekcji znowu osiągnął poziom porównywalny dla komórek nietransfekowanych (Ryc. 13).



Ryc. 13. Analizowany metodą western blot (A) i oceniany densytometrycznie (B) względny uśredniony poziom białka *ERK*, przyrównany do ekspresji białka referencyjnego *GAPDH* w komórkach SKOV-3 (K – komórki kontrolne, nietransfekowane; CGB24h – komórki transfekowane oceniane po dwudziestu czterech godzinach; CGB48h komórki transfekowane oceniane po czterdziestu ośmiu godzinach; CGB72h – komórki transfekowane oceniane po siedemdziesięciu dwóch godzinach).

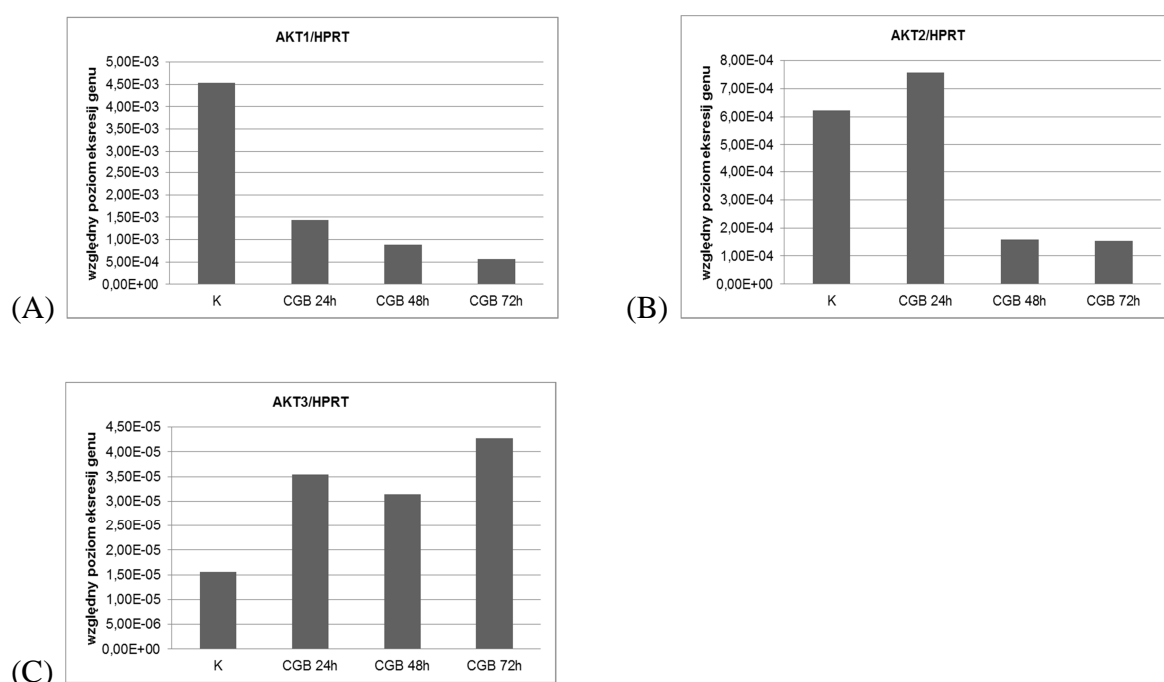
4.3.4. Ocena wpływu nadekspresji *CGB* na poziom kinazy *AKT* w komórkach linii SKOV-3

W wyniku analizy poziomu ekspresji kinazy *AKT* wykazano, że w komórkach linii SKOV-3 z nadekspresją *CGB5* dochodzi do zmian w aktywności genów kodujących poszczególne izoformy kinazy.

W dwudziestej czwartej godzinie po transfekcji względna ekspresja genu *AKT1* spadła ponad trzykrotnie w porównaniu do kontroli. W czterdziestej ósmej i siedemdziesiątej drugiej godzinie trwania eksperymentu odnotowano dalszy pięcio- i siedmiokrotny spadek ekspresji tego genu (Ryc. 14A).

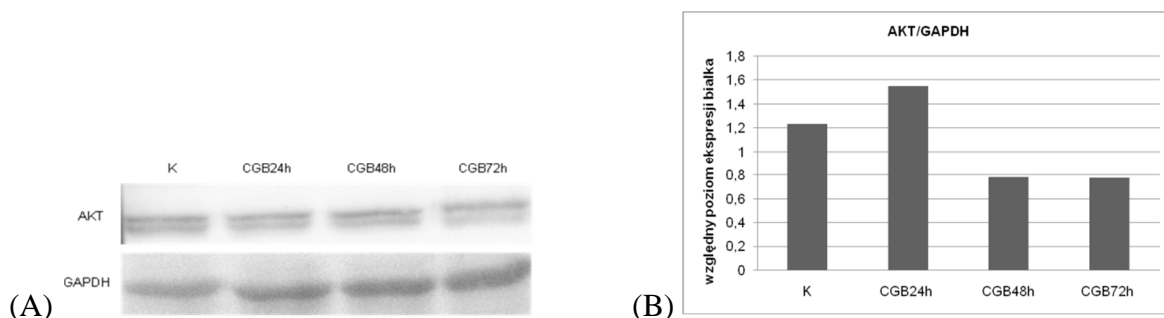
Analiza ekspresji genu kodującego izoformę 2 kinazy *AKT* wykazała nieznaczny wzrost ekspresji genu *AKT2* w dwudziestej czwartej godzinie od wprowadzenia konstruktów do komórek. Z kolei w czterdziestej ósmej i siedemdziesiątej drugiej godzinie po transfekcji komórki z nadekspresją *CGB* charakteryzował czterokrotnie niższy poziom *AKT2* niż w komórkach kontrolnych (Ryc. 14C).

Pośród badanych w komórkach SKOV-3 izoform kinaz jedynym genem, którego ekspresja wyraźnie wzrosła pod wpływem nadekspresji CGB i utrzymywała się na wysokim poziomie podczas trwania eksperymentu była izoforma 3 kinazy AKT. Średnia względna ekspresja *AKT3* w komórkach transfekowanych w dwudziestej czwartej i czterdziestej ósmej godzinie eksperymentu utrzymywała się na dwukrotnie wyższym poziomie niż w komórkach nietransfekowanych, a w siedemdziesiątej drugiej godzinie po transfekcji była blisko trzykrotnie wyższa w porównaniu do kontroli (Ryc. 14C).



Ryc. 14. Względny uśredniony poziom ekspresji genów *AKT1* (A) i *AKT2* (B) i *AKT3* (C) przyrównany do ekspresji genu referencyjnego HPRT w komórkach linii SKOV-3 transfekowanych genem *CGB5* i komórkach kontrolnych oceniany metodą qPCR (K – komórki kontrolne, nietransfekowane; CGB24h – komórki transfekowane oceniane po dwudziestu czterech godzinach; CGB48h – komórki transfekowane oceniane po czterdziestu ośmiu godzinach; CGB72h – komórki transfekowane oceniane po siedemdziesięciu dwóch godzinach).

Analiza ekspresji kinazy AKT na poziomie białka przeprowadzona metodą western blot połączona z oceną densytometryczną wykazała zmiany w ilości białek kinazy AKT w komórkach SKOV-3 z nadekspresją genu *CGB5*. Zaobserwowano, że o ile w dwudziestej czwartej godzinie po transfekcji poziom był bliski poziomowi tego białka w komórkach kontrolnych, to w czterdziestej ósmej i siedemdziesiątej drugiej godzinie trwania doświadczenia spadł on dwukrotnie (Ryc. 15).



Ryc. 15. Analizowany metodą western blot (A) i oceniany densytometrycznie (B) względny uśredniony poziom białka AKT, przyrównany do ekspresji białka referencyjnego GAPDH w komórkach SKOV-3 (K – komórki kontrolne, nietransfekowane; CGB24h – komórki transfekowane oceniane po dwudziestu czterech godzinach; CGB48h komórki transfekowane oceniane po czterdziestu ośmiu godzinach; CGB72h – komórki transfekowane oceniane po siedemdziesięciu dwóch godzinach).

4.4. Ocena wpływu nadekspresji *CGB* na biologię komórek OVCAR-3 i SKOV-3

Wpływ nadekspresji podjednostki beta gonadotropiny kosmówkowej na biologię komórek nowotworowych linii OVCAR-3 i SKOV-3 badano poprzez analizę cyklu komórkowego metodą cytometrii przepływowej, tempa wzrostu komórek przy użyciu systemu xCELLigence, obserwację mikroskopową cech morfologicznych typowych dla apoptozy i nekrozy, takich jak odpowiednio: kondensacja i fragmentacja chromatyny czy przerwanie ciągłości błony komórkowej, a także ocenę ekspresji markera proliferacji *MKI67* oraz genów regulujących proces apoptozy: *BIRC5*, *BCL2* i *BAX*.

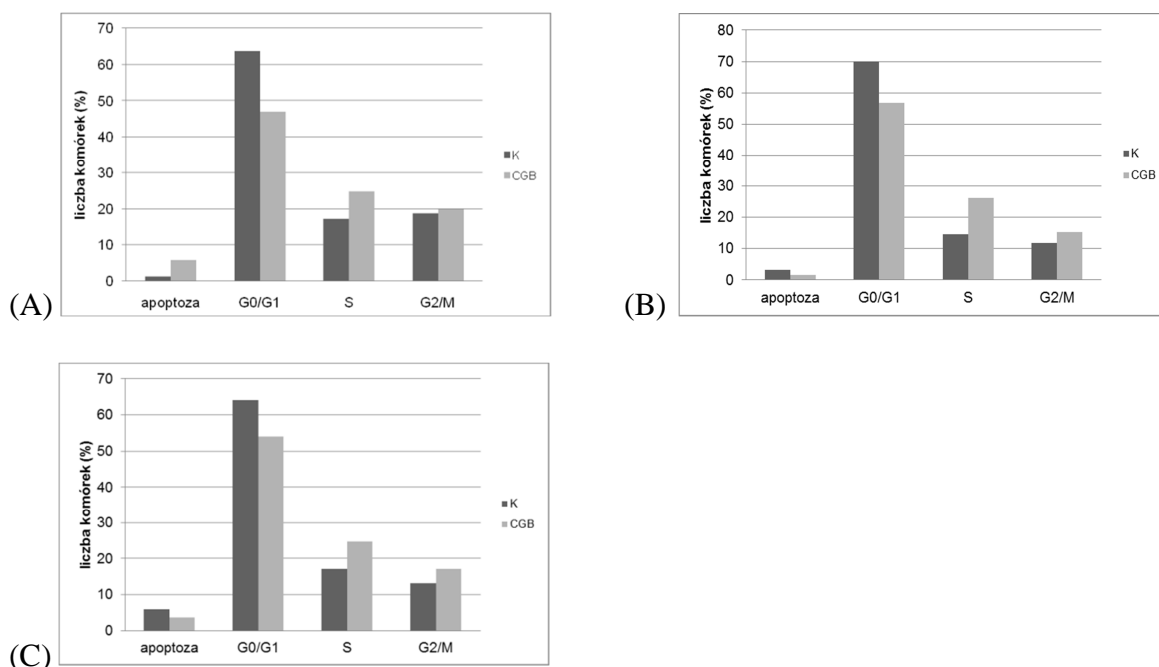
4.4.1. Ocena wpływu nadekspresji *CGB* na cykl życiowy komórek linii OVCAR-3

Analiza komórek OVCAR-3 wykazujących nadekspresję *CGB* przeprowadzona metodą cytometrii przepływowej wykazała zmiany w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Po dwudziestu czterech, czterdziestu ośmiu i siedemdziesięciu dwóch godzinach po wprowadzeniu genu *CGB5* do komórek, zaobserwowano większy niż w kontroli odsetek komórek znajdujących się w fazie S cyklu komórkowego. Największy, bo dwukrotny wzrost liczby komórek w fazie S, odnotowano czterdzieści osiem godzin od momentu po transfekcji, natomiast w dwudziestej czwartej i siedemdziesiątej drugiej godzinie po transfekcji wzrost ten był półtora razy większy niż w komórkach kontrolnych.

Komórki transfekowane w czterdziestej ósmej i siedemdziesiątej drugiej godzinie po transfekcji charakteryzowały się ponadto nieznacznym wzrostem liczby komórek będących w fazie G2/M.

Mniejszą liczbę komórek transfekowanych w porównaniu do kontrolnych zaobserwowano natomiast w fazie G0/G1 cyklu, przy czym największy spadek liczby komórek w tej fazie – półtora razy niższy niż w kontroli dotyczył komórek dwadzieścia cztery godziny po transfekcji (Ryc. 16).

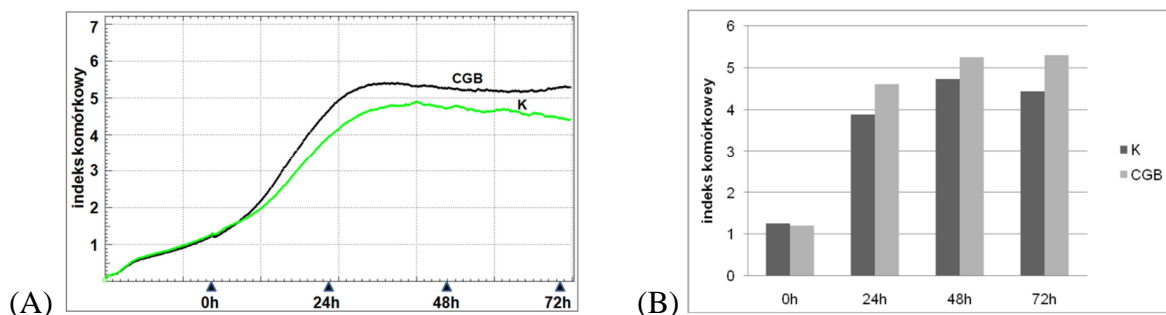
Co więcej, zmienił się również odsetek komórek podlegających procesom apoptotycznym. Choć początkowo w dwudziestej czwartej godzinie po transfekcji odnotowano pięciokrotny wzrost liczby komórek apoptotycznych, to w czterdziestej ósmej liczba tych komórek była dwukrotnie niższa niż w komórkach kontrolnych.



Ryc. 16. Procentowy udział poszczególnych faz cyklu komórkowego w komórkach OVCAR-3 kontrolnych (K) i transfekowanych genem *CGB5* (CGB) analizowanych metodą cytometrii przepływowej dwadzieścia cztery (A), czterdzieści osiem (B) i siedemdziesiąt dwie godziny po transfekcji (C).

4.4.2. Ocena wpływu nadekspresji *CGB* na przyrost liczby komórek linii OVCAR-3

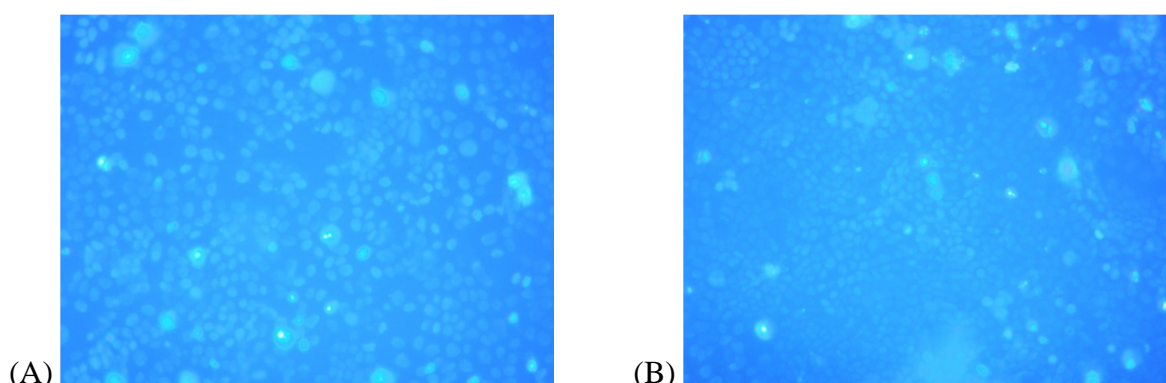
Analizę tempa wzrostu komórek OVCAR-3 transfekowanych genem *CGB5* prowadzono z wykorzystaniem systemu xCELLigence, pozwalającego na monitorowanie wzrostu komórek w czasie rzeczywistym. Pomiar prowadzony w sposób ciągły przez siedemdziesiąt dwie godziny pokazały, że komórki transfekowane charakteryzuje nieznaczne zwiększenie tempa wzrostu w porównaniu do komórek niepoddanych transfekcji. Przyrost liczby transfekowanych komórek był odpowiednio 1,2 razy wyższy w dwudziestej czwartej i siedemdziesiątej drugiej godzinie po transfekcji i 1,1 razy wyższe w czterdziestej ósmej godzinie po transfekcji niż ten obserwowany w komórkach kontrolnych (Ryc. 17).



Ryc. 17. Średni przyrost komórek linii OVCAR-3 mierzony przy użyciu aparatu xCELLigence (A) i przedstawiony za pomocą histogramu (0h – komórki w chwili transfekcji; 24h – komórki transfekowane oceniane po dwudziestu czterech godzinach; 48h – komórki transfekowane oceniane po czterdziestu ośmiu godzinach; 72h – komórki transfekowane oceniane po siedemdziesięciu dwóch godzinach; K – komórki kontrolne, nietransfekowane, CGB – komórki transfekowane genem *CGB5*).

4.4.3. Ocena wpływu nadekspresji *CGB* na apoptozę i nekrozę komórek linii OVCAR-3

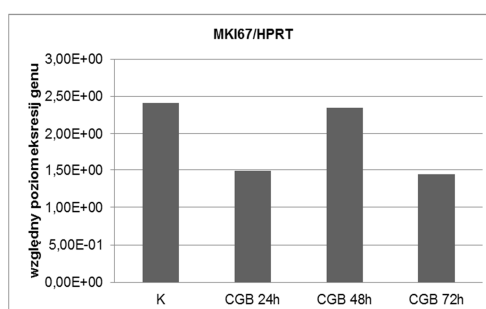
Barwienie komórek OVCAR-3 transfekowanych genem *CGB5* mieszaniną jodku propidionowego i barwnika Hoechsta 33342 pozwoliło na zobrazowanie zmian morfologicznych charakteryzujących proces apoptozy, takich jak kondensacja i fragmentacja chromatyny, (zabarwienie jądra na niebiesko – Hoechst 33342) oraz nekrozy – utrata ciągłości błony komórkowej, brak zmian w kondensacji chromatyny (zabarwienie jądra na czerwono jodkiem propidionowym). Badanie to pokazało, iż w transfekowanych komórkach nie dochodzi do zmian w liczbie komórek ulegających apoptozie i nekrozie w porównaniu do komórek kontrolnych (Ryc. 18). Procent komórek apoptotycznych i nekrotycznych zarówno w komórkach transfekowanych jak i niepoddanych transfekcji był taki sam i wahał się od 1 do 3%.



Ryc. 18. Komórki OVCAR-3 grupy kontrolnej (A) oraz transfekowane genem *CGB5* (B) wybarwione mieszaniną jodku propidionowego i Hoechst 33342; czas inkubacji 72h. Oryginalne powiększenie 200x.

4.4.4. Ocena wpływu nadekspresji *CGB* na poziom ekspresji genu markera proliferacji *MKI67* i genów kodujących czynniki regulujące apoptozę komórek: *BCL2*, *BAX* i *BIRC5* w komórkach linii OVCAR-3

Ocena poziomu ekspresji markera proliferacji *MKI67* techniką PCR pokazała, iż względna ekspresja jego genu w komórkach OVCAR-3 z nadekspresją *CGB* jest ponad półtora razy niższa niż w komórkach kontrolnych w dwudziestej czwartej i siedemdziesiątej drugiej godzinie po transfekcji. W czterdziestej ósmej godzinie poziom ekspresji *MKI67* był identyczny z kontrolą (Ryc. 19).



Ryc. 19. Względny uśredniony poziom ekspresji genu *MKI67* przyrównany do ekspresji genu referencyjnego HPRT w komórkach linii OVCAR-3 transfekowanych genem *CGB5* i komórkach kontrolnych oznaczony metodą qPCR (K – komórki kontrolne, nietransfekowane; CGB24h – komórki transfekowane oceniane po dwudziestu czterech godzinach; CGB48h – komórki transfekowane oceniane po czterdziestu ośmiu godzinach; CGB72h – komórki transfekowane oceniane po siedemdziesięciu dwóch godzinach).

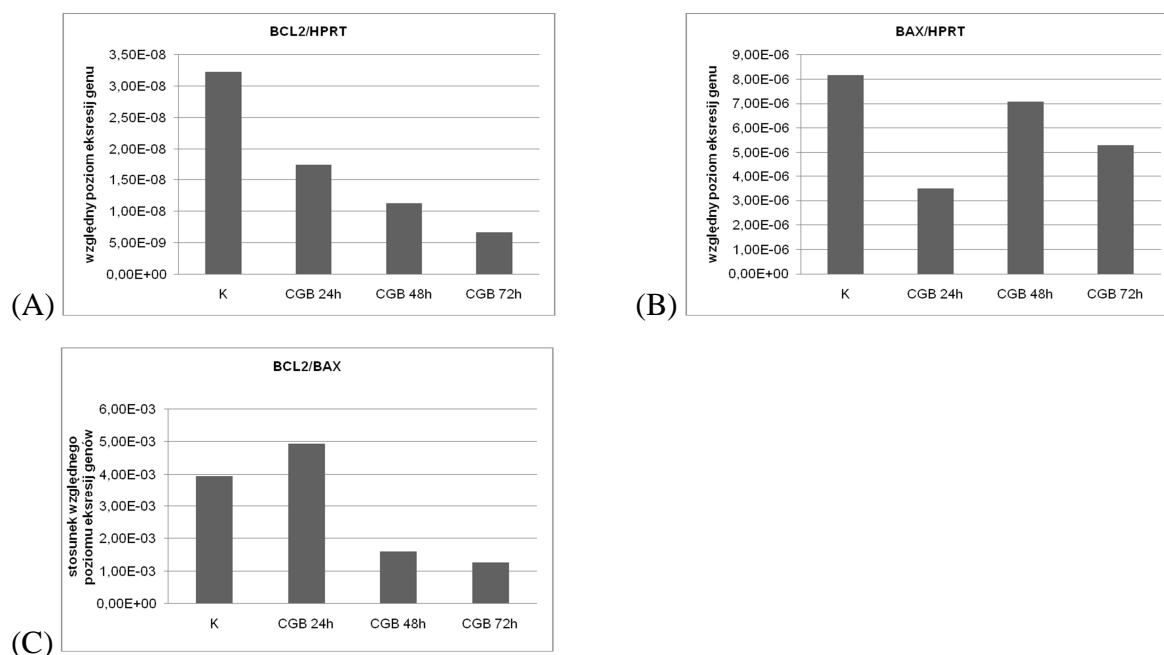
Pomiar ekspresji genów czynników zaangażowanych w regulację procesów apoptozy *BCL2* i *BAX* pokazał, iż nadekspresja podjednostki beta CG wpływa na zmianę ekspresji tych genów.

W miarę trwania eksperymentu ekspresja genu *BCL2* w komórkach poddanych transfekcji genem *CGB5* malała. Dwadzieścia cztery godziny po transfekcji poziom transkryptów *BCL2* w komórkach OVCAR-3 z nadekspresją *CGB* był dwukrotnie niższy niż w komórkach kontrolnych, natomiast czterdzieści osiem i siedemdziesiąt dwie godziny po podaniu plazmidu był odpowiednio trzy- i pięciokrotnie niższy niż w kontroli (Ryc. 20A).

Nieco mniejsze zmiany odnotowano dla poziomu ekspresji genu *BAX*. W komórkach OVCAR-3 dwadzieścia cztery godziny po transfekcji poziom ekspresji *BAX* był dwukrotnie niższy niż w kontroli. Z kolei w czterdziestej ósmej godzinie trwania doświadczenia wzrósł i był bliski poziomowi kontrolnego. W siedemdziesiątej drugiej godzinie odnotowano kolejny półtorakrotny spadek poziomu ekspresji *BAX* w porównaniu do komórek kontrolnych (Ryc. 20B).

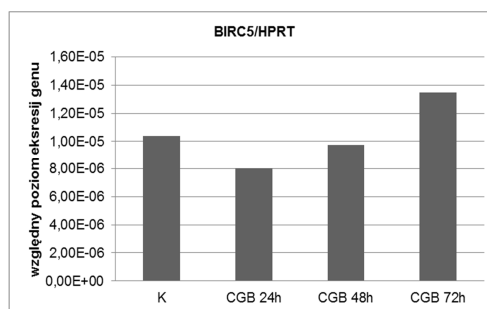
Uwzględniając fakt, iż elementem kluczowym dla wejścia komórki na drogę apoptozy uważa się ilościowy stosunek ekspresji *BCL/BAX* [Yoon i Roh 2012; de la

Torre i wsp. 2007], w niniejszej pracy analizie poddano również iloraz aktywności obu genów. Dowiedziono, iż mimo nieznacznego wzrostu w dwudziestej czwartej godzinie po transfekcji, w kolejnych godzinach doświadczenia stosunek ekspresji genów *BCL2/BAX* maleje. W czterdziestej ósmej godzinie eksperymentu był ponad dwukrotnie, a w siedemdziesiątej drugiej godzinie trzykrotnie niższy niż w komórkach nietransfekowanych (Ryc. 20C).



