

lekarz Łukasz Paschke

**BIAŁKO PALCA CYNKOWEGO ZFP91:
EKSPRESJA GENU I JEGO POTENCJALNE ZNACZENIE
W PATOGENEZIE RAKA GRUCZOŁU KROKOWEGO**

*Dysertacja na stopień doktora nauk medycznych
wykonana w Katedrze Histologii i Embriologii,
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
pod kierunkiem prof. dr. hab. Ludwika K. Malendowicza*

Poznań 2014

Panu Profesorowi Ludwikowi K. Malendowiczowi
za inspirację oraz okazaną pomoc, życzliwość i wsparcie
w trakcie przygotowania niniejszej rozprawy
składam serdeczne podziękowania

Dziękuję także

Panu Profesorowi Maciejowi Zabłowi
za stworzenie niezwykle życzliwej atmosfery w Zakładzie
oraz wszystkim członkom zespołu za zaangażowanie i pomoc
przy wykonywaniu badań.

Część badań ujętych w niniejszej rozprawie doktorskiej opublikowano jako:

Paschke L, Rucinski M, Ziolkowska A, Zemleduch T, Malendowicz W, Kwias Z, Malendowicz LK.: ZFP91-A Newly Described Gene Potentially Involved in Prostate Pathology.

Pathol. Oncol. Res. (2014) 20:453–459 IF (2013): 1,806

Badania ujęte w niniejszej rozprawie wykonano w ramach „Diamentowego Grantu” Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (DI 2011 0219 41).

SPIS TREŚCI

1. Skróty stosowane w pracy	5
2. Wstęp	8
2.1. Identyfikacja i budowa ZFP91	8
2.2. Aktualny stan wiedzy o biologicznej roli ZFP91	9
2.3. Dotychczasowe badania nad rolą ZFP91 w chorobach gruczołu krokowego .	11
3. Założenia i cel pracy	17
4. Materiały i metody	18
4.1. Stosowane odczynniki i zestawy do oznaczeń (z numerem katalogowym, o ile dostępny)	18
4.2. Oprogramowanie oraz adresy internetowe	20
4.3. Hodowla komórek	21
4.4. Izolacja RNA	22
4.5. Odwrotna transkrypcja	22
4.6. Projektowanie starterów do reakcji PCR	22
4.7. Określenie efektywności reakcji PCR	24
4.8. Kontrola specyficzności produktów reakcji PCR	25
4.9. Wybór genów referencyjnych	25
4.10. Matryce cDNA	26
4.11. QPCR	27
4.12. Izolacja białka	28
4.13. Western Blotting	28
4.14. Analiza statystyczna	29
5. Wyniki	30
5.1. Analiza ekspresji mRNA ZFP91 w hodowlach komórek nabłonka gruczołu krokowego prawidłowych i raka gruczołu krokowego	30
5.2. Identyfikacja i analiza ilości białka ZFP91 w hodowlach komórek nabłonka gruczołu krokowego prawidłowych i raka gruczołu krokowego	31
5.3. Analiza ekspresji genu ZFP91 w gruczole prawidłowym oraz w przypadkach raka gruczołu krokowego	32
5.4. Analiza ekspresji genu ZFP91 w przypadkach raka gruczołu krokowego o różnym stopniu zaawansowania	33

5.5. Analiza ekspresji genu ZFP91 w niezmiennych chorobowo narządach człowieka	34
5.6. Analiza ekspresji genu ZFP91 w 19. typach nowotworów człowieka	35
5.7. Porównanie ekspresji genu ZFP91 w 15. narządach człowieka z ekspresją w wywodzących się z nich nowotworach	36
6. Dyskusja	45
7. Wnioski	52
8. Streszczenie	53
9. Abstract	55
10. Spis tabel i rycin	57
11. Piśmiennictwo	59

1. Skróty stosowane w pracy

ACTB	– beta-aktyna
ALAS1	– syntaza delta-aminolewulinianu
ARF	(alternative reading frame tumor suppressor protein) – białko supresorowe nowotworu ARF
B2M	– beta-2 mikroglobulina
BPH	(benign prostatic hyperplasia) – łagodny rozrost gruczołu krokowego
BSA	– albumina surowicy bydłowej
CD154	(cluster of differentiation 154) – antygen różnicowania komórkowego 154, znany także jako ligand białka CD40
CNTF	(ciliary neurotrophic factor) – rzęskowy czynnik neurotroficzny
dNTP	– mieszanina dezoksynukleotydów
DNA	– kwas dezoksyrybonukleinowy
DSM-8	– jeden z nieaktualnych symboli genu ZFP91
DTT	– ditiotreitol
EDTA	– wersenian sodowy
GAPDH	– dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego
HIF-1 α	(hypoxia-inducible factor-1 α) – czynnik transkrypcyjny indukowany przez hipoksję 1 α
HPRT1	– fosforybozylotransferaza hipoksantyny 1.
IL-1 β	– interleukina 1 β
IL1R1	– receptor 1 interleukiny 1
LIGHT	(lymphotoxin homolog inducible and competes with HSV glycoprotein D for HveA and expressed on T-lymphocytes) – peptyd LIGHT
MAP3K14	(mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14) – jedna z nazw białka NIK
mRNA	– matrycowy RNA
NF- κ B	– jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B
NIK	(NF- κ B-inducing kinase) – kinaza indukująca jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B
NLS	(nuclear localization signals) – jądrowe sekwencje lokalizujące
p53	– białko p53
PCR	– reakcja łańcuchowa polimerazy DNA
pz	– para zasad

QPCR	– reakcja PCR w czasie rzeczywistym
RANKL	(Receptor Activator for NF- κ B Ligand) – ligand aktywatora receptora NF- κ B
RGK	– rak gruczołu krokowego
TBST	(Tris-buffered saline with Tween) – roztwór Tris, NaCl, Tween
TNF	– czynnik martwicy nowotworów (znany także jako TNF- α)
TUBA1B	– alfa-1b-tubulina
Tween 20	– detergent polisorbitolowy
Twist1	(Twist-related protein 1) – czynnik transkrypcyjny Twist
VEGF	(Vascular Endothelial Growth Factor) – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego
VHL	(von Hippel–Lindau tumor suppressor) – białko VHL
ZFP91	– białko palca cynkowego ZFP91

2. Wstęp

2.1. Identyfikacja i budowa ZFP91

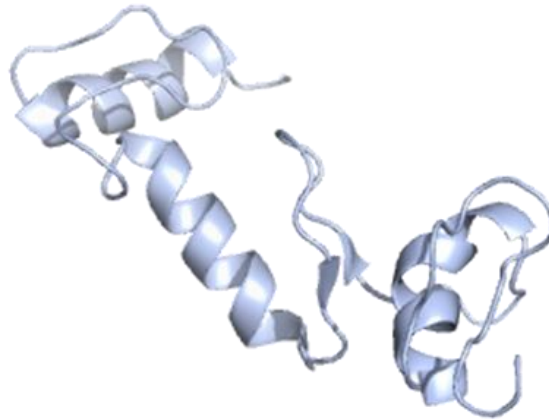
ZFP91 to słabo poznany gen człowieka kodujący białko palca cynkowego ZFP91. Jest to białko złożone z 570 aminokwasów o masie cząsteczkowej 63,4 kDa. W swej strukturze posiada pięć motywów palca cynkowego, zamek leucynowy, strukturę „coiled-coil” oraz sekwencje lokalizujące w jądrze (NLS-nuclear localization signals). Obraz przewidywanej komputerowo struktury białka przedstawia ryc. 1. U ssaków jest to białko wysoce konserwatywne, przykładowo u myszy i człowieka występuje 91,2% i 90,0% homologii, odpowiednio na poziomie białka i DNA (wg danych NCBI).

Gen *ZFP91* został odkryty przez zespół Saotome i wsp. w 1995 roku. Zespół ten wykrył transkrypt *ZFP91* u myszy i wykorzystując metodę Northern blot potwierdził jego ekspresję w mózgu, sercu, nerce, płucu, wątrobie, śledzionie, grasicy, mięśniu szkieletowym, jajniku i jądrze (Saotome i wsp., 1995). Wykryto także znacznie mniejszy transkrypt fuzyjny genu *ZFP91* i *CNTF* (rzęskowy czynnik neurotroficzny) występujący wyłącznie w jądrze. Badania innych zespołów wykazały, że jest to transkrypt niekodujący, występujący także u człowieka i ograniczony w występowaniu tylko do jądra (Saotome i wsp., 1995; Unoki i wsp., 2003).

W 2003 roku zespół Unoki i wsp. wykorzystując mikromacierze cDNA badał komórki mononuklearne krwi obwodowej oraz szpiku u pacjentów z ostrą białaczką szpikową (Unoki i wsp., 2003). Jako pierwszy wykazał on u człowieka ekspresję genu *ZFP91* homologicznego do genu myszy. Scharakteryzował także budowę białka, ekspresję oraz potencjalne właściwości ludzkiego *ZFP91*. Ekspresja tego genu była ponad dwukrotnie zwiększona w komórkach mononuklearnych krwi obwodowej u 27 z 29 pacjentów z ostrą białaczką szpikową, u których odsetek komórek białaczkowych we krwi przekraczał 70%. W większości przebadanych 18 linii komórek białaczki ekspresja *ZFP91* mRNA była również istotnie zwiększona. W kolejnym doświadczeniu autorzy zidentyfikowali strukturę *ZFP91* oraz zbadali jego ekspresję metodą Northern blot w szeregu narządów człowieka: w sercu, mózgu, łożysku, płucu, wątrobie, mięśniu szkieletowym, nerce, trzustce, śledzionie, grasicy, prostaty, jądrze, jajniku, jelicie cienkim, jelicie grubym oraz leukocytach. Pomimo braku analizy ilościowej, autorzy

zwrócili uwagę na szczególnie wysoką ekspresję *ZFP91* w jądrze.

Zespół Unoki i wsp. był również pierwszym, który zbadał ekspresję *ZFP91* na poziomie białka. Wykorzystując plazmid DNA zawierający sekwencję *ZFP91* powiązanego z peptydem sygnałowym FLAG, za pomocą immunofluorescencji wykazał jądrową lokalizację białka ZFP91 w komórkach hodowli (Unoki i wsp., 2003).



Ryc. 1. Przewidywana struktura białka ZFP91 (na podstawie http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?hsa:80829).

2.2. Aktualny stan wiedzy o biologicznej roli ZFP91

Dotychczas tylko nieliczne zespoły badawcze podejmowały się scharakteryzowania biologicznej roli ZFP91. Wspomniany już japoński zespół Motoko Unoki w swojej pionierskiej pracy badał efekt zmniejszenia ekspresji genu *ZFP91* za pomocą oligonukleotydów antysensownych. Badania na liniach komórek raka jelita grubego oraz raka endometrium wykazały zwiększenie odsetka komórek apoptotycznych pod wpływem antsensownego oligo-ZFP91 (Unoki i wsp., 2003).

W roku 2006 wykryto, że białko ZFP91 posiada zdolność fizycznej interakcji z białkiem ARF (ARF tumor suppressor protein). Białko ARF pełni ważne funkcje przeciwnkogenne, polegające na indukcji mechanizmów śmierci komórkowej i zatrzymania podziałów komórkowych w sposób zależny od białka p53, w odpowiedzi na aktywację onkogenów. Nie wyjaśniono jednak znaczenia zaobserwowanej interakcji (Tompkins i wsp., 2006).

Najważniejsze jak do tej pory doniesienia dotyczące funkcji genu *ZFP91* powstały dzięki pracy koreańskiego zespołu badawczego pod kierownictwem Lee. Wyniki swoich badań oraz ich potencjalne zastosowania terapeutyczne zespół ten opatentował (Lee i wsp., 2008). W 2010 roku opublikował także dwa artykuły rzucające nowe światło na funkcje badanego genu (Jin HR i wsp., 2010; Jin X i wsp., 2010).

Badania wspomnianego zespołu zostały zapoczątkowane odkryciem, że ekspresja genu *ZFP91* jest pozytywnie regulowana przez jednego z agonistów szlaku sygnałowego NF- κ B. Czynniki transkrypcyjny NF- κ B łącząc się z sekwencją promotorową w regionie 5' genu *ZFP91* stymuluje jego ekspresję. Z drugiej strony, zwiększona eksperymentalnie ekspresja *ZFP91* prowadzi do zwiększonej aktywności NF- κ B w sposób zależny od dawki i uzależniony od interakcji z białkiem MAP3K14, znanym także jako NIK (NF- κ B-inducing kinase). Jest to kluczowa kinaza aktywacji alternatywnego (niekanonicznego) szlaku NF- κ B (Jin X i wsp., 2010; Sun SC, 2011). Wykazano, że białko *ZFP91* pełni funkcję atypowej ligazy ubikwityno-białkowej typu E3. Pośredniczy ono w ubikwitynizacji NIK, prowadząc do stabilizacji NIK oraz aktywacji alternatywnego szlaku NF- κ B. Stanowi w ten sposób swoisty regulator ekspresji genów zależnych od tego szlaku (Jin HR i wsp., 2010; Jin X i wsp., 2010).

Kolejnymi białkami wchodzącymi w interakcje z *ZFP91* są białko supresorowe nowotworu von Hippel-Lindau (pVHL) oraz powiązany z nim czynnik indukowany hipoksją 1 α (HIF-1 α). Jak wykazali Lee i wsp. aktywność czynnika transkrypcyjnego HIF-1 α i genów zależnych od niego (m.in. VEGF) jest hamowana przez *ZFP91* siRNA (Lee i wsp., 2008). Zarówno pVHL jak i HIF-1 α oraz zależne od niego geny posiadają szeroko udokumentowaną rolę w procesach kancerogenezy i tworzenia przerzutów (Lee i wsp., 2008; Zhang i wsp., 2012; HuY i wsp., 2013).

Wykorzystując metodę zahamowania ekspresji genu *ZFP91* przy użyciu swoistego siRNA w komórkach raka piersi (MCF-7) i raka żołądka (AGS), Lee i wsp. zaobserwowali zmniejszenie ilości białek antyapoptotycznych i częstsze występowanie apoptozy w tak zmodyfikowanych komórkach (Lee i wsp., 2008). W badaniach na komórkach nowotworowych transfekowanych genem *ZFP91*, wykazujących w efekcie zwiększoną jego ekspresję, silnie wyrażał się potencjał proonkogenny tego genu. Tak zmienione komórki wykazywały m.in. większy potencjał wzrostowy i wyższą zdolność

migracyjną niż komórki nietransfekowane. Ponadto wzrost guza wywołany komórkami raka żołądka (MKN-45) o zwiększonej ekspresji genu *ZFP91* u immunoniekompetentnych myszy był znacząco szybszy niż indukowany komórkami nietransfekowanymi (Lee i wsp., 2008).

Stwierdzono zwiększoną ekspresję genu *ZFP91* w liniach komórek nowotworowych raka piersi i raka żołądka posiadających wysoką aktywność NF- κ B w porównaniu do innych linii tych samych nowotworów, ale o mniejszej aktywności szlaku NF- κ B. Wykryto także, przy użyciu techniki hybrydyzacji *in situ*, wyższą ekspresją *ZFP91* mRNA w próbkach raka żołądka, wątroby i prostaty w porównaniu do narządów prawidłowych (Lee i wsp. 2008).

2.3. Dotychczasowe badania nad rolą *ZFP91* w chorobach gruczołu krokowego.

Dwa najistotniejsze z punktu widzenia epidemiologicznego schorzenia gruczołu krokowego to łagodny rozrost gruczołu oraz rak gruczołu (Suzuki i wsp., 2009). Według aktualnych danych, na świecie rak gruczołu krokowego stanowi u mężczyzn drugi najczęściej występujący nowotwór złośliwy oraz szóstą przyczynę zgonów z przyczyn nowotworowych (www.cancer.org). W Polsce stanowi on odpowiednio drugą przyczynę zachorowań i trzecią przyczynę zgonów (www.onkologia.org.pl). Częstość występowania łagodnego rozrostu gruczołu krokowego jest trudna do oceny. Na podstawie badań autopsyjnych wykazano obecność choroby u 20%, 40%, 70% oraz 80% pacjentów odpowiednio w 40-, 50-, 60- i 70-latach życia (Berry i wsp., 1984). Jest to choroba wpływająca przede wszystkim na jakość życia dotkniętych nią pacjentów.

Istniejący stan wiedzy w zakresie ekspresji i funkcji genu *ZFP91* w prostatie to udokumentowanie ekspresji genu *ZFP91* przy użyciu techniki Northern blot w ludzkiej prostatie (Unoki i wsp., 2003) oraz obserwacja wyższej ekspresji *ZFP91* mRNA w raku gruczołu krokowego w porównaniu z gruczołem histologicznie prawidłowym przy użyciu techniki hybrydyzacji *in situ* (Lee i wsp., 2008).

Badania własne nad potencjalną rolą *ZFP91* w schorzeniach gruczołu krokowego rozpoczęły się od przesiewowego badania ekspresji genów związanych z otyłością w próbkach łagodnego rozrostu gruczołu krokowego w porównaniu do próbek gruczołów

prawidłowych. Założenia pracy opierały się na obserwacjach niekorzystnego wpływu otyłości na ryzyko rozwoju i przebieg schorzeń prostaty (Tewari i wsp., 2012). W dostępnych doniesieniach na ten temat udowodniono m.in., że otyłość zwiększa ryzyko wystąpienia bardziej agresywnej formy raka prostaty (Allott i wsp., 2013), powiększenia prostaty u mężczyzn z miejscowym rakiem prostaty (Kopp i wsp., 2011) oraz sprzyja rozwojowi łagodnego rozrostu gruczołu krokowego (Parsons i wsp., 2006).

