

Agnieszka Anna Rawłuszko-Wieczorek

**„REGULACJA EPIGENETYCZNA WYBRANYCH GENÓW
ZAANGAŻOWANYCH W ODPOWIEDŹ NA HIPOKSJĘ
W RAKU JELITA GRUBEGO”**

Rozprawa doktorska

wykonana w Katedrze i Zakładzie Biochemii i Biologii Molekularnej
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
pod kierunkiem Prof. dr. hab. Pawła P. Jagodzińskiego

Praca współfinansowana z projektu „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach
uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Poddziałanie 8.2.2
Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Poznań 2013

Składam serdeczne podziękowania mojemu promotrowi
Profesorowi dr. hab. Pawłowi P. Jagodzińskiemu
za motywację i umożliwienie realizacji pracy doktorskiej

Dziękuje również Wszystkim Koleżankom i Kolegom
z Katedry i Zakładu Biochemii i Biologii Molekularnej
za życzliwość, koleżeńskie rady i miłą atmosferę

*Dziękuję **Rodzicom, siostrze Małgosi** oraz **wszystkim bliskim**
za wsparcie i wiarę w moje możliwości*

Pracę dedykuję mojemu Mężowi, Jackowi

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	8
1. WSTĘP	11
1.1. Epidemiologia i etiologia raka jelita grubego	11
1.2. Patomorfologia raka jelita grubego	14
1.2.1. Klasyfikacja histopatologiczna raka jelita grubego	14
1.2.2. Klasyfikacja Dukesa	16
1.2.3. Klasyfikacja TNM	16
1.3. Hipoksja guzów litych	17
1.3.1. HIF- α	18
1.3.2. Regulacja podjednostki HIF- α w zależności od dostępności tlenu	19
1.4. Epigenetyka	22
1.4.1. Metylacja DNA	23
1.5. Karcynogeneza jelita grubego z uwzględnieniem roli metylacji DNA	25
2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	28
3. MATERIAŁY I METODY	29
3.1. Materiał kliniczny	29
3.2. Ustalone linie komórkowe raka jelita grubego HCT116 i DLD-1	30
3.3. Odczynniki i sprzęt laboratoryjny	30
3.3.1. Hodowla komórkowa	30
3.3.2. Izolacja oraz pomiar stężenia RNA, DNA i białka	30
3.3.3. Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelu agarozowym	31
3.3.4. Deaminacja genomowego DNA	31
3.3.5. Przygotowanie i transformacja komórek kompetentnych <i>E. coli</i> szczepu TOP10	32
3.3.6. Amplifikacja kwasów nukleinowych (odwrotna transkrypcja, PCR, qPCR, analiza HRM)	33
3.3.7. Rozdział elektroforetyczny i wykrywanie białek (western blot)	33
3.3.8. Sprzęt jednorazowy oraz drobny sprzęt trwały	34
3.4. Bufory	35
3.5. Metody	37
3.5.1. Homogenizacja tkanek w ciekłym azocie	37

3.5.2. Hodowla komórkowa	37
3.5.3. Izolacja całkowitego RNA, spektrofotometryczny pomiar stężenia RNA oraz elektroforeza RNA w żelu agarozowym	38
3.5.4. Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT-PCR) i ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR).....	39
3.5.5. Izolacja, oznaczanie stężenia i wykrywanie białek	43
3.5.6. Izolacja genomowego DNA z tkanek i linii komórkowych oraz reakcja deaminacji DNA	46
3.5.7. PCR deaminowanego DNA, przygotowanie produktu PCR do sekwencjonowania.	48
3.5.8. Wysokorozdzielcza analiza temperatur topnienia produktów PCR deaminowanego DNA - analiza HRM (ang. <i>high resolution melting</i>)	56
3.5.9. Obliczenia statystyczne	60
4. WYNIKI	61
4.1. Poziom transkryptu oraz białka dla genów PHD1, PHD2, PHD3, FIH, HIF-1 α i HIF-2 α w pierwotnej tkance nowotworowej i histopatologicznie niezmięnionej jelita grubego u chorych z CRC.....	61
4.2. Poziom metylacji DNA w regionie promotorowym genów PHD1, PHD2, PHD3, FIH, HIF-1 α , HIF-2 α w pierwotnej tkance nowotworowej i histopatologicznie niezmięnionej jelita grubego u chorych z CRC.....	71
4.3. Analiza korelacji metylacji DNA w obrębie wyspy CpG genu <i>PHD3</i> i <i>HIF-2α</i> z ekspresją na poziomie mRNA.....	85
4.4 Poziom metylacji DNA i ekspresji genów PHD1, PHD2, PHD3, FIH, HIF-1 α i HIF-2 α w ustalonych liniach komórkowych raka jelita grubego HCT116 i DLD-1 w warunkach normoksji i hipoksji.	87
4.5. Wpływ 5-dAzaC na metylację DNA i ekspresję genów PHD3 i HIF-2 α w ustalonych liniach komórkowych HCT116 i DLD-1 w warunkach normoksji i hipoksji.	95
5. DYSKUSJA	99
6. WNIOSKI.....	108
7. STRESZCZENIE	110
8. SUMMARY	112
9. WYKAZ RYCIN	114

10. WYKAZ TABEL	116
11. LITERATURA	117

WYKAZ SKRÓTÓW

5-dAzaC- 5-aza-2'-deoksycytydyna

Analiza HRM- wysokorozdzielcza analiza temperatur topnienia (ang. *high resolution melting analysis*)

ANGPTL4- białko podobne do angiopoetyny 4 (ang. *angiopoietin-like 4*)

APC- (ang. *Adenomatous Polyposis Coli*)

BER- system naprawczy typu wycinanie zasad (ang. *base extinsion repair*)

BSA- albumina wołowa (ang. *bovine serum albumin*)

CCNG2- cyklina G2 (ang. *cyclin G2*)

CDKN2A- inhibitor 2A kinaz zależny od cyklin (ang. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*)

CIMP- rak jelita grubego o fenotypie metylatora wysp CpG (ang. *CpG island methylator phehotype*)

CIN- niestabilność chromosomowa (ang. *chromosome instability*)

CRC- rak jelita grubego (ang. *colorectal cancer*)

CTNNB1- β -katenina (ang. *catenin (cadherin-associated protein), beta 1*)

CXCR4- receptor chemokin 4 z motywem C-X-C (ang. *chemokine (C-X-C motif) receptor 4*)

DEPC- eter dietylowy kwasu pirowęglowego

DNMT- metylotransferaza DNA (ang. *DNA methyltransferase*)

ENCODE- baza ENCODE (ang. *encyclopedia of DNA elements*)

EPO- erytropoetyna (ang. *erythropoietin*)

F- starter przedni (ang. *forward*)

FAP- zespół gruczolakowatości rodzinnej (ang. *familial adenomatous polyposis*)

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

FCC- rodzinny rak jelita grubego (ang. *familial colorectal cancer*)

FIH- czynnik hamujący HIF (ang. *factor inhibiting HIF*)

GLUT1/GLUT3- transporter glukozy1/3 (ang. *glucose transporter 1/3*)

hHLH- domena podstawowa helisa-pętla-helisa (ang. *basic helix-loop-helix*)

HIF- czynnik indukowany hipoksją (ang. *hypoxia inducible factor*)

HIF- β /ARNT- czynnik indukowany hipoksją typu β /translokaza jądrowa (ang. *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*)

hMLH1- homolog 1 genu *mutL* E.coli (ang. *human mutL homolog 1*)

hMRPL19- mitochondrialne białko rybosomalne L19 (ang. *human mitochondrial ribosomal protein L19,hMRPL19*)

- hMSH2**- homolog 2 genu *mutS* E.coli (ang. *human mutS homolog 2*)
- hMSH6**- homolog 6 genu *mutL* E.coli (ang. *human mutS homolog 6*)
- HNF4A**- czynnik jądrowy hepatocytu (ang. *hepatocyte nuclear factor 4*)
- HNPCC**- dziedziczny rak jelita grubego bez polipowatości (ang. *hereditary non-polyposis colorectal cancer*)
- HPP1**- gen *HPP1* (ang. *hyperpigmentation, progressive, 1*)
- HPRT**- fosforybozylotransferaza hipoksantynowa (ang. *Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1, HPRT*)
- HRE**- element odpowiedzi na hipoksję (ang. *hypoxia response element*)
- HRP**- peroksydaza chrzanowa (ang. *horseradish peroxidase*)
- IGF-2**- insulinopodobny czynnik wzrostu 2 (ang. *insulin-like growth factor 2*)
- IPTG**- izopropylotiogalaktozyd
- LOX**- oksydaza lizylowa (ang. *lysyl oxidase*)
- MBD** - białka zawierające domenę wiążącą m^5CpG MBD (ang. *m^5CpG binding domain proteins*)
- MeCP** - białka wiążące 5-metylocytozynę (ang. *m^5CpG binding protein*)
- MGMT** - metylotransferaza 0-6-metyloguaninowa (ang. *O-6-methylguanine-DNA methyltransferase*)
- MMP-2**- metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 2 (ang. *matrix metalloproteinase 2*)
- MSI**- niestabilność mikrosatelitarna (ang. *Microsatellite instability*)
- MSS**- stabilność mikrosatelitarna (ang. *microsatellite stable*)
- MUTYH**- homolog 2 genu *mutY* E.coli (ang. *mutY homolog*)
- NF $\kappa\beta$** - czynnik jądrowy $\kappa\beta$ (ang. *nuclear factor $\kappa\beta$*)
- NPM**- nukleofosmina (ang. *nucleophosmin*)
- OB**- odczynnik Bradforda
- ODDD**- zależna od tlenu domena degradacyjna (ang. *oxygen dependent degradation domain*)
- PAI-1**- inhibitor aktywacji plazminogenu (ang. *plasminogen activator inhibitor type 1*)
- PBGD**- deaminaza profobilinogenu (ang. *porphobilinogen deaminase*)
- PCR**- łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*)
- PDGF**- płytkopochodny czynnik wzrostu (ang. *platelet derived growth factor*)
- PHD**- hydroksylaza prolinowa (ang. *prolyl hydroxylase*)
- PMS2**- (ang. *postmeiotic segregation increased 2*)
- PPIA**- izomeraza peptydylo-prolinowa A (ang. *peptidylprolyl isomerase A*)

qPCR- ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym

R- starter wsteczny (ang. *reverse*)

RISC- indukowany RNA kompleks wyciszający (ang. *RNA Induced Silencing Complex*)

RT-PCR- reakcja odwrotnej transkrypcji

SAH- S-adenozylhomocysteina

SAM- S-adenozylometionina

SDS-PAGE- rozdział elektroforetyczny białek w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS (ang. *polyacrylamide gel electrophoresis in SDS*)

SIAH-1- E3 ligaza SIAH-1 (ang. *siah E3 ubiquitin protein ligase 1*)

TAD- domena transaktywacyjna (ang. *transactivation domain*)

TGF- α - transformujący czynnik wzrostu α (ang. *transforming growth factor α*)

TGF- β - transformujący czynnik wzrostu β (ang. *transforming growth factor β*)

TWIST- czynnik transkrypcyjny twist z domeną podstawową helisa-pętla-helisa (ang. *twist basic helix-loop-helix transcription factor*)

UPAR- aktywator plazminogenu (ang. *plasminogen activator, urokinase receptor*)

VEGF- czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. *vascular endothelial growth factor*)

VHL- białko VHL (ang. *von Hippel-Lindau tumor suppressor*)

1. WSTĘP

1.1. Epidemiologia i etiologia raka jelita grubego

W Wielkopolsce, podobnie jak w całej Polsce, wysoka liczba zachorowań i zgonów z powodu nowotworów złośliwych stanowi jedno z najpoważniejszych zagadnień medycznych [1]. Rak jelita grubego (ang. *colorectal cancer*, CRC) jest trzecim co do częstości występowania nowotworem w Polsce oraz najczęstszym nowotworem złośliwym przewodu pokarmowego na świecie [1]. W samym regionie Wielkopolski każdego roku odnotowuje się średnio 1,5 tys. nowych przypadków zachorowań na CRC, a około 60% pacjentów umiera w ciągu pięciu lat od postawienia diagnozy [1]. W ostatnich latach obserwuje się również zwiększoną dynamikę zachorowalności na CRC [1].

Dokładne przyczyny powstania nowotworu jelita grubego nie są ostatecznie poznane, chociaż wyróżnia się kilka kategorii czynników ryzyka. Zalicza się do nich:

- epidemiologiczne;
- środowiskowe, w tym dietetyczne;
- współwystępowanie niektórych chorób np. występowanie polipów gruczolakowych, stany zapalne jelit;
- genetyczne i epigenetyczne [2].

Do przyczyn epidemiologicznych można zaliczyć wiek. Wyższe ryzyko zachorowania na raka jelita grubego występuje u osób powyżej 65 roku życia (u mężczyzn 59%, a u kobiet 63% wzrost ryzyka). Zaobserwowano również, że powyżej 50-tego roku życia nowotwór jelita grubego występuje od 4 do 8 lat wcześniej u mężczyzn niż u kobiet [3]. Badania populacyjne pokazały, że hormonalna terapia zastępcza ma ochronny efekt u kobiet w wieku postmenopauzalnym we wszystkich stężeniach i dawkach. Badania te sugerują korzystny wpływ 17- β -estradiolu w hamowaniu rozwoju raka jelita grubego [4, 5]. Nadwaga oraz zmniejszona aktywność fizyczna również zostały zaklasyfikowane jako potencjalne przyczyny rozwoju raka jelita grubego [6, 7]. Zróżnicowaną zachorowalność na raka jelita grubego obserwuje się także biorąc pod uwagę czynniki geograficzne. W Europie największa zapadalność na nowotwór jelita grubego występuje w rejonach północnych. Badania migracyjne ludności wykazały, że liczne czynniki środowiskowe, w tym nawyki żywieniowe, odrywają bardzo ważną rolę w etiologii raka jelita grubego. Dieta oparta na żywności wysokoprzetworzonej, bogata w krwiste mięso i tłuszcze zwierzęce, a uboga w wapń, kwas foliowy i błonnik sprzyja zwiększonej zapadalności na opisany typ nowotworu [8-11].

Taki sposób odżywiania niekorzystnie wpływa na florę bakteryjną, wydłuża czas pasażu pokarmu przez jelito grube i sprzyja powstawaniu związków będących prekursorami karcynogenów. Podobnie czynnikiem ryzyka jest palenie tyotniu oraz nadmierne spożywanie alkoholu [10].

Zależność występowania raka jelita grubego ze stanami zapalnymi jelit została po raz pierwszy opisana w 1925 roku [12]. CRC nadal odpowiada za 10-15% zgonów wśród osób ze zdiagnozowanym nieswoistym zapaleniem jelit [12, 13]. Pomimo ewidentnego powiązania chorób zapalnych jelit z zachorowalnością na CRC, podstawy molekularne tego procesu oraz jego patobiologia wciąż pozostają tematem intensywnych badań naukowych [14, 15]. Zwrócono także uwagę na zwiększone ryzyko występowania choroby nowotworowej przy ostrym i długim czasie trwania zapalenia [16-18]. U osób z długoletnią historią choroby wrzodziejącego zapalenia jelita ryzyko zachorowania na raka jelita grubego może być nawet 20-krotnie wyższe [19].

Około 85% przypadków raka jelita grubego (w tym 90% sporadycznych CRC) wynika ze zmian o charakterze gruczolaków mających makroskopowo postać polipa [20]. Mogą one ulec przemianie nowotworowej. Polipy są rozrostami błony śluzowej ścian jelita grubego, skierowanymi do światła jelita. Ryzyko rozwoju CRC zależy od wielkości, liczby i charakterystyki histopatologicznej polipów. Ze względu na budowę histologiczną wyróżnia się następujące typy polipów:

- hiperplastyczne (metaplastyczne) - nie posiadają cech atypii komórkowej;
- zapalne;
- powstające z zaburzeń rozwojowych (hamartomatyczne);
- gruczolakowe:
 - gruczolaki cewkowe (łac. *adenoma tubulare*)
 - gruczolaki kosmkowe (łac. *adenoma villosum*)
 - gruczolaki cewkowo-kosmkowe (łac. *adenoma tubulovillosum*)
 - gruczolaki ząbkowane (serrated adenoma) - łączą cechy polipów hiperplastycznych i gruczolaków [20].

Największe ryzyko rozwoju CRC ma miejsce w przypadku polipów o budowie kosmkowej (29-70%), cewkowo-kosmkowej (19%) i cewkowej (5-10%) [20]. Udowodniono także istnienie zależności pomiędzy wielkością polipa a występowaniem CRC. U osoby, u której wykryto polipa o średnicy poniżej 1 cm ryzyko przejścia nowotworu w formę złośliwą wynosi poniżej 1%, jednak przy średnicy powyżej 2 cm wzrasta do niemal 50% [1].

Nagromadzenie dużej ilości polipów jest charakterystyczne dla genetycznie uwarunkowanego zespołu gruczolakowatości rodzinnej (ang. *familial adenomatous polyposis*, FAP) [21, 22]. Nieleczony FAP prowadzi do rozwoju ogniska nowotworowego (odpowiada za 0,5% wszystkich zachorowań na raka jelita grubego). Jest to choroba dziedziczona autosomalnie, dominująco, związana z mutacjami w genie *APC* (ang. *Adenomatous Polyposis Coli*) [21]. Gen *APC* jest zaliczany do genów supresorowych i odgrywa istotną rolę w ścieżce sygnałowej WNT. Do tej pory oznaczono ponad 300 mutacji genu *APC* zaangażowanych w rozwój zespołu gruczolakowatości rodzinnej [21, 22]. Większość z nich powoduje powstanie skróconego białka APC, co skutkuje zaburzeniem regulacji szlaku WNT i aktywacją wielu protoonkogenów [21]. U nosicieli mutacji genu *APC* stwierdza się często również wyższe ryzyko rozwoju nowotworu żołądka i jelita cienkiego. Objawami pozajelitowymi FAP są guzy desmoidalne, rak tarczycy, charakterystyczne wyrośla kostne i zmiany w siatkówce oka (zespół Gardnera) [21, 22].

Innymi typami genetycznie uwarunkowanych zespołów polipowatości związanych z powstawaniem ogniska nowotworowego raka jelita grubego stanowiących poniżej 0,5% wszystkich zachorowań jest zespół Putza-Jeghersa, polipowatość mnoga młodzieńcza czy polipowatość związana z mutacją w genie kodującym glikozydazę DNA zaangażowaną w proces naprawy uszkodzeń oksydacyjnych DNA, *MUTYH* (ang. *mutY homolog*) [22, 23]. Zespół Peutza-Jeghersa, cechujący się występowaniem plam soczewicowatych na skórze warg i palców oraz polipów typu hamartomatycznego, w 40% może zwiększać ryzyko wystąpienia CRC oraz innych nowotworów [23]. Polipy typu hamartomatycznego występują również w przypadku polipowatości mnogiej młodzieńczej i mogą zwiększać zachorowalność na raka jelita grubego nawet o 70% [24].

Z kolei dziedziczny rak jelita grubego bez polipowatości (ang. *hereditary non-polyposis colorectal cancer*, HNPCC) inaczej zespół Lyncha stanowi do 5% wszystkich przypadków CRC. HNPCC jest związany z mutacjami genów zaangażowanych w naprawę DNA, najczęściej *hMLH1* (ang. *human mutL homolog 1*) i *hMSH2* (ang. *human mutS homolog 2*), *hMSH6* (ang. *human mutL homolog 6*) i *PMS2* (ang. *postmeiotic segregation increased 2*).

Wyróżnia się dwa typy HNPCC:

- zespół Lyncha I - występowanie tylko raka jelita grubego;

- zespół Lyncha II - występowanie raka okrężnicy oraz innych typów nowotworów (m.in. raka trzonu macicy, jajnika, piersi, żołądka, jelita cienkiego, wątroby, dróg żółciowych, dróg moczowych a także chłoniaków).

Ze względu na brak swoistych cech fenotypowych HNPCC jest rozpoznawany na podstawie przeprowadzonych wywiadów rodzinnych wg kryteriów amsterdamskich, w których:

- rak jelita grubego występuje u co najmniej trzech krewnych, z których jeden jest w pierwszym stopniu pokrewieństwa, gdy wszystkie przypadki raka zostały zweryfikowane histopatologicznie;
- co najmniej dwie spośród tych osób to krewni pierwszego stopnia w dwóch różnych pokoleniach;
- przynajmniej u jednej z tych osób rozpoznano raka jelita grubego przed pięćdziesiątym rokiem życia;
- u badanej osoby wykluczono FAP [25].

Obecnie zaleca się również badanie występowania niestabilności mikrosatelitarnego DNA oraz zmian ekspresji genów podlegających mutacji w HNPCC [25].

Rodzinny rak jelita grubego (ang. *familial colorectal cancer*; FCC) stanowi około kilkunastu procent wszystkich zachorowań na CRC [20]. Są to przypadki, u których pomimo zdiagnozowania wśród krewnych raka jelita grubego układ zachorowań nie odpowiada dziedzicznemu zespołom predyspozycji takim jak np. HNPCC czy FAP. Uważa się, że główną rolę w zachorowalności na FCC odgrywają wspólne dla danej rodziny czynniki środowiskowe (np. podobne nawyki żywieniowe) oraz nieokreślone dotąd dokładnie uwarunkowania genetyczne [20].

1.2. Patomorfologia raka jelita grubego

1.2.1. Klasyfikacja histopatologiczna raka jelita grubego

Klasyfikacja histologiczna nowotworów jelita grubego według Światowej Organizacji Zdrowia wyróżnia [20]:

1. Nowotwory pochodzenia nabłonkowego (*epithelial tumors*):

- gruczolak (*adenoma*)
 - cewkowy (*tubulare*)
 - kosmkowy (*villosum*)
 - kosmkowo-cewkowy (*tubulo-villosum*)

-
- ząbkowany (*serrated*)
 - śródnabłonkowa dysplazja związana z przewlekłymi chorobami zapalnymi:
 - niskiego stopnia (*low-grade glandular intraepithelial dysplasia*)
 - wysokiego stopnia (*high-grade glandular intraepithelial dysplasia*)
 - rak (*carcinoma*):
 - rak gruczolowy (*adenocarcinoma*)
 - rak gruczolowy śluzotworczy (*adenocarcinoma mucinosum*)
 - rak sygnetowokomórkowy (*signet-ring cell carcinoma*)
 - rak drobnokomórkowy (*carcinoma microcellulare*)
 - rak łuskowokomórkowy (*squamous cell carcinoma*)
 - rak gruczolowo-łuskowy (*adenosquamous carcinoma*)
 - rak rdzeniasty (*medullary carcinoma*)
 - rak niezróżnicowany (*carcinoma nondifferentiatum*)
 - rakowiak (*carcinoid*) – dobrze zróżnicowany nowotwór endokrynnny:
 - EC-cell – nowotwór produkujący serotoninę
 - L-cell – nowotwór produkujący peptydy
 - inne
 - rakowiako-gruczolako-rak (*carcinoid-adenocarcinoma*)
2. Nowotwory pochodzenia nienabłonkowego:
- tłuszczak (*lipoma*)
 - mięśniak gładkokomórkowy (*leiomyoma*)
 - nowotwór podścieliskowy (*gastrointestinal stromal tumor – GIST*)
 - mięśniakomięsak gładkokomórkowy (*leiomyosarcoma*)
 - naczyniakomięsak (*angiosarcoma*)
 - mięsak Kaposiego (*Kaposi sarcoma*)
 - czerniak złośliwy (*melanoma malignum*)
 - inne
3. Chłoniaki (*lymphoma*)
4. Polipy nienowotworowe:
- polip hiperplastyczny
 - polip Peutza-Jeghersa
 - polip młodzieńczy

90% spotykanych sporadycznych raków jelita grubego ma postać raka gruczołowego (gruczolakoraków).

Makroskopowo wyróżnia się cztery typy zaawansowanego CRC:

- polipowaty;
- owrzodziały i grzybiasty;
- owrzodziały i zwężający;
- rozlegle naciekający.

1.2.2. Klasyfikacja Dukesa

Klasycznym podziałem kliniczno-patomorfologicznego zaawansowania raka jelita grubego jest skala Dukesa [26].

Klasa	Opis
A	nowotwór nie przekracza ściany jelita
B	nowotwór przekracza ścianę jelita do surowicówki lub tkanki tłuszczowej okołoodbytniczej
C	przerzuty w węzłach chłonnych
D	przerzuty odległe

1.2.3. Klasyfikacja TNM

W ocenie stopnia zaawansowania raka jelita grubego często wykorzystywana jest klasyfikacja TNM wg AJCC (ang. *American Joint Committee on Cancer*), opierająca się na ocenie trzech cech:

T (ang. *tumor*) - określającej głębokość naciekania guza pierwotnego,

N (ang. *noduli*) - określającej stan regionalnych węzłów chłonnych,

M (ang. *metastases*) - potwierdzającej lub wykluczającej występowanie przerzutów w narządach odległych [20].

T – guz pierwotny	
TX	nie można ocenić guza pierwotnego
T0	nie stwierdza się guza pierwotnego
Tis	carcinoma <i>in situ</i> – komórki nowotworowe widoczne w nabłonku, nacieki nie przekracza błony podstawnej lub blaszki właściwej błony śluzowej, nie stwierdza się przekraczania blaszki mięśniowej błony śluzowej

T1	guz nacieka błonę podśluzową
T2	guz nacieka warstwę mięśniową
T3	guz nacieka przez warstwę mięśniową do warstwy podsurowicówkowej lub do niepokrytych otrzewną tkanek okołookrężniczych bądź okołodbytniczych
T4	guz nacieka przez ciągłość innych tkanek i narządów lub przerasta otrzewną; naciekanie przez ciągłość dotyczy też innych okolic jelita grubego zajętych w wyniku przerastania błony surowiczej (np. naciekanie pętli esicy przez raka odbytnicy)
N – okoliczne węzły chłonne	
NX	nie można ocenić okolicznych węzłów chłonnych
N0	regionalne węzły chłonne bez przerzutów nowotworu
N1	przerzuty nowotworu w 1–3 regionalnych węzłach chłonnych
N2	przerzuty nowotworu w 4 i więcej regionalnych węzłach chłonnych
M – przerzuty odległe	
MX	nie można ocenić występowania przerzutów odległych
M0	nie stwierdza się przerzutów odległych
M1	stwierdza się przerzuty odległe

1.3. Hipoksja guzów litych

Tlen jest w stanie dyfundować z naczyń krwionośnych na odległość ok. 150 μm nim zostanie wykorzystany w procesach metabolicznych [27]. W trakcie zwiększania masy guza odległość komórek nowotworowych od naczyń krwionośnych wzrasta. Ponadto nowe naczynia powstające w pobliżu ogniska nowotworowego są najczęściej wykształcone nieprawidłowo strukturalnie i funkcjonalnie [28, 29]. Stąd w trakcie procesu nowotworzenia często pojawia się obniżone ciśnienie parcjalne tlenu w komórkach ($< 7 \text{ mmHg}$; $< 1\% \text{ O}_2$) zwane hipoksją. Warunki zmniejszonej podaży tlenu wymuszają na komórkach procesy adaptacyjne. Wśród nich należy wymienić przystosowanie do beztlenowego metabolizmu, nasilenie procesów replikacyjnych, neowaskularyzację, zwiększoną inwazyjność i migrację [30]. Wyniki badań podstawowych i klinicznych potwierdzają, że komórki znajdujące się w stanie hipoksji wykazują bardziej „agresywny fenotyp”, mają większy potencjał do przerzutowości oraz charakteryzują się zwiększoną odpornością na chemio- i radioterapię.

Promieniooporność tych komórek wynika bezpośrednio z braku tlenu niezbędnego do powstawania wolnych rodników, które mogłyby uszkadzać DNA naświetlanych komórek [31]. Brak odpowiedzi na chemioterapię w przypadku komórek nowotworowych w stanie hipoksji jest prawdopodobnie spowodowany brakiem tlenu niezbędnego do działania niektórych leków cytostatycznych oraz zmniejszoną dystrybucją leków do regionów słabo unaczynionych [32].

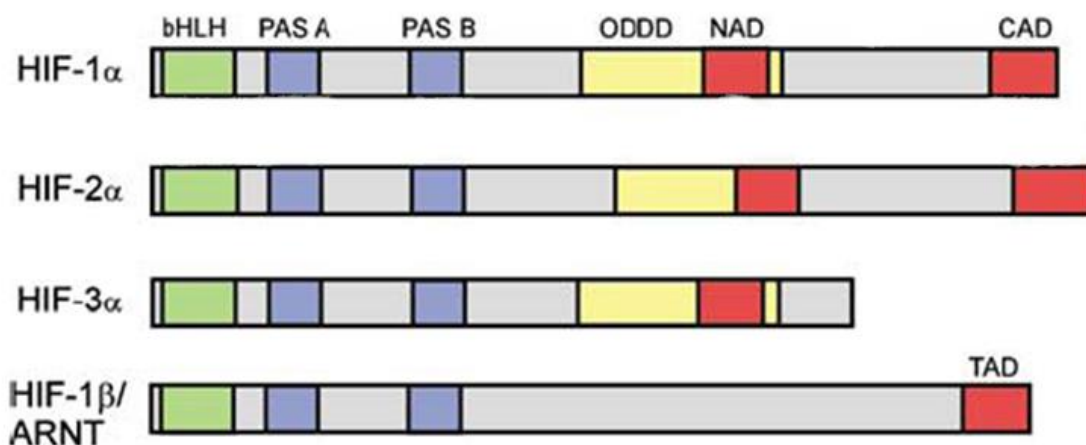
Kluczowym elementem odpowiedzi organizmu na stan hipoksji jest wzrost ekspresji genu *HIF*, kodującego czynnik indukowany hipoksją HIF (ang. *hypoxia inducible factor*).

1.3.1. HIF- α

Czynnik transkrypcyjny HIF został odkryty w 1992 roku przez zespół Semenza i wsp. podczas badań nad regionem promotorowym genu *erythropoetyny* (*EPO*) [33]. Okazało się, że za indukcję ekspresji *EPO* odpowiada HIF. Dalsze badania potwierdziły jego kluczową rolę w pierwotnej odpowiedzi transkrypcyjnej na stres wywołany hipoksją [30].

HIF jest heterodimerem zbudowanym z podjednostki wrażliwej na stężenie tlenu, HIF- α oraz podlegającej konstytutywnej ekspresji, HIF- β , zwanej również ARNT (ang. *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) [30]. Podjednostki te należą do rodziny białek Per-Arnt-Sim (PAS). Posiadają one w części N-aminowej domenę podstawową helisa-pętla-helisa (ang. *basic helix-loop-helix*, hHLH) oraz domenę PAS (PAS-A i PAS-B) odpowiedzialne za heterodimeryzację i wiązanie z DNA [34]. W pobliżu końca karboksylowego białka HIF są zlokalizowane domeny transaktywacyjne: N-TAD i C-TAD (ang. *transactivation domain*) [34]. Białko HIF- β posiada tylko jedną domenę TAD. Domeny TAD odpowiadają za rekrutację koaktywatorów CBP/p300 do heterodimeru HIF- α /HIF- β w jądrze komórkowym [34]. Wówczas do kompleksu HIF mogą przyłączyć się inne czynniki transkrypcyjne [34]. Domena N-TAD sąsiaduje bezpośrednio z zależną od tlenu domeną degradacyjną ODDD (ang. *oxygen dependent degradation domain*), która odgrywa kluczową rolę w regulacji stabilności białka HIF- α [34].

Dotychczas wykryto trzy izoformy dla białka HIF- α i HIF- β [35]. Wśród HIF- β wszystkie izoformy pełnią tę samą funkcję, jednak w największej ilości występuje HIF-1 β , która może dimeryzować z każdą izoformą białka HIF- α : HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α [35]. Najlepiej poznanymi i wykazującymi największą aktywność transkrypcyjną są HIF-1 α i HIF-2 α . Funkcja HIF-3 α nie jest wciąż dokładnie poznana, ale jednej z jej izoform przypisuje się rolę inhibitora HIF-1 α oraz HIF-2 α [35]. Schemat struktury białek HIF przedstawia rycina 1.



Rycina 1. Budowa i struktura HIF-1/2/3 α oraz HIF-1 β . hHLH-domena podstawowa helisa-pętla-helisa (ang. *basic helix-loop-helix*), PAS A-Per-Arnt-Sim A, PAS B- Per-Arnt-Sim B, ODDD- zależna od tlenu domena degradacyjna (ang. *oxygen dependent degradation domain*), NAD- N-terminalna domena transaktywacyjna, CAD- C-terminalna domena transaktywacyjna.

Czynnik transkrypcyjny HIF wiąże się z DNA jako heterodimer zbudowany z podjednostki HIF- α z HIF-1 β . HIF- α podlega regulacji posttranslacyjnej w przeciwieństwie do konstytutywnie podlegającej ekspresji podjednostki HIF-1 β [36]. Na tej podstawie przyjmuje się, że aktywność czynnika HIF jest zależna od funkcjonowania HIF- α [36].

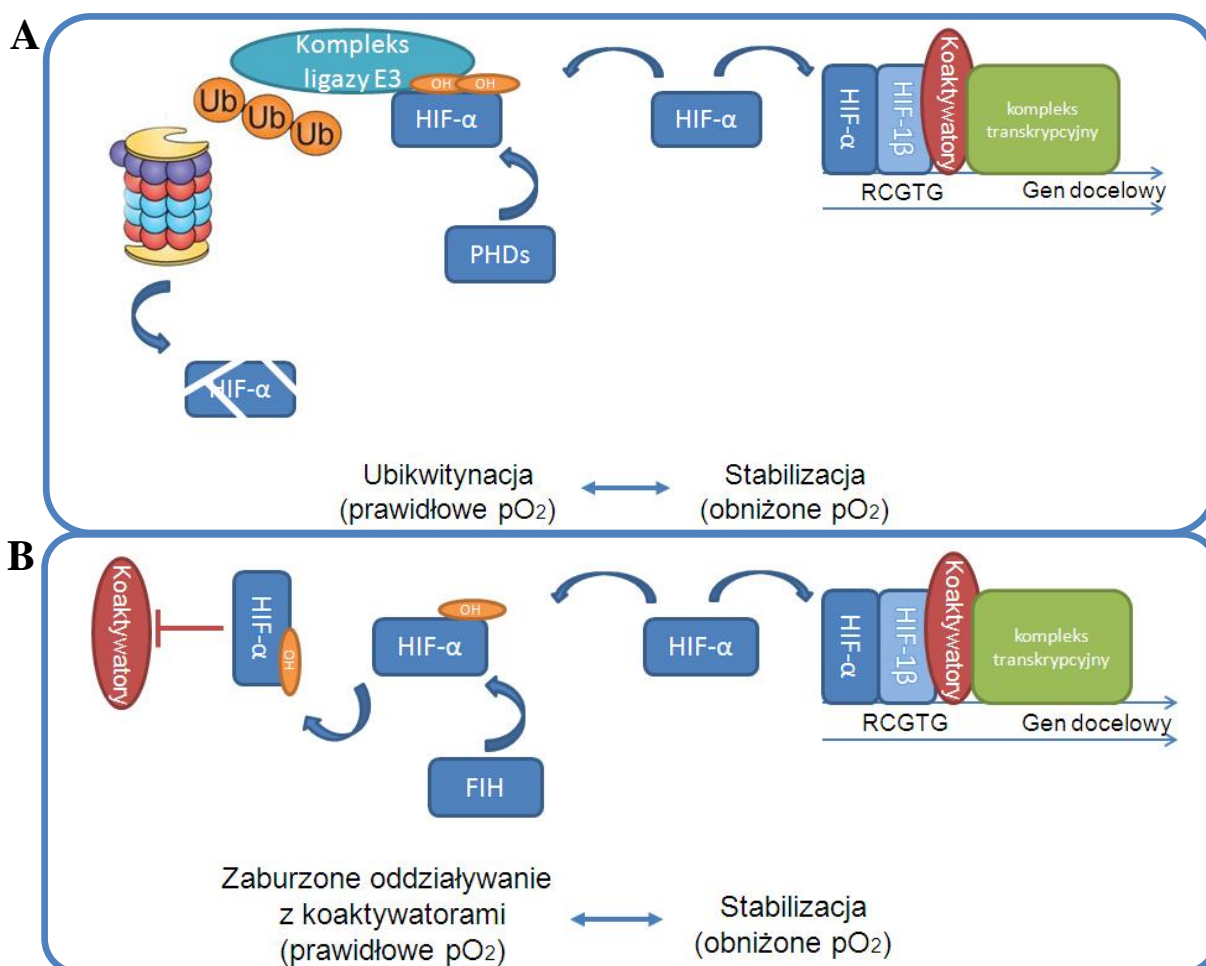
1.3.2. Regulacja podjednostki HIF- α w zależności od dostępności tlenu.

Obniżone ciśnienie tlenu wywiera stabilizujące działanie na białko HIF- α , natomiast jego prawidłowe ciśnienie wywołuje efekt przeciwny, czyli rozpad białka HIF- α [37]. Okres półtrwania białka HIF- α w warunkach normoksji wynosi ok. 5 minut [30]. Jednym z pierwszych etapów degradacji HIF- α jest hydroksylacja aminokwasów w obrębie N- lub C- końcowej domeny transaktywacyjnej z udziałem trzech hydroksylaz prolinowych (ang. *prolyl hydroxylases* -PHD) i hydroksylazy asparaginianowej, zwanej czynnikiem hamującym HIF (FIH - ang. *factor inhibiting HIF*) [37].

PHD odpowiadają za hydroksylację dwóch reszt prolinowych w pozycjach 402 i 564 w obrębie domeny ODDD białka HIF- α [38]. Następnie hydroksylowany czynnik HIF- α tworzy kompleks z białkiem VHL (ang. *von Hippel-Lindau tumor suppressor*), będącym częścią kompleksu ligazy E3 ubikwitynowej, co prowadzi do jego proteosomalnej degradacji [39] (Rycina 2A). Do rodziny hydroksylaz prolinowych regulujących stabilność białka HIF zaliczamy: PHD1, PHD2, PHD3 [39]. Należą one do grupy niehemowych dioksygenaz, które wymagają do swojej aktywności tlenu, dwuwartościowych jonów żelaza i α -ketoglutaranu. Stąd przy obniżonej zawartości tlenu aktywność PHD spada, a wzrasta aktywność HIF. Wszystkie izoformy PHD są w stanie hydroksylować HIF- α , jednak PHD2 jest uważana

za najważniejszą hydroksylazę. Wykazano, iż myszy pozbawione genu *phd2* wykazują liczne defekty rozwojowe prowadzące do śmierci, np. zaburzenia procesów angiogenezy i erytropoezy lub kardiomiopatię rozstrzeniową, natomiast brak genu *phd1* czy też *phd3* nie jest letalny [39]. Specyficzność poszczególnych hydroksylaz wobec miejsc hydroksylacji domeny ODDD oraz izoform białka HIF- α została potwierdzona na przykładzie PHD3, która hydroksyluje prolinę w pozycji 564 oraz wykazuje większą aktywność wobec białka HIF-2 α [40].

Kolejne białko należące do rodziny dioksygenaz, czynnik hamujący HIF (FIH) odpowiada za hydroksylację reszty asparaginowej domeny C-TAD w pozycji 803 [34]. Hydroksylacja w obrębie tej domeny uniemożliwia wiązanie aktywatorów transkrypcji CBP/p300 i zapobiega aktywacji genów indukowanych hipoksją (Rycina 2B). Wykazano, że FIH funkcjonuje w warunkach umiarkowanej hipoksji, gdy PHD nie wykazują już aktywności katalitycznej [41].



Rycina 2. Regulacja stabilności podjednostki HIF- α poprzez hydroksylację w zależności od dostępności tlenu. A- uproszczony mechanizm działania PHD, **B-** uproszczony mechanizm działania FIH.

W przypadku występowania hipoksji, gdy aktywność katalityczna hydroksylaz zostaje zahamowana, dochodzi do stabilizacji białka HIF- α [30]. Wiąże się to ze stabilizacją podjednostki α białka HIF, jej translokacją do jądra komórkowego, dimeryzacją z podjednostką β , związaniem koaktywatorów CBP/p300 oraz aktywacją ekspresji genów indukowanych hipoksją [30] (Rycina 2). Geny indukowane przez HIF zawierają w promotorze jedną lub kilka, ułożonych tandemowo sekwencji 5'-RCGTG-3' (R-puryna; A lub G), zwanych elementami odpowiedzi na hipoksję – HRE (ang. *hypoxia response element*) [30]. Do tej pory zidentyfikowano wiele genów z sekwencją HRE w regionie promotorowym zaangażowanych w takie procesy jak: adaptacja metabolizmu do warunków beztlenowych, neowaskularyzacja, erytropoeza, apoptoza, metabolizm glukozy czy regulacja pH (Tabela 1).

Tabela 1. Wybrane geny indukowane przez HIF posiadające sekwencję HRE w regionie promotora.

Proces		Produkt genu	Literatura
Adaptacja do warunków beztlenowych	Enzymy glikolityczne	-heksokinaza -dehydrogenaza mleczanowa -kinaza fosfoglicerynianowa	[42-44]
	Transporter glukozy	GLUT1, GLUT3	[42]
	Regulacja pH (w odpowiedzi na zwiększoną produkcję kwasu mlekowego)	-anhydraza węglanowa IX -transporter H ⁺ /mleczan	[45, 46]
Dostarczenie tlenu	Erytropoeza	erytropoetyna	[33]
	Neowaskularyzacja	-VEGF -angiopoetyna 1 -PDGF	[47, 48]
	Transport żelaza	-transferyna -ceruloplazmina	[49]
Regulacja apoptozy	Czynniki wzrostu	-IGF-2 -TGF- β	[50, 51]
	Hamowanie apoptozy	NPM	[52]
Inwazyjność/ przerzutowość	Metabolizm macierzy zewnątrzkomórkowej	-UPAR -MMP-2	[28, 53]

Inwazyjność/ przerzutowość		-PAI-1 -LOX	
	Inwazyjność	-TGF- α -CXCR4	[54, 55]
	Obniżenie aktywności E-kadhedryny	-SNAIL -TWIST -HNF4A	[54, 56]

GLUT1/GLUT3- transporter glukozy 1/3 (ang. *glucose transporter 1/3*); VEGF-czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. *vascular endothelial growth factor*); PDGF- płytkopochodny czynnik wzrostu (ang. *platelet derived growth factor*); IGF-2- insulinopodobny czynnik wzrostu (ang. *insulin-like growth factor*); TGF- β -transformujący czynnik wzrostu β (ang. *transforming growth factor β*); NPM- nukleofosmina (ang. *nucleophosmin*); UPAR- aktywator plazminogenu (ang. *plasminogen activator, urokinase receptor*); MMP-2 – metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 2 (ang. *matrix metalloproteinase 2*); PAI-1 inhibitor aktywacji plazminogenu (ang. *plasminogen activator inhibitor type 1*); LOX- oksydaza lizylowa (ang. *lysyl oxidase*); TGF- α - transformujący czynnik wzrostu α (ang. *transforming growth factor α*); CXCR4- receptor chemokin 4 z motywem C-X-C (ang. *chemokine (C-X-C motif) receptor 4*); TWIST- czynnik transkrypcyjny twist z domeną podstawową helisa-pętla-helisa (ang. *twist basic helix-loop-helix transcription factor*); HNF4A- czynnik jądrowy hepatocytów (ang. *hepatocyte nuclear factor 4*).