Ryc. 20. Względny uśredniony poziom ekspresji genów *BCL2* (A) i *BAX* (B) przyrównany do ekspresji genu referencyjnego HPRT w komórkach linii OVCAR-3 transfekowanych genem *CGB5* i komórkach kontrolnych oznaczony metodą qPCR i stosunek ekspresji tych genów (C); (K – komórki kontrolne, nietransfekowane; CGB24h – komórki transfekowane oceniane po dwudziestu czterech godzinach; CGB48h – komórki transfekowane oceniane po czterdziestu ośmiu godzinach; CGB72h – komórki transfekowane oceniane po siedemdziesięciu dwóch godzinach).

Trzeci spośród analizowanych czynników regulujących apoptozę – surwiwina, mimo niewielkiego spadku ekspresji w dwudziestej czwartej godzinie po transfekcji w kolejnych ocenianych punktach pomiarowych eksperymentu nasilała swoją ekspresję. Czterdzieści osiem godzin po wprowadzeniu konstruktu z genem *CGB5* do komórek linii OVCAR-3 ekspresja kodującego surwiwinę genu *BIRC5* była na tym samym poziomie co w komórkach kontrolnych, natomiast po siedemdziesięciu dwóch godzinach była blisko półtora razy wyższa od kontroli (Ryc. 21).



Ryc. 21. Względny uśredniony poziom ekspresji genu *BIRC5* przyrównany do ekspresji genu referencyjnego HPRT w komórkach linii OVCAR-3 transfekowanych genem *CGB5* i komórkach kontrolnych oceniany metodą qPCR (K – komórki kontrolne, nietransfekowane; CGB24h – komórki transfekowane oceniane po dwudziestu czterech godzinach; CGB48h – komórki transfekowane oceniane po czterdziestu ośmiu godzinach; CGB72h – komórki transfekowane oceniane po siedemdziesięciu dwóch godzinach).

4.4.5. Ocena wpływu nadekspresji *CGB* na cykl życiowy komórek linii SKOV-3

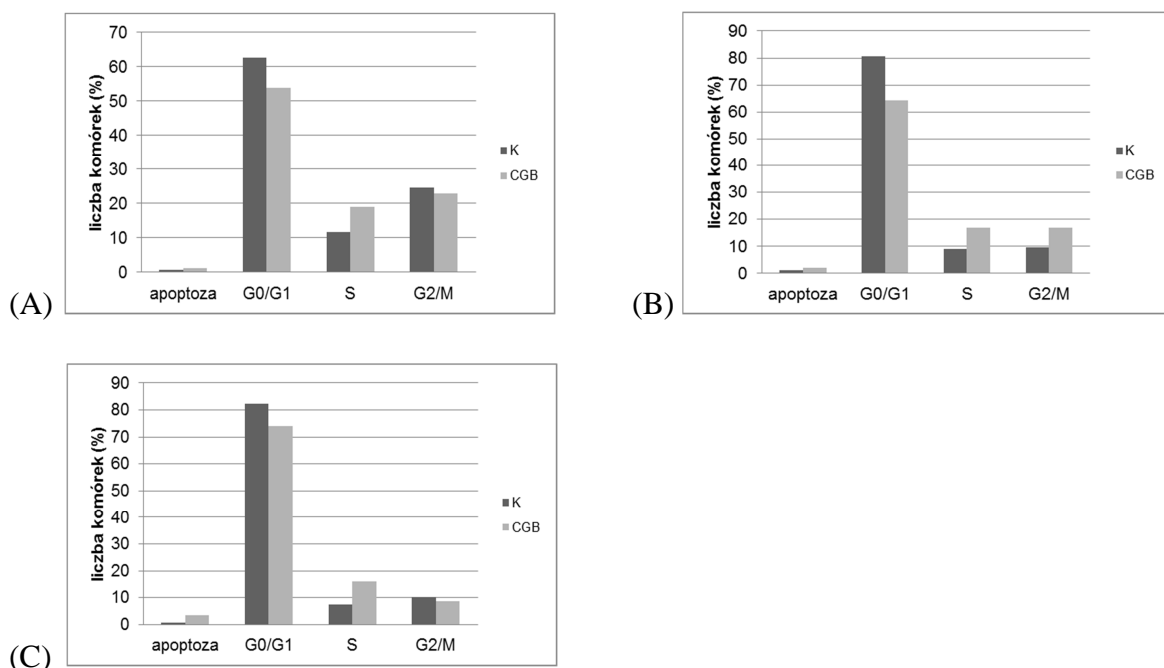
Analiza cyklu życiowego komórek linii SKOV-3 poddanych transfekcji genem *CGB5* wykazała, że nadekspresja podjednostki beta CG w tych komórkach powoduje zmiany w udziale poszczególnych faz cyklu, w porównaniu do komórek kontrolnych.

Przez cały czas trwania eksperymentu komórki z nadekspresją *CGB* cechował dwukrotny wzrost liczby komórek transfekowanych znajdujących się w fazie S cyklu komórkowego.

Mimo, iż w dwudziestej czwartej i siedemdziesiątej drugiej godzinie po transfekcji liczba komórek poddanych transfekcji, będących w fazie G2/M była zbliżona do tego obserwowanego w komórkach kontrolnych, to w czterdziestej ósmej godzinie zaobserwowano tymczasowy dwukrotny wzrost liczby tych komórek.

Z kolei jedynie nieznaczne zmiany odnotowano w udziale procentowym komórek transfekowanych będących w fazie G0/G1. W dwudziestej czwartej i czterdziestej ósmej godzinie po transfekcji liczba komórek w fazie G0/G1 spadła średnio 1,2 razy, natomiast w siedemdziesiątej drugiej godzinie 1,1 razy.

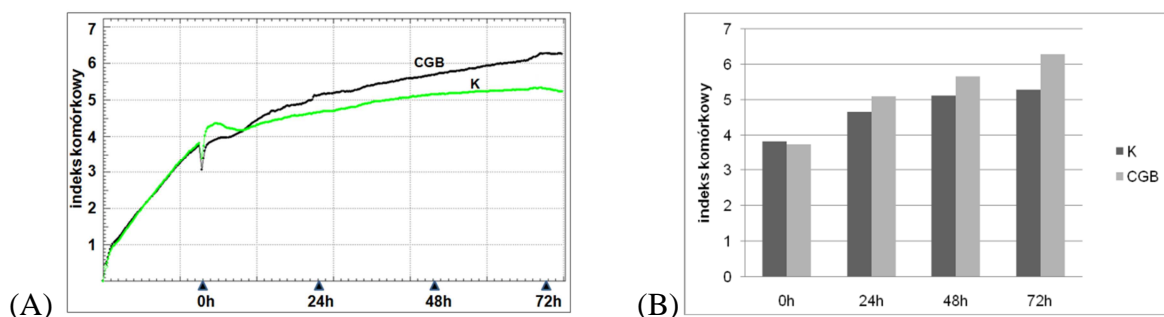
Istotne zmiany zanotowano w liczbie transfekowanych komórek znajdujących się w fazie apoptozy. W dwudziestej czwartej i czterdziestej ósmej godzinie po transfekcji liczba transfekowanych komórek apoptotycznych wzrosła dwukrotnie, natomiast siedemdziesiąt dwie godziny po transfekcji niemal sześciokrotnie (Ryc. 22).



Ryc. 22. Procentowy udział poszczególnych faz cyklu komórkowego w komórkach SKOV-3 kontrolnych (K) i transfekowanych genem *CGB5* (CGB) analizowanych metodą cytometrii przepływowej dwadzieścia cztery (A), czterdzieści osiem (B) i siedemdziesiąt dwie godziny po transfekcji (C).

4.4.6. Ocena wpływu nadekspresji *CGB* na przyrost liczby komórek linii SKOV-3

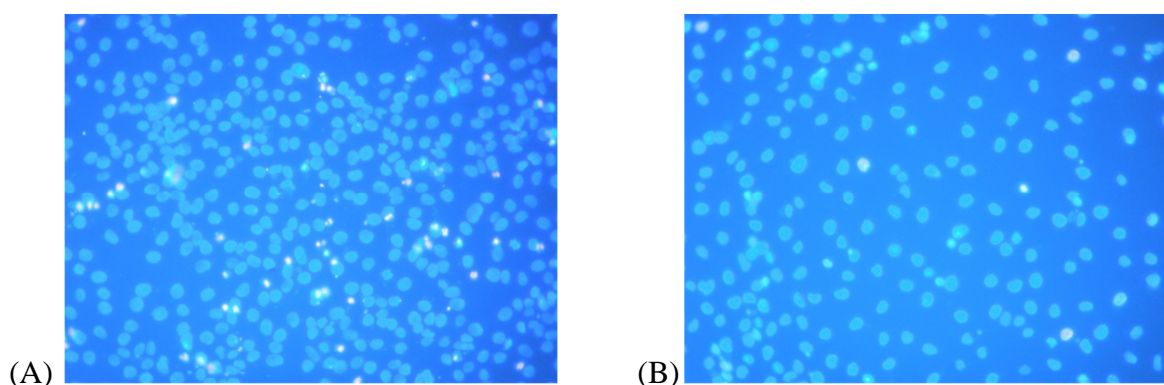
Przyrost liczby komórek monitorowany był na podstawie zmian impedancji z zastosowaniem systemu xCELLigence przez siedemdziesiąt dwie godziny. Analiza otrzymanych wyników pokazała, że poddane transfekcji genem *CGB5* komórki linii SKOV-3 charakteryzowały się nieznacznie szybszym tempem wzrostu niż nietransfektowane komórki kontrolne. Dwadzieścia cztery i czterdzieści osiem godzin po transfekcji tempo wzrostu komórek transfekowanych było 1,1 razy, natomiast w siedemdziesiątej drugiej godzinie 1,2 razy wyższe niż w komórkach nietransfektowanych (Ryc. 23).



Ryc. 23. Średni przyrost komórek linii SKOV-3 mierzony przy użyciu aparatu xCELLigence (A) i przedstawiony za pomocą histogramu (B) (0h – komórki w chwili transfekcji; 24h – komórki transfektowane oceniane po dwudziestu czterech godzinach; 48h – komórki transfektowane oceniane po czterdziestu ośmiu godzinach; 72h – komórki transfektowane oceniane po siedemdziesięciu dwóch godzinach).

4.4.7. Ocena wpływu nadekspresji *CGB* na apoptozę i nekrozę komórek linii SKOV-3

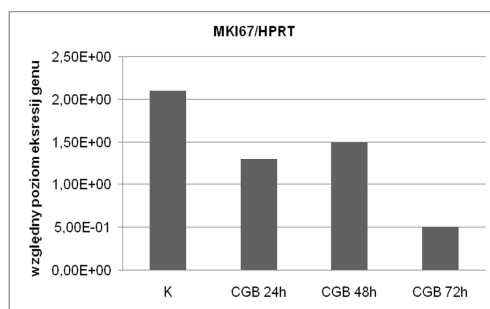
Badanie metodą mikroskopową z zastosowaniem barwników Hoechst 33342 i jodku propidionowego pokazało, iż transfekcja komórek SKOV-3 genem *CGB5* nie powoduje znaczących zmian liczby komórek ulegających apoptozie i nekrozie (Ryc. 24). Zarówno w komórkach poddanych transfekcji konstruktem kodującym gen *CGB5*, jak i nietransfekowanych komórkach kontrolnych odsetek komórek wykazujących charakterystyczne zmiany morfologii, wskazujące na zachodzące w nich procesy apoptozy i nekrozy był taki sam i nie przekraczał 3%.



Ryc. 24. Komórki SKOV-3 grupy kontrolnej (A) oraz transfekowane genem *CGB5* (B), wybarwione mieszaniną jodku propidionowego i Hoechst 33342; czas inkubacji 72h. Oryginalne powiększenie x200.

4.4.8. Ocena wpływu nadekspresji *CGB* na poziom ekspresji genu markera proliferacji *MKI67* i genów kodujących czynniki regulujące apoptozę komórek: *BCL2*, *BAX* i *BIRC5* w komórkach linii SKOV-3

Badanie względnego poziomu ekspresji markera proliferacji komórek *MKI67* metodą qPCR pokazało, że poziom aktywności genu tego czynnika pod wpływem nadekspresji *CGB* ulega obniżeniu. W dwudziestej czwartej i czterdziestej ósmej godzinie po transfekcji poziom ekspresji genu *MKI67* był około półtora razy niższy niż w kontroli, natomiast w siedemdziesiątej drugiej godzinie spadł czterokrotnie (Ryc. 25).

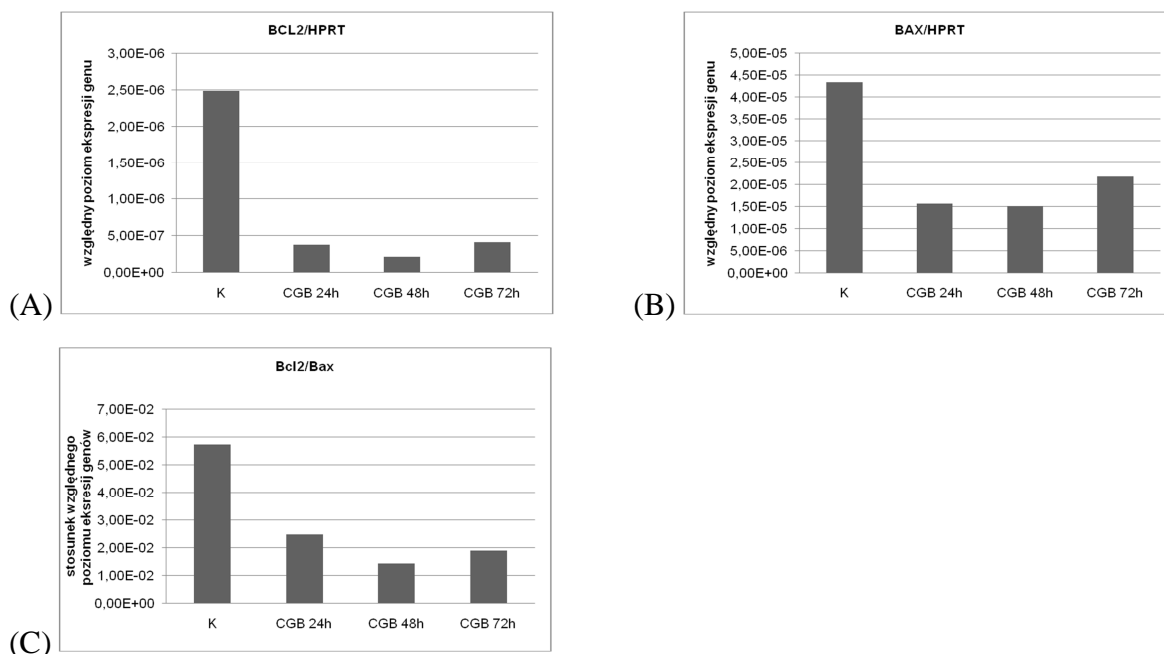


Ryc. 25. Względny uśredniony poziom ekspresji genu *MKI67* przyrównany do ekspresji genu referencyjnego HPRT w komórkach linii SKOV-3 transfekowanych genem *CGB5* i komórkach kontrolnych oceniany metodą qPCR (K – komórki kontrolne, nietransfekowane; CGB24h – komórki transfekowane oceniane po dwudziestu czterech godzinach; CGB48h – komórki transfekowane oceniane po czterdziestu ośmiu godzinach; CGB72h – komórki transfekowane oceniane po siedemdziesięciu dwóch godzinach).

Badania ilościowe czynników regulujących apoptozę *BCL2* i *BAX* na poziomie mRNA wykazały, iż nadekspresja CGB wyraźnie wpływa na zmianę aktywności transkrypcyjnej genów *BCL2* i *BAX*.

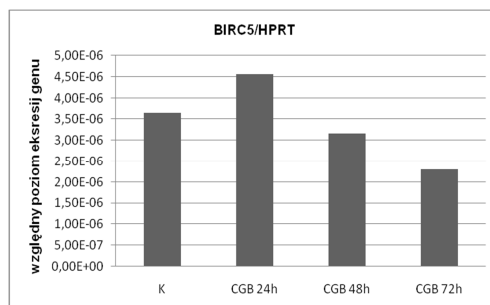
Transfekowane genem *CGB5* komórki SKOV-3 charakteryzowały się sześciokrotnym spadkiem ekspresji genu *BCL2* w dwudziestej czwartej i siedemdziesiątej drugiej godzinie po transfekcji. Największy spadek poziomu transkryptów *BCL2* odnotowano w czterdziestej ósmej godzinie eksperymentu, kiedy spadł od prawie dwunastokrotnie w porównaniu do kontroli (Ryc. 26A). W przypadku analizy ekspresji genu *BAX* pokazała, że zmiany jego ekspresji w poddanych transfekcji komórkach SKOV-3 nie były już tak znamienne. Dwadzieścia cztery i czterdzieści osiem godzin po transfekcji poziom *BAX* był trzykrotnie, a siedemdziesiąt dwie godziny po rozpoczęciu doświadczenia dwukrotnie niższy niż w komórkach nietransfekowanych (Ryc. 26B).

Ponadto dowiedziono, że w czasie trwania eksperymentu stosunek ekspresji genów *BCL2* do *BAX* (*BCL2/BAX*) był kolejno dwukrotnie, czterokrotnie i trzykrotnie niższy niż w kontroli, odpowiednio w dwudziestej czwartej, czterdziestej ósmej i siedemdziesiątej drugiej godzinie po transfekcji (Ryc. 26C).



Ryc. 26. Względny uśredniony poziom ekspresji genów *BCL2* (A) i *BAX* (B) przyrównany do ekspresji genu referencyjnego HPRT w komórkach linii SKOV-3 transfekowanych genem *CGB5* i komórkach kontrolnych oznaczony metodą qPCR i stosunek ekspresji tych genów (C); (K – komórki kontrolne, nietransfekowane; CGB24h – komórki transfekowane oceniane po dwudziestu czterech godzinach; CGB48h – komórki transfekowane oceniane po czterdziestu ośmiu godzinach; CGB72h – komórki transfekowane oceniane po siedemdziesięciu dwóch godzinach).

Analiza ekspresji czynnika antyapoptotycznego surwiwiny wykazała, iż komórki z nadekspresją *CGB* cechuje nieznaczny spadek transkrypcji kodującego ją genu *BIRC5*. O ile w dwudziestej czwartej i czterdziestej ósmej godzinie trwania doświadczenia poziom ekspresji *BIRC5* był bliski kontroli, to w siedemdziesiątej drugiej godzinie był ponad półtora razy niższy niż w komórkach niepoddawanych transfekcji (Ryc. 27).



Ryc. 27. Względny uśredniony poziom ekspresji genu *BIRC5* przyrównany do ekspresji genu referencyjnego HPRT w komórkach linii SKOV-3 transfekowanych genem *CGB5* i komórkach kontrolnych oceniany metodą qPCR (K – komórki kontrolne, nietransfekowane; CGB24h – komórki transfekowane oceniane po dwudziestu czterech godzinach; CGB48h – komórki transfekowane oceniane po czterdziestu ośmiu godzinach; CGB72h – komórki transfekowane oceniane po siedemdziesięciu dwóch godzinach).

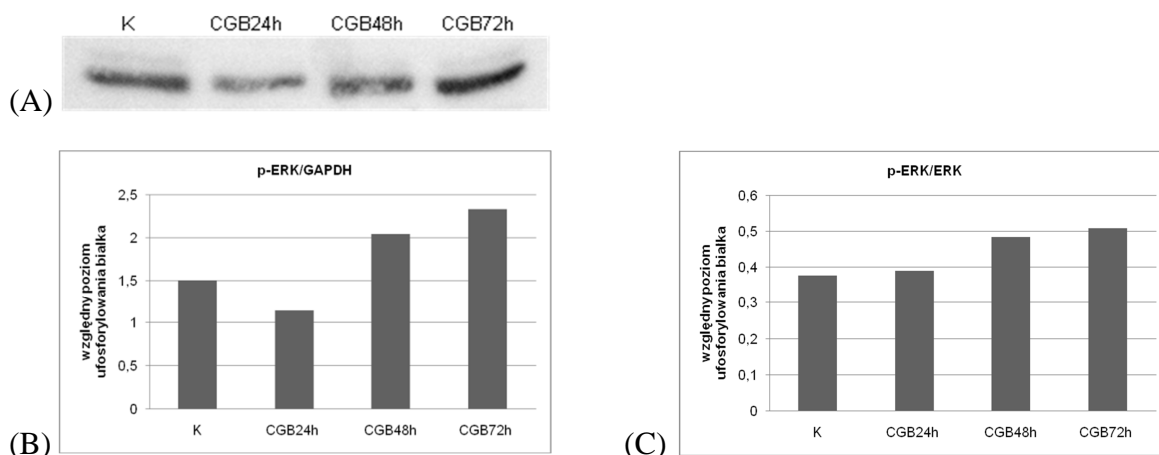
4.5. Ocena wpływu nadekspresji *CGB* na aktywację kinaz AKT i ERK w komórkach linii OVCAR-3 i SKOV-3

Stopień aktywacji kinaz AKT i ERK w komórkach linii SKOV-3 i OVCAR-3 wykazujących nadekspresję *CGB* określany był na podstawie analizy western blot oraz oceny densytometrycznej otrzymanych wyników. Pulę aktywnych białek wykrywano za pomocą przeciwciał skierowanych przeciwko ufosforylowanym kinazom AKT (p-AKT) i ERK (p-ERK). Wyniki przyrównywano do poziomu białka metabolizmu podstawowego GAPDH, a także poziomu całkowitych frakcji kinaz ERK i AKT określanych dla każdej próby. Próby te zbierano dwadzieścia cztery, czterdzieści osiem i siedemdziesiąt dwie godziny po transfekcji komórek konstruktem zawierającym gen *CGB5*.

4.5.1. Aktywacja kinaz ERK w transfekowanych komórkach linii OVCAR-3

Komórki linii OVCAR-3 niepoddawane transfekcji genem *CGB5* charakteryzowały się obecnością aktywnych, ufosforylowanych form kinazy ERK. Analiza western blot i ocena densytometryczna pokazały, że pod wpływem nadekspresji *CGB*, dwadzieścia cztery godziny po transfekcji, frakcja białek p-ERK (normalizowana względem białka GAPDH) uległa zmniejszeniu o jedną czwartą w porównaniu do wartości odnotowanej dla komórek kontrolnych. Jednak czterdzieści osiem i siedemdziesiąt dwie godziny po wprowadzeniu konstruktów z genem *CGB5* do komórek OVCAR-3 pula aktywnych p-ERK była blisko półtora razy większa niż obserwowana w komórkach kontrolnych (Ryc. 28A).

Podobne wyniki otrzymano, gdy poziom aktywnych białek ERK przyrównany był do całkowitego poziomu białka ERK (Ryc. 28B).



Ryc. 28. Analizowany metodą western blot (A) i oceniany densytometrycznie (B, C) względny uśredniony poziom ufosforylowania białka ERK, przyrównany do ekspresji białka referencyjnego GAPDH (B) i całkowitego białka ERK (C) w komórkach OVCAR-3 transfekowanych genem *CGB5* i komórkach kontrolnych (K – komórki kontrolne, nietransfekowane; CGB24h – komórki transfekowane oceniane po dwudziestu czterech godzinach; CGB48h – komórki transfekowane oceniane po czterdziestu ośmiu godzinach; CGB72h – komórki transfekowane oceniane po siedemdziesięciu dwóch godzinach).

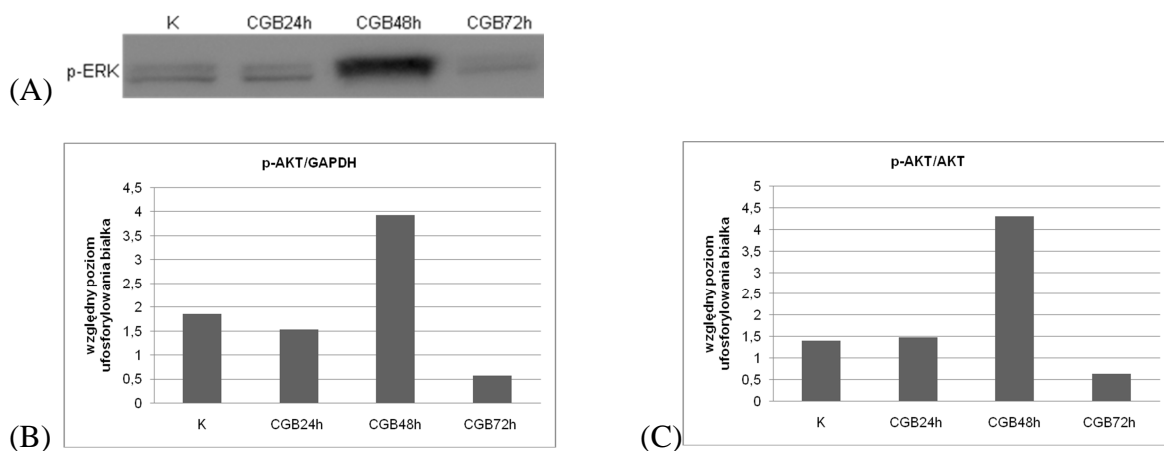
4.5.2. Aktywacja kinaz AKT w transfekowanych komórkach linii OVCAR-3

Analiza wyników western blot wykazała, że komórki kontrolne linii OVCAR-3, niepoddawane transfekcji konstruktom zawierającym gen podjednostki beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej charakteryzują się obecnością ufosforylowanych białek kinazy AKT.