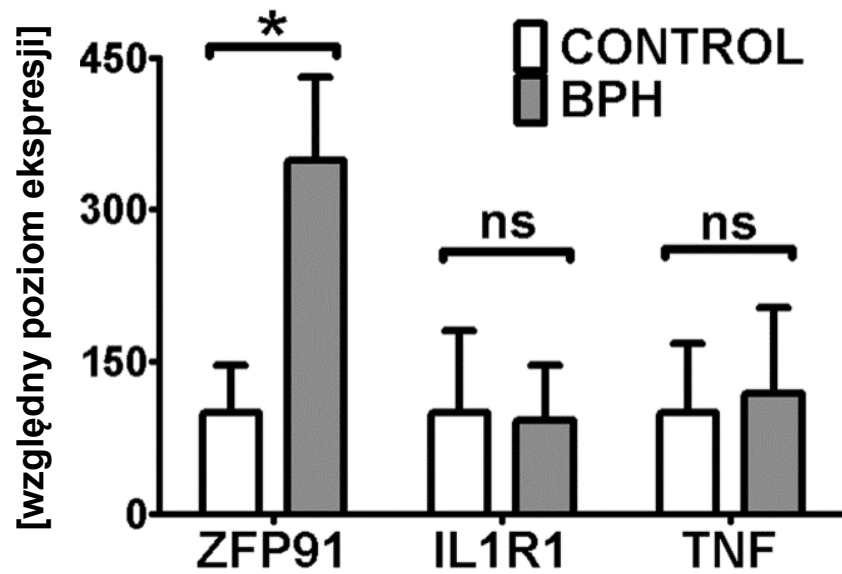
Wykorzystując zestaw starterów obejmujący 84 geny związane z patogenezą otyłości wykryto trzy geny, których ekspresja istotnie różniła się pomiędzy badanymi grupami. Były to *ZFP91*, receptor 1 interleukiny 1 (*IL1R1*) oraz czynnik martwicy nowotworów (*TNF*) – tab. 1 (Paschke i wsp., 2014). Co ciekawe, gen *ZFP91* znalazł się w badanym panelu genów przypadkiem, ponieważ nie posiada do tej pory udokumentowanego związku z otyłością.

W dalszym etapie badań weryfikowano uzyskane wyniki na większej grupie próbek za pomocą klasycznego QPCR – ryc. 2 (Paschke i wsp., 2014). Spośród wytypowanych genów tylko ekspresja *ZFP91* okazała się być istotnie zmieniona – podwyższona w próbkach łagodnego rozrostu gruczołu krokowego.

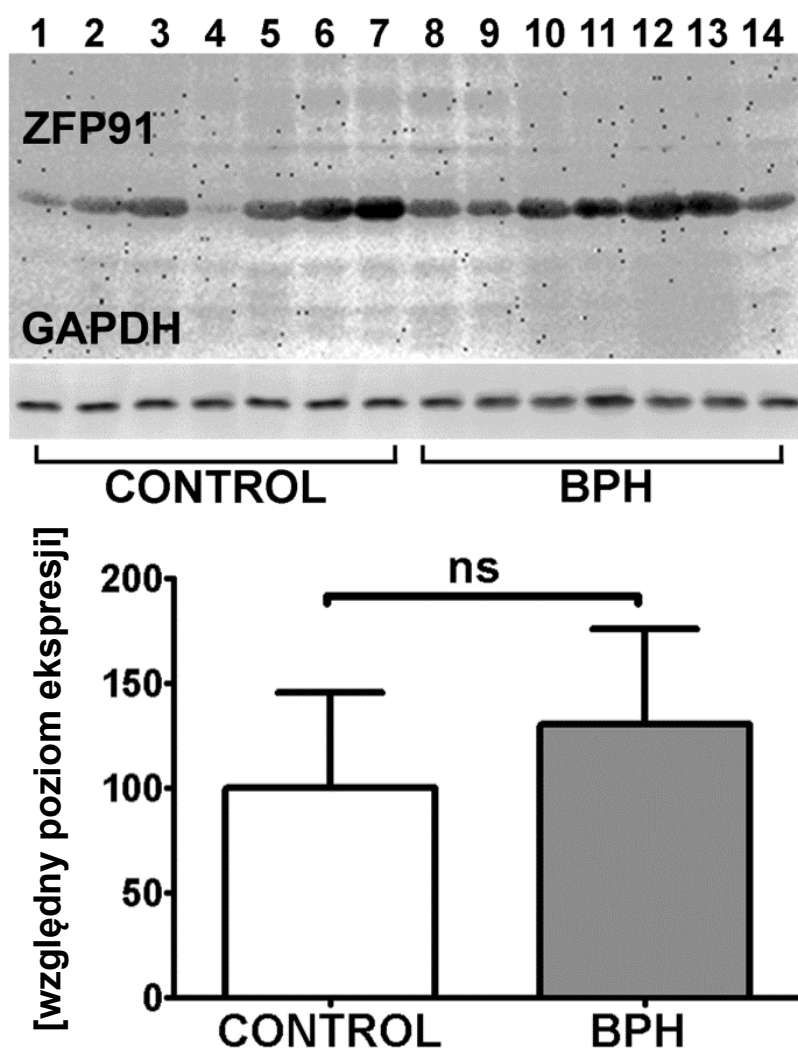
W celu oceny ekspresji *ZFP91* na poziomie białka przebadano próbki łagodnego rozrostu gruczołu krokowego i prostat prawidłowych metodą Western Blotting. Na poziomie białka nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami ryc. 3 (Paschke i wsp., 2014). Badanie to było pierwszym potwierdzającym ekspresję *ZFP91* w narządzie człowieka na poziomie białka (dotychczas badane były tylko pojedyncze linie komórek nowotworowych). Rozbieżność pomiędzy ekspresją *ZFP91* na poziomie mRNA i białka wydaje się wskazywać, że podlega ona regulacji w łagodnym rozroście gruczołu krokowego, jednak w wyniku potranskrypcyjnych mechanizmów regulacji ekspresji zmiany te nie przekładają się na fenotyp komórek. Nie potwierdzono zatem zaangażowania *ZFP91* w patogenezę łagodnego rozrostu gruczołu krokowego.

Tab. 1. Funkcjonalne pogrupowanie 84 genów związanych z otyłością badanych za pomocą zestawu starterów PCR (Human Obesity RT² Profiler PCR Array; SABioscience). Wyróżniono geny o średniej ekspresji różnej ponad trzykrotnie – zwiększonej w przypadku *ZFP91* i *IL1R1*, zmniejszonej w przypadku *TNF*, w próbkach łagodnego rozrostu gruczołu krokowego w porównaniu do gruczołów prawidłowych (każda z grup n=3) (Paschke i wsp., 2014).

Geny oreksygenne	
Neuropeptydy i receptory:	ADRA2B, AGRP, CNR1, GAL, GALR1, MCHR1 (GPR24), HCRT, HCRTR1, NPY, NPY1R, NR3C1 (GRL), OPRK1, OPRM1.
Hormony jelitowe i receptory:	GHRL (Ghrelin / Obestatin), GHSR.
Geny anorektyczne	
Neuropeptydy i receptory:	ATRN (Attractin), BDNF, BRS3, CALCA, CALCR, CARTPT (CART), CNTFR, CRHR1, DRD1, DRD2, GH1, GH2, GHR, NMUR1 (GPR66), GRP, GRPR, HRH1, HTR2C, IL1A, IL1B, IL1R1 , IL6, IL6R, MC3R, NMB, NMBR, NMU, NTRK2, NTS, NTSR1, PRLHR (GPR10), POMC, SORT1, TRH, UCN, ZFP91 .
Hormony jelitowe i receptory:	APOA4, CCK, CCKAR, GLP1R, PYY.
Peptydy i receptory pochodzące z tkanki tłuszczowej:	LEP (Leptin), LEPR, TNF .
Peptydy i receptory pochodzące z trzustki:	CALCR, CLPS, GCG, GCGR, GLP1R, IAPP, INS, INSR, RAMP3, SST, SSTR2.
Geny związane z wydatkowaniem energii	
Peptydy i receptory pochodzące z tkanki tłuszczowej:	ADIPOQ (ACRP30), ADIPOR1, ADIPOR2, ADRB1, C3, PPARA, PPARG, PPARGC1A, PTPN1, UCP1.
Peptydy i receptory pochodzące z centralnego układu nerwowego:	ADCYAP1, ADCYAP1R1, CPD, CPE, SIGMAR1, THRB.



Ryc. 2. Analiza QPCR ekspresji genów *ZFP91*, *IL1R1* i *TNF* w próbkach łagodnego rozrostu gruczołu krokowego (BPH) i w gruczołach prawidłowych (CONTROL). Słupki przedstawiają ekspresję genów na poziomie mRNA względem genów referencyjnych. Średniej ekspresji w grupie „CONTROL” przypisano wartość 100, oddzielnie dla każdego z genów. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SD; CONTROL n=18, BPH n=21. Analiza statystyczna za pomocą testu Manna-Whitneya; * – $p < 0.05$, ns – różnice nieistotne statystycznie (Paschke i wsp., 2014).



Ryc. 3. Analiza ekspresji białka ZFP91 w próbkach łagodnego rozrostu gruczołu krokowego (BPH) i w gruczołach prawidłowych (CONTROL). Górna część ryciny przedstawia reprezentatywny obraz wyników immunoblottingu. Słupki przedstawiają ilość białka ZFP91 względem białka referencyjnego – dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH). Średniej ekspresji w grupie „CONTROL” przypisano wartość 100. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SD; w każdej grupie $n = 14$. Analiza statystyczna za pomocą testu t-Studenta; * – $p < 0.05$, ns – różnice nieistotne statystycznie (Paschke i wsp., 2014).

Badania nad potencjalną rolą ZFP91 w patogenezie raka prostaty wydają się istotne nie tylko ze względu na onkogenne właściwości tego białka. W ostatnich latach jednym z intensywnie badanych molekularnych celów terapii raka prostaty jest szlak aktywacji kompleksu czynników transkrypcyjnych NF- κ B. Jego rola jako kluczowego regulatora procesów immunologicznych jest dobrze udokumentowana, natomiast coraz więcej dowodów przemawia także za jego istotnym wpływem na procesy inicjacji rozwoju i propagacji nowotworów. W kontekście biologii raka prostaty podkreśla się szczególnie

wielopoziomowe interakcje pomiędzy aktywacją szlaku NF- κ B a aktywacją ścieżek sygnalnych zależnych od receptora androgenów (Jain i wsp., 2012). Interakcja receptora androgenów z czynnikiem p52 (zaangażowanym w alternatywną ścieżkę aktywacji NF- κ B) promuje wzrost komórek raka prostaty, ich przeżywalność oraz ekspresję genów zależnych od receptora androgenów (Nadiminty i wsp., 2006, 2008, 2010; Lessard i wsp., 2007). Biorąc pod uwagę powyższe zależności, ZFP91 może potencjalnie wpływać na ekspresję genów zależnych od receptora androgenów, a tym samym na biologię raka prostaty.

W kontekście funkcji NF- κ B w komórkach raka prostaty stosunkowo dobrze scharakteryzowany jest wpływ agonistów klasycznej ścieżki aktywacji NF- κ B (aktywowanej m.in. przez TNF oraz IL-1 β), mniej natomiast wiadomo w tym zakresie o roli ścieżki alternatywnej. Funkcje tej dodatkowej i bardziej specyficznej w swym działaniu ścieżki aktywacji NF- κ B nie są dostatecznie poznane, jednak dostępne dane sugerują jej potencjalnie duże znaczenie w biologii raka prostaty (Jain i wsp., 2012; Sun i wsp., 2011). Stymulacja komórek nowotworowych *in vitro* przy użyciu TNF i LIGHT (aktywującego zarówno klasyczną jak i alternatywną ścieżkę) stymuluje ekspresję genu *ZFP91* (w komórkach MCF-7 dla TNF i HeLa dla LIGHT) w sposób zależny od dawki (co ciekawe, przede wszystkim na poziomie białka) (Jin HR i wsp., 2010; Lee i wsp., 2008). Wpływ TNF na wzrost i czynność komórek raka prostaty *in vitro* został dobrze udokumentowany, m.in. silnie pobudza on apoptozę w komórkach linii LNCaP (Chopra i wsp., 2004). W mniejszym stopniu poznany jest w tym zakresie wpływ LIGHT, jednak i ten związek był w ostatnich latach intensywnie badany. Pobudza on m.in. proliferację komórek LNCaP (Nadiminty i wsp., 2007). Inny agonista zarówno klasycznej jak i alternatywnej ścieżki NF- κ B – RANKL, stymuluje zaś migrację komórek androgenoniewrażliwej linii raka prostaty – PC-3 oraz ekspresję genów związanych z potencjałem metastatycznym w tych komórkach (Armstrong i wsp., 2008). ZFP91 jako czynnik swoiście regulujący alternatywną ścieżkę aktywacji NF- κ B (Jin HR i wsp., 2010; Jin X i wsp., 2010) może odgrywać istotną rolę w opisanych powyżej zależnościach.

3. Założenia i cel pracy

W świetle przedstawionych we wstępie informacji dotyczących właściwości i potencjalnej roli biologicznej ZFP91 nasuwa się szereg pytań, na które dotychczas nie ma odpowiedzi. Celem podjętych w tej pracy badań było:

- scharakteryzowanie ekspresji ZFP91 w liniach komórek raka gruczołu krokowego oraz w hodowlanych komórkach prawidłowych gruczołu na poziomie mRNA i białka,
- określenie ekspresji genu ZFP91 w gruczole krokowym prawidłowym i w raku gruczołu krokowego oraz ocena wpływu stopnia zaawansowania nowotworu na poziom ekspresji badanego genu,
- analiza ekspresji genu ZFP91 w szeregu narządów człowieka oraz w 19 typach nowotworów.

Wyniki przeprowadzonych badań winny pozwolić na ocenę, czy dotychczas opisywane zmiany ekspresji genu ZFP91 w komórkach białaczkowych, w łagodnym rozroście gruczołu krokowego oraz w niektórych liniach komórek nowotworowych są specyficzne dla badanych jednostek chorobowych. Analiza ekspresji *ZFP91* w raku gruczołu krokowego oraz w szeregu narządów prawidłowych i nowotworów człowieka może istotnie przyczynić się do lepszego poznania jego znaczenia w fizjologii i patofizjologii człowieka. Podjęcie badań uzasadnia potencjalnie istotna rola biologiczna *ZFP91*.

4. Materiały i metody

4.1. Stosowane odczynniki i zestawy do oznaczeń (z numerem katalogowym, o ile dostępny)

Hodowla komórek

- medium hodowlane RPMI-1640 (ATCC, 30-2001)
- medium hodowlane F12K Medium (ATCC, 30-2004)
- medium hodowlane Eagle's Minimum Essential Medium (ATCC, 30-2001)
- płodowa surowica bydlęca (Sigma-Aldrich, F6178)
- mieszanina antybiotyków i antymikotyków (Sigma-Aldrich, A5955)
- roztwór trypsyny i EDTA 0,25% (Sigma-Aldrich, T4049)
- roztwór glutaminy 200 mM (Sigma-Aldrich, G7513)
- roztwór błękitu trypanu do zliczania komórek (Sigma-Aldrich, T8154)
- komórki PrEC kriokonserwowane (Lonza, CC-2555 PrEC),
- medium hodowlane komórek PrEC podstawowe + czynniki wzrostu (Lonza, CC-3165)
- czynniki wzrostu dla komórek PrEC (Lonza, CC-4177)
- dodatkowe odczynniki do hodowli komórek PrEC (roztwór trypsyny, inhibitora trypsyny, roztwór zbuforowany HEPES) (Lonza, zestaw CC-5034)

Izolacja RNA, odwrotna transkrypcja

- TRI Reagent (trizol, Sigma-Aldrich, T-9424)
- zestaw kolumnkowy do izolacji i oczyszczania RNA (NucleoSpin Total RNA Isolation - Macherey Nagel, 740955)
- inhibitor rybonukleaz (Protector RNase Inhibitor – Roche, 03335399001)
- RNA zap (Sigma- Aldrich, R-2020)
- zestaw odczynników do odwrotnej transkrypcji (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit – Roche, 05081963001)

QPCR

- agaroz (Agaroz Basica LE, Prona)
- bromek etydy (Sigma- Aldrich, A-3678)
- wzorzec wielkości DNA (DNA Ladder – Fermentas, SM0613)
- bufor obciążający DNA (Orange Loading Dye Solution – Fermentas, R0631)

- zestaw do ekstrakcji DNA z żelu (DNA gel extraction kit, Millipore)
- zestaw odczynników do reakcji PCR (Lightcycler FastStart DNA Master SYBR Green I - Roche, 12 239 264 001)
- Prostate Cancer cDNA Array III (Origene, HPRT103)
- Cancer Survey cDNA Array 96 – I (Origene, CSRT101)
- Cancer Survey cDNA Array 96 – II (Origene, CSRT104)
- Cancer Survey cDNA Array 4X96 – III (Origene, CSRT103)

Izolacja białka, Western Blotting

- RIPA (bufor do izolacji białek) – przygotowywany w laboratorium
- dezoksyholan sodowy (Sigma-Aldrich, D6750)
- Igepal CA 630 (Sigma-Aldrich, 56741)
- mieszanina inhibitorów proteaz (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche - 11836153001)
- Albumina surowicy bydłowej (Sigma-Aldrich, A-7030)
- Błękit brylantowy Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250 – Sigma-Aldrich, B7920)
- przyrząd do formowania żeli gradientowych (Model 485 Gradient Former – Biorad, 65-4120)
- przyrząd do elektroforezy i transferu białek Mini-PROTEAN 3 Cell (Biorad, 165-3301)
- roztwór akrylamidu i bis-akrylamidu (Sigma-Aldrich, A3699)
- APS (nadsiarczan amonu) (Sigma-Aldrich, A3678)
- TEMED (NNNN- Tetrametyloetylenodiamina) (Sigma-Aldrich, T8133)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, P-7949)
- β -merkaptoetanol do biologii molekularnej (Sigma-Aldrich, M3148)
- błękit bromofenolowy (Sigma-Aldrich, B5525)
- SDS (siarczan dodecyłu sodu, Sigma-Aldrich, L4390)
- glicerol (Sigma-Aldrich, G5516)
- glicyna (Sigma- Aldrich, G8898)
- Trizma base (Sigma-Aldrich, T6066)
- roztwór TBST – przygotowywany w laboratorium
- membrana PVDF (Millipore)

- marker wielkości białka (ECL DualVue Western Blotting Markers – Amersham, RPN810)
- odczynnik chemiluminescencyjny (ECL Plus Western Blotting Detection Reagents – Amersham, RPN2133)
- lizat komórek Jurkat (Santa Cruz Biotechnology, sc-2204)
- przeciwciała poliklonalne królicze anti-ZFP91 (Santa Cruz Biotechnology, sc-102172)
- przeciwciała monoklonalne królicze anti-GAPDH (Cell Signaling Technology, 5174)
- przeciwciała drugorzędowe związane z peroksydazą chrzanową przeciw IgG króliczemu (Cell Signaling Technology, 7074)

Pozostałe odczynniki zakupiono w Avantor Performance Materials Poland S.A. (dawniej POCh Gliwice), cz.d.a.