1.4. Epigenetyka

Epigenetyka obejmuje dziedziczne, somatycznie (w niewielkim stopniu germinalnie) mechanizmy zmiany ekspresji genów, które nie wynikają ze zmian sekwencji DNA [57]. Do głównych mechanizmów epigenetycznych zalicza się: metylację DNA, potranslacyjne modyfikacje histonów i działanie mikroRNA (miRNA) [57]. Modyfikacje histonów dotyczą głównie postraslacyjnych modyfikacji histonów rdzeniowych i obejmują między innymi ich odwracalną: acetylację, metylację, fosforylację i ubikwitynację [58]. Zmiany te są rozpoznawane przez odpowiednie białka indukujące powstanie w danym regionie chromatyny skondensowanej, nieaktywnej transkrypcyjnie (heterochromatyny) lub formy luźnej chromatyny, aktywnej transkrypcyjnie (euchromatyny) [58]. Z kolei miRNA są ewolucyjnie konserwatywną klasą małych (około 20 nukleotydowych), niekodujących RNA, zdolnych do wyciszania ekspresji genów na poziomie posttranskrypcyjnym [59]. Dojrzałe miRNA wraz z kompleksem RISC (ang. *RNA Induced Silencing Complex*) wiąże się do komplementarnych sekwencji w rejonie 3' UTR docelowego mRNA. Obserwowanym efektem jest inhibicja inicjacji lub elongacji translacji transkryptu docelowego przy niezmienionej ilości jego mRNA [59]. Zazwyczaj nie dochodzi do pełnej komplementarności pomiędzy miRNA, a docelowym mRNA. Skutkiem tego pojedyncza cząsteczka miRNA może regulować

translację wielu mRNA. Ponadto translacja jednego mRNA może być regulowana przez wiele różnych cząsteczek miRNA [59].

1.4.1. Metylacja DNA

Metylacja DNA jest najlepiej poznanym mechanizmem zmian epigenetycznych, polegającym na poreplikacyjnej odwracalnej modyfikacji reszt cytozyny przy 5-tym węglu pierścienia pirymidynowego [60]. Metylacja cytozyny w łańcuchu DNA występuje gdy znajduje się ona w sąsiedztwie guaniny, tzw. dinukleotydy CpG. Szacuje się, że w ludzkim genomie jest około 56 milionów dinukleotydów CpG, z czego 60-80% z nich podlega metylacji [61]. Dinukleotydy CpG mogą być rozrzucone w genomie lub występować w skupieniach w postaci tzw. wysp CpG. Wyspa CpG charakteryzują się długością minimum 550 par zasad oraz współczynnikiem CpG obserwowanych do CpG oczekiwanych równym co najmniej 0,65 [62]. Zaobserwowano również, że 70% wszystkich wysp CpG występuje w regionach promotorowych genów [63]. Metylacja wysp CpG zlokalizowanych w regionach promotorowych genów jest odpowiedzialna za wyciszenie ekspresji genu [64]. Obecność metylowanej cytozyny uniemożliwia prawidłowe rozpoznanie miejsca wiązania na DNA przez czynniki transkrypcyjne w obrębie promotora [64]. Ponadto obecność tej modyfikacji epigenetycznej inicjuje łączenie białek wiążących 5-metylocytozynę ($m^5\text{CpG}$) – MeCP (ang. *$m^5\text{CpG}$ binding protein*) oraz zawierających domenę wiążącą $m^5\text{CpG}$ – MBD (ang. *$m^5\text{CpG}$ binding domain proteins*) [65]. Wśród białek MeCP wyróżniamy MeCP1 oraz MeCP2, które wiążą się specyficznie z metylovanym DNA w obrębie całego genomu, tworząc przestrzenną przeszkodę dla wiązania czynników transkrypcyjnych [65]. Do rodziny białek MBD zalicza się MBD1, MBD2, MBD3, MBD4 oraz kompleks Kaiso [65]. Mechanizm działania tych białek jest związany z blokowaniem miejsca wiązania dla czynników transkrypcyjnych w obrębie sekwencji promotorowej lub tworzeniem kompleksów z innymi białkami będącymi korepresorami, co w konsekwencji prowadzi do powstania struktury heterochromatyny i tym samym zahamowania procesu transkrypcji [66, 67].

Do głównych funkcji metylacji DNA, oprócz wpływu na ekspresję genów, zalicza się również piętnowanie rodzicielskie (ang. *imprinting*), inaktywację chromosomu X, kontrolę rozwoju zarodkowego oraz ochronę stabilności genomu poprzez wyciszenie sekwencji powtórzonych (retrowirusów, transpozonów DNA) [68-70].

Za metylację DNA odpowiadają enzymy należące do rodziny metylotransferaz,

wiązanie kowalencyjne z resztą seryny w miejscu aktywnym DNMT1 i DNMT3b, co skutkuje inaktywacją enzymu [75, 76].

Proces demetylacji DNA może też przebiegać na drodze enzymatycznej niezależnie od cyklu komórkowego, tzw. demetylacji aktywnej [73]. Dotychczas zaproponowano kilka mechanizmów aktywnej demetylacji DNA, takich jak:

- usuwanie grupy metylowej z udziałem białka z rodziny MBD2b;
- wycięcie 5-metylocytozyny i zastąpienie jej cytozyną przez system naprawczy typu wycinanie zasad, BER (ang. *base excision repair*);
- deaminacja 5-metylocytozyny do tyminy z udziałem białek AID/APOBEC (ang. *activation induced deaminase/ apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide*), a następnie przywrócenie pary G-C w wyniku działania systemu naprawczego BER [73, 77].

Dodatkowo, w 2009 roku zidentyfikowano rodzinę białek Tet, które w warunkach *in vitro* są w stanie katalizować przekształcenie 5-metylocytozyny do 5-hydroksymetylocytozyny (5-hmC) [78]. Uważa się, że białka Tet i 5-hmC mogą dwukierunkowo wpływać na proces aktywnej demetylacji DNA. Pierwszy model zakłada, że 5-hmC nie jest rozpoznawana przez białka z rodziny MBP, co może skutkować demetylacją pasywną w trakcie replikacji [79]. Druga teoria zakłada, że powstająca w wyniku działania białek Tet 5-hydroksymetylocytozyna jest produktem pośrednim aktywnej demetylacji DNA, która przebiega z zaangażowaniem systemu naprawczego BER [79].

1.5. Karcynogeneza jelita grubego z uwzględnieniem roli metylacji DNA

W ostatnich latach zwraca się szczególną uwagę na współistnienie zmian epigenetycznych w rozwoju raka jelita grubego, który przestał być traktowany tylko jako nowotwór spowodowany czynnikami genetycznymi.

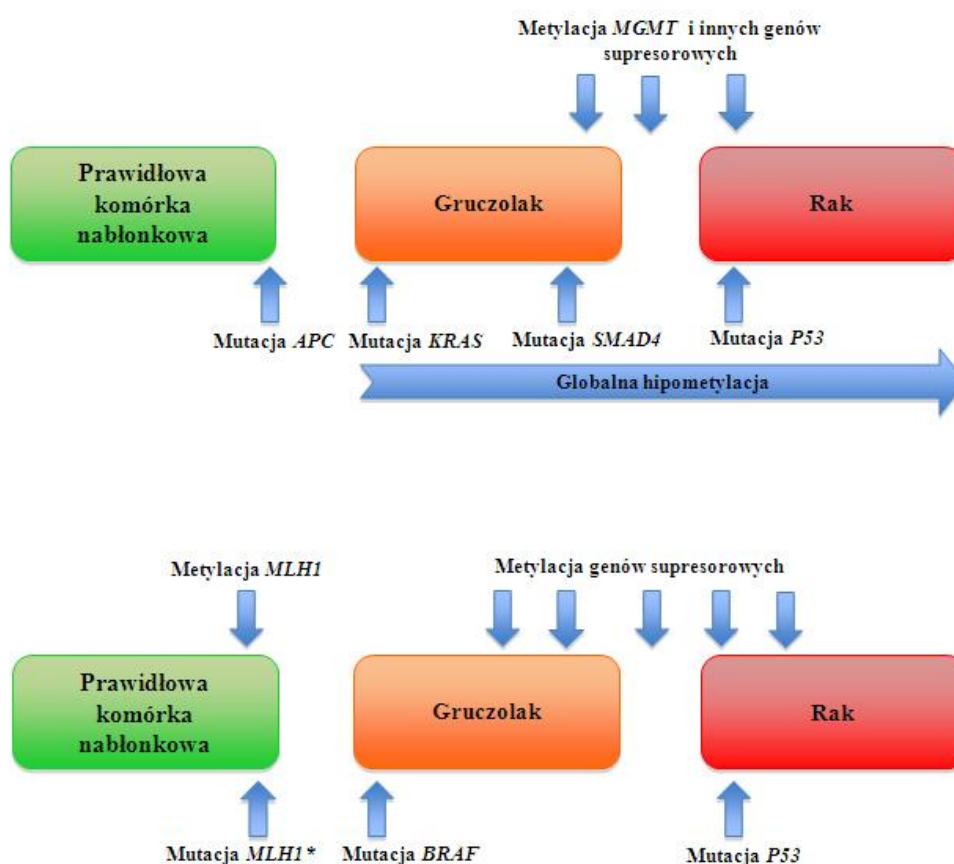
W szlaku rozwoju sporadycznego raka jelita grubego wyróżnia się trzy schematy: szlak sekwencyjny rozwoju gruczolak-rak, związany z niestabilnością mikrosatelitarną (ang. *Microsatellite instability-MSI*), przemiana z polipa hiperplastycznego poprzez ząbkowanego gruczolaka do raka oraz CRC o fenotypie metylatora wysp CpG (ang. *CpG island methylator phenotype, CIMP*). Pierwszy z wymienionych schematów został zaproponowany w 1990 roku przez Fearona i Vogelsteina [80]. Ta hipoteza zakłada występowanie kolejnych zmian genetycznych począwszy od mutacji w genie *APC*. Mutacje w tym genie są związane z opisanym w rozdziale 1.1 zespołem FAP, jednak są

identyfikowane również u około 80% pacjentów ze sporadycznym rakiem jelita grubego [81]. Co więcej, u większości przypadków sporadycznego raka jelita grubego spotyka się mutację genu *KRAS* (ang. *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), *TP53* i *SMAD4* [82]. Produkt genu *KRAS* należący do rodziny małych białek Ras jest zlokalizowany w błonie cytoplazmatycznej i wykazuje aktywność GTP-azy. Na skutek mutacji (wykrytych we wczesnych etapach rozwoju gruczolaka i raka) dochodzi do zaburzenia struktury domeny GTP i stałego przekazywania sygnału do wnętrza komórki w kierunku aktywacji proliferacji i inhibicji apoptozy [82]. Mutacje w obrębie genu *SMAD4* obserwowane w raku jelita grubego również prowadzą do aktywacji szlaków sygnałnych przez co wpływają na wzrost i różnicowanie komórek [82]. Ostatnim etapem progresji nowotworowej modelu raka jelita grubego zaproponowanego przez Fearona i Vogelsteina jest uszkodzenie funkcji produktu białkowego genu supresorowego *TP53*. Uszkodzenie funkcji białka p53 powoduje kumulację zmian genetycznych w kolejnych pokoleniach [82].

Drugą grupę stanowią nowotwory o fenotypie MSI. Zaliczamy do nich około 15% wszystkich nowotworów raka jelita grubego w tym dziedziczone genetycznie, HNPCC, opisane w rozdziale 1.1. Nowotwory sporadyczne oraz dziedziczny zespół Lyncha są związane zaburzeniami genów zaangażowanych w naprawę DNA, takich jak *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* oraz *PMS2* [82]. Jednak mechanizm molekularny odpowiedzialny za powstanie MSI w sporadycznych CRC i HNPCC jest odmienny. W HNPCC dochodzi do mutacji w genach odpowiedzialnych za naprawę DNA, z kolei w sporadycznych obserwowana jest zwiększona metylacja DNA regionu promotorowego (hipermetylacja) wyżej wymienionych genów. Ponadto u około 80% przypadków MSI w trakcie rozwoju zębowanego gruczolaka obserwuje się mutację protonkogenu *BRAF* (ang. *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*) [83]. Nowotwory CRC, w których nie obserwuje się MSI, nazywane są mikrosatelitarnie stabilnymi (ang. *microsatellite stable*, MSS).

Zmiany wzoru metylacji DNA są powszechnie obserwowane przede wszystkim w trzecim modelu karcynogenezy CRC, CIMP. Dochodzi wówczas do wyciszenia poprzez metylację DNA genów supresorowych, np. *CDKN2A* (ang. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*), *MLH1*, *MGMT* (ang. *O-6-methylguanine-DNA methyltransferase*), *HPPI* (ang. *hyperpigmentation, progressive, 1*) [83]. Prowadzi to do zaburzenia procesów podziałów komórkowych oraz apoptozy. Wielokrotnie obserwuje się również obniżenie zawartości 5-metylocytozyny w genomie (hipometylacja). Hipometylacja genomu obserwowana już na etapie wczesnego gruczolaka dotyczy głównie satelitarnego i pericentromerycznego rejonu

chromosomu. Skutkiem tego jest niestabilność chromosomowa (ang. *chromosome instability*, CIN). Ponadto hipometylacja może spowodować zaburzenie prawidłowej struktury genu, ekspresji wyciszonych dotychczas alternatywnych form mRNA, aktywacji protoonkogenów oraz reaktywacji retrotranspozonów. Istotne było odkrycie, że profil metylacji DNA nowotworu jest charakterystyczny dla pochodzenia guza, jego typu i stopnia zaawansowania [84]. Geny, których poziom metylacji DNA ulega zmianie w trakcie karcynogenezy jelita grubego zostały wybrane dla klasyfikacji nowotworów do grupy CIMP+ (obecna hipermetylacja wybranych genów w tkance nowotworowej) lub CIMP- (brak hipermetylacji wybranych genów w tkance nowotworowej) [85]. Lista genów, która służy do klasyfikacji CIMP wciąż pozostaje otwarta i jest modyfikowana w oparciu o najnowsze wyniki badań metylacji DNA genów zaangażowanych w progresję CRC. Model zmian zachodzących w trakcie karcynogenezy CIMP „przeplata się” ze zmianami obserwowanymi w szlaku klasycznym gruczolak-rak oraz MSI (Rycina 4).



Rycina 4. Model zmian genetycznych i epigenetycznych zachodzących w trakcie karcynogenezy jelita grubego. Zaznaczono mutacje i metylacje jedynie wybranych genów. APC- (ang. *Adenomatous Polyposis Coli*), KRAS- (ang. *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), MGMT- (ang. *O-6-methylguanine-DNA methyltransferase*), MLH1- (ang. *human mutL homolog 1*), BRAF - (ang. *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*). *- mutacja w HNPCC.

2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Kilka niezależnych grup badawczych potwierdziło zmienną zawartość hydroksylaz oraz czynnika HIF pomiędzy tkanką histopatologicznie niezmienną a nowotworową w raku sutka, prostaty i płuc [86-88]. Mechanizm, za pomocą którego te geny mogą być regulowane pozostaje niewyjaśniony. Co ciekawe, geny *PHD1*, *PHD2*, *PHD3*, *FIH*, *HIF-1 α* i *HIF-2 α* zawierają wyspę CpG w regionie promotorowym. Wykazano, że podobnie do mutacji genetycznych, hiper- lub hipometylacja sekwencji regulatorowych genów może spowodować zmianę ekspresji genów w różnych typach nowotworów, w tym raku jelita grubego [60].

Celem pracy doktorskiej jest weryfikacja hipotezy o wpływie metylacji DNA w obrębie sekwencji rozpoznawanych przez czynniki transkrypcyjne na ekspresję genów *PHD1*, *PHD2*, *PHD3*, *FIH*, *HIF-1 α* i *HIF-2 α* w raku jelita grubego.

Cel pracy doktorskiej jest realizowany w ramach następujących zadań:

- analiza ekspresji genów *PHD1*, *PHD2*, *PHD3*, *FIH*, *HIF-1 α* i *HIF-2 α* na poziomie mRNA i białka w pierwotnej tkance nowotworowej i histopatologicznie niezmiennionej, pobranej od 90 pacjentów z rakiem jelita grubego;
- analiza poziomu metylacji DNA regionu promotorowego genów *PHD1*, *PHD2*, *PHD3*, *FIH*, *HIF-1 α* i *HIF-2 α* w pierwotnej tkance nowotworowej i histopatologicznie niezmiennionej, pobranej od 90 pacjentów z rakiem jelita grubego;
- analiza korelacji metylacji DNA w obrębie wyspy CpG z ekspresją wybranych genów w materiale klinicznym;
- analiza poziomu metylacji DNA i ekspresji genów *PHD1*, *PHD2*, *PHD3*, *FIH*, *HIF-1 α* , *HIF-2 α* w ustalonych liniach komórkowych raka jelita grubego HCT116 i DLD-1 w warunkach normoksji i hipoksji;
- analiza wpływu inhibitora metylotransferaz DNA, 5-aza-2-deoksytydyny, na ekspresję wybranych genów w ustalonych liniach komórkowych raka jelita grubego HCT116 i DLD-1 w warunkach normoksji i hipoksji.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Materiał kliniczny

Grupę badaną stanowiło 90 pacjentów ze zdiagnozowanym pierwotnym gruczolakorakiem jelita grubego. Chorzy byli leczeni operacyjnie w Wielospecjalistycznym Szpitalu Miejskim im. Józefa Strusia przy ul. Szwajcarskiej (Katedra Chirurgii Ogólnej i Kolorektalnej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu). Tkanka histopatologicznie niezmienniona jelita grubego zlokalizowana co najmniej 10-20 cm od miejsc zmienionych nowotworowo została pobrana od tych samych pacjentów. Pobrane wycinki tkankowe były natychmiast zamrażane w ciekłym azocie i przechowywane w temperaturze -80°C do momentu izolacji RNA, DNA i białka. Klasyfikacja histopatologiczna, w tym stopień złośliwości histologicznej i stadium nowotworu, (TNM; AJCC 2010) została przeprowadzona przez doświadczonego patologa. Żaden z pacjentów nie otrzymywał przedoperacyjnej chemio- lub radioterapii. Badania uzyskały akceptację Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (uchwała nr 1001/09). Charakterystyka kliniczna pacjentów została przedstawiona w tabeli 2.

Tabela 2. Charakterystyka kliniczna pacjentów

Charakterystyka	Liczba pacjentów
Łączna liczba pacjentów	90
Płeć (Kobiety/Mężczyźni)	41/49
Średnia wieku (min-maks) w momencie operacji (lata)	68.60 (min-maks)
Lokalizacja	
okreźnica proksymalna (kątnica - okreźnica wstępująca i poprzeczna z zagięciem wątrobowym)	32
okreźnica dystalna (zagięcie śledzionowe-esica)	18
Odbytnica	40
Stopień złośliwości histologicznej	
G1	3
G2	65
G3	22
Skala Dukesa	
A	8
B	35
C	47
Stadium nowotworu	
T1	4
T2	10
T3	65
T4	11

3.2. Ustalone linie komórkowe raka jelita grubego HCT116 i DLD-1

Ustaloną linię komórkową raka jelita grubego DLD-1 otrzymano z banku linii komórkowych American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD) natomiast linię komórkową HCT116 otrzymano dzięki uprzejmości Zakładu Radiobiologii Doświadczalnej i Klinicznej Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie w Gliwicach. Charakterystyka oraz specyfikacja genetyczna obu linii jest dostępna na stronie internetowej ATCC, www.lgcstandards-atcc.org.

3.3. Odczynniki i sprzęt laboratoryjny

3.3.1. Hodowla komórkowa

Odczynniki:

Medium hodowlane DMEM	- Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)
Medium hodowlane McCoy	- Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)
PBS	-Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)
Trypsyna	-Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)
Roztwór antybiotykowy i przeciwgrzybiczny	-Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)
Surowica płodowa bydłęca (FBS)	-Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)
5-aza-2'-deoksycytydyna (5-dAzaC)	-Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)
wodorowęglan sodu	-Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)

Sprzęt:

Komora laminarna	-NuAire Inc. (Plymouth, MN)
Inkubator do hodowli komórek	-NuAire Inc. (Plymouth, MN)
Inkubator do hodowli komórek w war. hipoksji	- Sanyo (Wood Dale, IL)
Komora Bürkera	-Beckam Coulter Inc. (USA)

3.3.2. Izolacja oraz pomiar stężenia RNA, DNA i białka

Odczynniki:

Woda dejonizowana	- Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)
Tri Reagent	- Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)
Bufor do izolacji białek RIPA	- Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)
Protein Assay (Odczynnik Bradforda)	- Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA)
Woda traktowana eterem dietylowym	- BioShop Inc. (Ontario, Kanada)

kwasu pirowęglowego (DEPC)	
Koktajl inhibitorów proteaz	- Roche Diagnostics GmbH, (Mannheim, Niemcy)
Chloroform	- Polskie Odczynniki Chemiczne
Alkohol izopropylowy	- Polskie Odczynniki Chemiczne
Alkohol etylowy	- Polskie Odczynniki Chemiczne
Zestaw do izolacji genomowego DNA	- Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)
Proteinaza K (20 mg/ml)	- BioBasic Inc. (Ontario, Kanada)
Standard białkowy BSA 1mg/ml	- Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)

Sprzęt:

Wirówka z chłodzeniem (Centrifuge 5804R)	- Eppendorf AG (Niemcy)
Termoblok (Thermomixer Comfort)	- Eppendorf AG (Niemcy)
Spektrofotometr (Bio Photometer)	- Eppendorf AG (Niemcy)
Komora laminarna (BioAir Aura Mini)	- Euroclone (Milan, Włochy)
Spektrofotometr (NanoDrop1000)	- Eppendorf AG (Niemcy)

3.3.3. Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelu agarozowym**Odczynniki:**

Agaroza	- BioShop Inc. (Ontario, Kanada)
10×stężony koncentrat buforu TBE	- BioShop Inc. (Ontario, Kanada)
Bromek etydyny	- BioShop Inc. (Ontario, Kanada)
Marker wielkości DNA (GeneRuler 100bp)	- ThermoScientific Inc. (Waltham, MA)
Bufor obciążający 6×SB do DNA i RNA	- ThermoScientific Inc. (Waltham, MA)
Zestaw do izolacji DNA z żelu agarozowego	- Roche Diagnostics GmbH, (Mannheim, Niemcy)

Sprzęt:

Aparat do elektroforezy (multiSub Maxi)	- Biocom (San Diego, CA)
Zasilacz (Elite 300)	- Wealtec Corp. (Sparks, NV)
System dokumentacji żeli (MiniBis Pro)	- DNR Bio-Imaging Systems (Izrael)

3.3.4. Deaminacja genomowego DNA**Odczynniki:**

Zestaw do deaminacji genomowego DNA	- Zymo Research Corp. (Irvine, CA)
-------------------------------------	------------------------------------

Woda dejonizowana	- Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)
Sprzęt:	
Termoblok (Thermomixer Comfort)	- Eppendorf AG (Niemcy)
Wirówka (Centrifuge 5418)	- Eppendorf AG (Niemcy)
Spektrofotometr (NanoDrop 1000)	- Eppendorf AG (Niemcy)

3.3.5. Przygotowanie i transformacja komórek kompetentnych *E. coli* szczepu TOP10

Odczynniki:

Zestaw do izolacji plazmidowego DNA	- Promega (Sunnyvale, CA)
Izopropylotiogalaktozyd (IPTG)	- Promega (Sunnyvale, CA)
X-Gal	- Promega (Sunnyvale, CA)
pGEM-T Easy Vector System	- Promega (Sunnyvale, CA)
Woda dejonizowana	- Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)
Pożywka bakteryjna płynna LB Broth	- Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)
Pożywka bakteryjna stała LB Agar	- Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)
C ₂ H ₃ KO ₂	- Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)
RbCl	- Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)
CaCl ₂	- Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)
MnCl ₂	- Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)
Bufor MOPS	- Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)
Ampicylina	- Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)
NP-40	- Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)
Glicerol	- Polskie Odczynniki Chemiczne
Komórki bakteryjne <i>E. coli</i> szczep TOP10	- Invitrogen (Grand Island, NY)

Sprzęt:

Termoblok (Thermomixer Comfort)	- Eppendorf AG (Niemcy)
Wirówka (Centrifuge 5418)	- Eppendorf AG (Niemcy)
Spektrofotometr (Bio Photometer)	- Eppendorf AG (Niemcy)
Mieszadło magnetyczne (MMS-3000)	- Biosan (Ryga, Łotwa)
Aparat do pomiaru pH	- Hanna Instruments (USA)
Komora do pracy z bakteriami	- Polon (Polska)
Cieplarka do hodowli bakterii	- Laboratorni Pstroje (Czechy)
Wytrząsarka do hodowli bakteryjnych	- Johanna Otto GmbH (Niemcy)

3.3.6. Amplifikacja kwasów nukleinowych (odwrotna transkrypcja, PCR, qPCR, analiza HRM)

Odczynniki:

Woda dejonizowana	- Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)
M-MLV odwrotna transkryptaza	- Invitrogen (Grand Island, NY)
Zestaw IQ Sybr Green Supermix	- Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA)
Zestaw Hot FIREPol EvaGreen HRM Mix	- Solis BioDyne Co. (Tartu, Estonia)
Zestaw Dream Taq DNA Polymerase	- ThermoScientific Inc. (Waltham, MA)
Zestaw FastStart Taq DNA Polymerase	- Roche Diagnostics GmbH, (Mannheim, Niemcy)
Oligonukleotydy	- IBB PAN (Polska)
Mieszanina deoksynukleotydów	- Novazym (Polska)
Sześci nukleotydowe startery losowe	- Novazym (Polska)

Sprzęt:

Wirówka (Centrifuge 5418)	- Eppendorf AG (Niemcy)
Komora laminarna (BioAir Aura Mini)	- Euroclone (Milan, Włochy)
Termocykler PTC-200	- MJ Research (USA)
Light Cycler®480 Real-Time PCR System	- Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Niemcy)

3.3.7. Rozdział elektroforetyczny i wykrywanie białek (western blot)

Odczynniki:

Tris zasadowy	- Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)
Tris-HCl	- Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)
Siarczan dodecyłu sodu	- Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)
Nadsiarczan amonu	- Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)
TEMED	- Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)
Ponceau S	- Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)
β-merkaptotoetanol	- Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)
Glicyna	- Polskie Odczynniki Chemiczne
Metanol	- Polskie Odczynniki Chemiczne
Tween (R) 20	- Polskie Odczynniki Chemiczne
Kwas octowy	- Polskie Odczynniki Chemiczne

Bromofenol	- Polskie Odczynniki Chemiczne
Marker masy białek	- ThermoScientific Inc. (Waltham, MA)
SuperSignal West Femto Substrat	- ThermoScientific Inc. (Waltham, MA)
40% akrylamid/bisakrylamid	- Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA)
Membrana nitrocelulozowa do transferu białek	- Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA)
Bibuły do półsuchego transferu białek	- Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA)
Sprzęt:	
Termoblok (Thermomixer Comfort)	- Eppendorf AG (Niemcy)
Wirówka (Centrifuge 5418)	- Eppendorf AG (Niemcy)
Mieszadło orbitalne (Multi Bio RS-24)	- Biosan (Ryga, Łotwa)
Zasilacz (Elite 300)	- Wealtec Corp. (Sparks, NV)
Aparat do półsuchego transferu Yrdimes	- Wealtec Corp. (Sparks, NV)
Biospectrum [®] Imaging System 500	- UVP (Upland, CA)
Aparat do rozdzielania białek (Mini Protean)	- Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA)

3.3.8. Sprzęt jednorazowy oraz drobny sprzęt trwały

15 ml probówki polipropylenowe	- Becton-Dickinson (Franklin Lakes, NJ)
50 ml probówki polipropylenowe	- Becton-Dickinson (Franklin Lakes, NJ)
2,0 ml probówki do mrożenia w azocie	- TechnoPlastic Products AG (Szwajcaria)
1,5 ml probówki polietylenowe	- Axygen Scientific Inc. (UnionCity, CA)
0,2 ml probówki do reakcji PCR	- Axygen Scientific Inc. (UnionCity, CA)
10 µl końcówki do pipety	- Axygen Scientific Inc. (UnionCity, CA)
200 µl końcówki do pipety	- Axygen Scientific Inc. (UnionCity, CA)
1000 µl końcówki do pipety	- Axygen Scientific Inc. (UnionCity, CA)
Płytki do reakcji qPCR	- Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Niemcy)
Płytki Petriego do hodowli bakteryjnych	- Nerbe plus GmbH (Niemcy)
Plastikowe pipety Pasteura 3ml	- DHN (Polska)
butelki do hodowli komórkowej 25 i 75cm ²	- Becton-Dickinson (Franklin Lakes, NJ)
Płytki 6-dołkowe do hodowli	- Becton-Dickinson (Franklin Lakes, NJ)
Kuweta do pomiaru spektrofotometrycznego	- Eppendorf AG (Niemcy)
0,1-2,5 µl pipeta zmiennie objętościowa	- Eppendorf AG (Niemcy)

0,5-10 µl pipeta zmiennie objętościowa
 10-100 µl pipeta zmiennie objętościowa
 100-1000 µl pipeta zmiennie objętościowa

- Eppendorf AG (Niemcy)
 - Eppendorf AG (Niemcy)
 - Eppendorf AG (Niemcy)

3.4. Bufory

Bufor glicynowy 1× stężony

Odczynnik	Stężenie końcowe
Tris zasadowy	0,024 M
Glicyna	0,19 M
SDS	1%

Bufor do transferu 1× stężony

Odczynnik	Stężenie końcowe
Tris zasadowy	0,032 M
Glicyna	0,24 M
SDS	0,17%

Bufor TBS 1× stężony

Odczynnik	Stężenie końcowe
Tris zasadowy	0,01 M
NaCl	0,15 M

Bufor Ponceau S

Odczynnik	Stężenie końcowe
Ponceau S	1%
Kwas octowy	7%

Bufor TBST 1× stężony

Odczynnik	Stężenie końcowe
Tris zasadowy	0,01 M
NaCl	0,15 M
Tween 20	0,1%

Bufor TBST-M 1× stężony

Odczynnik	Stężenie końcowe
Tris zasadowy	0,01 M
NaCl	0,15 M
Tween 20	0,1%
Mleko w proszku	1%

Bufor blokujący TBST-B 1× stężony

Odczynnik	Stężenie końcowe
Tris zasadowy	0,01 M
NaCl	0,15 M
Tween 20	0,1%
Mleko w proszku	5%

Bufor do odmywania przeciwciał

Odczynnik	Stężenie końcowe
Glicyna	0,2 M
SDS	0,1%
Tween 20	1%
Ustalić pH=2,2	

**Bufor obciążający do rozdzielania białek
3× stężony**

Odczynnik	Stężenie końcowe
Tris kwasowy	0,24 M
SDS	6%
Glicerol	30%
Bromofenol	0,06%
β-merkaptoetanol	1,6%

Bufor Tbf1 do przygotowania komórek kompetentnych

Odczynnik	Stężenie końcowe
C ₂ H ₃ KO ₂	0,03 M
RbCl	0,1 M
CaCl ₂	0,01 M
MnCl ₂	0,05 M
Glicerol	15%
Ustalony pH=5,8; filtr 0,22 μm	

Bufor Tbf2 do przygotowania komórek kompetentnych

Odczynnik	Stężenie końcowe
MOPS	0,01 M
RbCl	0,01 M
CaCl ₂	0,075 M
Glicerol	15%
Ustalony pH=6,5; filtr 0,22 μm	

Żel poliakrylamidowy zagęszczający do rozdzielania białek

Odczynnik	Stężenie końcowe
Akrylamid/bisakrylamid	5%
Tris kwasowy 0,375M; pH=6,8	0,1 M
SDS	0,1%
APS	0,05%
TEMED	0,15%

Żel poliakrylamidowy rozdzielający do rozdzielania białek

Odczynnik	Stężenie końcowe
Akrylamid/bisakrylamid	10%
Tris kwasowy 1 M pH=8,8	0,25 M
SDS	0,1%
APS	0,05%
TEMED	0,15%

3.5. Metody

3.5.1. Homogenizacja tkanek w ciekłym azocie

Tkanki przechowywane w -80°C poddano homogenizacji w ciekłym azocie z wykorzystaniem młynka kriogenicznego, Freezer/Mill 6770, SPEX SamplePrep (Metuchen, NJ). Przed homogenizacją młynek oraz próby schładzano w ciekłym azocie. Tkanekę rozcierano 1 minutę z częstotliwością 5 uderzeń/sek co pozwalało na uzyskanie jednolitego homogenatu. Następnie roztartą tkankę przenoszono do uprzednio schłodzonej w ciekłym azocie 2,0 ml próbówki do mrożenia w ciekłym azocie. Tak przygotowane próbki przechowywano do momentu użycia w temperaturze -80°C .

3.5.2. Hodowla komórkowa

Komórki DLD-1 hodowano w medium DMEM (Gibco BRL Grand Island, NY), a HCT116 medium McCoy zawierającym 10% inaktywowaną termicznie bydlęcą surowicę płodową i 2 mM glutaminę w temperaturze 37°C , atmosferze wzbogaconej 5% CO_2 i nasyconej parą wodną. Rutynowo komórki po osiągnięciu pełnej konfluencji były odtrawiane od podłoża z użyciem trypsyny, Sigma-Aldrich Co (St Louis, MO), liczone przy pomocy komory Bürkera i przenoszone w odpowiednich rozcieńczeniach na nowe butelki hodowlane.

Traktowanie ustalonych linii komórkowych raka jelita grubego 5-aza2'-deoksycytydyną (5-dAzaC) w warunkach normoksji i hipoksji. Aby określić wpływ 5-dAzaC na metylację DNA w regionie promotorowym badanych genów, oraz na poziom ich transkryptu i białka komórek linii DLD-1 i HCT116 wysiewano na 6-dołkowe płytki. Komórki HCT116 i DLD-1 utrzymywano przez 24 godziny w odpowiednim medium. Następnie komórki hodowano w prawidłowej zawartości tlenu lub hipoksji (1% O_2) przy braku lub w obecności 5-dAzaC o stężeniu 1.00 μM lub 5.00 μM w czasie 6, 24 i 48 godzin. Warunki hipoksji uzyskano stosując inkubator do hodowli komórkowych MCO-18M, Sanyo (Wood Dale, IL), w którym była utrzymywana mieszanina gazów: 5% CO_2 , 94% N_2 i 1% O_2 . Komórki te były następnie wykorzystywane do izolacji DNA, RNA i białka dla potrzeb, odpowiednio, analizy HRM, qPCR i western blot.

3.5.3. Izolacja całkowitego RNA, spektrofotometryczny pomiar stężenia RNA oraz elektroforeza RNA w żelu agarozowym

Izolacja całkowitego RNA. Izolację całkowitego RNA z tkanek i linii komórkowych prowadzono pod komorą z laminarnym przepływem powietrza z wykorzystaniem odczynnika Tri Reagent. Izolację przeprowadzano wg metody Chomczyńskiego i Sacchi [89] z 20 mg homogenizowanej tkanki lub osadu komórkowego ustalonych linii komórkowych raka jelita grubego. Próbkę przenoszono do 1,5 ml probówki polietylenowej schłodzonej w ciekłym azocie i podawano 1 ml odczynnika TriReagent, a następnie mieszano z użyciem mieszadła typu vortex w celu dokładnego rozpuszczenia komórek zawartych w homogenacie. Po dokładnym wymieszaniu próbkę inkubowano przez 3 minuty w temperaturze pokojowej. Następnie do próby dodawano 0,2 ml chloroformu, wytrząsano energicznie przez 30 sekund i inkubowano przez 3 minuty w temperaturze pokojowej w celu wstępnego rozdziału fazy wodnej i organicznej. W kolejnym etapie, probówki wirowano 15 minut, 12000×g, w temperaturze 4°C i górną fazę (wodną ok. 0,7 ml), zawierającą całkowity RNA, przenoszono do nowych 1,5 ml probówek polietylenowych. W celu wytrącenia całkowitego RNA z roztworu, do zebranej fazy wodnej dodawano 0,7 ml izopropanolu schłodzonego do temperatury -20°C. Próby mieszano przez kilkakrotne odwracanie i wirowano 15 minut, 12000×g, w temperaturze 4°C w celu osadzenia wytrąconego całkowitego RNA. Po zakończeniu wirowania supernatant usuwano, a osad zawierający całkowity RNA płukano 1 ml 75% etanolu w wodzie dejonizowanej traktowanej DEPC. Całkowity RNA osadzano ponownie przez wirowanie 15 minut, 12000×g, w temperaturze 4°C. Po wirowaniu supernatant dokładnie usuwano, a osad zawierający całkowity RNA suszono pod komorą laminarną przez 20–30 minut. Do uzyskanego osadu podawano 20 µl wody dejonizowanej traktowanej DEPC i próbkę inkubowano 10 minut w temperaturze 60°C. Po rozpuszczeniu uzyskany całkowity RNA przechowywano w temperaturze -80°C.

Spektrofotometryczny pomiar stężenia RNA oraz elektroforeza RNA w żelu agarozowym. Zawartość i stopień zanieczyszczenia całkowitego RNA w próbce zmierzono spektrofotometrycznie przy trzech długościach fali: $\lambda=230\text{nm}$, 260 nm i 280 nm. Do pomiaru całkowitej ilości RNA wykorzystano spektrofotometr NanoDrop 1000, Eppendorf AG (Niemcy). 2µl próby DNA nakładano na dolną soczewkę spektrofotometru i wykonywano pomiar wobec próby zerowej (H₂O-DEPC). Odczytywano stężenie badanej próby oraz wartość współczynnika A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230} . Do dalszej analizy wybierano próby,

których wartości współczynnika A_{260}/A_{280} wynosiły 2,0 (brak lub niska zawartość białek w preparacie) oraz 2,2 dla współczynnika A_{260}/A_{230} (brak zanieczyszczenia preparatu etanolem).

Elektroforeza w 1,0% żelu agarozowym w buforze $1\times$ TBE posłużyła do oceny jakości uzyskanego całkowitego RNA. W tym celu, 1 μ g RNA mieszano z buforem obciążającym i наносono na żel zawierający bromek etydyny. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przez 45 minut przy napięciu 5 V/cm. Pążki RNA uwidoczniano w świetle UV z wykorzystaniem systemu dokumentacji żeli MiniBis Pro, DNR Bio-Imaging Systems (Izrael).

3.5.4. Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT-PCR) i ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR)

RT-PCR. Reakcję odwrotnej transkrypcji przygotowywano w komorze z laminarnym przepływem powietrza. Do syntezy cDNA na matrycy całkowitego RNA wykorzystano komercyjny zestaw firmy Invitrogen (Grand Island, NY). Reakcję odwrotnej transkrypcji podzielono na dwa etapy. Pierwszy etap miał na celu związanie starterów (mieszanina 0,5 μ l oligonukleotydów poli-dT₍₂₃₎ i 0,5 μ l sześci nukleotydowych starterów losowych) do matrycy mRNA w obecności deoksynukleotydów (4 μ l 2,5 mM dNTP). Powyższą próbkę inkubowano w temperaturze 65°C. Inkubacja ta powoduje zniesienie struktur drugorzędowych w cząsteczce mRNA, przez co sekwencja mRNA staje się dostępna dla starterów poli-dT₍₂₃₎ i sześci nukleotydowych starterów losowych. Szybkie schłodzenie próbki do 4°C umożliwia trwałe, specyficzne związanie starterów z sekwencją mRNA. W drugim etapie, do mRNA związanego ze starterem dodawano enzym – odwrotną transkryptazę (0,5 μ l; 200U/ μ l M-MLV) wraz z inhibitorem RNaz (0,25 μ l; 40 U/ μ l RNaseOUT) w obecności buforu do odwrotnej transkrypcji (4 μ l) i 0.1M DTT (2 μ l). Przygotowaną mieszaninę reakcyjną, o objętości końcowej 20 μ l, inkubowano najpierw przez 10 minut w 25°C, a następnie przez godzinę w 37°C w celu przepisania sekwencji mRNA na cDNA. W ostatnim etapie odwrotną transkryptazę inaktywowano przez 15 minutową inkubację w 75°C. Uzyskany w ten sposób cDNA przechowywano w -20°C do dalszej analizy - ilościowej łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym.

qPCR. Reakcję qPCR przygotowano w komorze z laminarnym przepływem powietrza. Wykorzystując reakcję qPCR określono względną ilość transkryptów badanych genów w tkankach nowotworowych i histopatologicznie niezmiennych oraz ustalonych

liniach komórkowych raka jelita grubego (HCT116, DLD-1) na matrycy cDNA uzyskanej w reakcji odwrotnej transkrypcji. Metoda oznaczenia względnej ilości transkryptu wyraża poziom mRNA w próbach badanych jako wielokrotność jej ilości w próbie referencyjnej. Próbami referencyjnymi dla prób pochodzących od pacjentów był kalibrator (mieszanina cDNA pochodzącego z każdej z tkanek nowotworowych jak i histopatologicznie niezmiennych), a w liniach komórkowych próby nie traktowane 5-dAzaC. Porównanie prób poprzedza normalizacja poziomu mRNA. Powszechnie uznaną metodą normalizacji jest odniesienie poziomu mRNA genu badanego do genu referencyjnego. Gen referencyjny charakteryzuje się stałą wartością ekspresji na poziomie mRNA, niezależnie od warunków doświadczenia czy stanu fizjologicznego tkanki. Na podstawie metaanalizy danych literaturowych wybrano grupę czterech genów referencyjnych dla raka jelita grubego: deaminazę profobilinogenu (ang. *porphobilinogen deaminase*, *PBGD*), mitochondrialne białko rybosomalne L19 (ang. *human mitochondrial ribosomal protein L19*, *hMRPL19*), izomerazę peptydylo-prolinową A (ang. *peptidylprolyl isomerase A*- *PPIA*) oraz fosforybozylotransferazę hipoksantynową (ang. *hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*, *HPRT*). Do wytypowania najbardziej stabilnych genów referencyjnych wykorzystano algorytm statystyczny geNorm [90]. Na jego podstawie do dalszych analiz wybrano *PBGD* i *hMRPL*.