Wprowadzenie do komórek konstruktów z genem *CGB5* w dwudziestej czwartej godzinie po transfekcji powodowało nieznaczny spadek poziomu frakcji ufosforylowanej kinazy AKT mierzony względem ekspresji białka referencyjnego GAPDH. Z kolei czterdzieści osiem godzin po transfekcji odnotowano dwukrotny wzrost ilości ufosforylowanych białek kinazy AKT. W siedemdziesiątej drugiej godzinie po transfekcji poziom frakcji p-AKT spadł ponownie i był trzykrotnie niższy niż w komórkach nietransfekowanych (Ryc. 29A).

Aktywacja kinazy AKT w komórkach OVCAR-3 wykazujących nadekspresję CGB określana względem zmierzonej wcześniej całkowitej puli białek AKT miała charakter zbliżony do obserwowanej przy normalizacji wyników względem ilości białka GAPDH. Dwadzieścia cztery godziny po transfekcji poziom ufosforylowanych białek AKT był na tym samym poziomie co w komórkach nietransfekowanych. W czterdziestej ósmej godzinie po transfekcji poziom ufosforylowanego białka wzrósł trzykrotnie, jednak

w siedemdziesiątej drugiej godzinie eksperymentu pula p-AKT stanowiła zaledwie połowę frakcji aktywowanych białek AKT odnotowanej dla kontroli (Ryc. 29B).



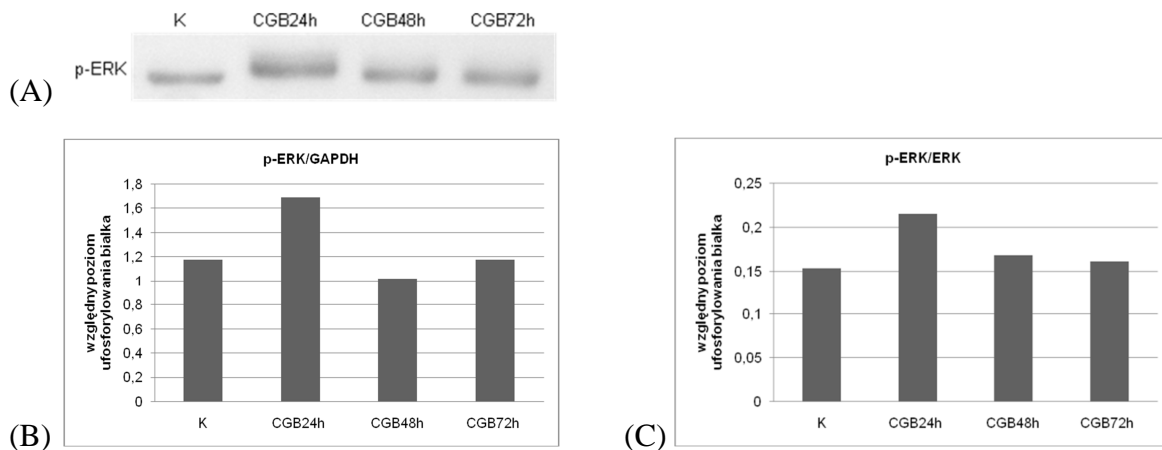
Ryc. 29. Analizowany metodą western blot (A) i oceniany densytometrycznie (B, C) względny uśredniony poziom ufosforylowania białka AKT, przyrównany do ekspresji białka referencyjnego GAPDH (B) i całkowitego białka AKT (C) w komórkach OVCAR-3 transfekowanych genem *CGB5* i komórkach kontrolnych (K – komórki kontrolne, nietransfekowane; CGB24h – komórki transfekowane oceniane po dwudziestu czterech godzinach; CGB48h – komórki transfekowane oceniane po czterdziestu ośmiu godzinach; CGB72h – komórki transfekowane oceniane po siedemdziesięciu dwóch godzinach).

4.5.3. Aktywacja kinazy ERK w transfekowanych komórkach linii SKOV-3

Przeprowadzone badania wykazały, że nietransfekowane komórki linii SKOV-3 charakteryzują się obecnością ufosforylowanych białek ERK. Nadekspresja podjednostki beta CG w tych komórkach wpływała jednak na aktywację kinazy ERK, objawiającą się wzrostem stopnia ufosforylowania kinaz ERK.

Pomiary densytometryczne poziomu tych białek normalizowanego względem poziomu ekspresji referencyjnego białka GAPDH pokazały, że najwyższy poziom ufosforylowanych kinaz ERK w komórkach z nadekspresją obserwuje się w dwudziestej czwartej godzinie po transfekcji komórek genem *CGB5*. Poziom aktywnych ERK był wówczas półtora razy wyższy niż odnotowany dla kontroli. W kolejnych monitorowanych godzinach eksperymentu – czterdziestej ósmej i siedemdziesiątej drugiej względna ilość aktywnych białek kinazy ERK była na poziomie kontroli (Ryc. 30A).

Podobny wzór aktywacji kinazy ERK otrzymano przy normalizacji wyników western blot względem całkowitej frakcji kinazy ERK. Dla tego sposobu analizy największy udział ufosforylowanych białek ERK odnotowano w dwudziestej czwartej godzinie po transfekcji (Ryc. 30B).

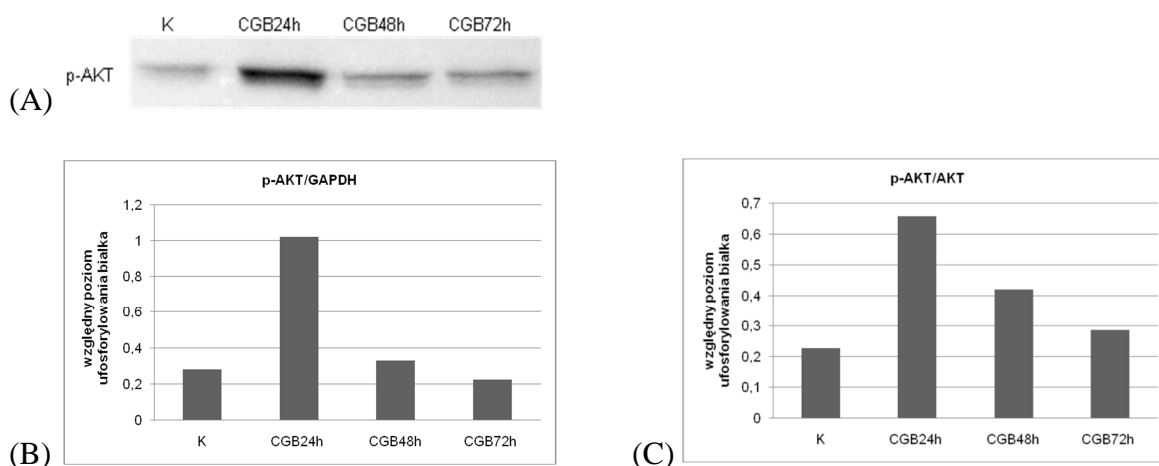


Ryc. 30. Analizowany metodą western blot (A) i oceniany densytometrycznie (B, C) względny uśredniony poziom ufosforylowania białka ERK, przyrównany do ekspresji białka referencyjnego GAPDH (B) i całkowitego białka ERK (C) w komórkach SKOV-3 transfekowanych genem *CGB5* i komórkach kontrolnych (K – komórki kontrolne, nietransfekowane; CGB24h – komórki transfekowane oceniane po dwudziestu czterech godzinach; CGB48h – komórki transfekowane oceniane po czterdziestu ośmiu godzinach; CGB72h – komórki transfekowane oceniane po siedemdziesięciu dwóch godzinach).

4.5.4. Aktywacja kinazy AKT w transfekowanych komórkach linii SKOV-3

Pomiar stopnia ufosforylowania kinazy AKT, przyrównany do ekspresji referencyjnego białka GAPDH pokazał, iż w komórkach z nadekspresją genu *CGB5* dochodzi do aktywacji kinaz. Najwyższy poziom ufosforylowanych białek AKT obserwowano po dwudziestu czterech godzinach od transfekcji. Był on wówczas pięciokrotnie wyższy niż w kontroli. W czterdziestej ósmej i siedemdziesiątej drugiej godzinie po transfekcji poziom p-AKT powraca do poziomu zbliżonego do aktywnych AKT w komórkach kontrolnych, niepoddanych transfekcji (Ryc. 31A).

Poziom fosforylacji kinazy AKT w komórkach SKOV-3 z nadekspresją CGB przyrównany do ekspresji całkowitej puli białek AKT był najwyższy, bo aż trzykrotnie większy niż w komórkach kontrolnych, w dwudziestej czwartej godzinie od transfekcji. Poziom ten stopniowo malał w trakcie trwania eksperymentu. W czterdziestej ósmej godzinie od rozpoczęcia doświadczenia był on dwukrotnie wyższy niż w kontroli, a w siedemdziesiątej drugiej był bliski poziomowi kontrolnemu (Ryc. 31B).



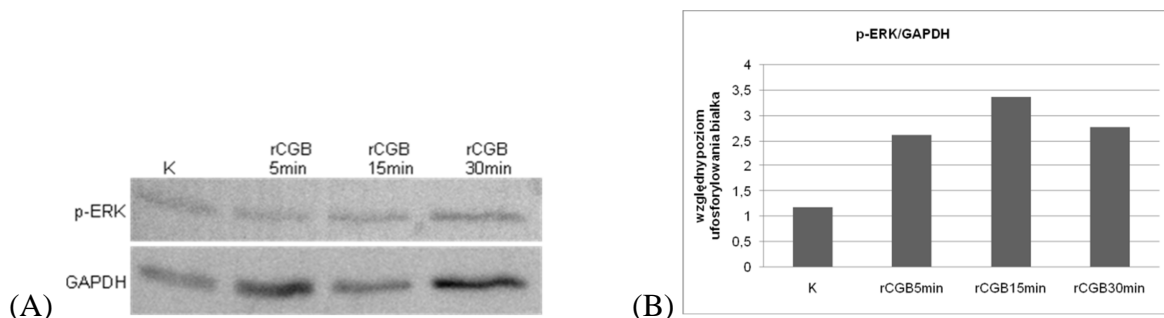
Ryc. 31. Analizowany metodą western blot (A) i oceniany densytometrycznie (B, C) względny uśredniony poziom ufosforylowania białka AKT, przyrównany do ekspresji białka referencyjnego GAPDH (B) i całkowitego białka AKT (C) w komórkach SKOV-3 transfekowanych genem *CGB5* i komórkach kontrolnych (K – komórki kontrolne, nietransfekowane; CGB24h – komórki transfekowane oceniane po dwudziestu czterech godzinach; CGB48h – komórki transfekowane oceniane po czterdziestu ośmiu godzinach; CGB72h – komórki transfekowane oceniane po siedemdziesięciu dwóch godzinach).

4.6. Ocena aktywacji kinaz ERK i AKT w komórkach linii OVCAR-3 i SKOV-3 pod wpływem inkubacji komórek z rekombinowaną podjednostką beta gonadotropiny kosmówkowej

Aby ocenić możliwość aktywacji kinaz ERK i AKT pod wpływem stymulacji przez egzogenną podjednostkę beta CG, komórki linii SKOV-3 i OVCAR-3 hodowano przez dwadzieścia cztery godziny w medium pozbawionym surowicy, a następnie inkubowano z rekombinowanym białkiem podjednostki beta gonadotropiny kosmówkowej (rCGB). Stymulowane komórki analizowano po pięciu, piętnastu i trzydziestu minutach inkubacji z egzogenną rCGB wprowadzoną do medium. Ze względu na fakt, iż przy tak krótkotrwałej stymulacji poziom całkowitych białek AKT i ERK nie ulega zmianom, stopień fosforylacji kinaz AKT i ERK oceniany metodą western blot normalizowano względem poziomu białka referencyjnego GAPDH.

4.6.1. Wpływ rCGB na aktywację kinazy ERK w komórkach linii OVCAR-3

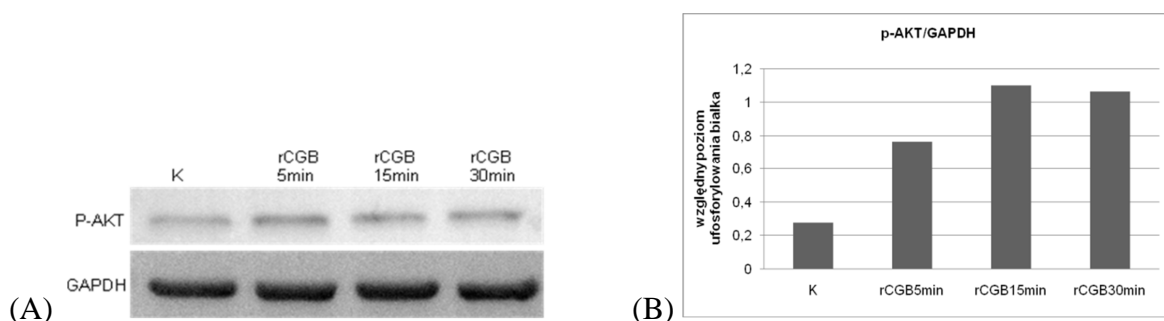
Wyniki analiz przeprowadzonych metodą western blot pokazują, że pięciominutowa inkubacja komórek z rCGB wywołuje dwukrotny wzrost frakcji ufosforylowanych białek ERK w komórkach linii OVCAR-3. Maksimum aktywności kinaz odnotowano piętnaście minut po dodaniu rCGB do medium hodowlanego. Stopień fosforylacji był wówczas niemal trzykrotnie wyższy niż w komórkach kontrolnych, niepoddawanych stymulacji. Po trzydziestu minutach stymulacji obserwowano niewielki spadek ufosforylowania kinazy ERK, jednak poziom p-ERK był nadal wysoki i stanowił dwukrotność poziomu kontrolnego (Ryc. 32).



Ryc. 32. Analizowany metodą western blot (A) i oceniany densytometrycznie (B) względny uśredniony poziom ufosforylowania białka ERK, przyrównany do ekspresji białka referencyjnego GAPDH w komórkach OVCAR-3poddawanych stymulacji rCGB i komórkach kontrolnych (K – komórki kontrolne, niestymulowane; rCGB5min – komórki stymulowane przez pięć minut; rCGB15min – komórki stymulowane przez piętnaście minut; rCGB30min – komórki stymulowane przez trzydzieści minut).

4.6.2. Wpływ rCGB na aktywację kinazy AKT w komórkach linii OVCAR-3

Analiza aktywacji kinazy białkowej AKT w komórkach OVCAR-3 stymulowanych przez rekombinowane białka podjednostki beta hormonu rozpuszczone w medium hodowlanym wykazała, iż w obecności rCGB w badanych komórkach dochodzi do wzrostu poziomu ufosforylowanych AKT. Już po pięciu minutach od momentu stymulacji rCGB poziom białek p-AKT był prawie trzykrotnie wyższy niż w komórkach kontrolnych. W piętnastej i trzydziestej minucie od rozpoczęcia eksperymentu odnotowano natomiast dalszy, czterokrotny wzrost aktywacji AKT, w porównaniu do poziomu aktywnych kinaz w komórkach kontrolnych – nieinkubowanych z rCGB (Ryc. 33).

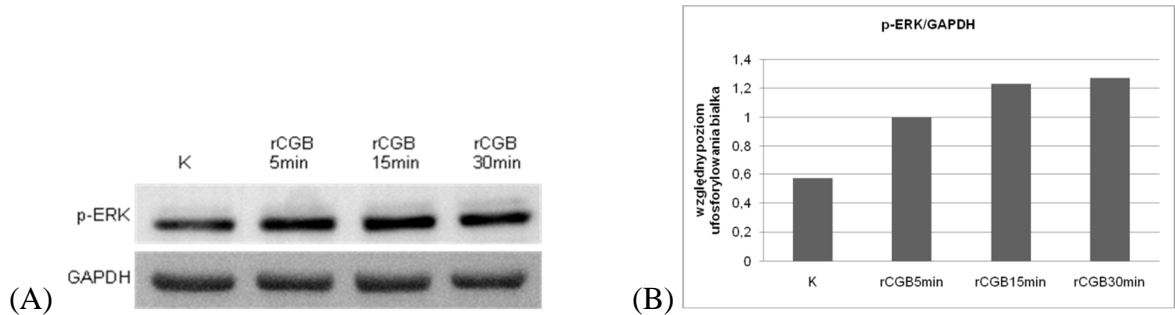


Ryc. 33. Analizowany metodą western blot (A) i oceniany densytometrycznie (B) względny uśredniony poziom ufosforylowania białka AKT, przyrównany do ekspresji białka referencyjnego GAPDH w komórkach OVCAR-3poddawanych stymulacji rCGB i komórkach kontrolnych (K – komórki kontrolne, niestymulowane; rCGB5min – komórki stymulowane przez pięć minut; rCGB15min – komórki stymulowane przez piętnaście minut; rCGB30min – komórki stymulowane przez trzydzieści minut).

4.6.3. Wpływ rCGB na aktywację kinazy ERK w komórkach linii SKOV-3

Komórki linii SKOV-3 stymulowane rekombinowaną CGB charakteryzowała aktywacja kinaz. Po pięciu minutach inkubacji komórek SKOV-3 z rCGB zaobserwowano prawie dwukrotny wzrost puli fosforylowanych białek ERK, mierzony względem białka referencyjnego GAPDH. Poziom p-ERK wzrastał w kolejnych minutach trwania

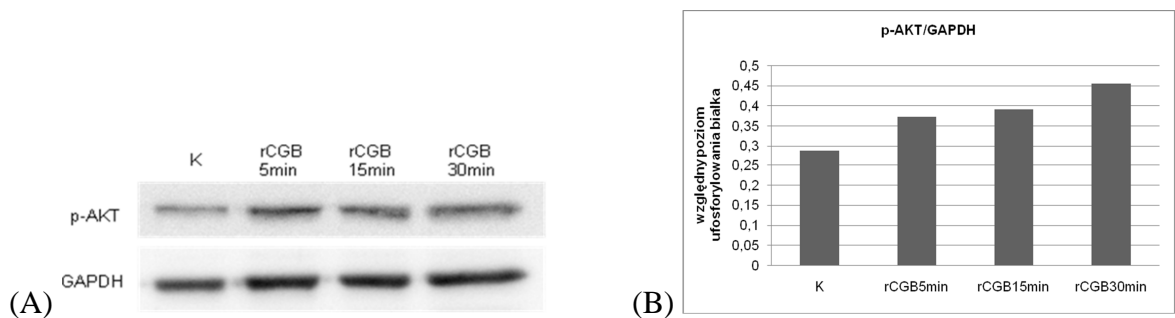
eksperymentu tak, że w piętnastej i trzydziestej minucie dwukrotnie przekroczył poziom odnotowany w komórkach niestymulowanych (Ryc. 34).



Ryc. 34. Analizowany metodą western blot (A) i oceniany densytometrycznie (B) względny uśredniony poziom ufosforylowania białka ERK, przyrównany do ekspresji białka referencyjnego GAPDH w komórkach SKOV-3 (K – komórki kontrolne, niestymulowane; rCGB5min – komórki stymulowane przez pięć minut; rCGB15min – komórki stymulowane przez piętnaście minut; rCGB30min – komórki stymulowane przez trzydzieści minut).

4.6.4. Wpływ rCGB na aktywację kinazy AKT w komórkach linii SKOV-3

Stymulacja komórek SKOV-3 przez rCGB prowadziła do aktywacji kinazy AKT. Analiza western blot i ocena densytometryczna pokazała, że w obecności rCGB poziom ufosforylowania AKT rośnie proporcjonalnie do czasu inkubacji z rCGB. Najwyższy stopień aktywacji AKT zaobserwowano trzydzieści minut po podaniu rekombinowanego białka CGB i był on ponad półtora razy większy niż w komórkach niepoddawanych stymulacji (Ryc. 35).



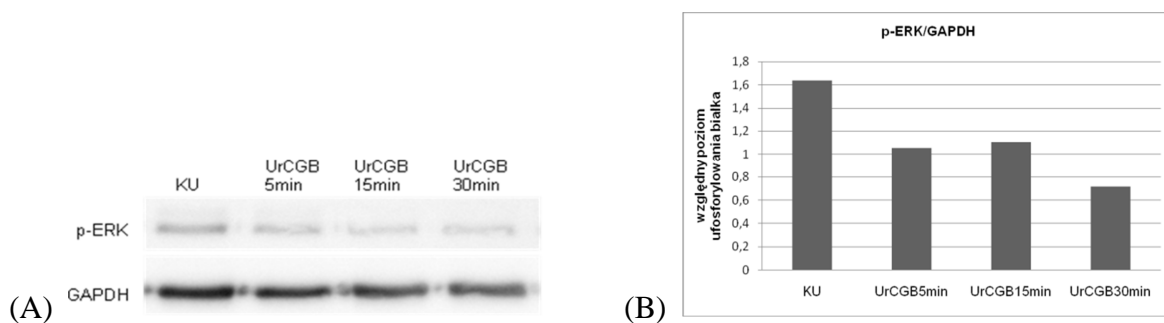
Ryc. 35. Analizowany metodą western blot (A) i oceniany densytometrycznie (B) względny uśredniony poziom ufosforylowania białka AKT, przyrównany do ekspresji białka referencyjnego GAPDH, w komórkach SKOV-3; K – komórki kontrolne, niestymulowane przez rCGB; rCGB5min – komórki stymulowane rCGB pięć minut; rCGB15min – komórki stymulowane rCGB piętnaście minut; rCGB30min – komórki stymulowane rCGB trzydzieści minut.

4.7. Ocena aktywacji kinaz ERK i AKT w komórkach linii OVCAR-3 i SKOV-3 pod wpływem rekombinowanej podjednostki beta CG w obecności inhibitorów kinaz MEK (U0126) i PI3K (LY294002)

4.7.1. Stymulacja komórek linii OVCAR-3 rCGB z zablokowaniem kinazy MEK

Aby potwierdzić specyficzność aktywacji kinaz ERK zaobserwowanej pod wpływem CGB i wykazać, czy zmiany fosforylacji tej kinazy w komórkach stymulowanych przez rCGB zachodzą dzięki aktywności kinazy wyższego rzędu – MEK, w badaniach zastosowano inhibitor tej kinazy – U0126.

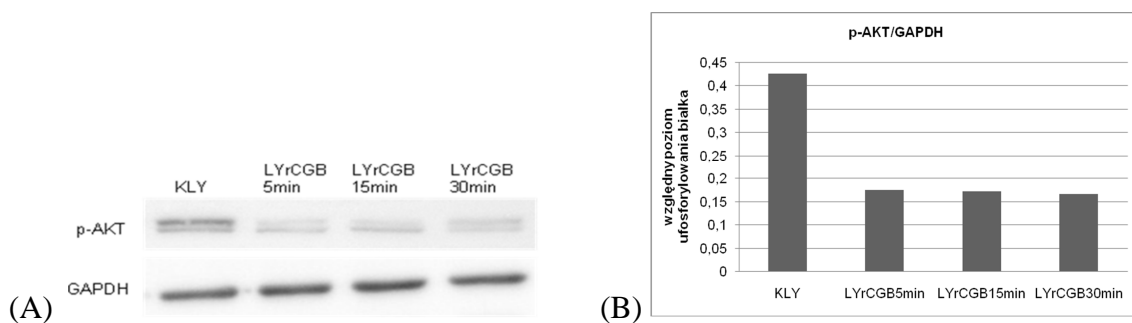
Badanie western blot pokazało, że w komórkach OVCAR-3 w obecności U0126 rCGB nie prowadzi do zwiększenia ufosforylowanej puli białka kinazy ERK. Poziom aktywnych kinaz ERK w komórkach hodowanych w obecności inhibitora i inkubowanych z rCGB był niższy niż w komórkach niestymulowanych niemal półtorakrotnie po pięciu i piętnastu minutach aktywacji i dwukrotnie niższy po trzydziestu minutach w porównaniu do komórek kontrolnych (z zablokowaną kinazą MEK, ale niestymulowanych przez rCGB) (Ryc. 36).



Ryc. 36. Analizowany metodą western blot (A) i oceniany densytometrycznie (B) względny uśredniony poziom ufosforylowania białka ERK, przyrównany do ekspresji białka referencyjnego GAPDH, w komórkach OVCAR-3 inkubowanych z inhibitorem U0126; KU – komórki kontrolne, niestymulowane przez rCGB; UrCGB5min – komórki stymulowane rCGB pięć minut; UrCGB15min – komórki stymulowane rCGB piętnaście minut; UrCGB30min – komórki stymulowane rCGB trzydzieści minut.