4.2. Oprogramowanie oraz adresy internetowe

- DNAsis MAX (analiza sekwencji nukleotydowych)
- Blast (porównywanie homologii sekwencji)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>
- Oligo (projektowanie starterów do reakcji PCR)
- Prism GraphPad (analiza statystyczna uzyskanych wyników)
- Totallab (analiza densytometryczna wyników metody western blott)
- BioRad Gene Expression Analysis Software (analiza danych z Q-PCR)
- GenEx MultiD (analiza danych z Q-PCR)
- Normfinder (wyszukiwanie najbardziej stabilnego zestawu genów referencyjnych do normalizacji wyników Q-PCR) - <http://moma.dk/normfinder-software>
- LightCycler software version 4.05
- VisionWorksLS Analysis Software
- NanoDrop UV-Vis Spectrophotometer software

4.3. Hodowla komórek

W badaniach wykorzystano następujące linie komórek raka prostaty: LNCaP, DU145, PC-3 i 22Rv1. Wszystkie linie pochodziły ze zbiorów American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA). LNCaP to linia komórek uzyskana z metastatycznych komórek raka prostaty w węźle chłonnym. DU145 to linia komórek uzyskana z metastatycznych komórek raka prostaty w mózgu. PC-3 to linia komórek uzyskana z metastatycznych komórek raka prostaty w kości. 22Rv1 to linia komórek uzyskana z ksenograftu propagowanego w myszach androgenowrażliwego nowotworu wytworzonego przez linię CWR22, po kastracji i wznowie choroby nowotworowej. Jest to linia wg najnowszych doniesień zawierająca retrowirusa XMRV. LNCaP i 22Rv1 są liniami komórek raka prostaty wrażliwymi na wpływ androgenów (22Rv1 linią słabo wrażliwą), natomiast linie DU145 i PC-3 nie są wrażliwe na androgeny.

Wykorzystane media hodowlane to: RPMI-1640 Medium (LNCaP and 22Rv1), F12K Medium (PC-3) oraz Eagle's Minimum Essential Medium (DU145). Media zakupiono w ATCC. Dodawano do nich płodową surowicę bydlęcą (do stężenia 10%), roztwór glutaminy oraz roztwór antybiotyków i antymykotyków.

Prawidłowe komórki nabłonka prostaty – PrEC (Prostate Epithelial Cells) zakupiono w firmie Lonza. Hodowane były w medium bez surowicy firmy Lonza – PrEGM, z dodatkiem czynników wzrostu.

Wykorzystane linie komórek stanowią jedne z najpowszechniej stosowanych w badaniach nad patogenezą raka prostaty i są dobrze scharakteryzowane (Sobel i wsp., 2005a; Sobel i wsp., 2005b; Sobel i wsp., 2006).

Wszystkie komórki hodowano w 25 lub 75 cm² butelkach z filtrem wymiany gazowej, w inkubatorze w temperaturze 37 °C, w atmosferze 5% CO₂, 95% powietrza i 100% wilgotności. W przypadku komórek PrEC medium hodowlane zmieniano każdego dnia, natomiast dla pozostałych linii komórek co dwa dni. Kiedy komórki osiągały konfluencję bliską 80%, pasażowano je lub zbierano przy użyciu 0,25% roztworu trypsyny i EDTA. Zebrane komórki zamrażano w -80 °C jako materiał do dalszych badań. Wszystkie etapy zakładania hodowli, a także czynności związane z przygotowaniem i późniejszą zmianą medium przeprowadzano z zachowaniem zasad aseptyki.

4.4. Izolacja RNA

Komórki poddawano lizie za pomocą trizolu w objętości ponad 10x przekraczającej objętość komórek. Dodawano chloroform w objętości 20% objętości trizolu. Wyrzäsano energicznie przez 15 sekund, następnie inkubowano w temperaturze pokojowej przez 3 minuty, następnie wirowano przy 12000x g przez 15 min. w temp. 4 °C. Górną frakcję zawierającą RNA przenoszono do probówek z równą objętością 70% etanolu, mieszano i podawano do kolumniek wiążących RNA. Następnie kontynuowano procedurę izolacji i oczyszczania RNA zgodnie z protokołem zestawu odczynników NucleoSpin Total RNA Isolation (Macherey Nagel). RNA związane z kolumnkami seryjnie przemywano zestawem buforów a ostatecznie eluowano za pomocą wody wolnej od rybonukleaz. Do eluatu dodawano inhibitor rybonukleaz oraz utrzymywano w blokach lodowych. Stężenie i czystość uzyskanego RNA badano spektrofotometrycznie za pomocą przyrządu NanoDrop (Thermo Scientific).

4.5. Odwrotna transkrypcja

Do mieszaniny reakcyjnej dodawano 1 µg RNA, 1 µl startera (oligo-dT) i wodę, do końcowej objętości 11,4 µl, inkubowano przez 10 min w temp. 65 °C, a następnie schładzano na lodzie. Zgodnie z zaleceniami producenta zestawu (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit – Roche) skład mieszaniny reakcyjnej dla pojedynczej próby zawierał: 4 µl buforu reakcyjnego, 0,5 µl inhibitora RNaz, 2 µl dNTP, 1 µl DTT oraz 1 µl odwrotnej transkryptazy. Dla reakcji kontrolnych (-RT) przeprowadzano dokładnie tę samą procedurę z zastąpieniem odwrotnej transkryptazy taką samą objętością wody. Reakcje przeprowadzano z użyciem termocyklera UNO II (Biometra) w temperaturze 48 °C w czasie 30 min, a następnie 85 °C w czasie 5 min. Uzyskane cDNA rozcieńczano i mrożono.

4.6. Projektowanie starterów do reakcji PCR

Projektowanie starterów do reakcji PCR rozpoczynano w programie DNAsis MAX od wyszukiwania w danej sekwencji mRNA punktów wycięcia intronów. Startery projektowano tak, aby amplifikowane fragmenty sekwencji nukleotydowych obejmowały punkty wycięć odpowiednio długich intronów. Uniemożliwia to amplifikację genomowego DNA w przypadku ewentualnego zanieczyszczenia próbki cDNA. Przy użyciu programu Oligo wytypowano optymalne pod względem

termodynamicznym sekwencje starterów. Przy użyciu dostępnej w Internecie witryny Blast skontrolowano ich specyficzność wobec innych sekwencji w ludzkim genomie. Syntezę starterów zlecano Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk. Zaprojektowano po dwie pary starterów dla każdego genu, tak aby podczas optymalizacji warunków reakcji, do dalszych badań wykorzystać parę zapewniającą lepszą efektywność reakcji. Ostatecznie wykorzystane startery przedstawia tab. 2. Startery dla genu beta-aktyny (ACTB) stanowiły element zestawów cDNA firmy Origene.

Tab. 2. Charakterystyka starterów użytych do reakcji QPCR. W tabeli przedstawiono sekwencje starterów sensownych (S) oraz antysensownych (A), numer dostępu do Genbank, pozycję oraz wielkość produktu. ZFP91 – białko palca cynkowego ZFP91, TUBA1B – alfa-1b-tubulina, ALAS1 – syntaza delta-aminolewulinianu, B2M –beta-2 mikroglobulina, ACTB – beta-aktyna, HPRT1 – fosforybozylotransferaza hipoksantyny 1.

cDNA	Numer dostępu Genbank	Starter	Sekwencja startera (5'-3')	Pozycja	Długość produktu PCR (pz)
ZFP91	NM_053023	S A	TGTCCTTGCCCATCCTCG CTA ACTCTTGAAGGCCCGAG CAC	1128-1148 1298-1317	190
TUBA1B	NM_006082	S A	TGGAACCCACAGTCATT GATGA TGATCTCCTTGCCAATG GTGTA	430-451 543-564	135
ALAS1	NM_000688	S A	AGACATAACATCTACGT GCAA GAATGAGGCTTCAGTTC CA	2031-2051 2179-2197	167
B2M	NM_004048	S A	CAGCCCAAGATAGTTAA GTG CCCTCCTAGAGCTACCT GT	375-394 617-636	262
ACTB	NM_001101	S A	CAGCCATGTACGTTGCT ATCCAGG AGGTCCAGACGCAGGAT GGCATG	473-496 601-623	151
HPRT1	NM_000194	S A	CTCCTCTGCTCCGCCAC CG TCGAGCAAGACGTTTCAG TCC	103-121 301-320	218

4.7. Określenie efektywności reakcji PCR

W celu określenia efektywności reakcji PCR w czasie rzeczywistym, dla każdego z badanych genów przygotowano krzywą standardową. W tym celu wykorzystano produkty klasycznej reakcji RT-PCR rozdzielone na 2,5% żelu agarozowym, które wyizolowano z żelu przy użyciu DNA gel extraction kit (Millipore). Ilość uzyskanego w ten sposób DNA szacowano spektrofotometrycznie. Krzywe standardowe tworzono poprzez amplifikację seryjnych dziesięciokrotnych rozcieńczeń uzyskanego wcześniej cDNA dokładnie w tych samych warunkach reakcji jak badane próby. Efektywność reakcji wyznaczano wykorzystując oprogramowanie LightCycler v.4.05.

4.8. Kontrola specyficzności produktów reakcji PCR

Kontrolę specyficzności produktów reakcji PCR stanowiły – po pierwsze: reakcje kontrolne, gdzie zamiast matrycy cDNA podawano wodę oraz kontrole, w których do reakcji PCR zamiast cDNA podawano próbę niepoddaną odwrotnej transkrypcji (-RT). Po drugie, w związku z wykorzystaniem metody opartej na detekcji barwnika SYBR Green, automatycznie po każdej reakcji przeprowadzano analizę krzywej topnienia produktu, z dokładnością 0,1 °C/s. Po trzecie, wybrane produkty reakcji poddawano rozdzielaniu elektroforetycznemu na 2,5% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny i uwidacziano prążki przy użyciu transiluminatora. Tą metodą kontrolowane były losowo wybrane produkty reakcji a także pojedyncze próby, w których analiza krzywych topnienia nie dawała jednoznacznego wyniku. Przykładowy rozdział losowych próbek amplifikacji starterów dla genu ZFP91 przedstawia ryc. 4.



Ryc. 4. Przykład elektroforetycznej kontroli wybranych produktów PCR amplifikacji ZFP91 cDNA. Na 2,5% żelu agarozowym rozdzielono losowo wybrane produkty reakcji próbek cDNA człowieka pochodzących z zestawu Origene Prostate Cancer.

4.9. Wybór genów referencyjnych

W doświadczeniach z wykorzystaniem cDNA komórek hodowli oraz cDNA z zestawu „Prostate Cancer” (Origene) zbadano ekspresję trzech genów referencyjnych: alfa-1b-tubuliny (*TUBA1B*), syntazy delta-aminolewulinianu (*ALAS1*) i beta-2 mikroglubuliny (*B2M*). Geny *TUBA1B* i *ALAS1* wytypowano w związku z doniesieniami, iż są one jednymi z najbardziej stabilnych genów referencyjnych w badaniach ekspresji genów w gruczole krokowym i w raku gruczołu krokowego (Ohl i wsp., 2005). Wykorzystując oprogramowanie NormFinder określono ekspresję *B2M* jako najmniej stabilną i do

analizy wyników użyto połączenia *TUBA1B* i *ALAS1*.

W doświadczeniach z wykorzystaniem cDNA z zestawów „Cancer Survey I,II,III” (Origene) wybrano 96 próbek, w których zbadano ekspresję pięciu genów referencyjnych: *TUBA1B*, *ALAS1*, *B2M*, beta-aktyny (*ACTB*) oraz fosforybozylotransferazy hipoksantyny 1 (*HPRT1*). Wykorzystując oprogramowanie NormFinder określono ekspresję *TUBA1B* i *ALAS1* jako najbardziej stabilną i tę parę genów wykorzystano jako referencyjną wobec wszystkich badanych próbek. Przykład tabeli wynikowej programu NormFinder próbek cDNA z zestawów „Cancer Survey” przedstawia tab. 3.

Tab. 3. Tabela wynikowa programu Normfinder określająca stabilność genów referencyjnych w próbkach cDNA z zestawów „Cancer Survey I,II,III” (Origene). Niższa wartość oznacza stabilniejszą ekspresję genu w badanych próbkach względem pozostałych genów referencyjnych.

Nazwa genu	Wartość stabilności
TUBA1B	0,082
ALAS1	0,245
B2M	0,510
ACTB	0,504
HPRT1	0,314

4.10. Matryce cDNA

Matryce cDNA do reakcji PCR uzyskano w wyniku odwrotnej transkrypcji izolowanego RNA lub poprzez rozpuszczenie liofilizowanego cDNA w przypadku zestawów cDNA firmy Origene. Zestawy „Prostate Cancer” oraz „Cancer Survey I,II,III” firmy Origene zawierają łącznie 621 próbek cDNA. Opis każdej z próbek zawiera informacje kliniczne (rozpoznanie kliniczne, wiek i płeć pacjenta), patologiczne (pełny raport badania histopatologicznego próbki) oraz techniczne, dotyczące jakości wykorzystanego RNA (dane dostępne: <http://www.origene.com/qPCR/Tissue-qPCR-Arrays.aspx>). Zakres analizowanych danych zawężono do narządów i typów nowotworów o dostatecznej liczbie niezależnych próbek. Ostatecznej analizie poddano 467 próbki cDNA, w tym 99 próbek narządów prawidłowych oraz 368 próbek nowotworów (tab. 4).

Tab. 4. Typy analizowanych narządów i nowotworów oraz liczebność próbek cDNA z zestawów „Prostate Cancer” oraz „Cancer Survey I,II,III” firmy Origene.

Narząd prawidłowy	N =	Nowotwór	N =
endometrium	5	rak endometrium	21
gruczoł piersiowy	5	rak piersi	30
jajnik	5	rak jajnika	27
jądro	6	nowotwór jądra (7 nasieniaków, 10 nienasieniaków)	17
jelito grube	11	rak jelita grubego	16
nadnercze	4	guz chromochłonny	7
nerka	8	rak nerki	19
płuco	6	rak płuca (niedrobnokomórkowy)	21
prostata		rak prostaty	
- Prostate Cancer	9	- Prostate Cancer	39
- Cancer Survey	6	- Cancer Survey	20
przełyk	4	rak przełyku (gruczolakorak)	14
tarczycza	6	rak tarczycy (brodawkowaty i pęcherzykowy)	20
trzustka	5	rak trzustki	6
urotelium	4	rak urotelialny	23
wątroba	6	rak wątroby	15
węzeł chłonny	4	chłoniak (nieziarniczny)	33
żołądek	5	rak żołądka	8
		czerniak	11
		mięsak	10
		guz neuroendokryny trzustki	11

4.11. QPCR (reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym)

Reakcje PCR w czasie rzeczywistym (QPCR lub Real-Time PCR) przeprowadzano aparatem Lightcycler 2.0 firmy Roche. Teoretyczne założenie tej metody opiera się na analizie kinetyki reakcji PCR, gdzie ilość produktu (N_n) zależy od ilości cykli (n), początkowej ilości matrycy (N_0) oraz od wydajności reakcji amplifikacji oszacowanej na podstawie krzywej standardowej (E). Teoretycznie maksymalna wydajności reakcji (E) równa się 2, tzn. każda cząsteczka matrycy daje w wyniku jednego cyklu amplifikacji dwie cząsteczki potomne, jednakże w rzeczywistych warunkach reakcji różne czynniki mogą obniżać (np. inhibitory) lub podwyższać (np. reakcje niespecyficzne) wydajność reakcji. Rzeczywistą wydajność reakcji określa się na podstawie krzywej standardowej wykreślanej po amplifikacji serii kolejnych rozcieńczeń cDNA lub wcześniej uzyskanych produktów PCR. Do detekcji przyrostu

produktu PCR użyto barwnika SYBR Green, który interkalując z dwuniciowym DNA emituje fluorescencję. Uzyskane wyniki normalizowano względem wytypowanych genów referencyjnych.

Mieszanina reakcyjna w objętości 20 μL zawierała 10 μl matrycy cDNA, 0,2 μM każdego ze starterów, 3,0 mM jonów Mg^{2+} oraz mieszaninę „Lightcycler FastStart DNA Master SYBR Green I” zawierającą polimerazę TaqDNA „FastStart”, barwnik SYBR Green I, mieszaninę dNTP oraz bufor reakcyjny. Dla wszystkich badanych genów użyto następującego programu reakcji: 10 min denaturacji aktywujący polimerazę DNA, a następnie 42 cykle amplifikacji według schematu: denaturacja 95° C przez 9 sekund, przyłączenie startera 58° C przez 5 sekund, wydłużenie startera 72° C przez 5 sekund.

4.12. Izolacja białka

Zamrożone komórki homogenizowano w zimnym buforze RIPA z dodatkiem mieszaniny inhibitorów proteaz. Następnie próbki inkubowano i wytrząsano przez godzinę, po czym wirowano przy 15000 x g przez 30 min aby usunąć osad komórkowy (wszystko w 4 °C). Supernatant przenoszono do świeżej probówki. Za pomocą metody Bradforda oszacowano stężenie białka w każdej z prób. W tym celu przygotowywano krzywą wzorcową o następujących stężeniach BSA: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 i 60 $\mu\text{g/ml}$. Do każdego rozcieńczenia dodawano 500 μl odczynnika Bradforda. Do 10 μl próbki dodawano 490 μl wody i 500 μl tego odczynnika. Pomiar absorpcji prowadzono przy długości fali 595 nm.

