

UNIwersytet Medyczny
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Piotr Białas

**Badanie ekspresji genów *CGB1* i *CGB2* oraz *CGB3-9*
kodujących podjednostkę beta
ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej
w nowotworach żeńskich narządów płciowych**

Rozprawa doktorska

wykonana pod kierunkiem
prof. dr hab. Anny Jankowskiej
w Katedrze i Zakładzie Biologii Komórki

Poznań 2020

Spis treści

Wykaz ważniejszych oznaczeń i skrótów stosowanych w pracy	5
1. Wstęp	7
1.1. Ludzka gonadotropina kosmówkowa	7
1.2. Geny kodujące hCG	7
1.3. Struktura hCG	10
1.4. Różnorodność form ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej	11
1.5. Biologiczna rola hCG	13
1.5.1. Rola hCG w ciąży prawidłowej	13
1.5.2. Rola hCG w ciąży patologicznej	14
1.5.3. hCG w nowotworach niotrofoblastycznych	15
2. Cel pracy	18
3. Materiały i metody	19
3.1. Materiały	19
3.1.1. Linie komórkowe	19
3.1.2. Konstrukty CGB	20
3.2. Metodyka	20
3.2.1. Analizy danych pochodzących z <i>The Cancer Genome Atlas</i> (TCGA)	20
3.2.2. Przygotowanie wektorów ekspresyjnych	21
3.2.3. Odwrotna transkrypcja	21
3.2.4. Amplifikacja analizowanych genów CGB	23
3.2.5. Transformacja komórek kompetentnych konstruktami kodującymi geny CGB	25
3.2.6. Selekcja i namnażanie konstruktów kodujących CGB	26
3.2.7. Hodowla linii komórkowych	26
3.2.8. Izolacja całkowitego RNA	28
3.2.9. Synteza cDNA na matrycy całkowitego RNA – odwrotna transkrypcja	28
3.2.10. Ilościowa analiza poziomu ekspresji genów kodujących CGB oraz genów regulujących proces apoptozy: <i>BAX</i> , <i>BCL2</i> i <i>BIRC5</i>	29
3.2.11. Wyznaczanie krzywych wzorcowych i pomiar ekspresji analizowanych genów	30

3.2.12. Ocena cyklu komórkowego z zastosowaniem cytometrii przepływowej.....	31
3.2.13. Ocena proliferacji komórek z zastosowaniem bromodeoksyurudyny (BrdU)	32
3.2.14. Ocena proliferacji komórek w czasie rzeczywistym	33
3.2.15. Ocena inwazyjności komórek w czasie rzeczywistym	33
3.2.16. Izolacja białek	34
3.2.17. Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym.....	34
3.2.18. Elektrotransfer i immunodetekcja białek.....	35
3.2.19. Barwienie fluorescencyjne komórek z zastosowaniem barwników Hoechst 33342 i jodku propidyny	36
3.2.20. Indukcja programowanej śmierci w komórkach linii HeLa oraz Ishikawa.....	37
3.2.21. Analizy statystyczne.....	38
4. Wyniki	39
4.1. Ocena poziomów transkryptów genów <i>CGB1</i> , <i>CGB2</i> i <i>CGB5</i> w rakach szyjki macicy i endometrium na podstawie wyników zdeponowanych w bazach TCGA.....	39
4.1.1. Ocena poziomów transkryptów genów <i>CGB1</i> , <i>CGB2</i> oraz <i>CGB5</i> w tkankach raka szyjki macicy oraz w tkankach szyjki macicy niezmiennionych nowotworowo	39
4.1.2. Ocena poziomów transkryptów genów <i>CGB1</i> , <i>CGB2</i> oraz <i>CGB5</i> w tkankach raka endometrium oraz w tkankach endometrium niezmiennionych nowotworowo	41
4.2. Ocena poziomu transkryptów oraz białka hCG β w liniach komórkowych HeLa i Ishikawa transfekowanych konstruktami kodującymi podjednostkę beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej.....	43
4.3. Ocena wpływu nadekspresji podjednostki beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej na biologię komórek linii HeLa oraz Ishikawa	49
4.3.1. Ocena wpływu transfekcji konstruktami CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2 oraz CGB 5 na proliferację komórek linii HeLa.....	50
4.3.2. Ocena wpływu transfekcji konstruktami CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2 oraz CGB 5 na proliferację komórek Ishikawa	56
4.3.3. Ocena wpływu transfekcji konstruktami CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2 oraz CGB 5 na inwazyjność komórek linii HeLa.....	62
4.3.4. Ocena wpływu transfekcji konstruktami CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2 oraz CGB 5 na inwazyjność komórek Ishikawa	63

4.3.5. Ocena wpływu transfekcji konstruktami CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2 oraz CGB 5 na cykl życiowy komórek HeLa	64
4.3.6. Ocena wpływu transfekcji konstruktami CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2 oraz CGB 5 na cykl życiowy komórek Ishikawa	67
4.3.7. Ocena wpływu nadekspresji podjednostki beta gonadotropiny kosmówkowej na apoptozę i nekrozę komórek linii HeLa i Ishikawa.....	70
4.3.8. Ocena poziomu transkryptów oraz białka genów kodujących czynniki regulujące proces apoptozy: <i>BAX</i> , <i>BCL2</i> i <i>BIRC5</i> w komórkach linii HeLa poddanych transfekcji konstruktami CGB1, CGB2 oraz CGB5	71
4.3.9. Ocena poziomu transkryptów oraz białka genów kodujących czynniki regulujące proces apoptozy: <i>BAX</i> , <i>BCL2</i> i <i>BIRC5</i> w komórkach linii Ishikawa poddanych transfekcji konstruktami CGB1, CGB2 oraz CGB5	79
4.3.10. Ocena wpływu nadekspresji <i>CGB1</i> , <i>CGB2</i> oraz <i>CGB5</i> na indukowaną apoptozę komórek linii HeLa oraz Ishikawa	88
5. Dyskusja	95
6. Wnioski.....	114
7. Streszczenie.....	115
8. Summary	118
9. Piśmiennictwo	121
10. Spis tabel, rysunków i rycin	128
10.1. Spis rysunków i rycin.....	128
10.2. Spis tabel	133

Wykaz ważniejszych oznaczeń i skrótów stosowanych w pracy

/zgodnie z kolejnością pojawiania się po raz pierwszy/

skrót	nazwa polska	nazwa angielska
hCG	ludzka gonadotropina kosmówkowa	human chorionic gonadotropin
FSH	hormon folikulotropowy	follicle-stimulating hormone
TSH	hormon tyreotropowy	thyroid stimulating hormone
LH	hormon luteinizujący	luteinizing hormone
5'-UTR	rejon 5' niepodlegający translacji	5' untranslated region
CGB1, CGB2, CGB3, CGB5, CGB6, CGB7, CGB8, CGB9	alleliczne geny kodujące podjednostkę beta gonadotropiny kosmówkowej	chorionic gonadotropin beta subunit coding genes/alleles
hCG-H	hiperglikozylowana ludzka gonadotropina kosmówkowa	hyperglycosylated human chorionic gonadotrophin
hCGα	wolna podjednostka alfa hCG	free alpha-subunit of human chorionic gonadotrophin
hCGβ	wolna podjednostka beta hCG	free beta-subunit of human chorionic gonadotrophin
hCGβ-H	hiperglikozylowana wolna podjednostka beta hCG	hyperglycosylated human chorionic gonadotropin free beta subunit
hCGn	nacięta hCG	nicked human chorionic gonadotropin
hCG-Hn	hiperglikozylowana nacięta hCG	nicked hyperglycosylated human chorionic gonadotrophin
hCGβ-n	nacięta podjednostka beta hCG	nicked β -subunit human chorionic gonadotropin
hCGβ-Hn	hiperglikozylowana nacięta podjednostka beta hCG	nicked hyperglycosylated β -subunit human chorionic gonadotropin
hCGβcf	fragment korowy podjednostki beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej	human chorionic gonadotropin, β -core fragment
LH/hCGR	receptor lutropiny i ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej	luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor
uNK	maciczne komórki NK	uterine natural killer
Th1	limfocyty pomocnicze Th1	helper Th1 cells
Th2	limfocyty pomocnicze Th2	helper Th2 cells
cAMP	cykliczny adenozynomonofosforan	cyclic adenosine monophosphate
EMT	tranzycja epithelialno-mezenchymalna	epithelial-mesenchymal transition
ZO-1	białka strefy zamykającej	zonula occludens-1
ERK	kinaza regulowana zewnątrzkomórkowo	extracellular signal-regulated kinases
PLAP	łożyskowa fosfataza alkaliczna	placental alkaline phosphatase
CRH	kortykoliberyna	corticotropin-releasing hormone
TCGA	baza danych TCGA	The Cancer Genome Atlas data base
OMIM	baza danych OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man data base
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy	polymerase chain reaction
FBS	bydłęca surowica płodowa	fetal bovine serum
PBS	roztwór soli buforowany fosforanem	phosphate buffered saline
eGFP	białko wzmożonej zielonej fluorescencji	enhanced green fluorescent protein

qPCR	reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym	quantitative polymerase chain reaction
GOI	badany gen	gene of interest
Cr	wskaźnik koncentracji	concentration ratio
BrdU	bromodeoksyurydyna	bromodeoxyuridine
CI	indeks komórkowy	cell index
PVDF	polifluorek winylidenu	polyvinylidene fluoride
TPM	liczba kopii transkryptu na milion (odczytów RNA)	transcript per milion
Me	mediana	median
M	średnia arytmetyczna	arithmetic mean
S	odchylenie standardowe	standard deviation
BAX	białko apoptotyczne z rodziny białek BCL	Bcl-2-associated X protein
BCL2	białko inhibitorowe apoptozy	B-cell lymphoma 2
BIRC5	surwiwina	baculoviral IAP repeat-containing protein 5
HPRT	fosforybozylotransferaza hipoksantynowo-guaninowa	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase

1. Wstęp

1.1. Ludzka gonadotropina kosmówkowa

Ludzka gonadotropina kosmówkowa (hCG, ang. *human chorionic gonadotropin*) jest heterodimerem, na który składają się dwie związane niekowalencyjnie podjednostki: alfa (α) i beta (β). Podjednostka α jest wspólna dla hormonów gonadotropowych takich jak: folikulotropina (FSH), tyreotropina (TSH) i hormonu luteinizującego (LH), zaś podjednostka β jest różna i determinuje biologiczne własności każdego z wyżej wymienionych hormonów¹⁻³. Hormony gonadotropowe syntetyzowane są przez przedni płąt przysadki mózgowej; synteza hCG odbywa się w łożysku, w skutek działalności komórek syncytiotrofoblastu⁴.

Ludzka gonadotropina kosmówkowa współuczestniczy w wielu procesach fizjologicznych związanych z prawidłowym przebiegiem ciąży, do których zalicza się między innymi: utrzymanie produkcji progesteronu przez ciało żółte, implantację zarodka, angiogenezę, czy rozwój kosmówki⁵. Dodatkowo hCG warunkuje odpowiedź immunologiczną organizmu matki na antygeny prezentowane przez kształtujący się płód, poprzez kontrolę działania komórek jej układu odpornościowego^{6,7}.

Gonadotropina kosmówkowa jest także wydzielana przez rozrosty i nowotwory trofoblastu oraz przez liczną grupę nowotworów nietrofoblastycznych. Ekspresję hCG zaobserwowano w guzach następujących narządów: piersi, szyjki macicy, prostaty, płuca, jelita grubego, nerki, pęcherza, trzustki, odbytu, sromu, jajnika, endometrium i jamy ustnej^{8,9}.

Mechanizmy regulujące ekspresję, działanie oraz rola pełniona przez hCG w nowotworach nie są do końca wyjaśnione.

1.2. Geny kodujące hCG

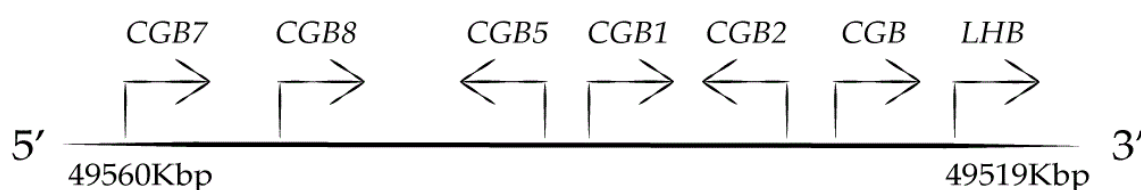
Powstanie w pełni funkcjonalnej cząsteczki ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej wiąże się z aktywacją genów kodujących podjednostkę alfa i beta hormonu. Na dłuższym ramieniu chromosomu szóstego, w locus 6q14-q21 znajduje się gen CGA kodujący podjednostkę alfa. Podjednostka beta kodowana jest przez osiem allelicznych genów (CGB1, CGB2, CGB3, CGB5, CGB6, CGB7, CGB8, CGB9) zlokalizowanych w klastrze

LHB/CGB na dłuższym ramieniu chromosomu dziewiętnastego w locus 19q13.32¹⁰ (Rycina 1.). W obrębie tego klastra znajduje się także gen *CGB4*, który zawiera sekwencję kodującą podjednostkę beta hormonu lutreotropowego^{11,12}.

Produkty białkowe poszczególnych genów *CGB* wykazują różnice aminokwasową w pozycji 117. Doprowadziło to do podziału genów na dwie grupy. Grupa pierwsza, do której zaliczono geny *CGB7* i *CGB9*, to tak zwane geny pierwszego typu – ich produkt białkowy w pozycji 117. posiada alaninę. Z kolei grupa genów, nazwana genami drugiego typu, na którą składają się geny *CGB3*, *CGB5*, *CGB6* oraz *CGB8* koduje białko z kwasem asparaginowym w pozycji 117.^{10,12,13}.

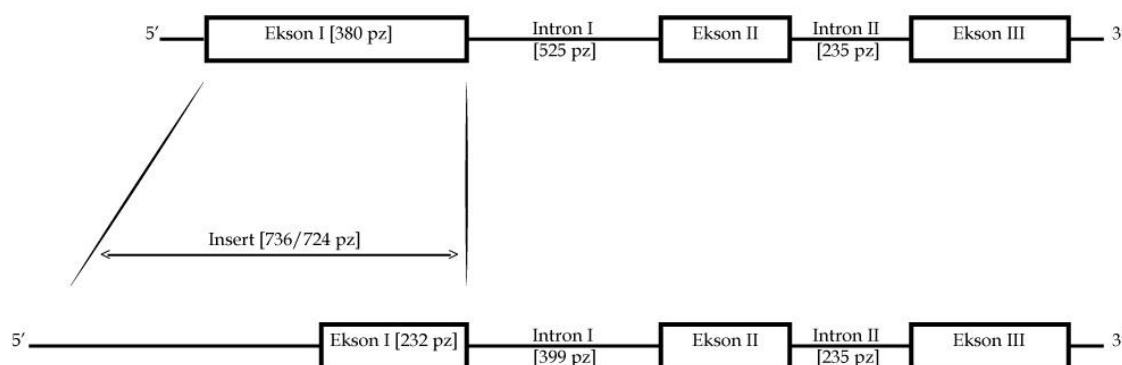
Sekwencjonowanie chromosomu dziewiętnastego ujawniło, iż geny *CGB7* oraz *CGB3* są allelicznymi formami odpowiednio genów *CGB6* i *CGB9*^{14,15}.

Uważa się, iż w toku ewolucji geny *CGB3*, *CGB5*, *CGB6*, *CGB7*, *CGB8*, *CGB9* powstały w wyniku wielokrotnej duplikacji genu kodującego podjednostkę beta hormonu luteinizującego¹⁶. Natomiast za pojawienie się genów *CGB1* oraz *CGB2* prawdopodobnie odpowiada insercja fragmentu DNA, która doprowadziła do eliminacji pięćdziesięciodwunukleotydowego odcinka proksymalnej części promotora, jak również całości regionu 5'-UTR genu *CGB*. W przypadku genu *CGB1* wspomniany fragment obejmował 736 par zasad, z kolei dla *CGB2* 724 pary zasad. Konsekwencją mutacji było utworzenie nowej sekwencji promotorowej dla *CGB1* i *CGB2*, nowego regionu 5'-UTR z alternatywnym kodonem start oraz nowego eksonu pierwszego. Kolejnym skutkiem było przesunięcie ramki odczytu dla eksonu drugiego i trzeciego^{15,17} (Rycina 2.).



Rycina 1. Ułożenie genów *CGB* w klastrze *LHB/CGB* na chromosomie 19. Na podstawie Grimwood i wsp.^(*).

^{*} Grimwood, J. i in. The DNA sequence and biology of human chromosome 19. *Nature* 428, 529–535 (2004).



Rycina 2. Struktura genów *CGB* ułożonych na chromosomie 19. Na podstawie Parrot i wsp. z modyfikacjami (†).

Jeszcze do niedawna sądzono, iż *CGB1* oraz *CGB2* są pseudogenami. Dzięki rozwojowi biologii systemowej oraz metod biologii molekularnej wykazano, iż sekwencje nukleotydowe tych genów u człowieka oraz szympansa różni jedynie 0,5% całości ich składu. Stanowi to mocny dowód na wysoki stopień konserwatywności *CGB1* i *CGB2* oraz potwierdza ich wspólną ewolucyjną drogę pochodzenia¹⁸. Ponadto wykazano aktywność biologiczną genów *CGB1* i *CGB2* na poziomie transkryptów, które wykryto w tkankach prawidłowych takich jak: łożysko, jądra, czy przysadka mózgowa^{15,19–22}. Dodatkowo, dowiedziono, że także tkanki zmienione nowotworowo cechuje obecność transkryptów *CGB1* i *CGB2*. Do tej pory potwierdzono ich obecność w komórkach raka sutka, raka pęcherza moczowego oraz raka jajnika^{9,23–25}.

Badania regionów promotorowych *CGB1* i *CGB2* dowiodły, iż oba geny zawierają prawie kompletną sekwencję promotora charakterystycznego dla *CGB*, uszczuploną jedynie o 52 pary zasad segmentu proksymalnego. Natomiast insercja fragmentu DNA w strukturę genów *CGB1* i 2 skutkuje powstaniem dodatkowego odcinka promotora zlokalizowanego powyżej miejsca rozpoczęcia transkrypcji^{17,18}.

Aktualnie zostały opisane cztery warianty transkrypcyjne genów *CGB1* i *CGB2* oznaczane jako: *CGB1/CGB2*, +47, +166 oraz +176. Uwzględniając przesunięcie ramki odczytu oraz obecność alternatywnego kodonu start sugeruje się, że hipotetyczne białko mogące powstawać podczas procesu translacji składa się z 132 aminokwasów. Pozostałe warianty mogą skutkować powstaniem 155 aminokwasowej formy białka dla *CGB1* oraz 163 aminokwasowej formy białka dla *CGB2*²¹. Pomimo doniesień o obecności transkryptów *CGB1* i *CGB2* w różnych tkankach nadal nie udało się wyizolować ich białkowego produktu.

†Parrott, A. M., Sriram, G., Liu, Y. & Mathews, M. B. Expression of type II chorionic gonadotropin genes supports a role in the male reproductive system. *Mol. Cell. Biol.* 31, 287–99 (2011).

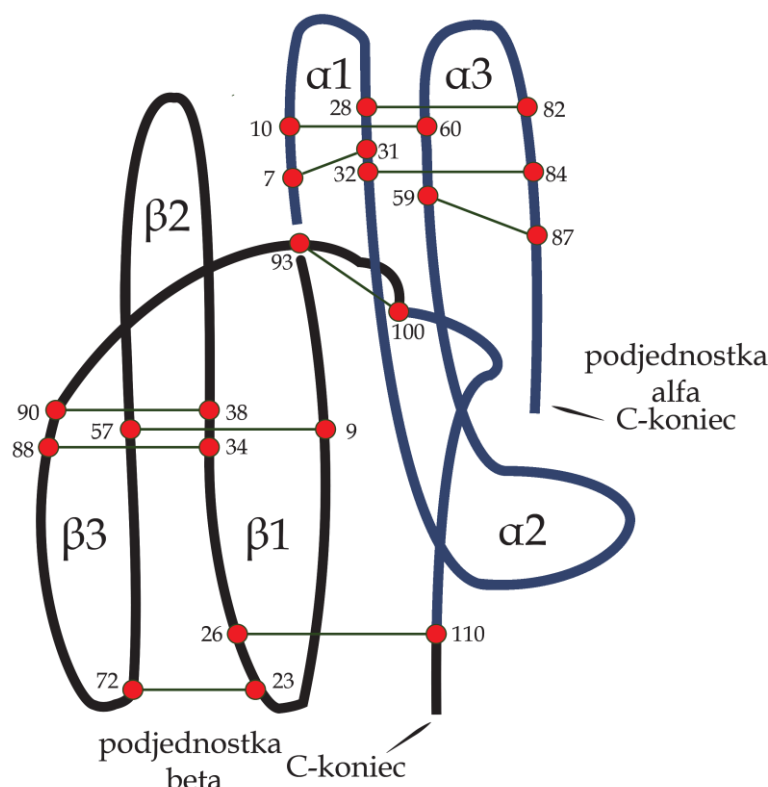
1.3. Struktura hCG

Heterodimeryczna cząsteczka ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej o łącznej masie 37,1 kDa zawiera 237 aminokwasów: 92 aminokwasy budujące podjednostkę alfa oraz 145 obecnych w strukturze beta. Około siedemdziesiąt procent masy hCG stanowią aminokwasy, zaś na pozostałe trzydzieści procent składają się reszty węglowodanowe¹. Zauważono, iż sekwencja aminokwasowa podjednostki alfa hCG jest tożsama z sekwencją aminokwasową podjednostek alfa pozostałych hormonów gonadotropowych: FSH, TSH oraz LH. Z kolei podjednostka beta pod względem składu ilościowego oraz jakościowego aminokwasów wykazuje znaczną zmienność w opisanych powyżej białkach²⁶.

Strukturę hCG charakteryzuje obecność cukrowców, powiązanych z komponentą białkową wiązaniami N- i O-glikozydowymi. Dwa miejsca N-glikozytacji dla podjednostki alfa dotyczą reszt asparaginy 52. i 78., podczas gdy w łańcuchu beta N-glikozylowane są reszty asparaginy w pozycji 13. i 30. Dodatkowo w podjednostce beta występują cztery miejsca, do których dodawane są cukrowce wiązaniem O-glikozydowym. Są to reszty seryny: 121., 127., 132. i 138.²⁶. Dołączone oligosacharydy mogą występować w formie prostych lub rozgałęzionych cząsteczek; ich skład jakościowy może być zmienny^{27,28}.

Pozostałe modyfikacje potranslacyjne hormonu zachodzą w retikulum endoplazmatycznym przy udziale disulfidoizomeras, które w obu podjednostkach katalizują wytworzenie mostków dwusiarczkowych. Badania krystalograficzne ujawniły, iż organizacja przestrzenna podjednostki alfa jest utrzymywana przez pięć mostków dwusiarczkowych utworzonych między cysteinami obecnymi w pozycjach: 7. i 31., 10. i 60., 28. i 82., 59. i 87., a także 32. i 84. Z kolei w strukturze podjednostki beta opisano sześć mostków dwusiarczkowych między resztami cysteinowymi aminokwasów w pozycjach: 9. i 57., 23. i 72., 26. i 110., 34. i 88., 38. i 90. oraz 93. i 100. Wiadomo, że całość struktury heterodimeru hCG stabilizowana jest obecnością motywu węzła cysteinowego, choć sam mechanizm składania heterodimeru jest wciąż niepoznany^{29,30}. Z jednej strony Ruddon i współpracownicy opisują, iż kluczowe jest powstanie wiązania dwusiarczkowego pomiędzy aminokwasami 93. i 100. w strukturze podjednostki beta, doprowadzające do powstania nieaktywnego dimeru alfa/beta. O pełnej funkcjonalności cząsteczki decyduje utworzenie ostatniego stabilizującego wiązania pomiędzy aminokwasami 26. i 110.³¹. Z drugiej strony Mole wraz z zespołem wskazują na odmienny przebieg składania w pełni funkcjonalnej cząsteczki heterodimeru, bazujący na konieczności utworzenia tzw. pętli pasa bezpieczeństwa (ang. *seat belt loop*) pomiędzy aminokwasami w pozycjach 26. i 110. Doprowadza to do

utworzenia wiązania dwusiarczkowego pomiędzy aminokwasami w pozycjach 93. i 100. oraz do rozszerzenia pętli pasa bezpieczeństwa. Umożliwia to podjednostce alfa przejście przez pętlę w celu wytworzenia dimeru alfa/beta. W tym przypadku aktywacja funkcjonalna dimeru następuje po zamknięciu wcześniej otwartej struktury wiązania pomiędzy cysteinami w pozycjach 93. oraz 100.³² (Rycina 3.).



Rycina 3. Układ podjednostek alfa i beta hCG po uformowaniu struktury heterodimeru. Na rycinie zaznaczono wiązania disulfidowe (opis w tekście). Na podstawie De Medeiros i wsp.^(†) z modyfikacjami.

1.4. Różnorodność form ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej

W zależności od biologicznego zapotrzebowania, wynikającego ze stanu organizmu, komórki syncytiotrofoblastu, trofoblastu i jego rozrostów, a także komórki gonadotropowe przysadki mózgowej oraz netrofoblastyczne nowotwory są w stanie syntetyzować różne formy ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej. Uwzględniając różnice w liczbie i rodzaju przyłączonych cukrowców, jak i typy utworzonych wiązań glikozydowych wyróżnia się kilka wariantów hCG. Dotychczas udokumentowano istnienie osiemnastu różnych form ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej. Część z nich jak: klasyczna cząsteczka ludzkiej

[†]De Medeiros SF, Norman RJ. Human choriogonadotropin protein core and sugar branches heterogeneity: basic and clinical insights. *Hum Reprod Update*.15(1):69-95; (2009).

gonadotropiny kosmówkowej (hCG), hiperglikozylowana ludzka gonadotropina kosmówkowa (hCG-H), wolna podjednostka alfa hCG (hCG α), wolna podjednostka beta hCG (hCG β) oraz hiperglikozylowana wolna podjednostka beta hCG (hCG β -H) zostały opisane jako formy wydzielane przez tkankę łożyska, jego rozrosty oraz liczne nowotwory niotrofoblastyczne³³.

Pozostałe formy hCG powstają w wyniku cięcia enzymatycznego dokonywanego przez elastazę i proteazę łożyskowych komórek Hofbauera. Na skutek tego procesu powstają następujące formy: nacięta cząsteczka ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (hCGn), nacięta sulfonowana cząsteczka ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej, nacięta hiperglikozylowana ludzka gonadotropina kosmówkowa (hCG-Hn), nacięta wolna podjednostka beta hCG (hCG β n) oraz nacięta hiperglikozylowana wolna podjednostka beta hCG (CG β -Hn)^{34,35}.

Okres połowicznego trwania całej cząsteczki hCG w surowicy wynosi około 24-36 godzin^{36,37}. Z kolei wydzielenie naciętych form hCG wiąże się ze skróceniem ich biologicznego okresu półtrwania oraz szybszą eliminacją z ustroju. W znakomitej większości opisane dotychczas warianty hCG ulegają dysocjacji na mniejsze części stanowiące formy zdegradowane, które dalej wydalone są na drodze metabolizmu wątrobowego (78%) oraz nerkowego (22%)³⁸. Zauważono, iż cząsteczki hCG pozbawione kwasu sialowego ulegają degradacji w kłębuszkach nerkowych znacznie szybciej niż inne warianty hCG, przez co bogactwo różnych form hCG jest zdecydowanie bardziej uwidocznione w moczu, a nie w krwioobiegu^{38,39}.

Kolejną formą białka opisaną w literaturze jest fragment rdzeniowy podjednostki beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (hCGb β c β f). Produkowany jest on w trakcie prawidłowego cyklu miesięczkowego, gdy dochodzi do uwolnienia pęcherzyka jajowego oraz pojawienia się nowej struktury, jaką jest ciało żółte. Podczas aktywnej fazy lutealnej pojawiają się w jego strukturze komórki tekaluteinowe i komórki ziarniste luteinowe, które degradują hCG do mniejszych cząsteczek najprawdopodobniej w wyniku działalności enzymów lizosomalnych⁴⁰⁻⁴³.