4.7.2. Stymulacja komórek linii OVCAR-3 rCGB z zablokowaniem kinazy PI3K

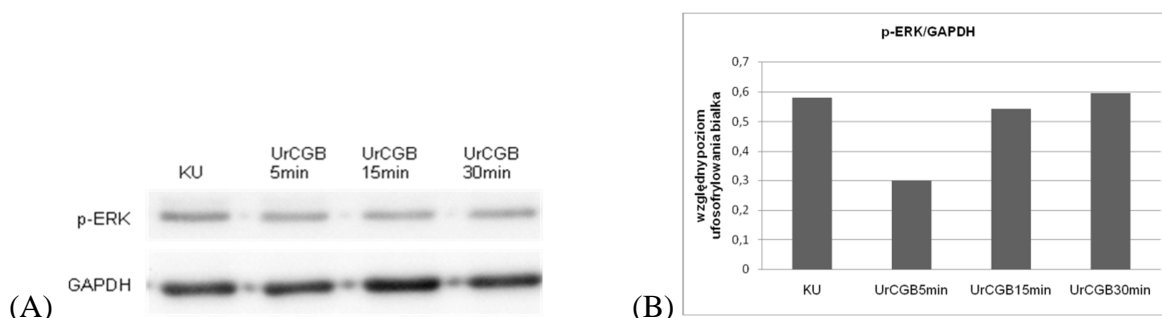
Celem sprawdzenia, czy obserwowany pod wpływem CGB efekt wzrostu fosforylacji AKT w komórkach OVCAR-3 jest skutkiem indukcji szlaku 3-kinazy fosfatydyloinozytolu i kinazy PI3K zastosowano specyficzny inhibitor tej kinazy – LY294002. Komórki przed stymulacją rCGB inkubowano godzinę w obecności inhibitora. Wykonana następnie analiza western blot wykazała, iż w komórkach OVCAR-3, które stymulowano rCGB w obecności inhibitora nie dochodzi do wzrostu fosforylacji kinazy AKT. Odnotowano natomiast ponad dwukrotny spadek stopnia ufosforylowania białka AKT w komórkach z zablokowaną kinazą PI3K pod wpływem rCGB (Ryc. 37).



Ryc. 37. Analizowany metodą western blot (A) i oceniany densytometrycznie (B) względny uśredniony poziom ufosforylowania białka AKT, przyrównany do ekspresji białka referencyjnego GAPDH, w komórkach OVCAR-3 inkubowanych z inhibitorem LY294002; KLY – komórki kontrolne, niestymulowane przez rCGB; LYrCGB5min – komórki stymulowane rCGB pięć minut; LYrCGB15min – komórki stymulowane rCGB piętnaście minut; LYrCGB30min – komórki stymulowane rCGB trzydzieści minut.

4.7.3. Stymulacja komórek linii SKOV-3 rCGB z zablokowaniem kinazy MEK

Zastosowanie inhibitora kinazy MEK fosforylującej ERK, powodowało zablokowanie efektu aktywacji szklaku kinaz MAP indukowanego przez obecność w medium komórek SKOV-3 rekombinowanego białka CGB. Wprawdzie zastosowanie inhibitora powodowało dwukrotny spadek ilości ufosforylowanego białka AKT pięć minut po podaniu do medium rCGB, jednak piętnaście i trzydzieści minut po podaniu rCGB do medium hodowlanego poziom p-ERK w komórkach był taki sam jak w kontroli (Ryc. 38).

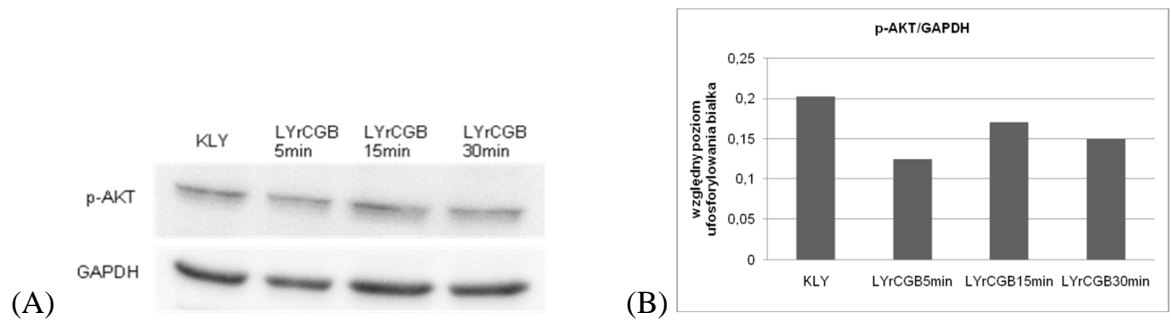


Ryc. 38. Analizowany metodą western blot (A) i oceniany densytometrycznie (B) względny uśredniony poziom ufosforylowania białka ERK, przyrównany do ekspresji białka referencyjnego GAPDH, w komórkach SKOV-3 inkubowanych z inhibitorem U0126; KU – komórki kontrolne, niestymulowane przez rCGB; UrCGB5min – komórki stymulowane rCGB pięć minut; UrCGB15min – komórki stymulowane rCGB piętnaście minut; UrCGB30min – komórki stymulowane rCGB trzydzieści minut.

4.7.4. Stymulacja komórek linii SKOV-3 rCGB z zablokowaniem kinazy PI3K

Eksperymenty przeprowadzone z zastosowaniem specyficznego inhibitora kinazy fosfatydyloinozytolu (PI3K) – LY294002 – wykazały, że obserwowana wcześniej pod wpływem rCGB fosforylacja kinazy AKT jest zależna od aktywności 3-kinazy fosfatydyloinozytolu. Użycie inhibitora LY294002, blokujące działanie kinazy wyższego rzędu – PI3K, uniemożliwiało w komórkach SKOV-3 aktywację białka AKT przez rCGB. Podczas analiz obserwowano nieznaczny spadek ilości ufosforylowanego białka AKT, który był niemal dwukrotny po pięciu minutach stymulacji rCGB i odpowiednio

1,2 i 1,3 razy niższy po piętnastu i trzydziestu minutach stymulacji komórek rCGB w obecności inhibitora LY294002, w porównaniu do komórek niestymulowanych przez rCGB (Ryc. 39).



Ryc. 39. Analizowany metodą western blot (A) i oceniany densytometrycznie (B) względny uśredniony poziom ufosforylowania białka AKT, przyrównany do ekspresji białka referencyjnego GAPDH, w komórkach SKOV-3 inkubowanych z inhibitorem LY294002; KLY – komórki kontrolne, niestymulowane przez rCGB; LYrCGB5min – komórki stymulowane rCGB pięć minut; LYrCGB15min – komórki stymulowane rCGB piętnaście minut; LYrCGB30min – komórki stymulowane rCGB trzydzieści minut.

5. Dyskusja

Ekspresja wolnej podjednostki beta gonadotropiny kosmówkowej w nowotworach jest fenomenem potwierdzonym dla wielu guzów różnego pochodzenia [Cole 2012 a i b; Cole 2009; Iles 2007; Jankowska i wsp. 2008 a; Hamada i wsp. 2005; Butler i Iles 2004; Butler i wsp. 1999; Lobel i wsp. 1999]. Przyjmuje się, że podstawowym efektem biologicznym działania CGB w nowotworzeniu jest zablokowanie procesów apoptozy w komórkach, co promuje ich wzrost i pozwala na rozwój guza [Butler i wsp. 2000; Jankowska i wsp. 2008 b]. Postuluje się, że podobnie jak gonadotropina kosmówkowa promuje angiogenezę podczas tworzenia łożyska i modulując aktywność matczyne go układu odpornościowego warunkuje tolerancję immunologiczną wobec płodu, również w onkogenezie hormon może pełnić podobne funkcje, przyczyniając się do neowaskularyzacji i prowadząc do uniewrażliwienia układu immunologicznego chorego na komórki nowotworowe [Bansal i wsp. 2012; Tsampalas i wsp. 2012; Herr i wsp. 2007]. Mimo licznych badań nad rolą gonadotropiny kosmówkowej oraz jej wolnych podjednostek w procesie nowotworzenia funkcje i biologiczne mechanizmy ich działania są nadal nieznanne.

Klasyczny model oddziaływania gonadotropiny kosmówkowej na komórki zakłada interakcję hormonu z receptorem wspólnym dla gonadotropiny kosmówkowej i hormonu luteinizującego – LHCGR i uruchomieniem ścieżki sygnałnej zależnej od cykazy adenylowej i cAMP. Co ciekawe, w części guzów produkujących CG nie stwierdza się obecności LHCGR [Jankowska i wsp. 2008 a; Davies i wsp. 2000].

Najnowsze badania nad rolą gonadotropiny kosmówkowej w angiogenezie pokazują, że hiperglikozylowana CG może wiązać się również z receptorem dla transformującego czynnika wzrostu beta – TGFBR, co prowadzi do aktywacji szlaku kinaz SMAD [Berndt i wsp. 2012]. Niemniej jednak dotychczas nie dowiedziono, czy wolna podjednostka beta hormonu jest zdolna łączyć się z którymkolwiek z tych receptorów i prowadzić w komórkach nowotworowych do aktywacji szlaków pośredniczonych przez cyklazę adenylową lub białka SMAD.

Badania nad steroidogenezą dowodzą, że gonadotropiny mogą oddziaływać na docelowe komórki również poprzez alternatywny mechanizm związany z aktywacją

kinaz białkowych ERK i AKT. W ten sposób gonadotropina kosmówkowa wpływa na produkcję sterydów oraz reguluje procesy proliferacji i apoptozy komórek Leydiga w jądrze oraz kontroluje syntezę progesteronu w komórkach ziarnistych i podziały komórek zrębu jajnika [Palaniappan i Menon 2010; Tai i wsp. 2009; Martinelle i wsp. 2004; Dewi i wsp. 2002]. W podobnym mechanizmie lutropina reguluje poziom receptora naskórkowego czynnika wzrostu w jajniku jak również promuje proliferację i migrację komórek nowotworowych raków jajnika [Mertens-Walker i wsp. 2010; Choi i wsp. 2009].

Jednak jak dotąd brak jakichkolwiek danych dokumentujących analogiczne działanie wolnej podjednostki beta gonadotropiny w nowotworach. Postuluje się, że CGB, wydzielane przez szereg guzów, jest najprawdopodobniej jednym z czynników regulujących ich proliferację i apoptozę. Stąd celem niniejszych badań było wykazanie działania CGB na komórki nowotworowe przez aktywację szlaków sygnalnych kinaz ERK i AKT, stanowiących kluczowe ogniwa w regulacji proliferacji, różnicowania i śmierci komórek oraz procesie kancerogenezy [Aksamitiene i wsp. 2012; Altomare i Khaled 2012; de Luca i wsp. 2012; McCubrey i wsp. 2007].

W badaniach wykorzystano dwie linie komórkowe raka jajnika: OVCAR-3 i SKOV-3, które charakteryzują się odpowiednio obecnością i brakiem ekspresji receptora LHCGR. W celu sprawdzenia możliwości aktywacji kinaz ERK i AKT pod wpływem wolnej podjednostki beta gonadotropiny kosmówkowej obie linie komórkowe poddane zostały transfekcji plazmidem z wklonowanym genem *CGB5*. Powodem, dla którego w doświadczeniach użyto sekwencji *CGB5* jest fakt, iż jest on jednym z najbardziej aktywnych transkrypcyjnie genów CGB zarówno w łożysku jak i licznych guzach [Cocquebert i wsp. 2012; Li i wsp. 2008; Iles 2007; Hotakainen i wsp. 2007; Rull i Laan 2005]. Ze względu na czas niezbędny do rozpoczęcia syntezy i eksportu białka podjednostki beta CG kodowanej przez wprowadzony konstrukt, pierwsze analizy prowadzono po upływie dwudziestu czterech godzin od transfekcji, natomiast kolejne po czterdziestu ośmiu i siedemdziesięciu dwóch godzinach. Wydajność transfekcji, monitorowana za pomocą plazmidu z genem kodującym białko zielonej fluorescencji (EGFP), wynosiła średnio 30% w komórkach OVCAR-3 i 50% w komórkach SKOV-3. W transfekowanych komórkach OVCAR-3 pozwoliło to osiągnąć maksymalnie odpowiednio pięć tysięcy, natomiast w komórkach SKOV-3 czternaście tysięcy razy wyższą ekspresję *CGB* na poziomie RNA, a także istotne zwiększenie produkcji białka CGB w porównaniu do komórek kontrolnych niepoddanych transfekcji. Wykonanie ilościowego porównania poziomu białka CGB w komórkach transfekowanych w stosunku

do kontroli nie było możliwe ze względu na zbyt niski poziom endogennej CGB niewykrywalny w pomiarach densytometrycznych.

Analiza komórek linii OVCAR-3 transfekowanych genem *CGB5* wykazała, że najwyższy poziom mRNA *CGB* (pięć tysięcy razy wyższy niż w kontroli) wyróżniał komórki dwadzieścia cztery godziny po transfekcji. W tym czasie odnotowano również najwyższy poziom białka CGB. W następnych godzinach trwania eksperymentu poziom transkryptów *CGB* istotnie zmalał, przy czym nadal był półtora tysiąca razy wyższy niż w kontroli. Poziom białka CGB w tym czasie był również niższy niż dwadzieścia cztery godziny po transfekcji, jednak zmiany te nie były tak znaczące jak zmiany obserwowane dla poziomu mRNA badanego genu.

W komórkach linii SKOV-3 najwyższą ekspresję *CGB* na poziomie mRNA odnotowano również po dwudziestu czterech godzinach po transfekcji. Następnie poziom transkryptów genu *CGB* malał, jednak nadal był wyższy niż w komórkach kontrolnych – w czterdziestej ósmej godzinie trwania doświadczenia był sześć tysięcy razy, a siedemdziesiątej drugiej dwa tysiące razy wyższy niż w kontroli. Z kolei poziom produkowanego białka stopniowo rósł, a jego najwyższy poziom w transfekowanych komórkach SKOV-3 odnotowano siedemdziesiąt dwie godziny po transfekcji.

Przypuszczalnie obserwowane różnice między tempem i charakterem zmian ilości mRNA i białka podjednostki beta CG mają związek z okresem półtrwania białka CGB, który jest dłuższy niż czas życia jego mRNA [Norman i wsp. 2000]. Co więcej, badania nad relacjami między ekspresją mRNA i białka wybranych genów pokazują, że w wielu przypadkach poziom mRNA nie koreluje z ilością białka produkowanego w komórkach [Gry i wsp. 2009]. W przypadku CGB fenomen ten zaobserwowano wcześniej w komórkach cytotrofoblastu, w których zmiany w poziomie ekspresji mRNA *CGB* nie zawsze wiązały się z odpowiednimi zmianami w ilości syntetyzowanego białka podjednostki beta CG [Handsuh i wsp. 2009].

Jak już wspomniano, linie komórkowe OVCAR-3 i SKOV-3 zostały wybrane do doświadczeń ze względu na odpowiednio potwierdzoną i brak ekspresji receptora LHCGR. O ile podczas prowadzonych badań w komórkach SKOV-3 zarówno kontrolnych jak i poddanych transfekcji nie wykryto transkryptów *LHCGR*, to w komórkach linii OVCAR-3 zaobserwowano zmiany aktywności genu receptora związane z nadekspresją CGB. Wprowadzenie konstruktów kodujących *CGB5* do komórek OVCAR-3 wiązało się bowiem ze znacznym – trzykrotnie niższym niż w kontroli, ograniczeniem transkrypcji genu *LHCGR*.

Negatywna regulacja ekspresji receptora zachodząca w obecności gonadotropiny kosmówkowej jest zjawiskiem opisanym już wcześniej i jak pokazują dotychczasowe badania dotyczy ograniczenia ekspresji LHCGR zarówno na poziomie mRNA jak i białka [Lakkakorpi i wsp. 1993; Hoffmann i wsp. 1991]. Jednak, o ile w opublikowanych pracach negatywną regulację LHCGR obserwowano po wpływie heterodimeru CG, tak tu po raz pierwszy pokazano ten fenomen dla wolnej podjednostki beta hormonu.

Podjednostka beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej tworząc funkcjonalny hormon łączy się z podjednostką alfa [Pierce i Parsons 1981]. Podczas syntezy hormonu ekspresja poszczególnych podjednostek, potranslacyjne modyfikacje i ich składanie w heterodimer są ściśle kontrolowane i zsynchronizowane [Albanese i wsp. 1991; Peters i wsp. 1984]. By sprawdzić, czy obserwowane podczas badań zmiany w biologii tranfekowanych genem *CGB5* komórek rzeczywiście były związane z nadekspresją wolnej podjednostki beta hormonu, a nie przez obecność heterodimeru hormonu, wykorzystując metodę western blot analizowano formy białka produkowanego w tranfekowanych komórkach OVCAR-3 i SKOV-3. Badanie to wykazało, że wykryty w ekstraktach komórkowych produkt białkowy, reagujący z przeciwciałami przeciwko CGB, odpowiada masą wolnej podjednostce beta hormonu (32 kDa) [Butler i Iles 2004]. Nie zaobserwowano natomiast produktów białkowych o masie powyżej 36 kDa charakterystycznej dla heterodimeru CG [Cole 2009; de Medeiros i Norman 2009; Butler i Iles 2004].

W komórkach wykazujących nadekspresję CGB zbadano również poziom ekspresji genu podjednostki alfa ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (*CGA*). Analiza aktywności genu *CGA* w tranfekowanych komórkach OVCAR-3 pokazała, że nadekspresja *CGB5* prowadzi do znaczącego, dwukrotnego spadku aktywności genu kodującego podjednostkę alfa CG w dwudziestej czwartej i czterdziestej ósmej godzinie po transfekcji. Po siedemdziesięciu dwóch godzinach poziom ekspresji *CGA* powracał do obserwowanego w komórkach kontrolnych. To samo badanie przeprowadzone na RNA pochodzącym z tranfekowanych komórek SKOV-3 – pozbawionych ekspresji receptora LHCGR – pokazało, że w tych komórkach w dwudziestej czwartej i czterdziestej ósmej godzinie po transfekcji poziom ekspresji podjednostki alfa CG był zbliżony do odnotowanego dla komórek kontrolnych, natomiast w siedemdziesiątej drugiej godzinie był półtora razy wyższy niż w kontroli. Przeprowadzone w niniejszej pracy badania po raz pierwszy dokumentują wpływ nadekspresji CGB na poziom ekspresji genu *CGA* w komórkach nowotworowych.

Biorąc po uwagę fakt, iż jeden z podstawowych mechanizmów regulujących ekspresję *CGA* jest zależny od cAMP [Knöfler i wsp. 2000] można przypuszczać, że tymczasowy spadek ekspresji tego genu w transfekowanych komórkach OVCAR-3 był związany z obniżeniem poziomu tego drugorzędowego nośnika informacji. W niniejszej pracy nie przeprowadzono analizy aktywacji szlaku cykazy adenylowej i poziomu cAMP w komórkach OVCAR-3, jednak prawdopodobnym wydaje się, że dzięki obecności receptora dla gonadotropiny kosmówkowej w komórkach tych pod wpływem CGB dochodzi do aktywacji kaskady AC/cAMP/PKA. Spadek ekspresji *CGA* w transfekowanych komórkach OVCAR-3 dwadzieścia cztery i czterdzieści osiem godzin po transfekcji może zatem tłumaczyć zaobserwowany tutaj obniżony poziom ekspresji *LHCGR*. Należy przypuszczać, że niższa ekspresja *LHCGR* ogranicza możliwość aktywacji cykazy adenylowej, a przez to wpływa na ekspresję genów takich jak *CGA*, które regulowane są przez czynniki transkrypcyjne zależne od cAMP. Odnotowany w siedemdziesiątej drugiej godzinie po transfekcji komórek OVCAR-3 wzrost poziomu ekspresji *CGA*, który powrócił do poziomu kontrolnego, mógł być z kolei efektem aktywacji alternatywnych mechanizmów regulujących ekspresję *CGA*. Hipotezę tę wydaje się potwierdzać fakt, iż w tym czasie w komórkach OVCAR-3 nadal utrzymywał się niski poziom ekspresji *LHCGR*.

Dodatkowych argumentów, potwierdzających możliwość istnienia mechanizmów regulujących ekspresję *CGA*, które byłyby niezależne od stymulacji receptora *LHCGR* i aktywacji ścieżki AC/cAMP/PKA dostarczają wyniki analizy poziomu ekspresji *CGA* w transfekowanych genem *CGB5* komórkach SKOV-3, które charakteryzują się brakiem ekspresji genu *LHCGR*. W komórkach tych w czasie trwania całego eksperymentu (dwadzieścia cztery, czterdzieści osiem i siedemdziesiąt dwie godziny po transfekcji) nie zaobserwowano bowiem spadku poziomu ekspresji genu *CGA*. Co więcej, w siedemdziesiątej drugiej godzinie po transfekcji komórki SKOV-3 z nadekspresją CGB charakteryzował wzrost ilości transkryptów tego genu, w porównaniu do komórek kontrolnych. Jednocześnie fakt, iż zarówno w transfekowanych genem *CGB5* liniach komórkowych – OVCAR-3 o obniżonym poziomie *LHCGR* jak SKOV-3 – niewykazującej ekspresji receptora, w tym samym momencie (siedemdziesiąt dwie godziny po transfekcji) nastąpił wzrost ekspresji *CGA* sugeruje, że w obu typach komórek mogły zostać uruchomione zależne od stymulacji CGB szlaki sygnałne regulujące ekspresję genu *CGA*.

Wyniki wcześniejszych doświadczeń dokumentujących rolę gonadotropiny kosmówkowej w procesach nowotworowych dowodzą, iż wyciszenie genów kodujących CGB w liniach nowotworowych, indukuje w nich proces programowanej śmierci komórki [Hamada i wsp. 2005, Jankowska i wsp. 2008 b]. Ponadto postuluje się, że ekspresja CGB w rakach szyjki macicy koreluje też ze zmniejszoną apoptozą w tkance guza [Li i wsp. 2008]. Dane te sugerują, że obecność gonadotropiny kosmówkowej produkowanej przez nowotwory może chronić komórki przed zainicjowaniem apoptozy, co umożliwia wzrost i rozwój guza. Z uwagi na doniesienia dokumentujące antyapoptotyczne działanie gonadotropiny kosmówkowej, aby sprawdzić, w jaki sposób nadekspresja CGB wpływa na czynności życiowe transfekowanych komórek OVCAR-3 i SKOV-3 w niniejszej pracy metodą cytometrii przepływowej poddano analizie cykl życiowy tych komórek. Ponadto sprawdzono, jak nadekspresja CGB wpływa na aktywność transkrypcyjną genów zaangażowanych w proces apoptozy *BCL2* i *BAX* oraz *BIRC5*. Czynniki te wybrano, gdyż choć w indukcji sygnałów odpowiedzialnych za śmierć komórki bierze udział wiele mechanizmów, to w literaturze tematu szczególną uwagę zwraca się na antyapoptotyczne białka z rodzin *BCL2* i *IAP*, hamujące końcowy etap tego procesu, polegający na aktywacji kaspaz [Philchenkov 2004; Lareu i wsp. 2003; Kiechle i Zhang 2002; Degenhardt i wsp. 2002; Wilson i wsp. 2001]. Co więcej, nadmierną ekspresję białek z tych rodzin, odpowiedzialną za zaburzenie przebiegu apoptozy stwierdza się w wielu nowotworach [Nemoto i wsp. 2004; Tamm i wsp. 2000].

Badanie cyklu życiowego komórek OVCAR-3 i SKOV-3 pokazało, że w obu transfekowanych liniach komórkowych zwiększenie syntezy CGB wpływało na czynności życiowe komórek, prowadząc do zmian w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Zmianom w transfekowanych komórkach ulegał również poziom ekspresji analizowanych tu genów *BCL2*, *BAX* i *BIRC5*.

Obie transfekowane genem *CGB5* linie komórkowe charakteryzowały się zmianami w liczbie komórek ulegających apoptozie. Co więcej, zmiany te wydają się mieć związek z ekspresją genu *BIRC5*, kodującego antyapoptotyczne białko z rodziny *IAP* – surwiwinę, modulowaną w obecności CGB.

W transfekowanych komórkach OVCAR-3 dwadzieścia cztery godziny po transfekcji odnotowano aż pięciokrotny wzrost liczby komórek apoptotycznych, w porównaniu do kontroli. Wzrostowi temu towarzyszył spadek ekspresji *BIRC5*. Jednak czterdzieści osiem i siedemdziesiąt dwie godziny po transfekcji komórek apoptotycznych było już dwukrotnie mniej niż w kontroli. W tym czasie następował z kolei stopniowy

wzrost ekspresji genu surwiwiny. Można zatem przypuszczać, że nadekspresja CGB w komórkach OVCAR-3 chroni je przed apoptozą m.in. poprzez regulację aktywności surwiwiny. Do tej pory nie wykazano, aby wolna podjednostka beta CG bezpośrednio wpływała na ekspresję *BIRC5*, jednak wydaje się to prawdopodobne, zwłaszcza zważywszy na doniesienia dokumentujące stymulację syntezy surwiwiny przez gonadotropinę kosmówkową w komórkach ziarnistych jajnika [Kumazawa i wsp. 2005].