4.13. Western Blotting

Próbki 20 μg białka rozdzielano na gradientowym 4-20% żelu poliakrylamidowym z SDS (siarczan dodecylu sodu), przygotowywanym aparatem do formowania gradientu „485 Gradient Former” (Biorad). Lizat komórek Jurkat wykorzystano jako kontrolę pozytywną dla ZFP91 rekomendowaną przez producenta przeciwciał anti-ZFP91. Do rozdziału elektroforetycznego używano aparatu Mini-PROTEAN 3 (Biorad). Rozdzielone białka przenoszono na membranę PVDF. Sprawdzano efektywność transferu oraz poprawność oszacowania ilości białka poprzez zabarwienie membrany barwnikiem Ponceau S. Barwnik odmywano inkubując membranę w roztworze TBST. Wolne miejsca na membranie blokowano przez inkubację w 5% odtłuszczonym mleku w roztworze TBST przez godzinę. Następnie membranę inkubowano przez noc w

temperaturze 4 °C w roztworze TBST z poliklonalnym przeciwciałem króliczym anti-ZFP91 rozcieńczonym w stosunku 1:200 lub monoklonalnym przeciwciałem króliczym anti-GAPDH rozcieńczonym w stosunku 1:2000. Po 3-krotnym przepłukaniu błony w roztworze TBST, przeprowadzano inkubację z drugorzędowym przeciwciałem skierowanym przeciwko króliczemu IgG związanym z peroksydazą chrzanową, w stosunku 1:2000 przez 1 godzinę, w temperaturze pokojowej. Membranę przemywano kilkakrotnie buforem TBST. Po inkubacji z chemiluminescencyjnym substratem ECL przez 5 min, uzyskany sygnał wizualizowano za pomocą kamery z chłodzoną matrycą CCD (GelDoc-It Imaging System, UVP). Sygnał analizowano stosując oprogramowanie densytometryczne Totallab.

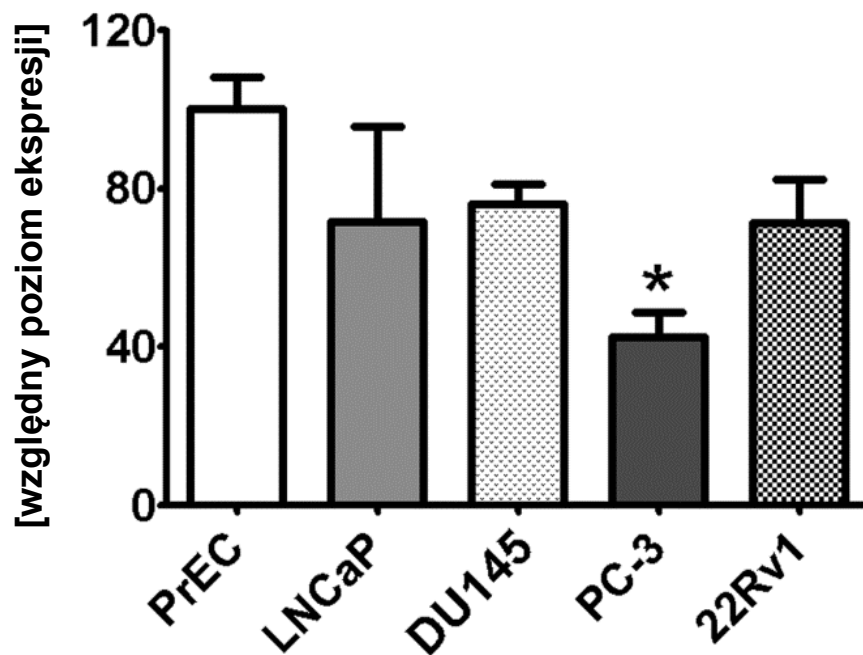
4.14. Analiza statystyczna:

W analizie statystycznej posługiwano się programem GraphPad Prism wersja 5. Różnice pomiędzy grupami interpretowano jako istotne przy $p < 0,05$. Szczegółowy opis statystyki dla każdego z eksperymentów znajduje się pod rycinami.

5. Wyniki

5.1. Analiza ekspresji mRNA ZFP91 w hodowlach komórek nabłonka gruczołu krokowego prawidłowych i raka gruczołu krokowego.

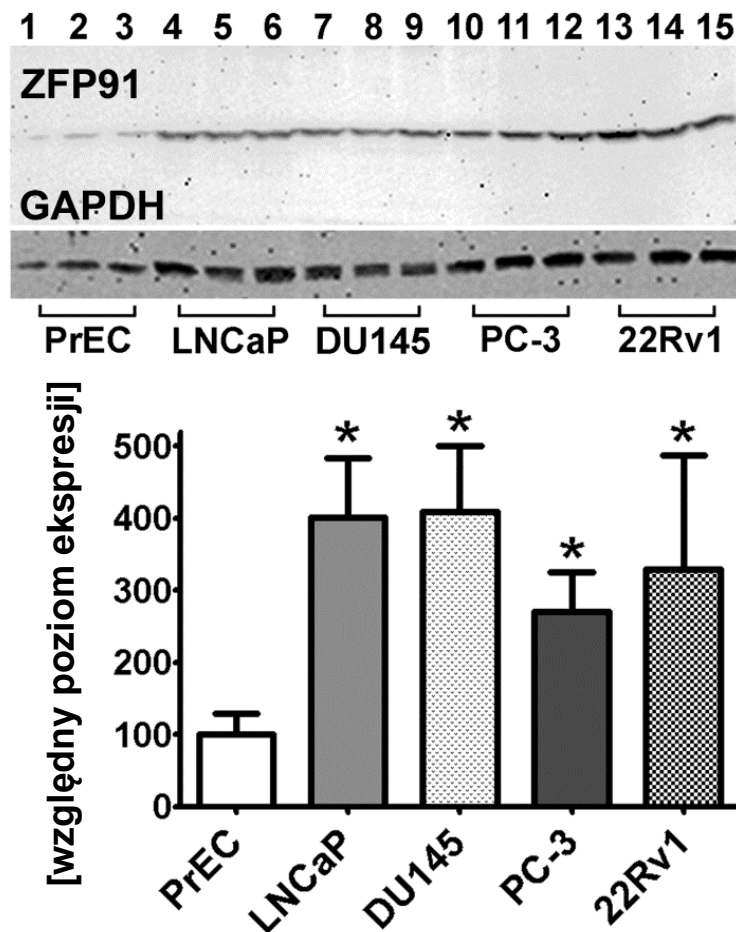
Ekspresję genu *ZFP91* badano metodą QPCR w hodowlach komórek nabłonka gruczołu krokowego – PrEC oraz liniach komórek raka gruczołu krokowego androgenowrażliwych – LNCaP i 22Rv1 oraz androgenoniewrażliwych – DU145 i PC3. Poziom ekspresji we wszystkich badanych komórkach był porównywalny. Jedynie ekspresja w komórkach PC-3 była istotnie mniejsza od ekspresji w komórkach PrEC (ryc. 5).



Ryc. 5. Analiza QPCR ekspresji genu *ZFP91* w komórkach PrEC, LNCaP, DU145, PC-3 i 22Rv1. Słupki przedstawiają ekspresję genu na poziomie mRNA względem genów referencyjnych. Średniej ekspresji w komórkach PrEC przypisano wartość 100, a w pozostałych liniach adekwatnie znormalizowano. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SD; w każdej grupie $n=6$. Analiza statystyczna za pomocą testu ANOVA i testu post-hoc Tukeya; * – $p < 0,05$.

5.2. Identyfikacja i analiza ilości białka ZFP91 w hodowlach komórek nabłonka gruczołu krokowego prawidłowych i raka gruczołu krokowego.

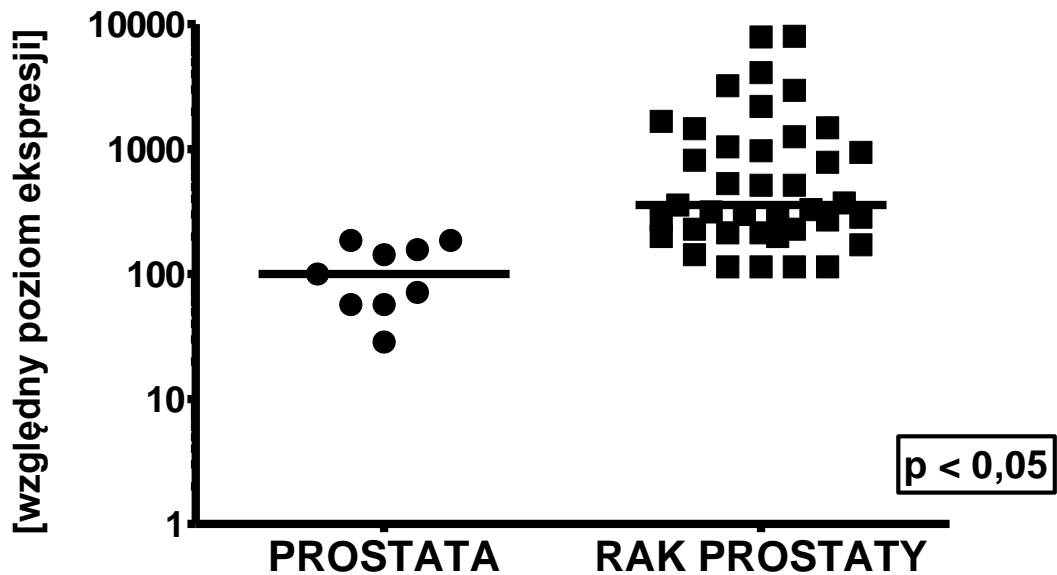
Potwierdzono obecność produktu białkowego genu *ZFP91* w badanych komórkach (PrEC, LNCaP, DU145, PC-3 i 22Rv1) za pomocą metody Western Blotting. Wykonano analizę densytometryczną uzyskanych prążków wykorzystując dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) jako białko referencyjne. Stwierdzono znacznie zwiększoną ilość białka ZFP91 we wszystkich liniach komórek nowotworowych w porównaniu do prawidłowych komórek nabłonka gruczołu krokowego. Nie stwierdzono w tym zakresie istotnych różnic pomiędzy liniami androgenowrażliwymi i androgenoniewrażliwymi (ryc. 6).



Ryc. 6. Analiza ekspresji białka ZFP91 w komórkach PrEC, LNCaP, DU145, PC-3 i 22Rv1. Górna część ryciny przedstawia reprezentatywny obraz wyników immunoblottingu. Słupki przedstawiają ilość białka ZFP91 względem białka referencyjnego – dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH). Średniej ekspresji w komórkach PrEC przypisano wartość 100, a w pozostałych liniach adekwatnie znormalizowano. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SD; w każdej grupie $n=6$. Analiza statystyczna za pomocą testu ANOVA i testu post-hoc Tukeya; * – $p < 0,05$.

5.3. Analiza ekspresji genu ZFP91 w gruczole prawidłowym oraz w przypadkach raka gruczołu krokowego.

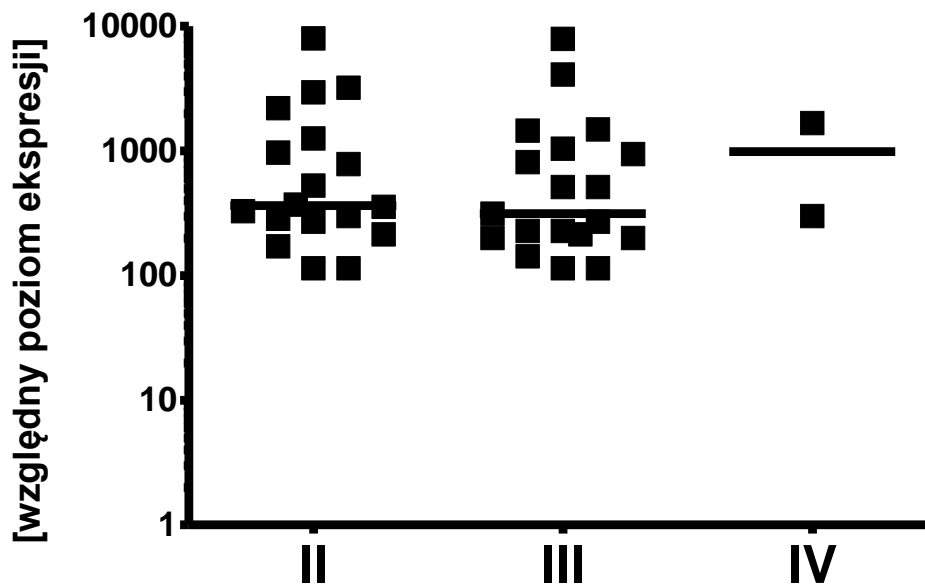
Przebadano próbki cDNA (z zestawu Prostate Cancer firmy Origene) pochodzące od 48. pacjentów z potwierdzonym histopatologicznie rakiem gruczołu krokowego. Próbki uzyskano z fragmentów narządu ocenionych mikroskopowo jako gruczoł niezmienny chorobowo lub z fragmentów nowotworowych. Wykorzystując metodę QPCR przeanalizowano ekspresję genu ZFP91 ww. próbkach, stwierdzając jego istotnie wyższą ekspresję w próbkach RGK. W części przypadków różnica ekspresji była ponad 10-krotna (ryc. 7).



Ryc. 7. Względny poziom ekspresji genu ZFP91 w analizowanych przypadkach (z zestawu Origene). „PROSTATA” – próbki gruczołu krokowego niezmiennego chorobowo (n=9), „RAK PROSTATY” – próbki raka gruczołu krokowego (n=39). Pozioma kreska wyznacza medianę. Medianie w grupie „PROSTATA” przypisano wartość 100, a pozostałe wartości adekwatnie znormalizowano. Analiza statystyczna za pomocą testu Manna-Whitneya – różnice istotne statystycznie.

5.4. Analiza ekspresji genu *ZFP91* w przypadkach raka gruczołu krokowego o różnym stopniu zaawansowania.

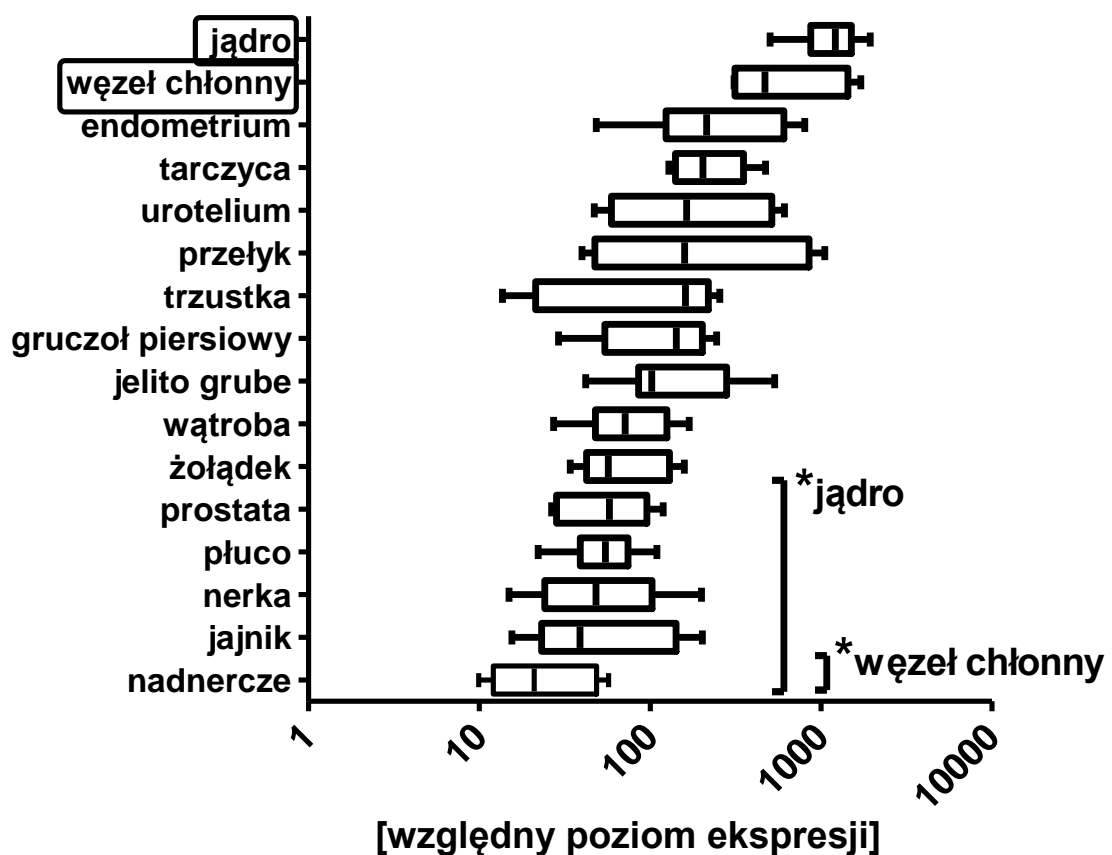
Przebadane próbki cDNA uzyskane z fragmentów nowotworowo zmienionych gruczołów krokowych podzielono zgodnie ze stopniem zaawansowania choroby nowotworowej określonym na podstawie raportu patologicznego. Nie stwierdzono istotnych różnic w zakresie ekspresji genu *ZFP91* pomiędzy tak wyodrębnionymi grupami (ryc. 8).



Ryc. 8. Względny poziom ekspresji genu *ZFP91* w przypadkach raka gruczołu krokowego o różnym stopniu zaawansowania: II n=18; III n=19; IV n=2 (z zestawu Origene). Medianie w grupie „PROSTATA” na poprzednim wykresie przypisano wartość 100, a pozostałe wartości adekwatnie znormalizowano. Analiza statystyczna za pomocą testu Kruskala-Wallisa i testu post-hoc Dunna – brak różnic istotnych statystycznie.