Wiedza na temat różnorodności form hCG, możliwych miejsc wydzielania hormonu, a także obecności lub braku dodatkowych reszt cukrowcowych pozwala na wyciąganie precyzyjnych wniosków z wyników testów immunoenzymatycznych stosowanych w laboratoriach diagnostycznych.

1.5. Biologiczna rola hCG

1.5.1. Rola hCG w ciąży prawidłowej

Ludzka gonadotropina kosmówkowa jest powszechnie znana jako hormon ciążowy. Wiadomo, że synteza hCG ma miejsce już w przedimplantacyjnej fazie rozwoju blastocysty, co zostało potwierdzone w badaniach poziomów transkryptów genów obu podjednostek⁴⁴. W trakcie przemian, jakie zachodzą w strukturze blastocysty, komórki trofoblastu zaczynają różnicować się w komórki syncytiotrofoblastu, które są w stanie syntetyzować progesteron i ludzką gonadotropinę kosmówkową. Przedimplantacyjne wydzielanie hCG do przestrzeni jamy macicy stanowi swoisty czynnik sygnałny rozpoznawany przez receptory LH/hCGR (receptor wspólny dla ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej oraz hormonu luteinizującego) zlokalizowane w tętnicach spiralnych miometrium i doczesnej. Ekspresja receptora LH/hCGR, który pośredniczy w działaniu hCG, cechuje wiele różnorodnych tkanek (mięśnie gładkie, komórki nabłonkowe naczyń krwionośnych, układ nerwowy), w tym także tkanki zmienione nowotworowo^{45,46}. Związanie cząsteczki hCG zmienia konformację receptora i prowadzi do transdukcji sygnału do wnętrza komórek^{47,48}.

Występowanie receptorów LH/hCGR potwierdzono w tkankach kształtującego się płodu, tj. nerce, wątrobie, płucach, śledzionie oraz obu rodzajach jelita. Z kolei w organizmie dorosłego człowieka nie wykazano obecności LH/hCGR na poziomie wyżej wspomnianych organów. Sugeruje się, że wpływ ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej na tkanki płodowe polega na współuczestniczeniu w ich kształtowaniu i różnicowaniu⁴⁹⁻⁵¹. Badania Lei i współpracowników ujawniły występowanie receptorów LH/hCGR w tkance mózgowej kobiet, co prawdopodobnie może pomóc w wyjaśnieniu występowania zjawiska niepowściągliwych wymiotów kobiet ciężarnych⁵².

Badania przeprowadzone przez Toth i współpracowników z wykorzystaniem ultrasonografii dopplerowskiej dowiodły, iż hCG przyczynia się do zmniejszenia oporu naczyniowego oraz rozszerzenia naczyń, przez co zwiększa się ukrwienie tkanki⁵³. Umożliwia to inicjację procesu zagnieżdżenia blastocysty w strukturę ściany macicy. Od tej chwili w przeważającej ilości produkowana jest forma hiperglikozylowana hCG; stan ten utrzymuje się do około czwartego tygodnia ciąży^{54,55}.

Dodatkowo, hCG wydaje się pełnić ważną rolę w samym procesie tworzenia nowych naczyń krwionośnych – angiogenezie. Na skutek wysokiego stężenia hormonu komórki nabłonkowe endometrium wydzielają czynnik wzrostu śródbłonna

naczyniowego VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*). Tym samym hCG przyczynia się do rozwoju nowopowstającej sieci naczyń w macicy, co zostało udokumentowane w testach *in vitro* i *in vivo*^{56,57}.

Niedobór hiperglikozylowej formy hCG został opisany przez Sasaki i współpracowników jako jedna z przyczyn niepowodzeń rozrodu na poziomie implantacji blastocysty⁵⁸. Z kolei wyniki badań *in vitro* przeprowadzone na linii ludzkiego raka kosmówki sugerują, iż udział hCG-H jest związany z czynnym procesem inwazji cytotrofoblastu^{54,55}.

W dalszym etapie pierwszego trymestru ciąży obserwowane jest zastępowanie hiperglikozylowanej hCG przez wydzielaną w coraz większych ilościach klasyczną formę hCG. Najwyższy poziom tej formy hormonu oznaczany w surowicy krwi zauważalny jest około 10. tygodnia ciąży; jego poziom wynosi wówczas powyżej 25 000 mIU/ml. Podczas dalszego rozwoju ciąży następuje spadek produkcji hCG, jednak stosunkowo wysoki poziom utrzymuje się do końca trwania ciąży⁵⁹.

hCG odgrywa kluczową rolę podczas całego rozwoju ciąży. Utrzymanie kształtującego się płodu jest gwarantowane między innymi przez biologiczne mechanizmy regulujące układ immunologiczny kobiety⁶⁰. Już w momencie implantacji, na skutek obecnej w krwioobiegu hCG obserwuje się zwiększenie ilości komórek uNK (ang. *uterine natural killer*) w endometrium macicy. Dochodzi wówczas do zmiany aktywności matczynych makrofagów promujących ich migrację do tkanki łożyska, co jak wskazują badania Wan i współpracowników doprowadza do usuwania tam komórek apoptotycznych⁶¹. W kolejnych miesiącach trwania prawidłowej ciąży całkowita liczba komórek uNK ulega zmniejszeniu, a ich dystrybucja w zdecydowanie mniejszym stopniu obejmuje łożysko⁶². Obecność dużej ilości hormonu wpływa również na proces polaryzacji immunologicznej limfocytów Th1 i Th2 skutkujący szeroko rozumianą immunotolerancją w odpowiedzi na prezentację ojcowskich antygenów^{63–65}.

1.5.2. Rola hCG w ciąży patologicznej

Biologiczna funkcja ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej została opisana również w stanach patologicznych. W przypadku ciąży pozamacicznej notuje się obecność takich samych form hormonu jak w ciąży prawidłowej. Zauważono jednak, iż nieprawidłowe miejsce zagnieżdżenia się blastocysty doprowadza do wzrostu poziomu hCG oraz jej wolnej podjednostki beta. Przyrost ten jest zdecydowanie niższy względem ciąży prawidłowej w tożsamym tygodniu jej trwania. Miano hCGβ wyższe niż 1500 IU/L

oznaczane w surowicy wraz z diagnostyką obrazową stanowi element pomocniczy w rozpoznaniu ciąży pozamacicznej⁶⁶⁻⁶⁸. Z kolei w przypadku wczesnych poronień, które rozumie się jako terminację ciąży przed dwunastym tygodniem jej trwania, poziomy hCG oraz hCG β w surowicy wykazują mniejszą dynamikę wzrostu w porównaniu z poziomami obserwowanymi podczas ciąży prawidłowej^{69,70}.

Dodatkowo liczne opracowania donoszą, iż jednostki chorobowe takie jak: ciążowa choroba trofoblastyczna oraz ciążowa neoplazja trofoblastu charakteryzują się wzrostem obecności różnorodnych form hCG w surowicy i w moczu. W celu rozpoznania tych jednostek w głównej mierze bazuje się na oznaczeniu najistotniejszych trzech form ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej tj. całej cząsteczki hCG, hiperglikozyłowanej hCG oraz wolnej podjednostki beta hCG⁶⁷. Po pierwotnej, bądź wtórnej ewakuacji częściowego lub całkowitego pustego jaja płodowego spodziewanym efektem zabiegu jest spadek poziomu hCG. Utrzymujący się wysoki poziom hormonu w surowicy ($\geq 20\,000$ IU/L) na przestrzeni trzech tygodni obserwacji lub wzrost jego miana o $\geq 10\%$ w dwóch kolejnych oznaczeniach w ciągu dwóch tygodni od zabiegu stanowi o istocie rozważenia kwalifikacji pacjentki do leczenia chemioterapeutykami, co jest rekomendowane przez Europejskie Towarzystwo Onkologii Klinicznej⁷¹.

Wiedza na temat hCG znalazła również zastosowanie w diagnostyce zaburzeń chromosomalnych płodu. Badania przesiewowe stosowane w celu wykrycia aneuploidii u kształtującego się płodu polegające na analizie poziomów markerów biochemicznych w surowicy ciężarnej oraz analizą grubości przezierności karku płodu są częścią praktyki położniczej w wielu krajach. W przypadkach trisomii chromosomów 13. oraz 18. obserwuje się obniżone wartości poziomów wolnej podjednostki beta hCG w surowicy ciężarnej. Natomiast ciąża z trisomią chromosomu 21., w porównaniu z ciążą prawidłową, charakteryzuje się podwyższonym poziomem hCG β w surowicy^{72,73}.

1.5.3. hCG w nowotworach nietrofoblastycznych

Intensywny rozwój technik biologii molekularnej przyniósł ze sobą wiedzę na temat udziału hCG i jej form w procesie rozwoju nowotworów nietrofoblastycznych. Początkowo, w drugiej połowie XX wieku zauważono, iż surowica, mocz, a także tkanki guzów m. in. raka trzustki, wątroby, płuca, sutka i żołądka cechuje immunoreaktywność względem hCG⁷⁴. Dalsze prace dowiodły, że przeważającą formą wydzielaną przez komórki nowotworowe jest wolna podjednostka beta, a w szczególności jej forma

hiperglikozylowana. Obecność hCG β -H została udokumentowana między innymi w nowotworach macicy, jelita grubego, żołądka, pęcherza moczowego oraz płuc^{75,76}.

Większość danych klinicznych sugeruje, że hCG β może być niezależnym czynnikiem prognostycznym choroby nowotworowej. Biorąc pod uwagę powszechnie uznawaną teorię, że poziom hCG β rośnie wykładniczo w trakcie implantacji zarodka w celu umożliwienia inwazji komórek trofoblastu, postuluje się, iż hCG β może odgrywać podobną rolę we wczesnych stadiach rozwoju nowotworów. Badania Li i współpracowników nad rakiem jelita grubego wykazały, iż blisko 40% guzów charakteryzowało się zwiększoną ekspresją hCG β na poziomie mRNA. Co więcej, dalsze analizy immunohistochemiczne dowiodły, iż obecność hCG β cechowała głównie fragmenty guza z komórkami o największym inwazyjnym potencjale. Obszar ten charakteryzował się dużą złośliwością i agresywnością, co zostało potwierdzone przez analizy markerów procesu tranzykcji epitelialno-mezenchymalnej (EMT) takich jak: kadheryna E oraz białka strefy zamykającej (ZO-1; ang. *zonula occludens-1*)⁷⁷. Ponadto Li i współpracownicy pokazali, że hCG β promuje migrację i inwazję w komórkach linii raka prostaty DU145 poprzez hamowanie aktywności kadheryny E, uruchomienie szlaku sygnałowego ERK (ang. *extracellular-signal-regulated kinase*) oraz zwiększenie ekspresji genu kodującego kolagenazę typu IV (MMP-2)⁷⁸.

Badania nad biologią raka jajnika wykazały, że także nieprawidłowości ultrastrukturalne komórek nowotworowych takie jak agregacja mitochondriów i przegrupowanie cytoszkieletu są ściśle związane z bardziej agresywnym fenotypem o wysokiej zdolności do migracji i inwazji. Zwiększone nagromadzenie mitochondriów może promować inwazyjność i przerzuty nowotworów^{79,80}. Doświadczenia przeprowadzone przez Wu i współpracowników na modelu mysim dokumentują duże skupiska mitochondriów w inwazyjnych komórkach raka jajnika. Dodatkowo, w tych komórkach wykazano wysoki poziom ekspresji hCG β . Jednocześnie potwierdzono, że ekspresja *LHCGR* nie ma istotnej korelacji z ekspresją hCG β w tkankach raka jajnika, co sugeruje, że rola hCG β w przerzutowaniu i inwazyjności tych komórek jest niezależna od receptora LH/hCGR⁸¹. Także inne badania pokazują, że guzy wydzielające hCG nie zawsze cechuje ekspresja receptora³³. Stąd postuluje się, że hCG w guzach może działać poprzez alternatywne mechanizmy, niezależne od obecności receptora.

Zrozumienie mechanizmów działania hCG w guzach dodatkowo utrudnia fakt, że w dużej części nowotworów wydzielających wolną podjednostkę beta hCG nie wszystkie geny regionu klastra *CGB/LHB* są aktywne, a dodatkowo ich aktywność

nie jest równocenna. Wydaje się, że synteza hCG β jest wynikiem zmienionej regulacji ekspresji określonych genów. Niestety mechanizmy regulujące ekspresję poszczególnych genów CGB a także ich rola w przebiegu choroby nowotworowej nie są do końca wyjaśnione.

2. Cel pracy

Celem niniejszej pracy było wykazanie aktywności genów *CGB1* i *CGB2* w komórkach wybranych raków żeńskich narządów płciowych oraz określenie wpływu ich ekspresji na biologię komórek nowotworowych *in vitro*.

Założony cel realizowano poprzez:

1. Analizę *in silico* poziomu transkryptów genów *CGB1* i *CGB2* oraz kontrolnego genu *CGB5* w rakach szyjki macicy i endometrium na podstawie wyników zdeponowanych w bazach TCGA.
2. Klonowanie i uzyskanie nadekspresji genów *CGB1* i *CGB2* oraz *CGB5* w ustalonych liniach komórkowych: HeLa i Ishikawa, wywodzących się z nowotworów raka szyjki macicy i endometrium.
3. Ocenę profilu ekspresji genów *CGB* w liniach komórkowych transfekowanych konstruktami zawierającymi sekwencje kodujące *CGB1* i *CGB2* oraz *CGB5* metodą PCR w czasie rzeczywistym.
4. Ocenę poziomu białka hCG β w liniach komórkowych transfekowanych konstruktami zawierającymi sekwencje kodujące *CGB1* i *CGB2* oraz *CGB5* metodą western blot.
5. Analizę biologii komórek nowotworowych z nadekspresją genów *CGB1* i *CGB2* oraz *CGB5* poprzez ocenę:
 - a) proliferacji,
 - b) inwazyjności,
 - c) apoptozy,
 - d) cyklu życiowego.

3. Materiały i metody

3.1. Materiały

3.1.1. Linie komórkowe

Modelem doświadczalnym w przeprowadzonych badaniach były dwie ustalone linie komórkowe – Ishikawa i HeLa. Linie te wybrano ze względu na ich charakterystyczne cechy związane z istotą prowadzonych badań.

Linia Ishikawa wywodzi się z ludzkiego nabłonkowego gruczolakoraka endometrium i wyprowadzona została z materiału pobranego od trzydziestodwuletniej kobiety. Linia ta wykazuje obecność receptorów estrogenowych, progesteronowych oraz receptorów hormonu luteinizującego i ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (LH/hCGR)⁸². Komórki Ishikawa charakteryzują się wydzielaniem łożyskowej fosfatazy alkalicznej (PLAP; ang. *placental alkaline phosphatase*) oraz kortykoliberyny (CRH; ang. *corticotropin-releasing hormone*). Linia komórkowa Ishikawa zdeponowana jest w kolekcji General Cell Collection pod numerem 98032302.

Drugim typem komórek wykorzystanym w niniejszej pracy były komórki linii HeLa. Komórki HeLa powstały w wyniku transformacji nowotworowej komórek nabłonkowych kanału zewnętrznego szyjki macicy wynikającej z zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego – HPV typ 18, pobranych od trzydziestoletniej kobiety. Komórki HeLa charakteryzują się obecnością LH/hCGR oraz wydzielaniem PLAP i CRH^{83,84}. W kolekcji General Cell Collection komórki te znajdują się pod numerem 93021013.

Obie linie komórkowe charakteryzuje endogenna produkcja hCGβ, przy czym poziom ekspresji podjednostki beta hormonu nie jest wysoki; nie przekracza 0,32 ng/ml na każde 10⁷ komórek utrzymywanych w warunkach *in vitro*⁸⁵.

Według danych umieszczonych w bazie TCGA Provisional (Firehose Legacy) raki szyjki macicy i endometrium różni ekspresja badanych w pracy genów, tj. CGB1 i CGB2. Zgodnie z informacjami zdeponowanymi w TCGA w tkankach gruczolakoraka szyjki macicy nie wykryto aktywności transkrypcyjnej CGB1 oraz CGB2. Pozostałe typy histopatologiczne raków szyjki macicy (płaskonabłonkowe, mieszane) charakteryzuje obecność transkryptów CGB1 oraz CGB2^{86,87}. Z kolei raka endometrium, zarówno typ I jak i typ II, cechuje obecność transkryptów obu tych genów⁸⁸.

3.1.2. Konstrukty CGB

W przeprowadzonych badaniach wykorzystano przygotowane na potrzeby niniejszej pracy wektory ekspresyjne (przygotowane na bazie wektora pcDNA3.1(+); Invitrogen, Stany Zjednoczone) z wklonowanymi insertami zawierającymi sekwencje kodujące genów *CGB1* oraz *CGB2*.

W pracy wykorzystano także wektor kontrolny (kontrola pozytywna) zawierający insert z sekwencją genu o najwyższej spośród genów *CGB* aktywności – *CGB5*. Konstrukty kontrolny z sekwencją kodującą *CGB5* został wykonany wcześniej i stanowi materiał archiwalny Pracowni Biologii Molekularnej Katedry i Zakładu Biologii Komórki Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

3.2. Metodyka

3.2.1. Analizy danych pochodzących z *The Cancer Genome Atlas* (TCGA)

Na podstawie danych zgromadzonych w bazach TCGA (ang. *The Cancer Genome Atlas*) przeprowadzono analizy poziomów ekspresji genów: *CGB1*, *CGB2* oraz *CGB5* w tkankach nowotworów szyjki macicy i endometrium. Każdorazowo wyniki porównywano do poziomu ekspresji powyższych genów w materiale niezmiennym chorobowo. Wyniki zaprezentowano w postaci liczby kopii transkryptu (TPM; ang. *transcripts per million*) uzyskanej przez normalizację wyrażoną, jako odsetek cząstek analizowanego genu/transkryptu na każde milion cząsteczek RNA w próbce.

W przypadku analiz dotyczących tkanek raka endometrium wykorzystano wyniki pochodzące od 546 pacjentek z rozpoznaną chorobą nowotworową oraz 35. kobiet, u których nie stwierdzono procesu nowotworowego w obrębie endometrium.

Z kolei analiza wyników prób raka szyjki macicy obejmowała 305 przypadków. Jednocześnie oceniano materiał zdeponowany w bazie, pochodzący od 3. kobiet z brakiem zdiagnozowanej choroby nowotworowej.

Zbierając dane dotyczące ekspresji analizowanych genów, uzyskano także informację na temat mediany wyników oraz ewentualnej istotności statystycznej. Zgodnie z informacjami zawartymi w bazie TCGA – UALCAN w analizie zdeponowanych tam danych zastosowany został test t-Studenta, uwzględniający ewentualne różnice w wartościach wariancji, zaś za poziom istotności statystycznej przyjęto $\alpha = 5\%$. W graficznym przedstawieniu wyników analiz zastosowano oznaczenia: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

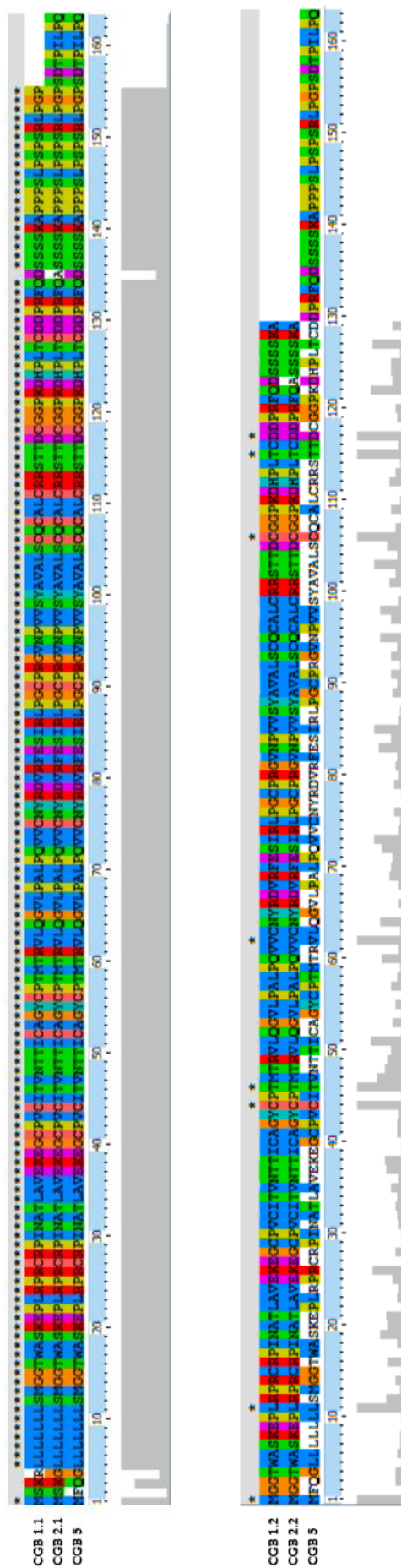
3.2.2. Przygotowanie wektorów ekspresyjnych

Ze względu na fakt, że białkowy produkt genów *CGB1* i *CGB2* nie został jak dotąd wyizolowany, w przypadku klonowania tych genów wykorzystano sekwencje wskazane *in silico* i zdeponowane w bazie OMIM, odpowiednio pod numerami 608823 oraz 608824. Przygotowano dwa rodzaje konstruktów zawierających: 1) sekwencję kodującą hipotetyczne białka homologiczne do hCG β – wektory: CGB 1.1 i CGB 2.1 oraz 2) sekwencję uwzględniającą przesunięcie ramki odczytu powodującą powstanie 132. aminokwasowego białka odmiennego od hCG β – konstrukty: CGB 1.2 i CGB 2.2¹⁸. Przewidywany *in silico* skład aminokwasów w strukturze pierwszorzędowej białka przedstawiono w formie graficznej (Rysunek 1.).

W celu przygotowania wektorów ekspresyjnych kodujących geny *CGB1* i *CGB2* wykorzystano całkowity RNA wyizolowany z tkanki łożyska uzyskanego z 38. tygodnia ciąży fizjologicznej, zakończonej porodem siłami natury (materiał archiwalny Katedry i Zakładu Biologii Komórki Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu), który posłużył jako matryca do syntezy cDNA (DNA komplementarnego do RNA). Przygotowane na drodze odwrotnej transkrypcji cDNA użyty został w łańcuchowej reakcji polimerazy – PCR z zastosowaniem genowo specyficznych starterów. Otrzymane produkty zostały następnie wklonowane do wektora ekspresyjnego.

3.2.3. Odwrotna transkrypcja

Każdorazowo do syntezy cDNA użyto 1 μ g RNA oraz uniwersalny starter oligo(dT)₁₀. Mieszaninę reakcyjną denaturowano przez 10 minut w temperaturze 65°C, po czym chłodzono na lodzie przez 5 minut. Następnie do probówki dodawano mieszaninę reakcyjną w składzie: odwrotna transkryptaza (Roche Diagnostics Polska sp. z o. o., Polska), bufor do odwrotnej transkrypcji (Roche Diagnostics Polska sp. z o. o., Polska) mieszanina deoksyrybonukleotydów (Novazym, Polska) oraz inhibitor rybonukleaz – RNAsin (Roche Diagnostics Polska sp. z o. o., Polska). Dokładną charakterystykę składników użytych w reakcji wraz z ich stężeniami zamieszczono w tabeli pierwszej.



Rysunek 1. Estymowane sekwencje aminokwasowe w strukturze pierwszorzędowej białka hCGB β opracowane na podstawie analizy bioinformatycznej z wykorzystaniem narzędzia BLAST.

Legenda:

CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 – analizowane konstrukty.

(*) – aminokwas obecny we wszystkich analizowanych sekwencjach.

Tabela 1. Zestawienie komponentów używanych do reakcji odwrotnej transkrypcji

komponent	stężenie początkowe	dodana ilość	stężenie końcowe
całkowity RNA	zmienne	zmienna	1 µg
starter oligo(dT)10	100 pmol/µl	1 µl	5 pmol/µl
bufor do odwrotnej transkrypcji	5 x	4 µl	1 x
mieszanina dNTPs (*)	100 pmol/µl	2 µl	10 pmol/µl
inhibitor RNaz	40 U/µl	0,5 µl	20 U
odwrotna transkryptaza	50 U/µl	0,25 µl	12,5 U
H ₂ O	-	zmienna	-
całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej	-	20 µl	-

(*) - trójfosforany deoksynukleotydów

Reakcję odwrotnej transkrypcji każdorazowo przeprowadzano w poniższych warunkach termicznych:

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

Po zakończeniu reakcji syntezy otrzymany cDNA przechowywano w temperaturze -20°C do czasu dalszych analiz.

3.2.4. Amplifikacja analizowanych genów CGB

Do reakcji PCR stosowano genowo specyficzne startery (TibMolBiol, Polska), zaś jako matrycy używano syntetyzowane wcześniej produkty reakcji odwrotnej transkrypcji (cDNA). Startery zaprojektowano w taki sposób, aby produkt reakcji zawierający sekwencje kodujące analizowanych wariantów genów posiadały na końcach 3' i 5' miejsca cięcia dla enzymów restrykcyjnych *Bam*HI i *Hind*III.

Opisy starterów oraz skład mieszaniny PCR wraz z profilem termicznym reakcji przedstawiono odpowiednio w tabelach: 2, 3 oraz 4.

Tabela 2. Charakterystyka starterów wykorzystanych do klonowania genów CGB

starter	sekwencja startera
CGB1v1 <i>Hind</i> III F	5'- CAA↓AGCTTATGTCAAAGAGGCTGCTG -3'
CGB1 <i>Bam</i> HI R	5'-GG↓GATCCGGCCCCGGGAGACG -3'
CGB1v2 <i>Hind</i> III F	5'-TACA↓AGCTTATGTCCACATTCAGTGCTTGCGGAAGATATCCCGCTAAGA GAGAGACATGTCAAAGAGGCT -3'
CGB1/2v2 <i>Bam</i> HI R	5'- TAG↓GATCCGTGGTGCTGCGGCG -3'
CGB2v1 <i>Hind</i> III F	5'-CAA↓AGCTTATGTCAAAGGGGCTGCTG -3'
CGB2 <i>Bam</i> HI R	5'- GG↓GATCCGGCCCCGGGAGTCTG -3'
CGB2v2 <i>Hind</i> III F	5'- TACA↓AGCTTATGTCCACATCCCCAGTGCTTGC -3'

Legenda:

AAGCTT – sekwencja rozpoznawana przez enzym *Hind*III,

GGATCC – sekwencja rozpoznawana przez enzym *Bam*HI,

↓ – miejsce cięcia.

Oznaczenie genów w bazie GenBank®: CGB1 (NM_033377.1), CGB2 (NM_033378.1).

Tabela 3. Zestawienie komponentów PCR

komponent	stężenie początkowe	dodana ilość	stężenie końcowe
cDNA	–	2 µl	–
odpowiedni starter CGB <i>Hind</i> III sensowy	100 pmol/µl	0,25 µl	1 pmol/µl
odpowiedni starter CGB <i>Bam</i> HI antysensowy	100 pmol/µl	0,25 µl	1 pmol/µl
bufor (BioXAct, Boline, Stany Zjednoczone)	10 x	2,5 µl	1 x
mieszanina dNTPs (*) (Novazym, Polska)	10 pmol/µl	2,5 µl	1 pmol/µl
enhancer (BioXAct, Boline, Stany Zjednoczone)	5 x	5 µl	1 x
MgCl ₂	50 pmol/µl	1,5 µl	3 pmol/µl
polimeraza (BioXAct, Boline, Stany Zjednoczone)	4U/µl	0,25 µl	1U
H ₂ O wolna od DNaz	–	10,8 µl	–

(*) – deoksynukleotydy

Tabela 4. Profil temperaturowy PCR

etap	temperatura	czas	liczba cykli
wstępna denaturacja	95°C	10 min	1
denaturacja	95°C		
hybrydyzacja starterów	zmienna, zależna od użytego startera	zmienny, zależny od użytego startera	
elongacja	72°C	zmienny, zależny od długości produktu	40
elongacja końcowa	72°C	5 min	1

Uzyskane produkty reakcji zostały ocenione na podstawie rozdziału elektroforetycznego w 2% żelu agarozowym pod względem jakościowym i ilościowym. W kolejnym etapie produkty wycięto z żelu i oczyszczano z zastosowaniem zestawu AxyPrep PCR Clean-up Kit (Axygen, Stany Zjednoczone) według procedury dostarczonej przez producenta.