Dla prawidłowej interpretacji wyników, dla każdego genu ustalono krzywą standardową. Krzywa standardowa umożliwia precyzyjne oznaczenie wydajności przeprowadzonej reakcji. Wydajność ta liczona jest ze wzoru $E=(10^{-1/\text{slope}}-1)*100\%$, gdzie E oznacza wydajność amplifikacji, natomiast "slope" określa stopień nachylenia krzywej wzorcowej względem osi x. Uzyskanie maksymalnej wydajności prowadzonej reakcji jest niezwykle istotne, ponieważ prawidłowa interpretacja uzyskanych wyników możliwa jest jedynie przy uzyskaniu wydajności amplifikacji w przedziale 90%–100%. Do przygotowania krzywej standardowej wykorzystano mieszaninę matryc cDNA prób pacjentów lub linii komórkowych. Następnie przygotowano serię pięciu rozcieńczeń mieszaniny cDNA otrzymując końcowe rozcieńczenia 1,000; 0,500; 0,250; 0,125; 0,0625 i 0,03125.

Reakcje qPCR przeprowadzano z wykorzystaniem aparatu Light Cycler®480 Real-Time PCR System, Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Niemcy) oraz komercyjnego zestawu IQ Sybr Green Supermix, Bio-Rad (Hercules, CA), w którym barwnikiem fluorescencyjnym podlegającym detekcji jest Sybr Green. Sekwencje badanych genów

(*PHD1*, *PHD2*, *PHD3*, *FIH*, *HIF1 α* , *HIF2 α* , *PBGD*, *hMRPL*) uzyskano w bazie danych Ensembl (www.ensembl.org). Startery były projektowane z użyciem programu AllelID 7.0, PREMIER Biosoft Int. (Palo Alto, CA). Aby zapobiec amplifikacji sekwencji z możliwych genomowych zanieczyszczeń DNA, startery i/lub produkty PCR zostały zaprojektowane na granicy eksonów. Sekwencję oligonukleotydów wykorzystanych w reakcji qPCR przedstawia Tabela 3. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil termiczny reakcji podano poniżej.

2× stężony IQ Sybr Green Mix	5,0 μ l	Wstępna denaturacja	95°C/5 minut
Starter przedni [5 lub 10 μ M]	0,5 μ l	Denaturacja	95°C/5-10 sek*
Starter wsteczny [5 lub 10 μ M]	0,5 μ l	Przyłączanie starterów	58-60°C*/5-10 sek*
Matryca cDNA	1,0 μ l	wydłużanie produktu	72°C/5-10sek*
H ₂ O dejonizowana	3,0 μ l	PCR	
	<u>10 μl</u>		

*temperatura i/lub czas zmienny
w zależności od zastosowanej pary starterów

Specyficzność reakcji qPCR była oceniana przez obserwacje krzywej temperatury topnienia produktu PCR (obserwacja „piku” obrazującej wartość ujemną z pierwszej pochodnej krzywej topnienia w trakcie spadku fluorescencji) oraz techniki elektroforezy w 2,5% żelu agarozowym w buforze 1× TBE.

Tabela 3. Sekwencje oligonukleotydów użytych w reakcji qPCR

Gen	Sekwencja (5'-3')	Pozycja na chromosomie wg. UCSC (GRCh37/hg19)	Długość produktu (pz)
<i>PHD1</i>	F: TATGCCACCAGGTACGCCATC R: AGGAGCAGCCAGCACAGG	chr19: 41 313 169-41 313 844	210
<i>PHD2</i>	F: GGACGACCTGATACG R: ACTTACCTTGGCATCC	chr1: 231 506424-231 556 792	190
<i>PHD3</i>	F: CCTCTTACGCAACCAGATATG R: AGCACGGTCAGTCTTCAG	chr14: 34 395 090-34 398 297	129
<i>FIH</i>	F: ACAGTGCCAGCACCCACAA R: GCCCACAGTGTCATTGAGCG	chr10:102 296 208-102 300 427	188
<i>HIF-1α</i>	F: TTCACCTGAGCCTAATAG R: AATCTGTGTCCTGAGTAG	chr14: 62 205 082-62 207 482	143
<i>HIF-2α</i>	F: CTGCTCCACGCCCAATAG R: GTGCCAGTGTCTCCAAGTC	chr2: 46 605 217- 46 607 402	158
<i>PBDG</i>	F: GCCAAGGACCAGGACATC R: TCAGGTACAGTTGCCCATC	chr11:118 468 348-118 468 864	160
<i>hMRPL19</i>	F: ACTTTATAATCCTCGGGTC R: ACTTTCAGCTCATTAACAG	chr2:75 735 389- 75 735 705	171

F: starter przedni (ang. *forward*)

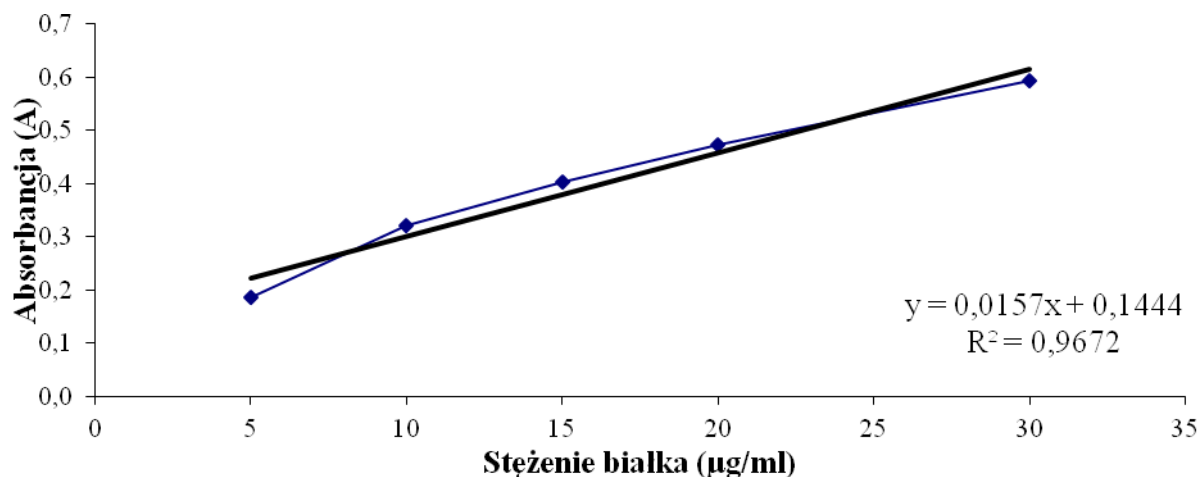
R: starter wsteczny (ang. *reverse*)

3.5.5. Izolacja, oznaczanie stężenia i wykrywanie białek

Izolacja białek. Białko izolowano z tkanki nowotworowej, histopatologicznie niezmienionej oraz osadu linii komórkowej zebranych po zakończeniu eksperymentu. 20 mg tkanki homogenizowanej w ciekłym azocie lub osadu komórkowego przenoszono do 1,5 ml probówki polietylenowej zawierającej 50 μ l buforu RIPA zawierającego 10% roztwór inhibitorów proteaz. Próby inkubowano przez 1 godzinę w lodzie a następnie wirowano przez 10 minut, 10000 \times g w temperaturze 4°C w celu osadzenia resztek komórek nie ulegających lizie w buforze RIPA. Po wirowaniu lizat przenoszono do nowej 1,5 ml probówki polietylenowej schłodzonej w lodzie. Do pomiaru stężenia białka użyto 5 μ l uzyskanego lizatu białkowego, a pozostałą część zamrożono w -80°C do analizy western blot.

Oznaczenie stężenia białka. Stężenie białka w uzyskanym lizacie oznaczono komercyjnym zestawem do oznaczania stężenia białek – Bio-Rad Protein Assay; odczynnik Bradforda (OB). Zestaw ten jest oparty na metodzie opracowanej przez Mariona M. Bradforda [91]. Metoda ta wykorzystuje zmianę absorbancji światła barwnika Commasie Blue G-250, który w środowisku kwaśnym ma zabarwienie czerwone (maksimum absorbancji 465 nm). Po związaniu z resztami aminokwasowymi, głównie zasadowymi i aromatycznymi, zawartymi w badanej próbce barwnik zmienia zabarwienie na niebieskie (maksimum absorbancji 595 nm) [91].

Przed pomiarem stężenia białek izolowanych buforem RIPA, w pierwszej kolejności należało przygotować krzywą standardową. Do przygotowania krzywej użyto standardu białkowego, który stanowiła albumina wołowa (ang. *bovine serum albumin*, BSA) o stężeniu wyjściowym 1 mg/ml. W celu przygotowania krzywej standardowej do 1,5 ml probówek polietylenowych podano roztwór BSA, którego stężenie końcowe w poszczególnych punktach krzywej standardowej wynosiło: 2,5, 5, 10, 15, 20, i 30 μ g/ml. Do każdej probówki podawano 5 μ l odpowiedniego stężenia BSA, 495 μ l wody dejonizowanej oraz 500 μ l roztworu roboczego OB. Próbę odniesienia stanowiła mieszanina 495 μ l wody, 5 μ l buforu RIPA i 500 μ l roztworu roboczego OB. Pomiar absorbancji prowadzono przy $\lambda=595$ nm przy użyciu spektrofotometru BioPhotometer, Eppendorf AG (Niemcy). Uzyskane dane posłużyły do przygotowania krzywej wzorcowej, przedstawionej na Rycinie 5.



Rycina 5. Krzywa wzorcowa BSA. Do każdej probówki podawano 5 µl odpowiedniego stężenia BSA (2,5; 5, 10; 15; 20 i 30 µg/ml), 495 µl wody dejonizowanej oraz 500 µl roztworu roboczego OB. Próbe odniesienia stanowiła mieszanina 495 µl wody, 5 µl buforu RIPA i 500 µl roztworu roboczego OB. Pomiar absorbancji prowadzono przy $\lambda=595$ nm przy użyciu spektrofotometru BioPhotometer, Eppendorf AG (Niemcy).

Przygotowana krzywa wzorcowa wykorzystana została do oznaczenia stężenia białek izolowanych z tkanek i linii komórkowych. W celu pomiaru stężenia białka w lizacie do 1,5 ml probówki polietylenowej dodano 495 µl wody, 5 µl lizatu białkowego w buforze RIPA oraz 500 µl roztworu roboczego OB. Przygotowanie próby odniesienia, inkubacja oraz pomiar prób badanych wykonano analogicznie jak przy wyznaczaniu krzywej standardowej.

Rozdział elektroforetyczny białek w żelu poliakryloamidowym w obecności SDS (ang. polyacrylamide gel electrophoresis in SDS, SDS-PAGE) i wykrywanie białek. Do 1,5 ml probówek polietylenowych podano po 30 µg białka wyizolowanego z pacjentów lub linii komórkowych (3-10 µl w zależności od stężenia), 6 µl buforu denaturującego i uzupełniano wodą do końcowej objętości 18 µl. Przygotowane próby inkubowano w termobloku, w temperaturze 99°C przez 10 minut, następnie schładzano w lodzie przez 5 minut i wirowano przez 30 sekund. Dodatkową próbę stanowił marker masy białka w objętości 5 µl. Tak przygotowane próby nałożono na 10% żel poliakrylamidowy zawierający SDS i poddawano rozdzielaniu elektroforetycznemu. Elektroforezę przeprowadzano w aparacie Mini Protean, Bio-Rad (Hercules, CA), w 1× stężonym buforze glicynowym schłodzonym przez noc do temperatury 4°C. Podczas całej elektroforezy stosowano napięcie: 80 V podczas zagęszczania białka w żelu zagęszczającym i 120 V przy rozdzielaniu białek w żelu rozdzielającym. Rozdział prowadzono przez około 1,5 godziny do momentu gdy niebieski barwnik będący składnikiem buforu denaturującego doszedł do dolnej granicy żelu. Następnie białka zawarte w żelu poliakryloamidowym przenoszono na membranę nitrocelulozową

o wielkości porów 0,45 μm przy użyciu aparatu do transferu półsuchego Yrdimes, Wealtec (Sparks, NV). Elektrotransfer prowadzono w $1\times$ stężonym buforze do transferu przez 1,5 godziny przy stabilizacji natężeniem 350 mA w temperaturze pokojowej. Po zakończonym elektrotransferze membranę nitrocelulozową barwiono przez 3 minuty w temperaturze pokojowej buforem Ponceau S w celu uwidocznienia poszczególnych frakcji białek i oceny wydajności elektrotransferu. Po wybarwieniu białek, membranę przemywano trzykrotnie wodą dejonizowaną i umieszczano w 50 ml probówce polipropylenowej, do której podawano 15 ml buforu blokującego $1\times$ TBST-B. Probówkę z membraną umieszczano w mieszadle orbitalnym i inkubowano przez godzinę w temperaturze pokojowej. W kolejnym etapie przygotowywano przeciwciała I-rzędowe, Novus Biologicals (Cambridge, Wielka Brytania), w buforze $1\times$ TBST-M zgodnie z opisem przedstawionym w Tabeli 4.

Tabela 4. Przeciwciała użyte do detekcji białek w technice Western blot.

Charakterystyka przeciwciał			
Przeciwciało	Pochodzenie/Stężenie	Masa cząst. białka	
PHD1 I-rzędowe	rabbit polyclonal IgG (1,00 mg/ml)	43 kDa	
PHD2 I-rzędowe	rabbit polyclonal IgG (1,00 mg/ml)	46 kDa	
PHD3 I-rzędowe	rabbit polyclonal IgG (1,00 mg/ml)	27 kDa	
FIH I-rzędowe	rabbit polyclonal IgG (1,00 mg/ml)	40 kDa	
HIF-1 α I-rzędowe	rabbit polyclonal IgG (1,00 mg/ml)	92 kDa	
HIF-2 α I-rzędowe	rabbit polyclonal IgG (1,00 mg/ml)	118 kDa	
GAPDH	goat polyclonal IgG-HRP (200 $\mu\text{g/ml}$)	36 kDa	
II-rzędowe	goat anty-rabbit IgG-HRP (400 $\mu\text{g/ml}$)	–	
Rozcieńczenia			
Białko badane	Ilość Ab I-rzędowego (rozcieńczenie)	Ilość Ab II-rzędowego (rozcieńczenie)	Ilość buforu $1\times$ TBST-M
PHD1	1:500	1:5000	10 ml
PHD2	1:500	1:10000	10 ml
PHD3	1:500	1:5000	10 ml
FIH	1:1000	1:10000	10 ml
HIF-1 α	1:500	1:5000	10 ml
HIF-2 α	1:500	1:10000	10 ml
GAPDH	1:3000	–	10 ml

50 ml probówkę polipropylenową wraz z membraną oraz odpowiednio rozcieńczonymi przeciwciałami I-rzędowymi umieszczano w mieszadle orbitalnym i inkubowano przez noc w temperaturze 4°C. Po upływie tego czasu membranę przemywano buforem 1×TBST, a następnie umieszczano w nowej 50 ml probówce polipropylenowej, zawierającej przeciwciało II-rzędowe w odpowiednim stężeniu sprzężone z peroksydazą chrzanową (ang. *horseradish peroxidase*, HRP) (Tabela 4) i inkubowano przez 1 godzinę na mieszadle orbitalnym w temperaturze pokojowej. Następnie odpłukano buforem 1×TBST niezwiązane z membraną przeciwciało II-rzędowe. Kolejno podano 1 ml mieszaniny substratu dla HRP, SuperSignal West Femto Substrate, ThermoScientific Inc. (Waltham, MA). W celu detekcji sygnału, całość umieszczono w aparacie do detekcji chemiluminescencji Biospectrum® Imaging System 500, UVP (Upland, CA). Do analizy gęstości optycznej (OD) uzyskanych wyników wykorzystano program ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Odmywanie przeciwciał z membrany nitrocelulozowej. Ze względu na zbliżoną masę cząsteczkową niektórych białek, po detekcji sygnału membrana nitrocelulozowa była używana powtórnie w celu zidentyfikowania kolejnego białka. Przed rozpoczęciem analizy kolejnego białka należało odmyć przeciwciało związane z wcześniej analizowanym białkiem. Wszystkie płukania wykonywano z wykorzystaniem mieszadła orbitalnego. W celu odmycia przeciwciał, membranę płukano kilkakrotnie w buforze 1×TBST i kwaśnym buforze do odmywania przeciwciał. Tak przygotowaną membranę inkubowano z buforem 1×TBST-B przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, a następnie przeprowadzono procedurę inkubacji z kolejnym przeciwciałem I i II-rzędowym jak opisano powyżej.

3.5.6. Izolacja genomowego DNA z tkanek i linii komórkowych oraz reakcja deaminacji DNA

Izolacja genomowego DNA z tkanek i linii komórkowych. Genomowy DNA izolowano wykorzystując komercyjny zestaw firmy Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO) w oparciu o metodę kolumienkową. Metoda kolumienkowa bazuje na zjawisku łączenia się DNA ze złożem krzemionkowym (membraną silikonową). Procedura izolacji obejmuje następujące etapy: lizę komórek, precypitację białek, związanie DNA ze złożem krzemionkowym, przemywanie oraz elucję DNA z membrany. Izolację przeprowadzano w 1,5 ml probówkach polietylenowych w temperaturze pokojowej zgodnie z opisem producenta zestawu. Wykonując pomiar spektrofotometryczny określono stężenie

elucyjnego. Całość wirowano 1 minutę przy 14000 RPM uzyskując deaminowany DNA w supernatancie.

3.5.7. PCR deaminowanego DNA, przygotowanie produktu PCR do sekwencjonowania.

PCR deaminowanego DNA. W celu określenia wstępnego stopnia metylacji DNA badanych genów, przeprowadzono sekwencjonowanie namnożonych produktów PCR deaminowanego DNA dla losowo wybranych pacjentów. Reakcje PCR przygotowano w komorze z laminarnym przepływem powietrza w 0,2 ml probówkach. Reakcje przeprowadzono z wykorzystaniem aparatu PTC-200 firmy MJ Research oraz komercyjnego zestawu FastStart Taq DNA Polymerase, Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Niemcy). Sekwencje regionów promotorowych genów *PHD1*, *PHD2*, *PHD3*, *FIH*, *HIF-1 α* i *HIF-2 α* oraz występowanie wysp CpG uzyskano z bazy danych www.ucsc.edu. Dodatkowo do oceny wysp CpG użyto dwóch niezależnych programów komputerowych: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/> oraz <http://bio.dfci.harvard.edu/Methylator/>. Ponadto sekwencje były poddane analizie z użyciem programu RepeatMasker na obecność powtórzeń tandemowych. Analiza wykazała obecność wysp CpG w sekwencjach promotorowych badanych genów. Na podstawie uzyskanych danych o obecności wysp CpG zaprojektowano startery z użyciem programu MethylPrimer Express, Applied Biosystems (Grand Island, NY). Sekwencje starterów przedstawiono w Tabeli 5. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil termiczny reakcji podano poniżej.

10 \times stężony bufor do reakcji	1,5 μ l	Wstępna denaturacja	95°C/5 minut
MgCl ₂ [25 mM]	2,4 μ l	Denaturacja	95°C/35 sek
dNTPs [2,5 mM]	1,2 μ l	Przyłączanie starterów	56-60°C*/35sek
Starter przedni [10 μ M]	0,6 μ l	wydłużanie produktu	72°C/45-60sek*
Starter wsteczny [10 μ M]	0,6 μ l	PCR	
Matryca DNA deaminowany	1,0 μ l	Końcowe wydłużanie	72°C/7 minut
Polimeraza FastStart Taq [5 U/ μ l]	0,2 μ l	*temperatura i/lub czas zmienny w zależności od zastosowanej pary starterów	
H ₂ O dejonizowana	7,5 μ l		
	15 μ l		

Tabela 5. Sekwencje oligonukleotydów użytych w reakcji PCR deaminowanego DNA

Nazwa starterów	Sekwencja (5'-3')	Pozycja na chromosomie wg. UCSC (GRCh37/hg19)	Długość produktu (pz)
PHD1S	F: TATGAATTTTGTGTGTGTTTGA R: TATGAATTTTGTGTGTGTTTGA	chr19: 41 304 043-41 304 698	656
PHD2S1	F: TGGAGGAAGAGTAGTTATG R: ATAACAACCTAAACTCAAAC	chr1: 231 557 896-231 558 421	526
PHD2S2	F: GTTTGAGTTTAGGTTGTTATT R: AATACTAATATAAACCCTC	chr1:231 557 412-231 557 915	504
PHD3S1	F: AGTGTGGGATTTAGGTTTTTAAGT R: ATCCAACCTCATAATATATCCCA	chr14:34 419 929-34 420 563	635
PHD3S2	F: ATTATGAGGTTGGATTTGGAGA R: ATCACCCACAAAACCAATATT	chr14: 34 419 346-34 419 943	598
FIHS1	F: TGAATTTGTTTTTTTTTTTGA R: ACCAAAAACCACAACCTC	chr10: 102 295 385–102 299 751	367
HIF-1 α S1	F: TGATGTATGTTTGGGATTAGG R: AACCTCTCCTCAAATAACTTA	chr14: 62 161 804-62 162 333	530
HIF-1 α S2	F: TTTGAGGGGATAGGAGGATTATTT R: ACTCAAAACCCCAAATCCACTA	chr14: 62 162 250-62 163 074	825
HIF-2 α S1	F: GGTTAGGGTTAGGGTAGAGGTT R: AAAAAACCCAAATTCCTTTTT	chr2: 46 524 336-46 524 767	432

HIF-2 α S2	F: AGGAATTTGGGTTTTTTTTTTT R: AACTCCRAAAACCTCTCAAC	chr2: 46 524 751-46 525 189	439
HIF-2 α S3	F: AGTGAGGGAGTTTTGAGATTG R: AACACAAAAATCCAAACAAATC	chr2: 46 526 521- 46 527 161	641

F: starter przedni (ang. *forward*)

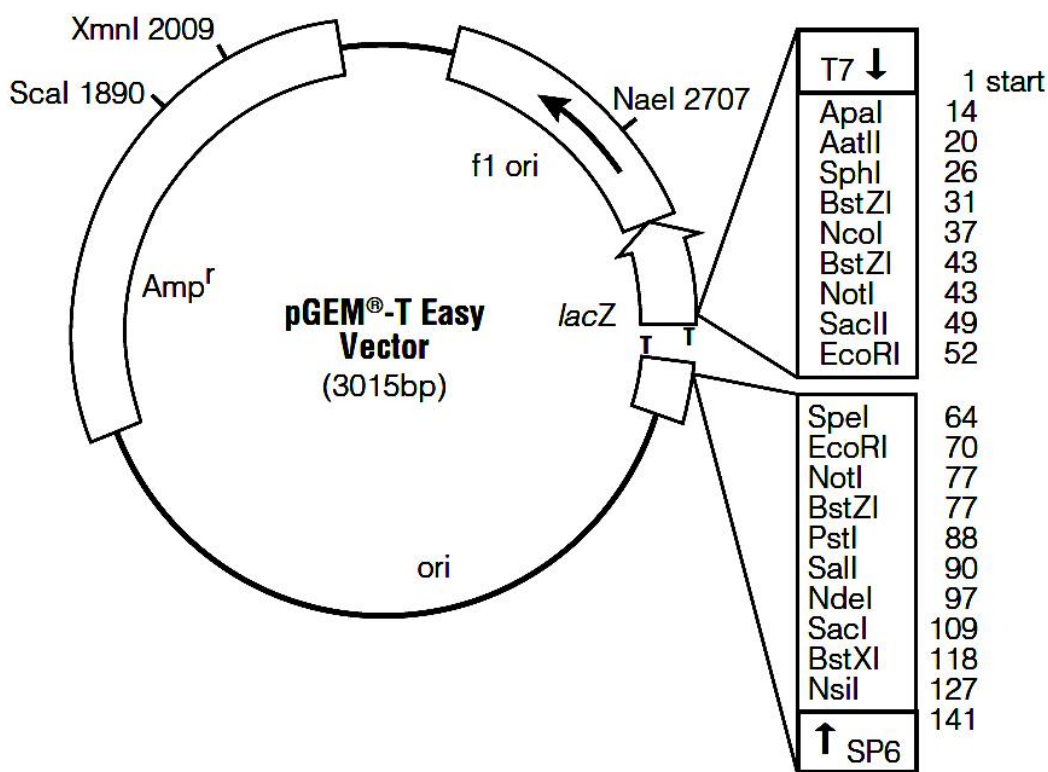
R: starter wsteczny (ang. *reverse*)

Elucja produktów PCR z żelu agarozowego. Po zakończonej reakcji PCR, próbki (15 μ l) mieszano z buforem obciążającym (3 μ l) i nanoszono na żel agarozowy zawierający bromek etydyny. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przy napięciu 5 V/cm przez 40 minut. Produkty PCR uwidaczniano z wykorzystaniem lampy UV niskiej mocy, co zapobiega tworzeniu się dimerów tymidyny w łańcuchu DNA. Produkty PCR o właściwej długości wycinano z żelu za pomocą skalpela, a następnie kawałki wyciętego żelu umieszczano w 1,5 ml probówkach polietylenowych w celu elucji produktów PCR z agarozy.

Produkty PCR rozdzielone elektroforetycznie w żelu agarozowym eluowano wykorzystując komercyjny zestaw do izolacji DNA z żeli agarozowych, Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Niemcy). Elucję przeprowadzono w 1,5 ml probówkach polietylenowych zgodnie z opisem producenta zestawu. Do próbki zawierającej fragment żelu z produktem PCR podawano 300 μ l buforu do rozpuszczania żelu oraz 10 μ l zawiesiny kuleczek krzemionkowych. Próby inkubowano 10 minut w temperaturze 60°C i wirowano przez 30 sekund przy 14000 RPM. Następnie odrzucono supernatant, a do osadu kuleczek krzemionkowych dodawano 500 μ l buforu wiążącego kwasy nukleinowe. Próby wirowano jak wyżej, supernatant odrzucano, a osad kuleczek przemywano dwukrotnie 500 μ l buforu przemywającego. Po ostatnim przemyciu i wirowaniu supernatant dokładnie usunięto, a kuleczki krzemionkowe suszono 10 minut w temperaturze pokojowej w otwartych probówkach. Następnie kuleczki zawieszono w 20 μ l wody dejonizowanej i inkubowano 15 minut w temperaturze 60°C. Próby wirowano przez 1 minutę przy 14000 RPM, a supernatant zawierający eluowany produkt PCR przeniesiono do nowej 1,5 ml próbki polietylenowej. Wykonano pomiar spektrofotometryczny i określono stężenie izolowanego produktu PCR w analogiczny sposób jak to opisano w punkcie 3.5.3, a następnie wykorzystano go w reakcji ligacji z plazmidem pGEM-T Easy.

Ligacja produktów PCR z plazmidem pGEM-T Easy. Ligację produktów PCR z plazmidem przygotowano w komorze z laminarnym przepływem powietrza w 0,2 ml probówkach do reakcji PCR. W reakcji tej wykorzystano komercyjny zestaw pGEM-T Easy Vector System, Promega (Sunnyvale, CA). System ten wykorzystuje plazmid o długości 3015 pz, w którym miejsce wprowadzenia insertu znajduje się w obrębie genu *lacZ* kodującego podjednostkę α enzymu β -galaktozydazy (Rycina 7). Selekcję klonów zawierających właściwy insert przeprowadza się na podłożu zawierającym antybiotyk – ampicylinę oraz X-Gal. Bakterie, które pobrały „pusty” plazmid (bez insertu) mają zdolność rozkładu substratu (X-Gal) dodanego do podłoża, powodując tym samym niebieskie zabarwienie

kolonii. Pobranie przez bakterie plazmidu rekombinowanego zawierającego powoduje utratę zdolności rozkładu X-Gal, przez co kolonie zabarwione są na biało.



Rycina 7. Mapa plazmidu pGEM-T Easy (www.promega.com).

Plazmid pGEM-T Easy posiada wolne nukleotydy tymidynowe w miejscu wprowadzenia insertu (Rycina 7). Umożliwia to połączenie go na zasadzie komplementarności z wolnymi nukleotydami adeninowymi występującymi na końcach produktów PCR (insert). Polimeraza DNA wykorzystywana w reakcji PCR dodaje na końcach amplifikowanego fragmentu kilka nukleotydów adeninowych, które wykorzystuje się do ligacji z miejscem wprowadzenia insertu w plazmidzie pGEM-T Easy. Aby uzyskać maksymalną wydajność ligacji plazmidu z insertem należało eksperymentalnie ustalić stosunek molowy insertu do plazmidu (wektora). Maksymalną wydajność reakcji uzyskano dla stosunku molowego insert:wektor wynoszącego 3:1.

Oczyszczone produkty PCR rozcieńczono aby uzyskać stężenie odpowiednie dla reakcji ligacji. Skład mieszaniny ligacyjnej podano poniżej.

	Produkt PCR	Kontrola pozytywna	Kontrola negatywna
2× stężony bufor ligacyjny	5 µl	5 µl	5 µl
Plazmid pGEM-T Easy [50 ng/µl]	1 µl	1 µl	1 µl
Produkt PCR	1 µl	–	–
Kontrolny DNA [4 ng/µl]	–	2 µl	–
T4 DNA ligaza [3 U/µl]	1 µl	1 µl	1 µl
H ₂ O dejonizowana	2 µl	1 µl	3 µl
	10 µl	10 µl	10 µl

Reakcję ligacji prowadzono przez noc w 4°C. Następnie produkt ligacji użyto do transformacji komórek kompetentnych *Escherichia coli* szczep TOP10.

Przygotowanie komórek kompetentnych *E. coli* szczep TOP10. Komórki kompetentne przygotowano w komorze do pracy z bakteriami oraz wykorzystując wytrząsarkę do hodowli bakteryjnych. Do jałowej, szklanej kolby stożkowej o pojemności 200 ml podano 50 ml płynnej pożywki LB (35 g LB/litr wody dejonizowanej) oraz za pomocą jałowej, plastikowej pipety Pasteura podano szczep bakterii *E. coli* TOP10 przechowywany wcześniej w 16% glicerolu w -80°C. Tak przygotowaną zaszczepkę bakteryjną inkubowano w wytrząsarce do hodowli bakteryjnych przy 180 RPM w temperaturze 37°C. W czasie inkubacji co 20 minut pobierano 1 ml zawiesiny bakterii w celu pomiaru gęstości optycznej (ang. *optical density*, OD). Hodowlę zakończono w momencie uzyskania gęstości optycznej w przedziale 0,4-0,5 (faza logarytmiczna wzrostu bakterii) przez przelanie zawiesiny bakteryjnej do schłodzonej w lodzie 50 ml probówki polipropylenowej. Po 10 minutowej inkubacji w lodzie próby wirowano przez 10 minut przy 4000 RPM w temperaturze 4°C, supernatant odrzucano, a uzyskany osad bakteryjny zawieszano w 20 ml buforu Tbf1 schłodzonego do temperatury 4°C. Następnie zawiesinę inkubowano przez 5 minut w lodzie, wirowano jak wyżej, odrzucano supernatant, a osad bakterii zawieszano w 2 ml buforu Tbf2 o temperaturze 4°C. Po 10 minutowej inkubacji w lodzie zawiesinę bakterii porcjowano po 50 µl do jałowych 1.5 ml probówek polietylenowych i zamrażano w ciekłym azocie. Przygotowane bakterie kompetentne *E. coli*, szczep TOP10 przechowywano w temperaturze -80°C do momentu transformacji plazmidem pGEM-T Easy.

Transformacja komórek kompetentnych *E. coli* szczep TOP10 plazmidem pGEM-T Easy. Transformację komórek kompetentnych przeprowadzono w komorze do pracy z bakteriami z wykorzystaniem termobloku. Przygotowane komórki kompetentne w 1,5 ml probówkach polietylenowych przeniesiono z zamrażarki niskotemperaturowej do lodu. Probówki inkubowano w lodzie przez 15 minut, a następnie do zawiesiny komórek kompetentnych podano 5 μ l mieszaniny ligacyjnej. Całość delikatnie mieszano i inkubowano w lodzie przez 30 minut, po czym probówki umieszczono na 60 sekund w termobloku w temperaturze 42°C, w celu wywołania szoku termicznego. Dokładnie po 60 sekundach probówki ponownie umieszczono na 2 minuty w lodzie, a następnie do każdej próby dodano 200 μ l płynnej pożywki LB o temperaturze pokojowej bez ampicyliny. Zawiesinę komórek bakteryjnych wytrząsano przez 1 godzinę w temperaturze 37°C przy 600 RPM. Po zakończeniu inkubacji całość zawiesiny przeniesiono na jałowe płytki Petriego zawierające stałe podłoże LB-agar z ampicyliną oraz rozprowadzonymi uprzednio na powierzchni 100 μ l IPTG o stężeniu 100 μ M oraz 10 μ l X-Gal o stężeniu 50 mg/ml w celu selekcji bakterii, które pobrały plazmid zawierający insert. Płytki inkubowano w cieplarni przez noc w temperaturze 37°C.

Selekcja klonów. Na płytkach bakteryjnych oszacowano liczbę białych kolonii bakteryjnych zawierających plazmid pGEM-T Easy z insertem. Z każdej płytki wytypowano po 5 białych kolonii bakteryjnych do szybkiej izolacji plazmidu w celu potwierdzenia obecności insertu reakcją PCR. Szybką izolację plazmidu przeprowadzono z wykorzystaniem 0,1% roztworu detergentu NP-40. Uzyskany supernatant zawierający plazmid użyto do reakcji PCR.

Reakcje PCR przygotowano w komorze z laminarnym przepływem powietrza w 0,2 ml probówkach do reakcji PCR, z wykorzystaniem termocyklera PTC-200 oraz komercyjnego zestawu Dream Taq DNA Polymerase, ThermoScientific Inc. (Waltham, MA). W reakcji PCR wykorzystano startery M13F: 5' CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC 3' oraz M13R: 5' TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C 3'. Startery te były również wykorzystywane w reakcji sekwencjonowania plazmidu z insertem. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil termiczny reakcji podano poniżej.

10×stężony bufor do reakcji	1,3 µl	Wstępna denaturacja	95°C/5 minut
dNTPs [2,5 mM]	1,0 µl	Denaturacja	95°C/30 sek
Starter M13F [10 µM]	0,5 µl	Przyłączanie starterów	55°C/30sek
Starter M13R [10 µM]	0,5 µl	wydłużanie produktu PCR	72°C/40 sek
Plazmid z insertem	2,5 µl	Końcowe wydłużanie	72°C/5 minut
Polimeraza DreamTaq [5 U/µl]	0,2 µl		
H ₂ O dejonizowana	7,0 µl		
	13 µl		

Na podstawie przeprowadzonej reakcji PCR i rozdziłu elektroforetycznego produktów wyselekcjonowano klony bakterii *E. coli* szczep TOP10, które zawierały plazmid pGEM-T Easy z insertem o odpowiedniej długości. Klony te zostały wykorzystane do namnożenia i izolacji plazmidów w celu przeprowadzenia reakcji sekwencjonowania.

Hodowla kolonii bakteryjnych zawierających prawidłowy insert oraz izolacja plazmidowego DNA. Do 15 ml probówek polipropylenowych podano 3 ml jałowej, płynnej pożywki LB oraz 3 µl ampicyliny o stężeniu 100 mg/ml. Do tak przygotowanych probówek przeniesiono jałowym tipsem wyselekcjonowane kolonie bakteryjne zawierające plazmid z insertem odpowiedniej długości. Kontrolę negatywną stanowiła płynna pożywka LB bez dodatku antybiotyku, do której nie podano żadnej kolonii bakteryjnej. Hodowlę prowadzono przez noc z użyciem wytrząsarki do hodowli bakteryjnych przy 180 RPM w temperaturze 37°C. Następnego dnia z uzyskanej zawiesiny bakteryjnej izolowano plazmidowy DNA z wykorzystaniem komercyjnego zestawu do izolacji plazmidów PureYield Plasmid Miniprep System, Promega (Sunnyvale, CA). Izolację plazmidu przeprowadzono w 1,5 ml probówkach polietylenowych. Zawiesinę bakteryjną z całonocnej hodowli wirowano przez 10 minut przy maksymalnej prędkości. Supernatant zlano, a osad bakterii zawieszono w 600 µl wody dejonizowanej. Następnie podano 100 µl buforu lizującego, a po lizie do całości mieszaniny podano 350 µl roztworu neutralizującego, schłodzonego do 4°C. Mieszano przez odwracanie i wirowano przy maksymalnej prędkości przez 3 minuty w temperaturze pokojowej. Uzyskany supernatant (ok. 900 µl) przeniesiono na kolumnę wiążącą plazmid. Kolumnę wirowano przez 15 sekund przy maksymalnej prędkości, przemyto 200 µl roztworu usuwającego endotoksynę, ponownie wirowano i przemyto 400 µl roztworu płuczającego. Po ostatnim przemyciu kolumnę przeniesiono do nowej 1,5 ml probówki polietylenowej podając na środek złoża 30 µl buforu elucyjnego. Probówkę inkubowano 1 minutę w temperaturze pokojowej, po czym wirowano przez 15 sekund przy maksymalnej prędkości.

Uzyskany supernatant zawierał plazmid pGEM-T Easy z wklonowanym insertem. Plazmid ten został wykorzystany do reakcji sekwencjonowania przeprowadzonej w Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Otrzymane wyniki sekwencjonowania zostały przeanalizowane z użyciem programu BiQ Analyser [92], a następnie umieszczone na serwerze Bisulfite sequencing Data Presentation and Compilation (BDPC) [93] w celu prezentacji danych w sekcji wynikowej.

3.5.8. Wysokorozdzielcza analiza temperatur topnienia produktów PCR deaminowanego DNA - analiza HRM (ang. *high resolution melting*)

Poziom metylacji DNA w obrębie regionów promotorowych genów *PHD1*, *PHD2*, *PHD3*, *FIH*, *HIF-1α* i *HIF-2α* dla wszystkich prób pacjentów oraz linii komórkowych HCT116 i DLD-1 określono z użyciem wysokorozdzielczej analizy temperatur topnienia (ang. *high resolution melting analysis*, analiza HRM). Produkty PCR deaminowanego DNA różnią się zawartością cytozyn. Produkt PCR zametylowany posiada cytozyny, które nie uległy konwersji w trakcie reakcji deaminacji. Z kolei produkt PCR niezametylowany w miejscu cytozyn po konwersji posiada uracyl, który w trakcie reakcji PCR jest zastępowany tyminą. Obserwacja różnic temperatur topnienia pomiędzy produktami pozwala na bardzo dokładne określenie stopnia metylacji badanej próby DNA.

Próby amplifikowano w reakcji Real Time PCR z użyciem aparatu Light Cycler®480 Real-Time PCR System, Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Niemcy) oraz komercyjnego zestawu Hot FIREPol EvaGreen HRM Mix, Solis BioDyne Co. (Tartu, Estonia), w którym barwnikiem fluorescencyjnym podlegającym detekcji jest EvaGreen. Startery były projektowane z użyciem programu MethylPrimer Express, Applied Biosystems (Grand Island, NY). Wysoka rozdzielczość analizy HRM jest uzyskiwana przy długości produktów PCR do 250 par zasad. Z tego powodu każda z wysp CpG była analizowana jedną do trzech par starterów w zależności od możliwości amplifikacji produktu w obrębie regionów promotorowych badanych genów. Sekwencję oligonukleotydów wykorzystanych w reakcji do analiz HRM przedstawia Tabela 6. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil termiczny reakcji podano poniżej.

Matrycami w reakcji było deaminowane DNA prób pacjentów, pochodzące z linii komórkowych HCT116 i DLD-1 oraz wzorców metylacji DNA. Wzorce DNA o różnej procentowości metylacji otrzymano poprzez zmieszanie wzorca całkowicie zametylowanego i całkowicie odmetrylowanego w różnych proporcjach. Reakcje prowadzono w warunkach

umożliwiających detekcję 1% metylacji. W celu określenia zawartości procentowej metylacji, profil HRM prób badanych był porównywany z profilem otrzymanym dla wzorców [94, 95]. Analiza profilu metylacji była wykonana w programie Light Cycler®480 Gene Scanning software, Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Niemcy). Powszechnie przyjmuje się, że niski procent metylacji DNA nie wykazuje znaczącego efektu biologicznego, dlatego dla analiz statystycznych wyniki procentowe dla pacjentów zostały podzielone na trzy grupy: 0-1% metylacji, 1-10% metylacji, 10-100% metylacji [96-98].

Hot FIREPol EvaGreen HRM Mix	2.0 μ l	Wstępna denaturacja	95°C/15 minut
Starter przedni [10 μ M]	0.2 μ l	Denaturacja	95°C/10-20 sek*
Starter wsteczny [10 μ M]	0.2 μ l	Przyłączanie starterów	56-60°C*/10-20sek*
Matryca deaminowanego DNA	1.0 μ l	wydłużanie produktu PCR	72°C/10-20 sek*
H ₂ O dejonizowana	6.6 μ l	Analiza temp. topnienia	65-95°C /odczyt fluorescencji co 0.01°C
	<u>10 μl</u>		

*temperatura i/lub czas zmienny w zależności od zastosowanej pary starterów

Tabela 6. Sekwencje oligonukleotydów użytych w analizie HRM.