5.5. Analiza ekspresji genu *ZFP91* w niezmiennych chorobowo narządach człowieka.

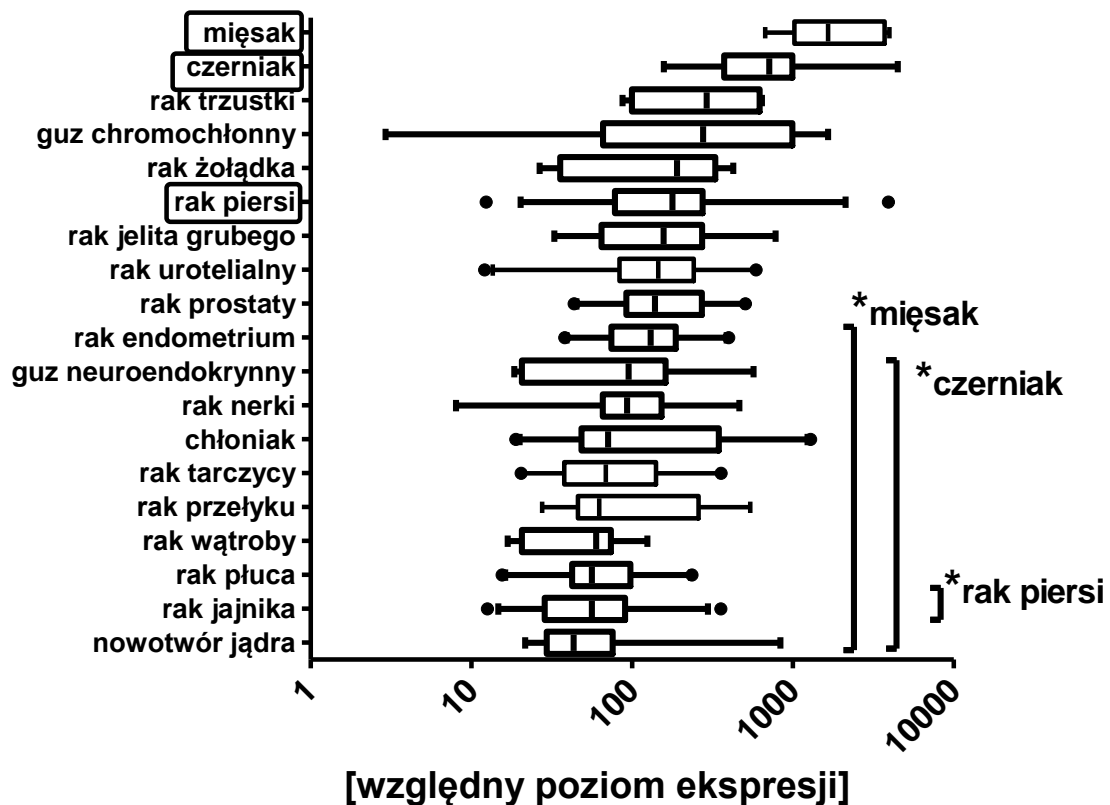
Wykorzystano próbki cDNA pobrane z niezmiennych chorobowo fragmentów narządów człowieka (z zestawu Origene). Najwyższą ekspresję genu *ZFP91* wśród przebadanych narządów wykazywało jądro (ryc. 9). Była ona istotnie wyższa niż w prostatie, płucu, nerce, jajniku i nadnerczu. Drugim narządem z najwyższą ekspresją badanego genu był węzeł chłonny. Ekspresja w węzle chłonnym była znamienne wyższa niż w nadnerczu, które wykazywało najniższą ekspresję genu *ZFP91* spośród wszystkich badanych narządów.



Ryc. 9. Analiza QPCR ekspresji *ZFP91* mRNA w 16 narządach człowieka. Wykres „pudełkowo-wąsowy” z zakresem pomiędzy 5 a 95 percentylem. Przedstawione wartości ekspresji znormalizowano względem mediany wszystkich analizowanych danych, której przypisano wartość 100. Gruczoł piersiowy n=5, przełyk n=4, jelito grube n=11, endometrium n=5, nerka n=8, wątroba n=6, płuco n=6, węzeł chłonny n=4, jajnik n=5, trzustka n=5, żołądek n=5, jądro n=6, tarczyca n=6, urotelium n=4, prostata n=6, nadnercze n=4. Analiza statystyczna za pomocą testu Kruskala-Wallisa i testu post-hoc Dunna, * - $p < 0,05$.

5.6. Analiza ekspresji genu ZFP91 w 19. typach nowotworów człowieka.

Wykorzystano próbki cDNA pobrane z różnych typów nowotworów człowieka (z zestawu Origene). Najwyższą ekspresję genu ZFP91 stwierdzono w mięsakach i w czerniaku (ryc. 10). Najniższą w nowotworze jądra i raku jajnika. Znamienne wyższą ekspresją w porównaniu do części typów przebadanych nowotworów wykazują mięsaki, czerniak i rak piersi.



Ryc. 10. Analiza QPCR ekspresji *ZFP91* mRNA w 19 typach nowotworów człowieka. Wykres „pudełkowo-wąsowy” z zakresem pomiędzy 5 a 95 percentylem. Przedstawione wartości ekspresji znormalizowano względem mediany wszystkich analizowanych danych, której przypisano wartość 100. Mięsak n=10, czerniak n=11, rak trzustki n=6, guz chromochłonny n=7, rak żołądka n=8, rak piersi n=30, rak jelita grubego n=16, rak urotelialny n=23, rak prostaty n=20, rak endometrium n=21, guz neuroendokrynnny n=11, rak nerki n=19, chłoniak n=33, rak tarczycy n= 20, rak przełyku n=14, rak wątroby n=15, rak płuca n=21, rak jajnika n=27, nowotwór jądra n=17. Analiza statystyczna za pomocą testu Kruskala-Wallis i testu post-hoc Dunna, * - $p < 0,05$.

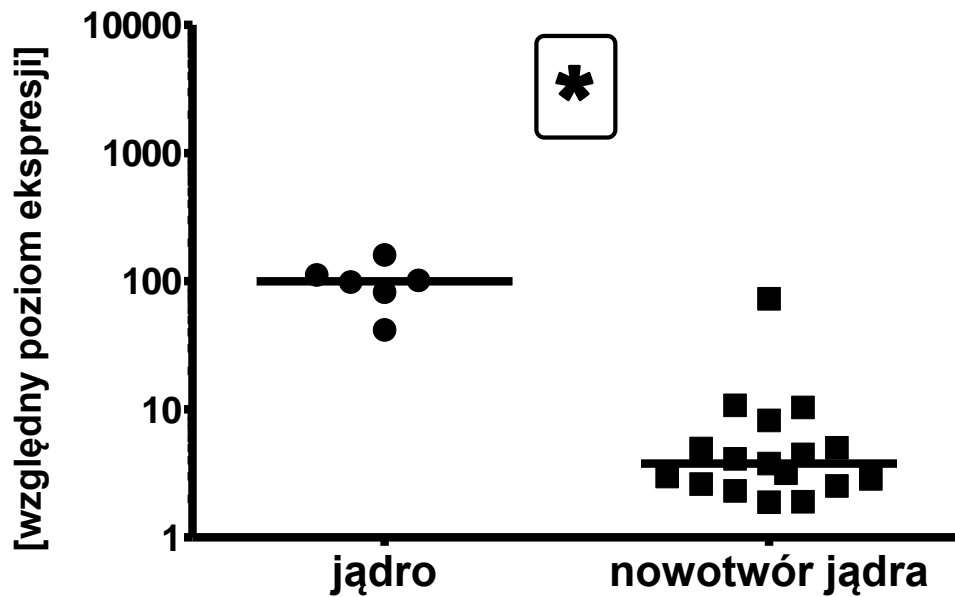
5.7. Porównanie ekspresji genu *ZFP91* w 15 narządach człowieka z ekspresją w wywodzących się z nich nowotworach.

Poddano analizie ekspresję genu *ZFP91* w próbkach cDNA z 15 typów narządów człowieka w porównaniu z ekspresją w wywodzących się z nich nowotworach. Na poniższych wykresach przedstawiono wyniki analizy poczynając od narządu z najwyższą ekspresją genu *ZFP91* – jądra. W przypadku wywodzących się z niego nowotworów stwierdzono szczególnie istotne zmniejszenie ilości *ZFP91* mRNA. Nie wykryto w tym zakresie różnic pomiędzy przypadkami guzów nasieniakowych (7 przypadków) i nienasieniakowych (10 przypadków) (ryc. 11).

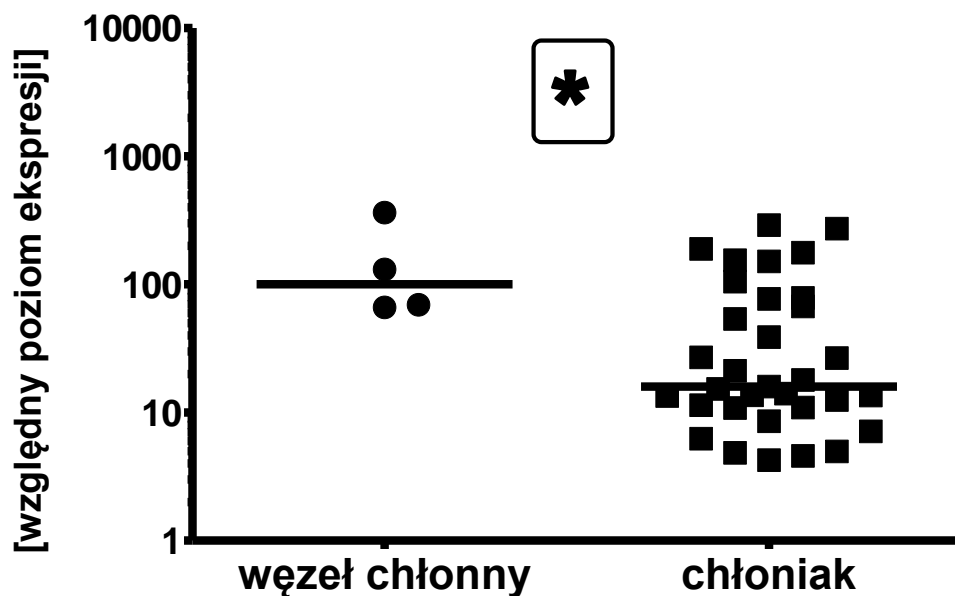
Drugim narządem o najwyższej ekspresji genu *ZFP91* była tkanka limfatyczna zawarta w węzłach chłonnych. W porównaniu z nią, w komórkach chłoniaka nieziarniczego poziom ekspresji genu *ZFP91* był znamienne niższy, pomimo szerokiego zakresu ekspresji (ryc. 12).

W przypadku raka tarczycy wykazano znamienne obniżenie ekspresji genu *ZFP91* w porównaniu do tarczycy prawidłowej (ryc. 13). Natomiast w przypadku RGK na podstawie próbek pochodzących z zestawów „Cancer Survey” (inni pacjenci niż w przypadku zestawu „Prostate Cancer”) potwierdzono wyniki uzyskane we wcześniejszych doświadczeniach. Ekspresja genu *ZFP91* była podwyższona w nowotworowo zmienionym gruczole krokowym (ryc. 14).

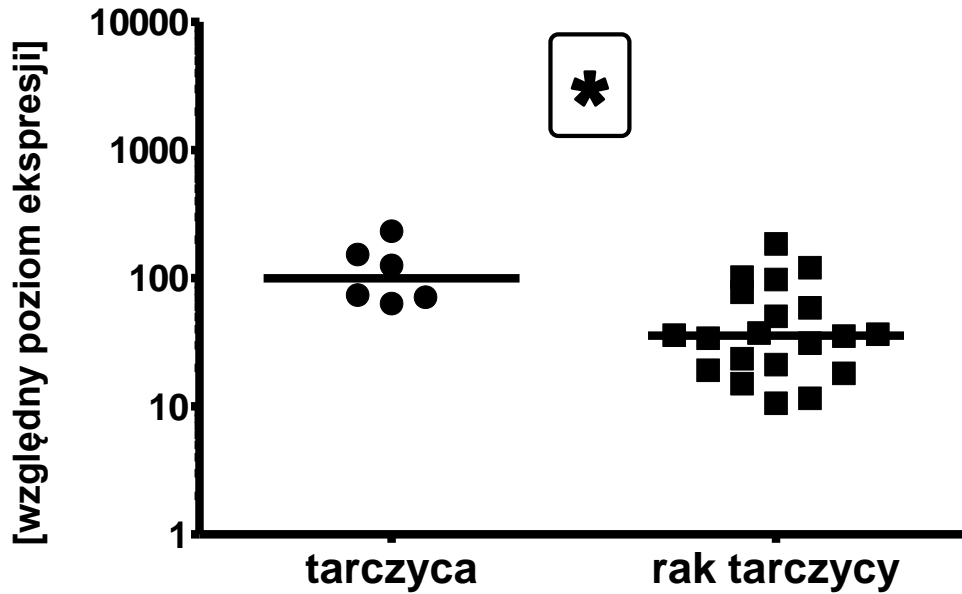
Jednakże w większości badanych typów nowotworów: w raku endometrium, raku urotelialnym, raku trzustki, raku piersi, raku jelita grubego, raku przełyku, raku nerki, raku żołądka, raku płuca, raku wątroby oraz w raku jajnika nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji genu *ZFP91* pomiędzy narządami prawidłowymi a nowotworami. (ryc. 15 – 25).



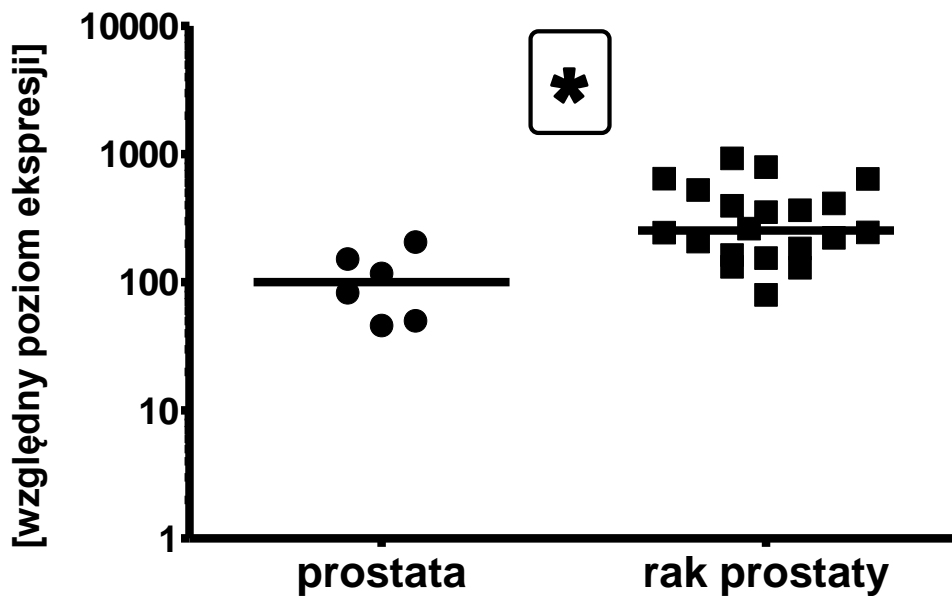
Ryc. 11. Względny poziom ekspresji genu ZFP91 w jądrze (n=6) i nowotworze jądra (n=17). Pozioma kreska wyznacza medianę. Medianie w narządzie niezmiennym przypisano wartość 100, a pozostałe wartości adekwatnie znormalizowano. Analiza statystyczna za pomocą testu Manna-Whitneya, * - $p < 0,05$.



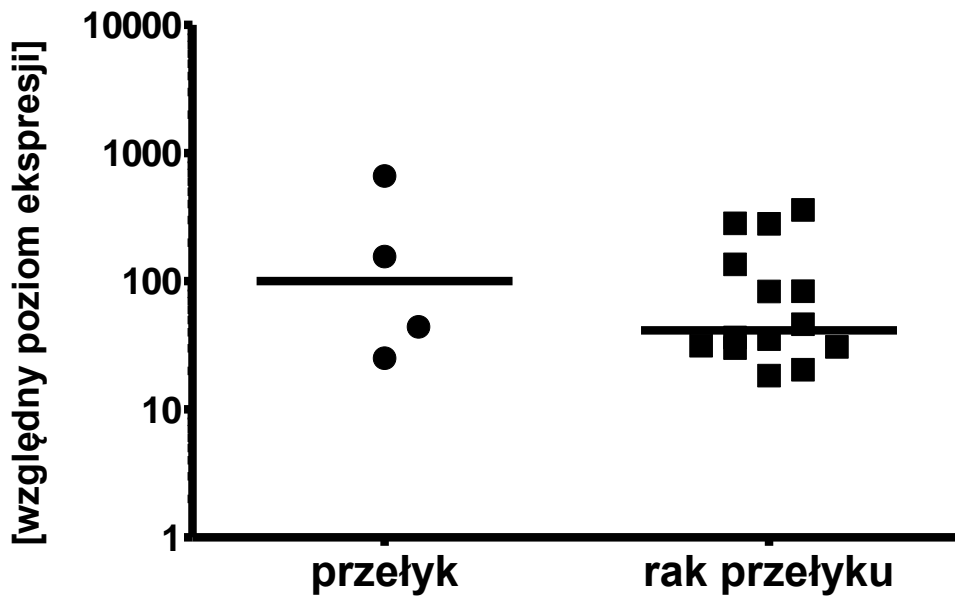
Ryc. 12. Względny poziom ekspresji genu ZFP91 w węzle chłonnym (n=4) i chłoniaku (n=33). Pozioma kreska wyznacza medianę. Medianie w narządzie niezmiennym przypisano wartość 100, a pozostałe wartości adekwatnie znormalizowano. Analiza statystyczna za pomocą testu Manna-Whitneya, * - $p < 0,05$.



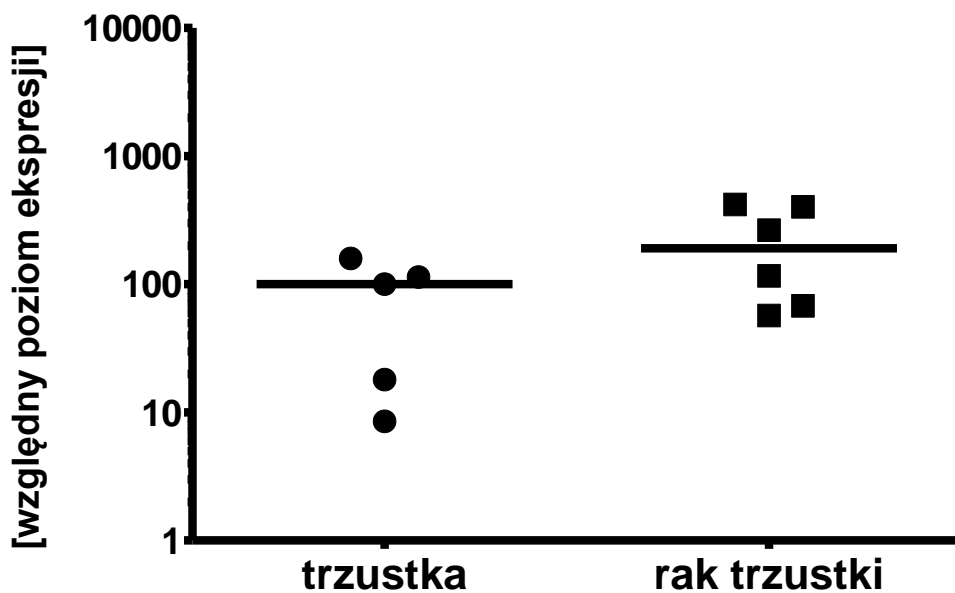
Ryc. 13. Względny poziom ekspresji genu ZFP91 w tarczycy (n=6) i raku tarczycy (n=20). Pozioma kreska wyznacza medianę. Medianie w narządzie niezmiennym przypisano wartość 100, a pozostałe wartości adekwatnie znormalizowano. Analiza statystyczna za pomocą testu Manna-Whitneya, * - $p < 0,05$.