3.2.4.1. Cięcie enzymami restrykcyjnymi

Oczyszczone produkty reakcji PCR poddano cięciu restrykcyjnemu, w którym zastosowano enzymy *Bam*HI i *Hind*III typu FastDigest (Fermentas, Stany Zjednoczone). Cięciu restrykcyjnemu, z jednoczesną defosforylacją, poddano także plazmid pcDNA3.1(+) (Invitrogen, Stany Zjednoczone), który został użyty w kolejnym etapie przygotowania wektora ekspresyjnego.

Warunki reakcji restrykcji w obu przypadkach były jednakowe. Reakcje cięcia prowadzono w temperaturze 37°C przez 10 minut. Skład mieszaniny restrykcyjnej zamieszczono w tabeli 5.

Tabela 5. Zestawienie składników zastosowanych w reakcjach cięcia restrykcyjnego

komponent	ilość odczynnika dodana podczas cięcia plazmidowego DNA	ilość odczynnika dodana podczas cięcia produktu PCR
H ₂ O wolna od nukleaz	14 µl	15 µl
bufor FastDigest 10x	2 µl	3 µl
DNA	1 µg	10 µl
enzym FastDigest <i>Bam</i> HI	1 µl	1 µl
enzym FastDigest <i>Hind</i> III	1 µl	1 µl
enzym FastAP (alkaliczna fosfataza)	1 µl	-

Produkty procesu restrykcji połączono z wektorem w reakcji ligacji, którą prowadzono przez jedną godzinę w temperaturze pokojowej.

Następnie przez 10 minut w temperaturze 65°C prowadzono inaktywację ligazy. Składniki mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w tabeli 6.

Tabela 6. Zestawienie składników zastosowanych w reakcjach ligacji

komponent	dodana ilość
H ₂ O wolna od nukleaz	do objętości 20 µl
bufor do ligacji 10 x (Fermentas, Stany Zjednoczone)	2 µl
plazmidowy DNA	50 ng
produkt PCR	130 ng
ligaza DNA z faga T4 (Fermentas, Stany Zjednoczone)	1 µl

3.2.5. Transformacja komórek kompetentnych konstruktami kodującymi geny CGB

Bakteryjne komórki kompetentne *Escherichia coli* szczepu TG1 (Stratagene, Stany Zjednoczone) poddano procedurze transformacji metodą szoku termicznego wykorzystując wektory z wklonowanymi sekwencjami kodującymi analizowane geny CGB.

Mieszaninę komórek kompetentnych rozmrażano przez 10 minut na lodzie, a następnie dodawano do niej 100 ng danego wektora ekspresyjnego. Po upływie 10 minut komórki znajdujące się w probówkach typu eppendorf przenoszono do bloku grzejnego z uprzednio nastawioną temperaturą 42°C. Po dwóch minutach komórki ponownie umieszczano na lodzie na 10 minut inkubacji, po czym do probówki dodawano 1 ml pożywki LB (ABO sp. z o. o., Polska), niezawierającej antybiotyków selekcyjnych. Komórki bakteryjne hodowano wytrząsając je w temperaturze 37°C przez 1,5 godziny. Po zakończonej inkubacji komórki odwirowywano przy prędkości 850 rpm przez 3 minuty. Supernatant usuwano, pozostawiając około 100 µl medium hodowlanego, w którym zawieszano osad bakterii. Całość przenoszono na uprzednio przygotowaną szalkę Petriego z pożywką LB z dodatkiem ampicyliny – 100 µg/ml (BioRad, Stany Zjednoczone) zestaloną 1,7% agarem (Becton Dickinson, Stany Zjednoczone). Hodowlę bakterii na podłożu stałym kontynuowano przez noc w inkubatorze bez wymuszonego obiegu powietrza, w temperaturze wynoszącej 37°C.

3.2.6. Selekcja i namnażanie konstruktów kodujących CGB

W celu namnożenia wektorów ekspresyjnych kodujących analizowane geny, po całonocnej hodowli bakterii na płytkach Petriego, wyselekcjonowane pojedyncze kolonie przenoszono do probówek zawierających 5 ml płynnej pożywki LB z antybiotykiem selekcyjnym (ampicylina 100 µg/ml); (BioRad, Stany Zjednoczone). Całość inkubowano wytrząsając w temperaturze 37°C aż do czasu uzyskania przez komórki bakteryjne fazy logarytmicznego wzrostu, mierzonego za pomocą spektrofotometru NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone). Hodowlę bakteryjną wirowano (3500 g, 10 min, 4°C), a osad wykorzystano do izolacji plazmidowego DNA.

W celu uzyskania plazmidowego DNA posłużono się zestawem do izolacji High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Diagnostics Polska sp. z o. o., Polska) stosując procedurę dołączoną przez producenta. Wyizolowany plazmid został sprawdzony pod względem jakościowym i ilościowym. Oceny dokonano wykorzystując spektrofotometr oraz technikę rozdziału elektroforetycznego w żelu agarozowym. Obecność insertów potwierdzano za pomocą cięcia restrykcyjnego enzymami *Bam*HI oraz *Hind*III i rozdziału elektroforetycznego. Dodatkowo poprawność klonowania sprawdzano, poddając produkty sekwencjonowaniu w Genomed S. A. (Polska).

Plazmidy z potwierdzoną obecnością insertu w prawidłowej orientacji posłużyły do przeprowadzenia transfekcji komórek linii HeLa oraz Ishikawa.

3.2.7. Hodowla linii komórkowych

3.2.7.1. Zakładanie hodowli

Rozmrożone komórki linii HeLa i Ishikawa przenoszono w warunkach aseptycznych na sterylne szalki Petriego (średnica 100 mm), w których uprzednio zostało umieszczone medium hodowlane RPMI 1640 (PAN-Biotech GmbH, Niemcy) z dodatkiem 100 U/ml penicyliny (VWR, Stany Zjednoczone), 100 µg/ml streptomycyny (Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone), 2 mmol/l L-glutaminy (VWR, Stany Zjednoczone) i 10% roztworu surowicy bydlęcej – FBS (ang. *fetal bovine serum*; Biowest, Francja). Komórki hodowano w aseptycznych warunkach, w inkubatorze o kontrolowanej temperaturze 37°C, 5% atmosferze CO₂ i 100% wilgotności.

3.2.7.2. Pasażowanie komórek linii HeLa oraz Ishikawa

Po siedemdziesięciodwugodzinnej hodowli komórki przenoszono na płytki sześciodołkowe (średnica 35 mm) zawierające świeże medium hodowlane. W tym celu komórki przemywano zbuforowanym roztworem soli fizjologicznej bez wapnia i magnezu i odtrawiano od podłoża przy użyciu 0,05% roztworu trypsyny przez trzy minuty w temperaturze pokojowej. Po usunięciu roztworu trypsyny komórki zawieszano w trzech mililitrach świeżego medium. Uzyskaną w ten sposób zawiesinę komórkową rozdzielano na szalki Petriego z 2 ml świeżego medium hodowlanego, w ilości umożliwiającej uzyskanie po dwudziestu czterech godzinach hodowli konfluentności komórek na poziomie wynoszącym 70%. Przygotowaną w ten sposób hodowlę komórkową inkubowano przez dwadzieścia cztery godziny w warunkach opisanych powyżej. Tak przygotowane komórki wykorzystywano do dalszych doświadczeń.

3.2.7.3. Transfekcja linii komórkowych HeLa oraz Ishikawa

Transfekcję komórek przeprowadzono z wykorzystaniem nośnika liposomalnego TurboFect™ (Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone).

Procedura transfekcji przeprowadzona została zgodnie z instrukcją dołączoną przez producenta. 2 µg DNA plazmidowego mieszano z 200 µl medium hodowlanego RPMI 1640, a następnie do mieszaniny dodawano 8 µl roztworu Turbofect™. Tak przygotowaną mieszaninę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 20 minut, po czym całość podawano na płytki z komórkami. Komórki po przeprowadzonej transfekcji hodowano w inkubatorze o kontrolowanej temperaturze 37°C, 5% atmosferze CO₂ i 100% wilgotności.

Transfekowane komórki poddawano dalszym testom i analizom po 24, 48 i 72 godzinach od momentu transfekcji.

3.2.8. Izolacja całkowitego RNA

Izolację całkowitego RNA z komórek linii HeLa oraz Ishikawa prowadzono z wykorzystaniem odczynnika Tri Pure Isolation Reagent i procedury dostarczonej przez producenta (Roche Diagnostics Polska sp. z o. o., Polska). Procedura obejmowała:

- usunięcie medium znad komórek;
- przemycie komórek roztworem PBS;
- zawieszenie komórek w 1 ml TriPure Isolation Reagent i inkubację w temperaturze pokojowej przez 5 minut w celu dysocjacji nukleoprotein;
- dodanie 0,2 ml chloroformu, intensywne wytrząsanie przez 15 sekund oraz inkubację przez 3 minuty w temperaturze pokojowej;
- wirowanie prób z przyśpieszeniem 12000 g przez 15 minut w temperaturze 4°C;
- przeniesienie odseparowanej górnej wodnej fazy do nowej probówki;
- wytrącanie RNA przez podanie do fazy wodnej 0,5 ml alkoholu izopropylowego i inkubację w temperaturze pokojowej przez 10 minut;
- wirowanie prób z przyśpieszeniem 12000 g przez 10 minut w temperaturze 4°C;
- usunięcie supernatantu i przemycie osadu 1 ml 75% etanolu;
- wirowanie prób z przyśpieszeniem 12000 g przez 10 minut w temperaturze 4°C;
- usunięcie alkoholu etylowego i wysuszenie osadu na wolnym powietrzu przez około 10 minut;
- rozpuszczenie RNA w 20 µl wody wolnej od RNaz i inkubację w temperaturze 60°C przez 10 minut.

Uzyskany w ten sposób RNA analizowano pod względem ilościowym i jakościowym wykorzystując metodę spektrofotometryczną (A_{260} , $A_{260/280}$) i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu dalszych analiz.

3.2.9. Synteza cDNA na matrycy całkowitego RNA - odwrotna transkrypcja

Całkowity RNA wyizolowany z komórek linii HeLa oraz Ishikawa poddano reakcji odwrotnej transkrypcji, tak jak opisano to w podrozdziale 3.2.3.

3.2.10. Ilościowa analiza poziomu ekspresji genów kodujących CGB oraz genów regulujących proces apoptozy: *BAX*, *BCL2* i *BIRC5*

cDNA zsyntetyzowane na matrycach RNA wyizolowanego z komórek HeLa i Ishikawa wykorzystano w reakcjach qPCR (ang. *quantitative polymerase chain reaction*), w których oceniono poziom ekspresji genów kodujących CGB, genów regulujących proces apoptozy: *BAX*, *BCL2* i *BIRC5*, a także genu metabolizmu podstawowego *HPRT*.

Do reakcji qPCR zastosowano specyficzne genowo startery zestawione w tabeli siódmej.

W przypadku analizy poziomu ekspresji genów kodujących podjednostkę beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej startery i sonda zostały zaprojektowane tak aby umożliwić amplifikację wszystkich genów CGB.

Tabela 7. Zestawienie starterów wykorzystywanych do reakcji qPCR

gen	sekwencja startera sensowego	sekwencja startera antysensowego
<i>CGB</i> (1)	5' - TACTGCCCCACCATGACC - 3'	5' - CACGGCGTAGGAGACCAC - 3'
<i>BAX</i> (2)	5' - ATGTTTCTGACGGCAACTTC - 3'	5' - ATCAGTTCGGGCACCTTG - 3'
<i>BIRC5</i> (3)	5' - TCTGCTTCAAGGAGCTGGA - 3'	5' - AAAGTGCTGGTATTACAGGCGTA - 3'
<i>BCL2</i> (4)	5' - TACCTGAACCGGCACCTG - 3'	5' - GCCGTACAGTTCCACAAAGG - 3'
<i>HPRT</i> (5)	5' - TGAAGAGCTATTGTAATGACCAGTC - 3'	5' - CAAATCCAACAAAGTCTGGC - 3'

Legenda:

oznaczenie genów w bazie GenBank®:

- (1) - *CGB1* (NM_033377.1); *CGB2* (NM_033378.1); *CGB3* (NM_000737.3); *CGB5* (NM_033043.1); *CGB7* (NM_033142.1); *CGB8* (NM_033183.2),
 (2) - izoforma alfa NM_138761.3; izoforma beta NM_004324.3,
 (3) - izoforma 1 NM_001168.2; izoforma 2 NM_001012270.1; izoforma 3 NM_001012271.1,
 (4) - izoforma alfa NM_000633.2; izoforma beta NM_000657.2,
 (5) - NM_000194.2

Do reakcji qPCR wykorzystano specyficzne sondy molekularne (Roche Diagnostics Polska sp. z o. o., Polska) przedstawione w tabeli ósmej.

Tabela 8. Charakterystyka sond użytych do reakcji qPCR

gen	Sonda	numer katalogowy
<i>BAX</i>	#57	04688546001
<i>BCL2</i>	#75	04688988001
<i>BIRC5</i>	#36	04687949001
<i>CGB</i>	#71	04688945001

W reakcjach wykorzystano także gen *HPRT* kodujący fosforybozylotransferazę hipoksantyno-guaninową, który charakteryzuje się konstytutywną ekspresją w komórkach HeLa i Ishikawa. W tym celu matrycę cDNA amplifikowano z zastosowaniem specyficznych genowo starterów przedstawionych w tabeli siódmej.

Mieszaninę reakcyjną dla ilościowej oceny względnej ekspresji genów badanych przedstawiono w tabeli dziewiątej.

Tabela 9. Skład mieszaniny reakcyjnej qPCR

komponent	stężenie początkowe	stężenie końcowe
cDNA	–	2 µl
mieszanina starterów	10 pmol/µl	5 pmol/µl
sonda	10 pmol/µl	5 pmol/µl
mieszanina Light Cycler Fast Start TaqMan Reaction Mix zawierająca polimerazę, dNTPs, MgCl ₂	10x	1x
H ₂ O	–	dopełnione do objętości 20 µl

Kapilary z mieszaniną reakcyjną umieszczono w rotorze i wirowano w wirówce Light Cycler Caraousel Centrifuge 2.0 (Roche Diagnostics Polska sp. z o. o., Polska). Następnie kapilary przenoszono do termocyklera Light Cycler 2.0 i prowadzono reakcję (Roche Diagnostics Polska sp. z o. o., Polska). Profil termiczny reakcji qPCR przedstawiono w tabeli dziesiątej.

Tabela 10. Profil termiczny reakcji qPCR z użyciem Light Cycler TaqMan Master i sond hydrolizujących

liczba cykli	etap	warunki reakcji w poszczególnych etapach		
		temperatura [°C]	czas [s]	
45	preinkubacja	95	600	
	denaturacja	95	10	
	amplifikacja	hybrydyzacja starterów z jednoczesną elongacją	60	20
		pomiar fluorescencji	72	1
	chłodzenie	40	30	

3.2.11. Wyznaczanie krzywych wzorcowych i pomiar ekspresji analizowanych genów

W celu oceny wydajności reakcji oraz możliwości określenia względnej ekspresji analizowanych genów w badanych próbach, wyznaczono krzywe wzorcowe. W tym celu wykonano serie rozcieńczeń cDNA uzyskanych w reakcji odwrotnej transkrypcji z uniwersalnym starterem oligo(dT)₁₀ z całkowitego RNA wyizolowanego z łożyska. Rozcieńczenia cDNA obejmowały zakres od 1 do 1:100000. Przygotowane w ten sposób

rozcieńczenia matrycy poddano amplifikacji zgodnie z procedurą opisaną w tabeli dziesiątej.

Uzyskano wyniki reakcji w postaci krzywych amplifikacji oraz punktów C_p (ang. *crossing point*) – miejsc, w których możliwa była detekcja sygnału fluorescencyjnego. Wydajność reakcji amplifikacji genów *CGB*, *HPRT*, *BCL2*, *BAX* i *BIRC5* wyznaczono z wykorzystaniem oprogramowania Light Cycler Data Analysis Software wersja 4.0.5.415 (Roche Diagnostics Polska sp. z o. o., Polska).

Uzyskane wyniki pomiarów fluorescencji analizowanych genów (GOI – ang. *gene of interest*) przyrównano do uprzednio przygotowanych krzywych wzorcowych. Pozyskane w ten sposób wartości dla GOI odnoszono do poziomu uzyskanego dla genu referencyjnego. Otrzymane w ten sposób rezultaty stanowiły względne poziomy ekspresji genów, które przedstawiono w postaci wartości C_r (ang. *concentration ratio*).

3.2.12. Ocena cyklu komórkowego z zastosowaniem cytometrii przepływowej

Do oceny cyklu życiowego komórek linii HeLa oraz Ishikawa zastosowano technikę cytometrii przepływowej.

Komórki transfekowane jak i nietransfekowane konstruktami *CGB* odtrawiono od podłoża roztworem 0,05% trypsyny (Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone), a następnie wirowano przez 5 minut w 4°C przy 3000 g. Kolejnym etapem było dwukrotne przepłukanie osadu komórkowego roztworem zimnego PBS (Avantor, Polska) i zawieszenie osadu w 1 ml 70% alkoholu etylowego w celu utrwalenia. Komórki inkubowano następnie w temperaturze 4°C przez 24 godziny. Po tym czasie komórki wirowano, supernatant usuwano, a osad komórkowy zawieszono w 0,5 ml PBS. W celu zdegradowania RNA do roztworu podawano RNazę A (100 µg/ml; Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone) i całość inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 minut. W kolejnym kroku komórki ponownie wirowano, po czym usuwano supernatant, a osad komórkowy zawieszono w roztworze jodku propidyny w PBS (50 µg/ml; Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone). W celu wybarwienia DNA komórki inkubowano w temperaturze 4°C przez godzinę.

Cykl życiowy komórek oceniano przy wykorzystaniu cytometru przepływowego BD FACS Aria III (Becton Dickinson, Stany Zjednoczone). Udział procentowy poszczególnych faz cyklu komórkowego: apoptozy, G0/G1, S, G2/M wyznaczano w grupie nie mniejszej niż 20000 komórek z użyciem oprogramowania BD Cell Quest™ Pro Ver. 5.2.1 (Becton Dickinson, Stany Zjednoczone).

3.2.13. Ocena proliferacji komórek z zastosowaniem bromodeoksyurydyny (BrdU)

Do analizy proliferacji komórek zastosowano metodę opartą na inkorporacji analogu tyminy (bromodeoksyurydyny, BrdU) do DNA replikujących komórek. Po siedemdziesięciu dwóch godzinach od rozpoczęcia eksperymentu, komórki kontrolne, nietransfekowane jak i te transfekowane konstruktami CGB zostały poddane czterogodzinnej inkubacji z 50 μ M BrdU (Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone). Po tym czasie medium znad komórek usuwano, zaś same komórki przemywano trzykrotnie przez 10 minut w roztworze płuczącym (50 mM NaCl i 100 mM TRIS w PBS; Avantor, Polska). W dalszej kolejności komórki inkubowano z 1N roztworem kwasu solnego (Avantor, Polska) przez 20 minut, w temperaturze pokojowej, a następnie przez kolejne 20 minut w 37°C. Po tym czasie komórki przepłukano dwukrotnie (przez 10 minut) w 0,1M buforze boranowym, w temperaturze pokojowej oraz trzykrotnie (po 5 minut), w roztworze PBS zawierającym 0,15% Triton X-100 (Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone). Następnie komórki inkubowano przez godzinę w temperaturze pokojowej w buforze blokującym (PBS; 0,15% Triton X-100; 1M glicyna; 5% BSA; Avantor, Polska), po czym poddano je całonocnej inkubacji w 4°C z pierwszorzędowymi monoklonalnymi przeciwciałami króliczymi anty-BrdU (Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone), rozcieńczonymi w stosunku 1:100 w buforze blokującym. Kolejnego dnia komórki przemyto trzykrotnie po 10 minut w roztworze płuczącym (50 mM NaCl i 100 mM TRIS w PBS) w celu usunięcia niezwiązanych przeciwciał. Następnie prowadzono inkubację przez godzinę w ciemności, w temperaturze pokojowej z drugorzędowymi przeciwciałami anty-króliczymi skoniugowanymi z barwnikiem ksantenowym FITC (ang. *fluorescein isothiocyanate*; Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone), rozcieńczonymi w stosunku 1:50 w buforze blokującym. W kolejnym kroku komórki w celu usunięcia niezwiązanych przeciwciał przemyto trzykrotnie po 10 minut w roztworze płuczącym (50 mM NaCl i 100 mM TRIS w PBS). Następnie komórki pozostawiono w roztworze PBS i analizowano wykorzystując mikroskop konfokalny LSM 710 (Carl Zeiss AG, Niemcy) wyposażony w obiektywy Plan-Neofluar oraz filtry: DAPI (F-set 49), GFP (F-set 10), Rhodamine/Texas Red (F-set 20). Jednorazowo oceniano nie mniej niż 2000 komórek. Były to wszystkie komórki znajdujące się w danym polu widzenia, w tym komórki wykazujące fluorescencję w świetle UV. Ich wzajemny stosunek pozwolił na oszacowanie odsetka proliferujących komórek. Do wykonania zdjęć oraz pomiarów wykorzystano oprogramowanie ZEN - Imaging Software (Carl Zeiss AG, Niemcy).

3.2.14. Ocena proliferacji komórek w czasie rzeczywistym

Do oceny proliferacji linii komórkowych HeLa oraz Ishikawa wykorzystano system xCELLigence® RTCA DP (Roche Diagnostics Polska sp. z o. o., Polska) umożliwiający ocenę proliferacji w czasie rzeczywistym. Po dwudziestu czterech godzinach od przeprowadzonej transfekcji komórki odtrawiono trypsyną (0,05%; Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone), zawieszono w 1 ml medium hodowlanego i zebrano do 1,5 ml probówek typu eppendorf. Następnie zliczano je z wykorzystaniem automatycznego licznika komórek TC20 (BioRad, Stany Zjednoczone), zgodnie z instrukcją dołączoną przez producenta. Po uzyskaniu danych dotyczących liczby komórek znajdujących się w zawiesinie płynu hodowlanego przenoszono je na specjalne płytki (E-plate) systemu xCELLigence® RTCA DP. Do każdego dołka płytki E-plate nakładano 160 μ l w pełni suplementowanego medium hodowlanego, następnie aplikowano 10 000 komórek i dopełniano płynem hodowlanym do końcowej objętości 200 μ l. Przygotowana w ten sposób płytka wkładana była do urządzenia umieszczonego w inkubatorze na kolejne 72 godziny. Podczas inkubacji mierzona była wartość impedancji przepływu elektronów spowodowana przez wzrastające komórki adherentne. Wartość ta opisywana jest przy użyciu parametru (bez standardowych jednostek) o nazwie *indeks komórkowy* (CI), gdzie CI jest ilorazem impedancji w punkcie czasowym n (impedancja przy braku komórek) do nominalnej wartości impedancji. Podczas przebiegu całości testu proliferacji wyniki przyrostu parametru CI były wyświetlane na monitorze komputera dla każdego z badanych konstruktów genowych. Kontrolę stanowiły komórki nietransfekowane.

3.2.15. Ocena inwazyjności komórek w czasie rzeczywistym

Potencjał inwazyjny komórek oceniano z zastosowaniem systemu xCELLigence® RTCA DP (Roche Diagnostics Polska sp. z o. o., Polska), który umożliwia ocenę ich migracji przez półprzepuszczalną błonę w czasie rzeczywistym. Po czterdziestu ośmiu godzinach od przeprowadzonej transfekcji komórki odtrawione trypsyną (0,05%; Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone) zawieszono w 1 ml medium hodowlanego i zbierano do 1,5 ml probówek typu eppendorf. Następnie zliczano je z wykorzystaniem automatycznego licznika komórek TC20 (BioRad, Stany Zjednoczone) zgodnie z instrukcją dołączoną przez producenta. Po uzyskaniu danych dotyczących liczby komórek w zawiesinie przystępowano do pracy ze specjalnie dedykowanymi analizie inwazyjności w systemie xCELLigence® RTCA DP płytkami CIM-plate. Do każdego

dołka dolnej komory płytki CIM-plate podawano 160 μ l w pełni suplementowanego medium hodowlanego, następnie dokładano górną komorę płytki. Dolna powierzchnia górnej komory składa się z mikroporowatej membrany, przez którą mogą migrować komórki. Złote elektrody na dolnej stronie membrany wykrywają obecność adherentnych komórek i rejestrują sygnał przekształcając go następnie na sygnał elektroniczny odnotowywany przez oprogramowanie xCELLigence. Do górnej komory CIM-plate aplikowano 20 000 komórek i dopełniano niesuplementowanym płynem hodowlanym do końcowej objętości 200 μ l. Przygotowaną w ten sposób płytkę instalowano w urządzeniu znajdującym się w inkubatorze na 24 godziny. W teście mierzona była wartość impedancji przepływu elektronów wywołana przez komórki, które pokonały barierę membrany o grubości 8 μ m, a następnie osiadały na dnie dolnej komory. Opisany w podrozdziale 3.2.14 indeks komórkowy był analizowany dla każdego z badanych konstruktów genowych; kontrolę stanowiły komórki nietransfekowane.

3.2.16. Izolacja białek

Po siedemdziesięciu dwóch godzinach hodowli komórkowej płytki z komórkami umieszczano na lodzie, medium usuwano, a komórki przemywano 500 μ l zimnego roztworu PBS (Avantor, Polska). Następnie, w obecności 1 ml świeżego, zimnego PBS komórki zbierano z płytek hodowlanych i przenoszono do probówek typu eppendorf. Zawiesinę komórek wirowano z prędkością 1500 rpm przez 5 minut w temperaturze pokojowej, następnie supernatant usuwano, a do osadu dodawano 100 μ l roztworu PBS (Avantor, Polska) z dodatkiem 10% buforu RIPA (Abcam, Wielka Brytania) i 10% inhibitora proteaz (Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone). Całość wytrząsano przez 15 minut w temperaturze 4°C, a następnie wirowano z przyspieszeniem 14000 g przez 15 minut w temperaturze 4°C. Uzyskany supernatant zawierający białka przenoszono do nowych probówek. Stężenie białek w uzyskanym ekstrakcie białkowym mierzono metodą Bradforda, wykorzystując odczynnik Quick Start Bradford Dye Reagent (BioRad, Stany Zjednoczone) według protokołu producenta. Próby przechowywano w temperaturze -80°C do czasu dalszych analiz.

3.2.17. Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym

Izolaty białkowe poddawano rozdzielaniu elektroforetycznemu w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących; charakterystykę żelu podano w tabeli jedenastej. Białkowe próby (30 μ g) przed nałożeniem na żel, mieszano z buforem

obciążającym (Laemmli; Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone) w próbówce typu eppendorf i następnie w celu denaturacji inkubowano przez 10 minut w bloku grzejmym w temperaturze 95°C. Rozdział elektroforetyczny prowadzono w buforze glicynowym o składzie: 0,25 M Tris (pH 8,3); 1,92 M glicyna oraz 1% SDS (Avantor, Polska) przez 90 minut przy napięciu 130 V przy użyciu zestawu Mini-PROTEAN (BioRad, Stany Zjednoczone).