Nazwa starterów	Sekwencja (5'-3')	Pozycja na chromosomie wg. UCSC (GRCh37/hg19)	Długość produktu (pz)
PHD1.1	F: GTGTGGTTATGAATTTTGTGTG R: CTACACCAATCCCCTACAAAC	chr19: 41 304 036-41 304 177	142
PHD1.2	F: CGGGTAGGTTTGTTTATGTAAA R: ACACGAAATTCATTTACATCCT	chr19: 41 304 758-41 304 922	165
PHD2.1	F: GGGAGTTTGATTTTTGGATTTAGT R: AATCATAACTACTCTTCCTCCAAACC	chr1: 231 558 400 – 231 558 576	177
PHD2.2	F: TTAGCGTTAGGATTGGAAGAAG R: ACCTTCCTAAACTCCCGAAC	chr1: 231 557 348- 231 557 497	150
PHD2.3	F:GGGGTTCGGGAGTTTAGGAAGGTAG R: CCGAAAACCTAACCTTTACTTTTCCCTAAC	chr1:231 557 283-231 557 370	88
PHD3.1	F: CGTGGTAGTCGTAGGTTTTTG R: TCTCAAATCCAACCTCATAAT	ch14: 34 419 922-34 420 080	159
PHD3.2	F: GTTGGATTTGGAGAAAATTG R: ACCCCGATACAATACTACTAC	ch14: 34 419 795-34 419 935	141
PHD3.3	F: TTGTATGTCGATTTTTTAGGGT R: ACCTAAACCCCTAACGTTAAC	chr14: 34 419 400 -34 419 538	139
FIH.1	F: TTGGGTGTGTGGTTTTTTTG R: CGAAACTCTCAAACCAAAAACC	chr10: 102 295 626- 102 295 765	140

HIF-1 α .1	F: AGATTAAAGGAAGGGTTTGTTGTTA R: AAATATGATGTATGTTTGGGATTAGGT	ch14: 62 161 655-62 161 825	171
HIF-1 α .2	F: GTTGGGTTTTGATAAGTTATTTGAG R: AAAACAAATCCAAAAATAAAAATAC	chr14: 62 162 301-62 162 427	127
HIF-2 α .1	F: TTTGAGATTGTATGGTTAGT R: GAAAAAGGAATTTGGGTTTTTTTT	chr2: 46 524 636-46 524 769	134
HIF-2 α .2	F: GAGCGGACGAGGGTTATA R: TTTTCTTCTCCTTATCAACTATCATT	chr2: 46 524 969-46 525 075	107
HIF-2 α .3	F: ATGTTTATCGGGAATGTGGTA R: CCTACTCCCAAATTTCTCGATA	chr2: 46 526 762-46 526 905	144

Forward: starter przedni (ang. *forward*)

Reverse: starter wsteczny (ang. *reverse*)

3.5.9. Obliczenia statystyczne

Obliczenia statystyczne wykonano w programie Statistica 10PL firmy Stat-Soft Inc. Weryfikacja rozkładu normalnego dla pacjentów została przeprowadzona z użyciem testu Shapiro-Wilka. W zależności od otrzymanego wyniku stosowano parametryczny, obustronny test t-studenta lub test nieparametryczny, U-Manna-Whitney'a. W tabelach zostały podane mediany oraz wartości najmniejsza i największa. Dla wykazania istotności różnic w poziomie metylacji zastosowano test Chi-kwadrat. Z kolei, by wykazać zależność pomiędzy różnymi zakresami metylacji (0-1%, 1-10% i 10-100% metylacji), a współczynnikiem ekspresji genu na poziomie mRNA w tkance nowotworowej w porównaniu z tkanką histopatologicznie niezmienną zastosowano test Kruskala-Wallisa.

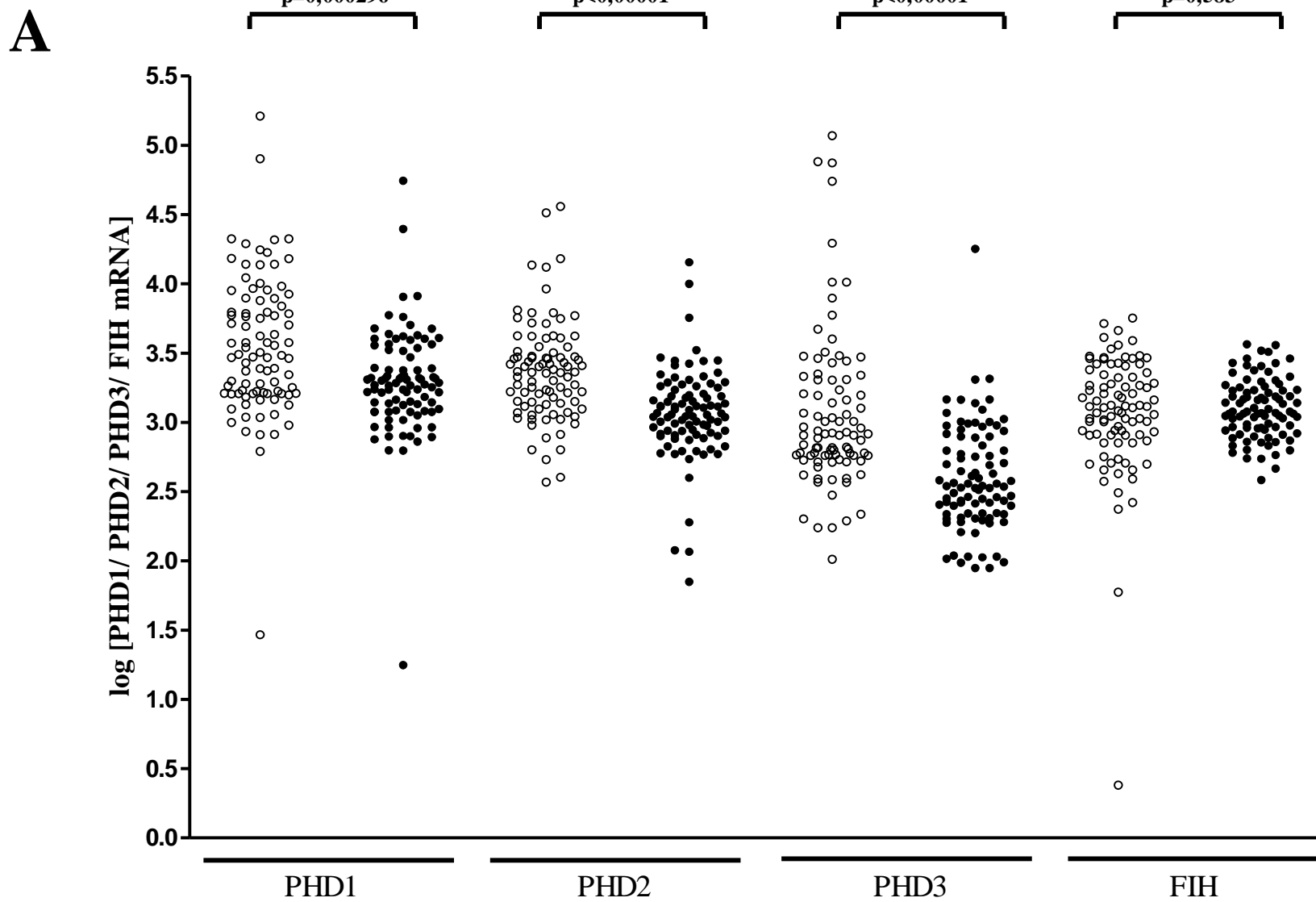
Istotność statystyczna dla wyników otrzymanych dla linii komórkowych była ewaluowana testem ANOVA. Dla wszystkich grup, które spełniały wstępne kryteria zastosowano test post-hoc Tukey'a przy założeniach rozkładu obustronnego.

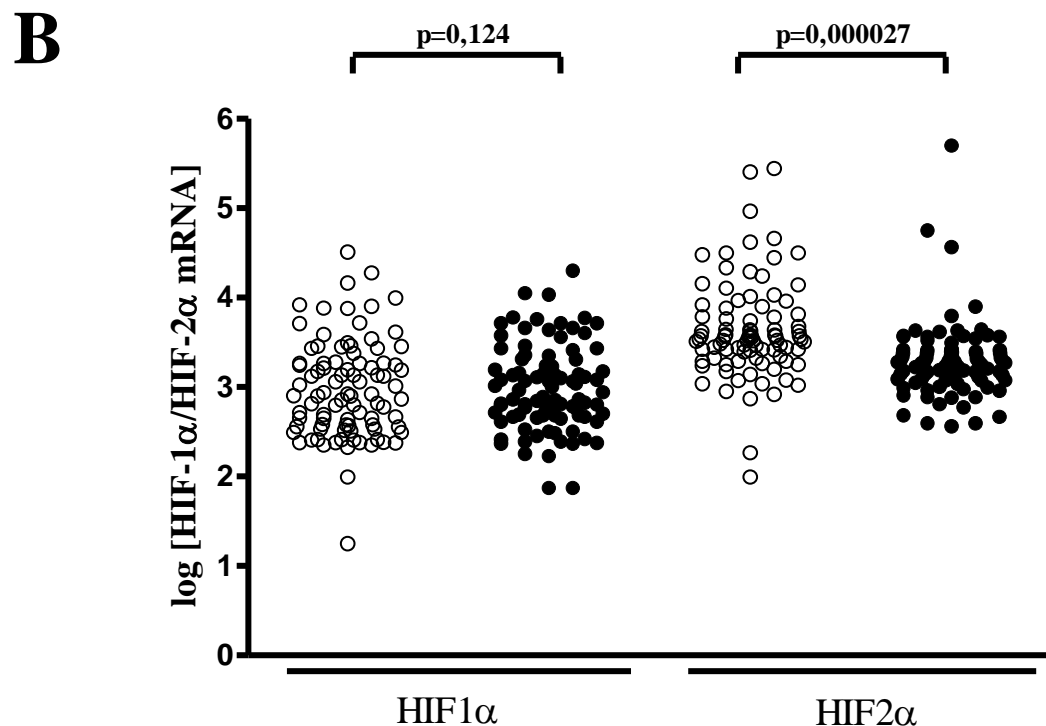
Wszystkie wykazane różnice i wyznaczone współczynniki korelacji przyjęto za statystycznie istotne przy poziomie istotności $P \leq 0.05$. Oznaczenia: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

4. WYNIKI

4.1. Poziom transkryptu oraz białka dla genów PHD1, PHD2, PHD3, FIH, HIF-1 α i HIF-2 α w pierwotnej tkance nowotworowej i histopatologicznie niezmięnionej jelita grubego u chorych z CRC

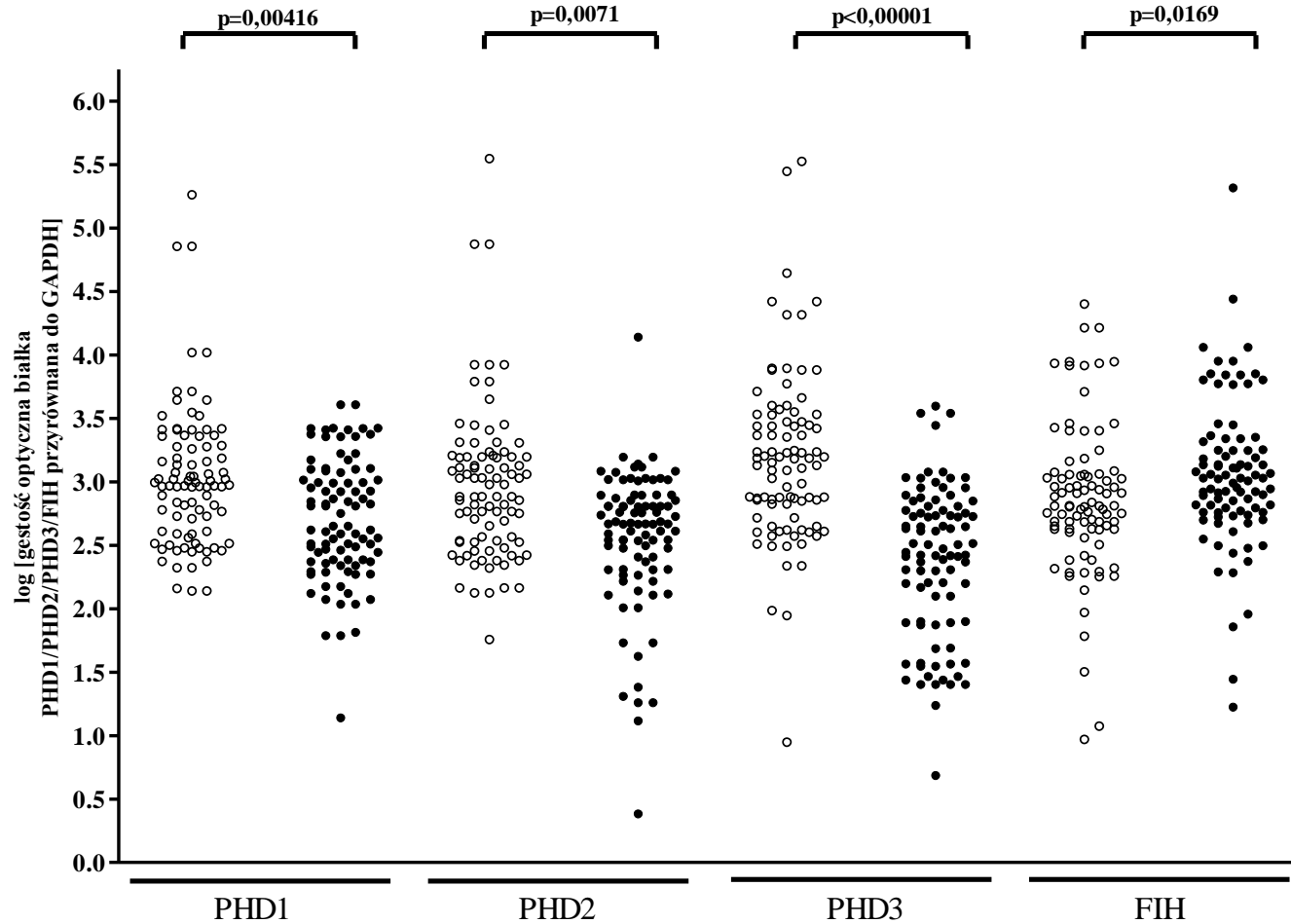
W celu określenia poziomu transkryptu i białka genów *PHD1*, *PHD2*, *PHD3*, *FIH*, *HIF-1 α* i *HIF-2 α* w tkance pierwotnej nowotworowej i histopatologicznie niezmięnionej pobranej od dziewięćdziesięciu pacjentów z rakiem jelita grubego użyto qPCR i techniki western blot (opis metod w rozdziale 3.5.4, 3.5.5.) . Wykazano istotny statystycznie obniżony poziom transkryptu ($p = 0,000296$, $p < 0,00001$, $p < 0,00001$) i białka ($p = 0,00416$, $p = 0,0071$, $p < 0,00001$) PHD1, PHD2 i PHD3 w pierwotnej tkance nowotworowej w porównaniu z tkanką histopatologicznie niezmięną (Rycina 8A, Rycina 9, Rycina 10). Stwierdzono również obniżony poziom transkryptu HIF-2 α w pierwotnej tkance nowotworowej w porównaniu z tkanką histopatologicznie niezmięną ($p=0,000027$) oraz nie wykryto obecności białka HIF-2 α w badanym materiale klinicznym (Rycina 8B). Ponadto, zaobserwowano istotny statystycznie niższy poziom transkryptu i białka PHD1, PHD2, PHD3 i HIF-2 α w tkance nowotworowej w różnych grupach wiekowych, płciach, lokalizacji anatomicznej guza, stopniach złośliwości histologicznej (G2 i G3), poziomach skali Dukesa (Tabela 7). W przeciwieństwie do opisanych powyżej wyników, nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy w poziomie transkryptu FIH i HIF-1 α pomiędzy tkanką pierwotną nowotworową w porównaniu z tkanką histopatologicznie niezmięną ($p = 0,583$, $p=0,124$) oraz nie wykryto z zastosowaniem techniki western blot białka HIF-1 α w materiale klinicznym (Rycina 8A, 8B). Jednakże, zaobserwowano istotny statystycznie wyższy poziom białka FIH w pierwotnej tkance nowotworowej w porównaniu z tkanką histopatologicznie niezmięną ($p=0,0169$) (Rycina 9, Rycina 10). Zauważono również istotny statystycznie wyższy poziom białka FIH w tkance nowotworowej w grupie mężczyzn ($p = 0,021$), u pacjentów w wieku powyżej 60 r.ż. ($p = 0,0257$), z nowotworem zlokalizowanym w odbytnicy ($p = 0,031$) i drugim stopniem złośliwości histologicznej (G2) ($p = 0,0226$) (Tabela 7).





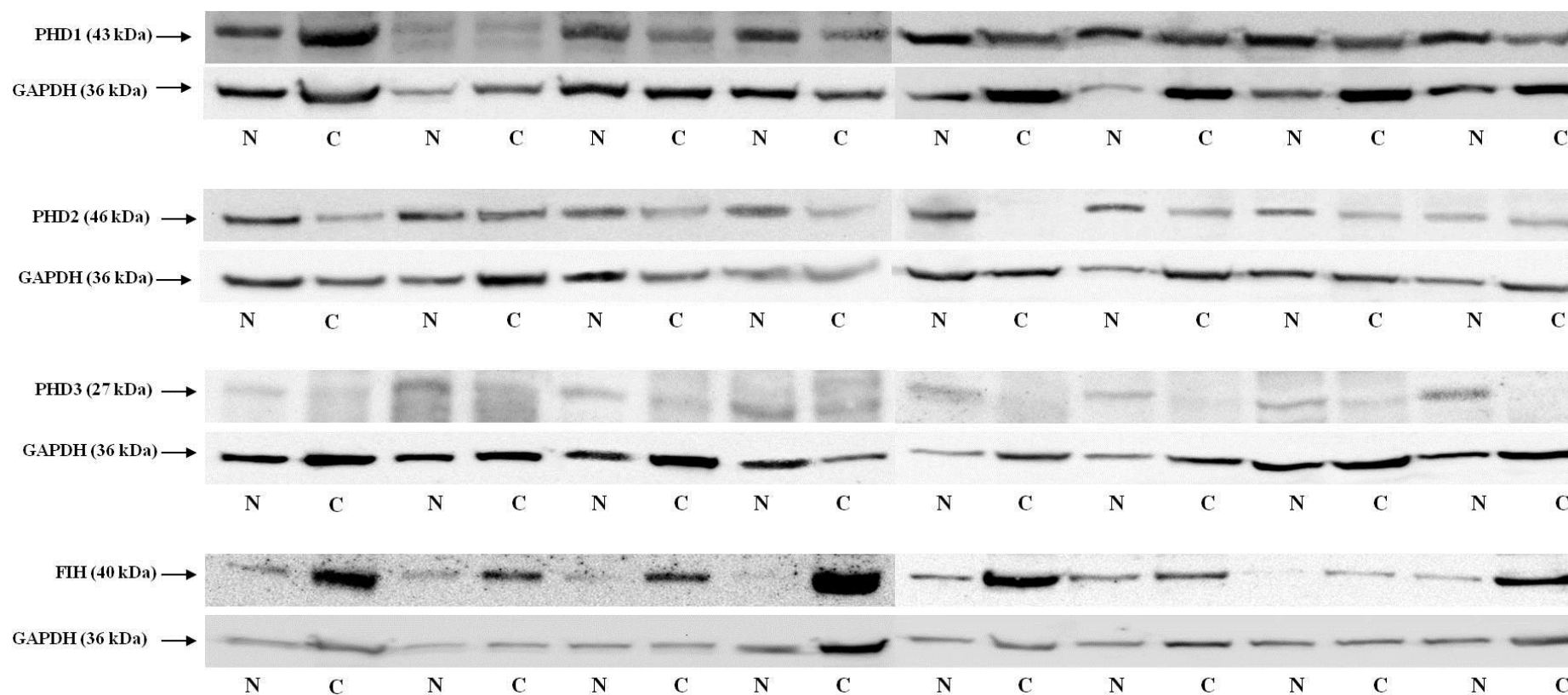
Rycina 8. Ilość transkryptu PHD1, PHD2, PHD3 i FIH (A) i HIF1α, HIF2α (B) w pierwotnej tkance nowotworowej i histopatologicznie niezmięnionej jelita grubego pobranych od pacjentów z CRC.

Pierwotną tkankę nowotworową (●) i histopatologicznie niezmięnionej jelita grubego (○) pobraną od dziewięćdziesięciu pacjentów z CRC użyto do izolacji RNA. Całkowity RNA poddano reakcji odwrotnej transkrypcji i względną ilość kopii cDNA oznaczono za pomocą qPCR. Ilość mRNA badanych genów standaryzowano względem poziomu średniej geometrycznej transkryptów PBGD i hMRPL19. Ilości PHD1, PHD2, PHD3, FIH, HIF1α, HIF2α mRNA przedstawiono jako logarytm dziesiętny wielokrotności tych kopii cDNA w kalibratorze. Wartość p oceniono za pomocą obustronnego testu t-studenta dla zmiennych niepowiązanych lub nieparametrycznego testu U-Manna-Whitneya.



Rycina 9. Ilość białka PHD1, PHD2, PHD3 i FIH w pierwotnej tkance nowotworowej i histopatologicznie niezmienionej jelita grubego pobranych od pacjentów zCRC.

Pierwotną tkankę nowotworową (●) i histopatologicznie niezmienioną jelita grubego (○) pobraną od dziewięćdziesięciu pacjentów z CRC użyto do izolacji białka. Białka rozdzielono w 10% SDS-PAGE i przeniesiono na membranę nitrocelulozową, która została następnie poddana analizie western blot. Ilości białek PHD1, PHD2, PHD3 i FIH przedstawiono jako logarytm dziesiętny z ich gęstości optycznej w stosunku do gęstości optycznej GAPDH. Wartość p oceniono za pomocą obustronnego testu t-studenta dla zmiennych niepowiązanych lub nieparametrycznego testu U-Manna-Whitneya.



Rycina 10. Przykładowy wynik analizy western blot dla tkanki histopatologicznie niezmiętej (N) i pierwotnej tkanki nowotworowej (C) u pacjentów z CRC. Białka rozdzielono w 10% SDS-PAGE i przeniesiono na membranę nitrocelulozową, która została następnie poddana analizie western blot. Membrany były inkubowane z anty-króliczymi przeciwciałami I rzędowymi -PHD1, -PHD2, -PHD3 i -FIH, Novus Biologicals (Cambridge, Wielka Brytania), a następnie z kozim anty-króliczym przeciwciałem II rzędowym sprzężonym z HRP, Santa Cruz (Dallas, TX). Kolejno podano 1 ml mieszaniny substratu dla HRP, SuperSignal West Femto Substrate, ThermoScientific Inc. (Waltham, MA). W celu detekcji sygnału, całość umieszczono w aparacie do detekcji chemiluminescencji Biospectrum® Imaging System 500, UVP (Upland, CA).

Tabela 7, Ilość transkryptu i białka PHD1(A), PHD2 (B), PHD3 (C), FIH (D) i transkryptu HIF-1 α (E), HIF-2 α (F) w pierwotnej tkance nowotworowej i histopatologicznie niezmięnionej jelita grubego pobranych od pacjentów z CRC z uwzględnieniem charakterystyki klinicznej.

A

PHD1		pierwotna tkanka nowotworowa	tkanka histopatologicznie niezmięciona	p
		mediana (zakres)	mediana (zakres)	
	transkrypt	3,278 (1,240-7,738)	3,515 (1,459-5,204)	0,000296
	białko	2,612 (1,132-3,560)	2,968 (2,132-5,256)	0,00416
Wiek (Lata)				
<60	transkrypt	3,264 (2,854-4,738)	3,394 (2,784-5,204)	0,0387
	białko	2,549 (1,805-3,414)	3,000 (2,579-3,512)	0,0576
>60	transkrypt	3,303 (1,240-3,904)	3,758 (1,459-4,896)	0,00428
	białko	2,612 (1,132-3,560)	2,962 (2,132-5,256)	0,0279
Płeć				
Kobieta	transkrypt	3,303 (1,241-3,904)	3,758 (1,459-4,896)	0,00189
	białko	2,707 (1,779-3,414)	3,000 (2,132-5,256)	0,0227
Mężczyzna	transkrypt	3,264 (2,854-4,738)	3,394 (2,784-5,204)	0,0387
	białko	2,503 (1,132-3,560)	2,919 (2,152-4,011)	0,063
Lokalizacja				
okreznica proksymalna	transkrypt	3,246 (2,790-3,899)	3,351 (2,905-4,318)	0,176
	białko	2,838 (1,780-3,560)	3,139 (2,132-5,256)	0,0137
okreznica dystalna	transkrypt	3,151 (2,854-3,669)	3,506 (2,784-4,328)	0,00548
	białko	2,480 (2,167-2,549)	2,896 (2,470-3,001)	0,0374
Odbytница	transkrypt	3,344 (1,240-4,388)	3,549 (1,459-5,204)	0,0641
	białko	2,563 (1,132-3,414)	2,846 (2,152-3,704)	0,0991
Stopień złośliwości histologicznej				
G1	transkrypt	3,176 (3,157-3,266)	3,533 (3,122-4,318)	0,513
	białko	2,207 (2,065-2,350)	2,462 (2,152-2,772)	0,438
G2	transkrypt	3,278 (1,240-4,388)	3,462 (1,459-5,204)	0,0141
	białko	2,549 (1,132-3,413)	2,999 (2,316-4,848)	0,0105
G3	transkrypt	3,307 (2,854-3,754)	3,568 (3,029-4,896)	0,0136
	białko	2,612 (2,623-3,414)	2,885 (2,132-5,256)	0,521
Skala Dukesa				
A	transkrypt	3,276 (3,157-3,669)	3,872 (3,218-4,318)	0,0476
	białko	2,543 (2,480-2,817)	2,470 (2,316-4,848)	0,513
B	transkrypt	3,305 (2,790-4,388)	3,487 (2,905-4,318)	0,213
	białko	2,549 (1,132-3,216)	3,000 (2,442-3,358)	0,0649
C	transkrypt	3,344 (1,240-3,899)	3,691 (1,459-5,204)	0,0115
	białko	2,744 (2,112-3,414)	2,954 (2,132-5,256)	0,0932
Stadium nowotworu				
T1	transkrypt	3,279 (3,157-3,462)	3,872 (3,364-4,318)	0,127
	białko	2,412 (1,921-2,498)	2,951 (0,939-3,020)	0,517
T2	transkrypt	3,508 (3,231-3,697)	3,567 (3,216-4,238)	0,655
	białko	2,836 (2,480-2,982)	2,986 (2,470-4,848)	0,174
T3	transkrypt	3,303 (1,240-4,388)	3,564 (1,459-5,204)	0,00747
	białko	2,600 (1,132-3,414)	2,968 (2,132-5,256)	0,0588
T4	transkrypt	3,326 (3,124-3,767)	3,644 (3,176-4,218)	0,337
	białko	2,437 (2,280-2,986)	2,951 (2,582-3,064)	0,275

B

PHD2		pierwotna tkanka nowotworowa	tkanka histopatologicznie niezmieniona	p
		mediana (zakres)	mediana (zakres)	
	transkrypt	3,069 (1,842-4,147)	3,355 (2,561-4,552)	p<0,00001
	białko	2,661 (0,374-4,132)	2,876 (1,749-5,545)	0,00710
Wiek (Lata)				
	<60			
	transkrypt	3,070 (2,727-3,460)	3,361 (3,012-3,784)	0,0243
	białko	2,605 (0,374-3,188)	3,032 (2,337-4,867)	0,000573
	>60			
	transkrypt	3,058 (1,842-4,174)	3,354 (2,561-4,552)	0,000005
	białko	2,660 (0,374-3,189)	2,813 (1,749-4,867)	0,0230
Płeć				
	Kobieta			
	transkrypt	3,042 (2,591-3,460)	3,438 (2,561-4,552)	0,000028
	białko	2,660 (1,616-3,077)	3,079 (2,157-5,545)	0,050
	Mężczyzna			
	transkrypt	3,088 (1,842-4,174)	3,264 (2,595-4,505)	0,00254
	białko	2,606 (0,374-3,188)	3,022 (2,337-4,867)	0,000573
Lokalizacja				
	okreźnica proksymalna			
	transkrypt	3,035 (2,058-3,747)	3,360 (2,724-4,552)	0,00611
	białko	2,534 (0,374-2,730)	2,721 (2,157-3,439)	0,0364
	okreźnica dystalna			
	transkrypt	2,974 (2,727-3,515)	3,413 (2,561-4,129)	0,00345
	białko	2,846 (2,469-3,188)	3,227 (3,044-3,783)	0,0281
	Odbytnica			
	transkrypt	3,108 (1,842-4,147)	3,237 (2,596-4,506)	0,00217
	białko	2,678 (1,109-4,132)	3,051 (1,749-5,545)	0,0188
Stopień złośliwości histologicznej				
	G1			
	transkrypt	2,862 (2,770-3,198)	3,447 (2,973-4,129)	0,0833
	białko	2,000 (0,374-2,900)	2,700 (2,400-2,800)	0,0615
	G2			
	transkrypt	3,054 (1,842-4,147)	3,230 (2,561-4,552)	0,00128
	białko	2,669 (1,108-4,132)	2,876 (2,116-5,545)	0,0415
	G3			
	transkrypt	3,105 (2,591-3,515)	3,414 (3,049-4,113)	0,000389
	białko	2,574 (1,251-3,188)	3,104 (1,749-4,867)	0,0576
Skala Dukesa				
	A			
	transkrypt	3,172 (2,905-3,515)	3,794 (2,982-4,552)	0,0587
	białko	2,100 (0,374- 2,300)	2,701 (2,402- 2,803)	0,169
	B			
	transkrypt	3,105 (2,727-4,147)	3,319 (2,561-3,741)	0,0707
	białko	2,673 (2,209-3,188)	2,831 (2,157-3,915)	0,773
	C			
	transkrypt	3,069 (1,842-3,439)	3,385 (2,796-4,506)	0,000327
	białko	2,661 (1,108-4,132)	3,094 (1,749-5,545)	0,00634
Stadium nowotworu				
	T1			
	transkrypt	3,172 (2,905-3,404)	3,492 (2,982-4,129)	0,248
	białko	2,229 (0,374-2,568)	2,458 (1,749-2,786)	0,462
	T2			
	transkrypt	3,181 (3,009-3,515)	3,414 (3,122-4,552)	0,0639
	białko	2,568 (2,229-4,132)	2,749 (2,458-2,786)	0,628
	T3			
	transkrypt	3,036 (2,271-4,147)	3,348 (2,561-4,505)	0,000147
	białko	2,667 (1,107-3,414)	3,065 (2,157-5,545)	0,0294
	T4			
	transkrypt	3,273 (1,842-3,435)	3,411 (2,880-3,764)	0,0782
	białko	2,751 (1,616-3,011)	3,099 (2,685-3,120)	0,275

C

PHD3		pierwotna tkanka nowotworowa	tkanka histopatologicznie niezmienniona	p
		mediana (zakres)	mediana (zakres)	
	transkrypt	2,562 (1,941-4,245)	2,910 (2,005-5,062)	p<0,00001
	białko	2,481(0,677-3,590)	3,175 (0,939-5,518)	p<0,00001
Wiek (Lata)				
	<60			
	transkrypt	2,634 (2,018-3,085)	3,378 (2,561-4,734)	0,00791
	białko	2,505 (1,229-3,069)	3,227 (2,885-3,564)	0,00601
	>60			
	transkrypt	2,534 (1,941-4,245)	2,901 (2,005-5,062)	0,000016
	białko	2,464 (0,677-3,590)	3,121 (0,939-5,518)	0,00001
Płeć				
	Kobieta			
	transkrypt	2,617 (2,008-3,085)	2,931 (2,005-5,062)	0,000189
	białko	2,481 (1,229-3,590)	3,210 (0,939-4,638)	0,000665
	Mężczyzna			
	transkrypt	2,531 (1,941-4,245)	2,909 (2,233-4,734)	0,000832
	białko	2,507 (0,677-3,533)	2,986 (2,484-5,518)	0,00027
Lokalizacja				
	okreznica proksymalna			
	transkrypt	2,556 (2,267-3,301)	2,794 (2,005-5,062)	0,00536
	białko	2,756 (1,395-3,590)	3,358 (1,978-4,638)	0,00172
	okreznica dystalna			
	transkrypt	2,699 (2,023-3,156)	2,960 (2,329-3,665)	0,0378
	białko	2,360 (1,538-2,604)	2,777 (0,939-5,518)	0,0543
	Odbytnica			
	transkrypt	2,540 (1,941-4,245)	2,900 (2,233-4,866)	0,000481
	białko	2,434 (0,677-3,025)	2,947 (2,484-5,439)	0,00002
Stopień złośliwości histologicznej				
	G1			
	transkrypt	2,121 (1,941-4,245)	3,061 (2,233-3,890)	0,438
	białko	2,398 (2,299-2,497)	2,030 (0,939-3,121)	0,99
	G2			
	transkrypt	2,531 (2,008-4,245)	2,900 (2,005-4,875)	0,000004
	białko	2,415 (0,677-3,590)	3,137 (1,978-4,638)	0,000009
	G3			
	transkrypt	2,716 (1,984-3,158)	2,994 (2,283-5,062)	0,0267
	białko	2,604 (1,229-3,021)	3,227 (2,501-5,518)	0,00124
Skala Dukesa				
	A			
	transkrypt	2,559 (2,008-3,308)	3,374 (2,794-4,866)	0,0374
	białko	2,454 (1,865-2,727)	2,796 (0,939-5,518)	0,149
	B			
	transkrypt	2,569 (2,193-3,156)	3,077 (2,005-3,741)	0,0018
	białko	2,415 (1,394-2,988)	3,292 (2,841-4,309)	0,000069
	C			
	transkrypt	2,662 (1,984-4,245)	2,898 (2,283-5,062)	0,00680
	białko	2,639 (0,677-3,590)	3,358 (2,484-5,439)	0,002
Stadium nowotworu				
	T1			
	transkrypt	3,108 (2,910-3,308)	3,247 (2,900-3,594)	0,99
	białko	2,410 (1,865-2,497)	2,951 (0,939-3,020)	0,517
	T2			
	transkrypt	2,605 (2,338-3,158)	2,865 (2,761-3,665)	0,0181
	białko	2,727 (2,604-2,945)	3,665 (2,564-5,518)	0,175
	T3			
	transkrypt	2,572 (1,984-4,245)	2,951 (2,005-5,662)	0,000221
	białko	2,464 (0,677-3,437)	3,212 (2,501-5,439)	0,000002
	T4			
	transkrypt	2,706 (2,453-3,060)	3,161 (2,760-3,455)	0,0374
	białko	2,506 (1,883-3,590)	3,617 (2,484-4,413)	0,149

D

FIH		pierwotna tkanka nowotworowa	tkanka histopatologicznie niezmienniona	p
		mediana (zakres)	mediana (zakres)	
	transkrypt	3,080 (2,576- 3,556)	3,131 (0,373-3,745)	0,583
	białko	2,965 (1,217-5,310)	2,785 (0,962-4,394)	0,0169
Wiek (Lata)				
	<60			
	transkrypt	3,154 (2,904-3,551)	3,265 (2,367-3,606)	0,885
	białko	2,989 (1,437-3,449)	2,889 (2,552-3,055)	0,248
	>60			
	transkrypt	3,071 (2,576-3,556)	3,108 (0,373-3,745)	0,596
	białko	2,947 (1,217-5,310)	2,776 (0,963-4,394)	0,0257
Płeć				
	Kobieta			
	transkrypt	3,161 (2,731-3,551)	3,233 (0,373-3,706)	0,411
	białko	2,927 (1,217-3,944)	2,803 (0,963-3,927)	0,267
	Mężczyzna			
	transkrypt	3,058 (2,576-3,556)	3,069 (2,367-3,745)	0,795
	białko	2,983 (1,949-5,310)	2,776 (1,066-4,394)	0,0210
Lokalizacja				
	Okreźnica proksymalna			
	transkrypt	3,111 (2,756-3,556)	3,222 (2,692-3,705)	0,291
	białko	2,811 (1,217-3,843)	2,743 (0,963-4,207)	0,435
	Okreźnica dystalna			
	transkrypt	3,040 (2,576-3,500)	3,243 (2,414-3,745)	0,327
	białko	3,100 (1,949-5,310)	2,905 (1,066-4,394)	0,375
	Odbytnica			
	transkrypt	3,128 (2,660-3,551)	3,063 (0,373-3,550)	0,117
	białko	3,036 (1,437-4,433)	2,798 (1,776-3,927)	0,031
Stopień złośliwości histologicznej				
	G1			
	transkrypt	3,108 (3,055-3,161)	2,889 (2,845-2,933)	0,0869
	białko	3,059 (2,787-3,332)	2,665 (2,313-3,018)	0,99
	G2			
	transkrypt	3,080 (2,576-3,511)	3,131 (1,768-3,706)	0,589
	białko	3,016 (1,217-5,310)	2,878 (0,963-4,394)	0,0226
	G3			
	transkrypt	3,169 (2,773-3,551)	3,169 (0,373-3,745)	0,213
	białko	2,741 (2,276-2,741)	2,710 (2,139-3,452)	0,520
Skala Dukesa				
	A			
	transkrypt	3,041 (2,660-3,500)	2,883 (1,768-3,745)	0,631
	białko	3,033 (2,844-3,836)	2,742 (1,066-3,025)	0,0832
	B			
	transkrypt	3,089 (2,576-3,403)	3,243 (2,692-3,523)	0,0522
	białko	2,916 (1,437-3,343)	2,745 (1,776-3,419)	0,213
	C			
	transkrypt	3,154 (2,756-3,551)	3,169 (0,373-3,706)	0,570
	białko	3,011 (1,217-4,433)	2,817 (2,139-3,702)	0,153
Stadium nowotworu				
	T1			
	transkrypt	3,230 (3,061-3,399)	3,109 (2,744-3,474)	0,99
	białko	2,930 (2,844-3,016)	2,045 (1,066-3,025)	0,99
	T2			
	transkrypt	3,206 (2,660-3,500)	3,169 (2,568-3,745)	0,749
	białko	3,022 (2,276-4,052)	2,675 (2,245-3,452)	0,465
	T3			
	transkrypt	3,131 (2,731-3,551)	3,147 (0,373-3,606)	0,967
	białko	2,947 (1,437-3,836)	2,802 (1,776-3,702)	0,0544
	T4			
	transkrypt	3,179 (2,576-3,511)	3,355 (3,244-3,700)	0,200
	białko	2,729 (1,217-4,443)	2,717 (2,411-2,954)	0,873

E

HIF1 α	pierwotna tkanka nowotworowa	tkanka histopatologicznie niezmienniona	p
	mediana (zakres)	mediana (zakres)	
	2,940 (1,855-4,288)	3,005 (1,234-4,496)	0,815
Wiek (Lata)			
<60	2,773 (1,885-4,288)	3,071 (2,365-4,263)	0,523
>60	2,973 (2,214-4,034)	3,005 (1,234-4,496)	0,920
Płeć			
Kobieta	2,841 (1,855-4,288)	3,113 (2,335-4,496)	0,205
Mężczyzna	3,009 (2,362-4,034)	2,871 (1,234-3,984)	0,334
Lokalizacja			
Okreźnica proksymalna	2,801 (2,214-3,701)	2,886 (2,335-3,984)	0,518
Okreźnica dystalna	2,931 (2,239-3,760)	3,159 (1,979-4,496)	0,324
Odbytnica	3,027 (1,885-4,034)	2,908 (1,234-4,263)	0,414
Stopień złośliwości histologicznej			
G1	3,095 (2,512-3,295)	3,709 (2,496-4,496)	0,257
G2	2,841 (1,855-4,034)	2,922 (1,234-3,906)	0,889
G3	3,052 (2,214-3,765)	2,804 (2,370-3,697)	0,524
Skala Dukeasa			
A	2,089 (2,759-4,034)	3,262 (2,368-4,496)	0,648
B	2,977 (2,239-4,012)	3,141 (2,312-4,263)	0,688
C	2,863 (2,512-3,295)	2,804 (2,370-3,697)	0,524
Stadium nowotworu			
T1	3,451 (3,049-4,034)	3,628 (2,368-4,496)	0,952
T2	2,802 (2,635-3,161)	2,981 (2,504-3,438)	0,631
T3	2,877 (1,855-4,288)	2,999 (1,234-4,269)	0,783
T4	2,796 (2,653-3,701)	2,713 (2,392-2,886)	0,133

F

HIF2 α	pierwotna tkanka nowotworowa	tkanka histopatologicznie niezmienniona	p
	mediana (zakres)	mediana (zakres)	
	3,265 (2,549-5,686)	3,557 (1,979-6,606)	0,000027
Wiek (Lata)			
<60	3,299 (2,549-3,579)	3,758 (3,249-4,227)	0,000615
>60	3,262 (2,583-5,686)	3,541 (1,979-6,606)	0,000954
Płeć			
Kobieta	3,285 (2,549-5,686)	3,612 (2,252-6,606)	0,00193
Mężczyzna	3,219 (2,583-4,740)	3,522 (1,979-5,391)	0,00719
Lokalizacja			
Okreźnica proksymalna	3,272 (2,583-5,686)	3,564 (3,023-6,606)	0,00865
Okreźnica dystalna	3,170 (2,549-3,604)	3,522 (2,938-4,952)	0,00270
Odbytnica	3,260 (2,583-4,740)	3,504 (1,979-5,430)	0,0878
Stopień złośliwości histologicznej			
G1	3,145 (2,758-3,403)	4,237 (3,130-4,952)	0,0539
G2	3,260 (2,549-4,740)	3,495 (1,979-4,648)	0,00190
G3	3,230 (2,651-5,686)	3,599 (2,252-6,606)	0,0588
Skala Dukeasa			
A	3,316 (2,794-3,481)	4,046 (2,857-4,952)	0,00885
B	3,283 (2,549-4,740)	3,460 (3,163-4,435)	0,0384
C	3,299 (2,583-5,686)	3,560 (1,979-6,606)	0,113

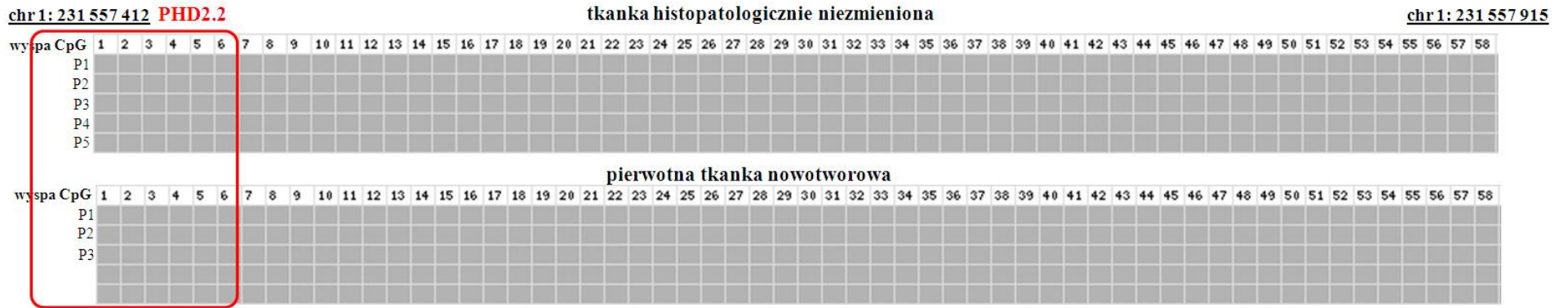
Stadium nowotworu			
T1	3,387 (3,036-3,481)	4,367 (3,539-4,952)	0,0223
T2	3,358 (2,794-3,558)	3,564 (2,252-3,952)	0,734
T3	3,277 (2,549-5,686)	3,522 (1,979-6,606)	0,0075
T4	3,292 (3,127-3,887)	3,504 (3,064-4,227)	0,00411

4.2. Poziom metylacji DNA w regionie promotorowym genów *PHD1*, *PHD2*, *PHD3*, *FIH*, *HIF-1 α* , *HIF-2 α* w pierwotnej tkance nowotworowej i histopatologicznie niezmięnionej jelita grubego u chorych z CRC

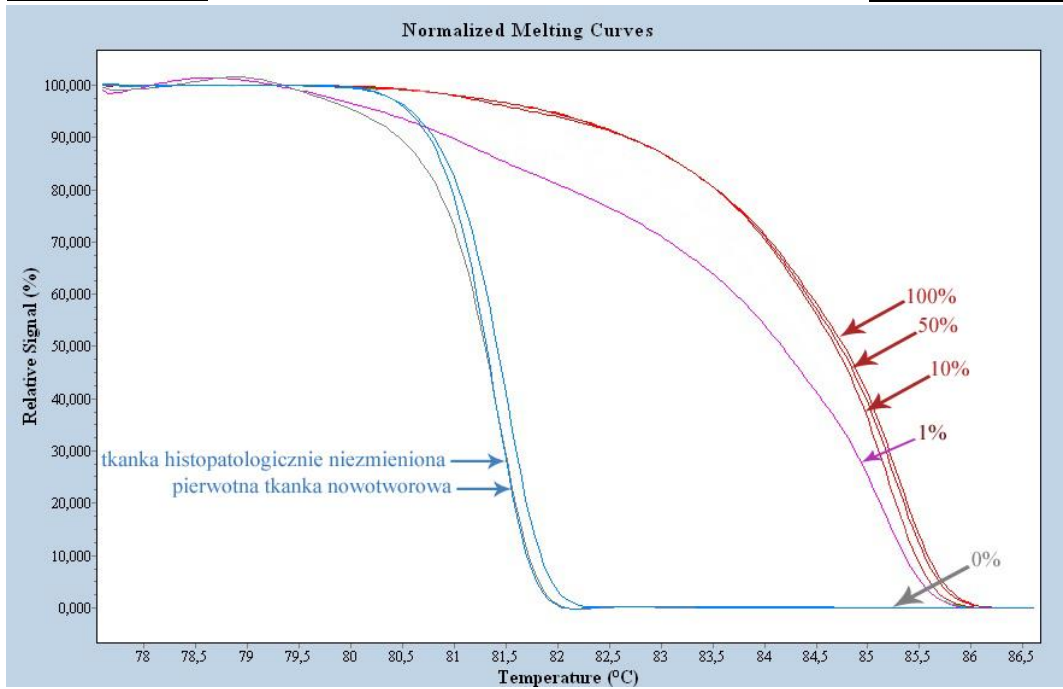
Poziom metylacji DNA w regionie promotorowym genów *PHD1*, *PHD2*, *PHD3*, *FIH*, *HIF-1 α* i *HIF-2 α* oznaczono z użyciem sekwencjonowania deaminowanego DNA (opis metody w rozdziale 3.5.7) i wysokorozdzielczej analizy krzywych temperatur topnienia (opis metody w rozdziale 3.5.8). Wybrane regiony wysp CpG pięciu losowo wytypowanych pacjentów (P1-P5) były poddane analizie poprzez sekwencjonowanie. Stwierdzono wyższy poziom metylacji DNA w pierwotnej tkance nowotworowej w porównaniu z tkanką histopatologicznie niezmięną dla genu *PHD3* w regionie chromosomowym chr14: 34 419 346-34 419 943 i dla genu *HIF-2 α* w regionie chr2:46 526 521-46 527 161 (Rycina 11E, Rycina 11K). Nie zaobserwowano metylacji DNA genu *PHD3* w regionie chr14: 34 419 929-34 420 563 i genu *HIF-2 α* w regionie chr2: 46 524 336-46 524 767 oraz chr2: 46 524 751-46 525 189 (Rycina 11D, Rycina 11I i Rycina 11J). Nie stwierdzono także metylacji DNA w regionie promotorowym genów *PHD1*, *PHD2*, *FIH* i *HIF-1 α* w tkance pierwotnej nowotworowej i histopatologicznie niezmięnionej wybranych pacjentów (Rycina 11A, Rycina11B, Rycina11C, Rycina 11F, Rycina11G i Rycina11H). Wyniki wstępne uzyskane za pomocą sekwencjonowania deaminowanego DNA zostały potwierdzone u wszystkich pacjentów metodą HRM. Zgodnie z wynikami otrzymanymi metodą sekwencjonowania, nie zauważono metylacji DNA w rejonie promotorowym genu *PHD1*, *PHD2*, *FIH* i *HIF-1 α* w tkance pierwotnej nowotworowej i histopatologicznie niezmięnionej pobranej od dziewięćdziesięciu pacjentów z CRC. Nie wykryto również metylacji DNA w pierwotnej tkance nowotworowej i histopatologicznie niezmięnionej dla genu *PHD3* w regionie chr14: 34 419 922-34 420 080 i dla genu *HIF-2 α* w regionie chr2: 46 524 636-46 524 769 oraz chr2: 46 524 969-46 525 075 (Rycina 11A, Rycina 11B, Rycina 11C, Rycina 11D, Rycina 11F, Rycina 11G, Rycina 11H, Rycina 11I i Rycina 11J). Stwierdzono także podwyższony średni poziom metylacji DNA w tkance pierwotnej nowotworowej w porównaniu z tkanką histopatologicznie niezmięną w regionie wyspy CpG genu *PHD3* : chr14: 34 419 795-34

419 935 i chr14: 34 419 400 -34 419 538 ($p < 0,00001$) oraz genu *HIF-2 α* : chr2: 46 526 762-46 526 905 ($p=0,0003$) (Rycina 11E, Rycina 11K i Tabela 8).