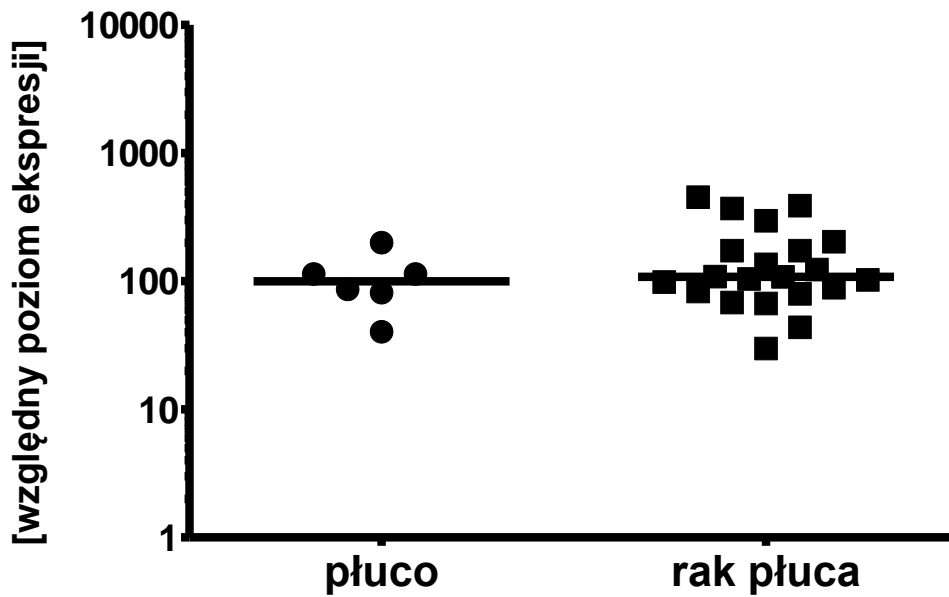
Ryc. 14. Względny poziom ekspresji genu ZFP91 w prostaty (n = 6) i raku prostaty (n = 20). Pozioma kreska wyznacza medianę. Medianie w narządzie niezmiennym przypisano wartość 100, a pozostałe wartości adekwatnie znormalizowano. Analiza statystyczna za pomocą testu Manna-Whitneya,* - $p < 0,05$ (istotność zaznaczono w ramce).



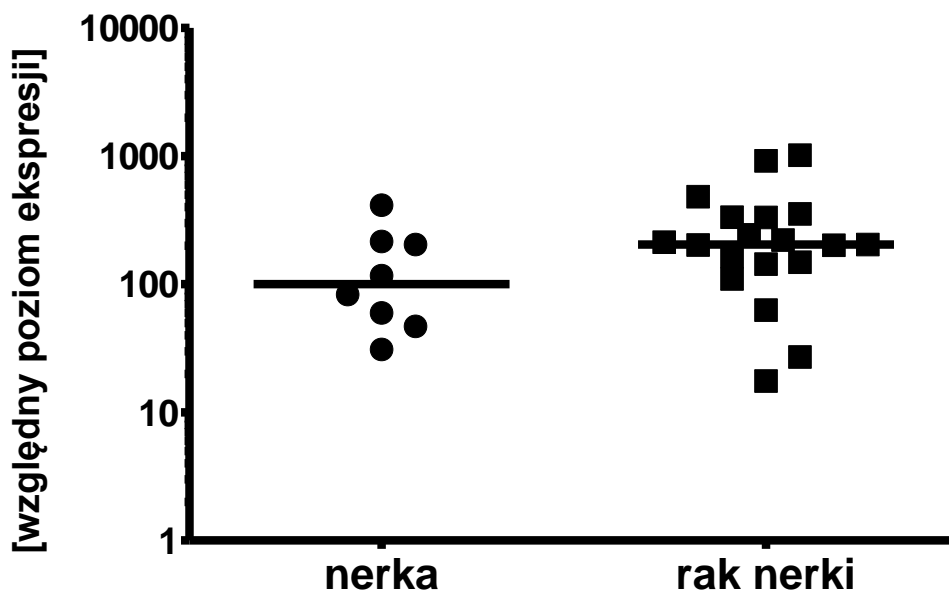
Ryc. 17. Względny poziom ekspresji genu ZFP91 w przełyku (n=4) i raku przełyku (n=14). Pozioma kreska wyznacza medianę. Medianie w narządzie niezmiennym przypisano wartość 100, a pozostałe wartości adekwatnie znormalizowano. Analiza statystyczna za pomocą testu Manna-Whitneya nie wykazała różnic istotnych statystycznie.



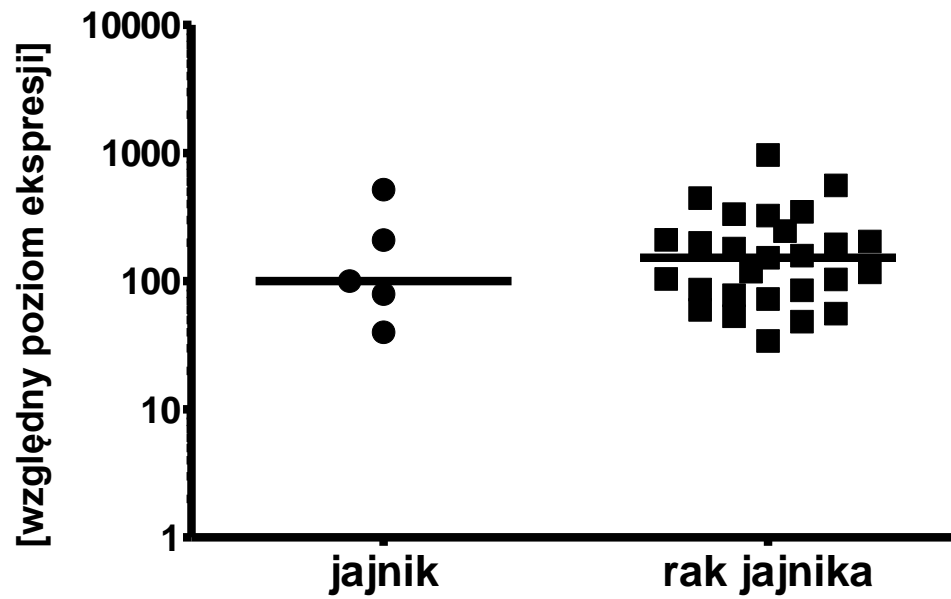
Ryc. 18. Względny poziom ekspresji genu ZFP91 w trzustce (n=5) i raku trzustki (n=6). Pozioma kreska wyznacza medianę. Medianie w narządzie niezmiennym przypisano wartość 100, a pozostałe wartości adekwatnie znormalizowano. Analiza statystyczna za pomocą testu Manna-Whitneya nie wykazała różnic istotnych statystycznie.



Ryc. 23. Względny poziom ekspresji genu ZFP91 w płucu (n=6) i raku płuca (n=21). Pozioma kreska wyznacza medianę. Medianie w narządzie niezmiennym przypisano wartość 100, a pozostałe wartości adekwatnie znormalizowano. Analiza statystyczna za pomocą testu Manna-Whitneya nie wykazała różnic istotnych statystycznie.



Ryc. 24. Względny poziom ekspresji genu ZFP91 w nerce (n=8) i raku nerki (n=19). Pozioma kreska wyznacza medianę. Medianie w narządzie niezmiennym przypisano wartość 100, a pozostałe wartości adekwatnie znormalizowano. Analiza statystyczna za pomocą testu Manna-Whitneya nie wykazała różnic istotnych statystycznie.



Ryc. 25. Względny poziom ekspresji genu ZFP91 w jajniku (n=5) i raku jajnika (n=27). Pozioma kreska wyznacza medianę. Medianie w narządzie niezmiennym przypisano wartość 100, a pozostałe wartości adekwatnie znormalizowano. Analiza statystyczna za pomocą testu Manna-Whitneya nie wykazała różnic istotnych statystycznie.

6. Dyskusja

Przedstawione badania są pierwszymi dotyczącymi ekspresji genu ZFP91 w liniach komórek raka prostaty. W komórkach nabłonkowych prostaty oraz w liniach komórek nowotworowych stwierdzono zbliżoną ekspresję mRNA. Pomimo tego, poziom białka ZFP91 był wyraźnie podwyższony we wszystkich badanych liniach komórek nowotworowych. Natomiast w przypadku łagodnego rozrostu gruczołu krokowego, zmiany ekspresji genu ZFP91 obserwowane na poziomie mRNA nie korelowały ze zmianami na poziomie białka. Może odpowiadać to obserwacjom Lee i wsp., gdzie stymulacja ekspresji genu ZFP91 indukowana aktywacją szlaku NF- κ B prowadziła do ograniczonych zmian na poziomie mRNA, a do znaczących i zależnych od czasu na poziomie białka (Lee i wsp., 2008).

Zjawisko słabej korelacji pomiędzy ilością mRNA a ilością białka jest dobrze znane na polu badań nad ekspresją genetyczną (Maier i wsp., 2009, 2011; Taniguchi i wsp., 2010; Vogel i wsp., 2012). Przykładowo, badania nad rakiem gruczołowym płuca wykazały, że tylko w przypadku około jednej piątej badanych genów istniała istotna korelacja pomiędzy poziomami białka i mRNA (Chen i wsp., 2002). Pomimo, że stężenie mRNA jest jednym z najważniejszych czynników determinujących ilość białka, także liczne inne czynniki także wpływają na stosunek ilości mRNA do białka. Wydaje się uzasadnionym założenie, że poziom mRNA może służyć jako wykładnik poziomu odpowiedniego białka, jednak nie bez weryfikacji. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że w przypadku genu ZFP91 nie występuje prosta zależność pomiędzy ilością mRNA a ilością białka.

Biorąc pod uwagę potencjalne funkcje ZFP91 jako czynnika transkrypcyjnego i/lub regulatora cyklu komórkowego (przewidywane na podstawie sekwencji wiążących DNA w cząsteczce), można przypuszczać, że jest to białko o krótkim okresie półtrwania, poddawane szybkiej wewnątrzkomórkowej degradacji. Relatywnie duża ilość białka ZFP91 w komórkach raka prostaty może być wynikiem jego większej stabilności i akumulacji w tych komórkach. Takie zjawisko było obserwowane w przypadku wielu białek onkogennych, na przykład białka p53, którego poziom uzależniony jest od potranskrypcyjnych mechanizmów regulacyjnych (Koumenis i wsp., 2001). Co więcej, wiele czynników w szlaku sygnałnym NF- κ B jest poddanych

ściślej kontroli ekspresji np. poprzez ukierunkowaną degradację proteasomalną (Vallabhapurapu i wsp., 2009). ZFP91 jest być może jednym z takich czynników w tym szlaku.

NF- κ B stanowi białkowy kompleks czynników transkrypcyjnych biorących udział w szerokim zakresie procesów biologicznych, w tym wzroście komórek i różnicowaniu, przeżywalności komórek oraz odpowiedzi zapalnej. Aktywacja NF- κ B prowadzi do uruchomienia klasycznej lub alternatywnej ścieżki sygnałnej, lub obu tych ścieżek. Ścieżka alternatywna jest związana z kilkoma ważnymi biologicznie funkcjami, m.in. nowotworzeniem komórek układu limfatycznego. Ważną cechą tej ścieżki jest jej zależność od poziomu białka NIK. Jego poziom zaś jest kontrolowany głównie poprzez degradację zależną od ubikwityny. W tym względzie istotne jest, że ZFP91 funkcjonuje jako pozytywny regulator NIK, powodujący jego stabilizację i aktywację (Harhaj i wsp., 2011, Sun i wsp., 2011). Co ważne, dostępne dane wskazują na onkogenną aktywność białka NIK. Jego zwiększona ekspresja jest wiązana z rozwojem nowotworów m.in. czerniaka, raka trzustki, raka piersi, raka płuca, szpiczaka mnogiego oraz białaczki T-komórkowej dorosłych. Stabilizacja białka NIK odbywająca się za pośrednictwem ZFP91 może stanowić jeden z mechanizmów onkogennej aktywacji białka NIK (Xiao i wsp., 2011).

Zespół Lee i wsp. wykrył nadekspresję genu ZFP91 w komórkach raka piersi i raka żołądka posiadających wysoką aktywność szlaku NF- κ B w porównaniu do innych linii komórek tych nowotworów (Lee i wsp., 2008). W badaniach nad rakiem gruczołu krokowego, szlak NF- κ B był konstytutywnie aktywowany w przypadku androgenoniewrażliwych linii komórek raka prostaty takich jak DU145 i PC-3, lecz nie w androgenowrażliwej linii LNCaP czy w prawidłowych komórkach nabłonka prostaty PrEC (Gasparian i wsp., 2002). Przedstawione wyniki doświadczeń wskazują jednak, że ekspresja genu ZFP91 nie różni się istotnie pomiędzy liniami DU145, PC-3 i LNCaP. Wydaje się, że postulowana przez zespół Lee i wsp. zależność pomiędzy konstytutywną aktywnością szlaku NF- κ B a ekspresją genu ZFP91 nie powinna być uogólniana.

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały istotnie zwiększoną ekspresję mRNA genu ZFP91 w próbkach RGK w porównaniu z narządem prawidłowym (ryc. 5.3), w części przypadków nawet 10-krotnie. Są to wyniki zgodne z obserwacją stanowiącą element

opracowania patentowego Lee i wsp. i, co ważne, pochodzą z doświadczenia na znamiennej liczbie pacjentów – 48. Podobnej nadekspresji nie zaobserwowano w badanych liniach komórek raka prostaty, pomimo jej obecności na poziomie białka. Jest to różnica niespodziewana, jednak nie zaskakująca biorąc pod uwagę wykazywane w szeregu badań różnice genomowe pomiędzy liniami komórek nowotworowych a nowotworami człowieka (Ertel i wsp., 2006; Stein i wsp., 2004; Gillet i wsp., 2011; Sandberg i wsp., 2005).

Analiza ekspresji genu ZFP91 w próbkach RGK podzielonych według stopnia zaawansowania nowotworu nie wykazała istotnych różnic pomiędzy grupami – ryc. 5.4. Brak zatem dowodów, by nadekspresja ZFP91 zaobserwowana w większości badanych przypadków raka prostaty korelowała ze stopniem zaawansowania choroby. W kontekście uzyskanych wyników interesującym kierunkiem dalszych badań byłaby ocena potencjalnych różnic pomiędzy pacjentami z rakiem prostaty o wysokiej ekspresji genu ZFP91, a tymi o ekspresji niezmienionej. W dotychczasowych badaniach nad rakiem prostaty wykrywano geny których zmienna ekspresja stanowi niezależny czynnik rokowniczy choroby (Lapointe i wsp., 2004). Pytanie czy zmiana ekspresji genu ZFP91 może stanowić taki czynnik pozostaje jak dotąd bez odpowiedzi. Możliwym jest, że towarzyszy ona tylko innym procesom komórkowym (np. aktywacji szlaku NF- κ B) i jako taka nie stanowi niezależnego czynnika patogenetycznego. Mnogość i wzajemne zależności pomiędzy czynnikami wpływającymi na aktywację szlaku NF- κ B czyni wyselekcjonowanie związków kluczowych w badanych procesach wyjątkowo trudnym (Hoesel i wsp., 2013). Badaniem, które pomogłoby ocenić istotność zaobserwowanych zmian byłaby ocena ekspresji genu ZFP91 na poziomie białka. Jest to szczególnie istotnie w związku z obserwowanymi rozbieżnościami w ekspresji genu ZFP91 na poziomie mRNA i białka. Znaczna nadekspresja ZFP91 w części przypadków raka gruczołu krokowego zachęca do dalszych badań nad tym zagadnieniem.

Wcześniejsze doniesienia dotyczące ekspresji genu ZFP91 w prawidłowych narządach człowieka wykazały obecność ZFP91 mRNA we wszystkich badanych narządach, ze szczególnie wysoką ekspresją w jądrze. W przedstawianym doświadczeniu (ryc. 5.5), potwierdzono ekspresję genu ZFP91 w dotychczas niezbadanych narządach: w węzłach chłonnych, endometrium, tarczycy, urotelium, przełyku, gruczole piersiowym, żołądka i

nadnerczu. Szczególnie wysoka ekspresja genu ZFP91 w jądrze została również potwierdzona również w naszym materiale. Trudno ocenić istotność tej obserwacji. Na podstawie literatury wiadomo, że jądro jest narządem, w którym wielokrotnie znajdowano transkrypty niewystępujące w innych narządach, nie stwierdzając przy tym dowodów na występowanie ich translacji i funkcji (Dobner i wsp., 1987; Garrett i wsp., 1989; Stallard i wsp., 1991). Co ciekawe, u myszy gen ZFP91 jest jednym genów-kandydatów jako czynnik powodujący męską niepłodność (Trachtulec i wsp., 1997). Niestety, to zagadnienie nie zostało do tej pory wyjaśnione. Kolejnym narządem ze stosunkowo wysoką ekspresją genu ZFP91 jest węzeł chłonny i zawarte w nim limfocyty. Może mieć to związek z aktywnością szlaku NF- κ B w tych komórkach. Szlak NF- κ B jest obecny w indukowalnej formie w praktycznie wszystkich typach komórek (Lenardo i wsp., 1989). Natomiast jest konstytutywnie aktywowany w większości komórek układu odpornościowego (Kolenko i wsp., 1999; Ward i wsp., 1999; Griffin i wsp., 1989). Wykazano także, poprzez farmakologiczne zahamowanie szlaku NF- κ B, że podstawowy poziom aktywności NF- κ B jest konieczny do hamowania apoptozy w dojrzałych limfocytach w fazie G0 cyklu komórkowego (Bureau i wsp., 2002). Wyższa ekspresja ZFP91 w komórkach węzła chłonnego może mieć związek z wyższą aktywnością szlaku NF- κ B.