Tabela 11. Charakterystyka składników użytych do przygotowania żelu poliakrylamidowego stosowanego podczas procedury western blot

komponent	żel zagęszczający	żel rozdzielający
mieszanina akrylamidu (39%) i bisakrylamidu (1%) (Lab Empire, Polska)	1,3 ml	6 ml
bufor do żelu zagęszczającego (0,5 M Tris/HCl; pH 6,8) (Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone)	2,5 ml	-
bufor do żelu rozdzielającego (1,5 M Tris/HCl; pH 8,8) (Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone)	-	5 ml
10% siarczan dodecylu sodu (Lab Empire, Polska)	100 µl	200 µl
woda destylowana	6,0 ml	8,7 ml
10% nadsiarczan amonu (Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone)	50 µl	100 µl
N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina (Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone)	10 µl	10 µl

3.2.18. Elektrotransfer i immunodetekcja białek

Po zakończonej elektroforezie białka przenoszono na zaktywowaną metanolem membranę PVDF (polifluorkuwinylidenu); (Merck Millipore, Stany Zjednoczone) o wielkości porów 0,45 µm. W tym celu wykorzystano metodę mokrego elektrotransferu w buforze glicynowym z dodatkiem 20% metanolu (Avantor, Polska), prowadzoną przez 90 minut przy natężeniu prądu 350 mA. Po zakończonym elektrotransferze membranę PVDF barwiono, przez 5 minut w temperaturze pokojowej buforem Ponceau S (Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone) w celu uwidocznienia poszczególnych frakcji białek i oceny wydajności elektrotransferu. Po wybarwieniu białek bufor zlewano, zaś błonę PVDF przemywano trzykrotnie wodą dejonizowaną. Następnie inkubowano ją przez godzinę w buforze blokującym (Blocking Buffer; Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone) w temperaturze pokojowej, na mieszadle horyzontalnym. Po tym czasie błonę poddawano całonocnej inkubacji w temperaturze 4°C z odpowiednimi przeciwciałami pierwszorzędowymi rozcieńczonymi do zwalidowanego stężenia w buforze blokującym (Tabela 12.).

W kolejnym dniu bufor wraz z przeciwciałami usuwano zaś membranę przemywano trzykrotnie przez 10 minut w roztworze płuczącym TBS-T (0,1%, Tween-20; 2,4% Tris/HCl; 8% NaCl; Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone). W następnym kroku membranę inkubowano przez godzinę w temperaturze pokojowej z przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z peroksydazą chrzanową w odpowiednim rozcieńczeniu, również w buforze blokującym (Tabela 12.). Po tym czasie bufor wraz z przeciwciałami usuwano, a membranę przemywano trzykrotnie przez 10 minut w roztworze płuczącym TBS-T. Po ostatnim płukaniu membranę osuszano na ręczniku papierowym i umieszczano na sztywnej folii. Na tak przygotowaną błonę podawano 2 ml mieszaniny substratu dla peroksydazy chrzanowej (Clarity ECL; Biorad, Stany Zjednoczone), a następnie przykrywano sztywną folią. Do detekcji sygnału chemiluminescencji użyto systemu G:BOX (Syngene, Wielka Brytania), który zaprogramowany w tryb dynamicznego odczytywania sygnałów zapisywał serie zdjęć.

Charakterystykę stosowanych przeciwciał przedstawiono w tabeli dwunastej.

Tabela 12. Charakterystyka stosowanych przeciwciał podczas detekcji białek

przeciwciało	masa cząsteczkowa analizowanego białka	stężenie/ pochodzenie/ producent
anty-hCGβ <u>I rządowe</u>	23 kDa	1:500 poliklonalne królicze anty-hCGβ (Agilent Dako, Stany Zjednoczone)
anty-BAX <u>I rządowe</u>	21 kDa	1:1000 poliklonalne królicze anty-BAX (Abcam, Wielka Brytania)
anty-BCL-2 <u>I rządowe</u>	26 kDa	1:1000 poliklonalne królicze anty-BCL2 (Santa Cruz Biotechnology, Stany Zjednoczone)
anty-surwiwina <u>I rządowe</u>	16 kDa	1:1000 poliklonalne królicze anty-surwiwina (Abcam, Wielka Brytania)
anty-GAPDH <u>I rządowe</u>	36 kDa	1:1000 poliklonalne królicze anty-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Stany Zjednoczone)
<u>II rządowe</u>	-	1:2000 poliklonalne kozie antykrólicze sprzężone z peroksydazą chrzanową (Santa Cruz Biotechnology, Stany Zjednoczone)

3.2.19. Barwienie fluorescencyjne komórek z zastosowaniem barwników Hoechst 33342 i jodku propidyny

Zmiany morfologiczne charakteryzujące proces apoptozy, do których zalicza się między innymi kondensację i fragmentację chromatyny w komórkach, oceniono stosując mieszaninę barwników fluorescencyjnych – bisbenzimidu (Hoechst 33342) oraz jodku propidyny.

W celu oceny liczby komórek apoptotycznych, nekrotycznych oraz komórek niezmiennych zastosowano mieszaninę wyżej wymienionych barwników.

Barwniki te różni możliwość penetracji przez błonę komórkową. Odczynnik Hoechst 33342 jest w stanie przenikać przez nieprzerwane błony komórkowe, barwiąc jądro na kolor niebieski, z kolei jodek propidyny penetruje do wnętrza komórek pozbawionych integralności błony komórkowej i barwi jądra na kolor czerwony. Komórki transfekowane analizowanymi konstruktami wybarwiano mieszaniną zawierającą Hoechst 33342 (0,1 µg/ml, Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone) i jodek propidyny (0,125 µg/ml, Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone). Barwienie umożliwiło ocenę kondensacji i/lub fragmentacji chromatyny jądrowej, świadczących o zachodzącym procesie apoptozy (wybarwienie jądra na kolor niebieski) oraz pozbawienia ciągłości błony komórkowej w procesie nekrozy i/lub późnej apoptozy (wybarwienie jądra na kolor czerwony). Proces apoptozy w komórkach transfekowanych oraz kontrolnych analizowano wykorzystując mikroskop konfokalny LSM 710 (Carl Zeiss AG, Niemcy) wyposażony w obiektywy Plan-Neofluar oraz filtry: DAPI (F-set 49), GFP (F-set 10), Rhodamine/Texas Red (F-set 20). Jednorazowo oceniano nie mniej niż 2000 komórek. Były to zarówno komórki wykazujące fluorescencję w świetle UV, jak i wszystkie komórki widzialne w danym polu. Ich wzajemny stosunek pozwolił na oszacowanie odsetka komórek apoptotycznych i nekrotycznych. Do wykonania zdjęć oraz pomiarów wykorzystano oprogramowanie ZEN – Imaging Software (Carl Zeiss AG, Niemcy).

3.2.20. Indukcja programowanej śmierci w komórkach linii HeLa oraz Ishikawa

Aby ocenić wpływ nadekspresji hCGβ w komórkach HeLa i Ishikawa na ich odporność na apoptozę, w komórkach uprzednio poddanych transfekcji indukowano proces apoptozy poprzez ich ekspozycję na związek PK 11195 (1-(2-chlorofenilo)-N-Metylo-N-(1-metylpropyl)-3-izochinolinokarboksamid; Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone). Za cechę charakterystyczną tego związku uznaje się jego zdolność do selektywnego wiązania z obwodowym receptorem benzodiazepinowym, opisywanym w nomenklaturze jako białko translokatora 18kDa (TSPO, ang. *translocator protein*). Specyficzne ligandy (w tym PK 11195) obwodowego receptora benzodiazepinowego (PBR) indukują apoptozę w komórkach nowotworowych, która związana jest z mitochondrialnym szlakiem śmierci komórki⁸⁹.

W pierwszym etapie eksperymentów dokonano selekcji stężeń związku PK 11195. Zgodnie z danymi literaturowymi, początkowo testowane stężenia mieściły się w zakresie

10 – 100 μM . Do eksperymentów z wykorzystaniem komórek transfekowanych konstrukcjami CGB, ze względu na najwyższy (około 50%) odsetek apoptozy, przy jednoczesnym niskim (około 5%) odsetku komórek nekrotycznych, zastosowano stężenie 100 μM .

Związek w stężeniu wynoszącym 100 μM aplikowano do medium hodowlanego w 48 godzinie od przeprowadzonej reakcji transfekcji. Po upływie 24 godzin w komórkach transfekowanych jak i kontrolnych niepoddanych transfekcji oceniano zmiany morfologiczne charakteryzujące proces apoptozy. W tym celu komórki barwiono stosując mieszaninę barwników fluorescencyjnych – bisbenzimid (Hoechst 33342) oraz jodek propidyny zgodnie z protokołem opisanym w podrozdziale 3.2.19.

3.2.21. Analizy statystyczne

Analizy statystyczne otrzymanych w pracy wyników wykonano w programie Statistica wersja 13.3 (StatSoft, Dell Inc). Zgodność rozkładu zmiennych ilościowych z rozkładem parametrycznym sprawdzano testem W Shapiro-Wilka. W przypadku zgodności z rozkładem parametrycznym, różnice pomiędzy dwiema grupami analizowane były testem t-Studenta oraz testem z niezależną estymacją wariancji. W analizie większej liczby grup zastosowano testy ANOVA i F-Welcha z testami *post hoc* Tuckeya oraz Dunnetta. W porównaniach wielokrotnych stosowano klasyczną poprawkę Bonferroniego. W przypadku braku zgodności z rozkładem parametrycznym, dla dwóch grup stosowano test U-Manna-Whitney'a, natomiast dla większej liczby grup test Kruskala-Wallisa z testem *post hoc* Dunna (test wielokrotnych porównań średnich rang). Dystrybuenta i funkcja gęstości rozkładu zmiennej losowej ciągłej została użyta dla określenia różnic między grupami w przypadku analizy danych pochodzących z cytometru przepływowego.

Podczas opisu wyników dla testów nieparametrycznych stosowano medianę (Me), natomiast dla testów parametrycznych średnią (M) $\pm$ odchylenie standardowe (S). Za poziom istotności statystycznej przyjęto $\alpha = 5\%$. W pracy zastosowano oznaczenia: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

4. Wyniki

W celu wykazania aktywności genów *CGB1* i *CGB2* w rakach szyjki macicy i endometrium przeprowadzono analizę *in silico* poziomu transkryptów tych genów wykorzystując wyniki zdeponowane w bazach TCGA.

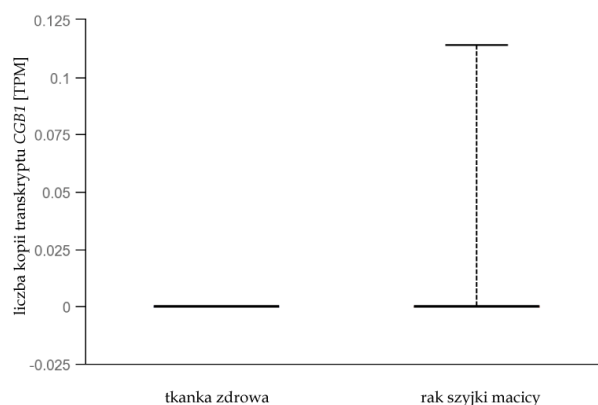
Oceny wpływu wybranych wariantów genów kodujących podjednostkę beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej: *CGB1* i *CGB2* na komórki nowotworowe dokonano w doświadczalnym modelu *in vitro*, wykorzystując linie komórkowe raka gruczołowego endometrium (Ishikawa) oraz raka szyjki macicy (HeLa). Ponieważ poziom ekspresji poszczególnych genów *CGB*, opisanych dotychczas w literaturze przedmiotu, nie jest jednakowy, jako kontrolę, ze względu na najsilniejszą aktywność transkrypcyjną, do badań włączono gen *CGB5*^{9,90}. Wszystkie prezentowane w pracy wyniki stanowią wartości pochodzące z minimum trzech niezależnych eksperymentów.

4.1. Ocena poziomów transkryptów genów *CGB1*, *CGB2* i *CGB5* w rakach szyjki macicy i endometrium na podstawie wyników zdeponowanych w bazach TCGA

W celu oceny poziomów transkryptów genów *CGB1*, *CGB2*, *CGB5* w tkankach raka szyjki macicy i raka endometrium, a także w tkankach szyjki macicy i endometrium niezmiennych nowotworowo posłużono się danymi zgromadzonymi w bazie TCGA – UALCAN⁸⁸. Różnice w wartościach TPM (ang. *transcripts per milion*), uzyskanych przez normalizację, wyrażoną jako odsetek ilości cząstek analizowanego genu/transkryptu na każde milion cząsteczek RNA w próbce pomiędzy tkankami zmienionymi nowotworowo oraz niezmiennymi nowotworowo były analizowane z wykorzystaniem testu t-Studenta z niezależną estymacją wariancji. W opisie wyników posłużono się wartością mediany.

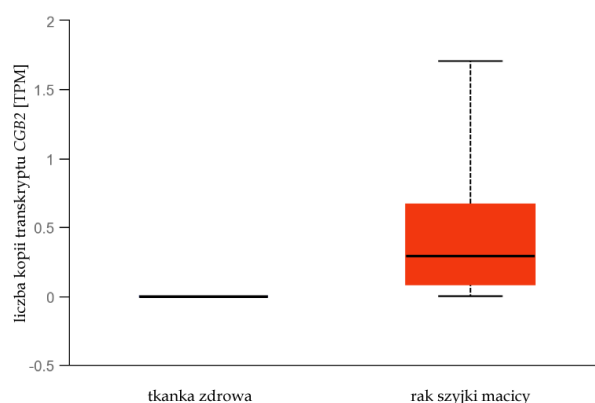
4.1.1. Ocena poziomów transkryptów genów *CGB1*, *CGB2* oraz *CGB5* w tkankach raka szyjki macicy oraz w tkankach szyjki macicy niezmiennych nowotworowo

Przeprowadzone analizy wykazały brak obecności transkryptów *CGB1* w tkankach szyjki macicy niezmiennych nowotworowo; wartość TPM w tkankach zmienionych nowotworowo oraz niezmiennych nowotworowo nie różniła się istotnie między analizowanymi grupami ($Me = 0$); (Rycina 4.).



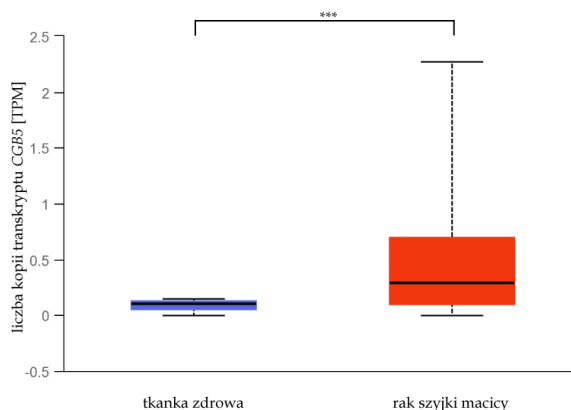
Rycina 4. Poziom ekspresji genu *CGB1* wyrażony w liczbie transkryptów na milion [TPM] w tkankach raka szyjki macicy oraz w tkankach szyjki macicy niezmienionych nowotworowo. Liniami przerywanymi oznaczono zakres pomiędzy największą i najmniejszą wartością badanej zmiennej.

Analizy ekspresji genu *CGB2* wykazały obecność jego transkryptów w tkankach raka szyjki macicy ($Me = 0,295$). Jednocześnie aktywności genu nie odnotowano w tkankach niezmienionych nowotworowo ($Me = 0$). Nie wykazano jednak istotnej różnicy między badanymi grupami (Rycina 5.).



Rycina 5. Poziom ekspresji genu *CGB2* wyrażony w liczbie transkryptów na milion [TPM] w tkankach raka szyjki macicy oraz w tkankach szyjki macicy niezmienionych nowotworowo. Długość zacięniowanego prostokąta reprezentuje rozstęp międzykwartylowy, zaś linia umieszczona wewnątrz wyznacza wartość mediany. Liniami przerywanymi oznaczono zakres pomiędzy największą i najmniejszą wartością badanej zmiennej.

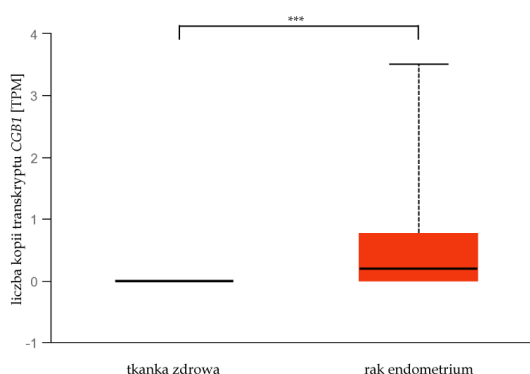
Dalsze analizy ujawniły, że zarówno tkanki raka szyjki macicy jak i tkanki szyjki macicy niezmienione nowotworowo cechuje obecność transkryptów *CGB5*. Jednak w przypadku tkanek patologicznie zmienionych liczba kopii transkryptu *CGB5* była istotnie statystycznie wyższa od tej odnotowanej dla tkanek niezmienionych nowotworowo ($Me = 0,288$ vs $Me = 0,107$; $p < 0,0001$); (Rycina 6.).



Rycina 6. Poziom ekspresji genu *CGB5* wyrażony w liczbie transkryptów na milion [TPM] w tkankach raka szyjki macicy oraz w tkankach szyjki macicy niezmiennych nowotworowo. Długość zacieniowanego prostokąta reprezentuje rozstęp międzykwartylowy, zaś linia umieszczona wewnątrz wyznacza wartość mediany. Liniami przerywanymi oznaczono zakres pomiędzy największą i najmniejszą wartością badanej zmiennej. Oznaczenie istotności różnic: *** $p < 0,001$.

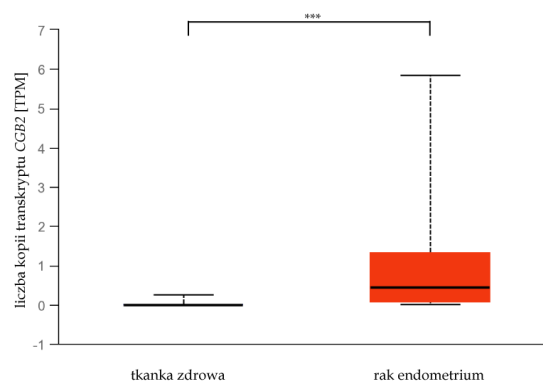
4.1.2. Ocena poziomów transkryptów genów *CGB1*, *CGB2* oraz *CGB5* w tkankach raka endometrium oraz w tkankach endometrium niezmiennych nowotworowo

W przypadku analizy genu *CGB1* obecność jego transkryptu stwierdzono w tkankach raka endometrium (Me = 0,19). Z kolei tkanki endometrium niezmiennych nowotworowo charakteryzowały się brakiem obecności mRNA *CGB1* (Me = 0). Analizowane grupy tkanek różniły się istotnie pod względem wartości TPM dla tego genu ($p < 0,0001$); (Rycina 7.).



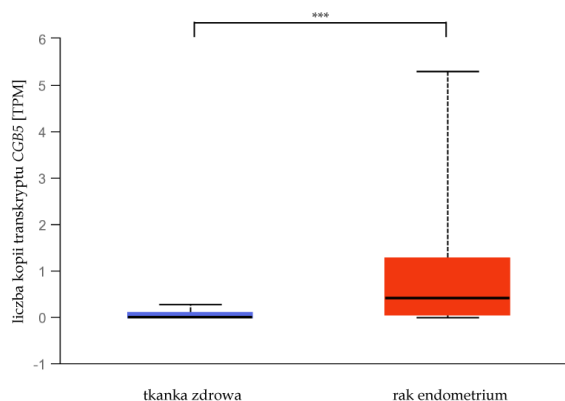
Rycina 7. Poziom ekspresji genu *CGB1* wyrażony w liczbie transkryptów na milion [TPM] w tkankach raka endometrium oraz w tkankach endometrium niezmiennych nowotworowo. Długość zacieniowanego prostokąta reprezentuje rozstęp międzykwartylowy, zaś linia umieszczona wewnątrz wyznacza wartość mediany. Liniami przerywanymi oznaczono zakres pomiędzy największą i najmniejszą wartością badanej zmiennej. Oznaczenie istotności różnic: *** $p < 0,001$.

Z kolei analizy liczby kopii transkryptów genu *CGB2* dowiodły, że jego poziomu ekspresji jest wyższy w tkankach raka endometrium (Me = 0,447) niż w tkankach zdrowych (Me = 0). Wartości TPM różniły się istotnie między omawianymi grupami tkanek ($p < 0,0001$); (Rycina 8.).



Rycina 8. Poziom ekspresji genu *CGB2* wyrażony w liczbie transkryptów na milion [TPM] w tkankach raka endometrium oraz w tkankach endometrium niezmiennych nowotworowo. Długość zacieniowanego prostokąta reprezentuje rozstęp międzykwartylowy, zaś linia umieszczona wewnątrz wyznacza wartość mediany. Liniami przerywanymi oznaczono zakres pomiędzy największą i najmniejszą wartością badanej zmiennej. Oznaczenie istotności różnic: *** $p < 0,001$.

Dalsze analizy *in silico* wykazały, iż podobnie jak w przypadku *CGB1* i *CGB2* liczba kopii transkryptu *CGB5* była wyższa w tkance nowotworowej ($Me = 0,416$) niż w tkance zdrowego endometrium ($Me = 0$). Wartości mediany liczby kopii transkryptów *CGB5* różniła się istotnie między omawianymi grupami tkanek ($p < 0,0001$); (Rycina 9.).



Rycina 9. Poziom ekspresji genu *CGB5* wyrażony w liczbie transkryptów na milion [TPM] w tkankach raka endometrium oraz w tkankach endometrium niezmiennych nowotworowo. Długość zacieniowanego prostokąta reprezentuje rozstęp międzykwartylowy, zaś linia umieszczona wewnątrz wyznacza wartość mediany. Liniami przerywanymi oznaczono zakres pomiędzy największą i najmniejszą wartością badanej zmiennej. Oznaczenie istotności różnic: *** $p < 0,001$.

4.2. Ocena poziomu transkryptów oraz białka hCG β w liniach komórkowych HeLa i Ishikawa transfekowanych konstruktami kodującymi podjednostkę beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej

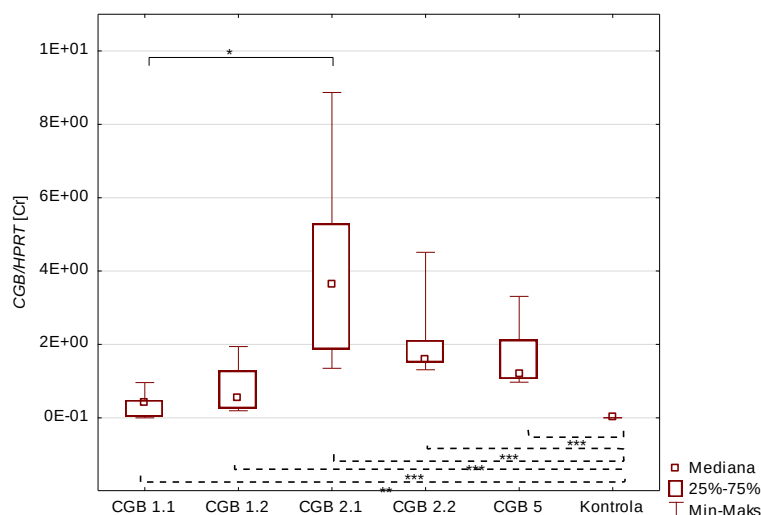
W celu określenia poziomu transkryptów i białka genów *CGB*, w ustalonych liniach komórkowych transfekowanych poszczególnymi konstruktami kodującymi hCG β posłużono się odpowiednio reakcją qPCR i techniką western blot.

W przypadku analizy poziomu ekspresji genów kodujących podjednostkę beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej startery i sonda zostały zaprojektowane tak aby umożliwić amplifikację wszystkich genów *CGB*.

Względny poziom ekspresji genów kodujących *CGB* oceniano po 72 godzinach od momentu transfekcji komórek. Poziom ekspresji *CGB* w komórkach transfekowanych określonymi konstruktami odnoszono do poziomu *CGB* w nietransfekowanych komórkach kontrolnych.

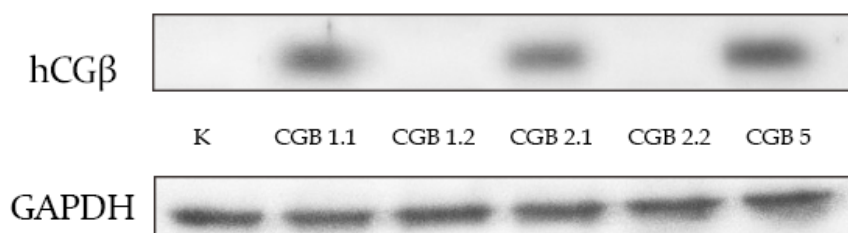
Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że transfekcja linii komórkowej HeLa wszystkimi przygotowanymi konstruktami, tj. *CGB* 1.1 i *CGB* 1.2., *CGB* 2.1 i *CGB* 2.2 oraz *CGB* 5 skutkowała nadekspresją hCG β na poziomie mRNA.

Na podstawie wyników testu Kruskala-Wallisa stwierdzono występowanie istotnych różnic w poziomie ekspresji pomiędzy analizowanymi konstruktami ($p < 0,0001$). Najwyższy poziom ekspresji *CGB* (najwyższa wartość C_r) zaobserwowano w przypadku transfekcji komórek HeLa konstruktami *CGB* 2.1 ($M = 3,625$). Najniższy poziom nadekspresji genów *CGB* na poziomie mRNA uzyskano dla konstruktu *CGB* 1.1 ($M = 0,395$), jednak poziom *CGB* w transfektantach w przypadku użycia tego konstruktu był istotnie wyższy niż w próbach kontrolnych ($p = 0,0013$). Również w przypadku pozostałych konstrukcji wykazano znacznie wyższy poziom ekspresji *CGB* w porównaniu z kontrolą ($p < 0,0001$). Występowanie różnic w ekspresji pomiędzy poszczególnymi konstruktami określono za pomocą testu *post hoc* Dunna. Na tej podstawie stwierdzono istotne różnice we względnym poziomie ekspresji w przypadku zastosowania konstrukcji *CGB* 1.1 vs *CGB* 2.1 ($Me = 0,395$ vs $Me = 3,625$; $p = 0,026$); (Rycina 10.).

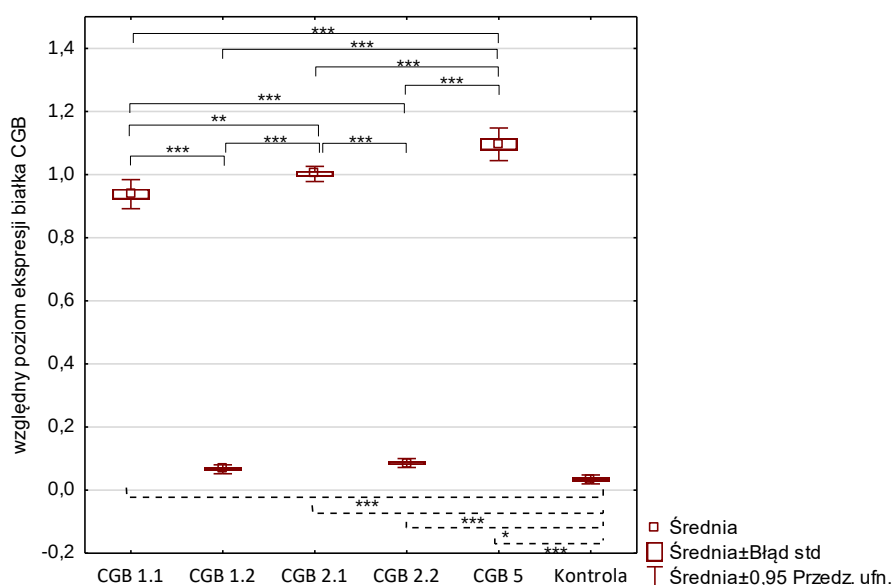


Rycina 10. Względny poziom ekspresji genów *CGB*, przyrównany do poziomu ekspresji genu referencyjnego *HPRT* oraz znormalizowany względem krzywych wzorcowych, w komórkach linii HeLa transfekowanych konstrukcjami CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5. Kontrolę stanowiły komórki niepoddane transfekcji. Linie ciągłe nad wykresami ramka-wąsy wskazują na różnice w poziomie ekspresji *CGB* pomiędzy konstrukcjami użytymi podczas transfekcji. Linie przerywane pod wykresami ramka-wąsy wskazują różnice pomiędzy konstrukcjami a kontrolą. Użyte oznaczenia istotności różnic: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Nadekspresję hCG β w transfekowanych komórkach HeLa potwierdziła także analiza ilości białka metodą western blot wraz z oceną densytometryczną. Zastosowany test jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA dla wyników pomiarów densytometrycznych poziomów białek, normalizowanych względem poziomów ekspresji referencyjnego białka GAPDH, wskazał na występowanie różnic pomiędzy poszczególnymi konstrukcjami, w porównaniu do komórek kontrolnych ($M = 0,034 \pm 0,011$). Najwyższy poziom hCG β cechował komórki transfekowane konstruktem CGB 5 ($M = 1,096 \pm 0,041$; $p < 0,0001$). Podobnie wysokie wyniki pomiarów uzyskano analizując próby poddane transfekcji konstrukcjami CGB 1.1 ($M = 0,938 \pm 0,037$; $p < 0,0001$) oraz CGB 2.1 ($M = 1,002 \pm 0,019$; $p < 0,0001$). Zdecydowanie niższe wartości otrzymano w przypadku transfekcji komórek linii HeLa konstruktem CGB 2.2 ($M = 0,086 \pm 0,011$; $p = 0,014$). Jedynie w przypadku zastosowania konstruktu CGB 1.2 różnice względem komórek nietransfekowanych nie różniły się istotnie ($M = 0,066 \pm 0,011$; $p = 0,2$); (Rycina 11. i 12.).