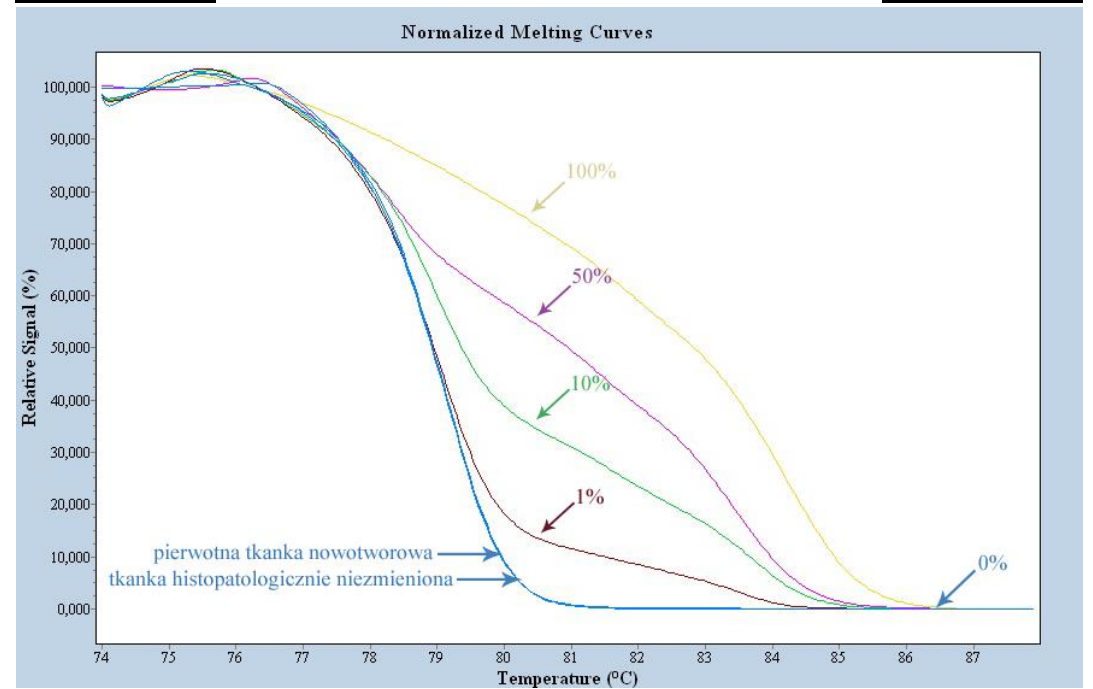
C



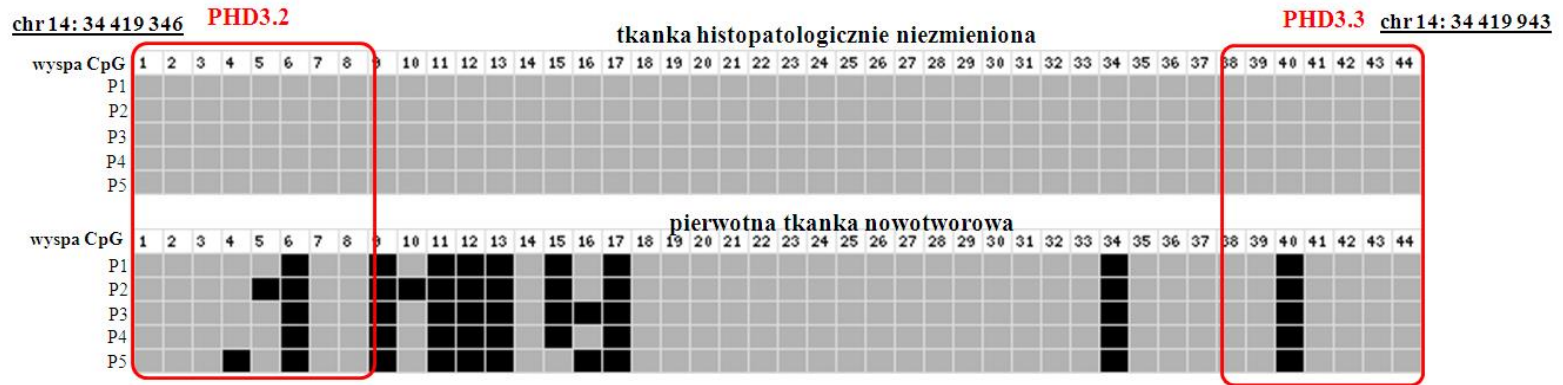
PHD2.2
chr1: 231 557 348



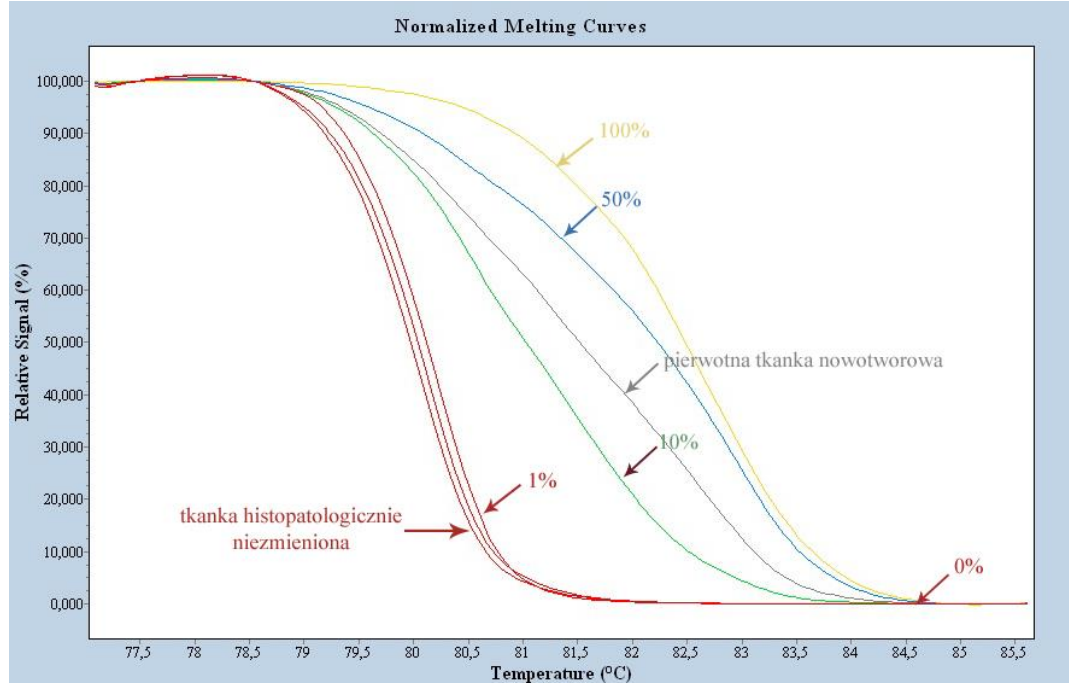
PHD2.3
chr1: 231 557 283



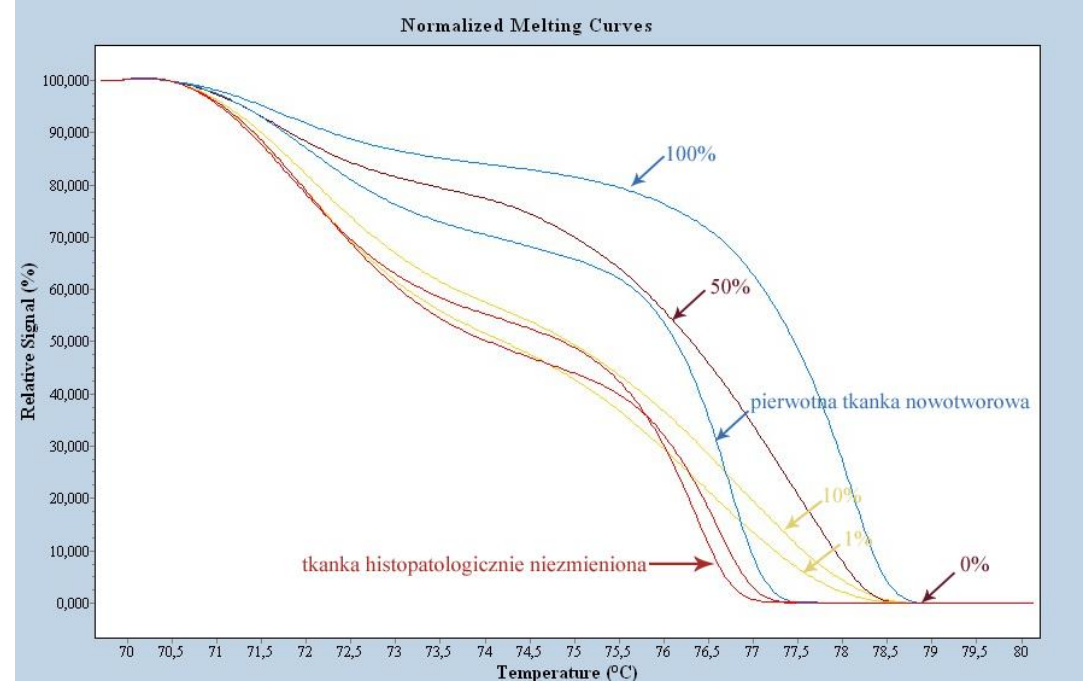
E



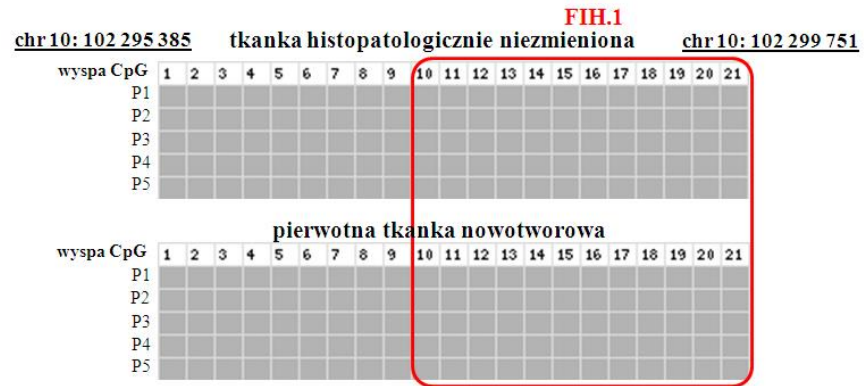
PHD3.2
chr14: 34 419 795



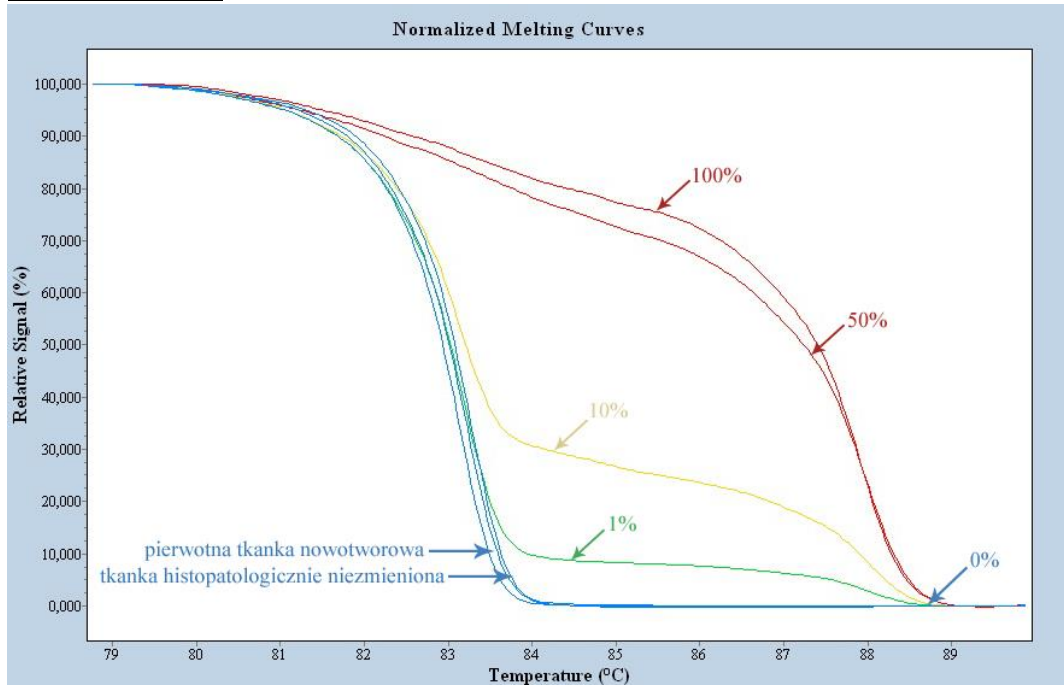
PHD3.3
chr14: 34 419 400

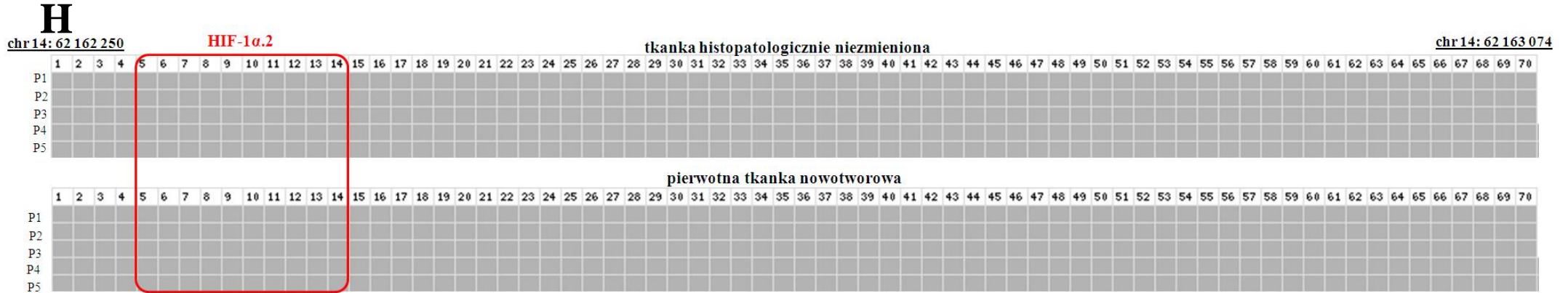


F

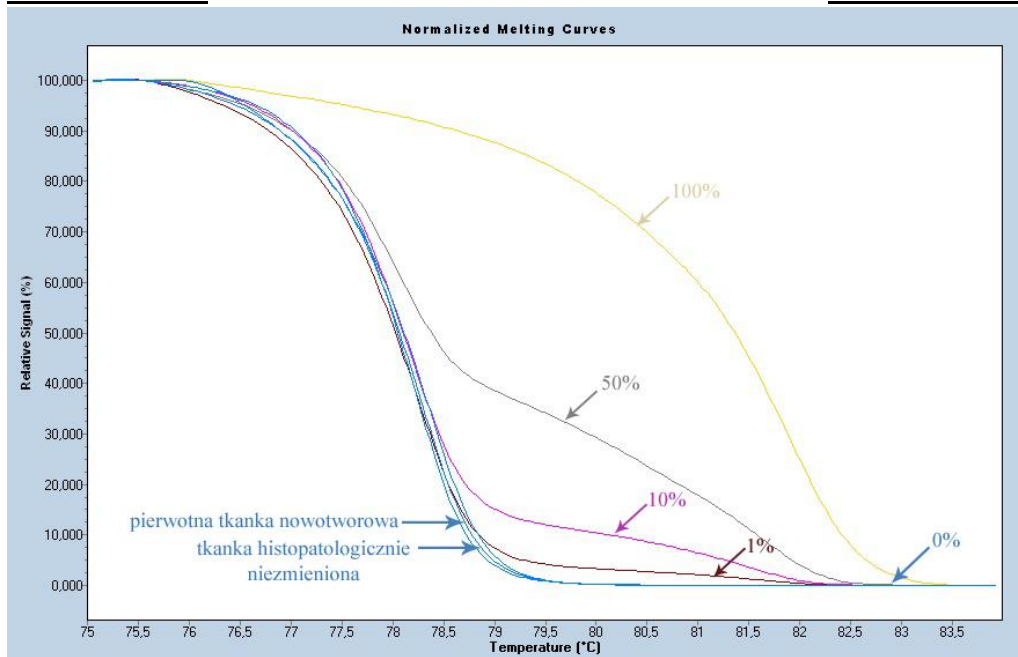


FIH.1
chr10: 102 295 626 **chr10: 102 295 765**





HIF-1 α .2
chr14: 62 162 301 **chr14: 62 162 427**



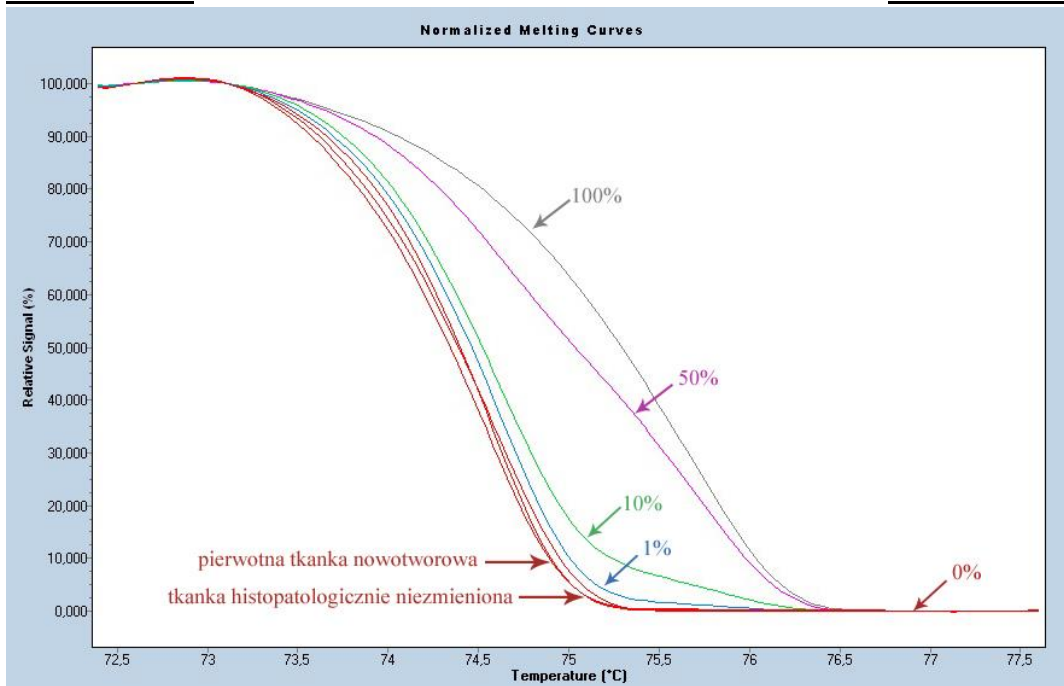
I

chr2: 46 524 336		tkanka histopatologicznie niezmienniona																																													HIF-2 α .1						
wyspaCpG	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49				
P1																																																					
P2																																																					
P3																																																					
P4																																																					
P5																																																					

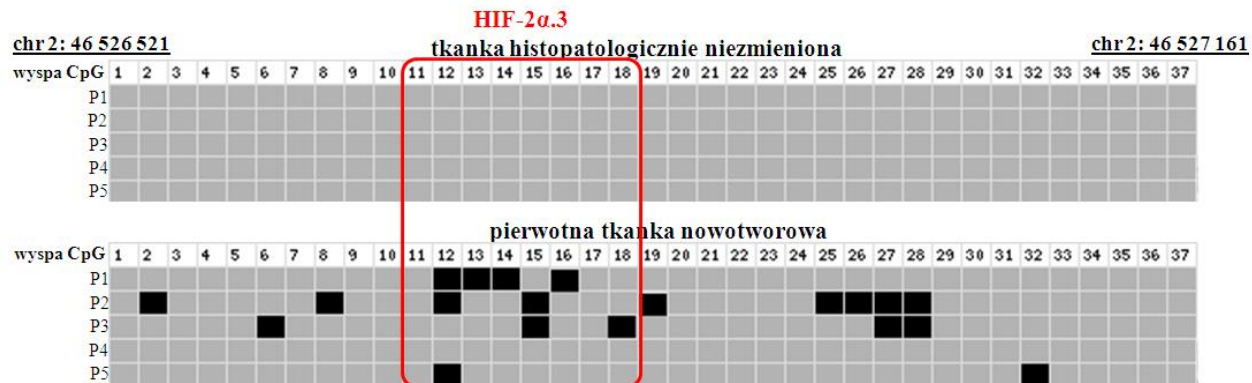
chr2: 46 524 769		pierwotna tkanka nowotworowa																																																					
wyspa CpG	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49						
P1																																																							
P2																																																							
P3																																																							
P4																																																							
P5																																																							

HIF-2 α .1
chr2: 46 524 636

chr2: 46 524 769

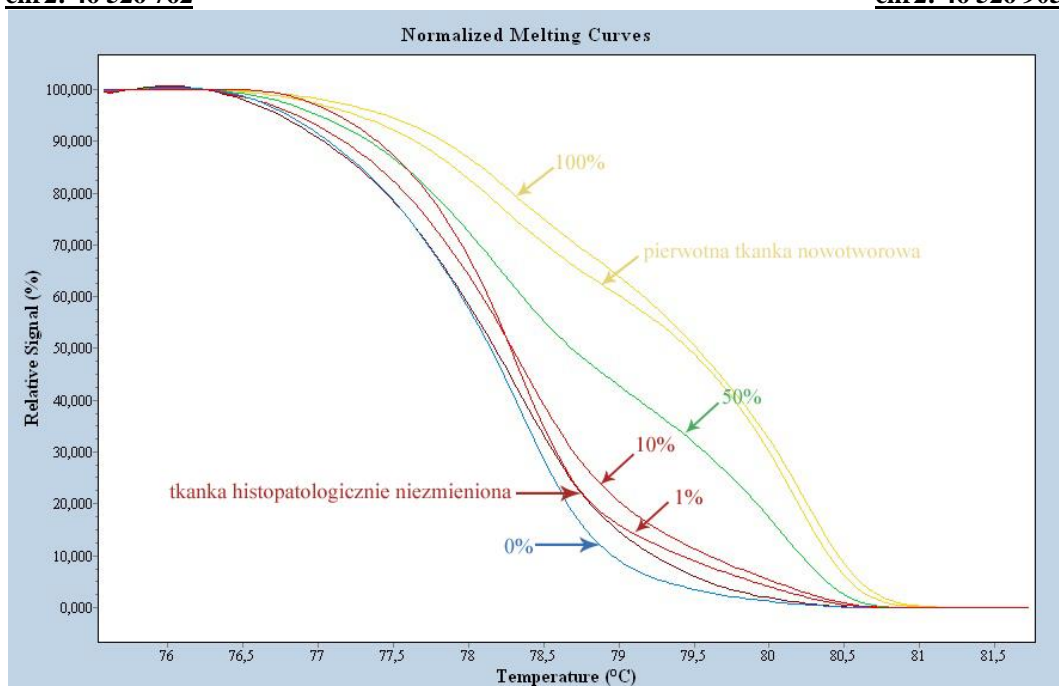


K



HIF-2 α .3
chr2: 46 526 762

chr2: 46 526 905



Rycina 11. Określenie poziomu metylacji DNA regionu promotorowego *PHD1* (A), *PHD2* (B,C), *PHD3* (D,E), *FIH* (F), *HIF-1α* (G,H), *HIF-2α* (I, J, K) z użyciem sekwencjonowania deaminowanego DNA i analizy HRM. Pierwotną tkankę nowotworową i histopatologicznie niezmienną jelita grubego pobraną od dziewięćdziesięciu pacjentów z CRC użyto do izolacji genomowego DNA, a następnie poddano reakcji deaminacji. Regiony wysp CpG amplifikowano z użyciem odpowiedniej pary starterów u 5 pacjentów (P1-P5). Otrzymane wyniki sekwencjonowania zostały przeanalizowane z użyciem programu BiQ Analyzer i BDPC [92, 93]. Czarne i szare pola reprezentują odpowiednio zametylowany i odmetrylowany dinukleotyd CpG. Czerwone prostokąty odpowiadają regionom amplifikowanym w trakcie reakcji Real Time PCR dla analizy HRM. Profil metylacji u pacjentów przedstawiony został w formie znormalizowanych krzywych temperatur topnienia. W celu określenia zawartości procentowej metylacji profil HRM prób badanych był porównywany z profilem otrzymanym dla wzorców.

Tabela 8. Poziom metylacji DNA regionu promotorowego genu *PHD3* i *HIF-2 α* w pierwotnej tkance nowotworowej i histopatologicznie niezmięnionej jelita grubego u chorych z CRC.

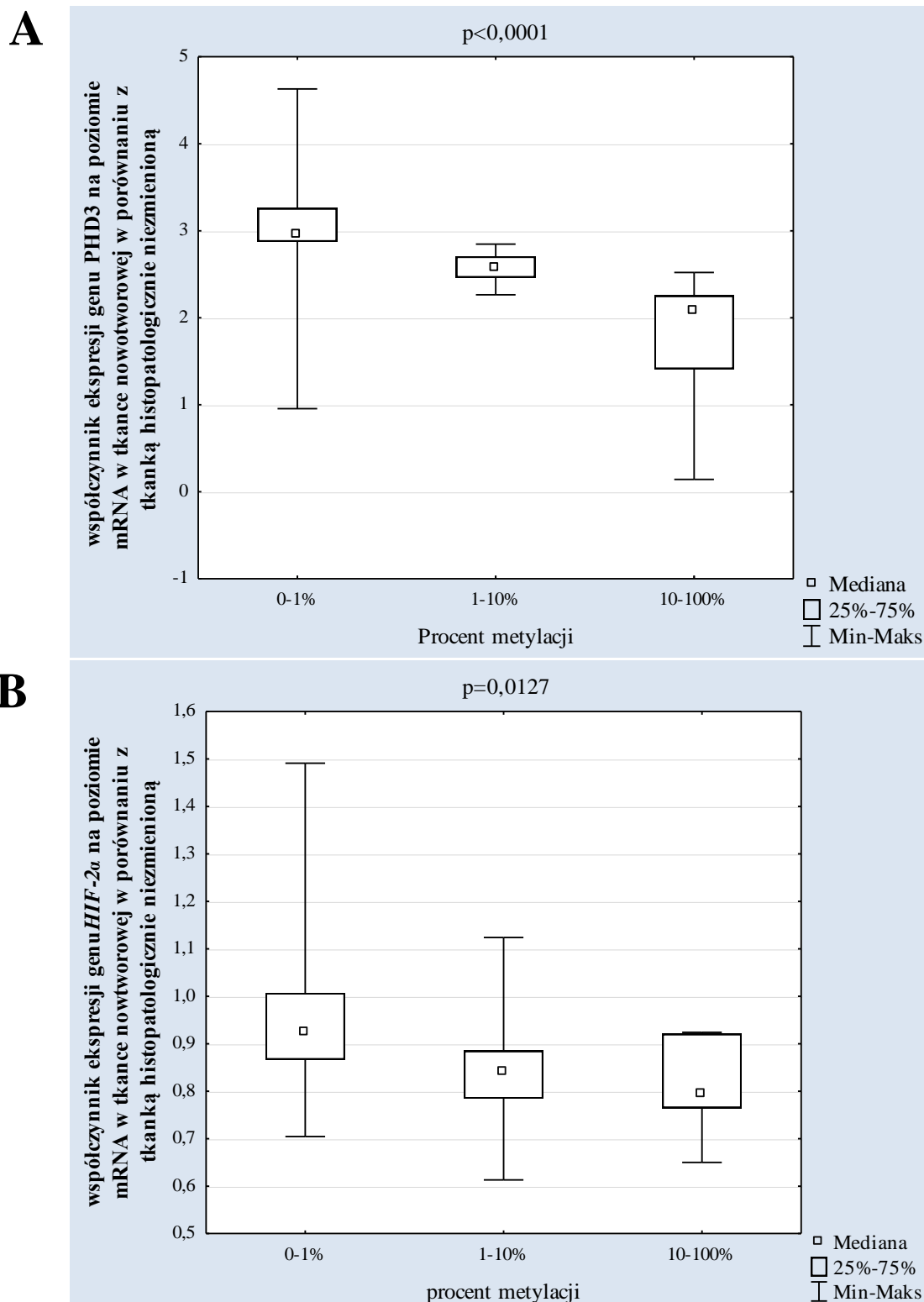
<i>PHD3</i>	Łączna liczba pacjentów	< 1% metylacji	1-10% metylacji	10-100% metylacji	p ^a
Tkanka histopatologicznie niezmięciona	90	63	27	0	p<0,00001
Pierwotna tkanka nowotworowa		37	31	22	

<i>HIF-2α</i>	Łączna liczba pacjentów	< 1% metylacji	1-10% metylacji	10-100% metylacji	p ^a
Tkanka histopatologicznie niezmięciona	90	82	6	2	p=0,0003
Pierwotna tkanka nowotworowa		60	24	6	

Pierwotną tkankę nowotworową i histopatologicznie niezmięzioną jelita grubego pobraną od dziewięćdziesięciu pacjentów z CRC użyto do izolacji genomowego DNA, a następnie poddano reakcji deaminacji. W celu określenia zawartości procentowej metylacji, profile HRM produktów PCR uzyskanych dla pacjentów porównano z profilami HRM produktów PCR uzyskanych dla wzorców metylacji (Rycina 11). Poziom metylacji DNA regionu promotorowego genu *PHD3* i *HIF-2 α* dla każdego pacjenta obliczono jako średnią wartość procentowej metylacji w amplifikowanych fragmentach DNA. ^aTest chi-kwadrat.

4.3. Analiza korelacji metylacji DNA w obrębie wyspy CpG genu *PHD3* i *HIF-2 α* z ekspresją na poziomie mRNA

Obliczono średni poziom metylacji DNA w regionie promotorowym genu *PHD3* chr14: 34 419 795-34 419 935 i chr14: 34 419 400-34 419 538 oraz w regionie promotorowym genu *HIF-2 α* chr2: 46 526 762-46 526 905 z użyciem analizy HRM (Tabela 8). Zaobserwowano, że wzrost średniego poziomu metylacji DNA w analizowanych fragmentach wyspy CpG koreluje z obniżoną ekspresją genu *PHD3* na poziomie mRNA w tkance nowotworowej w porównaniu z tkanką histopatologicznie niezmięzioną (p <0,0001) (Rycina 12A). Podobną korelację zauważono dla genu *HIF-2 α* (p=0,0127) (Rycina 12B).



Rycina12. Współczynnik ekspresji genu *PHD3* (A) i *HIF-2α* (B) na poziomie mRNA w tkance nowotworowej w porównaniu z tkanką histopatologicznie niezmienioną w trzech zakresach metylacji DNA analizowanego regionu promotorowego: 0-1%, 1-10% i 10-100%. Poziom metylacji DNA amplifikowanych fragmentów w obrębie wysp CpG genu *PHD3* i *HIF-2α* określono z użyciem analizy HRM. Poziom metylacji DNA dla każdego pacjenta obliczono jako średnią wartość procentowej metylacji amplifikowanych fragmentów. W celu wykazania zależności pomiędzy różnymi zakresami metylacji (0-1%, 1-10% i 10-100%), a współczynnikiem ekspresji genu na poziomie mRNA w tkance nowotworowej w porównaniu z tkanką histopatologicznie niezmienioną zastosowano test Kruskala-Wallisa.

4.4 Poziom metylacji DNA i ekspresji genów PHD1, PHD2, PHD3, FIH, HIF-1 α i HIF-2 α w ustalonych liniach komórkowych raka jelita grubego HCT116 i DLD-1 w warunkach normoksji i hipoksji.

W celu określenia poziomu metylacji DNA w regionie promotorowym oraz ekspresji genów *PHD1*, *PHD2*, *PHD3*, *FIH*, *HIF-1 α* i *HIF-2 α* w ustalonych liniach komórkowych raka jelita grubego HCT116 i DLD-1 przeprowadzono analizę HRM, qPCR i western blot. W obu badanych liniach komórkowych nie zaobserwowano metylacji DNA w obrębie wyspy CpG w regionie promotorowym genu *PHD1*, *PHD2*, *FIH* i *HIF-1 α* w warunkach hipoksji oraz normoksji (Rycina 13A, Rycina 13B, Rycina 13D, Rycina 13E). Nie wykryto również istotnych statystycznie zmian ekspresji na poziomie mRNA i białka genu *PHD1* i *FIH* (Rycina 13A, Rycina 13D). Zauważono istotny statystycznie wzrost poziomu mRNA i białka genu *PHD2* w warunkach hipoksji w porównaniu do normoksji w linii komórkowej DLD-1 i HCT116 (Rycina 13B). Zaobserwowano również istotny wzrost białka HIF-1 α przy braku różnic na poziomie mRNA w warunkach hipoksji w porównaniu do normoksji dla obu linii komórkowych (Rycina 13E).

Wykryto również wysoki poziom metylacji DNA w komórkach ustalonej linii HCT116 raka jelita grubego i brak metylacji DNA w linii DLD-1 w obrębie regionu wyspy CpG genu *PHD3* (chr14: 34 419 922-34 420 080, chr14: 34 419 795-34 419 935 i chr14: 34 419 400 -34 419 538) oraz regionu wyspy CpG genu *HIF-2 α* (chr2: 46 526 762-46 526 905) w warunkach zarówno hipoksji jak i normoksji (Rycina 13C, Rycina 13F). Wykryto również istotny statystycznie niższy poziom transkryptu i białka genu *PHD3* w ustalonej linii komórkowej HCT116 w porównaniu z ustaloną linią komórkową DLD-1 w warunkach hipoksji (Rycina 13C). Podobną zależność zauważono dla genu *HIF-2 α* w warunkach hipoksji oraz na poziomie mRNA w warunkach normoksji (Rycina 13F). W przypadku genu *PHD3* różnice nie osiągnęły wartości istotności statystycznej w warunkach normoksji (Rycina 13C). Co więcej, zaobserwowano istotny statystycznie wzrost ekspresji genu *PHD3* oraz *HIF-2 α* na poziomie mRNA w warunkach hipoksji w porównaniu do normoksji w ustalonej linii komórkowej DLD-1, przy braku istotnych zmian dla opisywanych genów w ustalonej linii komórkowej HCT116 (Rycina 13C, Rycina 13F).

A

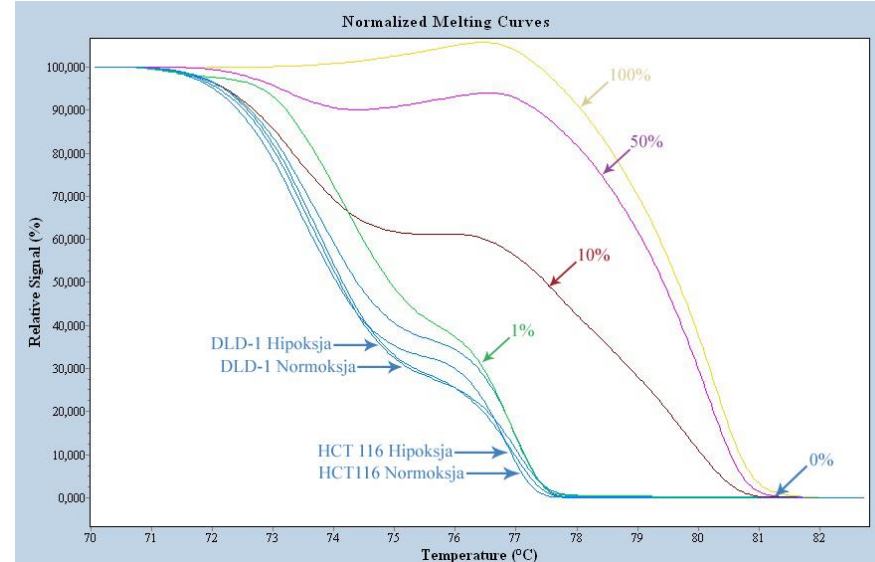
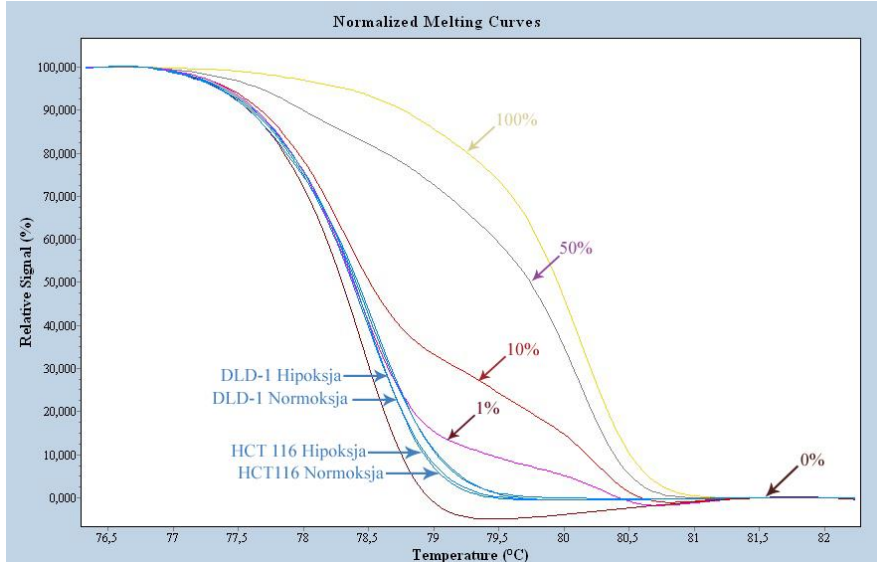
PHD1.1
chr19: 41 304 036

chr19: 41 304 177

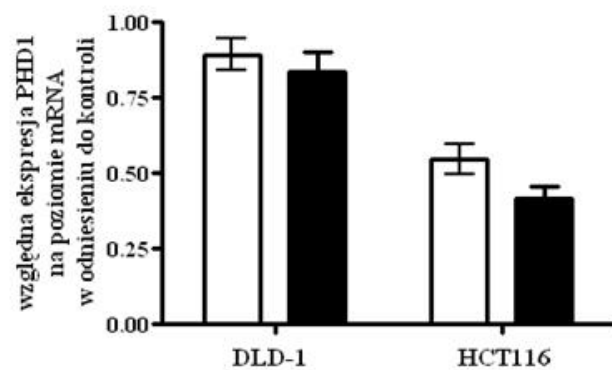
chr19: 41 304 758

PHD1.2
chr19: 41 304 922

1.