Fizjologiczna rola powszechnej ekspresji genu ZFP91 w narządach człowieka oraz jej znaczenie w biologii komórki oczekuje na pełne wyjaśnienie. Na podstawie analizy sekwencji ZFP91 przewidywane jest, że zawiera w swej strukturze pięć motywów palca cynkowego, zamek leucynowy, strukturę „coiled-coil” oraz sekwencje lokalizujące w jądrze (NLS-nuclear localization signals) (Unoki i wsp., 2003). Wewnątrzkomórkowa lokalizacja ZFP91 w jądrze została także potwierdzona przez zespół Unoki i wsp. Motywy palca cynkowego są zdolne do rozpoznawania i łączenia się z DNA (Klug, 1999). Zamki leucynowe występują w wielu eukariotycznych czynnikach transkrypcyjnych i służą wiązaniu DNA oraz interakcjom międzybiałkowym (van Heeckeren i wsp., 1992; Lupas i wsp., 2005). Pomimo powyższych właściwości, nie potwierdzono do tej pory roli ZFP91 jako czynnika transkrypcyjnego. W 2010 roku Jin X i wsp., wykazali, że ZFP91 posiada rolę atypowej ubikwitynazy typu E3 (ligazy ubikwityno-białkowej). Poprzez ubikwitynizację w pozycji 63 lizyny w łańcuchu ubikwityny ZFP91 aktywuje i stabilizuje białko NIK. O ile rola ubikwitynizacji w regulacji wielu procesów komórkowych w tym szlaku NF- κ B jest znana (Harhaj i wsp.,

2011), o tyle ta funkcja białka ZFP91 nie była możliwa do przewidzenia na podstawie jego struktury, stąd nazwa „atypowa” (Hutchins i wsp., 2013). Nie wykryto do tej pory innych białek ubikwitylizowanych za pośrednictwem ZFP91.

Spośród 19 przebadanych typów nowotworów, dwa wykazały wyraźnie podwyższoną ekspresję genu ZFP91 – mięsaki i czerniak (ryc. 5.6). Istotna aktywność szlaku NF- κ B obserwowana w tych nowotworach (Horiuchi i wsp., 2008; Madonna i wsp., 2012) nie wydaje się być jedyną przyczyną tego zjawiska w związku z podobną aktywnością obserwowaną i w innych typach agresywnych nowotworów (Lin Y i wsp., 2010). Zdecydowanie najwyższa ekspresja genu ZFP91 w badanych przypadkach mięsaków może stanowić odzwierciedlenie odmienności tego typu nowotworu złośliwego – agresywnego nienabłonkowego nowotworu pochodzenia mezenchymalnego. Jako jedyny z badanych typów nowotworów wywodzi się on z transformowanych macierzystych komórek mezenchymalnych (Xiao W i wsp., 2013). W przypadku czerniaka, będącego drugim pod względem ekspresji badanego genu, agresywnym nowotworem pochodzenia neuroektodermalnego, transformacja w kierunku fenotypu mezenchymalnego stanowi również ważny element rozwoju nowotworu (Mikesh i wsp., 2010). Pomimo obecności w skórze, melanocyty nie są komórkami nabłonkowymi. Ich migracja z grzebieni nerwowych podczas rozwoju embriologicznego może być ułatwiana poprzez przejściowy fenotyp mezenchymalny. Dojrzałe melanocyty wykazują pewne markery komórek nabłonkowych, natomiast przemiana nowotworowa oraz postępująca agresywność komórek czerniaka wiąże się ze zmianą ich fenotypu w kierunku komórek mezenchymalnych (Alonso i wsp., 2007). Stają się w ten sposób bardziej ruchliwe, zdolne do interakcji z macierzą pozakomórkową i nabywają zdolności rozprzestrzeniania się i przerzutowania (Grünert i wsp., 2003).

W kontekście nabywania mezenchymalnych właściwości komórek nowotworowych podkreślana jest rola czynnika transkrypcyjnego Twist1. Jest on zaangażowany w czasie rozwoju embrionalnego w procesy gastrulacji, migracji komórek grzebieni nerwowych oraz kościotworzenie. Po urodzeniu ekspresja Twist1 jest ograniczona do macierzystych komórek mezenchymalnych. W trakcie nowotworzenia, Twist1 jest zaangażowany w progresję nowotworu, przerzutowanie i ulega swoistej nadekspresji w różnych typach nowotworów, w tym raku prostaty, czerniaku, raku płuca, raku piersi,

raku przełyku i mięsaku kości. Uważa się, że Twist1 zwiększa inwazyjność nowotworów poprzez indukcję procesu zmiany fenotypu w kierunku mezenchymalnym. (Qin i wsp., 2012). W przypadku maziówczaka złośliwego jest to kluczowy gen odpowiedzialny za propagację nowotworu (Lee i wsp., 2014). W przypadku komórek czerniaka nadekspresja Twist1 jest częsta, wiąże się z większą inwazyjnością nowotworu i gorszymi wynikami przeżycia pacjentów (Weiss i wsp., 2012). Określenie czy nadekspresja genu ZFP91 stwierdzona w mięsakach i czerniaku ma związek z mezenchymalnymi właściwościami tych nowotworów, czy też stanowi jedynie zjawisko towarzyszące, wymaga dalszych badań.

W nielicznych badaniach dotyczących ekspresji genu ZFP91 w różnych typach nowotworów, zaobserwowano zmianę jego ekspresji w komórkach czerniaka. W 2000 roku, w badaniu poszukującym genów o zmiennej ekspresji w komórkach czerniaka o nabytej oporności na chemioterapeutyki, wykryto zmniejszoną ekspresję genu ZFP91 (w tej publikacji pod symbolem DSM-8) w komórkach czerniaka opornych na etopozyd. Nie wyjaśniono znaczenia tego odkrycia (Grottke i wsp., 2000).

Analiza porównawcza ekspresji genu ZFP91 w narządach prawidłowych i wywodzących się z nich nowotworach wykazała istotne różnice w kilku z badanych grup (ryc. 5.7 – 5.21). W trzech przypadkach – nowotworu jądra, chłoniaka nieziarniczego i raka tarczycy – ekspresja genu ZFP91 była istotnie obniżona w komórkach nowotworowych. Prawdopodobnie jest to związane z faktem, że zarówno jądro, węzeł chłonny jak i tarczyca były narządami z najwyższą ekspresją genu ZFP91 w porównaniu do innych narządów prawidłowych. Zmniejszona ekspresja genu ZFP91 w wywodzących się z nich nowotworach wydaje się być zjawiskiem wtórnym do zmiany fenotypu badanych komórek. Dalsze badania są potrzebne, aby wyjaśnić pełną rolę fizjologiczną ZFP91 w narządach prawidłowych. W przypadku komórek chłoniaka zmniejszenie ekspresji genu ZFP91 jest szczególnie ciekawe, biorąc pod uwagę doniesienia o zwiększonej ekspresji genu ZFP91 w komórkach białaczkowych (Unoki i wsp., 2003). Nadekspresja badanego genu nie jest zatem cechą wspólną wszystkich nowotworów wywodzących się z komórek układu odpornościowego.

Spośród badanych typów nowotworów tylko w przypadku raka prostaty ekspresja genu ZFP91 była istotnie zwiększona w porównaniu do narządu prawidłowego. Zwiększona

ilość ZFP91 mRNA (nawet 10-krotnie) dotyczyła jednak tylko części przypadków raka. Nie wykazano natomiast nadekspresji genu ZFP91 obserwowanej przez zespół Lee i wsp. w próbkach raka żołądka i raka wątroby. Na podstawie przedstawionych badań można stwierdzić, że regulacja ekspresji ZFP91 mRNA nie jest zjawiskiem typowo towarzyszącym procesowi nowotworzenia. Analiza ekspresji badanego genu w różnych stadiach choroby nowotworowej (przedstawiona dla przypadków raka prostaty, a także wykonana dla innych licznych grup badanych nowotworów – dane nie przedstawione) nie wykazała istotnych różnic pomiędzy tak wyselekcjonowanymi grupami. Poziom ekspresji genu ZFP91 na poziomie mRNA nie wydaje się być zatem związany ze stopniem zaawansowania choroby nowotworowej.

Dalsze badania nad rolą ZFP91 w procesie nowotworzenia powinny dotyczyć oceny ekspresji ZFP91 na poziomie białka. Jest to szczególnie istotne biorąc pod uwagę zaobserwowany brak jednoznacznej korelacji pomiędzy ekspresją tego genu na poziomie mRNA i białka. W przypadku hodowlanych komórek linii raka prostaty istotna nadekspresja ZFP91 występowała tylko na poziomie białka. Z kolei przebadane próbki RGK wykazywały w części przypadków znaczną nadekspresję ZFP91 na poziomie mRNA. W związku z zakładanymi onkogennymi właściwościami genu ZFP91 dalsze badania, szczególnie dotyczące jego ekspresji w mięsakach, czerniaku i raka gruczołu krokowego mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia molekularnej patogenezы tych chorób. Przedstawione wyniki doświadczeń uzupełnione o badania ekspresji genu ZFP91 na poziomie białka pozwolą w przyszłości uzyskać pełny obraz zmienności ekspresji białka palca cynkowego ZFP91 w narządach prawidłowych i w nowotworach człowieka.

7. Wnioski

Analiza wyników badań przeprowadzonych nad ekspresją *ZFP91* w narządach prawidłowych człowieka oraz w wywodzących się z nich nowotworach oraz nad rolą genu w patogenezie raka gruczołu krokowego pozwala na wysunięcie następujących wniosków:

1. W hodowanych komórkach nabłonka prostaty niezmiętej oraz w liniach komórek raka prostaty ekspresja *ZFP91* nie podlega znaczącemu zróżnicowaniu na poziomie mRNA, jest ona natomiast znacznie podwyższona na poziomie białka we wszystkich badanych liniach komórek nowotworowych – zarówno androgenowrażliwych jak i androgenoniewrażliwych. Spostrzeżenie to sugeruje, że w liniach komórek raka prostaty odmienne modyfikacje potranskrypcyjne prowadzą do podwyższenia poziomu białka palca cynkowego *ZFP91*.
2. W raku prostaty ekspresja genu *ZFP91* jest istotnie podwyższona na poziomie mRNA, przy czym zmiana ta nie jest związana ze stadium zaawansowania choroby nowotworowej. Z uwagi na potencjalnie istotne właściwości onkogenne *ZFP91*, jego rola w biologii raka prostaty zasługuje na dalsze badania.
3. Poziomy ekspresji genu *ZFP91* w prawidłowych narządach człowieka wykazują znaczne zróżnicowanie, z najwyższymi wartościami w jądrze, następnie wężłach chłonnych, endometrium i tarczycy. Sugeruje to, iż poziom ekspresji *ZFP91* w badanych narządach nie jest uzależniony od ich pochodzenia, a zależy jest raczej od ich czynności.
4. Porównanie ekspresji genu *ZFP91* w narządach prawidłowych i wywodzących się z nich nowotworach wykazały zmniejszenie ekspresji genu *ZFP91* w nowotworze jądra, chłoniaku nieziarniczym oraz raku tarczycy, natomiast zwiększenie w raku gruczołu krokowego. W większości badanych typów nowotworów ekspresja *ZFP91* nie różni się istotnie pomiędzy narządem a wywodzącym się z niego nowotworem. Z powyższego wynika, że zwiększona, w porównaniu z narządami niezmiętymi ekspresja *ZFP91* nie jest cechą charakterystyczną nowotworów człowieka.

8. Streszczenie

Łukasz Paschke

Białko palca cynkowego ZFP91: ekspresja genu i jego potencjalne znaczenie w patogenezie raka gruczołu krokowego.

Ekspresja i funkcje białka palca cynkowego ZFP91 w komórkach człowieka są do tej pory słabo poznane. Dostępne dane literaturowe wskazują, że ekspresja genu ZFP91 regulowana jest przez ścieżkę sygnałną czynnika transkrypcyjnego NF- κ B a sam ZFP91 działa jako istotny czynnik w aktywacji alternatywnej ścieżki sygnałnej tego czynnika. Dostępne dane sugerują także istotne proonkogenne właściwości ZFP91. Dotychczas zaobserwowana zmienność w ekspresji tego genu dotyczy m.in. zwiększonej ekspresji genu ZFP91 w komórkach białaczkowych. Wykryto także nadekspresję tego genu w łagodnym rozroście gruczołu krokowego.

Celem badań podjętych w tej pracy było określenie charakteru i zakresu zmian ekspresji genu ZFP91 w liniach komórek raka gruczołu krokowego oraz w hodowlanych komórkach prawidłowych gruczołu, a następnie analiza ekspresji tego genu w próbkach raka gruczołu krokowego o różnym stopniu zaawansowania. Ponadto, za cel postawiono analizę ekspresji genu ZFP91 w prawidłowych narządach człowieka oraz w 19 typach nowotworów człowieka.

Badania przeprowadzono na liniach komórek gruczołu krokowego i raka gruczołu krokowego oraz na próbkach cDNA potwierdzonych histopatologicznie przypadków raka gruczołu krokowego, prawidłowych narządów człowieka i 19. typów nowotworów. W badaniach wykorzystano klasyczny QPCR w czasie rzeczywistym. Ekspresję białek badano metodą Western blot. Prowadzono hodowlę androgenowrażliwych linii komórek raka prostaty: LNCaP i 22Rv1; androgenoniewrażliwych linii komórek raka prostaty: Du145 i PC-3 oraz prawidłowych komórek nabłonkowych prostaty – PrEC. Wykorzystano panele cDNA prawidłowych i nowotworowo zmienionych fragmentów prostaty (Prostate Cancer cDNA Array – Origene) oraz 19 typów nowotworów (Cancer Survey cDNA Array I, II, III – Origene).

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono znaczące podwyższenie poziomu białka ZFP91 w liniach komórek raka gruczołu krokowego. Nie towarzyszył temu wzrost ekspresji genu ZFP91 na poziomie mRNA oraz nie wykryto różnic w tym zakresie pomiędzy androgenowrażliwymi a androgenoniewrażliwymi liniami komórek. W badaniach nad ekspresją ZFP91 mRNA w próbkach raka gruczołu krokowego wykazano znaczącą nadekspresję badanego genu, niezwiązaną ze stopniem zaawansowania choroby nowotworowej. Wśród badanych prawidłowych narządów człowieka jądro wykazuje zdecydowanie najwyższą ekspresję genu ZFP91. Spośród 19 badanych typów nowotworów dwa – mięsaki i czerniak wykazują istotnie podwyższoną ekspresję genu ZFP91. Większość badanych narządów prawidłowych i wywodzących się z nich nowotworów wykazuje porównywalny poziom ekspresji genu ZFP91.

Biorąc pod uwagę potencjalnie istotną biologiczną rolę ZFP91, przedstawiona analiza jego ekspresji w raku gruczołu krokowego oraz w szerokim zakresie narządów prawidłowych i nowotworach człowieka winna stanowić fundament dla dalszych badań nad znaczeniem ZFP91 w fizjologii i patofizjologii człowieka.

9. Abstract

Łukasz Paschke

ZFP91 zinc finger protein: gene expression and its potential involvement in prostate cancer pathogenesis.

Expression and function of ZFP91 zinc finger protein in human cells are so far scarcely known. Available literature implies, that ZFP91 expression is regulated by NF- κ B signaling pathway and that ZFP91 alone functions as a key factor in activation of this factor alternative signaling pathway. Available data suggest also important prooncogenic properties of ZFP91. To this day, observed variability in this gene expression includes among others elevated ZFP91 gene expression in leukemia cells. Overexpression of this gene in benign prostatic hyperplasia was also discovered.

The aim of the present study was to characterize ZFP91 gene expression in prostate cancer cell lines and in cultured normal prostate cells and then to analyze ZFP91 gene expression in samples of prostate cancer at different clinical stages. Moreover, it was aimed to analyze ZFP91 gene expression in normal human organs and in 19 types of human neoplasms.

Research was conducted on prostate and prostate cancer cell lines as well as on cDNA samples of pathologically confirmed cases of prostate cancer, normal organs and 19 types of neoplasms. Classic QPCR method was employed. Protein expression was studied by Western blot method. Culture of androgen-sensitive prostate cancer cell lines: LNCaP and 22Rv1; androgen-insensitive prostate cancer cell lines: Du145 and PC-3 as well as normal prostate epithelial cells – PrEC was employed. CDNA arrays of normal prostate and prostate cancer tissues (Prostate Cancer cDNA Array – Origene) as well as 19 types of neoplasms (Cancer Survey cDNA Array I, II, III – Origene) were also used.

Based on conducted experiments, significant overexpression of ZFP91 protein was noted in prostate cancer cell lines. This finding was not accompanied by mRNA upregulation and no differences between androgen-sensitive and androgen-insensitive cancer cell lines in ZFP91 gene expression were noted. In studies on prostate cancer samples, a marked overexpression of ZFP91 was found, not related to disease staging.

Among normal human organs tested, testis shows highest expression of ZFP91 gene. Among 19 types of tested neoplasms two – sarcoma and melanoma demonstrated significantly higher expression of ZFP91 gene. Most of the examined organs and the neoplasms derived from them show comparable level of ZFP91 gene expression.

Taking into consideration potentially relevant biological role of ZFP91, presented analysis of its expression in prostate cancer and in wide range of human normal organs and neoplasms should provide a basis for further research aiming at characterizing ZFP91 significance in human physiology and pathophysiology.