Rycina 11. Reprezentatywny wynik detekcji białek hCG β oraz GAPDH uzyskany metodą western blot z izolatów linii komórkowej HeLa siedemdziesiąt dwie godziny od momentu transfekcji. CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 - izolaty komórkowe z komórek poddanych transfekcji z użyciem wybranego konstruktu. K - komórki kontrolne, nietransfekowane.



Rycina 12. Względny poziom ekspresji białka hCG β oznaczony densytometrycznie w izolatach komórkowych linii HeLa, znormalizowany wobec białka referencyjnego GAPDH. CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 - izolaty komórkowe z komórek poddawanych transfekcji z użyciem wybranego konstruktu. Kontrolę stanowiły komórki nietransfekowane. Linie ciągłe nad wykresami ramkowały wskazują na różnice w poziomie białka hCG β pomiędzy konstrukcjami użytymi podczas transfekcji. Linie przerywane pod wykresami ramkowały wskazują różnice pomiędzy konstrukcjami a kontrolą. Użyte oznaczenia istotności różnic: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Poziomy ekspresji hCG β w komórkach transfekowanych analizowanymi konstrukcjami dodatkowo porównano stosując test *post hoc* Tukeya. Wyniki tych analiz wykazały, iż zastosowanie konstruktyw CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2 oraz CGB 5 wpływa istotnie na poziom białka hCG β (Tabela 13.).

Tabela 13. Wyniki analiz statystycznych względnych poziomów ekspresji białka hCG β oznaczonych w izolatach komórkowych linii HeLa, znormalizowanych wobec białka referencyjnego GAPDH. CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 – izolaty białkowe z komórek poddawanych transfekcji z użyciem wybranego konstruktu

konstrukty				M, S		p
CGB 1.1	<i>vs</i>	CGB 1.2	0,938 $\pm$ 0,037	<i>vs</i>	0,066 $\pm$ 0,011	0,0001
CGB 1.1	<i>vs</i>	CGB 2.1	0,938 $\pm$ 0,037	<i>vs</i>	1,002 $\pm$ 0,019	0,006
CGB 1.1	<i>vs</i>	CGB 2.2	0,938 $\pm$ 0,037	<i>vs</i>	0,086 $\pm$ 0,011	0,0001
CGB 1.1	<i>vs</i>	CGB 5	0,938 $\pm$ 0,037	<i>vs</i>	1,096 $\pm$ 0,041	0,0001
CGB 1.2	<i>vs</i>	CGB 2.1	0,066 $\pm$ 0,011	<i>vs</i>	1,002 $\pm$ 0,019	0,0001
CGB 1.2	<i>vs</i>	CGB 2.2	0,066 $\pm$ 0,011	<i>vs</i>	0,086 $\pm$ 0,011	0,8
CGB 1.2	<i>vs</i>	CGB 5	0,066 $\pm$ 0,011	<i>vs</i>	1,096 $\pm$ 0,041	0,0001
CGB 2.1	<i>vs</i>	CGB 2.2	1,002 $\pm$ 0,019	<i>vs</i>	0,086 $\pm$ 0,011	0,0001
CGB 2.1	<i>vs</i>	CGB 5	1,002 $\pm$ 0,019	<i>vs</i>	1,096 $\pm$ 0,041	0,0001
CGB 2.2	<i>vs</i>	CGB 5	0,086 $\pm$ 0,011	<i>vs</i>	1,096 $\pm$ 0,041	0,0001

Legenda:

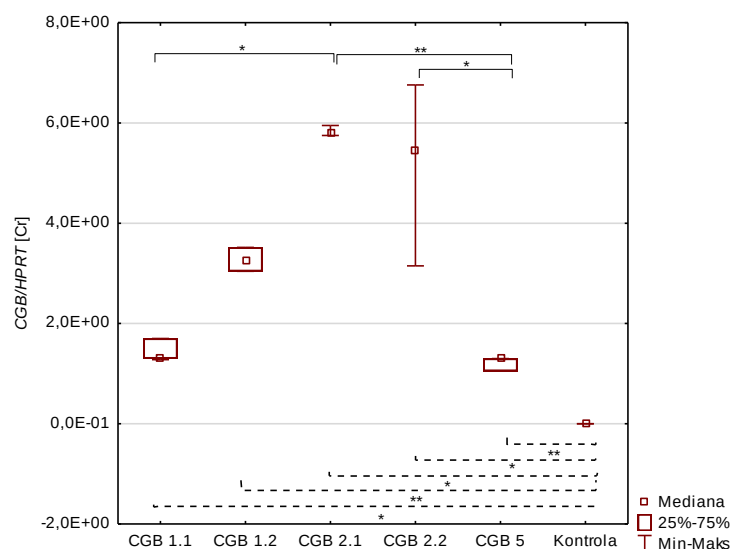
M – średnia arytmetyczna;

S – odchylenie standardowe;

p – poziom istotności statystycznej.

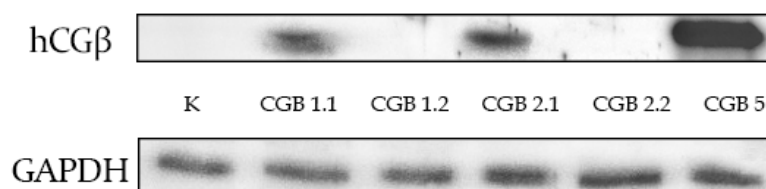
Wyniki przeprowadzonych analiz wykazały, że także transfekcja linii komórkowej Ishikawa z użyciem przygotowanych konstruktów CGB pozwala na osiągnięcie wydajnej nadekspresji hCG β na poziomie mRNA.

Wykorzystanie testu Kruskala-Wallisa pozwoliło na stwierdzenie, iż względne poziomy ekspresji genów kodujących hCG β , analizowane siedemdziesiąt dwie godziny po transfekcji, wykazywały istotne różnice pomiędzy wszystkimi analizowanymi konstruktami ($p < 0,0001$). Najwyższy poziom ekspresji CGB (najwyższa wartość Cr) zaobserwowano w przypadku transfekcji komórek konstruktem CGB 2.1 ($Me = 5,82$). Dodatkowo za pomocą testu *post hoc* Dunna przeprowadzono analizę mającą na celu określenie występowania różnic pomiędzy badanymi konstruktami. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono obecność istotnych różnic we względnym poziomie ekspresji w komórkach transfekowanych poszczególnymi konstruktami: CGB 1.1 *vs* CGB 2.1 ($Me = 1,3$ *vs* $Me = 5,82$; $p = 0,04$), CGB 2.1 *vs* CGB 5 ($Me = 5,82$ *vs* $Me = 1,3$; $p = 0,003$), CGB 2.2 *vs* CGB 5 ($Me = 5,46$ *vs* $Me = 1,3$; $p = 0,03$); (Rycina 13.).

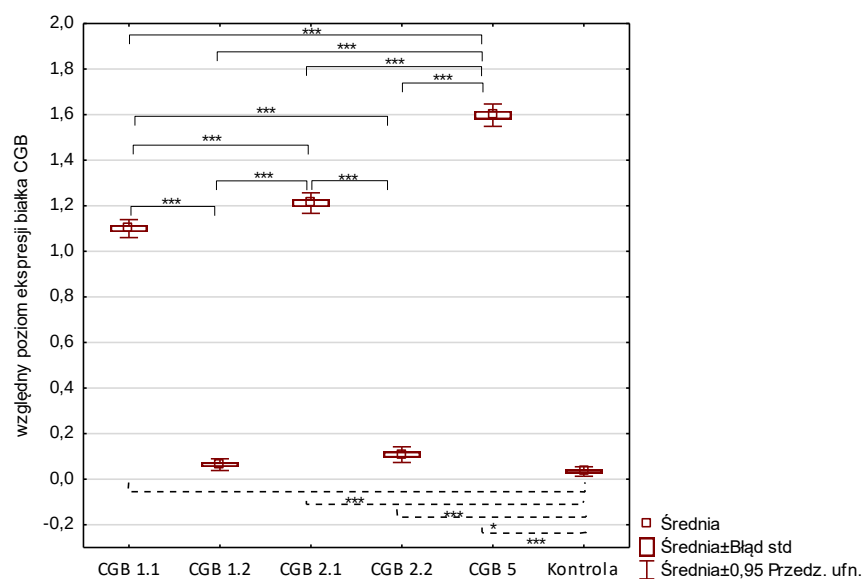


Rycina 13. Relatywny poziom ekspresji genów *CGB* przyrównany do poziomu ekspresji genu referencyjnego *HPRT* w komórkach linii Ishikawa transfekowanych konstrukcjami CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5. Kontrolę stanowiły komórki niepoddane transfekcji. Linie ciągłe nad wykresami ramka-wąsy wskazują na różnice w poziomie ekspresji *CGB* pomiędzy konstrukcjami użytymi podczas transfekcji. Linie przerywane pod wykresami ramka-wąsy wskazują różnice pomiędzy konstrukcjami a kontrolą. Użyte oznaczenia istotności różnic: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Nadekspresję hCG β w transfekowanych komórkach linii Ishikawa potwierdziła również analiza ilości białka metodą western blot. Jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA wraz z zastosowanym testem *post hoc* Dunnetta dla pomiarów densytometrycznych poziomów białek normalizowanych względem poziomów ekspresji referencyjnego białka GAPDH wskazały, że w porównaniu do wyników odnotowanych dla komórek kontrolnych ($M = 0,034 \pm 0,016$), istotnie wyższe poziomy hCG β w komórkach zaobserwowano w przypadku ich transfekcji konstrukcjami: CGB 5 ($M = 1,598 \pm 0,039$; $p < 0,0001$), CGB 2.1 ($M = 1,212 \pm 0,036$; $p < 0,0001$) oraz CGB 1.1 ($M = 1,1 \pm 0,031$; $p < 0,0001$). Niższe wyniki pomiarów otrzymano w przypadku transfekcji komórek linii Ishikawa konstrukcjami CGB 2.2 ($M = 0,108 \pm 0,027$; $p = 0,02$), oraz CGB 1.2 ($M = 0,064 \pm 0,02$; $p = 0,38$); (Rycina 14. i 15.).



Rycina 14. Reprezentatywny wynik detekcji białek hCG β oraz GAPDH w izolatach białkowych z linii komórkowej Ishikawa siedemdziesiąt dwie godziny po transfekcji, uzyskany metodą western blot. CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 – izolaty białkowe z komórek poddawanych transfekcji z użyciem wybranego konstruktu. K – komórki kontrolne, nietransfekowane.



Rycina 15. Względny poziom ekspresji białka hCG β oznaczony w izolatach komórkowych linii Ishikawa znormalizowany wobec białka referencyjnego GAPDH. CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 – izolaty białkowe z komórek poddawanych transfekcji z użyciem wybranego konstruktów. Kontrolę stanowiły komórki nietransfekowane. Linie ciągłe nad wykresami ramka-wąsy wskazują na różnice w poziomie białka hCG β pomiędzy konstrukcjami użytymi podczas transfekcji. Linie przerywane pod wykresami ramka-wąsy wskazują różnice pomiędzy konstrukcjami a kontrolą. Użyte oznaczenia istotności różnic: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Dodatkowo, wykorzystując test *post hoc* Tukeya dokonano porównania poziomu ekspresji białka hCG β w komórkach transfekowanych poszczególnymi konstrukcjami. Wykazano, iż zastosowanie konstrukcji CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2 wpływało istotnie na poziom białka hCG β (Tabela 14.).

Tabela 14. Wyniki analiz statystycznych względnych poziomów ekspresji białka hCG β oznaczonych w izolatach komórkowych linii Ishikawa znormalizowanych wobec białka referencyjnego GAPDH. CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 – izolaty białkowe z komórek poddawanych transfekcji z użyciem wybranego konstruktu

konstrukty				M, S		p
CGB 1.1	<i>vs</i>	CGB 1.2	1,1 $\pm$ 0,031	<i>vs</i>	0,064 $\pm$ 0,02	<0,0001
CGB 1.1	<i>vs</i>	CGB 2.1	1,1 $\pm$ 0,031	<i>vs</i>	1,212 $\pm$ 0,036	<0,0001
CGB 1.1	<i>vs</i>	CGB 2.2	1,1 $\pm$ 0,031	<i>vs</i>	0,108 $\pm$ 0,027	<0,0001
CGB 1.1	<i>vs</i>	CGB 5	1,1 $\pm$ 0,031	<i>vs</i>	1,598 $\pm$ 0,039	<0,0001
CGB 1.2	<i>vs</i>	CGB 2.1	0,064 $\pm$ 0,02	<i>vs</i>	1,212 $\pm$ 0,036	<0,0001
CGB 1.2	<i>vs</i>	CGB 2.2	0,064 $\pm$ 0,02	<i>vs</i>	0,108 $\pm$ 0,027	0,2
CGB 1.2	<i>vs</i>	CGB 5	0,064 $\pm$ 0,02	<i>vs</i>	1,598 $\pm$ 0,039	<0,0001
CGB 2.1	<i>vs</i>	CGB 2.2	1,212 $\pm$ 0,036	<i>vs</i>	0,108 $\pm$ 0,027	<0,0001
CGB 2.1	<i>vs</i>	CGB 5	1,212 $\pm$ 0,036	<i>vs</i>	1,598 $\pm$ 0,039	<0,0001
CGB 2.2	<i>vs</i>	CGB 5	0,108 $\pm$ 0,027	<i>vs</i>	1,598 $\pm$ 0,039	<0,0001

Legenda:

M – średnia arytmetyczna;

S – odchylenie standardowe;

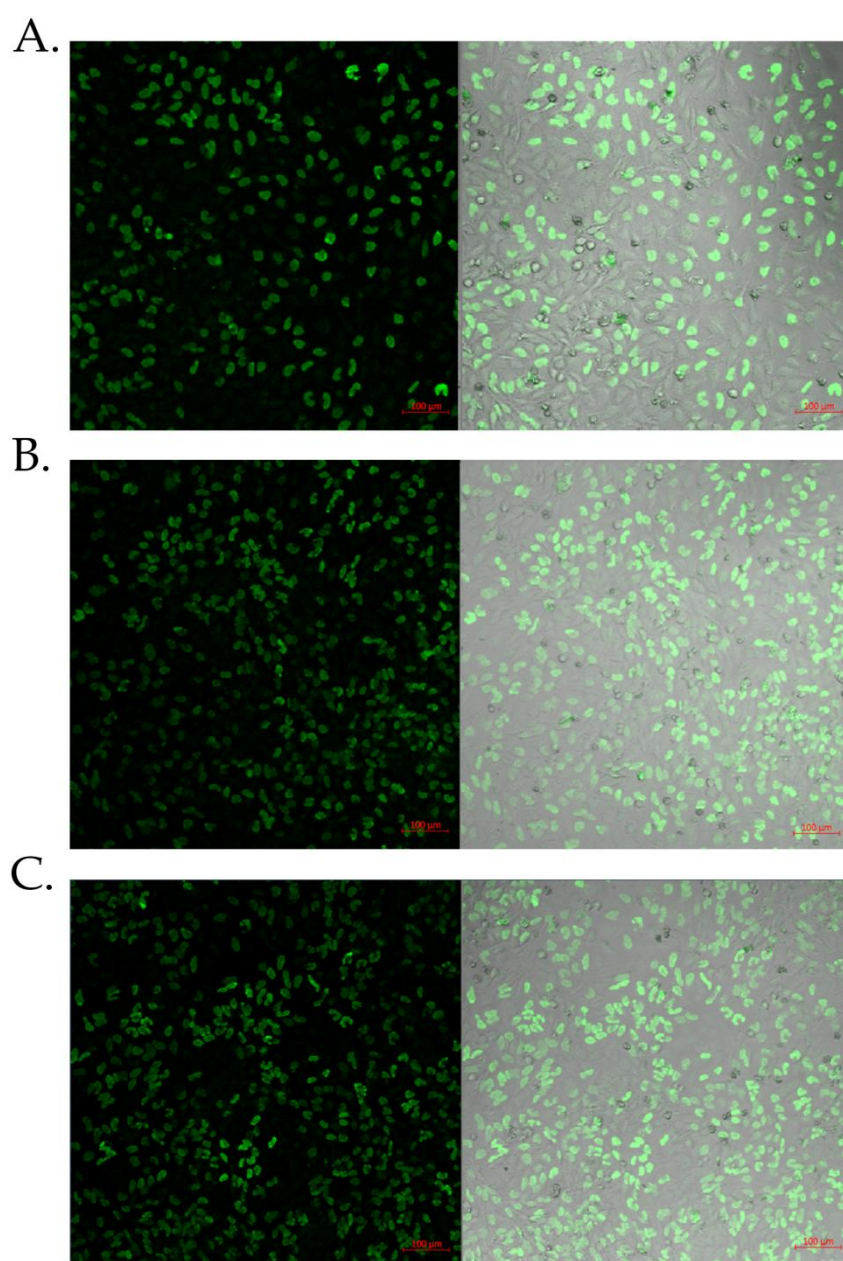
p – poziom istotności statystycznej.

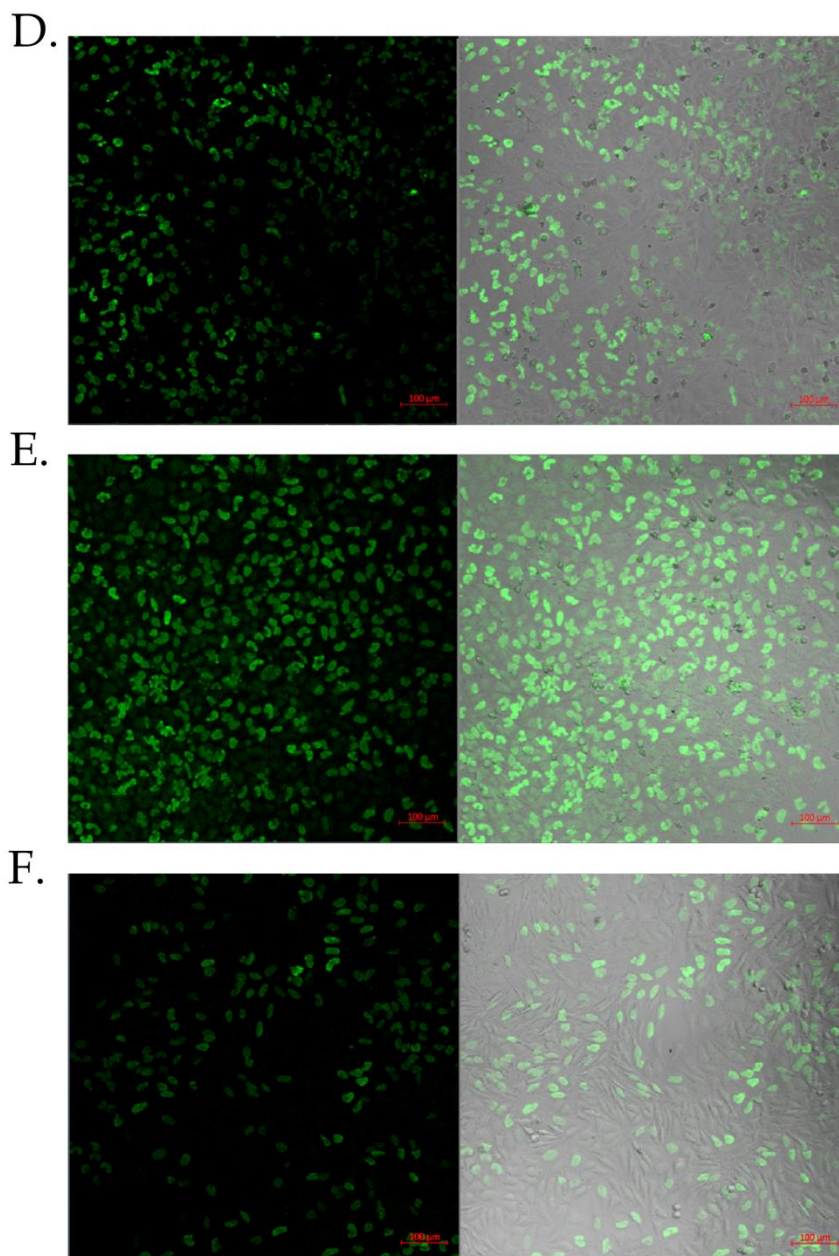
4.3. Ocena wpływu nadekspresji podjednostki beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej na biologię komórek linii HeLa oraz Ishikawa

Wpływ nadekspresji podjednostki beta gonadotropiny kosmówkowej na biologię komórek nowotworowych badanych linii oceniano poprzez: (i) analizę proliferacji metodą inkorporacji BrdU, (ii) analizę tempa wzrostu komórek przy użyciu systemu xCELLigence, (iii) ocenę cyklu komórkowego z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, (iv) obserwację mikroskopową cech morfologicznych typowych dla apoptozy i nekrozy, takich jak odpowiednio: kondensacja i fragmentacja chromatyny czy przerwanie ciągłości błony komórkowej, a także (v) ocenę ekspresji genów: *BIRC5*, *BCL2* i *BAX* kodujące białka regulujące proces apoptozy, odpowiednio surwiwiny, BCL-2 i BAX oraz (vi) analizę hamowania indukcji procesu apoptozy w komórkach transfekowanych konstruktami CGB i poddanych działaniu związku PK 11195 wywołującego apoptozę.

4.3.1. Ocena wpływu transfekcji konstruktami CGB1.1, CGB1.2, CGB2.1, CGB2.2 oraz CGB5 na proliferację komórek linii HeLa

Analiza komórek linii HeLa przeprowadzona metodą inkorporacji BrdU wykazała, że nadekspresja hCG β , będąca wynikiem transfekcji komórek przygotowanymi konstruktami, zwiększa odsetek komórek inkorporujących BrdU (Rycina 16.). Na podstawie wyników testu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA zaobserwowano, iż odsetek komórek proliferujących, analizowany siedemdziesiąt dwie godziny po transfekcji, wykazywał występowanie istotnych statystycznie różnic pomiędzy analizowanymi konstruktami ($p < 0,0001$). Najwyższe tempo proliferacji zaobserwowano w przypadku transfekcji komórek konstruktem CGB 5 ($M = 43,58 \pm 1,606$), w porównaniu do nietransfekowanych komórek kontrolnych ($M = 22,66 \pm 2,345$; $p = 0,0001$). Nieznacznie niższe wyniki otrzymano w przypadku transfekcji komórek konstruktami: CGB 2.1 ($M = 34,16 \pm 1,582$; $p = 0,0001$), CGB 1.2 ($M = 33,39 \pm 0,93$; $p = 0,0001$), CGB 2.2 ($M = 28,88 \pm 1,239$; $p = 0,0001$) oraz CGB 1.1 ($M = 29,6 \pm 1,176$; $p = 0,0001$); (Rycina 17.).





Rycina 16. Komórki linii HeLa aktywnie inkorporujące BrdU podczas replikacji DNA, uwidocznione podczas reakcji z przeciwciałem przeciwko BrdU, skoniugowanym z FITC. Komórki transfekowane konstruktami: CGB 1.1 (A.); CGB 1.2 (B.); CGB 2.1 (C.); CGB 2.2 (D.); CGB 5 (E.) oraz komórki kontrolne (F.), nietransfekowane. Panel lewy: zdjęcia prezentujące komórki uwidocznione w świetle UV; panel prawy: zdjęcia z panelu lewego nałożone na zdjęcia wykonane w świetle przechodzącym (VIS). Oryginalne powiększenie 200x.

Określono również występowanie różnic w proliferacji komórek transfekowanych poszczególnymi konstruktami CGB. Test *post hoc* Tukeya (Tabela 15.) wykazał istotne różnice w odsetku komórek inkorporujących BrdU do DNA w przypadku prawie wszystkich stosowanych konstruktów genowych. Jedynie pomiędzy CGB 1.1 i CGB 2.2 oraz CGB 1.2 i CGB 2.1 różnica nie była istotna statystycznie (Rycina 17.).

Tabela 15. Wyniki analiz statystycznych (test *post hoc* Tukeya) odsetka komórek inkorporujących BrdU dla linii HeLa. CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 – stosowane konstrukty CGB

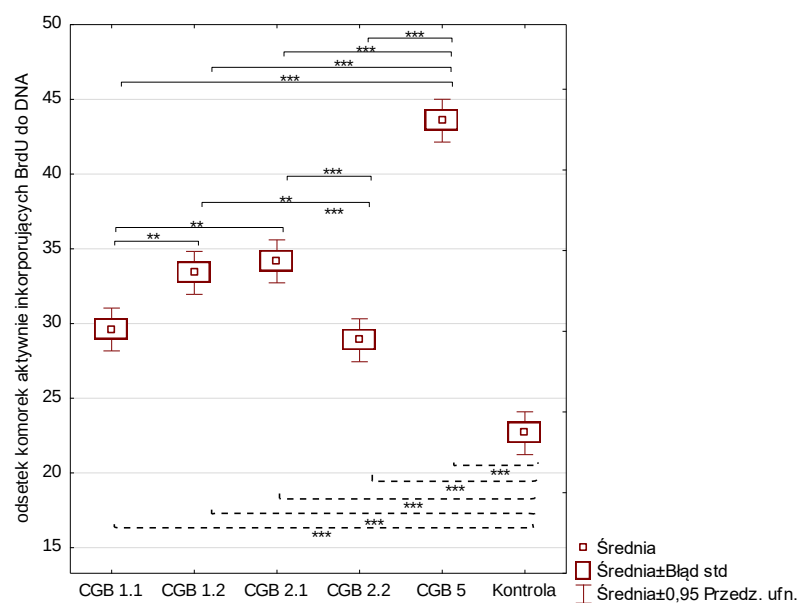
konstrukty			M, S		p	
CGB 1.1	<i>vs</i>	CGB 1.2	29,6 ± 1,176	<i>vs</i>	33,39 ± 0,93	0,0087
CGB 1.1	<i>vs</i>	CGB 2.1	29,6 ± 1,176	<i>vs</i>	34,16 ± 1,582	0,0015
CGB 1.1	<i>vs</i>	CGB 5	29,6 ± 1,176	<i>vs</i>	43,58 ± 1,606	0,0001
CGB 1.2	<i>vs</i>	CGB 2.2	33,39 ± 0,93	<i>vs</i>	28,88 ± 1,293	0,0017
CGB 1.2	<i>vs</i>	CGB 5	33,39 ± 0,93	<i>vs</i>	43,58 ± 1,606	0,0001
CGB 2.1	<i>vs</i>	CGB 2.2	34,16 ± 1,582	<i>vs</i>	28,88 ± 1,293	0,0004
CGB 2.1	<i>vs</i>	CGB 5	34,16 ± 1,582	<i>vs</i>	43,58 ± 1,606	0,0001
CGB 2.2	<i>vs</i>	CGB 5	28,88 ± 1,293	<i>vs</i>	43,58 ± 1,606	0,0001

Legenda:

M – średnia arytmetyczna;

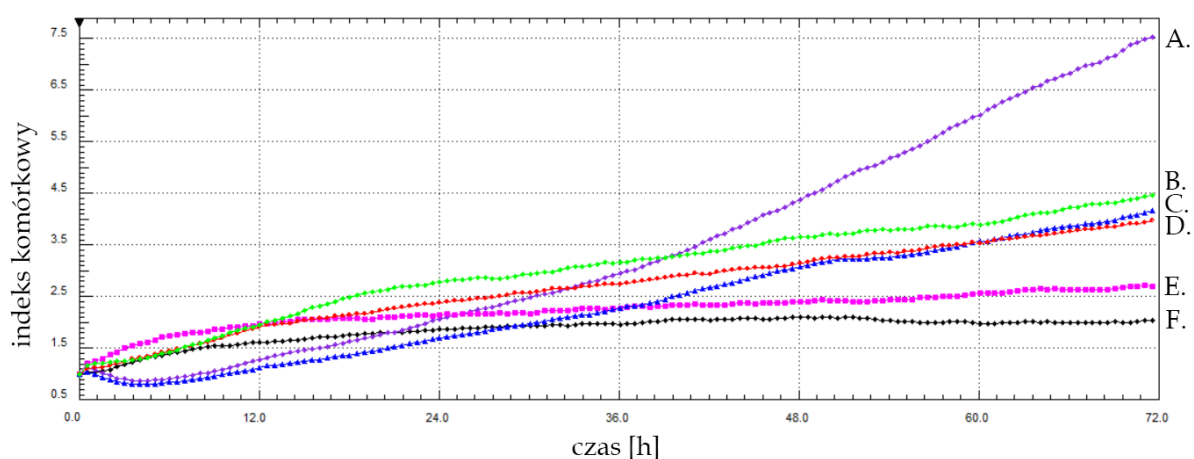
S – odchylenie standardowe;

p – poziom istotności statystycznej.