Analiza cyklu życiowego komórek SKOV-3 transfekowanych genem kodującym CGB pokazała stopniowy wzrost liczby komórek apoptotycznych, proporcjonalny do czasu trwania eksperymentu. O ile dwadzieścia cztery godziny po transfekcji odsetek komórek apoptotycznych był niewiele większy niż w kontroli, to w czterdziestej ósmej i siedemdziesiątej drugiej godzinie był on odpowiednio dwu- i pięciokrotnie wyższy niż w komórkach nietransfekowanych. Znaczącemu wzrostowi liczby komórek apoptotycznych w czterdziestej ósmej i siedemdziesiątej drugiej godzinie po transfekcji towarzyszyło wyraźne obniżenie poziomu ekspresji genu *BIRC5*. Otrzymane wyniki sugerują, że obserwowane tu zmiany liczby apoptotycznych komórek SKOV-3 po transfekcji genem *CGB5*, podobnie jak w przypadku komórek OVCAR-3, mogą również zależeć od poziomu ekspresji genu kodującego antyapoptotyczne białko surwiwinę.

Badania nad nowotworzeniem dowodzą, że wysoki poziom surwiwiny w komórkach nowotworowych wiąże się z ich inwazyjnym fenotypem i opornością na chemio- i radioterapię, a co za tym idzie – gorszym rokowaniem [Jiang i wsp. 2013; Rödel i wsp. 2012; Waligórska-Stachura i wsp. 2012]. Z drugiej strony, zablokowanie ekspresji surwiwiny indukuje apoptozę komórek guza i sprawia, że stają się bardziej podatne na leczenie [Ai i wsp. 2006; Guha i wsp. 2009]. Można zatem przypuszczać, że obserwowane w niniejszej pracy zmiany w cyklu życiowym komórek poddanych transfekcji *CGB5* na poziomie apoptozy mają związek z ekspresją surwiwiny zależną od nadekspresji CGB.

O ile w komórkach OVCAR-3 nadekspresja CGB, która wpływała na wzrost poziomu surwiwiny, wydaje się wywierać efekt ochronny przed apoptozą, to w komórkach SKOV-3 nie obserwowano takiej zależności. Przeciwnie, nadekspresja CGB w komórkach SKOV-3 była związana ze wzrostem liczby komórek apoptotycznych, któremu towarzyszył stopniowy spadek aktywności *BIRC5*. Trudno wytłumaczyć zaobserwowane tu różnice w poziomie ekspresji surwiwiny i podatności na apoptozę komórek OVCAR-3 i SKOV-3. Można przypuszczać, że wynikają one odpowiednio z ekspresji i braku receptora LHCGR, a co za tym idzie uruchomieniem różnych ścieżek sygnałnych, prowadzących do zmian ekspresji genu *BIRC5*. Choć aktywność surwiwiny, której

przypisuje się nie tylko rolę białka hamującego apoptozę, ale także czynnika zaangażowanego w podziały komórkowe, wydaje się nie być bezpośrednio zależna od poziomu ekspresji *CGB*, otrzymane wyniki nie wykluczają jednak, że procesy te zależą od syntezy podjednostki hormonu.

Kluczową rolę w regulacji apoptozy odgrywa także wewnątrzpochodny szlak zwany mitochondrialnym. Inicjowana przez niego aktywacja kaspaz jest wynikiem zaburzeń potencjału błonowego i zwiększenia przepuszczalności błony mitochondrialnej, w następstwie których dochodzi do obrzęku i pęknięcia mitochondriów oraz uwalniania do cytoplazmy cytochromu *c* i innych białek proapoptotycznych. Szlak ten kontrolowany jest przez interakcje pomiędzy wewnątrzkomórkowymi pro- (np.: *BAX*, *BAK*, *BOK*, białka *BH3-only*) i antyapoptotycznymi białkami należącymi głównie do rodziny białek *BCL2* (np.: *BCL2*, *BCLXL*, *BCLW*, *MCL1*) [Adams i Cory 2007; Elmore 2007; Maddika i wsp. 2007].

Stąd w transfekowanych komórkach linii *OVCAR-3* i *SKOV-3* analizie poddano poziom ekspresji genów *BCL2* i *BAX*. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów dowodzą, że w komórkach *OVCAR-3* ekspresja genu *BAX* była zależna od poziomu ekspresji *CGB*, natomiast w komórkach *SKOV-3* podobną zależność zaobserwowano dla genu *BCL2*. W obu przypadkach nadekspresja *CGB* wiązała się z proporcjonalnym spadkiem ekspresji analizowanych tu genów.

Dane literaturowe pokazują, że zmiany w poziomie ekspresji *BCL2* i *BAX* są kluczowe dla procesów regulujących cykl życiowy komórek i ich apoptozę. Przewaga ekspresji *BCL2* chroni prawidłowe komórki przed apoptozą, natomiast nadmiar *BAX* może prowadzić do zainicjowania procesów śmierci komórkowej. Poziom ekspresji tych czynników wydaje się być zależny również od gonadotropiny kosmówkowej. Dowiedziono bowiem, że *CG* decyduje o losie komórek *corpus luteum* regulując proces apoptozy w opisany powyżej sposób [Sugino i wsp. 2000].

Interpretacja wyników analizy ekspresji czynników pro- i antyapoptotycznych *BCL2* i *BAX* w komórkach nowotworowych ma jednak odmienny charakter niż w przypadku tej samej analizy wykonywanej dla zdrowych tkanek. W nowotworach obecność i wysoki poziom białka *BCL2* koreluje ze zróżnicowaniem guza i lepszym rokowaniem, natomiast przewaga w tkance guza ekspresji *BAX* – z gorszym. Co więcej, pacjenci z nowotworami jajnika wykazującymi ekspresję *BAX*, ale nie *BCL2*, charakteryzują się istotnie obniżoną przeżywalnością, w porównaniu do tych, u których ekspresji ulegają oba te czynniki [Basu i Haldar 1998; Marx i wsp. 1997].

W obu transfekowanych liniach komórkowych nadekspresja CGB wiązała się ze spadkiem poziomu ekspresji genów *BCL2* i *BAX*. Zaobserwowano jednak, że bardziej znamienne spadki ekspresji dotyczyły genu *BCL2*. W poddanych transfekcji komórkach OVCAR-3 poziom *BCL2* spadał stopniowo i w siedemdziesiątej drugiej godzinie po podaniu konstruktów był pięć razy niższy niż w komórkach kontrolnych. Z kolei najniższy poziom *BCL2* w komórkach SKOV-3 odnotowano czterdzieści osiem godzin po transfekcji, gdy był on dwunastokrotnie niższy niż w komórkach kontrolnych. Ekspresja genu *BAX* nie podlegała tak dużym zmianom i była maksymalnie dwukrotnie i trzykrotnie niższa odpowiednio w komórkach OVCAR-3 i SKOV-3 z nadekspresją CGB, niż w komórkach nietransfekowanych. Z tego względu można przypuszczać, że obserwowane tu wahania ekspresji obu czynników odpowiedzialne są nie tylko za zmiany na poziomie czynników pro- i antyapoptotycznych, ale prawdopodobnie również fenotypu komórek wykazujących nadekspresję CGB na bardziej złośliwy.

Liczne badania dowodzą, że to ilościowy stosunek ekspresji *BCL2* i *BAX* i interakcje pomiędzy tymi czynnikami są elementem decydującym o losie (przeżyciu lub śmierci) komórki [Yoon i Roh 2012; de la Torre i wsp. 2007; Matsumoto i wsp. 2004; Schuyer i wsp. 2001]. Wartość stosunku *BCL2/BAX* jest cechą zmienną i charakterystyczną dla danego typu komórek, natomiast zmiana stosunku ekspresji obu genów ma udokumentowane znaczenie kliniczne i niekiedy jest stosowana jako czynnik prognostyczny w nowotworach. Spadek stosunku *BCL2/BAX* obserwowany w zaawansowanych stadiach raka jajnika związany jest ze stopniem zróżnicowania guza i gorszym rokowaniem, lecz wydaje się nie mieć związku z tempem proliferacji komórek [Yoon i Roh 2012]. Niski wskaźnik *BCL2/BAX* koreluje też z opornością na leczenie i nawrotem choroby. Ponadto bywa wyznacznikiem progresji choroby oraz całkowitego czasu przeżycia [de la Torre i wsp. 2007; Matsumoto i wsp. 2004; Schuyer i wsp. 2001; Scopa i wsp. 2001; Mackey i wsp. 1998].

Z uwagi na powyższe doniesienia, w przeprowadzonych tutaj badaniach poddano analizie współczynnik będący ilorazem względnej ekspresji genów *BCL2* i *BAX* (*BCL2/BAX*).

W komórkach OVCAR-3 zmiany w liczbie komórek apoptotycznych (oceniane metodą cytometrii przepływową) w sposób odwrotnie proporcjonalny odpowiadały analizowanemu współczynnikowi *BCL2/BAX*. Wzrostowi wartości tego współczynnika w dwudziestej czwartej godzinie po transfekcji odpowiadał pięciokrotny wzrost liczby komórek apoptotycznych. Z kolei trzykrotny, w stosunku do kontroli, spadek wartości

BCL2/BAX w czterdziestej ósmej i siedemdziesiątej drugiej godzinie po transfekcji związany był z dwukrotnym spadkiem liczby apoptotycznych komórek OVCAR-3, wykazujących nadekspresję *CGB*. A zatem niska wartość stosunku *BCL2/BAX* koreluje z zahamowaniem procesów apoptozy transfekowanych komórek OVCAR-3.

O ile w komórkach OVCAR-3 nadekspresja *CGB* powodowała wahania współczynnika *BCL2/BAX*, to w komórkach SKOV-3 wysoki poziom *CGB* związany był ze znaczącym spadkiem wartości wskaźnika *BCL2/BAX* a zarazem wzrostem liczby komórek apoptotycznych. Stan ten utrzymywał się przez cały czas trwania eksperymentu.

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki oraz fakt, iż nowotwory charakteryzujące się ekspresją wolnej podjednostki beta CG uważa się za gorzej rokujące i częściej ulegające przerzutom, pozwalają przypuszczać, że wywierany przez *CGB* efekt biologiczny polegający na ochronie komórek nowotworowych przed apoptozą, a także złośliwy fenotyp komórek guza osiągniany jest dzięki modulacji ekspresji genów *BCL2* i *BAX*.

Co ciekawe, mimo zmian liczby komórek apoptotycznych odnotowanych podczas analizy cyklu komórkowego obserwacja mikroskopowa morfologicznych cech komórek OVCAR-3 i SKOV-3 transfekowanych *CGB5*, z zastosowaniem barwinków Hoechst 33342 i jodku propidionowego, nie potwierdziła, aby dochodziło w nich do zwiększenia lub zmniejszenia odsetka komórek apoptotycznych. Prawdopodobnie zastosowana metoda, bazująca na subiektywnej ocenie obserwatora i analizująca ograniczoną i znacznie mniejszą niż w cytometrii przepływowej liczbę komórek apoptotycznych, nie była wystarczająco dobrym narzędziem, aby uwidocznić śmierć komórek i subtelne różnice pomiędzy komórkami kontrolnymi i poddanymi transfekcji.

Szczegółowe analizy cyklu komórkowego badanych tutaj komórek transfekowanych genem *CGB5* ponadto dostarczyły dowodów, że oprócz zmian na poziomie apoptozy, zarówno w linii OVCAR-3 jak i SKOV-3 nadekspresja *CGB* związana była ze zwiększoną proliferacją komórek. Wzrostowi odsetka komórek znajdujących się w fazie towarzyszył spadek frakcji komórek w fazie G₀/G₁.

W poddanych transfekcji komórkach SKOV-3 obserwowano dwukrotny wzrost komórek będących w fazie S cyklu, który utrzymywał się przez cały czas trwania eksperymentu. Natomiast w transfekowanych komórkach OVCAR-3 procentowy udział komórek w tej fazie zmieniał się podczas trwania eksperymentu, jednak zawsze był wyższy od półtora do dwóch razy niż w komórkach kontrolnych.

Przeprowadzone w pracy badania nie wyjaśniają bezpośrednio mechanizmu, w jakim nadekspresja *CGB* w komórkach OVCAR-3 i SKOV-3 promuje ich przejście

z fazy G1 w fazę S cyklu komórkowego. Niemniej jednak wydaje się, że fakt ten można wiązać z indukcją syntezy określonych czynników regulujących cykl komórkowy, które, jak pokazują dane literaturowe, mogą podlegać kontroli CG. Dowiedziono bowiem, że stymulacja komórek zrębu jajnika przez gonadotropinę kosmówkową prowadzi do wzrostu ekspresji cykliny D3 i zależnej od cyklin kinazy 4 (CDK4), które odpowiadają właśnie za przejście komórek z fazy G1 cyklu w fazę S [Palaniappan i Menon 2010].

Zwiększone tempo wzrostu komórek transfekowanych genem *CGB5* potwierdziło badanie przeprowadzone przy użyciu systemu xCELLigence. Analiza przyrostu liczby komórek w czasie rzeczywistym obu poddanych transfekcji genem *CGB5* linii komórkowych wykazywała ich szybszy wzrost w stosunku do komórek kontrolnych – niepoddanych transfekcji.

Dowodów potwierdzających zwiększenie potencjału proliferacyjnego transfekowanych genem *CGB5* komórek poszukiwano również na poziomie molekularnym badając ekspresję genu markera proliferacji – *MKI67*. Zarówno w komórkach OVCAR-3 jak i SKOV-3 nadekspresja CGB związana była jednak raczej ze spadkiem aktywności genu *MKI67*. Niemniej jednak ekspresja KI67 cechowała transfekowane komórki przez cały czas trwania eksperymentu. Ze względu na potwierdzoną proliferację analizowanych tu komórek można przypuszczać, że marker ten ulegał ekspresji również na poziomie białka. Zmiany w ekspresji KI67 zachodzą bardzo dynamiczne i związane są z przechodzeniem komórki przez poszczególne fazy cyklu, stąd analizy ekspresji KI67 wykonuje się zwykle pod względem jakościowym, a nie ilościowym, tak jak miało to miejsce w niniejszej pracy. Opublikowane dotychczas dane literaturowe ograniczają się jedynie do analiz immunohistochemicznych, dokumentujących obecność białka w różnego typu nowotworach. Analizy te wskazują, że ich istotą jest potwierdzenie samego faktu ekspresji KI67 w tkankach, świadczące o zachodzących w niej procesach proliferacji, a nie ilościowa analiza jego poziomu. Uważa się, że zmiany w ekspresji KI67 zachodzą bardzo szybko i związane są z przechodzeniem komórki przez poszczególne fazy cyklu. Poziom ekspresji KI67 najprawdopodobniej zwiększa się w momencie wejścia komórki w fazę S cyklu. Jego wzrost obserwuje się w fazie G2, a maksymalny poziom KI67 charakteryzuje komórki znajdujące się w metafazie mitozy [Scholzen i Gerdes 2000]. Poziom ekspresji białka w fazie G1 jest zagadnieniem niejasnym, gdyż część prac dokumentuje wzrost immunoreaktywności antygeny KI67 w tej fazie [Braun i wsp. 1988; Starborg i wsp. 1996], podczas gdy inne publikacje dowodzą spadku ekspresji antygeny [Bruno i Darzynkiewicz 1992; Lopez i wsp. 1991; van Dierendock i wsp. 1989].

Zmiany w poziomie ekspresji *MKI67* zaobserwowane w czasie eksperymentu może tłumaczyć fakt, że poddane badaniu komórki stanowiły niejednorodną grupę, obejmującą zarówno komórki dzielące się, będące w różnych fazach cyklu komórkowego, jak i te znajdujące się w fazie spoczynkowej. Niemniej jednak otrzymane wyniki jednoznacznie potwierdzają, iż transfekowane genem *CGB5* komórki OVCAR-3 jak i SKOV-3 charakteryzują się ekspresją markera KI67, co świadczy o ich potencjale do przeprowadzania podziałów.

We wcześniejszych doniesieniach dokumentujących efekt działania podjednostki beta gonadotropiny kosmówkowej na komórki nowotworowe obserwowano wprawdzie wzrost liczby komórek poddawanych stymulacji CGB, jednak do tej pory zakładano, że przyczyną tego zjawiska jest zablokowanie sygnałów proapoptotycznych [Bulter i Iles 2004]. W przeprowadzonych tu badaniach zastosowanie dwóch technik: cytometrii przepływowej i systemu xCELLigence pozwoliło jasno wykazać, że podjednostka beta gonadotropiny kosmówkowej wpływa na wzrost liczby komórek nie tylko poprzez regulację apoptozy, ale również przez stymulację ich proliferacji.

Jedne z ważniejszych mechanizmów regulujących podstawowe procesy komórkowe takie jak przeżycie, proliferacja, wzrost i metabolizm związane są ze szlakami kinaz białkowych ERK i AKT. Kinazy te stanowią kluczowe ogniwa efektorowe ścieżek sygnałnych aktywowanych odpowiednio mitogenami – kinazy MAPK i kinazy fosfatydyloinozytolu (PI3K). Liczne badania potwierdzają, że rozregulowanie sygnalizacji pośredniczonej przez ERK i AKT stanowi jedną z cech wyróżniających komórki nowotworowe. Zmiany na poziomie aktywności tych kinaz mogą promować rozwój i proliferację, a także wpływać na fenotyp komórek guza. Aktywacja tych enzymów zachodzi m.in. pod wpływem wielu różnych czynników wzrostu i hormonów [de Luca i wsp. 2012; Goto i wsp. 2009; Los i wsp. 2009; Junttila i wsp. 2008; McCubrey i wsp. 2007; Meloche i Pouysségur 2007].

Jednym z czynników, który jest zdolny indukować szlaki kinaz MAP i fosfatydyloinozytolu jest ludzka gonadotropina kosmówkowa. Potwierdzają to analizy prowadzone na komórkach, wykazujących ekspresję receptora LHCGR, m.in. komórkach trofoblastu, komórkach ziarnistych i zrębu jajnika, Leydiga i endometrium, w których pod wpływem CG dochodzi do fosforylacji białek ERK i AKT [Palaniappan i Menon 2010; Tai i wsp. 2009; Prast i wsp. 2008; Seger i wsp. 2001].

Przeprowadzone w niniejszej pracy analizy aktywności kinaz białkowych ERK i AKT w komórkach linii OVCAR-3 – posiadających receptor LHCGR, jak i SKOV-3 –

niewykazujących jego ekspresji wykazały, że zwiększenie syntezy CGB prowadzące do zmian w procesach proliferacji i apoptozy komórek nowotworowych związane jest z indukcją w nich szlaków kinaz białkowych ERK i AKT. Wyniki te dowodzą, że aktywacja ta zachodzi niezależnie od klasycznej ścieżki receptorowej: LHCGR/AC/cAMP.

Analizy aktywności kinaz białkowych ERK i AKT wykonane metodą western blot połączoną z oceną densytometryczną pokazały, że w transfekowanych genem *CGB5* komórkach raka jajnika linii OVCAR-3 najwyższy – półtorakrotnie wyższy niż w kontroli – poziom ufosforylowanego białka kinazy EKR (p-ERK) odnotowano czterdzieści osiem i siedemdziesiąt dwie godziny po podaniu konstruktów. Z kolei maksymalna aktywność kinazy AKT (p-AKT) cechowała komórki czterdzieści osiem godzin po transfekcji. Wówczas fosforylacja AKT była trzykrotnie wyższa niż w kontroli.

W poddanych transfekcji komórkach SKOV-3 poziom aktywacji zarówno ERK jak i AKT był podobny do obserwowanego w komórkach OVCAR-3. Maksymalny wzrost fosforylacji obu kinaz nastąpił dwadzieścia cztery godziny po transfekcji i był półtorakrotnie wyższy w przypadku p-ERK i trzykrotnie wyższy dla p-AKT niż w kontroli. Otrzymane wyniki jednoznacznie wskazują, że nadekspresja podjednostki beta gonadotropiny kosmówkowej w komórkach nowotworowych prowadzi do aktywacji kinaz ERK i AKT. Jednocześnie można zauważyć, że CGB silniej oddziałuje na ścieżkę związaną z kinazą fosfatydyloinozytolu.

Nie można jednak wykluczyć, że obserwowany w trakcie eksperymentów niższy stopień aktywacji kinazy ERK był również wynikiem zwiększonej ekspresji specyficznych fosfataz, odpowiedzialnych za dezaktywację kinaz MAP. Poziom aktywności tych enzymów nie był przedmiotem niniejszych badań, niemniej jednak wyniki prac prowadzonych na fibroblastach endometrium pokazały, że stymulacja tych komórek wysokimi stężeniami wolnej podjednostki beta CG powoduje m.in. wzrost ekspresji *DUSP6* – fosfatazy dezaktywującej kinazy indukowane mitogenami, w tym także ERK [Hudelist i wsp. 2010]. Jednocześnie doświadczenia wykonane na komórkach ziarnistych jajnika dowodzą, że gonadotropina kosmówkowa prowadzi do wzrostu ekspresji fosfatazy PTEN i redukcji stopnia fosforylacji AKT. Należy jednak podkreślić, że obserwacje te dotyczyły działania heterodimeru CG [Goto i wsp. 2009].

Obserwowana w niniejszej pracy zależność procesu aktywacji kinaz ERK i sekrecji CG była odnotowana już wcześniej. Dowiedziono, że podczas kontrolowanego przez gonadotropinę procesu tworzenia syncytium przez komórki raka kosmówki dochodzi

do wzrostu poziomu cAMP i ekspresji genów kontrolujących fuzję jednojądrzastych komórek cytotrofoblastu. Zauważono, że zwiększenie aktywności tych genów i poziomu hormonu CG poprzedzone jest gwałtownym wzrostem fosforylacji kinaz ERK1/2 i p38MAPK oraz redukcją wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapniowych. Pokazano także, że procesom tym towarzyszy zahamowanie sygnalizacji na ścieżce kinazy PI3K/AKT [Vatish i wsp. 2012; Delidaki i wsp. 2011]. Z kolei doświadczenia prowadzone na pierwotnych liniach komórkowych cytotrofoblastu wykazują, iż hormon promuje inwazję i migrację komórek trofoblastu poprzez aktywację sygnalizacji pośredniczonej przez oba typy kinaz: ERK i AKT, a także warunkowany aktywnością ERK i AKT wzrost ekspresji metaloproteiny 2 (MMP-2) [Prast i wsp. 2008]. Wpływ na ekspresję innej metaloproteiny (MMP-1) dowiedziono również w przypadku stymulacji fibroblastów endometrium przez wolną podjednostką beta CG. Co ciekawe, efekt ten wywołany był jedynie niskimi stężeniami CGB. Zwiększenie ilości CGB używanego do stymulacji komórek skutkowało aktywacją transkrypcyjną zupełnie innych genów [Hudelist i wsp. 2010].

Aktywacja kinaz AKT i ERK oraz ich związek z rozwojem procesu nowotworowego poprzez wpływ na przeżycie komórek np.: pod wpływem chemioterapeutyków jest dobrze udokumentowany [Peng i wsp. 2012; Astle i wsp. 2012; Nogueira i wsp. 2008; Liu i wsp. 2006; Yoeli-Lerner i wsp. 2005; Boldt i wsp. 2002; Ballif i Blenis 2001]. Podobnie szlak RAF/MEK/ERK promuje przeżycie komórek nowotworowych, inhibując apoptozę kontrolowaną przez białka z rodziny BCL2 [Balmanno i wsp. 2009; Boucher i wsp. 2000]. Dowiedziono także, że aktywacja ścieżki sygnalnej kinaz PI3K/AKT oraz ERK zwiększa *de novo* ekspresję antyapoptotycznego białka MCL1, członka rodziny BCL2 [Coloff i wsp. 2011; Schubert i wsp. 2001; Boucher i wsp. 2000]; przy czym relatywny poziom ekspresji MCL1 może być regulowany przez ERK zarówno na poziomie transkrypcji jak i przez potranslacyjne modyfikacje [Thomas i wsp. 2010]. Jak już wspomniano, w badanych tu komórkach raka jajnika wolna podjednostka beta CG wpływała na ekspresję genów *BCL2* i *BAX*. O ile w komórkach OVCAR-3 nadekspresja CGB prowadziła do obniżenia ekspresji genu *BCL2*, to w komórkach SKOV-3 spadek aktywności cechował gen *BAX*. Podobnie zmiany liczby komórek pod wpływem CGB wiązały się ze zmianą poziomu ekspresji genu kodującego surwiwinę. Nie można także wykluczyć, iż wykazana tu pod wpływem nadekspresji CGB aktywacja ścieżek sygnalnych pośredniczonych przez kinazy ERK i AKT reguluje proces

apoptozy poprzez inne geny, np. wspomniany powyżej *MCL1*, nieanalizowane w niniejszej pracy.

Jak już wspomniano, osiągnięta dzięki transfekcji wysoka ekspresja *CGB* w komórkach *OVCAR-3* i *SKOV-3* miała wpływ na aktywność transkrypcyjną genów *LHCGR* i *CGA*. W świetle otrzymanych w niniejszej pracy wyników, dowodzących, że nadekspresja *CGB* prowadzi do wzrostu fosforylacji kinazy *ERK* w komórkach *OVCAR-3*, można przypuszczać, że mechanizm odpowiedzialny za ograniczenie ekspresji *LHCGR* związany jest ze wzrostem ilości białka *LRBP*, biorącym udział w blokowaniu transkryptów genu receptora. Dowiedziono bowiem, że stymulacja komórek ziarnistych jajnika gonadotropiną kosmówkową prowadzi do spadku ekspresji *LHCGR* zależnego od aktywności kinaz białkowych *AKT* i *ERK* oraz poziomu *LRBP* [Menon i wsp. 2011].