10. Spis tabel i rycin

Tab. 1. Funkcjonalne pogrupowanie 84 genów związanych z otyłością badanych za pomocą zestawu starterów PCR	13
Tab. 2. Charakterystyka starterów użytych do reakcji QPCR.	24
Tab. 3. Tabela wynikowa programu Normfinder określająca stabilność genów referencyjnych w próbkach cDNA z zestawów „Cancer Survey I,II,III” (Origene). ..	26
Tab. 4. Typy analizowanych narządów i nowotworów oraz liczebność próbek cDNA z zestawów „Prostate Cancer” oraz „Cancer Survey I,II,III” firmy Origene.	27
Ryc. 1. Przewidywana struktura białka ZFP91	9
Ryc. 2. Analiza QPCR ekspresji genów <i>ZFP91</i> , <i>IL1R1</i> i <i>TNF</i> w próbkach łagodnego rozrostu gruczołu krokowego (BPH) i w gruczołach prawidłowych (CONTROL). ..	14
Ryc. 3. Analiza ekspresji białka ZFP91 w próbkach łagodnego rozrostu gruczołu krokowego (BPH) i w gruczołach prawidłowych (CONTROL).	15
Ryc. 4. Przykład elektroforetycznej kontroli wybranych produktów PCR amplifikacji ZFP91 cDNA.	25
Ryc. 5. Analiza QPCR ekspresji genu ZFP91 w komórkach PrEC, LNCaP, DU145, PC-3 i 22Rv1.	30
Ryc. 6. Analiza ekspresji białka ZFP91 w komórkach PrEC, LNCaP, DU145, PC-3 i 22Rv1.	31
Ryc. 7. Względny poziom ekspresji genu ZFP91 w analizowanych przypadkach (z zestawu Origene).	32
Ryc. 8. Względny poziom ekspresji genu ZFP91 w przypadkach raka gruczołu krokowego o różnym stopniu zaawansowania: II n=18; III n=19; IV n=2 (z zestawu Origene).	33
Ryc. 9. Analiza QPCR ekspresji <i>ZFP91</i> mRNA w 16 narządach człowieka	34
Ryc. 10. Analiza QPCR ekspresji <i>ZFP91</i> mRNA w 19 typach nowotworów człowieka.	35
Ryc. 11. Względny poziom ekspresji genu ZFP91 w jądrze (n=6) i nowotworze jądra (n=17).	37
Ryc. 12. Względny poziom ekspresji genu ZFP91 w węźle chłonnym (n=4) i chłoniaku (n=33).	37

Ryc. 13. Względny poziom ekspresji genu ZFP91 w tarczycy (n=6) i raku tarczycy (n=20).	38
Ryc. 14. Względny poziom ekspresji genu ZFP91 w prostaty (n = 6) i raku prostaty (n = 20).	38
Ryc. 15. Względny poziom ekspresji genu ZFP91 w endometrium (n=5) i raku endometrium (n=21)	39
Ryc. 16. Względny poziom ekspresji genu ZFP91 w urotelium (n=4) i raku urotelialnym (n=23).	39
Ryc. 17. Względny poziom ekspresji genu ZFP91 w przełyku (n=4) i raku przełyku (n=14).	40
Ryc. 18. Względny poziom ekspresji genu ZFP91 w trzustce (n=5) i raku trzustki (n=6).	40
Ryc. 19. Względny poziom ekspresji genu ZFP91 w gruczole piersiowym (n=5) i raku piersi (n=30).	41
Ryc. 20. Względny poziom ekspresji genu ZFP91 w jelicie grubym (n=11) i raku jelita grubego (n=16).	41
Ryc. 21. Względny poziom ekspresji genu ZFP91 w wątrobie (n=6) i raku wątroby (n=15).	42
Ryc. 22. Względny poziom ekspresji genu ZFP91 w żołądku (n=5) i raku żołądka (n=8).	42
Ryc. 23. Względny poziom ekspresji genu ZFP91 w płucu (n=6) i raku płuca (n=21).	43
Ryc. 24. Względny poziom ekspresji genu ZFP91 w nerce (n=8) i raku nerki (n=19).	43
Ryc. 25. Względny poziom ekspresji genu ZFP91 w jajniku (n=5) i raku jajnika (n=27).	44

11. Piśmiennictwo

Allott EH, Masko EM, Freedland SJ: Obesity and prostate cancer: weighing the evidence. Eur Urol., 63: 800-809 (2013)

Alonso SR, Tracey L, Ortiz P, Pérez-Gómez B, Palacios J, Pollán M, Linares J, Serrano S, Sáez-Castillo AI, Sánchez L, Pajares R, Sánchez-Aguilera A, Artiga MJ, Piris MA, Rodríguez-Peralto JL: A High-Throughput Study in Melanoma Identifies Epithelial-Mesenchymal Transition as a Major Determinant of Metastasis. Cancer Res., 67: 3450–3460 (2007)

Armstrong AP, Miller RE, Jones JC, Zhang J, Keller ET, Dougall WC: RANKL acts directly on RANK-expressing prostate tumor cells and mediates migration and expression of tumor metastasis genes. Prostate, 68: 92-104 (2008)

Berry SJ, Coffey DS, Walsh PC, Ewing LL: The development of human benign prostatic hyperplasia with age. J Urol., 132: 474–479 (1984)

Bureau F, Vanderplasschen A, Jaspar F, Minner F, Pastoret PP, Merville MP, Bours V, Lekeux P: Constitutive nuclear factor-kappaB activity preserves homeostasis of quiescent mature lymphocytes and granulocytes by controlling the expression of distinct Bcl-2 family proteins. Blood, 99: 3683-3691 (2002)

Chen G, Gharib TG, Huang CC, Taylor JM, Misek DE, Kardia SL, Giordano TJ, Iannettoni MD, Orringer MB, Hanash SM, Beer DG: Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. Mol Cell Proteomics: MCP, 1: 304-313 (2002)

Chopra DP, Menard RE, Januszewski J, Mattingly RR: TNF-alpha-mediated apoptosis in normal human prostate epithelial cells and tumor cell lines. Cancer Lett., 203: 145-154 (2004)

Dobner PR, Kislauskis E, Wentworth BM, Villa-Komaroff L: Alternative 5' exons either provide or deny an initiator methionine codon to the same alpha-tubulin coding region. Nucleic Acids Res., 15: 199-218 (1987)

Ertel A, Verghese A, Byers SW, Ochs M, Tozeren A: Pathway-specific differences between tumor cell lines and normal and tumor tissue cells. Mol Cancer., 5: 55 (2006)

Garrett JE1, Collard MW, Douglass JO: Translational control of germ cell-expressed mRNA imposed by alternative splicing: opioid peptide gene expression in rat testis. Mol Cell Biol., 9: 4381-4389 (1989)

Gasparian AV, Yao YJ, Kowalczyk D, Lyakh LA, Karseladze A, Slaga TJ, Budunova IV: The role of IKK in constitutive activation of NF-kappaB transcription factor in prostate carcinoma cells. J Cell Sci., 115: 141-151 (2002)

Gillet JP, Calcagno AM, Varma S, Marino M, Green LJ, Vora MI, Patel C, Orina JN, Eliseeva TA, Singal V, Padmanabhan R, Davidson B, Ganapathi R, Sood AK, Rueda BR, Ambudkar SV, Gottesman MM: Redefining the relevance of established cancer cell lines to the study of mechanisms of clinical anti-cancer drug resistance. Proc Natl Acad Sci USA, 108: 18708–18713 (2011)

Griffin GE, Leung K, Folks TM, Kunkel S, Nabel GJ: Activation of HIV gene expression during monocyte differentiation by induction of NF-kappa B. Nature, 339: 70-73 (1989)

Grottke C, Mantwill K, Dietel M, Schadendorf D, Lage H: Identification of differentially expressed genes in human melanoma cells with acquired resistance to various antineoplastic drugs. Int J Cancer., 88: 535-546 (2000)

Grünert S, Jechlinger M, Beug H: Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. Nat Rev Mol Cell Biol., 4: 657-665 (2003)

Harhaj EW, Dixit VM: Deubiquitinases in the regulation of NF-kappaB signaling. Cell Res., 21: 22-39 (2011)

Harhaj EW, Dixit VM: Deubiquitinases in the regulation of NF-κB signaling. Cell Res., 21: 22-39 (2011)

Hoesel B, Schmid JA: The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer. Mol Cancer, 12: 86 (2013)

Horiuchi K, Morioka H, Nishimoto K, Suzuki Y, Susa M, Nakayama R, Kawai A, Sonobe H, Takaishi H, Ozaki T, Yabe H, Umezawa K, Toyama Y: Growth suppression and apoptosis induction in synovial sarcoma cell lines by a novel NF-kappaB inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ). Cancer Lett., 272: 336-344 (2008)

Hu Y, Liu J, Huang H: Recent agents targeting HIF-1 α for cancer therapy. J Cell Biochem., 114: 498-509 (2013)

Hutchins AP, Liu S, Diez D, Miranda-Saavedra D: The repertoires of ubiquitinating and deubiquitinating enzymes in eukaryotic genomes. Mol Biol Evol., 30: 1172-1187 (2013)

Jain G, Cronauer MV, Schrader M, Moller P, Marienfeld RB: NF-kappaB signaling in prostate cancer: a promising therapeutic target? World J Urol., 30: 303-310 (2012)

Jin HR, Jin X, Lee JJ: Zinc-finger protein 91 plays a key role in LIGHT-induced activation of non-canonical NF-kappaB pathway. Biochem Biophys Res Commun., 400: 581-586 (2010)

Jin X, Jin HR, Jung HS, Lee SJ, Lee JH, Lee JJ: An atypical E3 ligase zinc finger protein 91 stabilizes and activates NF-kappaB-inducing kinase via Lys63-linked ubiquitination. J Biol Chem., 285: 30539-30547 (2010)

Klug A: Zinc finger peptides for the regulation of gene expression. J Mol Biol., 293: 215-218 (1999)

Kolenko V, Bloom T, Rayman P, Bukowski R, Hsi E, Finke J: Inhibition of NF- κ B activity in human T lymphocytes induces caspase-dependent apoptosis without detectable activation of caspase-1 and -3. J Immunol., 163: 590-598 (1999)

Kopp RP, Han M, Partin AW, Humphreys E, Freedland SJ, Parsons JK: Obesity and prostate enlargement in men with localized prostate cancer. BJU International, 108: 1750-1755 (2011)

Koumenis C, Alarcon R, Hammond E, Sutphin P, Hoffman W, Murphy M, Derr J, Taya Y, Lowe SW, Kastan M, Giaccia A: Regulation of p53 by hypoxia: dissociation of transcriptional repression and apoptosis from p53-dependent transactivation. Mol. Cell Biol., 21: 1297-1310 (2001)

Lapointe J, Li C, Higgins JP, van de Rijn M, Bair E, Montgomery K, Ferrari M, Egevad L, Rayford W, Bergerheim U, Ekman P, DeMarzo AM, Tibshirani R, Botstein D, Brown PO, Brooks JD, Pollack JR: Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. Proc Natl Acad Sci USA, 101: 811-816 (2004)

Lee J, Lee JH, Lee K, Hong YS, Jin X: Therapeutic agent for cancer, inflammation, and auto-immune disease containing inhibitor of Zinc Finger Protein 91. US Patent 20,080,248,024. (2008)

Lee KW, Lee NK, Ham S, Roh TY, Kim SH: Twist1 is essential in maintaining mesenchymal state and tumor-initiating properties in synovial sarcoma. Cancer Lett., 343: 62-73 (2014)

Lenardo MJ, Baltimore D: NF-kappa B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. Cell, 58: 227-229 (1989)

Lessard L, Saad F, Le PC, Diallo JS, Peant B, Delvoye N, Mes-Masson AM: NF-kappaB2 processing and p52 nuclear accumulation after androgenic stimulation of LNCaP prostate cancer cells. Cell Signal., 19: 1093–1100 (2007)

Lin Y, Bai L, Chen W, Xu S: The NF-kappaB activation pathways, emerging molecular targets for cancer prevention and therapy. Expert Opin Ther Targets, 14: 45-55 (2010)

Lupas AN, Gruber M: The structure of alpha-helical coiled coils. Adv Protein Chem., 70: 37-78 (2005)

Madonna G, Ullman CD, Gentilcore G, Palmieri G, Ascierto PA: NF-κB as potential target in the treatment of melanoma J Transl Med., 10: 53 (2012)

Maier T, Guell M, Serrano L: Correlation of mRNA and protein in complex

biological samples. FEBS Lett., 583: 3966-3973 (2009)

Maier T, Schmidt A, Guell M, Kuhner S, Gavin AC, Aebersold R, Serrano L: Quantification of mRNA and protein and integration with protein turnover in a bacterium. Molec Systems Biol., 7: 511 (2011)

Mikesh LM, Kumar M, Erdag G, Hogan KT, Molhoek KR, Mayo MW, Slingluff CL Jr: Evaluation of molecular markers of mesenchymal phenotype in melanoma. Melanoma Res., 20: 485-495 (2010)

Nadiminty N, Chun JY, Hu Y, Dutt S, Lin X, Gao AC: LIGHT, a member of the TNF superfamily, activates Stat3 mediated by NIK pathway. Biochem Biophys Res Commun., 359: 379-384 (2007)

Nadiminty N, Chun JY, Lou W, Lin X, Gao AC: NF-kappaB2/p52 enhances androgen-independent growth of human LNCaP cells via protection from apoptotic cell death and cell cycle arrest induced by androgen-deprivation. Prostate, 68: 1725–1733 (2008)

Nadiminty N, Lou W, Lee SO, Lin X, Trump DL, Gao AC: Stat3 activation of NF- κ B p100 processing involves CBP/p300-mediated acetylation. Proc Natl Acad Sci USA, 103: 7264–7269 (2006)

Nadiminty N, Lou W, Sun M, Chen J, Yue J, Kung HJ, Evans CP, Zhou Q, Gao AC: Aberrant activation of the androgen receptor by NF-kappaB2/p52 in prostate cancer cells. Cancer Res., 70: 3309–3319 (2010)

Ohl F, Jung M, Xu C, Stephan C, Rabien A, Burkhardt M, Nitsche A, Kristiansen G, Loening SA, Radonic A, Jung K: Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization? J Mol Med., 83: 1014-1024 (2005)

Parsons JK, Carter HB, Partin AW, Windham BG, Metter EJ, Ferrucci L, Landis P, Platz EA: Metabolic factors associated with benign prostatic hyperplasia. J Clin Endocrinol Metab., 91: 2562-2568 (2006)

Paschke L, Rucinski M, Ziolkowska A, Zemleduch T, Malendowicz W, Kwias Z, Malendowicz LK.: ZFP91-A Newly Described Gene Potentially Involved in Prostate Pathology. Pathol Oncol Res., 20: 453–459 (2014)

Qin Q, Xu Y, He T, Qin C, Xu J: Normal and disease-related biological functions of Twist1 and underlying molecular mechanisms. Cell Res., 22: 90-106 (2012)

Sandberg R, Ernberg I: Assessment of tumor characteristic gene expression in cell lines using a tissue similarity index (TSI). Proc Natl Acad Sci USA, 102: 2052–2057 (2005)

Saotome Y, Winter CG, Hirsh D: A widely expressed novel C2H2 zinc-finger protein with multiple consensus phosphorylation sites is conserved in mouse and man. Gene, 152: 233-238 (1995)

Sobel RE, Wang Y, Sadar MD: Molecular analysis and characterization of PrEC, commercially available prostate epithelial cells. In Vitro Cell Dev Biol Anim., 42: 33-39 (2006)

Sobel, RE, Sadar MD: Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines--part 1. J Urol., 173: 342-359 (2005a)

Sobel, RE, Sadar MD: Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines--part 2. J Urol., 173: 360-372 (2005b)

Stallard BJ1, Collard MW, Griswold MD: A transferrinlike (hemiferrin) mRNA is expressed in the germ cells of rat testis. Mol Cell Biol., 11: 1448-1453 (1991)

Stein WD, Litman T, Fojo T, Bates SE: A Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) database analysis of chemosensitivity: comparing solid tumors with cell lines and comparing solid tumors from different tissue origins. Cancer Res., 64: 2805–2816 (2004)

Sun SC: Non-canonical NF-kappaB signaling pathway. Cell Res., 21: 71-85 (2011)

Suzuki K: Epidemiology of Prostate Cancer and Benign Prostatic Hyperplasia. JMAJ., 52: 478–483 (2009)

Taniguchi Y, Choi PJ, Li GW, Chen H, Babu M, Hearn J, Emili A, Xie XS: Quantifying *E. coli* proteome and transcriptome with single-molecule sensitivity in single cells. Science, 329: 533-538 (2010)

Tewari R, Rajender S, Natu SM, Dalela D, Goel A, Goel MM, Tandon P: Diet, obesity, and prostate health: are we missing the link? J Androl., 33: 763-776 (2012)

Tompkins V, Hagen J, Zediak VP, Quelle DE: Identification of novel ARF binding proteins by two-hybrid screening. Cell Cycle, 5: 641-646 (2006)

Trachtulec Z, Mnuková-Fajdelová M, Hamvas RM, Gregorová S, Mayer WE, Lehrach HR, Vincek V, Forejt J, Klein J: Isolation of candidate hybrid sterility 1 genes by cDNA selection in a 1.1 megabase pair region on mouse chromosome 17. Mamm Genome, 8: 312-316 (1997)

Unoki M, Okutsu J, Nakamura Y: Identification of a novel human gene, ZFP91, involved in acute myelogenous leukemia. Int J Oncol., 22: 1217-1223 (2003)

Vallabhapurapu S, Karin M: Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. Ann Rev Immunol., 27: 693-733 (2009)

van Heeckeren WJ1, Sellers JW, Struhl K: Role of the conserved leucines in the leucine zipper dimerization motif of yeast GCN4. Nucleic Acids Res., 20: 3721-3724 (1992)

Vogel C, Marcotte EM: Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. Nature Rev Genetics, 13: 227-232 (2012)

Ward C, Chilvers ER, Lawson MF, Pryde JG, Fujihara S, Farrow SN, Haslett C, Rossi AG: NF-kappaB activation is a critical regulator of human granulocyte apoptosis in vitro. J Biol Chem., 274: 4309-4318 (1999)

Weiss MB, Abel EV, Mayberry MM, Basile KJ, Berger AC, Aplin AE: TWIST1 is an ERK1/2 effector that promotes invasion and regulates MMP-1 expression in human melanoma cells. Cancer Res., 72: 6382-6392 (2012)

Xiao G, Fu J: NF-kappaB and cancer: a paradigm of Yin-Yang. Am J Cancer Res., 1: 192-221 (2011)

Xiao W, Mohseny AB, Hogendoorn PC, Cleton-Jansen AM: Mesenchymal stem cell transformation and sarcoma genesis. Clin Sarcoma Res., 3: 10 (2013)

Zhang Q, Yang H: The Roles of VHL-Dependent Ubiquitination in Signaling and Cancer. Front Oncol., 2: 35 (2012)