Rycina 17. Zmiany proliferacji komórek linii HeLa transfekowanych konstrukcjami CGB: CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 wykazane podczas analizy z wykorzystaniem bromodeoksyurydyny (BrdU). Kontrolę stanowiły komórki niepoddane transfekcji. Linie ciągłe nad wykresami ramkowały wskazują na różnice w tempie proliferacji komórek pomiędzy konstrukcjami użytymi podczas transfekcji. Linie przerywane pod wykresami ramkowały wskazują różnice pomiędzy konstrukcjami a kontrolą. Użyte oznaczenia istotności różnic: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

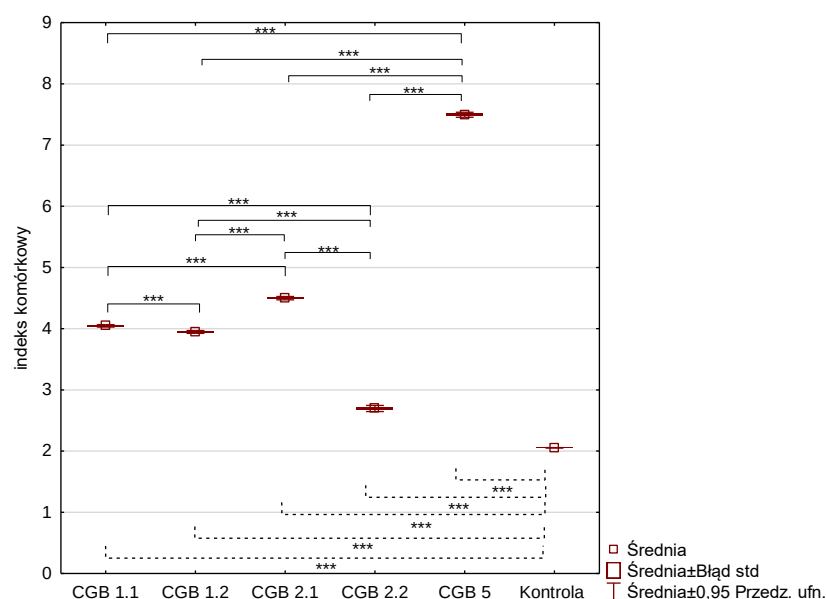
Zwiększone tempo proliferacji komórek linii HeLa transfekowanych badanymi konstruktami potwierdziła także analiza przeprowadzona z wykorzystaniem systemu xCELLigence® RTCA DP, pozwalającego na monitorowanie wzrostu komórek w czasie rzeczywistym. Pomiary prowadzone w sposób ciągły przez siedemdziesiąt dwie godziny wykazały, że komórki transfekowane charakteryzuje zwiększenie tempa wzrostu w porównaniu do komórek niepoddanych transfekcji (Rycina 18.).



Rycina 18. Reprezentatywny wykres zmian proliferacji komórek HeLa podczas siedemdziesięciodwugodzinnej obserwacji z wykorzystaniem systemu xCELLigence® RTCA DP. Komórki transfekowane konstruktami: CGB 5 (A.); CGB 2.1 (B.); CGB 1.1 (C.); CGB 1.2 (D.); CGB 2.2 (E.) oraz komórki kontrolne (F.).

Na podstawie wyników testu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA stwierdzono występowanie istotnych różnic w przyroście liczby komórek pomiędzy analizowanymi konstruktami ($p < 0,0001$). Zastosowany test *post hoc* Tukeya wykazał, iż najwyższy, w porównaniu do komórek kontrolnych, wzrost liczby komórek zaobserwowano dla prób transfekowanych konstruktem CGB 5 ($M = 7,495 \pm 0,038$). Także komórki transfekowane konstruktami CGB 1.1 ($M = 4,046 \pm 0,019$), CGB 1.2 ($M = 3,947 \pm 0,02$), CGB 2.1 ($M = 4,498 \pm 0,025$) oraz CGB 2.2 ($M = 2,695 \pm 0,048$) wyróżniało tempo proliferacji istotnie większe niż to cechujące komórki kontrolne ($M = 2,054 \pm 0,002$); (we wszystkich przypadkach $p < 0,0001$); (Rycina 19.).

Występowanie istotnych różnic pomiędzy stosowanymi konstruktami przedstawiono w tabeli szesnastej (Tabela 16.).



Rycina 19. Zmiany w proliferacji komórek HeLa obserwowane z wykorzystaniem systemu xCELLigence® RTCA DP, w siedemdziesiątej drugiej godzinie po transfekcji konstruktami CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5. Kontrolę stanowiły komórki niepoddane transfekcji. Linie ciągłe nad wykresami ramka-wąsy wskazują na różnice w tempie proliferacji komórek pomiędzy konstruktami użytymi podczas transfekcji. Linie przerywane pod wykresami ramka-wąsy wskazują różnice pomiędzy konstruktami a kontrolą. Użyte oznaczenia istotności różnic: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabela 16. Wyniki analiz statystycznych (test *post hoc* Tukeya) tempa proliferacji komórek HeLa w siedemdziesiątej drugiej godzinie po transfekcji. CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 – zastosowane konstrukty CGB

konstrukty				M, S		p
CGB 1.1	vs	CGB 1.2	$4,046 \pm 0,019$	vs	$3,947 \pm 0,021$	0,0001
CGB 1.1	vs	CGB 2.1	$4,046 \pm 0,019$	vs	$4,498 \pm 0,025$	0,0001
CGB 1.1	vs	CGB 2.2	$4,046 \pm 0,019$	vs	$2,695 \pm 0,048$	0,0001
CGB 1.1	vs	CGB 5	$4,046 \pm 0,019$	vs	$7,495 \pm 0,038$	0,0001
CGB 1.2	vs	CGB 2.1	$3,947 \pm 0,021$	vs	$4,498 \pm 0,025$	0,0001
CGB 1.2	vs	CGB 2.2	$3,947 \pm 0,021$	vs	$2,695 \pm 0,048$	0,0001
CGB 1.2	vs	CGB 5	$3,947 \pm 0,021$	vs	$7,495 \pm 0,038$	0,0001
CGB 2.1	vs	CGB 2.2	$4,498 \pm 0,025$	vs	$2,695 \pm 0,048$	0,0001
CGB 2.1	vs	CGB 5	$4,498 \pm 0,025$	vs	$7,495 \pm 0,038$	0,0001
CGB 2.2	vs	CGB 5	$2,695 \pm 0,048$	vs	$7,495 \pm 0,038$	0,0001

Legenda:

M – średnia arytmetyczna;

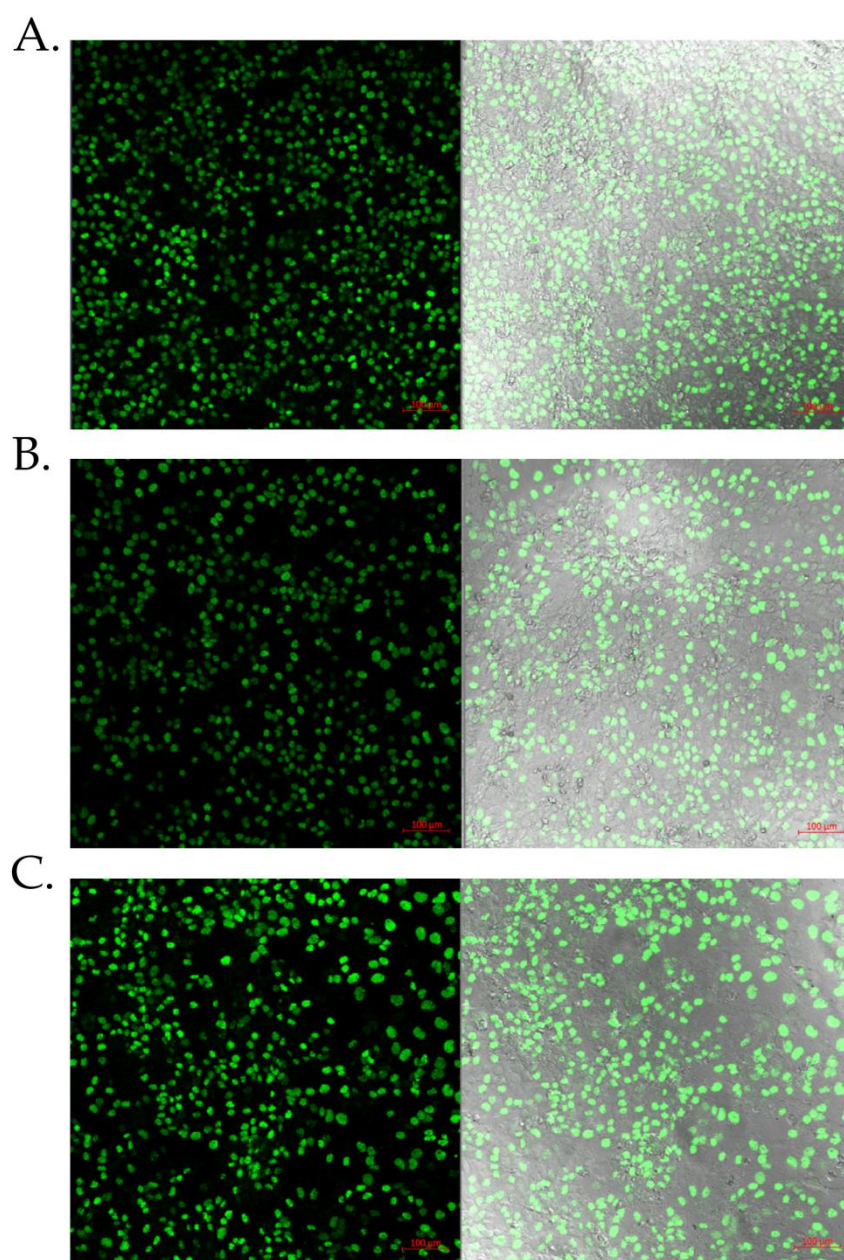
S – odchylenie standardowe;

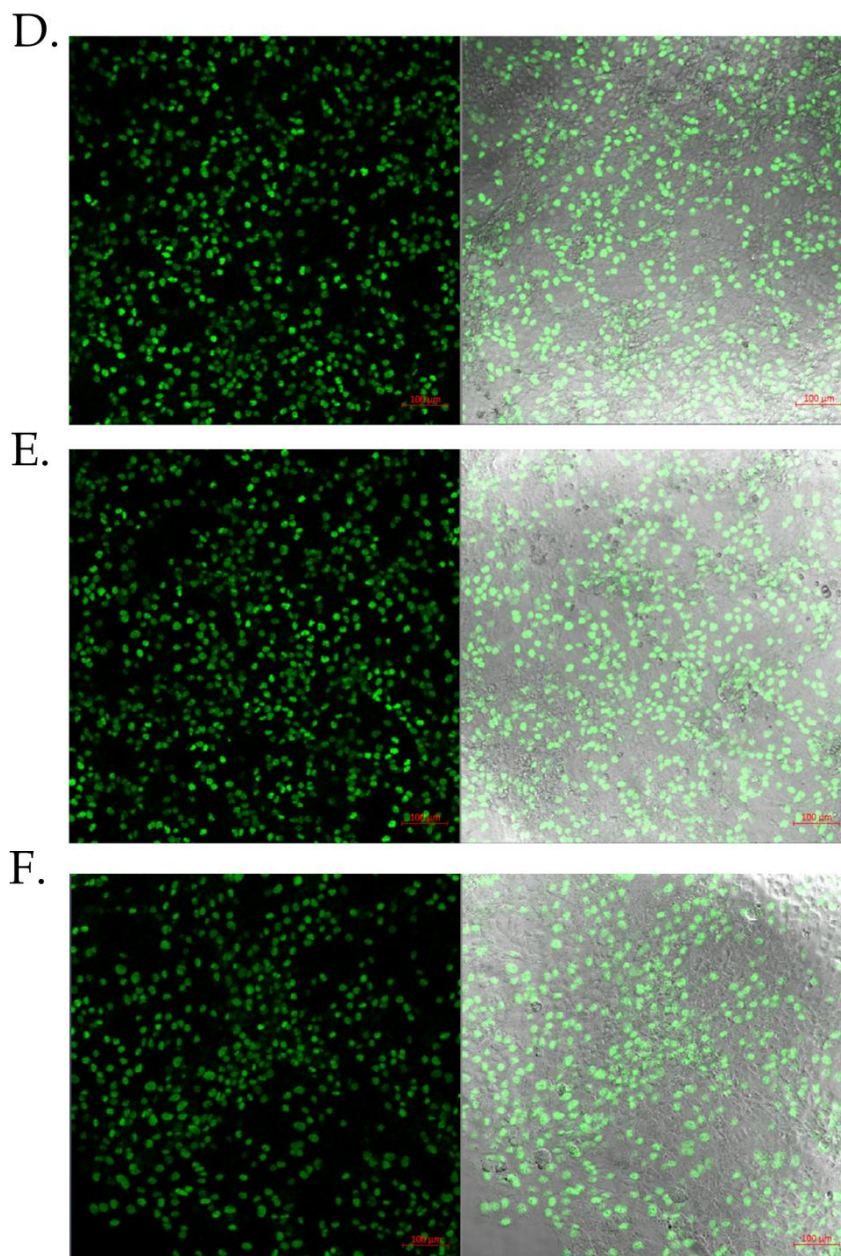
p – poziom istotności statystycznej.

4.3.2. Ocena wpływu transfekcji konstruktami CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2 oraz CGB 5 na proliferację komórek Ishikawa

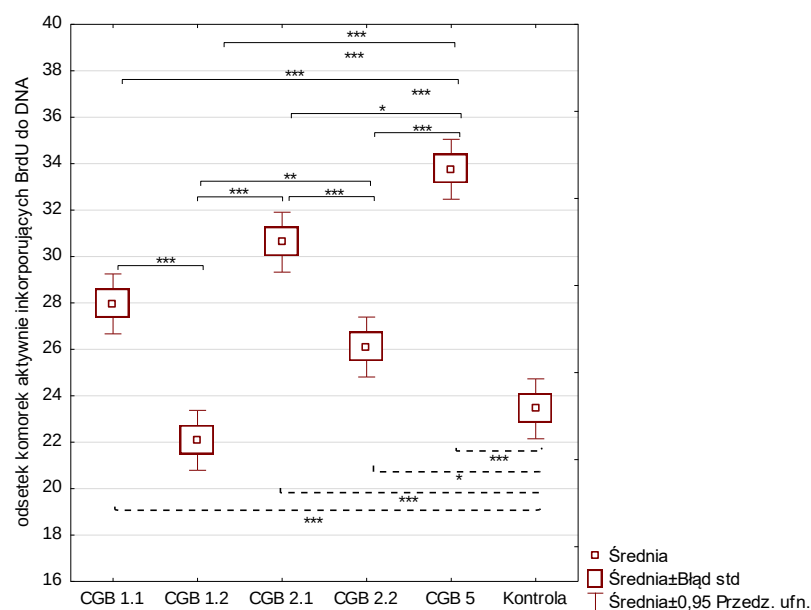
Analizy proliferacji komórek Ishikawa z wykorzystaniem metody inkorporacji BrdU wykazały, że nadekspresja hCG β , podobnie jak w przypadku komórek HeLa, zwiększa proces proliferacji także i tej linii komórkowej (Rycina 20.). Na podstawie przeprowadzonego testu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA stwierdzono, iż odsetek komórek proliferujących, analizowany siedemdziesiąt dwie godziny po transfekcji różni się istotnie statystycznie pomiędzy analizowanymi konstruktami, w porównaniu z rezultatami uzyskanymi dla prób kontrolnych ($p < 0,0001$). Zastosowany test *post hoc* Dunnetta wykazał, iż największym stopniem proliferacji charakteryzowały się komórki poddane transfekcji z wykorzystaniem konstruktu CGB 5 ($M = 33,76 \pm 2,168$) w porównaniu ze stopniem proliferacji w komórkach nietransfekowanych ($M = 23,44 \pm 1,379$); ($p < 0,0001$). Pozostałe konstrukty również wpływały modulująco na proces proliferacji. Przeprowadzone analizy pokazały, iż w przypadku użycia konstruktu CGB 2.1 ($M = 30,62 \pm 0,965$) oraz CGB 1.1 ($M = 27,96 \pm 1,401$) istotnie zwiększa się odsetek komórek inkorporujących BrdU, w porównaniu do komórek kontrolnych ($M = 23,44 \pm 1,379$); (dla obu konstruktyw $p < 0,0001$). Także zastosowanie konstruktu CGB 2.2 wpływało istotnie na zwiększenie tempa proliferacji komórek Ishikawa ($M = 26,1 \pm 1,029$) w porównaniu z rezultatami uzyskanymi dla prób kontrolnych ($p = 0,025$). W przeciwieństwie do opisanych powyżej wyników, nie zaobserwowano istotnej różnicy w tempie proliferacji komórek transfekowanych konstruktami CGB 1.2 ($M = 22,08 \pm 1,087$), względem komórek nietransfekowanych ($p = 0,4$); (Rycina 21.).

Ponadto, wykorzystując test *post hoc* Tukeya analizowano wyniki proliferacji komórek Ishikawa traktowanych poszczególnymi konstruktami CGB i określono występowanie różnic pomiędzy nimi (Tabela 17.). Wykazano istotne różnice w odsetku komórek inkorporujących BrdU, w zależności od wykorzystanego konstruktu. Jedynie pomiędzy CGB 1.1 i CGB 2.1 oraz CGB 1.1 i CGB 2.2 różnica nie wykazała istotności statystycznej (Rycina 21.).





Rycina 20. Komórki linii Ishikawa aktywnie inkorporujące BrdU podczas replikacji DNA, uwidocznione podczas reakcji z przeciwciałem przeciwko BrdU, skoniugowanym z FITC. Komórki transfekowane konstrukcjami: CGB 1.1 (A.); CGB 1.2 (B.); CGB 2.1 (C.); CGB 2.2 (D.); CGB 5 (E.) oraz komórki kontrolne (F.), nietransfekowane. Panel lewy: zdjęcia prezentujące komórki uwidocznione w świetle UV; panel prawy: zdjęcia z panelu lewego nałożone na zdjęcia wykonane w świetle przechodzącym (VIS). Oryginalne powiększenie 200x.



Rycina 21. Zmiany proliferacji komórek linii Ishikawa transfekowanych konstrukcjami CGB: CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 uwidocznione metodą inkorporacji bromodeoksyurydyny (BrdU). Kontrolę stanowiły komórki niepoddane transfekcji. Linie ciągłe nad wykresami ramka-wąsy wskazują na różnice w tempie proliferacji komórek pomiędzy konstrukcjami użytymi do transfekcji. Linie przerywane pod wykresami ramka-wąsy wskazują różnice pomiędzy konstrukcjami a kontrolą. Oznaczenia istotności różnic: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabela 17. Wyniki analiz statystycznych (test *post hoc* Tukeya) odsetka komórek inkorporujących BrdU dla linii Ishikawa. CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 – stosowane konstrukty CGB

konstrukty			M, S		p	
CGB 1.1	vs	CGB 1.2	27,96 ± 1,401	vs	22,08 ± 1,087	0,0001
CGB 1.1	vs	CGB 5	27,96 ± 1,401	vs	33,76 ± 2,168	0,0001
CGB 1.2	vs	CGB 2.1	22,08 ± 1,087	vs	30,62 ± 0,965	0,0001
CGB 1.2	vs	CGB 2.2	22,08 ± 1,087	vs	26,10 ± 1,029	0,002
CGB 1.2	vs	CGB 5	22,08 ± 1,087	vs	33,76 ± 2,168	0,0001
CGB 2.1	vs	CGB 2.2	30,62 ± 0,965	vs	26,10 ± 1,029	0,0005
CGB 2.1	vs	CGB 5	30,62 ± 0,965	vs	33,76 ± 2,168	0,02
CGB 2.2	vs	CGB 5	26,10 ± 1,029	vs	33,76 ± 2,168	0,0001

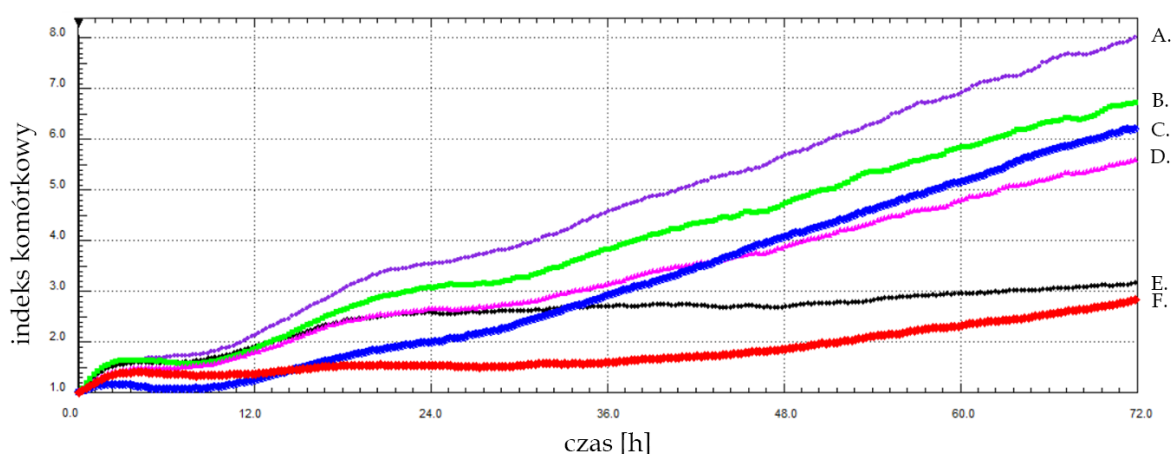
Legenda:

M – średnia arytmetyczna;

S – odchylenie standardowe;

p – poziom istotności statycznej.

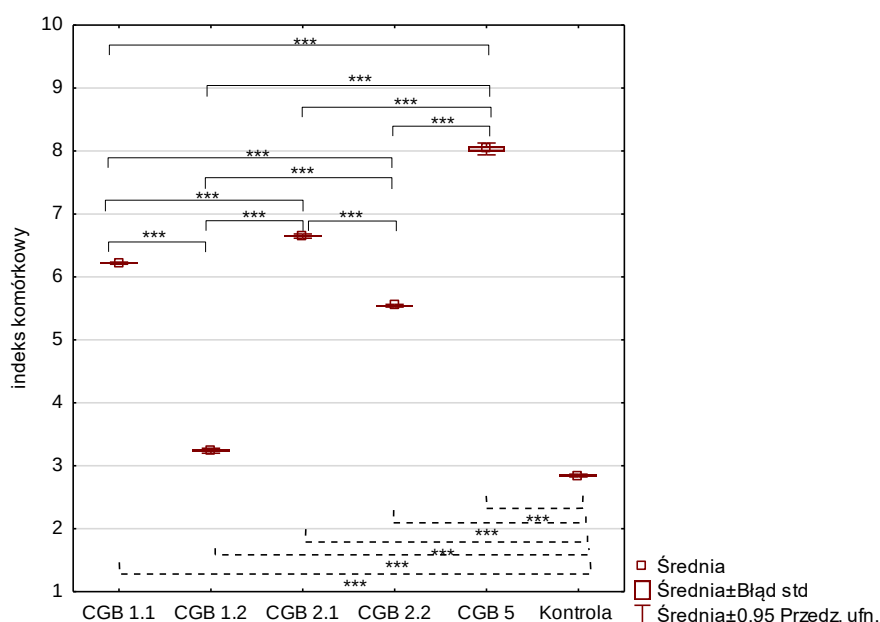
Do monitorowania wzrostu i oceny potencjału proliferacyjnego komórek Ishikawa transfekowanych konstruktami CGB w czasie rzeczywistym, został wykorzystany system xCELLigence® RTCA DP. Obserwacje dowiodły, iż komórki transfekowane charakteryzowało zwiększenie tempa proliferacji względem komórek niepoddanych transfekcji (Rycina 22.).



Rycina 22. Reprezentatywny wykres zmian w proliferacji komórek Ishikawa podczas siedemdziesięciogodzinnej obserwacji z wykorzystaniem systemu xCELLigence® RTCA DP. Komórki transfekowane konstruktami: CGB 5 (A.); CGB 2.1 (B.); CGB 1.1 (C.); CGB 2.2 (D.); CGB 1.2 (E.); oraz komórki kontrolne (F.).

Na podstawie wyników przeprowadzonych eksperymentów i analiz statystycznych (test jednoczynnikowej wariancji ANOVA) stwierdzono występowanie istotnych różnic w przyroście liczby komórek pomiędzy analizowanymi konstruktami, w porównaniu do rezultatów uzyskanych dla prób kontrolnych ($p < 0,0001$). Zastosowany test *post hoc* Dunnetta wykazał istotny przyrost liczby komórek w przypadku konstruktu CGB 5 ($M = 8,033 \pm 0,089$). Także analiza rezultatów uzyskanych dla komórek transfekowanych konstruktami CGB 1.1 ($M = 6,219 \pm 0,016$), CGB 1.2 ($M = 3,239 \pm 0,037$), CGB 2.1 ($M = 6,649 \pm 0,031$) oraz CGB 2.2 ($M = 5,543 \pm 0,02$) pokazała, iż zwiększają one istotnie tempo proliferacji, w porównaniu do komórek kontrolnych ($M = 2,845 \pm 0,021$); ($p < 0,0001$); (Rycina 23.).

Dalsze analizy, za pomocą testu *post hoc* Tukeya, określiły występowanie istotnych różnic pomiędzy stosowanymi konstruktami (Tabela 18.). Zauważono istotny przyrost liczby komórek transfekowanych analizowanymi konstruktami CGB (Rycina 23.).