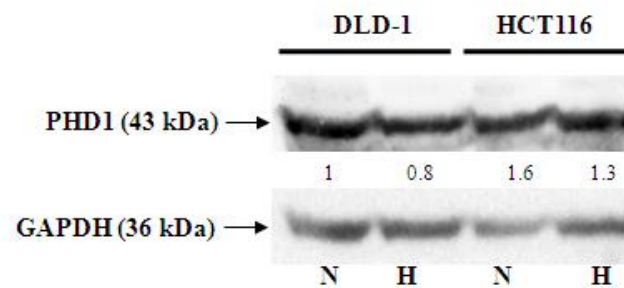


2.



□ Normoksja
■ Hipoksja

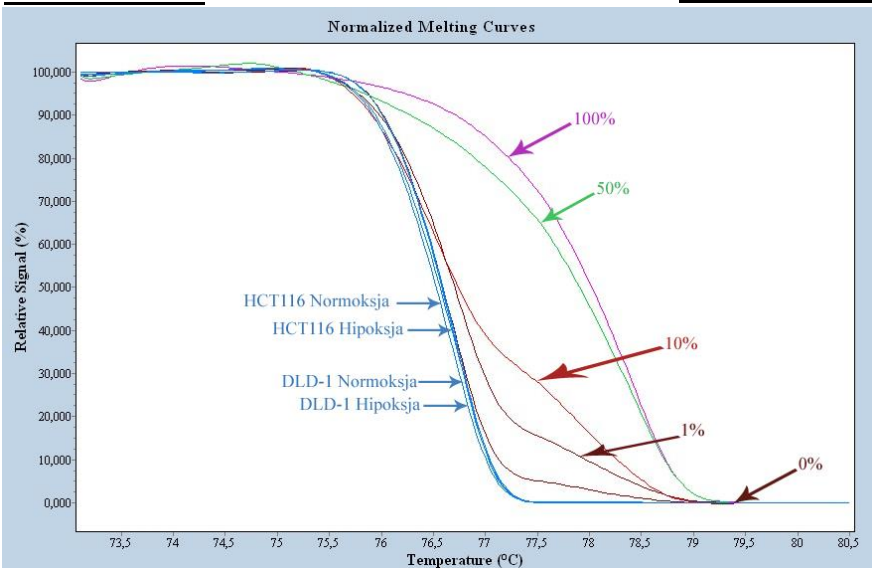
3.



B
1.

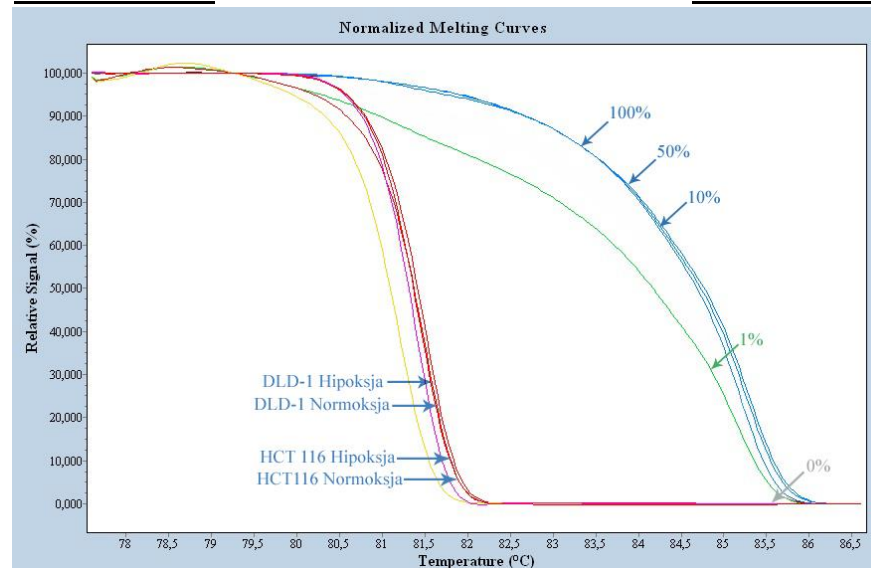
PHD2.1
chr1: 231 558 400

chr1: 231 558 576



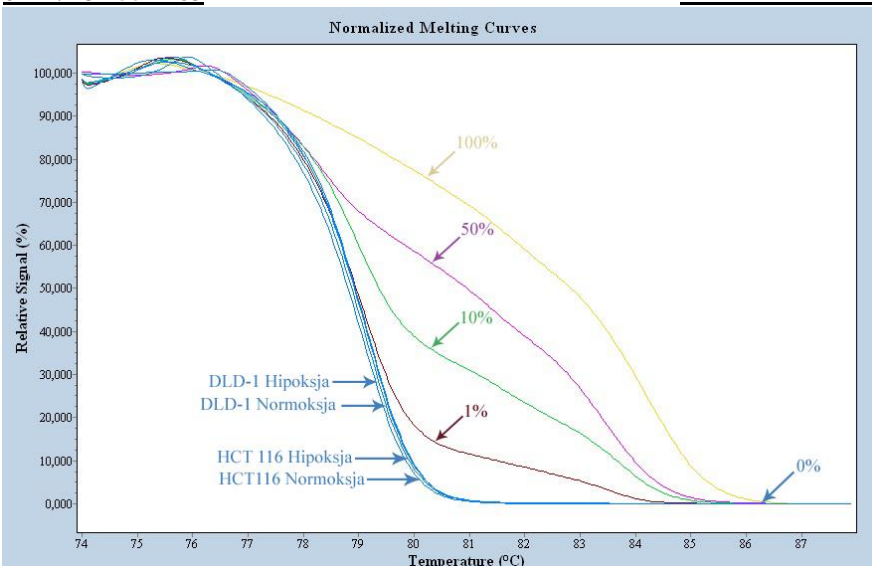
PHD2.2
chr1: 231 557 348

chr1: 231 557 497

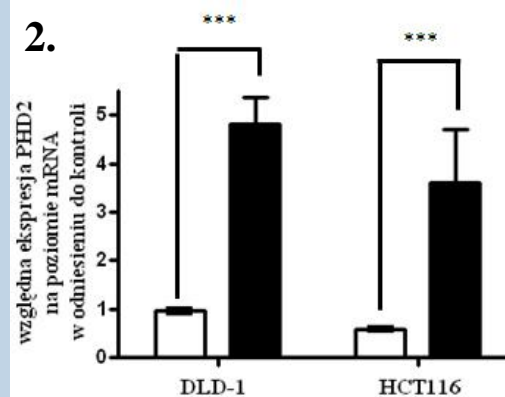


PHD2.3
chr1: 231 557 283

chr1: 231 557 370

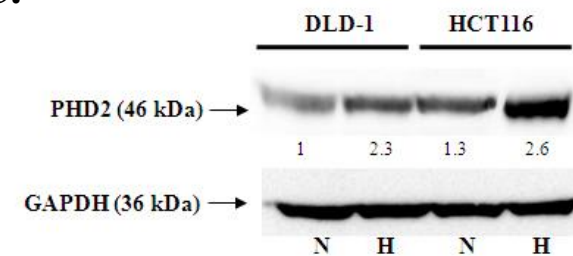


2.



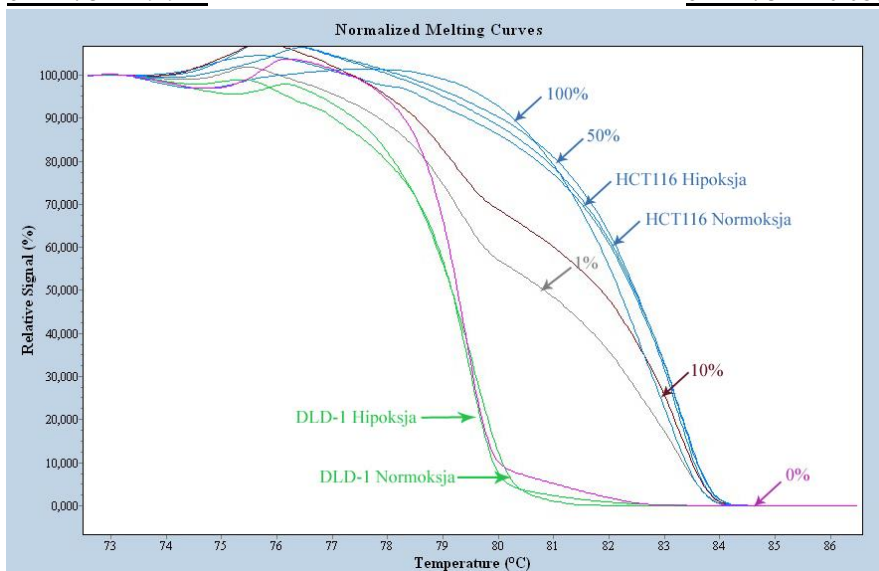
□ Normoksja
■ Hipoksja

3.

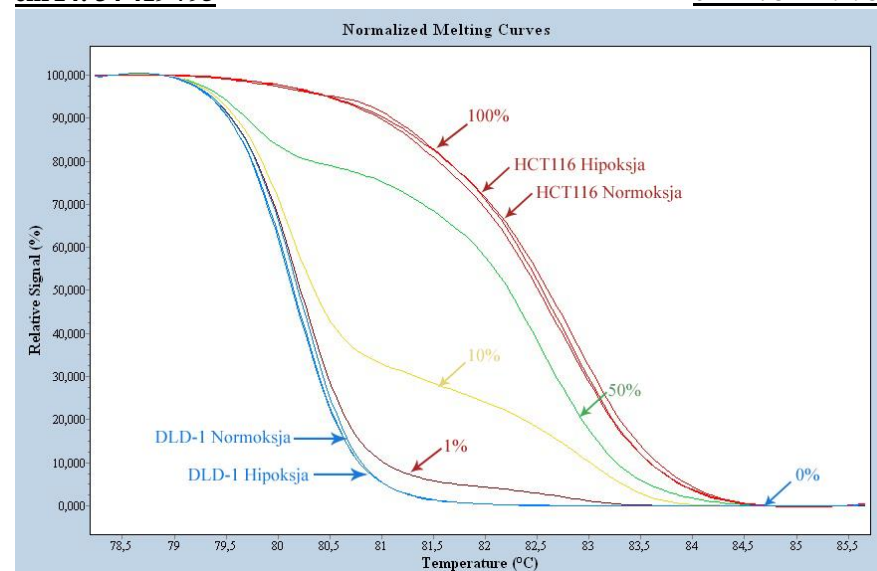


C
1.

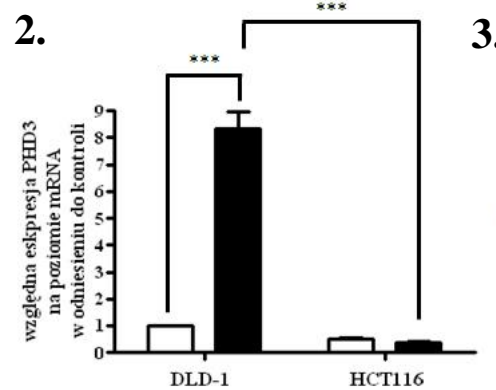
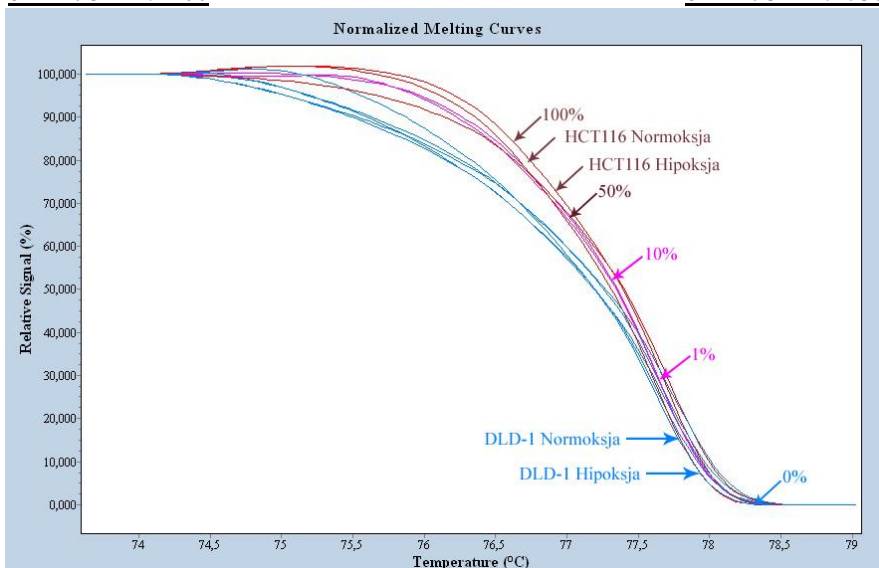
PHD3.1
chr14: 34 419 922



PHD3.2
chr14: 34 419 795



PHD3.3
chr14: 34 419 400

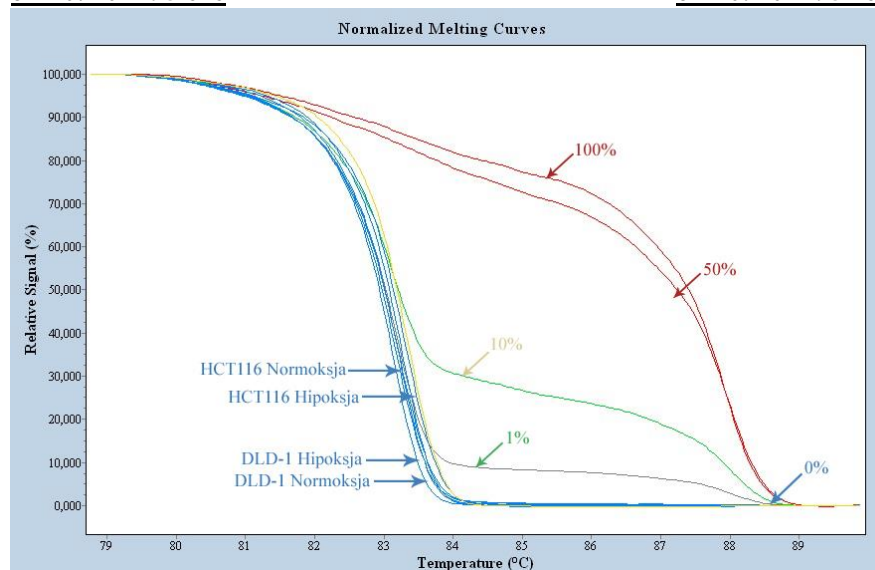


□ Normoksja
■ Hipoksja

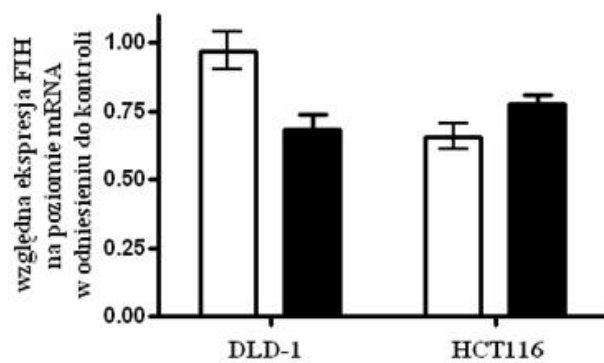


D

1. **FIH.1**
chr10: 102 295 626 chr10: 102 295 765

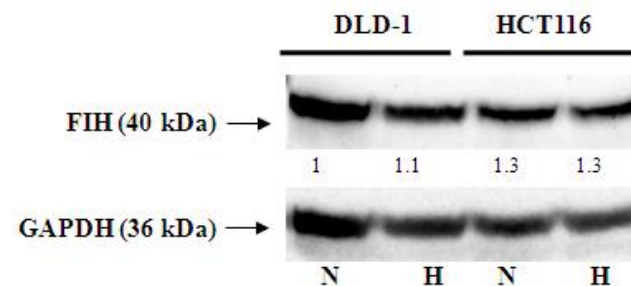


2.



□ Normoksja
■ Hipoksja

3.



E

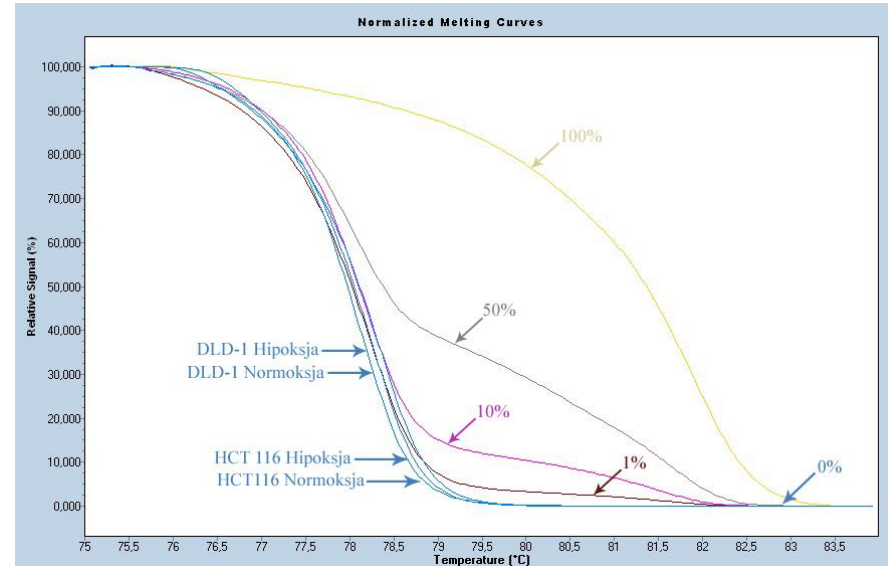
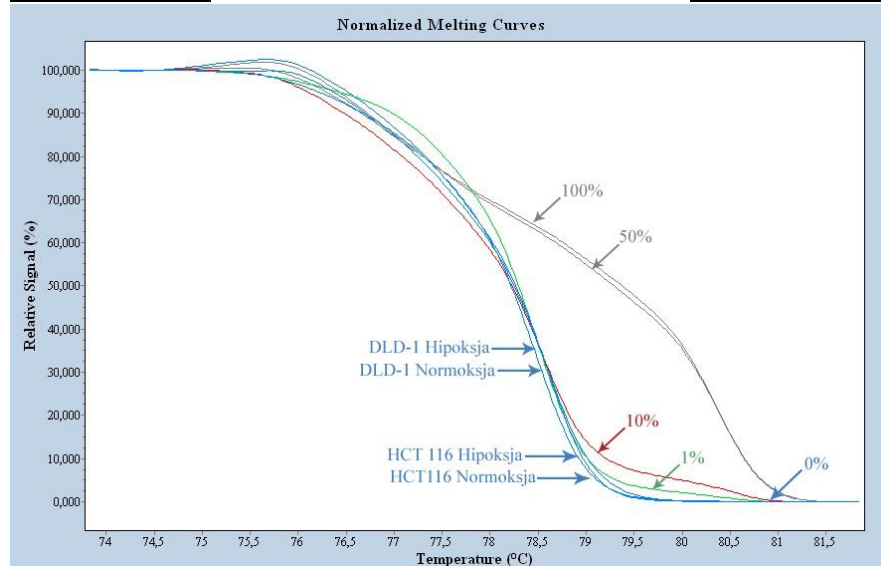
HIF-1 α .1
chr14: 62 161 655

chr14: 62 161 825

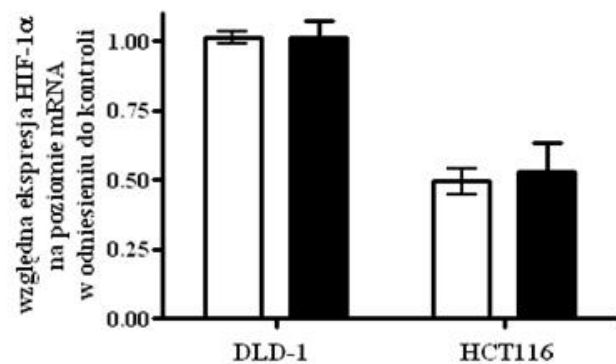
HIF-1 α .2
chr14: 62 162 301

chr14: 62 162 427

1.

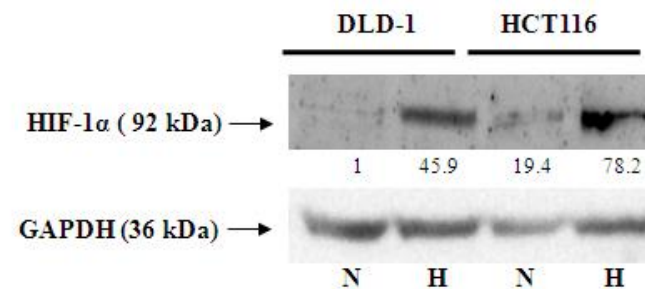


2.



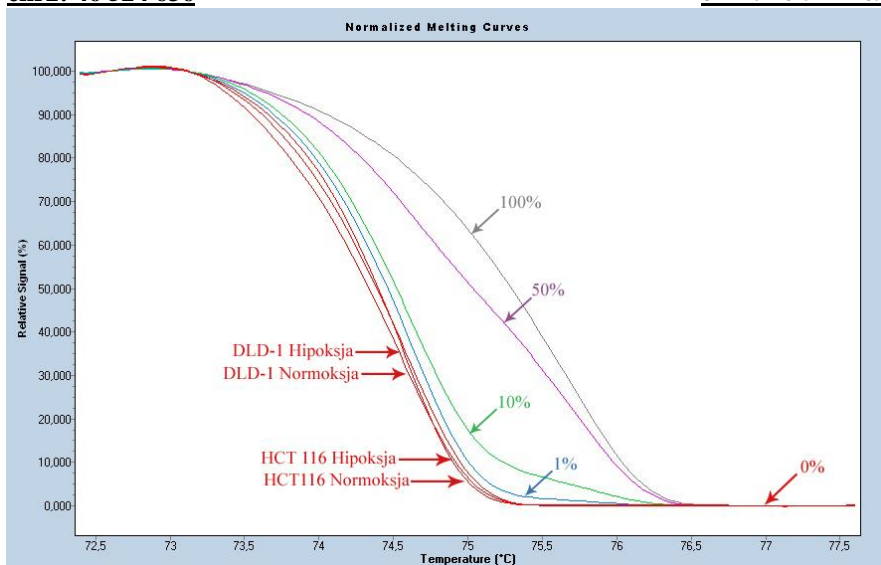
□ Normoksja
■ Hipoksja

3.



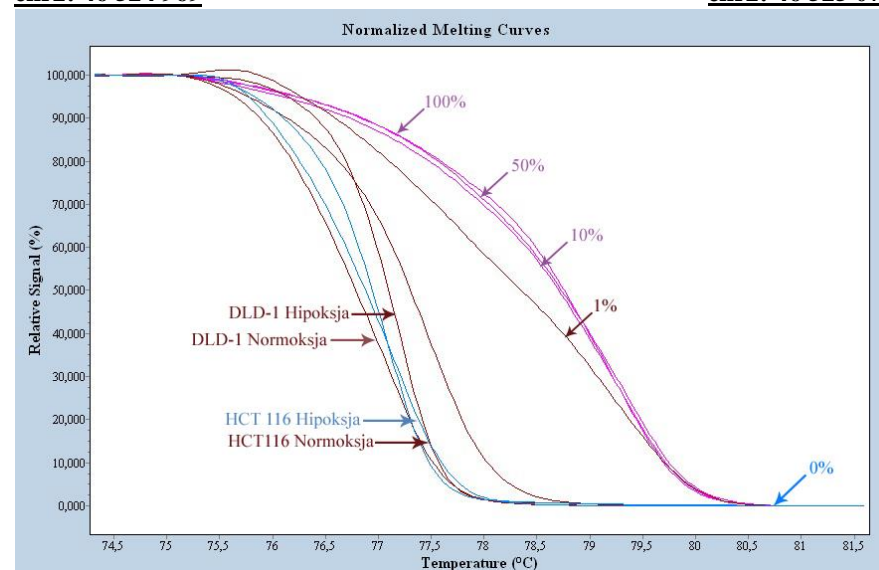
F
1.

HIF-2 α .1
chr2: 46 524 636



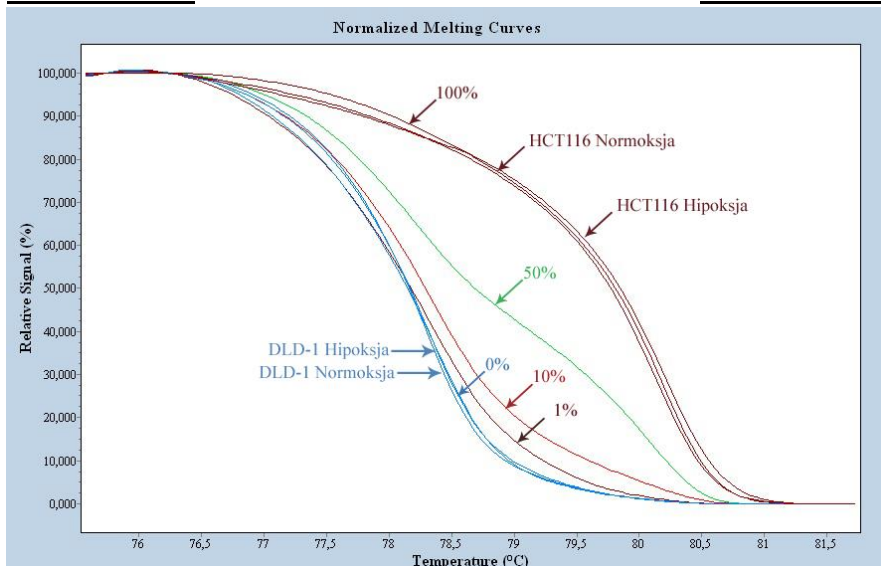
chr2: 46 524 769

HIF-2 α .2
chr2: 46 524 969



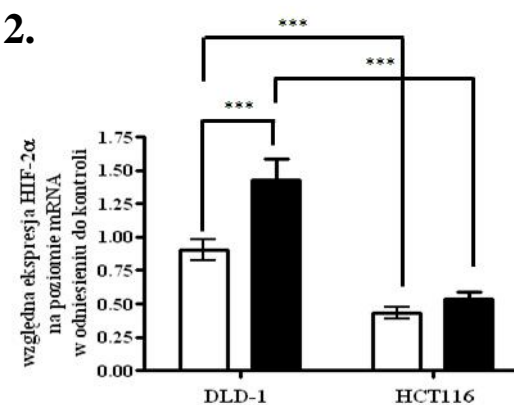
chr2: 46 525 075

HIF-2 α .3
chr2: 46 526 762

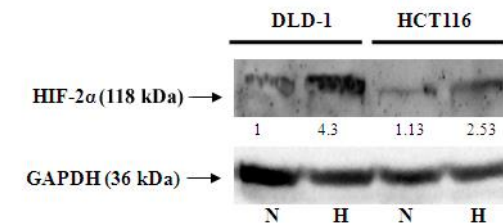


chr2: 46 526 905

2.



3.



□ Normoksja
■ Hipoksja

Rycina 13. Poziom metylacji DNA i ekspresji genu *PHD1* (A), *PHD2* (B), *PHD3* (C), *FIH* (D), *HIF-1 α* (E) i *HIF-2 α* (F) w ustalonych liniach komórkowych raka jelita grubego HCT116 i DLD-1.

1). Ustalony linie komórkowe HCT116 i DLD-1 hodowano w warunkach normoksji lub hipoksji (1% O₂) przez 48 godzin. Następnie zebrane komórki użyto do izolacji oraz reakcji deminacji DNA. Z użyciem analizy HRM oznaczono profil metylacji wybranych genów w liniach komórkowych w warunkach hipoksji i normoksji.

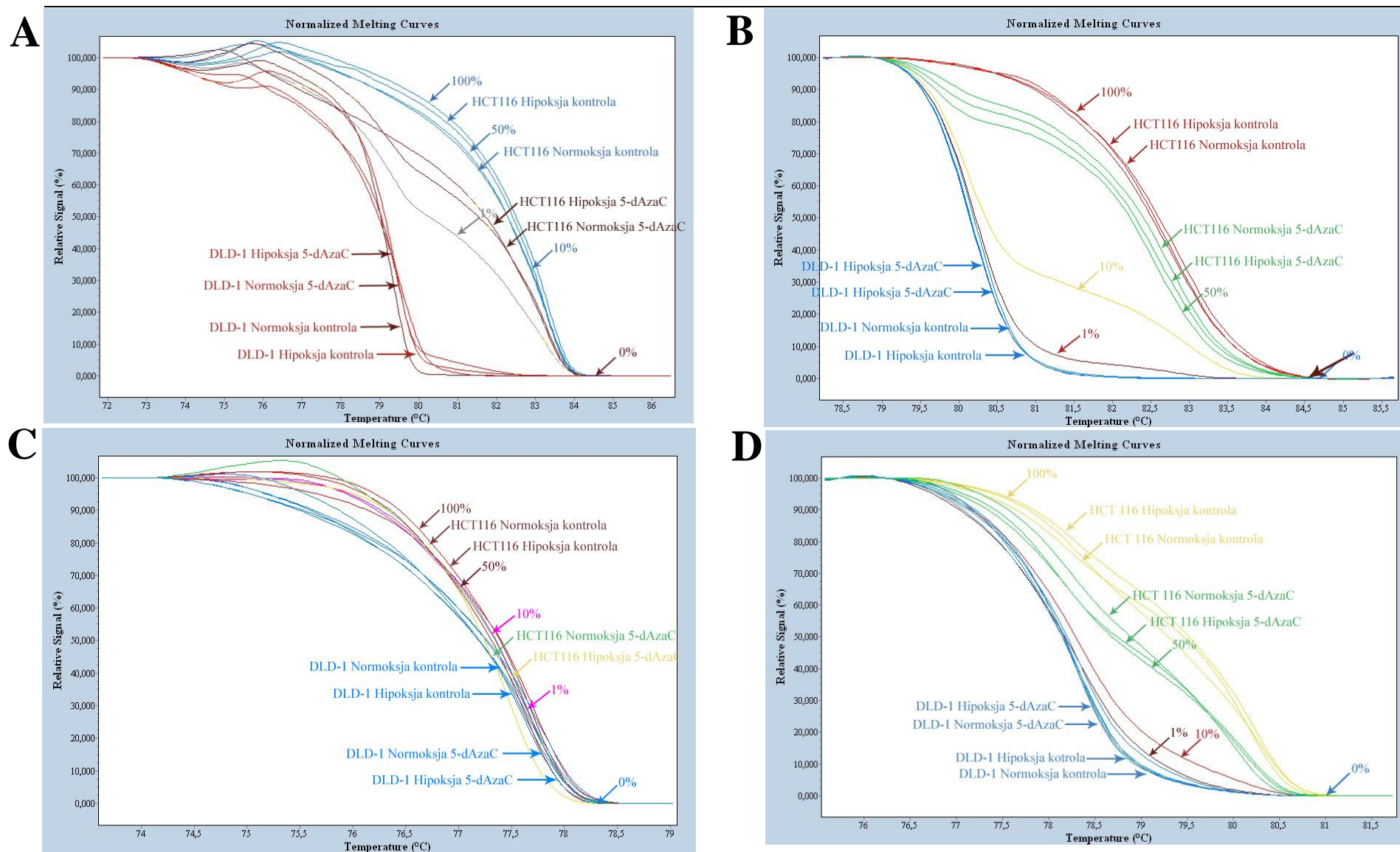
2). Linie komórkowe hodowano w odpowiednim medium w warunkach hipoksji (1% O₂) lub normoksji przez 48 godzin. Następnie zebrane komórki użyto do izolacji całkowitego RNA. Całkowity RNA poddano reakcji odwrotnej transkrypcji i względną ilość kopii cDNA oznaczono za pomocą qPCR. Ilość mRNA badanych genów standaryzowano względem poziomu średniej geometrycznej transkryptów PBGD i hMRPL19. Ilości mRNA poszczególnych genów są przedstawione jako wielokrotność ich kopii w stosunku do kalibratora dla linii komórkowych. Wartość p oceniono za pomocą testu ANOVA; *** p<0,001

3). Linie komórkowe hodowano w odpowiednim medium w warunkach hipoksji (1% O₂) lub normoksji przez 48 godzin. Następnie zebrane komórki użyto do izolacji białka. Białka rozdzielono w 10% SDS-PAGE i przeniesiono na membranę nitrocelulozową, która została następnie poddana analizie western blot. Ilość białka standaryzowano względem ilości GAPDH i przedstawiono jako względną gęstość optyczną. Stosunek ilości białek wybranych genów do GAPDH w linii komórkowej DLD-1 w warunkach normoksji przyjęto jako 1.

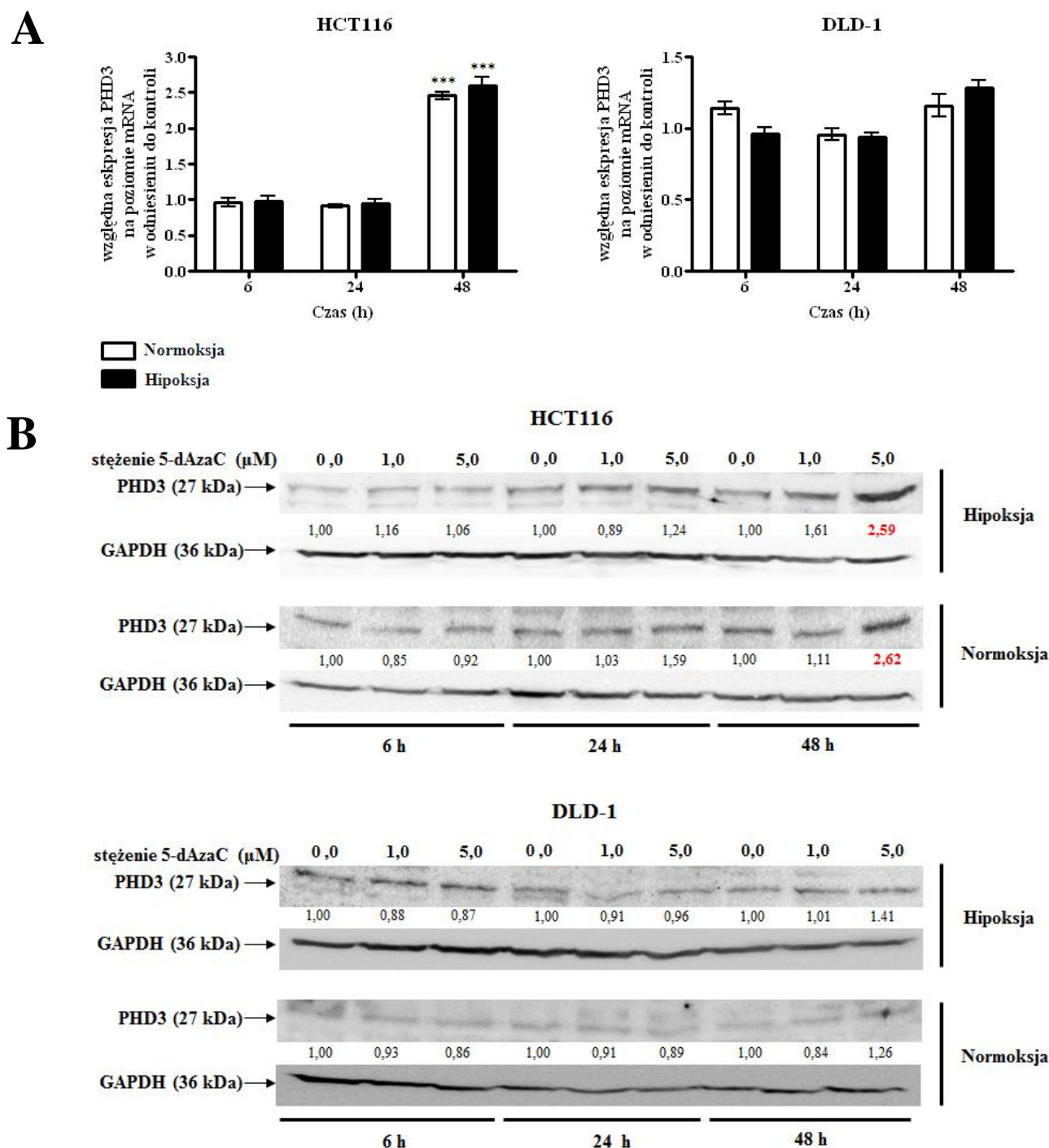
4.5. Wpływ 5-dAzaC na metylację DNA i ekspresję genów *PHD3* i *HIF-2 α* w ustalonych liniach komórkowych HCT116 i DLD-1 w warunkach normoksji i hipoksji.

Wpływ inhibitora metylotransferaz, 5-dAzaC, na metylację DNA regionów promotorowych i ekspresję genów *PHD3* i *HIF-2 α* w ustalonych liniach komórkowych raka jelita grubego HCT116 i DLD-1 badano z użyciem metody HRM, qPCR i Western Blot. 5-dAzaC nie wpłynęła na metylację DNA w analizowanych regionach wyspy CpG genu *PHD3* i *HIF-2 α* w linii komórkowej DLD-1 w warunkach hipoksji i normoksji (Rycina 14). Z kolei analiza HRM wykazała istotną demetylację DNA w regionie chr14: 34 419 922-34 420 080, chr14: 34 419 795-34 419 935 i chr14: 34 419 400 -34 419 538 wyspy CpG genu *PHD3* oraz regionu chr2: 46 526 762- 46 526 905 genu *HIF-2 α* w linii komórkowej HCT116 hodowanej przez 48 godzin w obecności 5,00 μ M 5-dAzaC w warunkach hipoksji i normoksji (Rycina 14).

Modyfikacjom poziomu metylacji DNA regionu promotorowego genu *PHD3* i *HIF-2 α* w linii komórkowej HCT116 towarzyszyły zmiany ekspresji tych genów. Komórki inkubowane z 5-dAzaC wykazywały stopniowy wzrost ilości transkryptu *PHD3* i *HIF-2 α* w linii komórkowej HCT116 (Rycina 15A, Rycina 16A). Nie zaobserwowano zmian poziomu mRNA genu *PHD3* dla linii DLD-1 (Rycina 15A). Wykazano natomiast 1,71- i 2,24- krotny wzrost ilości transkryptu *HIF-2 α* w warunkach normoksji dla linii komórkowej DLD-1 po czasie odpowiednio 24 i 48 godzin (Rycina 16A). Zwiększenie ilości mRNA *HIF-2 α* zaobserwowano również w komórkach linii HCT 116 w warunkach hipoksji (2,88 –krotne) i normoksji (2,10 –krotne) po 48 godzinnej inkubacji z 5-dAzaC (Rycina 16A). Wykazano także 2,45 i 2,59-krotny wzrost ilości mRNA genu *PHD3* po 48 godzinnej inkubacji linii komórkowej HCT116 z 5,00 μ M 5-dAzaC, odpowiednio, w warunkach normoksji i hipoksji (Rycina 15A). Wzrost poziomu transkryptu *PHD3* w linii komórkowej HCT116 był związany ze zwiększoną ilością białka *PHD3* w warunkach hipoksji i normoksji (Rycina 15B). Stwierdzono odpowiednio 2,59 i 2,62-krotny wzrost ilości białka *PHD3* w linii komórkowej HCT116 inkubowanej z 5,00 μ M 5-dAzaC przez 48 godzin w warunkach hipoksji i normoksji. Inkubacja komórek DLD-1 z 5-dAzaC w różnych stężeniach i różnych przedziałach czasowych nie wykazała istotnego wzrostu zawartości białka *PHD3* w warunkach hipoksji i normoksji (Rycina 15B). Podobnie nie wykryto istotnych zmian w linii DLD-1 analizując ilość białka *HIF-2 α* (Rycina 16B). Z kolei, w linii komórkowej HCT116 inkubowanej przez 48 godzin z 5,00 μ M 5-dAzaC w warunkach hipoksji i normoksji wykazano odpowiednio 2,31- i 2,43-krotny wzrost ilości białka *HIF-2 α* (Rycina 16B).