Wśród genów, których aktywność transkrypcyjna zmieniła się pod wpływem nadekspresji *CGB* w badanych tu liniach komórkowych znalazły się również geny kodujące kinazy *ERK* i *AKT*. Zarówno w komórkach *OVCAR-3* jak i *SKOV-3* poddanych transfekcji zaobserwowano znaczący spadek ekspresji genu *ERK1* i mniejszy, choć wyraźny, spadek ekspresji *ERK2*.

Mimo utrzymującego się niższego, w porównaniu do nietransfekowanych komórek, poziomu mRNA *ERK1* i *ERK2*, w obu liniach komórkowych poziom całkowitego białka *ERK* był bardzo zbliżony do odnotowanego dla komórek kontrolnych. Można zatem przypuszczać, że pula RNA kodującego kinazy *ERK1* i *ERK2* w komórkach z nadekspresją była wystarczająca, aby utrzymać produkcję białka na poziomie zbliżonym do obserwowanego w komórkach kontrolnych. Jednocześnie można założyć, iż aktywność transkrypcyjna tych genów jest znacznie większa, niż zapotrzebowanie komórek na mRNA wykorzystywane w translacji białek, stąd ograniczenie jego ilości nie ma istotnego wpływu na ilość produkowanego białka *ERK* [Gry i wsp. 2009]. Obserwowany w niniejszych badaniach spadek poziomu ekspresji genów *ERK1* i *ERK2*, wydaje się nie mieć istotnego wpływu na poziom białka *ERK* i jego aktywność, choć opublikowane wcześniej doniesienia literaturowe sugerują, że to m.in. relacje ilościowe pomiędzy poszczególnymi izoformami *ERK* decydują o końcowym efekcie biologicznym i wejściu komórki na ścieżkę proliferacji bądź apoptozy [Guégan i wsp. 2013; Shin i wsp. 2010; Vantaggiato i wsp. 2006]. Dowiedziono, że wyciszenie genu *ERK1* w mysich fibroblastach powoduje wzmocnienie aktywacji *ERK2*, co promuje proliferację komórek. Z kolei nadekspresja *ERK1*, ale nie *ERK2*, powoduje zahamowanie podziałów komórkowych oraz blokuje zależny od aktywności białka *RAS* rozwój guzów u myszy [Vantaggiato i wsp. 2006].

Natomiast zablokowanie ekspresji *ERK2* całkowicie hamuje podziały komórkowe [Cárcamo-Orive i wsp. 2008; Lefloch i wsp. 2008]. Co ciekawe, przy niskim poziomie *ERK2*, kinaza *ERK1* promuje apoptozę indukowaną przez cisplatinę, stosowaną w chemioterapii nowotworów [Guégan i wsp. 2013]. W końcu nadekspresja i aktywacja *ERK2*, lecz nie *ERK1*, umożliwia natomiast epithelialno-mezenchymalną tranzycję (EMT) indukowaną przez białko RAS [Shin i wsp. 2010] oraz warunkuje migrację komórek raka piersi w warunkach *ich vitro* [von Thun i wsp. 2012].

Biorąc pod uwagę fakt, iż w analizowanych komórkach doszło do zmian relacji ilościowych w ekspresji kinaz *ERK1* i *ERK2* oraz że aktywacja kinaz ERK jest niezbędna jest do przejścia komórki z fazy G1 do fazy S i z G2 do M [Meloche i Pouysségur 2010] można wnioskować, że zmiany te wpłynęły na tempo wzrostu transfekowanych komórek. Ponadto w świetle przytoczonych danych literaturowych wyniki analizy ekspresji *ERK1* i *ERK2* sugerują, że w transfekowanych komórkach mogło dojść do zmiany ich fenotypu na bardziej złośliwy.

Przeprowadzona w niniejszej pracy analiza poziomu ekspresji genów kodujących trzy izoformy kinazy AKT pokazała, że nadekspresja CGB ma wpływ także na poziom transkryptów tych genów. W transfekowanej genem *CGB5* linii OVCAR-3 zaobserwowano zmniejszoną o połowę ekspresję kinazy *AKT1* w dwudziestej czwartej i siedemdziesiątej drugiej godzinie po podaniu konstruktów, natomiast zbliżony do kontrolnego poziom ekspresji tej izoformy AKT czterdzieści osiem godzin po transfekcji. Największe zmiany w komórkach OVCAR-3 komórkach odnotowano jednak dla izoformy 2 kinazy *AKT*. Przez cały czas trwania eksperymentu poziom ekspresji, *AKT2* utrzymywał się bowiem na pięciokrotnie niższym poziomie niż w komórkach kontrolnych. Z kolei ekspresja genu *AKT3* utrzymywała się na poziomie kontrolnym w czterdziestej ósmej i siedemdziesiątej drugiej godzinie po transfekcji, a dwukrotny spadek odnotowano tylko dwadzieścia cztery godziny po podaniu konstruktów.

W linii komórkowej SKOV-3 spadek ekspresji zaobserwowano dla genów *AKT1* i *AKT2*. Poziom *AKT1* spadł trzykrotnie dwadzieścia cztery godziny po transfekcji, a w kolejnych godzinach czterdziestej ósmej i siedemdziesiątej czwartej odnotowano dalszy pięcio- i siedmiokrotny spadek ekspresji tego genu. Natomiast analiza aktywności genu kodującego izoformę 2 kinazy AKT wykazała nieznaczny wzrost ekspresji kodującego ją genu w dwudziestej czwartej godzinie od wprowadzenia konstruktów z genem *CGB5*, a następnie czterokrotny spadek ekspresji *AKT2* w porównaniu do kontroli. Jedynym genem wyraźnie pozytywnie regulowanym przez CGB był *AKT3*, którego

ekspresja rosła stopniowo i siedemdziesiąt dwie godziny po transfekcji była trzykrotnie wyższa niż w kontroli.

Zmiany w poziomie mRNA dla genu kodującego *AKT3* udokumentowane w niniejszej pracy pozostają w zgodzie w wynikami wcześniejszych doniesień, mówiącymi iż w przypadku raku jajnika to właśnie izoforma *AKT3* w największym stopniu decyduje o przeżyciu i proliferacji komórek [Iliopoulos i wsp. 2009; Dillon i wsp. 2009; Maroulakou i wsp. 2007; Irie i wsp. 2005]. Można zatem założyć, iż obserwowana tu zmieniona ekspresja poszczególnych izoform kinazy wiąże się ze zmianą fenotypu badanych komórek. Zmiany w aktywności genów kodujących poszczególne izoformy kinazy zachodzące w transfekowanych komórkach OVCAR-3 i SKOV-3 wydają się ważne, gdyż jak pokazują badania kliniczne, nasilona ekspresja specyficznych izoform w różnych typach raka może odgrywać odmienny, niekiedy przeciwstawny efekt [Iliopoulos i wsp. 2009; Dillon i wsp. 2009; Maroulakou i wsp. 2007; Irie i wsp. 2005]. I tak na przykład, zahamowanie epitelialno-mezenchymalnej tranzycji, czy migracji komórek przez *AKT1* w raku piersi może być zrównoważone poprzez działanie *AKT2*. Z kolei, w raku prostaty zarówno *AKT1* jak i *AKT2* są negatywnymi regulatorami migracji i inwazji komórek [Virtakoivu i wsp. 2012], *AKT3* jest natomiast kluczowym czynnikiem zaangażowanym w proces nowotworzenia w jajniku. Wyciszenie tego genu wyraźnie hamuje proliferację komórek raka jajnika [Cristiano i wsp. 2006]. Doświadczenia prowadzone na komórkach trofoblastu, w których wyciszano poszczególne izoformy kinazy *AKT* sugerują, że to ekspresja *AKT1* i *AKT3* determinuje migrację komórek. Natomiast nie zaobserwowano, aby ograniczenie ekspresji którejkolwiek z izoform *AKT* wpływało na proliferację i apoptozę tych komórek [Haslinger i wsp. 2013]. Wydaje się więc, że to równowaga pomiędzy poszczególnymi izoformami kinazy decyduje o losie komórki, a niejednakowa ekspresja poszczególnych izoform jest charakterystyczną cechą określonych typów nowotworów [Iliopoulos i wsp. 2009; Maroulakou i wsp. 2007; Irie i wsp. 2005]. Potwierdzeniem tej hipotezy jest fakt, iż podwyższona aktywność *AKT1* wyróżnia raki piersi i prostaty, *AKT2* raki trzustki, a *AKT3* estrogenozależne raki piersi i raki prostaty oraz raki jajnika [Cristiano i wsp. 2006; Altomare i wsp. 2002; Sun i wsp. 2001; Nakatani i wsp. 1999].

Ponieważ w prowadzonych tu badaniach każdy z analizowanych genów kinazy *AKT* miał nieco odmienny wzór ekspresji w zależności od rodzaju transfekowanej linii komórkowej, trudno precyzyjnie określić wpływ poziomu mRNA poszczególnych izoform

na ilości produkowanego białka AKT i charakter zmian obserwowanych w transfekowanych komórkach.

Dane literaturowe oraz wyniki doświadczeń przedstawione w niniejszej pracy, dokumentujące obniżenie relatywnej ekspresji genów kodujących kinazy ERK i AKT pod wpływem CGB sugerują ponadto możliwość istnienia mechanizmów zwrotnie kontrolujących ich aktywność transkrypcyjną [Delidaki i wsp. 2011].

Zmiany poziomu ekspresji genów poszczególnych izoform kinaz i fluktuacje poziomu białek ERK i AKT w komórkach OVCAR-3 i SKOV-3 pod wpływem nadekspresji CGB nie wpływały jednak na sam proces aktywacji tych kinaz: stopień fosforylacji ERK i AKT w badanych komórkach nie wydaje się być bezpośrednio zależny od poziomu białka CGB produkowanego w transfekowanych komórkach. Można jednak założyć, że zwiększenie aktywności kinaz jest związane ze wzrostem poziomu ekspresji podjednostki beta gonadotropiny kosmówkowej i osiągnięcia określonej wartości progowej wymaganej dla indukcji szlaków sygnałnych pośredniczonych przez ERK i AKT.

W niniejszej pracy sprawdzono także możliwość aktywacji kinaz białkowych ERK i AKT pod wpływem stymulacji komórek przez egzogenną CGB. W tym celu przeprowadzono doświadczenia, w których zastosowano rekombinowane, komercyjnie dostępne białko – rCGB. Stężenie rCGB (100 ng/ml), a także czas inkubacji komórek z cząsteczką (pięcio-, piętnasto- i trzydziestominutowej) zostały dobrane na podstawie danych literaturowych [Hudelist i wsp. 2010; Prast i wsp. 2008].

Wyniki tych badań pokazały, że w obu liniach komórkowych podanie rCGB do medium hodowlanego już po kilku minutach skutkowało wzrostem puli ufosforylowanych białek kinaz ERK i AKT. Efekt ten był bardziej wyraźny w przypadku komórek OVCAR-3 (charakteryzującej się obecnością receptora LHCGR). Najwyższy stopień aktywacji kinaz ERK i AKT w tych komórkach odnotowano piętnaście minut po podaniu rCGB i był odpowiednio trzy- i czterokrotnie wyższy niż w komórkach niepoddawanych stymulacji. Z kolei w komórkach SKOV-3 maksymalny poziom fosforylacji ERK i AKT osiągnięty został po trzydziestominutowej inkubacji z rCGB, przy czym był on jedynie półtora razy wyższy niż w komórkach kontrolnych. Można zatem przypuszczać, że obecność receptora dla gonadotropiny kosmówkowej warunkuje szybszą i silniejszą aktywację analizowanych ścieżek sygnałnych w komórkach OVCAR-3. Powolniejszy i niższy wzrost aktywacji w komórkach SKOV-3 może świadczyć o tym, iż aktywacja kinaz ERK i AKT pod wpływem rCGB zachodzi na odmiennej, niezależnej od LHCGR

drodze poprzez inne znajdujące się na powierzchni komórki receptory potencjalnie oddziałujące z podjednostką beta CG.

Specyficzność indukcji szlaków badanych tu kinaz przez rCGB w obu liniach komórkowych została potwierdzona, gdyż wykazano, że ulega ona zablokowaniu w obecności inhibitorów kinaz wyższego rzędu, tj.: kinazy MEK oraz kinazy PI3K. Inkubacja komórek OVCAR-3 i SKOV-3 ze specyficznymi dla tych enzymów inhibitorami (odpowiednio U0126 oraz LY294002) nie prowadziła do fosforylacji kinaz AKT i ERK, obserwowanej w komórkach poddanych działaniu rCGB.

Przeprowadzone w niniejszej pracy badania dokumentujące fosforylację kinaz ERK i AKT pod wpływem endogennej nadekspresji CGB oraz egzogennej rekombinowanej podjednostki beta CG jednoznacznie dowodzą, że wolna podjednostka beta gonadotropiny kosmówkowej zdolna jest aktywować szlaki sygnałowe z udziałem tych kinaz.

Choć związek pomiędzy CG a indukcją ścieżek sygnałowych kinaz był już badany, należy jednak podkreślić, iż dotychczasowe prace dotyczyły działania całego hormonu i aktywacji szlaków kinaz ERK i AKT w komórkach z aktywnym receptorem LHCGR. Jak dotąd w literaturze brak doniesień potwierdzających lub wykluczających możliwość łączenia się wolnej CGB z receptorem dla gonadotropiny kosmówkowej a fakt, że w licznych nowotworach wydzielających CGB brak ekspresji LHCGR [Davies i wsp, 2001; Jankowska i wsp. 2008 b] sugeruje, że istnieje alternatywny mechanizm, przez który CGB oddziałuje na komórki guza.

Badania przeprowadzone z wykorzystaniem komórek SKOV-3 charakteryzujących się brakiem ekspresji LHCGR jednoznacznie dowodzą, że obecność tego receptora nie jest warunkiem koniecznym, aby CGB mogła wywierać biologiczny efekt na komórki nowotworowe, aktywując w nich szlaki sygnałowe kinaz ERK i AKT regulujące procesy proliferacji i apoptozy.

Jedną z hipotez wyjaśniającą prawdopodobny mechanizm działania CGB na komórki niewykazujące ekspresji receptora LHCGR opiera się na podobieństwie trzeciorzędowej struktury CG i CGB do czynników wzrostu zawierających motyw wężła cysteinowego, takich jak TGF β , PDGF i NGF. Zakłada ona, że dzięki homologii strukturalnej CGB może oddziaływać z receptorami tych czynników [Iles 2007; Butler i wsp. 2000].

Opublikowane ostatnio wyniki badań dotyczące roli gonadotropiny kosmówkowej w angiogenezie pokazały, że hiperglikozylowana CG, lecz nie hormon o podstawowym stopniu glikozylacji, rzeczywiście może wiązać się z receptorem dla TGFBR2 i indukować

aktywację kinaz SMAD, promując waskularyzację w komórkach linii raka kosmówki [Berndt i wsp. 2012]. Natomiast jedna z wcześniejszych prac dowodzi, że wykazując antagonistyczne w stosunku do TGFB działanie, wolna podjednostka beta gonadotropiny kosmówkowej warunkuje przeżycie komórek nowotworowych, chroniąc je przed apoptozą indukowaną przez TGFB [Butler i wsp. 2000]. Wyniki tych doświadczeń sugerują, iż biologiczna aktywność monomeru CGB może być pośredniczona przez receptor transformującego czynnika wzrostu – TGFBR2.

Hipoteza mówiąca o możliwości łączenia się wolnej podjednostki beta gonadotropiny kosmówkowej z receptorami czynników posiadających motyw wężła cysteinowego nie została jednak potwierdzona i mimo ukazania się publikacji o oddziaływaniu hiperglikozylowanej gonadotropiny kosmówkowej z TGFBR2, nadal brak odpowiedzi na pytanie, czy w podobny sposób mogłaby wiązać się z tym receptorem wolna podjednostka beta CG. Niemniej jednak zważywszy na fakt, iż receptory czynników wzrostu takich jak EGFR, PDGFR, czy TGFBR2 są jednymi z czynników aktywujących ścieżki sygnałowe kinaz ERK i AKT hipoteza ta wydaje się bardzo prawdopodobna [Stipursky i wsp. 2012; McCubrey i wsp. 2007; Jiang i wsp. 2006; Wilkes i wsp. 2005; Stehr i wsp. 2003].

W świetle przedstawionych w pracy wyników dokumentujących fakt, że produkowana przez szereg nowotworów różnego pochodzenia wolna podjednostka beta gonadotropiny kosmówkowej może wywierać biologiczny efekt z pominięciem klasycznego receptora wspólnego dla gonadotropiny kosmówkowej i lutropiny i oddziaływać na komórki pozbawione LHCGR, niezwykle istotnym staje się wyjaśnienie mechanizmów działania podjednostki hormonu w komórkach nowotworowych. Poznanie mechanizmów, dzięki którym podjednostka beta gonadotropiny kosmówkowej indukuje ścieżki sygnałowe kinaz AKT i ERK, zaangażowane w regulację procesów proliferacji i apoptozy może w przyszłości stać się podstawą wyznaczenia nowych dróg terapii raka. Znajomość poszczególnych elementów kaskady sygnału i wykorzystanie potencjału blokowania ekspresji genów może bowiem umożliwić zastosowanie terapii celowanej przeciw białkom zaangażowanym w nowotworzenie.

6. Wnioski

Na podstawie wyników uzyskanych w niniejszej pracy, wysunięto następujące wnioski:

1. Nadekspresja podjednostki beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej wpływa na czynności życiowe komórek nowotworowych, prowadząc do zwiększenia ich proliferacji oraz zmian w ekspresji genów regulujących apoptozę.
2. Podjednostka beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej aktywuje w komórkach szlaki sygnału pośredniczone przez kinazy białkowe ERK i AKT.
3. Aktywacja kinaz białkowych ERK i AKT przez CGB jest specyficzna – ulega zablokowaniu w obecności inhibitorów kinaz wyższego rzędu.
4. CGB może wywierać biologiczny efekt z pominięciem klasycznego receptora LHCGR – efekt aktywacji kinaz ERK i AKT obserwuje się zarówno w komórkach posiadających jak i nieposiadających receptor. Jednak w komórkach, w których receptor ten jest aktywny, poziom fosforylacji kinaz jest wyższy.
5. Ekspresja receptora LHCGR warunkuje osiągnięcie antyapoptotycznego efektu wywieranego przez CGB.

7. Bibliografia

1. Abramowitz J, Birnbaumer L: Temporal characteristics of gonadotropin interaction with rabbit luteal receptors and activation of adenylyl cyclase: comparison to the mode of action of catecholamine receptors. *Endocrinology*. 1982; 111(3):970-6.
2. Adams JM, Cory S: The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 2007; 26:26(9):1324-37.
3. Ai Z, Yin L, Zhou X, Zhu Y, Zhu D, Yu Y, Feng Y: Inhibition of survivin reduces cell proliferation and induces apoptosis in human endometrial cancer. *Cancer*. 2006; 107(4):746-56.
4. Aksamitiene E, Kiyatkin A, Kholodenko BN: Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. *Biochem Soc Trans*. 2012; 40(1):139-46.
5. Albanese C, Kay TW, Troccoli NM, Jameson JL: Novel cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element in the human chorionic gonadotropin beta-subunit gene. *Mol Endocrinol*. 1991; 5(5):693-702.
6. Altomare DA, Khaled AR: Homeostasis and the importance for a balance between AKT/mTOR activity and intracellular signaling. *Curr Med Chem*. 2012; 19(22):3748-62.
7. Altomare DA, Tanno S, De Rienzo A, Klein-Szanto AJ, Tanno S, Skele KL, Hoffman JP, Testa JR: Frequent activation of AKT2 kinase in human pancreatic carcinomas. *J Cell Biochem*. 2002; 87(4):470-6.
8. Arrieta O, Michel Ortega RM, Angeles-Sánchez J, Villarreal-Garza C, Avilés-Salas A, Chanona-Vilchis JG, Aréchaga-Ocampo E, Luévano-González A, Jiménez MA, Aguilar JL: Serum human chorionic gonadotropin is associated with angiogenesis in germ cell testicular tumors. *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 2009; 28:120.
9. Astle MV, Hannan KM, Ng PY, Lee RS, George AJ, Hsu AK, Haupt Y, Hannan RD, Pearson RB: AKT induces senescence in human cells via mTORC1 and p53 in the absence of DNA damage: implications for targeting mTOR during malignancy. *Oncogene*. 2012; 31(15):1949-62.
10. Ballif BA, Blenis J: Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals. *Cell Growth Differ*. 2001; 12:397-408.
11. Balmanno K, Cook SJ: Tumor cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death Differ*. 2009; 16:368-377.
12. Banerjee P, Fazleabas AT: Extragonadal actions of chorionic gonadotropin. *Rev Endocr Metab Disord*. 2011; 12(4):323-32.

13. Bansal AS, Bora SA, Saso S, Smith JR, Johnson MR, Thum MY: Mechanism of human chorionic gonadotrophin-mediated immunomodulation in pregnancy. *Expert Rev Clin Immunol.* 2012; 8(8):747-53.
14. Basu A, Haldar S: The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Mol Hum Reprod.* 1998; 4(12):1099-109.
15. Beebe JS, Krzesicki RF, Norton SE, Perini F, Peters BP, Ruddon RW: Identification and characterization of subpopulations of the free alpha-subunit that vary in their ability to combine with chorionic gonadotropin-beta. *Endocrinology.* 1989; 124(4):1613-24.
16. Berger P., Kranewitter W., Madersbacher S., Gerth R., Geley S., Dirnhofer S: Eutopic production of human chorionic gonadotropin beta (hCG beta) and luteinizing hormone beta (hLH beta) in the human testis. *FEBS Lett.* 1994; 343:229-233.
17. Berndt S, Blacher S, Munaut C, Detilleux J, Perrier d'Hauterive S, Huhtaniemi I, Evain-Brion D, Noël A, Fournier T, Foidart JM: Hyperglycosylated human chorionic gonadotropin stimulates angiogenesis through TGF- β receptor activation. *FASEB J.* 2012.
18. Blithe DL, Richards RG, Skarulis MC: Free alpha molecules from pregnancy stimulate secretion of prolactin from human decidual cells: a novel function for free alpha in pregnancy. *Endocrinology.* 1991; 129(4):2257-9.
19. Bo M, Boime I: Identification of the transcriptionally active genes of the chorionic gonadotropin beta gene cluster in vivo. *J Biol Chem.* 1992; 267(5):3179-84.
20. Boldt S, Weidle UH, Kolch W: The role of MAPK pathways in the action of chemotherapeutic drugs. *Carcinogenesis.* 2002; 23(11):1831-8.
21. Bonduelle ML, Dodd R, Liebaers I, Van Steirteghem A, Williamson R, Akhurst R: Chorionic gonadotrophin-beta mRNA, a trophoblast marker, is expressed in human 8-cell embryos derived from trippronucleate zygotes. *Hum Reprod.* 1988; 3(7):909-14.
22. Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME: Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and-independent mechanisms. *Science.* 1999; 286(5443):1358-62.
23. Boothby M, Kukowska J, Boime J: Imbalanced synthesis of human choriogonadotropin alpha and beta subunits reflects the steady state levels of the corresponding mRNAs. *J Biol Chem.* 1983; 258:9250-9253.
24. Boucher MJ, Morisset J, Vachon PH, Reed JC, Lainé J, Rivard N: MEK/ERK signaling pathway regulates the expression of Bcl-2, Bcl-XL, and Mcl-1 and promotes survival of human pancreatic cancer cells. *J Cell Biochem.* 2000; 79:355-369.
25. Braun N, Papadopoulos T, Müller-Hermelink HK: Cell cycle dependent distribution of the proliferation-associated Ki-67 antigen in human embryonic lung cells. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 1988; 56(1):25-33.
26. Bruno S, Darzynkiewicz Z: Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif.* 1992; 25(1):31-40.