Rycina 23. Wykres zmian proliferacji komórek Ishikawa uzyskany dzięki wykorzystaniu systemu xCELLigence® RTCA DP w siedemdziesiątej drugiej godzinie od przeprowadzenia transfekcji konstrukcjami: CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5. Kontrolę stanowiły komórki niepoddane transfekcji. Linie ciągłe nad wykresami ramka-wąsy wskazują na różnice w tempie proliferacji komórek pomiędzy konstrukcjami użytymi podczas transfekcji. Linie przerywane pod wykresami ramka-wąsy wskazują różnice pomiędzy konstrukcjami a kontrolą. Użyte oznaczenia istotności różnic: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabela 18. Wyniki analiz statystycznych (test *post hoc* Tukeya) proliferacji komórek Ishikawa w siedemdziesiątej drugiej godzinie obserwacji. CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 – stosowane konstrukty CGB

konstrukty			M, S			p
CGB 1.1	vs	CGB 1.2	6,219 ± 0,016	vs	3,239 ± 0,037	0,0001
CGB 1.1	vs	CGB 2.1	6,219 ± 0,016	vs	6,649 ± 0,031	0,0001
CGB 1.1	vs	CGB 2.2	6,219 ± 0,016	vs	5,543 ± 0,02	0,0001
CGB 1.1	vs	CGB 5	6,219 ± 0,016	vs	8,033 ± 0,089	0,0001
CGB 1.2	vs	CGB 2.1	3,239 ± 0,037	vs	6,649 ± 0,031	0,0001
CGB 1.2	vs	CGB 2.2	3,239 ± 0,037	vs	5,543 ± 0,02	0,0001
CGB 1.2	vs	CGB 5	3,239 ± 0,037	vs	8,033 ± 0,089	0,0001
CGB 2.1	vs	CGB 2.2	6,649 ± 0,031	vs	5,543 ± 0,02	0,0001
CGB 2.1	vs	CGB 5	6,649 ± 0,031	vs	8,033 ± 0,089	0,0001
CGB 2.2	vs	CGB 5	5,543 ± 0,02	vs	8,033 ± 0,089	0,0001

Legenda:

M – średnia arytmetyczna;

S – odchylenie standardowe;

p – poziom istotności statystycznej.

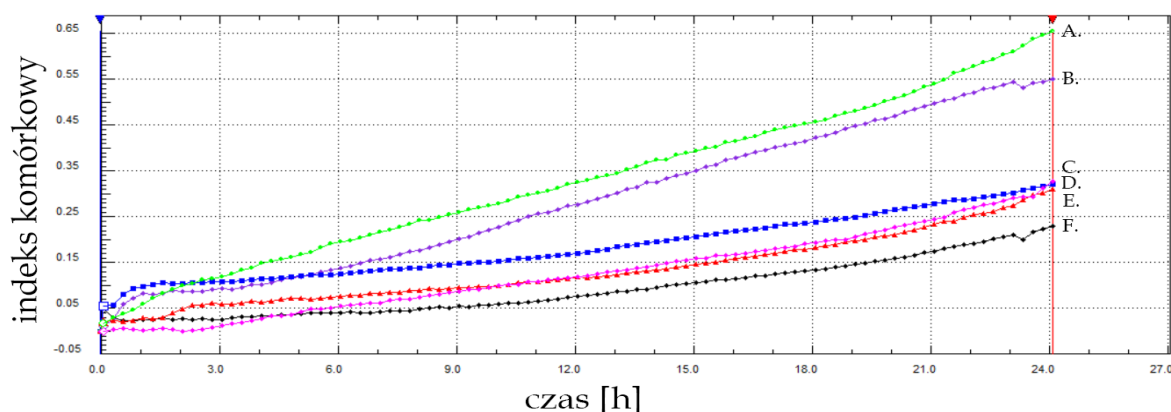
4.3.3. Ocena wpływu transfekcji konstruktami CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2 oraz CGB 5 na inwazyjność komórek linii HeLa

Potencjał inwazyjny komórek oceniano z pomocą systemu xCELLigence® RTCA DP. System, dzięki wykorzystaniu specjalnych płytek (płytek CIM-plate), pozwala mierzyć w czasie rzeczywistym przemieszczanie się komórek w kierunku chemoatraktanta (Rycina 24).

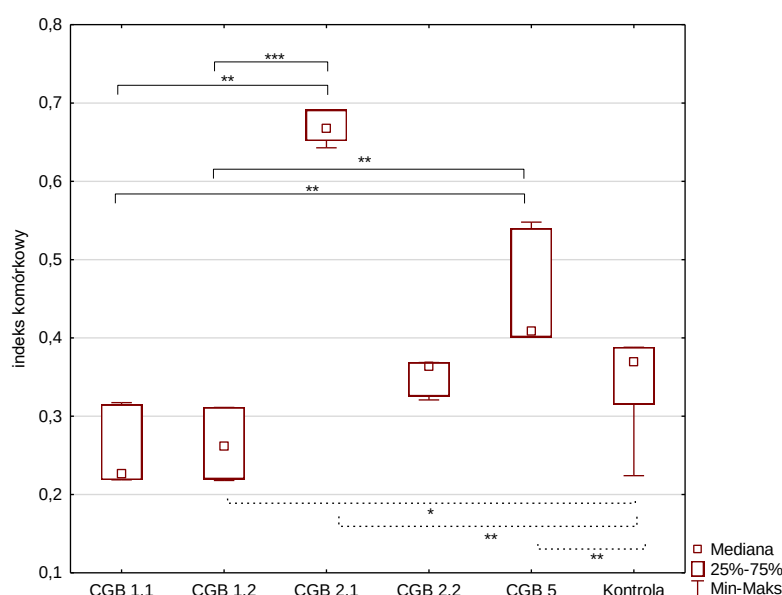
Na podstawie wyników przeprowadzonych eksperymentów oraz analiz statystycznych (test Kruskala-Wallisa) dowiedziono, iż transfekcja badanymi konstruktami CGB wpływa na szybkość migracji komórek HeLa przez mikroporowate membrany płytek CIM-plate. Różnice migracji transfektantów w porównaniu z komórkami kontrolnymi były istotnie statystycznie ($p < 0,0001$); (Rycina 25.).

Wyniki testu *post hoc* Dunna wskazały wzrost w szybkości migracji komórek transfekowanych konstruktami CGB 2.1 ($Me = 0,667$), w porównaniu do istotnie niższego poziomu odnotowanego w próbach kontrolnych ($Me = 0,369$); ($p = 0,004$). Istotny wzrost uzyskano także dla konstruktów CGB 5 ($Me = 0,408$); ($p = 0,004$). Z kolei istotnie niższe tempo migracji komórek zauważono w przypadku komórek transfekowanych konstruktami CGB 1.2 ($Me = 0,262$); ($p = 0,03$). Istotnej różnicy w migracji komórek transfekowanych nie wykazano dla konstruktów: CGB 1.1 oraz CGB 2.2, w porównaniu z komórkami kontrolnymi ($p > 0,05$); (Rycina 25.).

Ponadto za pomocą testu *post hoc* Tuckeya stwierdzono występowanie istotnych różnic w tempie migracji komórek linii HeLa w przypadku konstruktów: CGB 1.1 *vs* CGB 2.1 ($Me = 0,226$ *vs* $Me = 0,667$; $p = 0,003$), CGB 1.1 *vs* CGB 5 ($Me = 0,22$ *vs* $Me = 0,408$; $p = 0,0014$), CGB 1.2 *vs* CGB 2.1 ($Me = 0,262$ *vs* $Me = 0,667$; $p = 0,0001$) oraz CGB 1.2 *vs* CGB 5 ($Me = 0,262$ *vs* $Me = 0,408$; $p = 0,007$); (Rycina 25.).



Rycina 24. Reprezentatywny wykres zmian potencjału inwazyjności komórek HeLa podczas dwudziestoczterogodzinnej obserwacji z wykorzystaniem systemu xCELLigence® RTCA DP. Komórki transfekowane konstruktami: CGB 2.1 (A.); CGB 5 (B.); CGB 1.1 (C.); CGB 2.2 (D.); CGB 1.2 (E.) oraz komórki kontrolne (F.).



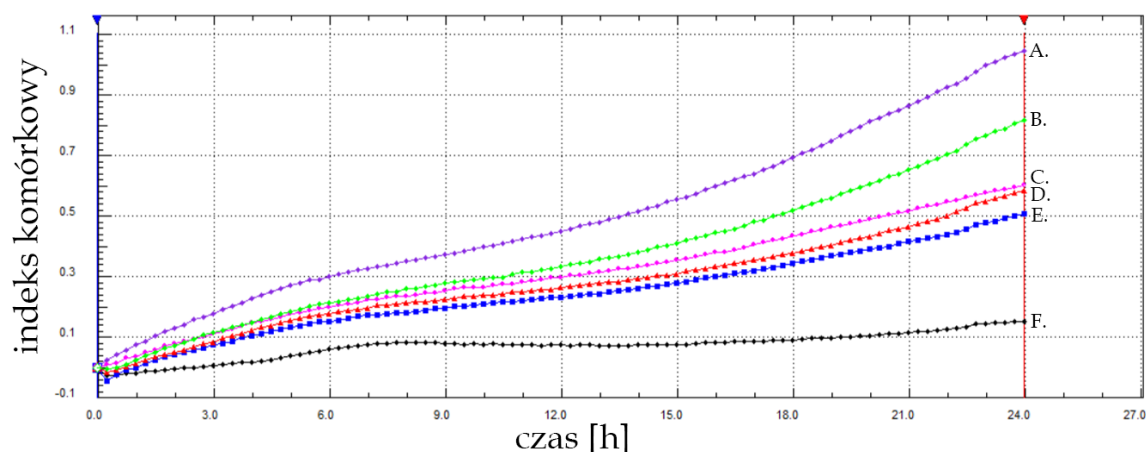
Rycina 25. Wykres potencjału inwazyjności komórek linii HeLa poddanych transfekcji z zastosowaniem badanych konstrukcji: CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5. Kontrolę stanowiły komórki niepoddane transfekcji. Linie ciągłe nad wykresami ramka-wąsy wskazują na różnice w potencjale inwazyjności komórek pomiędzy konstrukcjami użytymi podczas transfekcji. Linie przerywane pod wykresami ramka-wąsy wskazują różnice pomiędzy konstrukcjami a kontrolą. Oznaczenia istotności różnic: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.3.4. Ocena wpływu transfekcji konstrukcjami CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2 oraz CGB 5 na inwazyjność komórek Ishikawa

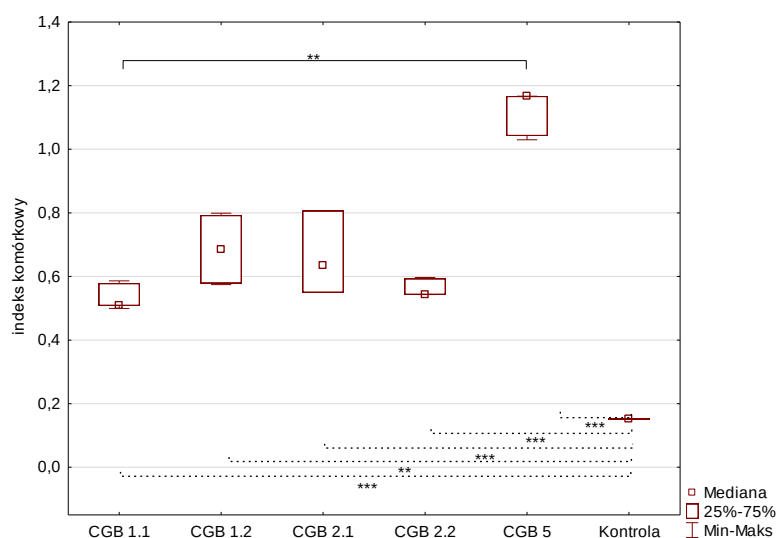
Z wykorzystaniem systemu xCELLigence® RTCA DP oceniano również potencjał inwazyjny transfekowanych konstrukcjami CGB komórek Ishikawa (Rycina 26.). Na podstawie wyniku testu Kruskala-Wallisa stwierdzono różnice w tempie migracji transfektantów i komórek kontrolnych ($p < 0,0001$); (Rycina 27.).

Wyniki testu *post hoc* Dunna dowiodły, że istotnie wyższe tempo migracji, w porównaniu do komórek kontrolnych ($Me = 0,151$), cechowało komórki transfekowane konstruktem CGB 5 ($Me = 1,166$); ($p = 0,0002$). Równie istotnie znaczący wzrost, w porównaniu do prób kontrolnych uzyskano w przypadku zastosowania konstrukcji: CGB 2.1 ($Me = 0,633$), CGB 1.1 ($Me = 0,508$), CGB 2.2 ($Me = 0,543$) oraz CGB 1.2 ($Me = 0,684$) (odpowiednio: $p = 0,0004$, $p = 0,0002$, $p = 0,0002$, $p = 0,003$); (Rycina 27.).

Za pomocą testu *post hoc* Tuckeya określono także występowanie różnic pomiędzy stosowanymi konstrukcjami. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono istotne różnice w tempie migracji komórek linii Ishikawa jedynie w przypadku konstrukcji CGB 1.1 vs CGB 5 ($Me = 0,508$ vs $Me = 1,166$; $p = 0,008$); (Rycina 27.).



Rycina 26. Reprezentatywny wykres zmian potencjału inwazyjności komórek Ishikawa podczas dwudziestoczegodzinnej obserwacji z wykorzystaniem systemu xCELLigence® RTCA DP. Komórki transfekowane konstrukcjami CGB 5 (A.); CGB 2.1 (B.); CGB 2.2 (C.); CGB 1.2 (D.); CGB 1.1 (E.); komórki kontrolne (F.).



Rycina 27. Wykres potencjału inwazyjności komórek linii Ishikawa poddanych transfekcji badanymi konstrukcjami: CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5. Kontrolę stanowiły komórki niepoddane transfekcji. Linie ciągłe nad wykresami ramka-wąsy wskazują na różnice potencjału inwazyjności komórek pomiędzy konstrukcjami użytymi podczas transfekcji. Linie przerywane pod wykresami ramka-wąsy wskazują różnice pomiędzy konstrukcjami a kontrolą. Użyte oznaczenia istotności różnic: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.3.5. Ocena wpływu transfekcji konstrukcjami CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2 oraz CGB 5 na cykl życiowy komórek HeLa

W celu oceny wpływu transfekcji konstrukcjami CGB na cykl życiowy komórek linii HeLa wykorzystano technikę cytometrii przepływowej (Rycina 28.). Analizy liczebności komórek transfekowanych konstrukcjami z badanymi genami CGB oraz komórek nietransfekowanych wykazały zmiany w odsetku komórek znajdujących się w poszczególnych fazach cyklu życiowego (Tabela 19.).

Tabela 19. Procentowy udział poszczególnych faz cyklu komórkowego komórek HeLa transfekowanych konstrukcjami: CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5. Kontrolę stanowiły komórki niepoddane transfekcji

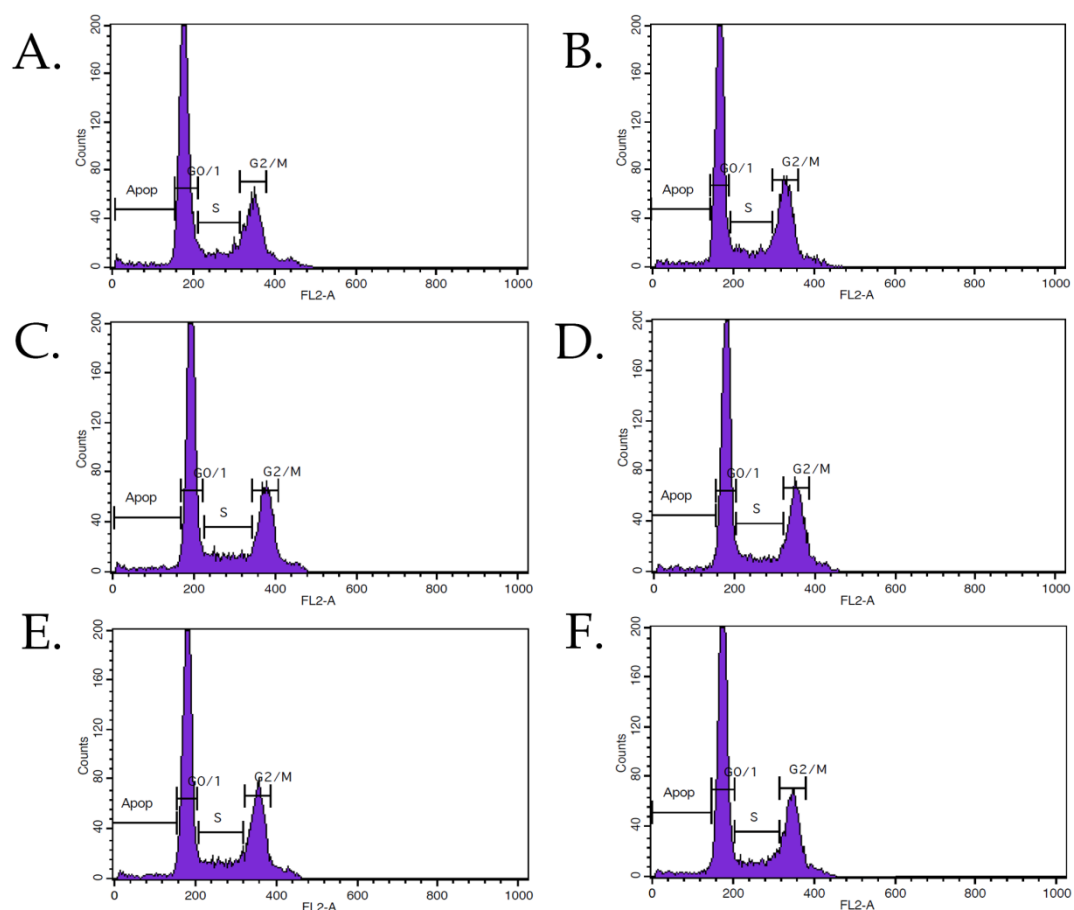
konstrukt	fazy cyklu komórkowego			
	apoptoza	G0/G1	S	G2/M
CGB 1.1	3,23%	47,12%	28,54%	21,11%
CGB 1.2	2,16%	43,78%	29,34%	24,72%
CGB 2.1	3,72%	40,27%	30,92%	25,09%
CGB 2.2	2,97%	48,92%	24,23%	23,88%
CGB 5	2,04%	40,37%	32,06%	25,53%
kontrola	2,81%	51,53%	22,70%	23,14%
odchylenie standardowe	0,64%	4,63%	3,73%	1,62%

Wykorzystując funkcję gęstości rozkładu, dla komórek HeLa transfekowanych konstrukcjami: CGB 5 ($M = 32,06\% \pm 3,73\%$) oraz CGB 2.1 ($M = 30,92\% \pm 3,73\%$) odnotowano istotną różnicę w odsetku komórek będących w fazie S; wartości te odniesiono do odsetka komórek w fazie S zanotowanego dla prób kontrolnych ($M = 22,7\%$); (odpowiednio: $p = 0,012$ oraz $p = 0,028$); (Rycina 29. C.).

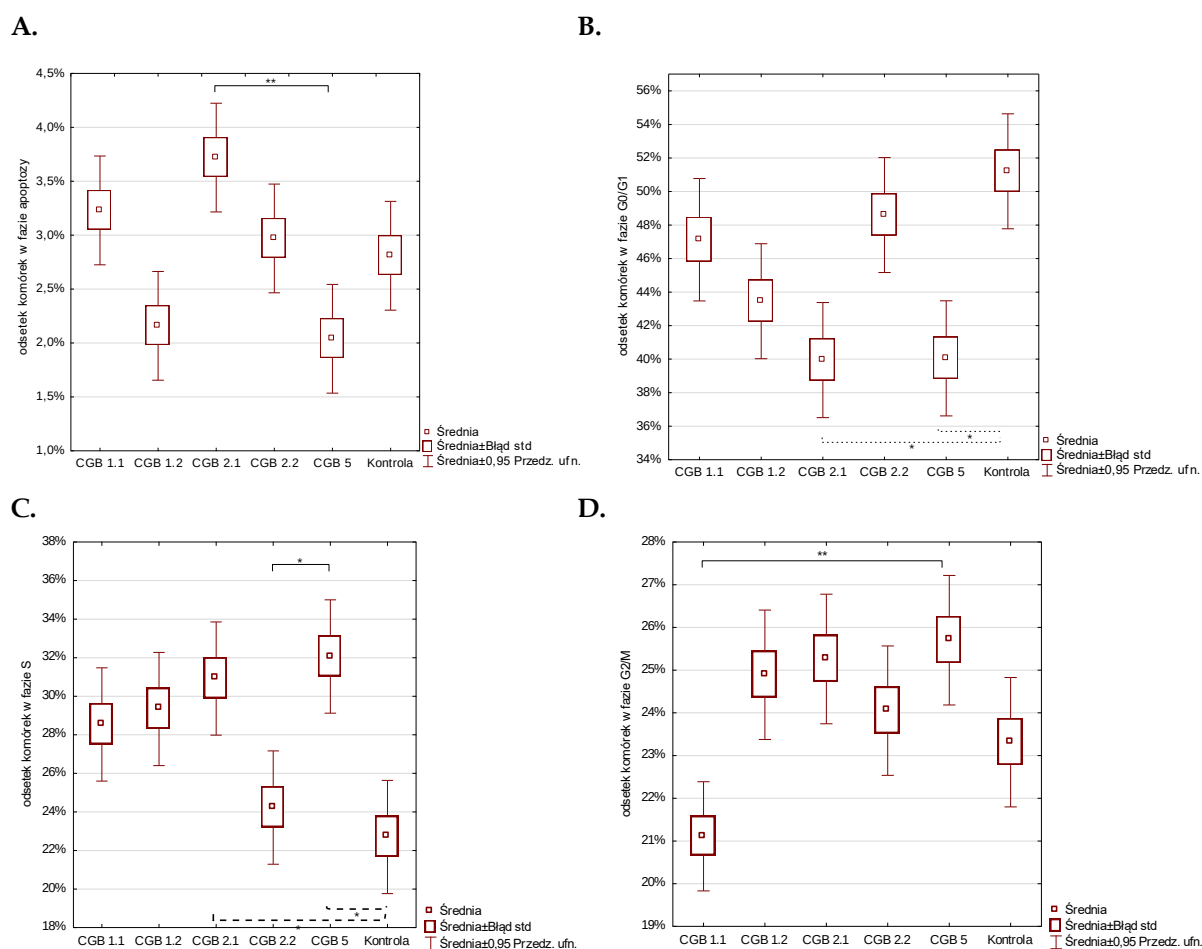
W przeciwieństwie do wyników opisanych powyżej, w przypadku zastosowania wariantów CGB 1.1, CGB 1.2 oraz CGB 2.2 nie zaobserwowano istotnej różnicy w liczebności komórek znajdujących się w fazie S ($p > 0,05$) (Rycina 29. C.).

Z kolei w przypadku zastosowania konstruktów CGB 2.1 ($M = 40,27\% \pm 4,63\%$; $p = 0,015$) oraz CGB 5 ($M = 40,37\% \pm 4,63\%$; $p = 0,016$), w porównaniu do prób kontrolnych, wykazano różnicę w odsetku komórek będących w fazie G0/G1 (Rycina 29. B.). Po transfekcji konstrukcjami CGB nie zaobserwowano istotnych różnic w odsetku komórek znajdujących się w fazie apoptozy oraz w fazie G2/M (Rycina 29. A. i D.).

Analiza porównawcza wykazała także istotną różnicę w odsetku komórek apoptotycznych po transfekcji poszczególnymi konstrukcjami: CGB 2.1 *vs* CGB 5 ($M = 3,72\% \pm 0,64\%$ *vs* $M = 2,04\% \pm 0,64\%$; $p = 0,009$) (Rycina 29. A.). Z kolei analizy liczebności komórek w fazie S wykazały istotną różnicę w odsetku komórek po zastosowaniu konstrukcji: CGB 2.2 *vs* CGB 5 ($M = 24,23\% \pm 3,73\%$ *vs* $M = 32,06\% \pm 3,73\%$; $p = 0,03$) (Rycina 29. C.). Natomiast w przypadku fazy G2/M zauważono istotną różnicę w odsetku komórek po zastosowaniu konstrukcji: CGB 1.1 *vs* CGB 5 ($M = 21,11\% \pm 1,62\%$ *vs* $M = 25,53\% \pm 1,62\%$; $p = 0,006$); (Rycina 29. D.).



Rycina 28. Reprezentatywne histogramy jednowymiarowe cyklu komórkowego komórek linii HeLa transfekowanych analizowanymi konstruktami. Komórki transfekowane konstruktami: CGB 1.1 (A.); CGB 1.2 (B.); CGB 2.1 (C.); CGB 2.2 (D.); CGB 5 (E.); komórki kontrolne (F.), niepoddawane procedurze transfekcji.



Rycina 29. Wykresy rozkładów liczności komórek HeLa znajdujących się w poszczególnych fazach cyklu życiowego (A. faza apoptozy; B. faza G0/G1; C. faza S; D. faza G2/M) poddanych transfekcji z zastosowaniem badanych konstruktów: CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5. Kontrolę stanowiły komórki niepoddane transfekcji. Linie ciągłe nad wykresami ramka-wąsy wskazują na różnice w rozkładach liczebności komórek pomiędzy konstruktami użytymi podczas transfekcji. Linie przerywane pod wykresami ramka-wąsy wskazują różnice pomiędzy konstruktami a kontrolą. Oznaczenia istotności różnic: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.3.6. Ocena wpływu transfekcji konstruktami CGB1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2 oraz CGB 5 na cykl życiowy komórek Ishikawa

Technikę cytometrii przepływowej wykorzystano również do oceny wpływu transfekcji konstruktami CGB na cykl życiowy linii komórkowej Ishikawa (Rycina 30.). Liczebność komórek transfekowanych konstruktami CGB oraz komórek nietransfekowanych analizowano wykorzystując funkcję gęstości rozkładu. Na podstawie otrzymanych wyników określono zmiany w odsetku komórek znajdujących się w poszczególnych fazach cyklu życiowego (Tabela 20.).

Tabela 20. Procentowy udział komórek znajdujących się w poszczególnych fazach cyklu komórkowego linii komórkowej Ishikawa poddanej transfekcji. CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 – stosowane konstrukty CGB. Kontrolę stanowiły komórki niepoddane transfekcji

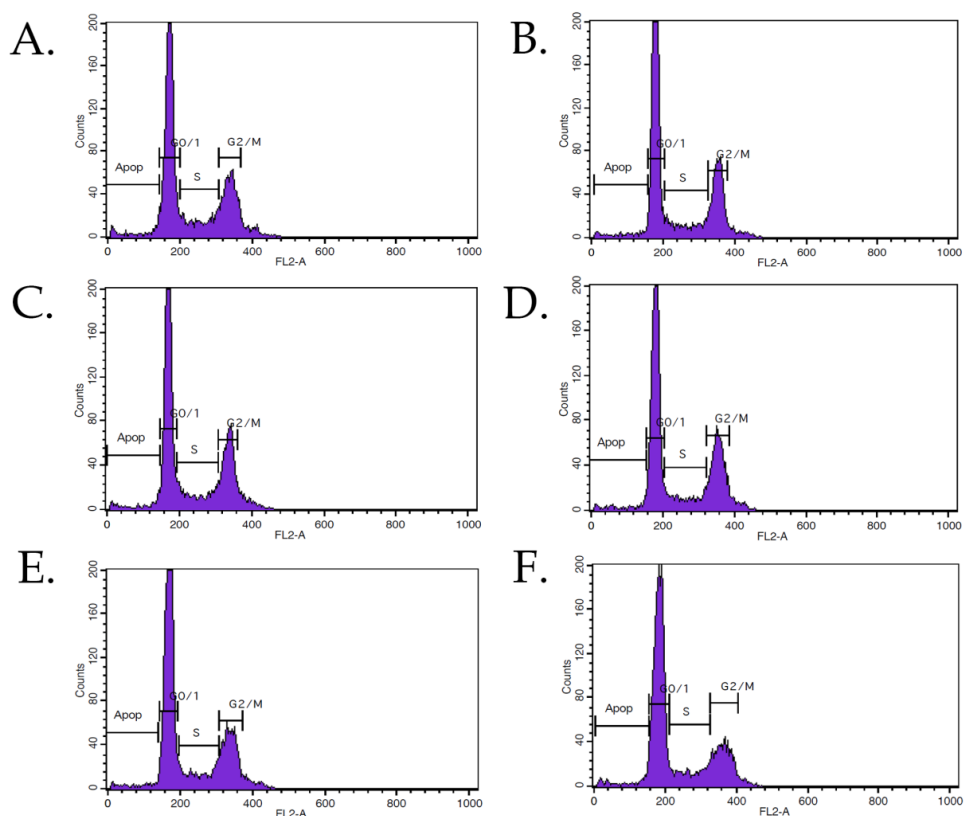
konstrukt	fazy cyklu komórkowego			
	apoptoza	G0/G1	S	G2/M
CGB 1.1	3,72%	46,13%	27,02%	23,13%
CGB 1.2	3,01%	48,25%	26,21%	22,53%
CGB 2.1	2,98%	45,62%	27,12%	24,28%
CGB 2.2	2,91%	45,26%	26,69%	25,14%
CGB 5	2,12%	44,50%	28,47%	24,91%
kontrola	2,71%	52,91%	24,11%	20,27%
odchylenie standardowe	0,52%	3,11%	1,44%	1,83%

Istotne różnice w odsetku komórek będących w fazie S zaobserwowano dla komórek transfekowanych konstrukcjami: CGB 5 ($M = 28,47\% \pm 1,44\%$), CGB 2.1 ($M = 27,12\% \pm 1,44\%$) oraz CGB 1.1 ($M = 27,02\% \pm 1,44\%$); względem komórek kontrolnych ($M = 24,11\% \pm 1,44\%$; odpowiednio: $p = 0,0002$, $p = 0,037$, $p = 0,043$). Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w odsetku komórek znajdujących się w fazie S dla konstruktyw CGB 1.2 oraz CGB 2.2 ($p > 0,05$); (Rycina 31. C.).