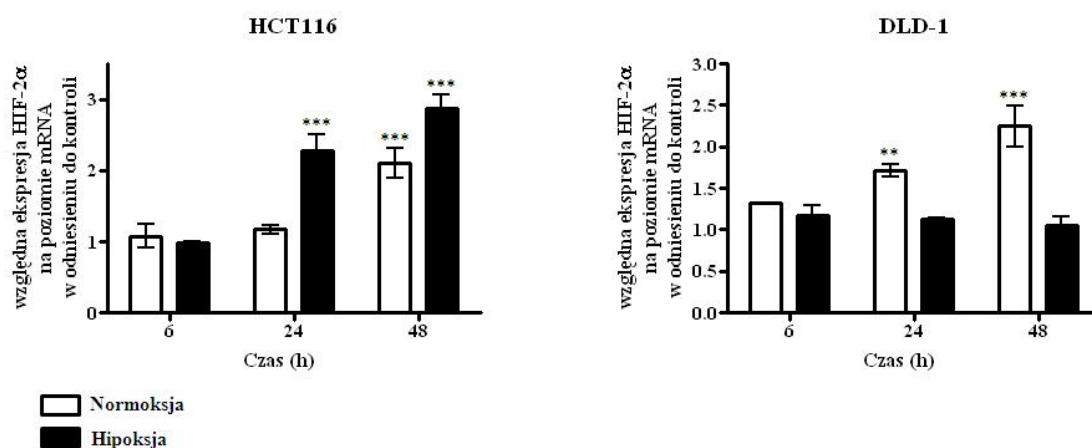


Rycina 14. Określenie poziomu metylacji DNA regionu promotorowego genu *PHD3* (A-PHD3.1, B-PHD3.2, C-PHD3.3) i *HIF-2 α* (D-HIF2 α .3) w linii komórkowej DLD-1 i HCT116 po traktowaniu 5-dAzaC w warunkach hipoksji i normoksji z użyciem analizy HRM. Ustalone linie komórkowe HCT116 i DLD-1 hodowano w warunkach normoksji lub hipoksji (1% O₂) przez 48 godzin. Następnie zebrane komórki użyto do izolacji DNA oraz reakcji deaminacji DNA. Z użyciem analizy HRM oznaczono profil metylacji wybranych genów (względem wzorców) w liniach komórkowych w warunkach hipoksji i normoksji. 96

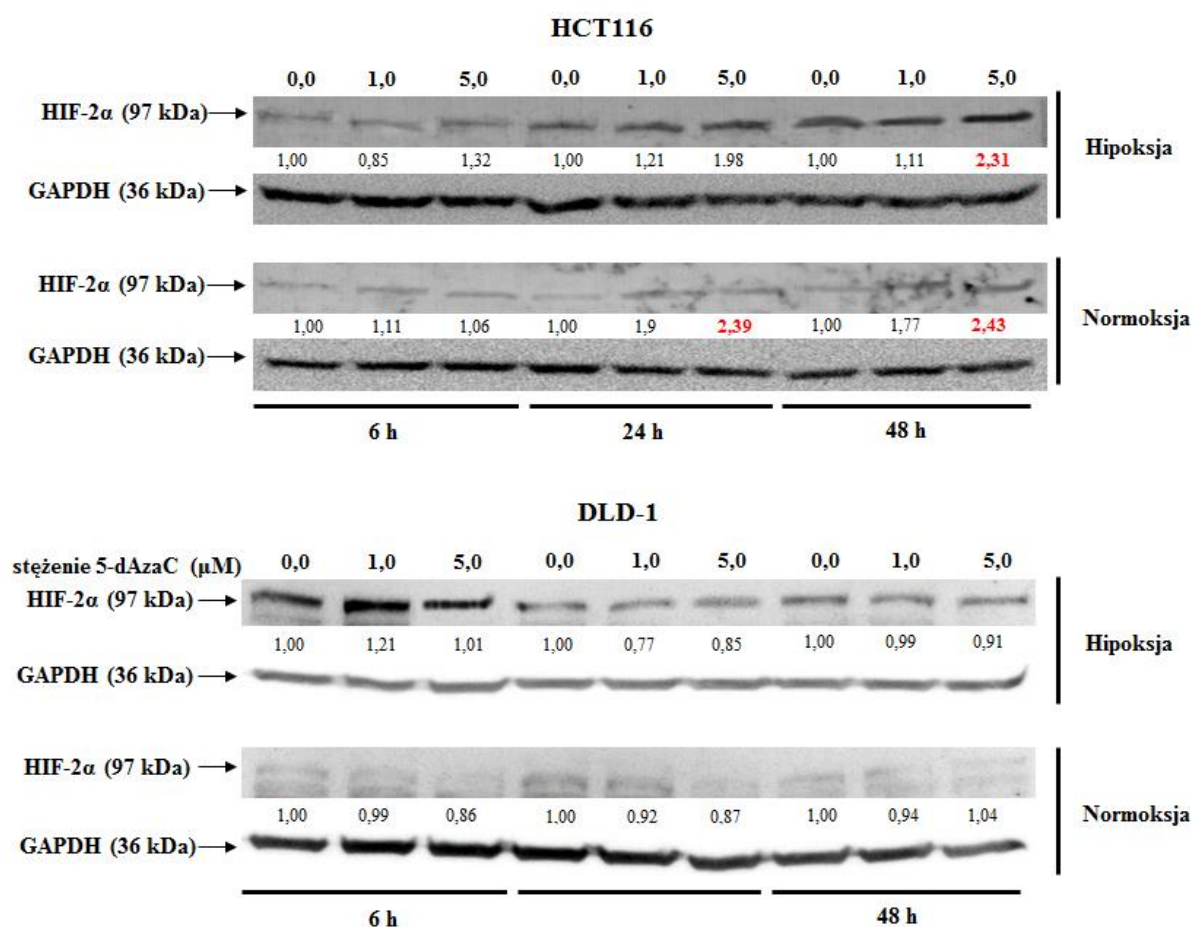


Rycina 15. Wpływ 5-dAzaC na poziom transkryptu (A) i białka (B) genu *PHD3* w liniach komórkowych HCT116 i DLD-1. Linie komórkowe HCT116 i DLD-1 hodowano w odpowiednim medium w prawidłowej zawartości tlenu lub hipoksji (1% O₂) w braku lub obecności 5-dAzaC o stężeniu 1,00 lub 5,00 μM przez 6, 24 i 48 godzin. Po inkubacji osad komórkowy został zebrany do izolacji całkowitego RNA i białka. Całkowity RNA poddano reakcji odwrotnej transkrypcji i względną ilość kopii cDNA oznaczono za pomocą qPCR. Ilość mRNA badanych genów standaryzowano względem poziomu średniej geometrycznej transkryptów PBGD i hMRPL19. Ilość mRNA *PHD3* jest przedstawiona jako wielokrotność kopii w stosunku do odpowiedniej kontroli. Każdą próbkę oznaczono trzykrotnie, a wyniki przedstawiono jako średnią ± SE z trzech eksperymentów. *** $p < 0,001$. Białka rozdzielono w 10% SDS-PAGE i przeniesiono na membranę nitrocelulozową, która została następnie poddana analizie western blot. Ilość białka standaryzowano względem ilości GAPDH i przedstawiono jako względną gęstość optyczną. Stosunek ilości białek *PHD3* do GAPDH dla kontroli przyjęto jako 1.

A



B



Rycina 16. Wpływ 5-dAzaC na poziom transkryptu (A) i białka (B) genu *HIF-2α* w liniach komórkowych HCT116 i DLD-1. Linie komórkowe HCT116 i DLD-1 hodowano w odpowiednim medium w prawidłowej zawartości tlenu lub hipoksji (1% O₂) w braku lub obecności 5-dAzaC o stężeniu 1,00 lub 5,00 μM przez 6, 24 i 48 godzin. Po inkubacji osad komórkowy został zebrany do izolacji całkowitego RNA, białka. Całkowity RNA poddano reakcji odwrotnej transkrypcji i względną ilość kopii cDNA oznaczono za pomocą qPCR. Ilość mRNA badanych genów standaryzowano względem poziomu średniej geometrycznej transkryptów PBGD i hMRPL19. Ilość mRNA *HIF-2α* jest przedstawiona jako wielokrotność kopii w stosunku do odpowiedniej kontroli. Każdą próbkę oznaczano trzykrotnie, a wyniki przedstawiono jako średnią ± SE z trzech eksperymentów. ** p < 0,01; *** p < 0,001. Białka rozdzielono w 10% SDS-PAGE i przeniesiono na membranę nitrocelulozową, która została następnie poddana analizie western blot. Ilość białka standaryzowano względem ilości GAPDH i przedstawiono jako względną gęstość optyczną. Stosunek ilości białek *HIF-2α* do GAPDH dla kontroli przyjęto jako 1.

5. DYSKUSJA

Hipoksja jest wspólną cechą guzów litych [99]. Wpływa ona istotnie na biologię nowotworu oraz jest związana z większą agresywnością i odpornością na chemioterapię [31, 32]. Odpowiedź komórkowa na niedotlenienie środowiska jest związana z heterodimerycznym czynnikiem transkrypcyjnym indukowanym przez hipoksję (HIF), regulowanym posttranslacyjnie przez hydroksylazy prolinowe (PHD) i asparaginowe (FIH) [99]. Reakcje hydroksylacji przeprowadzane przez te enzymy wymagają obecności tlenu. Tak więc, białko HIF w warunkach niedotlenienia nie jest kierowane na ubikwitynozależną degradację i może uczestniczyć w aktywacji ekspresji genów zaangażowanych w progresję raka jelita grubego [37]. Zauważono jednak, że hipoksja i deficyt pozostałych substratów dla reakcji hydroksylacji nie jest jedynym powodem zmienionej aktywności hydroksylaz prolinowych podczas nowotworzenia. Możliwość przeprowadzania reakcji hydroksylacji przez dioksygenazy jest również uwarunkowana ich zawartością w komórce [39].

Ilość enzymów może determinować tempo hydroksylacji HIF- α . Z tego też powodu badania w ostatnich latach koncentrują się na określeniu ilości hydroksylaz w poszczególnych typach tkanek prawidłowych i nowotworowych. Szczegółowa analiza wszystkich izoform hydroksylaz prolinowych wykazała ich zróżnicowaną zawartość w zależności od typu tkanki i rodzaju nowotworu [40, 87, 100, 101]. Zaobserwowano wyższy poziom białka PHD1 w niedrobnokomórkowym raku płuc i guzach endokrynych trzustki [88, 100]. Na modelu mysim wykazano jednak, że inaktywacja genu *Phd1* wpływa na obniżenie poziomu cykliny D1 i upośledza powstawanie nowotworu piersi [102]. Ponadto udowodniono, że nadekspresja genu *PHD1* w ustalonej linii komórkowej raka okrężnicy powoduje inhibicję angiogenezy w warunkach hipoksji [103]. Poziom ekspresji genu *PHD2* badano także w różnych typach nowotworów. Obniżony poziom ekspresji genu *PHD2* został skorelowany z niskim współczynnikiem przeżycia w raku piersi i jelita grubego [104, 105]. Niemniej jednak, badania nad płaskonabłonkowym rakiem głowy i szyi wykazały związek między wyższym stężeniem białka PHD2 frakcji jądrowej z silnie proliferującym i złośliwym typem tego nowotworu [106, 107]. Co więcej, w badaniach immunohistochemicznych udowodniono, że wysoki poziom białka PHD2 i PHD3 w tkance nowotworowej trzustki koreluje z niższym współczynnikiem 5-letniego przeżycia pacjenta [108]. Wykazano również, że ekspresja genu *PHD3* na poziomie mRNA jest podwyższona w płaskonabłonkowym raku głowy i szyi, a w badaniach *in vitro* dowiedziono zahamowania cyklu komórkowego w ustalonych liniach komórkowych tego typu nowotworu w przypadku braku aktywności PHD3 [109]. Wzrost

poziomu białka PHD3 w tkance zmienionej nowotworowo obserwowano również w analizach immunohistochemicznych raka żołądka i niedrobnokomórkowego raka płuc [38, 46]. Wykazano jednak, że aktywność katalityczna PHD3 może indukować apoptozę niezależnie od HIF w ustalonych liniach komórkowych nowotworów różnego pochodzenia [86, 110-112]. Potwierdzają to badania Peurala i wsp., w których wyższa ekspresja genu *PHD3* w raku piersi była związana ze zwiększonym współczynnikiem przeżywalności pacjentek [105].

Rozbieżne wyniki badań dotyczące ilości białka PHD1, PHD2 i PHD3 w tkankach nowotworowych w odniesieniu do parametrów klinicznych mogą być częściowo wyjaśnione przez mechanizm sprzężenia zwrotnego HIF-PHD. Geny *PHD2* i *PHD3* posiadają w regionie promotorowym funkcjonalną sekwencję HRE. D'Angelo i wsp. stwierdził, że w warunkach przedłużającej się hipoksji HIF aktywuje ekspresję wspomnianych hydroksylaz prolinowych, by w trakcie reoksygenacji mogły one w relatywnie krótkim czasie znacząco obniżyć ilość HIF- α [113]. Co więcej, niezgodności otrzymanych wyników mogą być wynikiem tkankowo-specyficznej ekspresji hydroksylaz. Inne hipotezy wskazują na niezależną od białka HIF funkcję PHD. Wskazuje na to m.in. niska specyficzność substratowa poszczególnych hydroksylaz [114]. Do opisanych do tej pory HIF-niezależnych funkcji hydroksylaz należy zaliczyć hamowanie fosforylacji inhibitora kinazy $\kappa\beta$ (ang. *kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) oraz aktywację NF $\kappa\beta$ (ang. *nuclear factor $\kappa\beta$*) przez PHD3 w raku jelita grubego [115]. PHD3 jest również zaangażowana w regulację procesu apoptozy neuronów i różnicowania mioblastów [116], a PHD2 w kontrolę rozwoju zawału mięśnia sercowego [117].

Przeprowadzone w ramach tej pracy obserwacje jednoczesnych zmian ekspresji genów *PHD1*, *PHD2*, *PHD3* i *FIH* nie zostały dotąd opisane w publikacjach naukowych. Badania prezentują istotny statystycznie spadek poziomu ekspresji trzech genów: *PHD1*, *PHD2* i *PHD3* w pierwotnej tkance nowotworowej w porównaniu z tkanką histopatologicznie niezmienną. Pomimo, że nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w poziomie transkryptu genu *FIH* pomiędzy pierwotną tkanką nowotworową i tkanką histopatologicznie niezmienną, wykryto istotny wzrost białka FIH w raku jelita grubego. Poprzez aktywność enzymatyczną wobec reszty asparaginowej białka HIF- α , FIH uniemożliwia oddziaływanie HIF- α z koaktywatorami w jądrze komórkowym [118]. Dodatkowo, FIH pełni wiele funkcji niezależnych od białka HIF. Należą do nich interakcje z pVHL, deacetylazami histonowymi, białkami p105, Notch 1 oraz z rodziny SOCS [119-122]. Gen *FIH* ulega ekspresji we wszystkich typach komórek, ale poziom jego ekspresji zależy od tkanki oraz typu

nowotworu [87]. Dotychczas powiązано nadekspresję białka FIH z bardziej złośliwym fenotypem nowotworu i złym rokowanie guzów endokrynych trzustki i niedrobnokomórkowego raka płuc [88, 100]. Co więcej, zauważono, że wyciszenie ekspresji genu *FIH* zmniejsza proliferację komórek nowotworowych raka jelita grubego za pośrednictwem szlaku zależnego od białek p53-p21 w badaniach *in vitro* i *in vivo* [123]. W przedstawionych w tej pracy badaniach zaobserwowano istotny statystycznie wzrost poziomu białka FIH w pierwotnej tkance nowotworowej w porównaniu z tkanką histopatologicznie niezmienną. Obserwacja wzrostu ilości białka FIH, przy niezmienniej ekspresji na poziomie mRNA, może wynikać z aktywności E3 ligazy SIAH-1 (ang. *siah E3 ubiquitin protein ligase 1*). SIAH-1 może kierować białko FIH na ubikwitynozależną degradację [124, 125]. W przeprowadzonych do tej pory badaniach wykazano powszechne występowanie białka SIAH-1 w tkankach, w tym w raku jelita grubego [126]. Aczkolwiek, różnice pomiędzy tkanką histopatologicznie niezmienną, a nowotworową zostały opisane dotąd tylko dla raka piersi oraz wątrobowo-komórkowego, gdzie zaobserwowano istotny spadek ilości SIAH-1 w tkance nowotworowej [127, 128]. Obniżenie ilości białka SIAH-1 w tkance nowotworowej mogłoby tłumaczyć wzrost ilości FIH w pierwotnej tkance nowotworowej jelita grubego.

Najszerzej prowadzone dotąd badania dotyczące zmian poziomu białek zaangażowanych w odpowiedź na hipoksję w trakcie karcynogenezy dotyczą białka HIF- α . Wiele z nich opartych na doświadczeniach immunohistochemicznych wykazało ujemną korelację pomiędzy ekspresją białka HIF-1 α i HIF-2 α , a współczynnikiem przeżywalności, wskaźnikiem reakcji na leczenie uzupełniające czy ekspresją onkogenów i genów zaangażowanych w angiogenezę, jak VEGF w nowotworze piersi, szyjki macicy, żołądka, wątroby, komórek glejowych, skóry oraz płaskonabłonkowym raku głowy i szyi [129-134]. Poziom białek HIF-1 α i HIF-2 α był także oznaczany w raku jelita grubego, jednak wyniki są niejednoznaczne. Wysoki poziom ekspresji białka HIF-1 α był skorelowany z niskim współczynnikiem przeżywalności w badaniach przeprowadzonych przez 3 niezależne grupy badawcze, jednak 3 kolejne wykazały brak takiego powiązania w raku jelita grubego [135-141]. Pomimo wykazania przez grupę Yoshimura i wsp. silnego pozytywnego zabarwienia w analizach immunohistochemicznych HIF-2 α w zaawansowanym CRC, badania przeprowadzone 5 lat później przez 2 inne zespoły badawcze opisały przeciwstawne wyniki [138, 141, 142]. Imamura i wsp. przeprowadzili badania *in vitro* w kierunku identyfikacji genów, które podlegają aktywacji przez wyłącznie HIF-1 α lub HIF-2 α [142]. Wcześniejsze

doświadczenia na mysich nokautach *Hif-1α* (-) lub *Hif-2α* (-) wykazały bowiem różne fenotypy [143]. Mechanizmem różnicującym wybór genów docelowych dla HIF-1α lub HIF-2α wydaje się być oddziaływanie domeny N-TAD z koaktywatorami, które z kolei decydują o aktywacji innych genów [144, 145]. W ten sposób wykazano, że HIF-1α odpowiada za indukcję wielu genów związanych z glikolizą i angiogenezą [133, 142], a do genów podlegających regulacji przez HIF-2α w raku jelita grubego należy m.in. gen *CCNG2* (ang. *cyclin G2*) oraz *ANGPTL4* (ang. *angiopoietin-like 4*) [142]. Ekspresja *CCNG2* jest obniżona w nowotworze jamy ustnej, a jej nadekspresja hamuje proliferację ustalonej linii nowotworowej języka [146]. Z kolei ekspresja *ANGPTL4* obniża migrację i metastazę komórek nowotworowych [147, 148]. Regulacja przez HIF-2α ekspresji obydwu genów popiera hipotezę o funkcji tego białka jako supresora nowotworowego w raku jelita grubego [142]. Także na modelu mysim udowodniono, że wyciszenie ekspresji *HIF-2α* wiązało się z bardziej intensywnym rozwojem nowotworu jelita grubego [142]. Potwierdzeniem tych badań były wyniki uzyskane na hodowlach komórkowych innych tkanek. Zauważono wzrost masy guza szczura z wszczepionymi komórkami z linii glejaka i potworniaka z wyciszonym genem *HIF-2α* [149]. W badaniach własnych z użyciem techniki western blot, pomimo wielu prób optymalizacji metody, nie udało się wykryć białek HIF-1α i HIF-2α w materiale klinicznym. Brak sygnału dla tych białek mógł być efektem ich zbyt niskiego poziomu w próbach pacjentów, niemożliwego do wykrycia z użyciem zastosowanych odczynników. Zaobserwowano jednak istotny statystycznie niższy poziom transkryptu *HIF-2α* w pierwotnej tkance nowotworowej w porównaniu z tkanką histopatologicznie niezmienną, przy braku różnic dla genu *HIF-1α* w analizowanym materiale klinicznym.

O ile poziom białka i mechanizm regulacji posttranslacyjnej HIF-1α i HIF-2α są dobrze opisane, o tyle wciąż niewiele wiadomo na temat regulacji syntezy ich mRNA i białka [150]. W płaskonabłonkowym raku przełyku oraz raku jelita grubego wykazano nadekspresję *HIF-1α* na poziomie mRNA, jednak okazało się to nie związane z charakterystyką histopatologiczną pacjentów oraz współczynnikiem przeżywalności [140, 151]. Zaobserwowano natomiast pozytywne korelacje pomiędzy wysokim poziomem mRNA oraz zwiększoną przerzutowością do węzłów chłonnych i/lub niskim współczynnikiem przeżywalności u pacjentów odpowiednio z nowotworem żołądka i/lub części zewnątrzwydzielniczej trzustki [152, 153]. Uważa się jednak, że ekspresja genu *HIF-1α* na poziomie mRNA w większości typów komórek nowotworowych jest stała i podlega kluczowej regulacji na poziomie białka [154-156], co jest zgodne z obserwacjami

przedstawionymi w pracy doktorskiej. W odniesieniu do ekspresji *HIF-2 α* dotychczas tylko jedna publikacja opisuje podwyższony poziom krążącego mRNA dla tego genu w osoczu nawiązuje do pacjentów z rakiem jelita grubego [157]. Prezentowane w pracy doktorskiej wyniki po raz pierwszy opisują jednocześnie zmiany poziomu mRNA dla dwóch genów: *HIF-1 α* i *HIF-2 α* w pierwotnej tkance nowotworowej w porównaniu do tkanki histopatologicznie niezmięnionej jelita grubego. Wykazany w badaniach własnych istotny statystycznie spadek poziomu transkryptu *HIF-2 α* w pierwotnej tkance nowotworowej może sugerować regulację ekspresji tego genu już na poziomie mRNA.

Hydroksylazy prolinowe, asparaginowe oraz czynnik transkrypcyjny indukowany hipoksją mają istotny wpływ na progresję nowotworową. Badania na temat regulacji ekspresji tych genów na poziomie syntezy mRNA mogą pomóc w zrozumieniu karcynogenezy jelita grubego. Istnieje wiele czynników zaangażowanych w rozwój i występowanie CRC. Można je zaklasyfikować jako genetyczne, epigenetyczne i środowiskowe [80, 158-160]. Jednym z mechanizmów epigenetycznych, jest modyfikacja DNA poprzez jego metylację, którą obserwuje się już we wczesnych etapach nowotworzenia jelita grubego [161, 162]. Wykazano, że hipermetylacja DNA genów *MLH1*, *MGMT*, *CDKN2A* i inne jest związana z progresją raka jelita grubego [160, 163, 164]. Realizowane w ramach rozprawy doktorskiej badania są pierwszymi opisującymi poziom metylacji DNA regionu promotorowego genów *PHD1*, *PHD2*, *PHD3*, *FIH*, *HIF-1 α* i *HIF-2 α* w materiale klinicznym pobranym od pacjentów z rakiem jelita grubego. Z użyciem techniki sekwencjonowania deaminowanego DNA oraz HRM nie stwierdzono jednak metylacji DNA w obrębie wyspy CpG genów *PHD1*, *PHD2*, *FIH* i *HIF-1 α* u 90 pacjentów z rakiem jelita grubego. Brak metylacji DNA regionu promotorowego genów *PHD1* i *PHD2* może świadczyć o występowaniu innych mechanizmów odpowiedzialnych za obniżony poziom ekspresji tych genów w pierwotnej tkance nowotworowej w porównaniu z histopatologicznie niezmięnoną tkanką jelita grubego.

Poziom metylacji DNA regionu promotorowego genów *PHD1*, *PHD2*, *PHD3*, *FIH* i *HIF-1 α* był badany przez kilka zespołów naukowców w różnych typach nowotworów [86, 165-168]. Zgodnie z tymi doniesieniami, nie zaobserwowano metylacji DNA w obrębie wysp CpG genów *PHD1*, *PHD2* i *FIH* w raku piersi i szpiczaka mnogiego [13, 14], ani też w regionie promotorowym genu *PHD3* w raku piersi i prostaty [86, 166]. W realizowanych w ramach rozprawy doktorskiej badaniach metylacji DNA regionu wiązania czynników transkrypcyjnych genu *PHD3* z użyciem sekwencjonowania deaminowanego DNA (region chr14: 34 419 929-34 420 563) i analizy HRM (region chr14: 34 419 922-34 420 080)

u pacjentów z rakiem jelita grubego również nie zauważono metylacji DNA. Zaobserwowano jednak wyższy poziom metylacji DNA w obrębie pierwszego eksonu i intronu genu *PHD3* (region chr14: 34 419 346-34 419 943 w analizie sekwencjonowania deaminowanego DNA; regiony chr14: 34 419 795-34 419 935 i chr14: 34 419 400 -34 419 538 w analizie HRM) w pierwotnej tkance nowotworowej w porównaniu z histopatologicznie niezmienną jelita grubego. Dotychczas metylacja DNA w regionie chr14: 34 419 346-34 419 943, chr14: 34 419 795-34 419 935 i chr14: 34 419 400 -34 419 538 nie była wcześniej analizowana przez inne grupy badawcze, a dane z bazy ENCODE (ang. *encyclopedia of DNA elements*) potwierdzają, że regiony te są wrażliwe na DNazę I oraz mogą wiązać czynniki transkrypcyjne [169]. Hipotezę tę zdają się wspierać także badania Pescador i wsp., którzy zidentyfikowali funkcjonalny element HRE w pierwszym intronie genu *PHD3* oraz zaproponowali model indukcji genu *PHD3* zależny od HIF [170]. Co więcej w badaniach własnych wykazano odwrotną korelację pomiędzy poziomem metylacji DNA, a ekspresją *PHD3* na poziomie mRNA, co dodatkowo sugeruje funkcję regulatorową metylacji DNA tego genu.

Informacje naukowe na temat metylacji DNA regionu promotorowego genu *HIF-1 α* są niejednoznaczne. Wykazano na przykład brak metylacji DNA genu *HIF-1 α* u 168 pacjentek z rakiem piersi [166], natomiast zauważono zmiany poziomu metylacji DNA w trakcie różnicowania mastocytów oraz hipermetylację DNA u dwudziestu pacjentów z rakiem jelita grubego [167, 171]. Przeprowadzone w pracy doktorskiej badania na grupie 90 pacjentów nie potwierdzają tych ostatnich doniesień. Różnice mogą wynikać z zastosowania innych metod oznaczania metylacji DNA oraz mogą sugerować złożoność regulacji epigenetycznej *HIF-1 α* w raku jelita grubego. Dotychczas nie ukazały się prace naukowe przedstawiające poziom metylacji DNA w obrębie wyspy CpG genu *HIF-2 α* . W przeprowadzonych badaniach własnych wykryto w pierwotnej tkance nowotworowej wyższy poziom metylacji DNA w porównaniu z tkanką histopatologicznie niezmienną jelita grubego w regionie chr2: 46 526 521-46 527 161 z użyciem sekwencjonowania deaminowanego DNA i w regionie chr2: 46 526 762- 46 526 905 z użyciem analizy HRM oraz wykazano odwrotną korelację pomiędzy poziomem metylacji DNA, a ekspresją *HIF-2 α* na poziomie mRNA. Otrzymane wyniki mogą sugerować rolę metylacji DNA w regulacji ekspresji na poziomie mRNA genu *HIF-2 α* . Potwierdzają to również dane w oparciu o bazę ENCODE [169]. Badany fragment wyspy CpG genu *HIF-2 α* jest miejscem silnego wiązania

czynników transkrypcyjnych oraz regionem innego typu modyfikacji epigenetycznych, takich jak acetylacja histonów.

Doświadczenia przeprowadzone przez Sharzarda i wsp. pokazują, że hipoksja może promować zmiany metylacji DNA w liniach komórkowych raka jelita grubego i czerniaka [172]. Z tego powodu, w celu oceny roli metylacji DNA i poziomu ekspresji badanych genów eksperymenty realizowane w ramach pracy doktorskiej zostały przeprowadzone w warunkach prawidłowej zawartości tlenu (normoksji) oraz hipoksji (1% O₂) na ustalonych liniach komórkowych raka jelita grubego, DLD-1 i HCT116. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian metylacji DNA regionów promotorowych, poziomu mRNA oraz białka dla genów *PHD1* i *FIH* w warunkach hipoksji i normoksji w badanych liniach komórkowych. Zaobserwowano jednak wzrost ilości produktu białkowego genu *HIF-1α* oraz wzrost ilości transkryptu i białka genu *PHD2* w warunkach hipoksji przy równoczesnym braku zmian poziomu metylacji DNA wysp CpG tych genów w obu liniach komórkowych. Wzrost ekspresji genu *PHD2* potwierdza przedstawioną przez D'Angelo hipotezę o zależnej od HIF-1α indukcji ekspresji genu *PHD2* [113]. Różnice w ilości białka HIF-1α w warunkach hipoksji i normoksji wskazują natomiast, że podlega ono degradacji regulowanej posttranslacyjnie w warunkach normoksji [37].

Analogiczne badania własne dotyczące poziomu metylacji DNA i ekspresji genu *PHD3* w warunkach hipoksji i normoksji w linii komórkowej HCT116 pozwoliły wykryć wysoki poziom metylacji DNA genu *PHD3* i brak zmian poziomu transkryptu oraz białka. Z kolei w linii komórkowej DLD-1 nie wykryto metylacji DNA w analizowanych warunkach zawartości tlenu, ale zaobserwowano istotny statystycznie wzrost transkryptu oraz białka genu *PHD3* w warunkach hipoksji. Zgodnie z wcześniejszym opisem gen *PHD3* posiada w regionie promotorowym element HRE i przypuszczalnie może być aktywowany przez HIF w warunkach hipoksji [40]. Brak wzrostu ekspresji *PHD3* w linii komórkowej HCT116 w 1% zawartości tlenu może być wynikiem metylacji DNA w obrębie badanej wyspy CpG. W innych badaniach, przeprowadzonych na liniach komórkowych szpiczaka mnogiego, czerniaka, prostaty i sutka uzyskano podobną korelację pomiędzy zmniejszoną ekspresją transkryptu *PHD3*, a wysokim poziomem metylacji wyspy CpG [86, 165].

Badania własne wykluczyły zmiany poziomu transkryptu genu *HIF-2α* w warunkach hipoksji i normoksji w linii komórkowej HCT116, jednak poziom białka HIF-2α był wyższy w warunkach hipoksji. Z kolei, w linii komórkowej DLD-1 zauważono istotny statystycznie wzrost zarówno ilości transkryptu jak i białka HIF-2α w warunkach hipoksji w porównaniu

do normoksji. Tylko w linii HCT116 zaobserwowano metylację DNA regionu chr2: 46 526 762- 46 526 905, niezależną od warunków tlenowych hodowli komórkowej. Wzrost ilości białka HIF-2 α w warunkach hipoksji potwierdza jego tlenowo-zależną stabilizację. Niemniej jednak na uwagę zasługuje fakt, że poziom białka dla linii komórkowej HCT116, gdzie wykryto metylację DNA, był niższy w porównaniu z linią DLD-1. Ponadto zaobserwowany wzrost ilości transkryptu HIF-2 α w warunkach hipoksji, charakterystyczny dla linii komórkowej DLD-1 odbywał się bez metylacji DNA wyspy CpG, co sugeruje występowanie epigenetycznej regulacji ekspresji tego genu.

Wiele prac badawczych potwierdza, że inhibitor metylotransferaz DNA, 5-dAzaC, może indukować ekspresję wielu genów w różnych typach nowotworów poprzez mechanizm demetylacji pasywnej, a także hamować wzrost linii komórkowych raka jelita grubego [173, 174]. Dane mikromacierzowe potwierdzają, że ekspresja ponad 1000 genów może ulegać indukcji za pomocą 5-dAzaC w ustalonej linii komórkowej raka jelita grubego SW116 [175]. W celu sprawdzenia roli metylacji DNA wyspy CpG genu *PHD3* i *HIF-2 α* linie komórkowe HCT116 i DLD-1 inkubowano z 5-dAzaC, w warunkach hipoksji i normoksji. W przeprowadzonych doświadczeniach pracy doktorskiej zaobserwowano demetylację DNA w regionie chr14: 34 419 922-34 420 080, chr14: 34 419 795-34 419 935 i chr14: 34 419 400 -34 419 538 wyspy CpG genu *PHD3* w linii komórkowej HCT116 inkubowanej z 5-dAzaC, co korelowało ze wzrostem poziomu transkryptu i białka. Wykazano również, że te regiony DNA nie podlegały metylacji w linii komórkowej DLD-1 w warunkach hipoksji i normoksji podczas inkubacji z 5-dAzaC. Nie zaobserwowano również istotnych statystycznie zmian w ekspresji genu *PHD3* dla tej linii po inkubacji z 5-dAzaC. Występowanie hipermetylacji DNA w obrębie wyspy CpG genu *PHD3* jest obserwowane również w innych typach nowotworów, co sugeruje rolę modyfikacji epigenetycznej regionu promotorowego tego genu w karcynogenezie. Obniżenie ekspresji genu *PHD3* w wyniku metylacji DNA mogłoby umożliwić stabilizację białka HIF-1 α i odpowiedź komórkową podczas niedotlenienia [86]. Jednak w wybranych liniach komórkowych raka piersi, prostaty, czerniaka i nerek wykazano, że wzrost poziomu białka HIF-1 α w trakcie hipoksji jest niezależny od hipermetylacji DNA regionu promotorowego genu *PHD3*, co sugeruje rolę tej hydroksylazy prolinowej w innych procesach komórkowych [86]. Koncepcja taka jest również zgodna z przedstawionymi w tej pracy obserwacjami dla genu *HIF-2 α* , wobec którego *PHD3* wykazuje wyższą aktywność w porównaniu do HIF-1 α [40].

Wyniki prezentowane w niniejszej pracy doktorskiej po raz pierwszy pokazują znaczenie metylacji DNA w ekspresji genu *HIF-2 α* . W przeprowadzonych doświadczeniach wykazano obecność demetylowanego DNA w regionie promotorowym tego genu w linii komórkowej HCT116, co wiąże się z obserwowanym wzrostem transkryptu i białka, niezależnie od warunków tlenowych. Stwierdzono również wzrost ilości transkryptu *HIF-2 α* w linii komórkowej DLD-1 po inkubacji z 5-dAzac w warunkach normoksji. Uważa się, że 5-dAzaC demetylując regiony promotorowe czynników transkrypcyjnych, może zwiększać ich ekspresję i w ten sposób wpływać na ekspresję innych genów, w których nie wykryto metylacji DNA. Wzrost poziomu transkryptu w linii DLD-1 nie był jednak związany ze wzrostem ilości białka *HIF-2 α* w tych samych warunkach najprawdopodobniej na skutek aktywności hydroksylaz. Co ciekawe, wzrost ten w normoksji był obserwowany w linii komórkowej HCT116, co sugeruje występowanie nieopisanego dotąd mechanizmu, który pozwala na stabilizację tego białka również w warunkach prawidłowego stężenia tlenu.

Rozbieżność otrzymanych wyników dla obu linii komórkowych mogą ostatecznie wynikać z różnego profilu mutacji w genach *APC*, *TP53* czy *CTNNB1* (ang. *catenin* (*cadherin-associated protein*), *beta 1*), co może mieć wpływ na zmiany metylacji DNA komórek nowotworowych HCT116 i DLD-1. Ponadto pomimo wykazania pozytywnego dowodu wpływu metylacji DNA na ekspresję *PHD3* i *HIF2- α* przedstawione wyniki nie wykluczają udziału innych typów mechanizmów regulacji ekspresji genów, jak np. aberracje chromosomowe czy mutacje genowe, w ostatecznej aktywności produktów białkowych tych genów w trakcie karcynogenezy jelita grubego.

6. WNIOSKI

1. Udział procesu metylacji DNA w regulacji ekspresji genów *PHD3* i *HIF-2 α* sugeruje odwrotna korelacja poziomu metylacji DNA w obrębie wyspy CpG opisywanych genów ze spadkiem ich ekspresji na poziomie mRNA w pierwotnej tkance nowotworowej w porównaniu do histopatologicznie niezmienionej jelita grubego.
2. Obniżona ekspresja genów *PHD1* i *PHD2* w pierwotnej tkance nowotworowej w porównaniu do histopatologicznie niezmienionej jelita grubego wskazuje na brak powiązania z metylacją DNA w regionach promotorowych tych genów.
3. Na posttranslacyjny mechanizm regulacji ekspresji genu *FIH* wskazuje wzrost ilości białka FIH w pierwotnej tkance nowotworowej w porównaniu do histopatologicznie niezmienionej jelita grubego przy braku zarówno metylacji DNA jak i zmian ilości transkryptu.
4. Regulacja ekspresji genu *HIF-1 α* wydaje się podlegać głównie mechanizmom posttranslacyjnym w karcynogenezie jelita grubego.
5. Wzrost ekspresji genu *PHD2* w linii komórkowej DLD-1 i HCT116 oraz genu *PHD3* w linii komórkowej raka jelita grubego DLD-1 w warunkach hipoksji potwierdza hipotezę o zależnej od HIF indukcji ekspresji obu genów. Brak zmiany ekspresji genu *PHD3* w linii komórkowej raka jelita grubego HCT116 w warunkach hipoksji może być wynikiem metylacji DNA w obrębie wyspy CpG tego genu.
6. Obserwowany tylko w linii komórkowej DLD-1 wzrost ilości transkryptu *HIF-2 α* w warunkach hipoksji wraz z brakiem metylacji DNA wyspy CpG tego genu, która miała miejsce w linii komórkowej HCT116 sugeruje występowanie epigenetycznej regulacji ekspresji genu *HIF-2 α* w badaniach *in vitro*.
7. Działanie inhibitora metylotransferaz DNA, 5-dAzaC, poprzez obniżenie poziomu metylacji DNA wysp CpG genu *PHD3* i *HIF-2 α* oraz indukcję ekspresji tych genów w linii komórkowej HCT116 potwierdza znaczenie procesu metylacji DNA w ich regulacji epigenetycznej.

8. Brak wpływu podwyższonego poziomu białka PHD3 na stabilizację białka HIF-2 α w linii komórkowej HCT116 sugeruje niezależną od białka HIF funkcję tej hydroksylazy w raku jelita grubego.

7. STRESZCZENIE

Rak jelita grubego (ang. *colorectal cancer*, CRC) jest trzecim co do częstości występowania nowotworem w Polsce oraz najczęstszym nowotworem złośliwym przewodu pokarmowego na świecie. Warunki hipoksji podczas karcynogenezy jelita grubego mogą wspierać rozwój nowotworu o bardziej agresywnym fenotypie. W pierwotnej odpowiedzi transkrypcyjnej na stres wywołany hipoksją uczestniczy czynnik indukowany hipoksją HIF (ang. *hypoxia inducible factor*). Jest on heterodimerem zbudowanym z podjednostki wrażliwej na stężenie tlenu HIF- α i podlegającej konstytutywnej ekspresji HIF- β . Zidentyfikowano trzy izoformy białka HIF- α : HIF-1 α , HIF-2 α i HIF-3 α . Pierwsze dwie są szczególnie ważne w odpowiedzi komórkowej w trakcie hipoksji, podczas gdy funkcja HIF-3 α nie jest dokładnie określona.

Białko HIF- α ma bardzo krótki okres półtrwania w warunkach prawidłowej zawartości tlenu w komórce i jego ilość jest regulowana na różne sposoby. Najlepiej opisanym mechanizmem jest degradacja HIF- α poprzez hydroksylację posttranslacyjną. Odpowiada za to rodzina hydroksylaz prolinowych PHD1, PHD2 i PHD3 (ang. *prolyl hydroxylases*) oraz hydroksylaza asparaginowa zwana czynnikiem hamującym HIF, FIH (ang. *factor inhibiting HIF*). PHD odpowiadają za hydroksylację konserwatywnych reszt prolinowych w obrębie N-końcowej domeny transaktywacyjnej białka HIF- α . Umożliwia to rozpoznanie przez kompleks ligazy E3 ubikwitynowej i skierowanie hydroksylowanego białka na proteosomalną degradację. Podobnie, FIH hydroksyluje resztę asparaginową w obrębie C-końcowej domeny transaktywacyjnej białka HIF- α . Uniemożliwia to wiązanie koaktywatorów HIF- α i zapobiega indukcji ekspresji genów zależnych od HIF. Dlatego w warunkach prawidłowej zawartości tlenu, PHD i FIH działają synergistycznie w celu ograniczenia aktywności HIF- α poprzez odpowiednio jego degradację i inaktywację. Zauważono jednak, że hipoksja i deficyt pozostałych substratów dla reakcji hydroksylacji nie jest jedynym powodem zmienionej aktywności hydroksylaz w trakcie nowotworzenia. Możliwość przeprowadzania reakcji przez te enzymy oraz indukcji genów przez HIF jest również uwarunkowana ich zawartością w komórce. Regulacja ekspresji tych genów nie jest wciąż dokładnie poznana. Geny: *PHD1*, *PHD2*, *PHD3*, *FIH*, *HIF-1 α* i *HIF-2 α* zawierają wyspę CpG w miejscach przyłączania się czynników transkrypcyjnych. Podobnie do mutacji genetycznych, hiper- lub hipometylacja DNA miejsc regulatorowych genów może spowodować zmianę ekspresji genów związanych z różnymi nowotworami, w tym jelita grubego. Celem pracy doktorskiej była weryfikacja hipotezy o wpływie metylacji DNA w obrębie sekwencji rozpoznawanych przez czynniki

transkrypcyjne na ekspresję genów *PHD1*, *PHD2*, *PHD3*, *FIH*, *HIF-1 α* i *HIF-2 α* w raku jelita grubego.

W celu określenia poziomu transkryptu i białka genów *PHD1*, *PHD2*, *PHD3*, *FIH*, *HIF-1 α* i *HIF-2 α* w pierwotnej tkance nowotworowej i histopatologicznie niezmięnionej pobranej od dziewięćdziesięciu pacjentów z rakiem jelita grubego oraz w ustalonych liniach komórkowych raka jelita grubego HCT116 i DLD-1 użyto qPCR i western blot. Poziom metylacji DNA w materiale klinicznym oraz liniach komórkowych w obrębie wyspy CpG regionu promotorowego genów *PHD1*, *PHD2*, *PHD3*, *FIH*, *HIF-1 α* i *HIF-2 α* określono za pomocą sekwencjonowania deaminowanego DNA oraz wysokorozdzielczej analizy temperatur topnienia (ang. *high resolution melting*, HRM).