27. Buday L, Egan SE, Rodriguez Viciano P, Cantrell DA, Downward J: A complex of Grb2 adaptor protein, Sos exchange factor, and a 36-kDa membrane-bound tyrosine phosphoprotein is implicated in ras activation in T cells. *J Biol Chem.* 1994; 269(12):9019-23.
28. Burgering BM, Medema RH: Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty. *J Leukoc Biol.* 2003; 73(6):689-701.
29. Butler SA, Ikram MS, Mathieu S, Iles RK: The increase in bladder carcinoma cell population induced by the free beta subunit of human chorionic gonadotrophin is a result of an anti-apoptosis effect and not cell proliferation. *Br J Cancer.* 2000; 82(9):1553-6.
30. Butler SA, Iles RK: The free monomeric beta subunit of human chorionic gonadotrophin (hCG beta) and the recently identified homodimeric beta-beta subunit (hCG beta beta) both have autocrine growth effects. *Tumour Biol.* 2004; 25(1-2):18-23.
31. Butler SA, Laidler P, Porter JR, Kicman T, Chard T, Cowan D, Iles RK: The beta-subunit of human chorionic gonadotrophin exists as a homodimer. *J Mol Endocrinol.* 1999; 22(2):185-92.
32. Calleja V, Alcor D, Laguerre M, Park J, Vojnovic B, Hemmings BA, Downward J, Parker PJ, Larijani B: Intramolecular and intermolecular interactions of protein kinase B define its activation in vivo. *PLoS Biol.* 2007; 5(4):e95.
33. Campaign JA, Gutkin DW, Cox GS: Differential DNA methylation of the chorionic gonadotropin beta-subunit multigene family. *Mol Endocrinol.* 1993; 7(10):1331-46.
34. Cárcamo-Orive I, Tejados N, Delgado J, Gaztelumendi A, Otaegui D, Lang V, Trigueros C. ERK2 protein regulates the proliferation of human mesenchymal stemcells without affecting their mobilization and differentiation potential. *ExpCell Res.* 2008; 314(8):1777-88.
35. Cargnello M, Roux PP: Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2011; 75(1):50-83.
36. Casamayor A, Torrance PD, Kobayashi T, Thorner J, Alessi DR: Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast. *Curr Biol.* 1999; 9(4):186-97.
37. Casarini L, Lispi M, Longobardi S, Milosa F, La Marca A, Tagliasacchi D, Pignatti E, Simoni M: LH and hCG Action on the Same Receptor Results in Quantitatively and Qualitatively Different Intracellular Signalling. *PLoS One.* 2012; 7(10):e46682.
38. Chambard JC, Lefloch R, Pouyssegur J, Lenormand P: ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1773(8):1299-310.
39. Chen WS, Xu PZ, Gottlob K, Chen ML, Sokol K, Shiyanova T, Roninson I, Weng W, Suzuki R, Tobe K, Kadowaki T, Hay N: Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes Dev.* 2001; 15(17):2203-8.
40. Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB 3rd, Kaestner KH, Bartolomei MS, Shulman GI, Birnbaum MJ: Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science.* 2001; 292(5522):1728-31.

41. Choi JH, Chen CL, Poon SL, Wang HS, Leung PC: Gonadotropin-stimulated epidermal growth factor receptor expression in human ovarian surface epithelial cells: involvement of cyclic AMP-dependent exchange protein activated by cAMP pathway. *Endocr Relat Cancer*. 2009; 16(1):179-88.
42. Cocquebert M, Berndt S, Segond N, Guibourdenche J, Murthi P, Aldaz-Carroll L, Evain-Brion D, Fournier T: Comparative expression of hCG β -genes in human trophoblast from early and late first-trimester placentas. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012; 303(8):E950-8.
43. Cole LA: hCG, five independent molecules. *Clin Chim Acta*. 2012 a; 413(1-2):48-65.
44. Cole LA: hCG variants, the growth factors which drive human malignancies *Am J Cancer Res* 2012 b; 2(1):22-35.
45. Cole LA: New discoveries on the biology and detection of human chorionic gonadotropin. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009; 26:7-8.
46. Cole LA, Butler S: Hyperglycosylated hCG, hCG β and Hyperglycosylated hCG β : Interchangeable cancer promoters. *Mol Cell Endocrinol*. 2011; 349(2):232-8.
47. Cole LA, Kardana A, Andrade-Gordon P, Gawinowicz MA, Morris JC, Bergert ER, O'Connor J, Birken S: The heterogeneity of hCG: III. The occurrence, biological and immunological activities of nicked hCG. *Endocrinology*. 1991; 129:1559–1567.
48. Coloff JL, Macintyre AN, Nichols AG, Liu T, Gallo CA, Plas DR, Rathmell JC: Akt-dependent glucose metabolism promotes Mcl-1 synthesis to maintain cell survival and resistance to Bcl-2 inhibition. *Cancer Res*. 2011; 71:5204–5213.
49. Craig EA, Stevens MV, Vaillancourt RR, Camenisch TD: MAP3Ks as central regulators of cell fate during development. *Dev Dyn*. 2008; 237(11):3102-14.
50. Cremoux de P, Robert J: Cell signalling and cancer: characterisation of therapeutic targets. *Pathol Biol (Paris)*. 2012; 60(4):217-22.
51. Cristiano BE, Chan JC, Hannan KM, Lundie NA, Marmy-Conus NJ, Campbell IG, Phillips WA, Robbie M, Hannan RD, Pearson RB: A specific role for AKT3 in the genesis of ovarian cancer through modulation of G(2)-M phase transition. *Cancer Res*. 2006; 66(24):11718-25.
52. Cui J, Miner BM, Eldredge JB, Warrenfeltz SW, Dam P, Xu Y, Puett D: Regulation of gene expression in ovarian cancer cells by luteinizing hormone receptor expression and activation. *BMC Cancer*. 2011; 11:280.
53. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME: Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev*. 1999; 13(22):2905-27.
54. Davies S, Bax CM, Chatzaki E, Chard T, Iles R: Regulation of endometrial cancer cell growth by luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH). *Br J Cancer*. 2000; 83(12):1730-4.
55. Degenhardt K, Sundararajan R, Lindsten T, Thompson C, White E: Bax and Bak independently promote cytochrome C release from mitochondria. *J Biol Chem*. 2002; 277(16):14127-34.

56. Deiry el S, Kaetzel D, Kennedy G, Nilson J, Puett D: Site-directed mutagenesis of the human chorionic gonadotropin beta-subunit: bioactivity of a heterologous hormone, bovine alpha-human des-(122-145)beta. *Mol Endocrinol.* 1989; 3(10):1523-8.
57. Delidaki M, Gu M, Hein A, Vatish M, Grammatopoulos DK: Interplay of cAMP and MAPK pathways in hCG secretion and fusogenic gene expression in a trophoblast cell line. *Mol Cell Endocrinol.* 2011; 332(1-2):213-20.
58. Dewi DA, Abayasekara DR, Wheeler-Jones CP: Requirement for ERK1/2 activation in the regulation of progesterone production in human granulosa-lutein cells is stimulus specific. *Endocrinology.* 2002; 143(3):877-88.
59. Dierendonck van JH, Keijzer R, van de Velde CJ, Cornelisse CJ: Nuclear distribution of the Ki-67 antigen during the cell cycle: comparison with growth fraction in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 1989; 49(11):2999-3006.
60. Dillon RL, Marcotte R, Hennessy BT, Woodgett JR, Mills GB, Muller WJ: Akt1 and akt2 play distinct roles in the initiation and metastatic phases of mammary tumor progression. *Cancer Res.* 2009; 69:5057-5064.
61. Dirnhofer S, Hermann M, Hittmair R, Hoermann K, Kapelari K, Berger P: Expression of the human chorionic gonadotropin-beta gene cluster in human pituitaries and alternate use of exon 1. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996; 81:4212-4217.
62. Dong LQ, Liu F: PDK2: the missing piece in the receptor tyrosine kinase signaling pathway puzzle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005; 289(2):E187-96.
63. Du K, Herzig S, Kulkarni RN, Montminy M: TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science.* 2003; 300(5625):1574-7.
64. Dummler B, Hemmings BA: Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease. *Biochem Soc Trans.* 2007; 35(Pt 2):231-5.
65. Eisenmann KM, VanBrocklin MW, Staffend NA, Kitchen SM, Koo HM: Mitogen-activated protein kinase pathway-dependent tumor-specific survival signaling in melanoma cells through inactivation of the proapoptotic protein bad. *Cancer Res.* 2003; 63(23):8330-7.
66. Elmore S: Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35(4):495-516.
67. Feng W, Bedows E, Norton SE, Ruddon RW: Novel covalent chaperone complexes associated with human chorionic gonadotropin beta subunit folding intermediates. *J Biol Chem.* 1996; 271(31):18543-8.
68. Feng W, Matzuk MM, Mountjoy K, Bedows E, Ruddon RW, Boime I. The asparagine-linked oligosaccharides of the human chorionic gonadotropin beta subunit facilitate correct disulfide bond pairing. *J Biol Chem.* 1995; 270(20):11851-9.
69. Fournier T, Guibourdenche J, Handschuh K, Tsatsaris V, Rauwel B, Davrinche C, Evain-Brion D: PPAR γ and human trophoblast differentiation. *J Reprod Immunol.* 2011; 90(1):41-9.

70. Gaestel M: Specificity of signaling from MAPKs to MAPKAPKs: kinases' tango nuevo. *Front Biosci.* 2008; 13:6050-9.
71. Galet C, Ascoli M: The differential binding affinities of the luteinizing hormone (LH)/choriogonadotropin receptor for LH and choriogonadotropin are dictated by different extracellular domain residues. *Mol Endocrinol.* 2005; 19(5):1263-76.
72. Gao T, Furnari F, Newton AC: PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell.* 2005; 18(1):13-24.
73. Garcia-Campayo V, Sugahara T, Boime I: Unmasking a new recognition signal for O-linked glycosylation in the chorionic gonadotropin beta subunit. *Mol Cell Endocrinol.* 2002; 194(1-2):63-70.
74. Ghosh D, Ezashi T, Ostrowski MC, Roberts RM: A central role for Ets-2 in the transcriptional regulation and cyclic adenosine 5'-monophosphate responsiveness of the human chorionic gonadotropin-beta subunit gene. *Mol Endocrinol.* 2003; 17(1):11-26.
75. Giovangrandi Y., Parfait B., Asheuer M., Olivi M., Lidereau R., Vidaud M., Bieche I: Analysis of the human CGB/LHB gene cluster in breast tumors by real-time quantitative RT-PCR assays. *Cancer Lett.* 2001; 168:93-100.
76. Gonzalez FA, Raden DL, Rigby MR, Davis RJ: Heterogeneous expression of four MAP kinase isoforms in human tissues. *FEBS Lett.* 1992; 304(2-3):170-8.
77. Goto M, Iwase A, Harata T, Takigawa S, Suzuki K, Manabe S, Kikkawa F: IGF1-induced AKT phosphorylation and cell proliferation are suppressed with the increase in PTEN during luteinization in human granulosa cells. *Reproduction.* 2009; 137(5):835-42.
78. Grigoriu A, Ferreira JC, Choufani S, Baczyk D, Kingdom J, Weksberg R: Cell specific patterns of methylation in the human placenta. *Epigenetics.* 2011; 6(3):368-79.
79. Gry M, Rimini R, Strömberg S, Asplund A, Pontén F, Uhlén M, Nilsson P: Correlations between RNA and protein expression profiles in 23 human cell lines. *BMC Genomics.* 2009; 10:365.
80. Guégan JP, Ezan F, Théret N, Langouët S, Baffet G: MAPK signaling incisplatin-induced death: predominant role of ERK1 over ERK2 in humanhepatocellular carcinoma cells. *Carcinogenesis.* 2013; 34(1):38-47.
81. Guha M, Altieri DC: Survivin as a global target of intrinsic tumor suppressionnetworks. *Cell Cycle.* 2009; 8(17):2708-10.
82. Hallast P, Nagirnaja L, Margus T, Laan M: Segmental duplications and gene conversion: Human luteinizing hormone/chorionic gonadotropin beta gene cluster. *Genome Res.* 2005; 15(11):1535-46.
83. Hamada AL, Nakabayashi K, Sato A, Kiyoshi K, Takamatsu Y, Laoag-Fernandez JB, Ohara N, Maruo T: Transfection of antisense chorionic gonadotropin β gene into choriocarcinoma cells suppresses the cell proliferation and induces apoptosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90:4873-4879.

84. Han SW, Lei ZM, Rao CV: Treatment of human endometrial stromal cells with chorionic gonadotropin promotes their morphological and functional differentiation into decidua. *Mol Cell Endocrinol.* 1999; 147(1-2):7-16.
85. Handschuh K, Guibourdenche J, Cocquebert M, Tsatsaris V, Vidaud M, Evain-Brion D, Fournier T: Expression and regulation by PPARgamma of hCG alpha- and beta-subunits: comparison between villous and invasive extravillous trophoblastic cells. *Placenta.* 2009; 30(12):1016-22.
86. Haslam RJ, Koide HB, Hemmings BA: Pleckstrin domain homology. *Nature.* 1993; 363(6427):309-10.
87. Haslinger P, Haider S, Sonderegger S, Otten JV, Pollheimer J, Whitley G, Knöfler M: AKT Isoforms 1 and 3 Regulate Basal and Epidermal Growth Factor-Stimulated SGHPL-5 Trophoblast Cell Migration in Humans. *Biol Reprod.* 2013.
88. Herr F, Baal N, Reisinger K, Lorenz A, McKinnon T, Preissner KT, Zygmunt M: HCG in the regulation of placental angiogenesis. Results of an in vitro study. *Placenta.* 2007; 28(Suppl A):5-93.
89. Hoffman YM, Peegel H, Sprock MJ, Zhang QY, Menon KMJ: Evidence that human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor down-regulation involves decreased levels of receptor messenger ribonucleic acid. *Endocrinology.* 1991; 128:388–393.
90. Hopkin K: A surprising function for the PTEN tumor suppressor. *Science.* 1998; 282(5391):1027,1029-30.
91. Horgan AM, Stork PJ: Examining the mechanism of Erk nuclear translocation using green fluorescent protein. *Exp Cell Res.* 2003; 285(2):208-20.
92. Hotakainen K, Lintula S, Jarvinen R, Paju A, Stenman J, Rintala E, Stenman UH: Overexpression of human chorionic gonadotropin beta genes 3, 5 and 8 in tumortissue and urinary cells of bladder cancer patients. *Tumour Biol.* 2007; 28(1):52-6.
93. Hudelist G, Huber A, Auer M, Knöfler M, Saleh L, Hrachowitz C, Huber JC, Kubista E, Manavi M, Bilban M, Singer CF: Administration of betaHCG leads todose-dependent changes of gene expression signature of endometriotic stromalcells. *Reprod Biomed Online.* 2010; 20(5):699-706.
94. Huth JR, Mountjoy K, Perini F, Ruddon RW: Intracellular folding pathway of human chorionic gonadotropin beta subunit. *J Biol Chem.* 1992; 267(13):8870-9.
95. Iles RK: Ectopic hCGbeta expression by epithelial cancer: malignant behaviour, metastasis and inhibition of tumor cell apoptosis. *Mol Cell Endocrinol.* 2007; 260–262:264–270.
96. Iliopoulos D, Polytarchou C, Hatziapostolou M, Kottakis F, Maroulakou IG, Struhl K, Tsichlis PN: MicroRNAs differentially regulated by Akt isoforms control EMT and stem cell renewal in cancer cells. *Sci Signal.* 2009; 2:ra62.
97. Irie HY, Pearline RV, Grueneberg D, Hsia M, Ravichandran P, Kothari N, Natesan S, Brugge JS: Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol.* 2005; 71(6):1023-34.
98. Jablonka-Shariff A, Boime I: Secretory trafficking signal encoded in the carboxyl-terminal region of the CGbeta-subunit. *Mol Endocrinol.* 2009; 23(3):316-23.

99. Jameson JL, Powers AC, Gallagher GD, Habener JF: Enhancer and promoter element interactions dictate cyclic adenosine monophosphate mediated and cell-specific expression of the glycoprotein hormone alpha-gene. *Mol Endocrinol.* 1989; 3(5):763-72.
100. Jankowska A, Andrusiewicz M, Grabowski J, Nowak-Markwitz E, Warchol JB: Coexpression of human chorionic gonadotropin beta subunit and its receptor in nontrophoblastic gynecological cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2008 a; 18(5):1102-7.
101. Jankowska A, Gunderson SI, Andrusiewicz M, Burczynska B, Szczerba A, Jarmolowski A, Nowak-Markwitz E, Warchol JB: Reduction of human chorionic gonadotropin beta subunit expression by modified U1 snRNA caused apoptosis in cervical cancer cells. *Mol Cancer.* 2008 b; 7:26-31.
102. Jiang L, Luo RY, Yang J, Cheng YX: Knockdown of survivin contributes to antitumor activity in cisplatin-resistant ovarian cancer cells. *Mol Med Report.* 2013; 7(2):425-30.
103. Jiang Q, Zhou C, Bi Z, Wan Y: EGF-induced cell migration is mediated by ERK and PI3K/AKT pathways in cultured human lens epithelial cells. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2006; 22(2):93-102.
104. Junttila MR, Li SP, Westermarck J: Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J.* 2008; 22(4):954-65.
105. Jurisicova A, Antenos M, Kapasi K, Meriano J, Casper RF: Variability in the expression of trophoblastic markers beta-human chorionic gonadotrophin, human leukocyte antigen-G and pregnancy specific beta-1 glycoprotein by the human blastocyst. *Hum Reprod.* 1999; 14(7):1852-8.
106. Katayama K, Fujita N, Tsuruo T: Akt/protein kinase B-dependent phosphorylation and inactivation of WEE1Hu promote cell cycle progression at G2/M transition. *Mol Cell Biol.* 2005; 25(13):5725-37.
107. Kiechle FL, Zhang X: Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clin Chim Acta.* 2002; 326(1-2):27-45.
108. Kim DW, Cochran BH: Extracellular signal-regulated kinase binds to TFII-I and regulates its activation of the c-fos promoter. *Mol Cell Biol.* 2000; 20(4):1140-8.
109. Knöfler M, Saleh L, Bauer S, Galos B, Rotheneder H, Husslein P, Helmer H: Transcriptional regulation of the human chorionic gonadotropin beta gene during villous trophoblast differentiation. *Endocrinology.* 2004; 145(4):1685-94.
110. Knöfler M, Saleh L, Bauer S, Vasicek R, Griesinger G, Strohmer H, Helmer H, Husslein P: Promoter elements and transcription factors involved in differentiation-dependent human chorionic gonadotrophin-alpha messenger ribonucleic acid expression of term villous trophoblasts. *Endocrinology.* 2000; 141(10):3737-48.
111. Krause, JM, Berger P, Roig J, Singh V, Merz WE: Rapid maturation of glycoprotein hormone free alpha-subunit (GPHalpha) and GPHalpha alpha homodimers. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.).* 2007; 21(10):2551-64.
112. Kumazawa Y, Kawamura K, Sato T, Sato N, Konishi Y, Shimizu Y, Fukuda J, Kodama H, Tanaka T: HCG up-regulates survivin mRNA in human granulosa cells. *Mol Hum Reprod.* 2005; 11(3):161-6.

113. Lakkakorpi JT, Pietilä EM, Aatsinki JT, Rajaniemi HJ: Human chorionic gonadotrophin (CG)-induced down-regulation of the rat luteal LH/CG receptor results in part from the down-regulation of its synthesis, involving increased alternative processing of the primary transcript. *J Mol Endocrinol.* 1993; 10(2):153-62.
114. Lareu RR, Lacher MD, Bradley CK, Sridaran R, Friis RR, Dharmarajan AM: Regulated expression of inhibitor of apoptosis protein 3 in the rat corpus luteum. *Biol Reprod.* 2003; 68(6):2232-40
115. Lefloch R, Pouyssegur J, Lenormand P: Single and combined silencing of ERK1 and ERK2 reveals their positive contribution to growth signaling depending on their expression levels. *Mol Cell Biol.* 2008; 28(1):511-27.
116. Lei ZM, Toth P, Rao CV, Pridham D: Novel coexpression of human chorionic gonadotropin (hCG)/human luteinizing hormone receptors and their ligand hCG in human fallopian tubes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1993; 77:863–872.
117. Li D, Wen X, Ghali L, Al-Shalabi FM, Docherty SM, Purkis P, Iles RK: hCG beta expression by cervical squamous carcinoma--in vivo histological association with tumour invasion and apoptosis. *Histopathology.* 2008; 53(2):147-55.
118. Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, Kotchetkov R, Connor MK, Han K, Lee JH, Ciarallo S, Catzavelos C, Beniston R, Franssen E, Slingerland JM: PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med.* 2002; 8(10):1153-60.
119. Licht P, Russu V, Wildt L. On the role of human chorionic gonadotropin (hCG) in the embryo-endometrial microenvironment: implications for differentiation and implantation. *Semin Reprod Med.* 2001; 19(1):37-47.
120. Lidke DS, Huang F, Post JN, Rieger B, Wilsbacher J, Thomas JL, Pouyssegur J, Jovin TM, Lenormand P: ERK nuclear translocation is dimerization-independent but controlled by the rate of phosphorylation. *J Biol Chem.* 2010; 285(5):3092-102.
121. Liu H, Radisky DC, Nelson CM, Zhang H, Fata JE, Roth RA, Bissell MJ: Mechanism of Akt1 inhibition of breast cancer cell invasion reveals a protumorigenic role for TSC2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103:4134–4139.
122. Liu L, Roberts RM: Silencing of the gene for the β -subunit of human chorionic gonadotropin by the embryonic transcription factor Oct-3/4. *J Biol Chem.* 1996; 271:16683–16689.
123. Lobel L, Pollak S, Wang S, Chaney M, Lustbader JW: Expression and characterization of recombinant beta-subunit hCG homodimer. *Endocrine.* 1999; 10(3):261-70.
124. Lopata A, Hay DL: The potential of early human embryos to form blastocysts, hatch from their zona and secrete HCG in culture. *Hum Reprod.* 1989; 4(8 Suppl):87-94.
125. Lopez F, Belloc F, Lacombe F, Dumain P, Reiffers J, Bernard P, Boisseau MR: Modalities of synthesis of Ki67 antigen during the stimulation of lymphocytes. *Cytometry.* 1991; 12(1):42-9.
126. Los M, Maddika S, Erb B, Schulze-Osthoff K: Switching Akt: from survival signaling to deadly response. *Bioessays.* 2009; 31(5):492-5.

127. Lovely LP, Fazleabas AT, Fritz MA, McAdams DG, Lessey BA: Prevention of endometrial apoptosis: randomized prospective comparison of human chorionic gonadotropin versus progesterone treatment in the luteal phase. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90:2351–2356.
128. Lu D, Yang C, Liu Z: How hydrophobicity and the glycosylation site of glycans affect protein folding and stability: a molecular dynamics simulation. *J Phys Chem B.* 2012; 116(1):390-400.
129. Luca de A, Maiello MR, D'Alessio A, Pergameno M, Normanno N: The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets.* 2012; 16 Suppl 2:S17-27.
130. Mackey TJ, Borkowski A, Amin P, Jacobs SC, Kyprianou N: bcl-2/bax ratio as a predictive marker for therapeutic response to radiotherapy in patients with prostate cancer. *Urology.* 1998; 52(6):1085-90.
131. Maddika S, Ande SR, Panigrahi S, Paranjothy T, Weglarczyk K, Zuse A, Eshraghi M, Manda KD, Wiechec E, Los M: Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. *Drug Resist Updat.* 2007; 10(1-2):13-29.
132. Maira SM, Galetic I, Brazil DP, Kaech S, Ingley E, Thelen M, Hemmings BA: Carboxyl-terminal modulator protein (CTMP), a negative regulator of PKB/Akt and v-Akt at the plasma membrane. *Science.* 2001; 294(5541):374-80.
133. Maroulakou IG, Oemler W, Naber SP, Tschlis PN: Akt1 ablation inhibits, whereas Akt2 ablation accelerates, the development of mammary adenocarcinomas in mouse mammary tumor virus (MMTV)-ErbB2/neu and MMTV-polyoma middle T transgenic mice. *Cancer Res.* 2007; 67:167-177.
134. Martinelle N, Holst M, Söder O, Svechnikov K: Extracellular signal-regulated kinases are involved in the acute activation of steroidogenesis in immature rat Leydig cells by human chorionic gonadotropin. *Endocrinology.* 2004; 145(10):4629-34.
135. Marx D, Binder C, Meden H, Lenthe T, Ziemek T, Hiddemann T, Kuhn W, Schauer A: Differential expression of apoptosis associated genes bax and bcl-2 in ovarian cancer. *Anticancer Res.* 1997; 17(3C):2233-40.
136. Matsumoto H, Wada T, Fukunaga K, Yoshihiro S, Matsuyama H, Naito K: Bax to Bcl-2 ratio and Ki-67 index are useful predictors of neoadjuvant chemoradiotherapy in bladder cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2004; 34(3):124-30.
137. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA: Roles of the RAF/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1773:1263-1284.
138. McDonald NQ, Hendrickson WA: A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell.* 1993; 73:421-424.
139. McFarland KC, Sprengel R, Phillips HS, Köhler M, Rosemblyt N, Nikolics K, Segaloff DL, Seeburg PH: Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G protein-coupled receptor family. *Science.* 1989; 245(4917):494-9.