Stwierdzono istotny statystycznie obniżony poziom transkryptu ($p=0,000296$, $p<0,00001$, $p<0,00001$) oraz białka ($p=0,00416$, $p=0,0071$, $p<0,00001$) *PHD1*, *PHD2* i *PHD3* w pierwotnej tkance nowotworowej w porównaniu z histopatologicznie niezmięnią. Analogicznie stwierdzono również obniżony poziom transkryptu *HIF-2 α* ($p=0,000027$) w pierwotnej tkance nowotworowej. W przeciwieństwie do opisanych powyżej wyników, nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy na poziomie mRNA *FIH* i *HIF-1 α* pomiędzy pierwotną tkanką nowotworową, a histopatologicznie niezmięnią. Jednakże, wykazano istotny statystycznie wyższy poziom białka *FIH* ($p=0,0169$) w pierwotnej tkance nowotworowej w porównaniu z histopatologicznie niezmięnią. Spadek ekspresji na poziomie mRNA genu *PHD3* i *HIF-2 α* był odwrotnie skorelowany z metylacją DNA w obrębie [176]DNA w obrębie wysp CpG powyższych genów. Wykazano również demetylację regionu promotorowego genów *PHD3* i *HIF-2 α* po inkubacji z inhibitorem metylotransferaz DNA, 5- dAzaC, co korelowało ze wzrostem transkryptu i białka tych genów w ustalonej linii komórkowej raka jelita grubego HCT116 w warunkach hipoksji i normoksji. Wyniki te wskazują na znaczenie procesu metylacji DNA w regulacji ekspresji genów *PHD3* i *HIF-2 α* w raku jelita grubego.

8. SUMMARY

Colorectal cancer (CRC) is one of the most comprehensively studied malignancies. It is the third most common cancer among adults in Poland. Hypoxic conditions during formation of CRC may support the development of more aggressive cancers. Hypoxia inducible factor (HIF) is heterodimeric complex composed of an oxygen induced HIF- α and constitutively expressed HIF- β which mediate the primary transcriptional response to hypoxic stress. There are three isoforms of the HIF- α subunit: HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α . The first two are particularly important for the hypoxic response, while HIF-3 α function is much less understood.

HIF- α is constitutively expressed in the tissue; however, it has an extremely short half-life in normoxic conditions. The level of HIF- α protein is regulated in several ways. The most well known is its degradation through post-translational hydroxylation. To date, two oxygen-dependent hydroxylation pathways have been identified that involve of Fe²⁺ and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases. The first pathway is initiated by three prolyl hydroxylase domain enzymes, PHD1, PHD2 and PHD3, and the second pathway involves the factor-inhibiting HIF (FIH). The PHD enzymes hydroxylate the conserved proline residues in the N-terminal transactivation domain of HIF-1 α protein. This allows E3 ubiquitin ligase complex to bind HIF-1 α and target it for degradation by the 26S proteasome. Similarly, FIH hydroxylate the asparagine residue within the C-terminal transactivation domain of HIF- α . This results in prevention of HIF- α interaction with its coactivators. Thus, under normoxic conditions, PHD and FIH enzymes act synergistically to restrict the activity of HIF-1 α by degradation and inactivation, respectively. However, oxygen concentration is not the only cause of altered PHD function and HIF stability during tumorigenesis. The contribution of PHD and HIF to cell behaviour depends on several conditions, including the relative abundance of PHD and HIF proteins in a specific tissue.

The mechanism by which these genes might be regulated is still not well elucidated. Interestingly, *PHDs*, *FIH* and *HIF- α* genes possess a CpG island within their promoter region. Similarly to genetic mutations, hyper- or hypomethylation of gene regulatory sequences have been shown to potentially change the expression of cancer related genes in different malignancies, including CRC. The aim of the dissertation was to test the hypothesis about the role of DNA methylation within promoter regulatory regions of genes *PHD1*, *PHD2*, *PHD3*, *FIH*, *HIF-1 α* and *HIF-2 α* in colorectal cancer.

Using qPCR and western blotting *PHD1*, *PHD2*, *PHD3*, *FIH*, *HIF-1 α* and *HIF-2 α* gene expression was evaluated in primary colonic adenocarcinoma and adjacent histopathologically unchanged colonic mucosa from patients who underwent radical surgical resection of the colon (n=90). The same methods were used for assessment of gene expression in HCT116 and DLD-1 CRC cell lines. DNA methylation levels of the CpG island in the promoter regulatory region of *PHD1*, *PHD2*, *PHD3*, *FIH*, *HIF-1 α* and *HIF-2 α* were assessed using bisulfite DNA sequencing and high resolution melting analysis (HRM) for patients and CRC cell lines.

Significantly lower levels of *PHD1*, *PHD2* and *PHD3* transcripts (p=0.000296; p<0.00001; p<0.00001) and proteins (p=0.00416; p=0.0071; p<0.00001) were found in primary cancerous than in histopathologically unchanged tissues. Reduced transcript level of *HIF-2 α* was also observed in primary cancerous tissue (p=0.000027). Despite this, statistically significant differences were not observed in *FIH* and *HIF-1 α* transcript levels between cancerous and histopathologically unchanged colorectal tissue. However, a significantly increased level of *FIH* protein (p=0.0169) was found in CRC. The reduced *PHD3* (p<0.0001) and *HIF-2 α* (p=0.0003) transcript was correlated with significantly increased DNA methylation in the CpG island of the *PHD3* and *HIF-2 α* promoter regulatory region, respectively. The diminished expression of *PHD1* and *PHD2* and elevated level of *FIH* protein in cancerous tissue compared to histopathologically unchanged colonic mucosa was not associated with DNA methylation within the CpG islands of the *PHD1*, *PHD2* and *FIH* genes. An inhibitor of DNA methyltransferases, 5-aza-2'-deoxycytidine, was also found to induce DNA demethylation of the *PHD3* and *HIF-2 α* promoter regulatory region, which was associated with increased transcript and protein levels in HCT116 cells under hypoxic and normoxic conditions. These results confirm the importance of DNA methylation in the regulation of *PHD3* and *HIF-2 α* expression in colorectal cancer.

9. WYKAZ RYCIN

Rycina 1. Budowa i struktura HIF-1/2/3 α oraz HIF-1 β .

Rycina 2. Regulacja stabilności podjednostki HIF- α poprzez hydroksylację w zależności od dostępności tlenu.

Rycina 3. Schemat reakcji metylacji cytozyny.

Rycina 4. Model zmian genetycznych i epigenetycznych zachodzących w trakcie karcynogenezy jelita grubego.

Rycina 5. Krzywa wzorcowa BSA.

Rycina 6. Mechanizm obrazujący reakcję deaminacji cytozyny do uracylu.

Rycina 7. Mapa plazmidu pGEM-T Easy.

Rycina 8. Ilość transkryptu PHD1, PHD2, PHD3 i FIH (A) i HIF1 α , HIF2 α (B) w pierwotnej tkance nowotworowej i histopatologicznie niezmienionej jelita grubego pobranych od pacjentów z CRC.

Rycina 9. Ilość białka PHD1, PHD2, PHD3 i FIH w pierwotnej tkance nowotworowej i histopatologicznie niezmienionej jelita grubego pobranych od pacjentów z CRC.

Rycina 10. Przykładowy wynik analizy western blot dla tkanki histopatologicznie niezmienionej (N) i pierwotnej tkanki nowotworowej (C) u pacjentów z CRC.

Rycina 11. Określenie poziomu metylacji DNA regionu promotorowego *PHD1* (A), *PHD2* (B,C), *PHD3* (D,E), *FIH* (F), *HIF-1 α* (G,H), *HIF-2 α* (I, J, K) z użyciem sekwencjonowania deaminowanego DNA i analizy HRM.

Rycina 12. Współczynnik ekspresji genu *PHD3* (A) i *HIF-2 α* (B) na poziomie mRNA w tkance nowotworowej w porównaniu z tkanką histopatologicznie niezmienioną w trzech zakresach metylacji DNA analizowanego regionu promotorowego: 0-1%, 1-10% i 10-100%.

Rycina 13. Poziom metylacji DNA i ekspresji genu *PHD1* (A), *PHD2* (B), *PHD3* (C), *FIH* (D), *HIF-1 α* (E) i *HIF-2 α* (F) w ustalonych liniach komórkowych raka jelita grubego HCT116 i DLD-1.

Rycina 14. Określenie poziomu metylacji DNA regionu promotorowego genu *PHD3* (A-PHD3.1, B-PHD3.2, C-PHD3.3) i *HIF-2 α* (D-HIF2 α .3) w linii komórkowej DLD-1 i HCT116 po traktowaniu 5-dAzaC w warunkach hipoksji i normoksji z użyciem analizy HRM.

Rycina 15. Wpływ 5-dAzaC na poziom transkryptu (A) i białka (B) genu *PHD3* w liniach komórkowych HCT116 i DLD-1.

Rycina 16. Wpływ 5-dAzaC na poziom transkryptu (A) i białka (B) genu *HIF-2 α* w liniach komórkowych HCT116 i DLD-1.

10. WYKAZ TABEL

Tabela 1. Wybrane geny indukowane przez HIF posiadające sekwencję HRE w regionie promotora.

Tabela 2. Charakterystyka kliniczna pacjentów.

Tabela 3. Sekwencje oligonukleotydów użytych w reakcji qPCR.

Tabela 4. Przeciwciała użyte do detekcji białek w technice Western blot.

Tabela 5. Sekwencje oligonukleotydów użytych w reakcji PCR deaminowanego DNA.

Tabela 6. Sekwencje oligonukleotydów użytych w analizie HRM.

Tabela 7. Ilość transkryptu i białka PHD1(A), PHD2 (B), PHD3 (C), FIH (D) i transkryptu HIF-1 α (E), HIF-2 α (F) w pierwotnej tkance nowotworowej i histopatologicznie niezmięnionej jelita grubego pobranych od pacjentów z CRC z uwzględnieniem charakterystyki klinicznej.

Tabela 8. Poziom metylacji DNA regionu promotorowego genu *PHD3* i *HIF-2 α* w pierwotnej tkance nowotworowej i histopatologicznie niezmięnionej jelita grubego u chorych z CRC.

11. LITERATURA

1. *Nowotwory złośliwe w Wielkopolsce w 2010 roku*. Wielkopolskie Centrum Onkologii, 2012.
2. Gil J, S.A., Łaczmańska I, Sasiadek M., *Sporadycznyrak jelita grubego – czynniki modulujące indywidualną wrażliwość na zachorowanie*. Wspólcz Onkol, 2010. **14**(3): p. 211-216.
3. Brenner, H., M. Hoffmeister, V. Arndt, et al., *Gender differences in colorectal cancer: implications for age at initiation of screening*. Br J Cancer, 2007. **96**(5): p. 828-31.
4. Qiu, Y., M.J. Langman, and M.C. Eggo, *Targets of 17beta-oestradiol-induced apoptosis in colon cancer cells: a mechanism for the protective effects of hormone replacement therapy?* J Endocrinol, 2004. **181**(2): p. 327-37.
5. Rennert, G., H.S. Rennert, M. Pinchev, et al., *Use of hormone replacement therapy and the risk of colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2009. **27**(27): p. 4542-7.
6. Samad, A.K., R.S. Taylor, T. Marshall, et al., *A meta-analysis of the association of physical activity with reduced risk of colorectal cancer*. Colorectal Dis, 2005. **7**(3): p. 204-13.
7. Bianchini, F., R. Kaaks, and H. Vainio, *Overweight, obesity, and cancer risk*. Lancet Oncol, 2002. **3**(9): p. 565-74.
8. Terry, P., E. Giovannucci, K.B. Michels, et al., *Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer*. J Natl Cancer Inst, 2001. **93**(7): p. 525-33.
9. Gonzalez, C.A., *Nutrition and cancer: the current epidemiological evidence*. Br J Nutr, 2006. **96 Suppl 1**: p. S42-5.
10. Huxley, R.R., A. Ansary-Moghaddam, P. Clifton, et al., *The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence*. Int J Cancer, 2009. **125**(1): p. 171-80.
11. Williams, E.A., *Folate, colorectal cancer and the involvement of DNA methylation*. Proc Nutr Soc, 2012. **71**(4): p. 592-7.
12. Crohn, B., *The sigmoidoscopic picture of chronic ulcerative colitis*. Amer J Med Sci, 1925. **170**: p. 220-228.
13. Munkholm, P., *Review article: the incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease*. Aliment Pharmacol Ther, 2003. **18 Suppl 2**: p. 1-5.

14. Danese, S. and A. Mantovani, *Inflammatory bowel disease and intestinal cancer: a paradigm of the Yin-Yang interplay between inflammation and cancer*. *Oncogene*, 2010. **29**(23): p. 3313-23.
15. Mantovani, A., *Cancer: Inflaming metastasis*. *Nature*, 2009. **457**(7225): p. 36-7.
16. Lutgens, M.W., F.P. Vleggaar, M.E. Schipper, et al., *High frequency of early colorectal cancer in inflammatory bowel disease*. *Gut*, 2008. **57**(9): p. 1246-51.
17. Levin, B., *Inflammatory bowel disease and colon cancer*. *Cancer*, 1992. **70**(5 Suppl): p. 1313-6.
18. Askling, J., P.W. Dickman, P. Karlen, et al., *Colorectal cancer rates among first-degree relatives of patients with inflammatory bowel disease: a population-based cohort study*. *Lancet*, 2001. **357**(9252): p. 262-6.
19. Persson, P.G., O. Bernell, C.E. Leijonmarck, et al., *Survival and cause-specific mortality in inflammatory bowel disease: a population-based cohort study*. *Gastroenterology*, 1996. **110**(5): p. 1339-45.
20. Aaltonen, L.A., S.R. Hamilton, World Health Organization., et al., *Pathology and genetics of tumours of the digestive system*. 2000, Lyon Oxford. 314 p.
21. Half, E., D. Bercovich, and P. Rozen, *Familial adenomatous polyposis*. *Orphanet J Rare Dis*, 2009. **4**: p. 22.
22. Drews, M., J. Paszkowski, T. Banasiewicz, et al., *Genetycznie uwarunkowane choroby nowotworowe jelita grubego – kryteria rozpoznania i metody diagnostyczne*. *Nowotwory*, 2000. **50**(2): p. 159-164.
23. Omundsen, M. and F.F. Lam, *The other colonic polyposis syndromes*. *ANZ J Surg*, 2012. **82**(10): p. 675-81.
24. Chow, E. and F. Macrae, *A review of juvenile polyposis syndrome*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2005. **20**(11): p. 1634-40.
25. Boland, C.R., S.N. Thibodeau, S.R. Hamilton, et al., *A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer*. *Cancer Res*, 1998. **58**(22): p. 5248-57.
26. Dukes, C., *The classification of cancer of the rectum*. *J Pathol Bact* 1932. **35**: p. 323-332.
27. Vaupel, P., *Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology*. *Semin Radiat Oncol*, 2004. **14**(3): p. 198-206.

28. Erler, J.T., K.L. Bennewith, M. Nicolau, et al., *Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis*. *Nature*, 2006. **440**(7088): p. 1222-6.
29. Yao, K., J.A. Gietema, S. Shida, et al., *In vitro hypoxia-conditioned colon cancer cell lines derived from HCT116 and HT29 exhibit altered apoptosis susceptibility and a more angiogenic profile in vivo*. *Br J Cancer*, 2005. **93**(12): p. 1356-63.
30. Brahimi-Horn, M.C., G. Bellot, and J. Pouyssegur, *Hypoxia and energetic tumour metabolism*. *Curr Opin Genet Dev*, 2011. **21**(1): p. 67-72.
31. Adams, G.E., S. Dische, J.F. Fowler, et al., *Hypoxic cell sensitisers in radiotherapy*. *Lancet*, 1976. **1**(7952): p. 186-8.
32. Comerford, K.M., T.J. Wallace, J. Karhausen, et al., *Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene*. *Cancer Res*, 2002. **62**(12): p. 3387-94.
33. Semenza, G.L. and G.L. Wang, *A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation*. *Mol Cell Biol*, 1992. **12**(12): p. 5447-54.
34. Lisy, K. and D.J. Peet, *Turn me on: regulating HIF transcriptional activity*. *Cell Death Differ*, 2008. **15**(4): p. 642-9.
35. Webb, J.D., M.L. Coleman, and C.W. Pugh, *Hypoxia, hypoxia-inducible factors (HIF), HIF hydroxylases and oxygen sensing*. *Cell Mol Life Sci*, 2009. **66**(22): p. 3539-54.
36. Kenneth, N.S. and S. Rocha, *Regulation of gene expression by hypoxia*. *Biochem J*, 2008. **414**(1): p. 19-29.
37. Brahimi-Horn, M.C. and J. Pouyssegur, *HIF at a glance*. *J Cell Sci*, 2009. **122**(Pt 8): p. 1055-7.
38. Epstein, A.C., J.M. Gleadle, L.A. McNeill, et al., *C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation*. *Cell*, 2001. **107**(1): p. 43-54.
39. Jokilehto, T. and P.M. Jaakkola, *The role of HIF prolyl hydroxylases in tumour growth*. *J Cell Mol Med*, 2010. **14**(4): p. 758-70.
40. Appelhoff, R.J., Y.M. Tian, R.R. Raval, et al., *Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(37): p. 38458-65.

41. Stolze, I.P., Y.M. Tian, R.J. Appelhoff, et al., *Genetic analysis of the role of the asparaginyl hydroxylase factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) in regulating hypoxia-inducible factor (HIF) transcriptional target genes [corrected]*. J Biol Chem, 2004. **279**(41): p. 42719-25.
42. Semenza, G.L., *HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(2): p. 167-71.
43. Kim, J.W., I. Tchernyshyov, G.L. Semenza, et al., *HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia*. Cell Metab, 2006. **3**(3): p. 177-85.
44. Papatheou, I., R.A. Cairns, L. Fontana, et al., *HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption*. Cell Metab, 2006. **3**(3): p. 187-97.
45. Ullah, M.S., A.J. Davies, and A.P. Halestrap, *The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1alpha-dependent mechanism*. J Biol Chem, 2006. **281**(14): p. 9030-7.
46. Ivanov, S., S.Y. Liao, A. Ivanova, et al., *Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer*. Am J Pathol, 2001. **158**(3): p. 905-19.
47. Kelly, B.D., S.F. Hackett, K. Hirota, et al., *Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1*. Circ Res, 2003. **93**(11): p. 1074-81.
48. Rankin, E.B. and A.J. Giaccia, *The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis*. Cell Death Differ, 2008. **15**(4): p. 678-85.
49. Mukhopadhyay, C.K., B. Mazumder, and P.L. Fox, *Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency*. J Biol Chem, 2000. **275**(28): p. 21048-54.
50. Feldser, D., F. Agani, N.V. Iyer, et al., *Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2*. Cancer Res, 1999. **59**(16): p. 3915-8.
51. Krishnamachary, B., S. Berg-Dixon, B. Kelly, et al., *Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1*. Cancer Res, 2003. **63**(5): p. 1138-43.

52. Li, J., X. Zhang, D.P. Sejas, et al., *Hypoxia-induced nucleophosmin protects cell death through inhibition of p53*. J Biol Chem, 2004. **279**(40): p. 41275-9.
53. Pouyssegur, J., F. Dayan, and N.M. Mazure, *Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression*. Nature, 2006. **441**(7092): p. 437-43.
54. Sullivan, R. and C.H. Graham, *Hypoxia-driven selection of the metastatic phenotype*. Cancer Metastasis Rev, 2007. **26**(2): p. 319-31.
55. Chan, D.A. and A.J. Giaccia, *Hypoxia, gene expression, and metastasis*. Cancer Metastasis Rev, 2007. **26**(2): p. 333-9.
56. Yang, M.H., M.Z. Wu, S.H. Chiou, et al., *Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(3): p. 295-305.
57. Hammoud, S.S., B.R. Cairns, and D.A. Jones, *Epigenetic regulation of colon cancer and intestinal stem cells*. Curr Opin Cell Biol, 2013. **25**(2): p. 177-83.
58. Waldmann, T. and R. Schneider, *Targeting histone modifications--epigenetics in cancer*. Curr Opin Cell Biol, 2013. **25**(2): p. 184-9.
59. Winter, J. and S. Diederichs, *MicroRNA biogenesis and cancer*. Methods Mol Biol, 2011. **676**: p. 3-22.
60. Kondo, Y., *Epigenetic cross-talk between DNA methylation and histone modifications in human cancers*. Yonsei Med J, 2009. **50**(4): p. 455-63.
61. Lister, R., M. Pelizzola, R.H. Dowen, et al., *Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences*. Nature, 2009. **462**(7271): p. 315-22.
62. Takai, D. and P.A. Jones, *Origins of bidirectional promoters: computational analyses of intergenic distance in the human genome*. Mol Biol Evol, 2004. **21**(3): p. 463-7.
63. Saxonov, S., P. Berg, and D.L. Brutlag, *A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(5): p. 1412-7.
64. Miranda, T.B. and P.A. Jones, *DNA methylation: the nuts and bolts of repression*. J Cell Physiol, 2007. **213**(2): p. 384-90.
65. Hendrich, B. and A. Bird, *Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(11): p. 6538-47.
66. Fujita, N., N. Shimotake, I. Ohki, et al., *Mechanism of transcriptional regulation by methyl-CpG binding protein MBD1*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(14): p. 5107-18.

67. Ballestar, E., M.F. Paz, L. Valle, et al., *Methyl-CpG binding proteins identify novel sites of epigenetic inactivation in human cancer*. *Embo J*, 2003. **22**(23): p. 6335-45.
68. Delaval, K. and R. Feil, *Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting*. *Curr Opin Genet Dev*, 2004. **14**(2): p. 188-95.
69. Heard, E., *Recent advances in X-chromosome inactivation*. *Curr Opin Cell Biol*, 2004. **16**(3): p. 247-55.
70. Howard, G., R. Eiges, F. Gaudet, et al., *Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice*. *Oncogene*, 2008. **27**(3): p. 404-8.
71. Jurkowska, R.Z., T.P. Jurkowski, and A. Jeltsch, *Structure and function of mammalian DNA methyltransferases*. *Chembiochem*, 2011. **12**(2): p. 206-22.
72. Goll, M.G., F. Kirpekar, K.A. Maggert, et al., *Methylation of tRNAAsp by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2*. *Science*, 2006. **311**(5759): p. 395-8.
73. Chen, Z.X. and A.D. Riggs, *DNA methylation and demethylation in mammals*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(21): p. 18347-53.
74. Lyko, F. and R. Brown, *DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies*. *J Natl Cancer Inst*, 2005. **97**(20): p. 1498-506.
75. Brueckner, B., D. Kuck, and F. Lyko, *DNA methyltransferase inhibitors for cancer therapy*. *Cancer J*, 2007. **13**(1): p. 17-22.
76. Weisenberger, D.J., M. Velicescu, J.C. Cheng, et al., *Role of the DNA methyltransferase variant DNMT3b3 in DNA methylation*. *Mol Cancer Res*, 2004. **2**(1): p. 62-72.
77. Wu, S.C. and Y. Zhang, *Active DNA demethylation: many roads lead to Rome*. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **11**(9): p. 607-20.
78. Tahiliani, M., K.P. Koh, Y. Shen, et al., *Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1*. *Science*, 2009. **324**(5929): p. 930-5.
79. Dahl, C., K. Gronbaek, and P. Guldborg, *Advances in DNA methylation: 5-hydroxymethylcytosine revisited*. *Clin Chim Acta*, 2011. **412**(11-12): p. 831-6.
80. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. *Cell*, 1990. **61**(5): p. 759-67.
81. Bienz, M. and H. Clevers, *Linking colorectal cancer to Wnt signaling*. *Cell*, 2000. **103**(2): p. 311-20.

82. Arends, M.J., *Pathways of colorectal carcinogenesis*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2013. **21**(2): p. 97-102.
83. Worthley, D.L., V.L. Whitehall, K.J. Spring, et al., *Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(28): p. 3784-91.
84. Esteller, M., M.F. Fraga, M. Guo, et al., *DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(26): p. 3001-7.
85. Toyota, M., N. Ahuja, M. Ohe-Toyota, et al., *CpG island methylator phenotype in colorectal cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(15): p. 8681-6.
86. Place, T.L., M.P. Fitzgerald, S. Venkataraman, et al., *Aberrant promoter CpG methylation is a mechanism for impaired PHD3 expression in a diverse set of malignant cells*. PLoS One, 2011. **6**(1): p. e14617.
87. Soilleux, E.J., H. Turley, Y.M. Tian, et al., *Use of novel monoclonal antibodies to determine the expression and distribution of the hypoxia regulatory factors PHD-1, PHD-2, PHD-3 and FIH in normal and neoplastic human tissues*. Histopathology, 2005. **47**(6): p. 602-10.
88. Andersen, S., T. Donnem, H. Stenvold, et al., *Overexpression of the HIF hydroxylases PHD1, PHD2, PHD3 and FIH are individually and collectively unfavorable prognosticators for NSCLC survival*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e23847.
89. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
90. Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, et al., *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. Genome Biol, 2002. **3**(7): p. RESEARCH0034.
91. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
92. Bock, C., S. Reither, T. Mikeska, et al., *BiQ Analyzer: visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfite sequencing*. Bioinformatics, 2005. **21**(21): p. 4067-8.

93. Rohde, C., Y. Zhang, T.P. Jurkowski, et al., *Bisulfite sequencing Data Presentation and Compilation (BDPC) web server--a useful tool for DNA methylation analysis*. *Nucleic Acids Res*, 2008. **36**(5): p. e34.
94. Wojdacz, T.K. and A. Dobrovic, *Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation*. *Nucleic Acids Res*, 2007. **35**(6): p. e41.
95. Rawluszko, A.A., K. Horbacka, P. Krokowicz, et al., *Decreased expression of 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is associated with DNA hypermethylation in colorectal cancer located in the proximal colon*. *BMC Cancer*, 2011. **11**(1): p. 522.
96. Hsieh, C.L., *Dependence of transcriptional repression on CpG methylation density*. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**(8): p. 5487-94.
97. Shao, Y., W. Zhang, C. Zhang, et al., *High-resolution melting analysis of BLU methylation levels in gastric, colorectal, and pancreatic cancers*. *Cancer Invest*, 2010. **28**(6): p. 642-8.
98. Dimitrakopoulos, L., P.A. Vorkas, V. Georgoulas, et al., *A closed-tube methylation-sensitive high resolution melting assay (MS-HRMA) for the semi-quantitative determination of CST6 promoter methylation in clinical samples*. *BMC Cancer*, 2012. **12**: p. 486.
99. Brahimi-Horn, M.C., J. Chiche, and J. Pouyssegur, *Hypoxia and cancer*. *J Mol Med (Berl)*, 2007. **85**(12): p. 1301-7.
100. Couvelard, A., L. Deschamps, V. Rebours, et al., *Overexpression of the oxygen sensors PHD-1, PHD-2, PHD-3, and FIH Is associated with tumor aggressiveness in pancreatic endocrine tumors*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(20): p. 6634-9.
101. Boddy, J.L., S.B. Fox, C. Han, et al., *The androgen receptor is significantly associated with vascular endothelial growth factor and hypoxia sensing via hypoxia-inducible factors HIF-1a, HIF-2a, and the prolyl hydroxylases in human prostate cancer*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(21): p. 7658-63.
102. Zhang, Q., J. Gu, L. Li, et al., *Control of cyclin D1 and breast tumorigenesis by the EglN2 prolyl hydroxylase*. *Cancer Cell*, 2009. **16**(5): p. 413-24.
103. Erez, N., M. Milyavsky, R. Eilam, et al., *Expression of prolyl-hydroxylase-1 (PHD1/EGLN2) suppresses hypoxia inducible factor-1alpha activation and inhibits tumor growth*. *Cancer Res*, 2003. **63**(24): p. 8777-83.

104. Xie, G., L. Zheng, J. Ou, et al., *Low expression of prolyl hydroxylase 2 is associated with tumor grade and poor prognosis in patients with colorectal cancer*. *Exp Biol Med* (Maywood), 2012. **237**(7): p. 860-6.
105. Peurala, E., P. Koivunen, R. Bloigu, et al., *Expressions of individual PHDs associate with good prognostic factors and increased proliferation in breast cancer patients*. *Breast Cancer Res Treat*, 2012. **133**(1): p. 179-88.
106. Jokilehto, T., K. Rantanen, M. Luukkaa, et al., *Overexpression and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase PHD2 in head and neck squamous cell carcinoma is associated with tumor aggressiveness*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(4): p. 1080-7.
107. Jokilehto, T., H. Hogel, P. Heikkinen, et al., *Retention of prolyl hydroxylase PHD2 in the cytoplasm prevents PHD2-induced anchorage-independent carcinoma cell growth*. *Exp Cell Res*, 2010. **316**(7): p. 1169-78.
108. Gossage, L., A. Zaitoun, K.R. Fareed, et al., *Expression of key hypoxia sensing prolyl-hydroxylases PHD1, -2 and -3 in pancreaticobiliary cancer*. *Histopathology*, 2010. **56**(7): p. 908-20.
109. Hogel, H., K. Rantanen, T. Jokilehto, et al., *Prolyl hydroxylase PHD3 enhances the hypoxic survival and G1 to S transition of carcinoma cells*. *PLoS One*, 2011. **6**(11): p. e27112.
110. Lee, S., E. Nakamura, H. Yang, et al., *Neuronal apoptosis linked to EglN3 prolyl hydroxylase and familial pheochromocytoma genes: developmental culling and cancer*. *Cancer Cell*, 2005. **8**(2): p. 155-67.
111. Schlisio, S., R.S. Kenchappa, L.C. Vredeveld, et al., *The kinesin KIF1Bbeta acts downstream from EglN3 to induce apoptosis and is a potential 1p36 tumor suppressor*. *Genes Dev*, 2008. **22**(7): p. 884-93.
112. Rantanen, K., J. Pursiheimo, H. Hogel, et al., *Prolyl hydroxylase PHD3 activates oxygen-dependent protein aggregation*. *Mol Biol Cell*, 2008. **19**(5): p. 2231-40.
113. D'Angelo, G., E. Duplan, N. Boyer, et al., *Hypoxia up-regulates prolyl hydroxylase activity: a feedback mechanism that limits HIF-1 responses during reoxygenation*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(40): p. 38183-7.
114. Huang, J., Q. Zhao, S.M. Mooney, et al., *Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1alpha for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(42): p. 39792-800.

115. Xue, J., X. Li, S. Jiao, et al., *Prolyl hydroxylase-3 is down-regulated in colorectal cancer cells and inhibits IKKbeta independent of hydroxylase activity*. Gastroenterology, 2010. **138**(2): p. 606-15.
116. Fu, J., K. Menzies, R.S. Freeman, et al., *EGLN3 prolyl hydroxylase regulates skeletal muscle differentiation and myogenin protein stability*. J Biol Chem, 2007. **282**(17): p. 12410-8.
117. Takeda, K., V.C. Ho, H. Takeda, et al., *Placental but not heart defects are associated with elevated hypoxia-inducible factor alpha levels in mice lacking prolyl hydroxylase domain protein 2*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(22): p. 8336-46.
118. Lando, D., D.J. Peet, D.A. Whelan, et al., *Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch*. Science, 2002. **295**(5556): p. 858-61.
119. Mahon, P.C., K. Hirota, and G.L. Semenza, *FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity*. Genes Dev, 2001. **15**(20): p. 2675-86.
120. Cockman, M.E., D.E. Lancaster, I.P. Stolze, et al., *Posttranslational hydroxylation of ankyrin repeats in IkappaB proteins by the hypoxia-inducible factor (HIF) asparaginyl hydroxylase, factor inhibiting HIF (FIH)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(40): p. 14767-72.
121. Coleman, M.L., M.A. McDonough, K.S. Hewitson, et al., *Asparaginyl hydroxylation of the Notch ankyrin repeat domain by factor inhibiting hypoxia-inducible factor*. J Biol Chem, 2007. **282**(33): p. 24027-38.
122. Ferguson, J.E., 3rd, Y. Wu, K. Smith, et al., *ASB4 is a hydroxylation substrate of FIH and promotes vascular differentiation via an oxygen-dependent mechanism*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(18): p. 6407-19.
123. Pelletier, J., F. Dayan, J. Durivault, et al., *The asparaginyl hydroxylase factor-inhibiting HIF is essential for tumor growth through suppression of the p53-p21 axis*. Oncogene, 2012. **31**(24): p. 2989-3001.
124. Fukuba, H., T. Takahashi, H.G. Jin, et al., *Abundance of asparaginyl-hydroxylase FIH is regulated by Siah-1 under normoxic conditions*. Neurosci Lett, 2008. **433**(3): p. 209-14.
125. Hu, G. and E.R. Fearon, *Siah-1 N-terminal RING domain is required for proteolysis function, and C-terminal sequences regulate oligomerization and binding to target proteins*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(1): p. 724-32.

126. Bruzzoni-Giovanelli, H., P. Fernandez, L. Veiga, et al., *Distinct expression patterns of the E3 ligase SIAH-1 and its partner Kid/KIF22 in normal tissues and in the breast tumoral processes*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2010. **29**(1): p. 10.
127. Matsuo, K., S. Satoh, H. Okabe, et al., *SIAH1 inactivation correlates with tumor progression in hepatocellular carcinomas*. Genes Chromosomes Cancer, 2003. **36**(3): p. 283-91.
128. Wen, Y.Y., Z.Q. Yang, M. Song, et al., *The expression of SIAH1 is downregulated and associated with Bim and apoptosis in human breast cancer tissues and cells*. Mol Carcinog, 2010. **49**(5): p. 440-9.
129. Birner, P., M. Schindl, A. Obermair, et al., *Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer*. Cancer Res, 2000. **60**(17): p. 4693-6.
130. Birner, P., B. Gatterbauer, G. Oberhuber, et al., *Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in oligodendrogliomas: its impact on prognosis and on neoangiogenesis*. Cancer, 2001. **92**(1): p. 165-71.
131. Birner, P., M. Schindl, A. Obermair, et al., *Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in epithelial ovarian tumors: its impact on prognosis and on response to chemotherapy*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(6): p. 1661-8.
132. Koukourakis, M.I., A. Giatromanolaki, J. Skarlatos, et al., *Hypoxia inducible factor (HIF-1a and HIF-2a) expression in early esophageal cancer and response to photodynamic therapy and radiotherapy*. Cancer Res, 2001. **61**(5): p. 1830-2.
133. Keith, B., R.S. Johnson, and M.C. Simon, *HIF1alpha and HIF2alpha: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(1): p. 9-22.
134. Semenza, G.L., *Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics*. Oncogene, 2010. **29**(5): p. 625-34.
135. Rasheed, S., A.L. Harris, P.P. Tekkis, et al., *Hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha are expressed in most rectal cancers but only hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with prognosis*. Br J Cancer, 2009. **100**(10): p. 1666-73.
136. Schmitz, K.J., C.I. Muller, H. Reis, et al., *Combined analysis of hypoxia-inducible factor 1 alpha and metallothionein indicates an aggressive subtype of colorectal carcinoma*. Int J Colorectal Dis, 2009. **24**(11): p. 1287-96.

137. Rajaganeshan, R., R. Prasad, P.J. Guillou, et al., *Expression patterns of hypoxic markers at the invasive margin of colorectal cancers and liver metastases*. Eur J Surg Oncol, 2009. **35**(12): p. 1286-94.
138. Yoshimura, H., D.K. Dhar, H. Kohno, et al., *Prognostic impact of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha in colorectal cancer patients: correlation with tumor angiogenesis and cyclooxygenase-2 expression*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(24): p. 8554-60.
139. Kuwai, T., Y. Kitadai, S. Tanaka, et al., *Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with tumor vascularization in human colorectal carcinoma*. Int J Cancer, 2003. **105**(2): p. 176-81.
140. Furlan, D., N. Sahnane, I. Carnevali, et al., *Up-regulation of the hypoxia-inducible factor-1 transcriptional pathway in colorectal carcinomas*. Hum Pathol, 2008. **39**(10): p. 1483-94.
141. Baba, Y., K. Nosho, K. Shima, et al., *HIF1A overexpression is associated with poor prognosis in a cohort of 731 colorectal cancers*. Am J Pathol, 2010. **176**(5): p. 2292-301.
142. Imamura, T., H. Kikuchi, M.T. Herraiz, et al., *HIF-1alpha and HIF-2alpha have divergent roles in colon cancer*. Int J Cancer, 2009. **124**(4): p. 763-71.
143. Rosenberger, C., S. Mandriota, J.S. Jurgensen, et al., *Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha in hypoxic and ischemic rat kidneys*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(7): p. 1721-32.
144. Hu, C.J., A. Sataur, L. Wang, et al., *The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(11): p. 4528-42.
145. Lau, K.W., Y.M. Tian, R.R. Raval, et al., *Target gene selectivity of hypoxia-inducible factor-alpha in renal cancer cells is conveyed by post-DNA-binding mechanisms*. Br J Cancer, 2007. **96**(8): p. 1284-92.
146. Kim, Y., S. Shintani, Y. Kohno, et al., *Cyclin G2 dysregulation in human oral cancer*. Cancer Res, 2004. **64**(24): p. 8980-6.
147. Cazes, A., A. Galaup, C. Chomel, et al., *Extracellular matrix-bound angiopoietin-like 4 inhibits endothelial cell adhesion, migration, and sprouting and alters actin cytoskeleton*. Circ Res, 2006. **99**(11): p. 1207-15.

148. Galaup, A., A. Cazes, S. Le Jan, et al., *Angiopoietin-like 4 prevents metastasis through inhibition of vascular permeability and tumor cell motility and invasiveness*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(49): p. 18721-6.
149. Acker, T., A. Diez-Juan, J. Aragones, et al., *Genetic evidence for a tumor suppressor role of HIF-2alpha*. Cancer Cell, 2005. **8**(2): p. 131-41.
150. Galban, S. and M. Gorospe, *Factors interacting with HIF-1alpha mRNA: novel therapeutic targets*. Curr Pharm Des, 2009. **15**(33): p. 3853-60.
151. Matsuyama, T., K. Nakanishi, T. Hayashi, et al., *Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in esophageal squamous cell carcinoma*. Cancer Sci, 2005. **96**(3): p. 176-82.
152. Hoffmann, A.C., R. Mori, D. Vallbohmer, et al., *High expression of HIF1a is a predictor of clinical outcome in patients with pancreatic ductal adenocarcinomas and correlated to PDGFA, VEGF, and bFGF*. Neoplasia, 2008. **10**(7): p. 674-9.
153. Ma, J., L. Zhang, G.Q. Ru, et al., *Upregulation of hypoxia inducible factor 1alpha mRNA is associated with elevated vascular endothelial growth factor expression and excessive angiogenesis and predicts a poor prognosis in gastric carcinoma*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(11): p. 1680-6.
154. Minet, E., I. Ernest, G. Michel, et al., *HIF1A gene transcription is dependent on a core promoter sequence encompassing activating and inhibiting sequences located upstream from the transcription initiation site and cis elements located within the 5'UTR*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **261**(2): p. 534-40.
155. Dery, M.A., M.D. Michaud, and D.E. Richard, *Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(3): p. 535-40.
156. Galban, S., Y. Kuwano, R. Pullmann, Jr., et al., *RNA-binding proteins HuR and PTB promote the translation of hypoxia-inducible factor 1alpha*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(1): p. 93-107.
157. Mohammed, N., M. Rodriguez, V. Garcia, et al., *EPAS1 mRNA in plasma from colorectal cancer patients is associated with poor outcome in advanced stages*. Oncol Lett, 2011. **2**(4): p. 719-724.
158. Kim, Y.I., *Nutritional epigenetics: impact of folate deficiency on DNA methylation and colon cancer susceptibility*. J Nutr, 2005. **135**(11): p. 2703-9.

159. Hermann, S., S. Rohrmann, and J. Linseisen, *Lifestyle factors, obesity and the risk of colorectal adenomas in EPIC-Heidelberg*. *Cancer Causes Control*, 2009. **20**(8): p. 1397-408.
160. Kim, M.S., J. Lee, and D. Sidransky, *DNA methylation markers in colorectal cancer*. *Cancer Metastasis Rev*, 2010. **29**(1): p. 181-206.
161. Chan, A.O., R.R. Broaddus, P.S. Houlihan, et al., *CpG island methylation in aberrant crypt foci of the colorectum*. *Am J Pathol*, 2002. **160**(5): p. 1823-30.
162. Suehiro, Y. and Y. Hinoda, *Genetic and epigenetic changes in aberrant crypt foci and serrated polyps*. *Cancer Sci*, 2008. **99**(6): p. 1071-6.
163. Kane, M.F., M. Loda, G.M. Gaida, et al., *Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines*. *Cancer Res*, 1997. **57**(5): p. 808-11.
164. Herman, J.G., A. Merlo, L. Mao, et al., *Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers*. *Cancer Res*, 1995. **55**(20): p. 4525-30.
165. Hatzimichael, E., A. Dasoula, R. Shah, et al., *The prolyl-hydroxylase EGLN3 and not EGLN1 is inactivated by methylation in plasma cell neoplasia*. *Eur J Haematol*, 2010. **84**(1): p. 47-51.
166. Huang, K.T., T. Mikeska, A. Dobrovic, et al., *DNA methylation analysis of the HIF-1alpha prolyl hydroxylase domain genes PHD1, PHD2, PHD3 and the factor inhibiting HIF gene FIH in invasive breast carcinomas*. *Histopathology*, 2010. **57**(3): p. 451-60.
167. Koslowski, M., U. Luxemburger, O. Tureci, et al., *Tumor-associated CpG demethylation augments hypoxia-induced effects by positive autoregulation of HIF-1alpha*. *Oncogene*, 2011. **30**(7): p. 876-82.
168. Walczak-Drzewiecka, A., M. Ratajewski, L. Pulaski, et al., *DNA methylation-dependent suppression of HIF1A in an immature hematopoietic cell line HMC-1*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **391**(1): p. 1028-32.
169. Site, U.G.B. *UCSC Genome Bioinformatics Site*. [cited; Available from: <http://genome.ucsc.edu/>].
170. Pescador, N., Y. Cuevas, S. Naranjo, et al., *Identification of a functional hypoxia-responsive element that regulates the expression of the egl nine homologue 3 (egl3/phd3) gene*. *Biochem J*, 2005. **390**(Pt 1): p. 189-97.

171. Walczak-Drzewiecka, A., A. Salkowska, M. Ratajewski, et al., *Epigenetic regulation of CD34 and HIF1A expression during the differentiation of human mast cells*. Immunogenetics, 2013. **65**(6): p. 429-38.
172. Shahrzad, S., K. Bertrand, K. Minhas, et al., *Induction of DNA hypomethylation by tumor hypoxia*. Epigenetics, 2007. **2**(2): p. 119-25.
173. Momparler, R.L., *Epigenetic therapy of cancer with 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine)*. Semin Oncol, 2005. **32**(5): p. 443-51.
174. Ghoshal, K., J. Datta, S. Majumder, et al., *5-Aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(11): p. 4727-41.
175. Tian, X.Q., Y. Zhang, D. Sun, et al., *Epigenetic silencing of LRRC3B in colorectal cancer*. Scand J Gastroenterol, 2009. **44**(1): p. 79-84.
176. Gil J, S.A., Łaczmńska I, Sąsiadek M., *Sporadyczny rak jelita grubego – czynniki modulujące indywidualną wrażliwość na zachorowanie*. Współcz Onkol, 2010. **14**(3): p. 211-216.