140. Medeiros de SF, Norman RJ: Human choriogonadotrophin protein core and sugar branches heterogeneity: basic and clinical insights. *Hum Reprod Update*. 2009; 15(1):69-95.
141. Meloche S, Pouyssegur J: The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathways as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene*. 2007; 26(22):3227-39.
142. Menon B, Franzo-Romain M, Damanpour S, Menon KJM: Luteinizing hormone receptor mRNA down-regulation is mediated through ERK- dependent induction of RNA binding protein. *Mol Endocrinol*. 2011; 25(2): 282–90.
143. Mertens-Walker I, Bolitho C, Baxter RC, Marsh DJ: Gonadotropin-induced ovarian cancer cell migration and proliferation require extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation regulated by calcium and protein kinase C δ . *EndocrRelat Cancer*. 2010; 17(2):335-49.
144. Merz WE, Krause JM, Roig J, Singh V, Berger P: Nonassembled human chorionic gonadotropin subunits and alpha-alpha-homodimers use fast-track processing in the secretory pathway in contrast to alpha-beta-heterodimers. *Endocrinology*. 2007; 148(12):5831-41.
145. Moodley D, Moodley J, Buck R, Haneef R, Payne A: Free alpha-subunits of human chorionic gonadotropin in preeclampsia. *Int J Gynaecol Obstet*. 1995; 49(3):283-7.
146. Nakatani K, Thompson DA, Barthel A, Sakaue H, Liu W, Weigel RJ, Roth RA: Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines. *J Biol Chem*. 1999; 274(31):21528-32.
147. Nemansky M, Moy E, Lyons CD, Yu I, Blithe DL: Human endometrial stromal cells generate uncombined alpha-subunit from human chorionic gonadotropin, which can synergize with progesterone to induce decidualization. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998; 83(2):575-81.
148. Nemoto T, Kitagawa M, Hasegawa M, Ikeda S, Akashi T, Takizawa T, Hirokawa K, Koike M: Expression of IAP family proteins in esophageal cancer. *Exp Mol Pathol*. 2004; 76(3):253-9.
149. Nogueira V, Park Y, Chen CC, Xu PZ, Chen ML, Tonic I, Unterman T, Hay N: Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis. *Cancer Cell*. 2008; 14(6):458-70.
150. Norman RJ, Buchholz MM, Somogyi AA, Amato F: hCG beta core fragment is a metabolite of hCG: evidence from infusion of recombinant hCG. *J Endocrinol*. 2000; 164(3):299-305.
151. Okumura E, Fukuhara T, Yoshida H, Hanada S, Kozutsumi R, Mori M, Tachibana K, Kishimoto T: Akt inhibits Myt1 in the signalling pathway that leads to meiotic G2/M-phase transition. *Nat Cell Biol*. 2002; 4(2):111-6.
152. Palaniappan M, Menon KM: Human chorionic gonadotropin stimulates theca-interstitial cell proliferation and cell cycle regulatory proteins by a cAMP-dependent activation of AKT/mTORC1 signaling pathway. *Mol Endocrinol*. 2010; 24(9):1782-93.
153. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH: Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*. 2001; 22(2):153-83.

154. Peng Z, Weber JC, Han Z, Shen R, Zhou W, Scott JR, Chan MW, Lin HJ: Dichotomy effects of Akt signaling in breast cancer. *Mol Cancer*. 2012; 11:61.
155. Peters BP, Krzesicki RF, Hartle RJ, Perini F, Ruddon RW: A kinetic comparison of the processing and secretion of the alpha beta dimer and the uncombined alpha and beta subunits of chorionic gonadotropin synthesized by human choriocarcinoma cells. *J Biol Chem*. 1984; 259(24):15123-30.
156. Peters BP, Krzesicki RF, Perini F, Ruddon RW: O-glycosylation of the alpha-subunit does not limit the assembly of chorionic gonadotropin alpha beta dimer in human malignant and nonmalignant trophoblast cells. *Endocrinology*. 1989; 124(4):1602-12.
157. Philchenkov A: Caspases: potential targets for regulating cell death. *J CellMol Med*. 2004; 8(4):432-44.
158. Pierce JG, Parsons TF: Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem* 1981; 50:465-495.
159. Pietrowski D, Wiehle P, Sator M, Just A, Keck C: Regulation of the angiopoietin-2 gene by hCG in ovarian cancer cell line OVCAR-3. *Horm Metab Res*. 2010; 42(5):328-33.
160. Potgens AJ, Schmitz U, Bose P, Versmold A, Kaufmann P, Frank HG: Mechanisms of syncytial fusion: a review. *Placenta*. 2002; 23 Suppl A:S107-S113.
161. Prast J, Saleh L, Husslein H, Sonderegger S, Helmer H, Knöfler M: Human chorionic gonadotropin stimulates trophoblast invasion through extracellularly regulated kinase and AKT signaling. *Endocrinology*. 2008; 149(3):979-87.
162. Psychoyos A: Uterine receptivity for nidation. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 1986; 476:36-42.
163. Puett D, Bhowmick N, Fernandez LM, Huang J, Wu C, Narayan P: hCG-receptor binding and transmembrane signaling. *Mol Cell Endocrinol*. 1996; 125(1-2):55-64.
164. Pyne NJ, Waters C, Moughal NA, Sambhi BS, Pyne S: Receptor tyrosine kinase-GPCR signal complexes. *Biochem Soc Trans*. 2003; 31(Pt 6):1220-5.
165. Rödel F, Sprenger T, Kaina B, Liersch T, Rödel C, Fulda S, Hehlhans S: Survivin as a prognostic/predictive marker and molecular target in cancertherapy. *Curr Med Chem*. 2012; 19(22):3679-88.
166. Roskoski R Jr: ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res*. 2012; 66(2):105-43.
167. Rössig L, Jadidi AS, Urbich C, Badorf C, Zeiher AM, Dimmeler S: Akt-dependent phosphorylation of p21(Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells. *Mol Cell Biol*. 2001; 21(16):5644-57.
168. Roux PP, Blenis J: ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004; 68(2):320-44.
169. Ruddon RW, Bedows E: Assisted protein folding. *J Biol Chem*. 1997; 272(6):3125-8.

170. Ruddon RW, Krzesicki RF, Norton SE, Beebe JS, Peters BP, Perini F: Detection of a glycosylated, incompletely folded form of chorionic gonadotropin beta subunit that is a precursor of hormone assembly in trophoblastic cells. *J Biol Chem.* 1987; 262:12533–12540.
171. Rull K, Hallast P, Uusküla L, Jackson J, Punab M, Salumets A, Campbell RK, Laan M: Fine-scale quantification of HCG beta gene transcription in humantrophoblastic and non-malignant non-trophoblastic tissues. *Mol Hum Reprod.* 2008 a; 14(1):23-31.
172. Rull K, Nagirnaja L, Ulander VM, Kelgo P, Margus T, Kaare M, Aittomäki K, Laan M. Chorionic gonadotropin beta-gene variants are associated with recurrent miscarriage in two European populations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 b; 93(12):4697-706.
173. Rull K, Laan M. Expression of β -subunit of human chorionic gonadotropin genes during the normal and failed pregnancy. *Hum. Reprod.* 2005; 20(12):3360–3368.
174. Ryu KS, Ji I, Chang L, Ji TH: Molecular mechanism of LH/CG receptor activation. *Mol Cell Endocrinol.* 1996; 125(1-2):93-100.
175. Scheid MP, Parsons M, Woodgett JR: Phosphoinositide-dependent phosphorylation of PDK1 regulates nuclear translocation. *Mol Cell Biol.* 2005; 25(6):2347-63.
176. Schmidt M, Fernandez de Mattos S, van der Horst A, Klompmaker R, Kops GJ, Lam EW, Burgering BM, Medema RH: Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D. *Mol Cell Biol.* 2002; 22(22):7842-52.
177. Scholzen T, Gerdes J: The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000; 182(3):311-22.
178. Schubert KM, Duronio V: Distinct roles for extracellular-signal-regulated protein kinase (ERK) mitogen-activated protein kinases and phosphatidylinositol 3-kinase in the regulation of Mcl-1 synthesis. *Biochem J.* 2001; 356:473–480.
179. Schumacher A, Brachwitz N, Sohr S, Engeland K, Langwisch S, Dolaptchieva M, Alexander T, Taran A, Malfertheiner SF, Costa SD, Zimmermann G, Nitschke C, Volk HD, Alexander H, Gunzer M, Zenclussen AC: Human chorionic gonadotropin attracts regulatory T cells into the fetal-maternal interface during early human pregnancy. *J Immunol.* 2009; 182(9):5488-97.
180. Schuyer M, van der Burg ME, Henzen-Logmans SC, Fieret JH, Klijn JG, Look MP, Foekens JA, Stoter G, Berns EM: Reduced expression of BAX is associated with poor prognosis in patients with epithelial ovarian cancer: a multifactorial analysis of TP53, p21, BAX and BCL-2. *Br J Cancer.* 2001; 85(9):1359-67.
181. Scopa CD, Vagianos C, Kardamakis D, Kourelis TG, Kalofonos HP, Tsamandas AC: mbcl-2/bax ratio as a predictive marker for therapeutic response to radiotherapy in patients with rectal cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2001; 9(4):329-34.
182. Segaloff DL, Ascoli M: The lutropin/choriogonadotropin receptor. 4 years later. *Endocr Rev* 1993; 14:324–347.
183. Seger R, Hanoch T, Rosenberg R, Dantes A, Merz WE, Strauss JF 3rd, Amsterdam A: The ERK signaling cascade inhibits gonadotropin-stimulated steroidogenesis. *J Biol Chem.* 2001; 276(17):13957-64.

184. Shaul YD, Gibor G, Plotnikov A, Seger R: Specific phosphorylation and activation of ERK1c by MEK1b: a unique route in the ERK cascade. *Genes Dev.* 2009; 23(15):1779-90.
185. Shaul YD, Seger R: The MEK/ERK cascade: From signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1773:1213–1226.
186. Shin S, Dimitri CA, Yoon SO, Dowdle W, Blenis J: ERK2 but not ERK1 induces epithelial-to-mesenchymal transformation via DEF motif-dependent signalling events. *Mol Cell.* 2010; 38(1):114-27.
187. Sohr S, Engeland K: The tumor suppressor p53 induces expression of the pregnancy-supporting human chorionic gonadotropin (hCG) CGB7 gene. *Cell Cycle.* 2011; 10(21):3758-67.
188. Srisuparp S, Strakova Z, Brudney A, Mukherjee S, Reierstad S, Hunzicker-Dunn M, Fazleabas AT: Signal transduction pathways activated by chorionic gonadotropin in the primate endometrial epithelial cells. *Biol Reprod.* 2003; 68(2):457-64.
189. Starborg M, Gell K, Brundell E, Höög C: The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *J Cell Sci.* 1996; 109(Pt1):143-53.
190. Stehr M, Adam RM, Khoury J, Zhuang L, Solomon KR, Peters CA, Freeman MR: Platelet derived growth factor-BB is a potent mitogen for rat ureteral and human bladder smooth muscle cells: dependence on lipid rafts for cell signaling. *J Urol.* 2003; 169(3):1165-70.
191. Steinmetz R, Wagoner HA, Zeng P, Hammond JR, Hannon TS, Meyers JL, Pescovitz OH: Mechanisms regulating the constitutive activation of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway in ovarian cancer and the effect of ribonucleic acid interference for ERK1/2 on cancer cell proliferation. *Mol Endocrinol.* 2004; 18(10):2570-82.
192. Stipursky J, Francis D, Gomes FC: Activation of MAPK/PI3K/SMAD pathways by TGF- β (1) controls differentiation of radial glia into astrocytes in vitro. *Dev Neurosci.* 2012; 34(1):68-81.
193. Sugino N, Suzuki T, Kashida S, Karube A, Takiguchi S, Kato H: Expression of Bcl-2 and Bax in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy: regulation by human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85(11):4379-86.
194. Sun M, Wang G, Paciga JE, Feldman RI, Yuan ZQ, Ma XL, Shelley SA, Jove R, Tschlis PN, Nicosia SV, Cheng JQ: AKT1/PKB α kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. *Am J Pathol.* 2001; 159(2):431-7.
195. Tai P, Shiraishi K, Ascoli M: Activation of the lutropin/choriogonadotropin receptor inhibits apoptosis of immature Leydig cells in primary culture. *Endocrinology.* 2009; 150(8):3766-73.
196. Talmadge K, Vamvakopoulos NC, Fiddes JC. Evolution of the genes for the beta subunits of human chorionic gonadotropin and luteinizing hormone. *Nature.* 1984; 307(5946):37-40.
197. Tamm I, Kornblau SM, Segall H, Krajewski S, Welsh K, Kitada S, Scudiero DA, Tudor G, Qui YH, Monks A, Andreeff M, Reed JC: Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias. *Clin Cancer Res.* 2000; 6(5):1796-803.

198. Thomas LW, Lam C, Edwards SW: Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS Lett.* 2010; 584:2981–2989.
199. Thun von A, Birtwistle M, Kalna G, Grindlay J, Strachan D, Kolch W, vonKriegsheim A, Norman JC: ERK2 drives tumour cell migration in three-dimensional microenvironments by suppressing expression of Rab17 and liprin- β 2. *J Cell Sci.* 2012; 125(Pt 6):1465-77.
200. Torre de la FJ, García A, Gil-Moreno A, Planaguma J, Reventos J, Ramón y Cajal S, Xercavins J: Apoptosis in epithelial ovarian tumours Prognostic significance of clinical and histopathologic factors and its association with the immunohistochemical expression of apoptotic regulatory proteins (p53, bcl-2 and bax). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2007; 130(1):121-8.
201. Tsampalas M, Gridelet V, Berndt S, Foidart JM, Geenen V, Perrier d'Hauterive S: Human chorionic gonadotropin: a hormone with immunological and angiogenic properties. *J Reprod Immunol.* 2010; 85(1):93-8.
202. Tschopp O, Yang ZZ, Brodbeck D, Dummler BA, Hemmings-Mieszczak M, Watanabe T, Michaelis T, Frahm J, Hemmings BA: Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development.* 2005; 132(13):2943-54.
203. Uusküla L, Rull K, Nagirnaja L, Laan M: Methylation allelic polymorphism (MAP) in chorionic gonadotropin beta5 (CGB5) and its association with pregnancy success. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96(1):E199-207.
204. Valmu L, Alfthan H, Hotakainen K, Birken S, Stenman UH. Site-specific glycan analysis of human chorionic gonadotropin beta-subunit from malignancies and pregnancy by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Glycobiology.* 2006; 16(12):1207-18.
205. Vantaggiato C, Formentini I, Bondanza A, Bonini C, Naldini L, Brambilla R: ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases affect Ras-dependent cell signaling differentially. *J Biol.* 2006; 5(5):14.
206. Vatish M, Tesfa L, Grammatopoulos D, Yamada E, Bastie CC, Pessin JE: Inhibition of Akt activity and calcium channel function coordinately drive cell-cell fusion in the BeWO choriocarcinoma placental cell line. *PLoS One.* 2012; 7(1):e29353.
207. Virtakoivu R, Pellinen T, Rantala JK, Perälä M, Ivaska J: Distinct roles of AKT isoforms in regulating β 1-integrin activity, migration, and invasion in prostate cancer. *Mol Biol Cell.* 2012; 23(17):3357-69.
208. Waligórska-Stachura J, Jankowska A, Waško R, Liebert W, Biczysko M, Czarnywojtek A, Baszko-Błaszyk D, Shimek V, Ruchała M: Survivin--prognostic tumor biomarker in human neoplasms. *Ginekol Pol.* 2012; 83(7):537-40.
209. Wan H, Versnel MA, Cheung WY, Leenen PJ, Khan NA, Benner R, Kiekens RC: Chorionic gonadotropin can enhance innate immunity by stimulating macrophage function. *J Leukoc Biol.* 2007; 82(4):926-33.
210. Weedon-Fekjær MS, Taskén K: Spatiotemporal dynamics of hCG/cAMP signaling and regulation of placental function. *Placenta.* 2012; 33Suppl:S87-91.

211. Wilken JA, Bedows E: A novel four-amino acid determinant defines conformational freedom within chorionic gonadotropin beta-subunits. *Biochemistry*. 2007; 46(14):4417-24.
212. Wilkes MC, Mitchell H, Penheiter SG, Dore JJ, Suzuki K: Transforming growth factor-beta activation of phosphatidylinositol 3-kinase is independent of Smad2 and Smad3 and regulates fibroblast responses via p21-activated kinase-2. *Cancer Res* 2005; 65:10431–10440.
213. Wilson GD, Saunders MI, Dische S, Richman PI, Daley FM, Bentzen SM: bcl-2 expression in head and neck cancer: an enigmatic prognostic marker. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001; 49(2):435-41.
214. Xing Y, Myers RV, Cao D, Lin W, Jiang M, Bernard MP, Moyle WR: Glycoprotein hormone assembly in the endoplasmic reticulum. IV. Probable mechanism of subunit docking and completion of assembly. *J Biol Chem* 2004; 279:35458–35468.
215. Xing Y, Williams C, Campbell RK, Cook S, Knoppers M, Addona T, Altarocca V, Moyle WR: Threading of a glycosylated protein loop through a protein hole: implications for combination of human chorionic gonadotropin subunits. *Protein Sci*. 2001; 10:226–235.
216. Xu J, Keeton AB, Franklin JL, Li X, Venable DY, Frank SJ, Messina JL: Insulin enhances growth hormone induction of the MEK/ERK signaling pathway. *J Biol Chem*. 2006; 281(2):982-92.
217. Yang JY, Zong CS, Xia W, Yamaguchi H, Ding Q, Xie X, Lang JY, Lai CC, Chang CJ, Huang WC, Huang H, Kuo HP, Lee DF, Li LY, Lien HC, Cheng X, Chang KJ, Hsiao CD, Tsai FJ, Tsai CH, Sahin AA, Muller WJ, Mills GB, Yu D, Hortobagyi GN, Hung MC: ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. *Nat Cell Biol*. 2008; 10(2):138-48.
218. Yao R, Cooper GM: Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science*. 1995; 267(5206):2003-6.
219. Yao Z, Seger R: The molecular mechanism of MAPK/ERK inactivation. *Curr. Genomics*. 2004; 5:385-393.
220. Yoeli-Lerner M, Yiu GK, Rabinovitz I, Erhardt P, Jauliac S, Toker A: Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT. *Mol Cell*. 2005; 20:539–550.
221. Yoon O, Roh J: Downregulation of KLF4 and the Bcl-2/Bax ratio in advanced epithelial ovarian cancer. *Oncol Lett*. 2012; 4(5):1033-1036.
222. Yoshida Y: Secretion of human chorionic gonadotropin in early pregnancy. *Med Mol Morphol*. 2005; 104-11.
223. Yung Y, Yao Z, Hanoch T, Seger R: ERK1b: a 46 kD ERK isoform which is differentially regulated by MEK. *J Biol Chem* 2000; 275:15799–15808.
224. Zenzmaier C, Gerth R, Gruschwitz M, Lindner H, Plas E, Berger P: Decreased levels of genuine large free hCG alpha in men presenting with abnormal semen analysis. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011; 9:114.
225. Zięcik, AJ, Kaczmarek MM, Blitek A, Kowalczyk AE, Li X, Rahman N.: Novel biological and possible applicable roles of LH/hCG receptor. *Mol Cell Endocrinol*. 2007; 269(1-2):51–60.

226. Zygmunt M, Herr F, Munstedt K, Lang U, Liang OD: Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Euro J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003; 110(Suppl 1):S10-8.

8. Streszczenie

Badania ostatnich lat wykazały, że szereg guzów różnego pochodzenia syntetyzuje ludzką gonadotropinę kosmówkową (CG), a zwłaszcza jej podjednostkę beta (CGB). Obecność CGB w surowicy oraz moczu pacjentów w wielu przypadkach ma znaczenie prognostyczne, koreluje ze złą odpowiedzią na leczenie i złym rokowaniem. Sugeruje się, że CGB promuje wzrost guza wykazując działanie antyapoptotyczne.

Nie wszystkie guzy syntetyzujące CG posiadają receptor dla gonadotropiny kosmówkowej (LHCGR), przez który w warunkach fizjologicznych hormon wywiera biologiczny efekt. Można zatem przypuszczać, że CGB wpływa na komórki nowotworowe wykorzystując odmienne szlaki sygnalizacji komórkowej.

Zaplanowane badania miały na celu wykazanie możliwości istnienia alternatywnego mechanizmu działania CGB na komórki nowotworowe, pośredniczonego przez kinazy białkowe ERK – regulowane sygnałem zewnątrzkomórkowym oraz kinazy AKT – kluczowe regulatory szlaku fosfatydyloinozytolu, uruchamianego przez szereg czynników wzrostu. Aktywacja obu tych szlaków umożliwiającą proliferację i promującą przeżycie komórki ma istotne znaczenie w patogenezie wielu guzów.

Badania przeprowadzono w warunkach *in vitro* na liniach komórkowych wywodzących się z raka jajnika: OVCAR-3 charakteryzującej się ekspresją receptora *LHCGR* i linii SCOV-3, która nie wykazuje ekspresji tego receptora. Komórki w celu uzyskania nadekspresji CGB poddano transfekcji plazmidem z wklonowanym genem *CGB5*, kodującym podjednostkę beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej. Efekt nadekspresji CGB i jej oddziaływanie na komórki nowotworowe oceniano po dwudziestu czterech, czterdziestu ośmiu i siedemdziesięciu dwóch godzinach od transfekcji przeprowadzając analizy: 1) poziomu nadekspresji CGB; 2) relatywnej ekspresji podjednostki alfa gonadotropiny kosmówkowej (*CGA*) oraz receptora dla CG (*LHCGR*); 3) względnej ekspresji poszczególnych izoform kinaz ERK (*ERK1*, *ERK2*) i AKT (*AKT1*, *AKT2*, *AKT3*); 4) cyklu komórkowego oraz proliferacji (ocena przyrostu liczby komórek ekspresji markera proliferacji *MKI67*) i apoptozy (ocena czynników pro-

i antyapoptotycznych: *BCL2*, *BAX*, *BIRC5*); 5) aktywacji (fosforylacji) kinaz białkowych ERK i AKT.

Otrzymane wyniki dowiodły, że nadekspresja CGB wpływa na czynności życiowe komórek nowotworowych prowadząc do zmian aktywności genów zaangażowanych w procesy proliferacji i apoptozy. CGB syntetyzowana przez komórki nowotworowe reguluje homeostazę komórek guza, aktywując kinazy białkowe ERK i AKT. Działanie hormonu związane jest ze specyficzną aktywacją tych szlaków i ulega zablokowaniu w obecności inhibitorów kinaz wyższego rzędu – kinazy MEK oraz kinazy PI3K.

Ponadto przeprowadzone badania dowodzą, że CGB może wywierać biologiczny efekt z pominięciem klasycznego receptora LHCGR. Obserwowana w komórkach wykazujących nadekspresję CGB aktywacja kinaz AKT i ERK oraz nasilona proliferacja komórek nowotworowych była niezależna od obecności receptora LHCGR.

Zaprezentowane tu wyniki dokumentują alternatywny, pomijający aktywację receptora LHCGR, mechanizm działania podjednostki beta CG w komórkach nowotworowych.

Otrzymane wyniki wydają się mieć znaczenie nie tylko poznawcze. W przyszłości mogą one być wykorzystane w klinice, ponieważ poznanie szlaków sygnałnych inicjowanych przez CGB, zaangażowanych w proces nowotworzenia może stać się podstawą wyznaczenia nowych dróg terapii raka.

9. Summary

Recent studies have shown that a number of tumors of various origin synthesize human chorionic gonadotropin (CG) and particularly its beta subunit (CGB). The presence of CGB in serum and urine of patients is of prognostic significance, correlates with a poor response to treatment, and poor prognosis. It is suggested that CGB shows anti-apoptotic activity and promotes tumor growth.

Interestingly, not all tumors synthesizing CG express the receptor for human chorionic gonadotropin (LHCGR), by which the hormone exerts its biological effects. Furthermore, there is no evidence that free CGB subunit may bind to LHCGR leading to its activation. It can therefore be assumed that CGB affects cancer cells through different cell signaling pathways.

The aim of the study was to demonstrate the possibility of CGB's alternative mechanism of action on tumor cells, related to ERK and AKT kinases. Activation of both kinases pathways allows cell proliferation and promotes cell survival, what is important in the pathogenesis of many tumors.

The studies were carried out *in vitro* using two cell lines derived from ovarian cancer: OVCAR-3 characterized by LHCGR receptor expression and SCOV-3 that do not express the receptor.

In order to achieve CGB overexpression cells were transfected with a construct encoding the *CGB5* gene of human chorionic gonadotropin beta subunit. CGB overexpression and its effect on cancer cells were evaluated after twentyfour, fortyeight and seventytwo hours after transfection by analysing 1) CGB level expression; 2) relative expression of the alpha subunit of human chorionic gonadotropin (*CGA*) and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor (*LHCGR*); 3) relative expression of ERK and AKT specific isoforms: *ERK1*, *ERK2* and *AKT1*, *AKT2*, *AKT3* respectively; 4) cell cycle, proliferation (cells growth rate and *MKI67* proliferation marker expression) and apoptosis (pro- and antiapoptotic factors gene expression: *BCL2*, *BAX*, *BIRC*); 5) protein kinases ERK and AKT activation (phosphorylation).

The results obtained in this study showed that overexpression of CGB affect viability of tumor cells, leading to changes in activity of the genes involved in proliferation and apoptosis. Furthermore CGB synthesized by cancer cells affects tumor cells' homeostasis by activating protein kinases ERK and AKT. The action of CG beta subunit is associated with a rapid and sustained activation of signaling pathways mediated by ERK and AKT kinases. Specificity of these kinase pathways induction was demonstrated by blocking of MEK and PI3K kinases which phosphorylate ERK and AKT respectively using specific inhibitors. Furthermore, the results showed that CGB may exert biological effects on cancer cells lacking LHCGR expression, which under physiological conditions mediates the hormone's action.

The results of the research document for the first time an alternative mechanism of CGB action in cancer cells, which is LHCGR-independent .

These results are not only cognitive, but may also have clinical relevance. The knowledge of signaling pathways activated by CGB, involved in the process of carcinogenesis, maybe be used for developing new anticancer therapy.