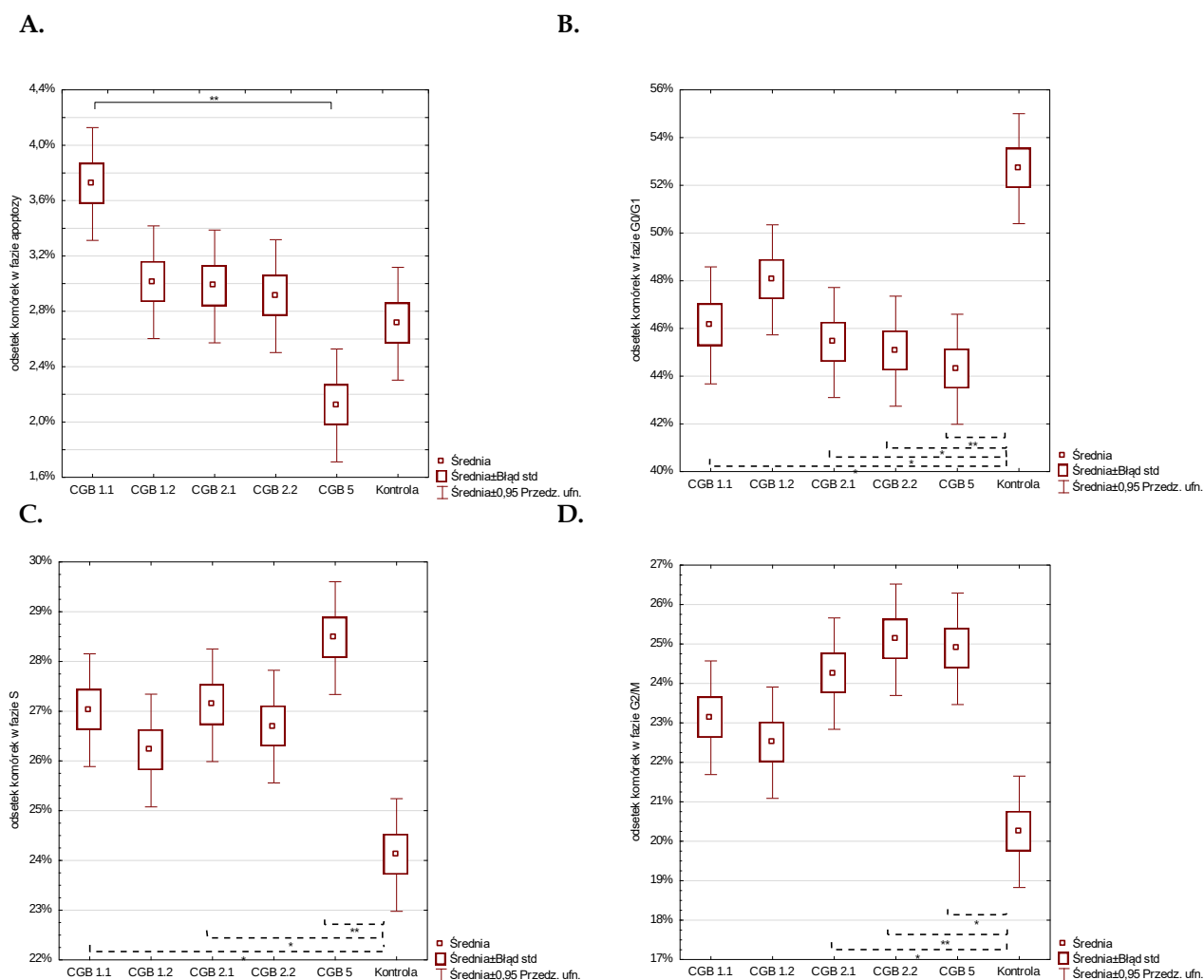
Ponadto odnotowano różnice w odsetku komórek będących w fazie G0/G1. Były one istotne dla konstruktyw: CGB 2.1 ($M = 2,98\% \pm 3,11\%$), CGB 5 ($M = 2,12\% \pm 3,11\%$), CGB 1.1 ($M = 3,72\% \pm 3,11\%$) oraz CGB 2.2 ($M = 2,91\% \pm 3,11\%$); w porównaniu do prób kontrolnych ($M = 52,91\% \pm 3,11\%$), a poziom istotności statystycznej wynosił odpowiednio: $p = 0,019$, $p = 0,007$, $p = 0,029$, $p = 0,014$ (Rycina 31. B). Stwierdzono również istotną różnicę w odsetku komórek znajdujących się w fazie G2/M. Miało to miejsce w przypadku transfekcji konstrukcjami: CGB 2.1 ($M = 24,28\% \pm 1,83\%$), CGB 2.2 ($M = 25,14\% \pm 1,83\%$) oraz CGB 5 ($M = 24,91\% \pm 1,83\%$); (M dla prób kontrolnych = $20,27\% \pm 1,83\%$; p odpowiednio: $p = 0,028$, $p = 0,008$, $p = 0,011$); (Rycina 31. D.).

Transfekcja konstrukcjami CGB nie powodowała różnic w odsetku komórek ulegających apoptozie, w porównaniu z próbami kontrolnymi ($p > 0,05$); (Rycina 31. A.).

Z kolei analizy porównawcze odsetka komórek będących w poszczególnych fazach cyklu komórkowego ujawniły istotne różnice pomiędzy liczebnością komórek apoptotycznych przy porównaniu względem siebie zastosowanych konstruktyw: CGB 1.1 ($M = 3,72\% \pm 0,52\%$) vs CGB 5 ($M = 2,12\% \pm 0,52\%$); ($p = 0,002$); (Rycina 31. A.).



Rycina 30. Reprezentatywne histogramy jednowymiarowe cyklu komórkowego komórek linii Ishikawa transfekowanych analizowanymi konstruktami. Komórki transfekowane konstruktami: CGB 1.1 (A.); CGB 1.2 (B.); CGB 2.1 (C.); CGB 2.2 (D.); CGB 5 (E.); komórki kontrolne (F.), niepoddawane procedurze transfekcji.



Rycina 31. Wykresy rozkładów liczności komórek znajdujących się w poszczególnych fazach cyklu życiowego (A. faza apoptozy; B. faza G0/G1; C. faza S; D. faza G2/M) dla komórek linii Ishikawa poddanych transfekcji z zastosowaniem badanych konstruktyw: CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5. Kontrolę stanowiły komórki niepoddane transfekcji. Linie ciągłe nad wykresami ramka-wąsy wskazują na różnice w rozkładach liczebności komórek pomiędzy konstruktywami użytymi podczas transfekcji. Linie przerywane pod wykresami ramka-wąsy wskazują różnice pomiędzy konstruktywami a kontrolą. Użyte oznaczenia istotności różnic: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

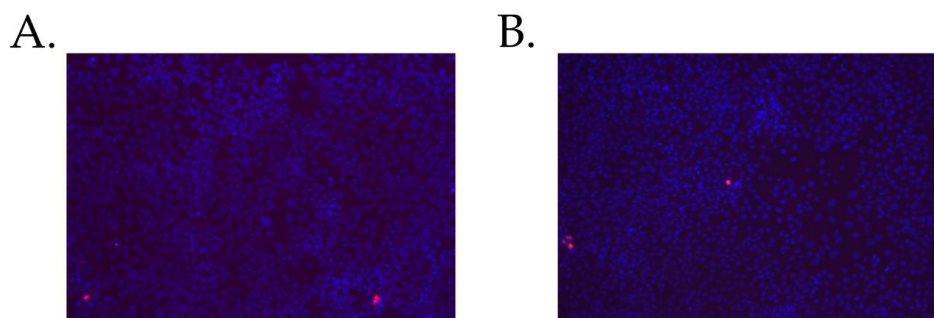
4.3.7. Ocena wpływu nadekspresji podjednostki beta gonadotropiny kosmówkowej na apoptozę i nekrozę komórek linii HeLa i Ishikawa

Zmiany morfologiczne charakteryzujące proces apoptozy, do których zalicza się między innymi kondensację i fragmentację chromatinu w komórkach, oceniono stosując mieszaninę barwników fluorescencyjnych – bisbenzimidu (Hoechst 33342) oraz jodku propidyny.

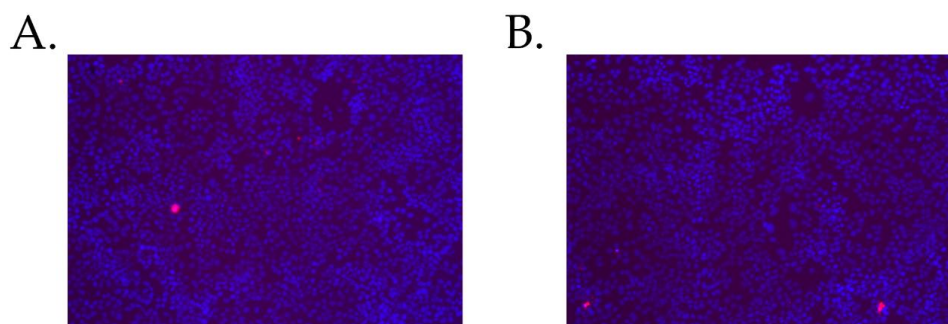
W poddawanych analizom liniach komórkowych, po siedemdziesięciu dwóch godzinach od momentu transfekcji badanymi konstruktywami, nie stwierdzano zwiększonego odsetka komórek ulegających apoptozie oraz nekrozie. Liczebność

komórek wykazujących cechy apoptozy we wszystkich próbach kontrolnych oraz badanych, niezależnie do rodzaju użytego konstruktu CGB była zbliżona i nie przekraczała pięciu procent całkowitej liczby komórek.

Dla zobrazowania wyników na rycinie 32. oraz 33. przedstawiono reprezentatywne zdjęcia komórek, odpowiednio linii HeLa oraz Ishikawa transfekowanych konstrunktem zawierającym gen *CGB5* oraz komórek kontrolnych, niepoddanych transfekcji.



Rycina 32. Komórki linii HeLa wybarwione mieszaniną barwników: bisbenzimidu (Hoechst 33342) i jodku propidyny. A. Komórki kontrolne. B. Komórki transfekowane wektorem zawierającym gen *CGB5* siedemdziesiąt dwie godziny po transfekcji. Oryginalne powiększenie 200 x.



Rycina 33. Komórki linii Ishikawa wybarwione mieszaniną barwników: bisbenzimidu (Hoechst 33342) i jodku propidyny. A. Komórki kontrolne. B. Komórki transfekowane wektorem kodującym gen *CGB5* siedemdziesiąt dwie godziny po transfekcji. Oryginalne powiększenie 200 x.

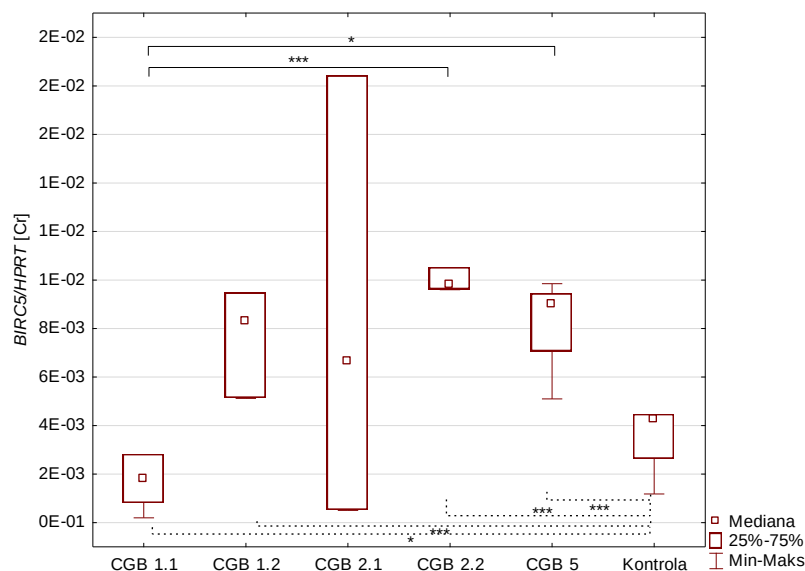
4.3.8. Ocena poziomu transkryptów oraz białka genów kodujących czynniki regulujące proces apoptozy: *BAX*, *BCL2* i *BIRC5* w komórkach linii HeLa poddanych transfekcji konstruktami *CGB1*, *CGB2* oraz *CGB5*

W celu określenia zmian w ekspresji genów kodujących czynniki regulujące proces apoptozy, w komórkach transfekowanych konstruktami CGB, siedemdziesiąt dwie godziny po transfekcji, wykorzystując metodę qPCR oraz western blot oceniono poziom transkryptów i białek genów: *BAX*, *BCL2* i *BIRC5*.

Oceniając (testem Kruskala-Wallisa) wyniki analiz przeprowadzonych reakcji qPCR, w komórkach transfekowanych przygotowanymi konstruktami CGB wykazano występowanie istotnych różnic w poziomie ekspresji genu *BIRC5* regulującego proces apoptozy ($p < 0,0001$). Za pomocą testu *post hoc* Dunna wykazano istotne różnice

w poziomach transkryptów *BIRC5* w komórkach transfekowanych konstruktami: CGB 1.1 (Me = 0,0017), CGB 1.2 (Me = 0,0082), CGB 2.2 (Me = 0,0097) oraz CGB 5 (Me = 0,0089), w porównaniu do prób kontrolnych (Me = 0,0042); (istotność statystyczna odpowiednio: $p = 0,02$, $p = 0,0007$, $p = 0,0006$, $p = 0,0002$). W przypadku konstruktów CGB 2.1 nie zauważono istotnej różnicy w poziomie ekspresji *BIRC5* pomiędzy komórkami transfekowanymi i kontrolnymi ($p > 0,05$); (Rycina 34.).

Określono także (test *post hoc* Tuckeya) różnice w modulowaniu ekspresji *BIRC5* przez poszczególne konstrukty. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono występowanie istotnych różnic we względnym poziomie ekspresji genu kodującego surwiwinę jedynie w przypadku stosowania konstruktów: CGB 1.1 *vs* CGB 2.2 (Me = 0,0017 *vs* Me = 0,0097; $p = 0,0004$) oraz CGB 1.1 *vs* CGB 5 (Me = 0,0017 *vs* Me = 0,0089; $p = 0,02$); (Rycina 34.).



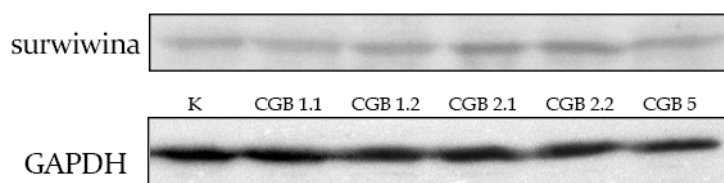
Rycina 34. Względny poziom ekspresji genu *BIRC5*, przyrównany do poziomu ekspresji genu referencyjnego *HPRT*, w komórkach linii HeLa transfekowanych konstruktami: CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5. Kontrolę stanowiły komórki niepoddane transfekcji. Linie ciągłe nad wykresami ramkowane wskazują na różnice w poziomie ekspresji *BIRC5* pomiędzy konstruktami użytymi podczas transfekcji. Linie przerywane pod wykresami ramkowane wskazują różnice pomiędzy konstruktami a kontrolą. Oznaczenia istotności różnic: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Wyniki analiz prowadzonych na poziomie mRNA potwierdzano z wykorzystaniem metody western blot, oceniając w transfekowanych komórkach poziom kodowanego przez gen *BIRC5* białka surwiwiny.

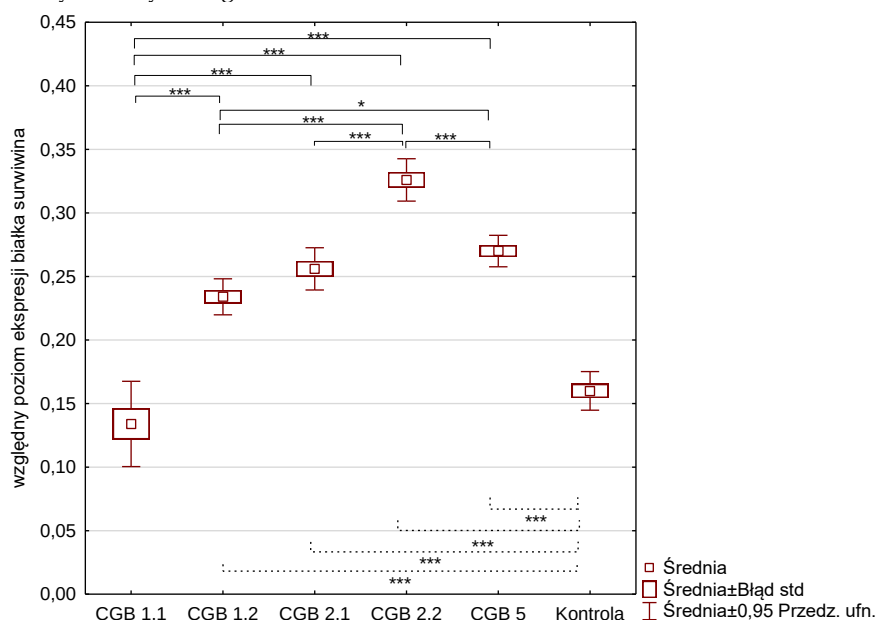
Analiza statystyczna (test *post hoc* Dunna) wyników pochodzących z pomiarów densytometrycznych poziomów surwiwiny, normalizowanych względem poziomu referencyjnego białka GAPDH, wykazała zwiększony poziom tego białka w komórkach linii

HeLa transfekowanych konstruktami: CGB 1.2 ($M = 0,234 \pm 0,011$), CGB 2.1 ($M = 0,256 \pm 0,013$), CGB 2.2 ($M = 0,326 \pm 0,013$) oraz CGB 5 ($M = 0,27 \pm 0,01$), w porównaniu do poziomów notowanych dla prób kontrolnych (we wszystkich przypadkach $p < 0,0001$). Jedynie po użyciu konstruktu CGB 1.1 poziom surwiwiny był nieznacznie obniżony względem wartości uzyskanej dla prób kontrolnych ($M = 0,134 \pm 0,027$ vs $M = 0,16 \pm 0,012$; $p = 0,12$); (Rycina 35. i 36.).

Dodatkowo porównano poziomy ekspresji surwiwiny w komórkach transfekowanych poszczególnymi konstruktami. Test *post hoc* Tukeya wykazał, iż zastosowanie konstruktów CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2 oraz CGB 5 wpływało na poziom białka surwiwiny, zaś różnice występujące pomiędzy próbami były istotne statystycznie (Tabela 21.).



Rycina 35. Reprezentatywny wynik detekcji białka surwiwina oraz GAPDH w izolatach białkowych z linii komórkowej HeLa siedemdziesiąt dwie godziny po transfekcji, uzyskany metodą western blot. CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 – izolaty białkowe z komórek poddawanych transfekcji z użyciem wybranego konstruktu. K – komórki kontrolne, nietransfekowane.



Rycina 36. Względny poziom ekspresji białka surwiwina oznaczony w izolatach białkowych linii HeLa, znormalizowany wobec białka referencyjnego GAPDH. CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 – izolaty białkowe z komórek poddanych transfekcji z użyciem wybranego konstruktu. Kontrolę stanowiły komórki nietransfekowane. Linie ciągłe nad wykresami ramka-wąsy wskazują na różnice w poziomie białka surwiwina pomiędzy konstruktami użytymi podczas transfekcji. Linie przerywane pod wykresami ramka-wąsy wskazują różnice pomiędzy konstruktami a kontrolą. Użyte oznaczenia istotności różnic: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabela 21. Wyniki analiz statystycznych względnych poziomów ekspresji białka surwiwina oznaczonych w izolatach komórek HeLa, znormalizowanych wobec białka referencyjnego GAPDH, CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 - izolaty białkowe z komórek poddanych transfekcji wybranym konstruktom CGB.

konstrukty			M, S		p	
CGB 1.1	vs	CGB 1.2	0,134 ± 0,027	vs	0,234 ± 0,011	0,0001
CGB 1.1	vs	CGB 2.1	0,134 ± 0,027	vs	0,256 ± 0,013	0,0001
CGB 1.1	vs	CGB 2.2	0,134 ± 0,027	vs	0,326 ± 0,013	0,0001
CGB 1.1	vs	CGB 5	0,134 ± 0,027	vs	0,27 ± 0,01	0,0001
CGB 1.2	vs	CGB 2.2	0,234 ± 0,011	vs	0,326 ± 0,013	0,0001
CGB 1.2	vs	CGB 5	0,234 ± 0,011	vs	0,27 ± 0,01	0,012
CGB 2.1	vs	CGB 2.2	0,256 ± 0,013	vs	0,326 ± 0,013	0,0001
CGB 2.2	vs	CGB 5	0,326 ± 0,013	vs	0,27 ± 0,01	0,0002

Legenda:

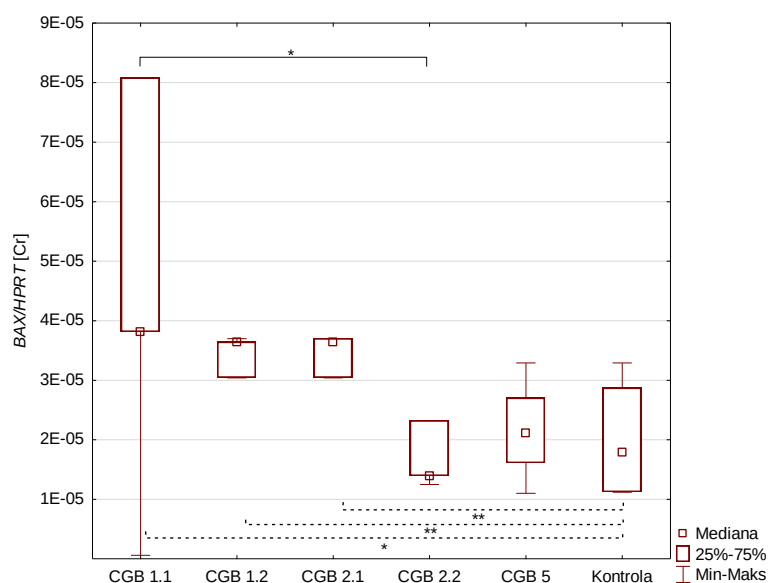
M - średnia arytmetyczna;

S - odchylenie standardowe;

p - poziom istotności statystycznej.

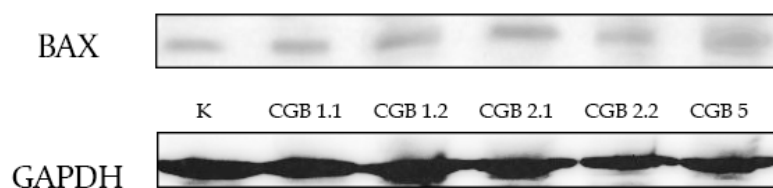
Nadekspresja podjednostki beta hCG prowadziła także do zmian w poziomie ekspresji genów *BCL2* i *BAX*. Na podstawie wyników testu Kruskala-Wallisa wykazano istotne różnice w poziomach transkryptów *BAX* w komórkach transfekowanych konstrukcjami: CGB 1.1 ($Me = 3,8 E^{-5}$), CGB 1.2 ($Me = 3,6 E^{-5}$) oraz CGB 2.1 ($Me = 3,6 E^{-5}$), w porównaniu do poziomu notowanego dla prób kontrolnych ($Me = 1,8 E^{-5}$); (odpowiednio: $p = 0,043$, $p = 0,008$, $p = 0,008$). Istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji *BAX* nie zanotowano w przypadku transfekcji komórek konstrukcjami CGB 2.2 oraz CGB 5 ($p > 0,05$); (Rycina 37.).

Wykorzystując test *post hoc* Dunna porównano również poziom ekspresji *BAX* w komórkach transfekowanych poszczególnymi konstrukcjami. Na tej podstawie stwierdzono istotne różnice we względnym poziomie ekspresji jedynie w przypadku konstrukcji: CGB 1.1 vs CGB 2.2 ($Me = 3,8 E^{-5}$ vs $Me = 2,1 E^{-5}$; $p = 0,046$); (Rycina 37.).

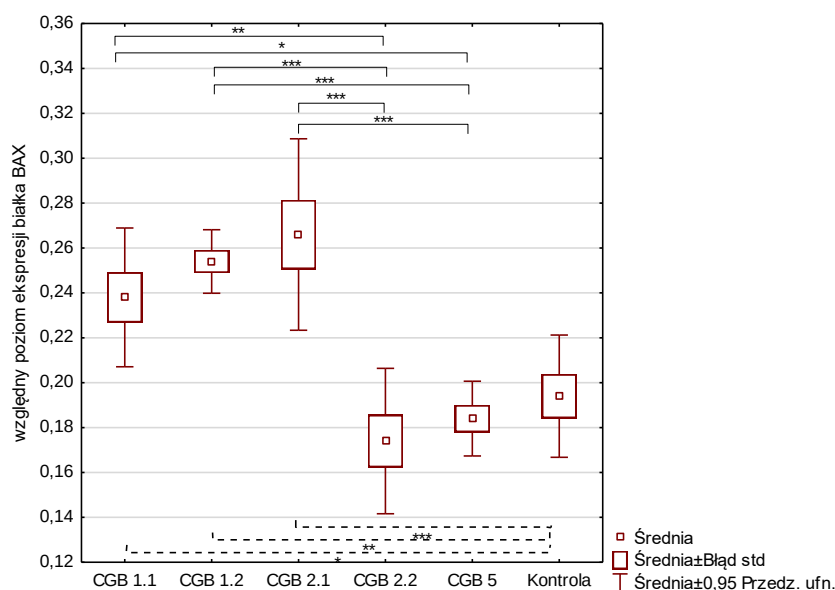


Rycina 37. Relatywny poziom ekspresji genu *BAX* przyrównany do poziomu ekspresji genu referencyjnego *HPRT*, w komórkach linii HeLa transfekowanych konstruktami CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5. Kontrolę stanowiły komórki niepoddane transfekcji. Linie ciągłe nad wykresami ramka-wąsy wskazują na różnice w poziomach ekspresji *BAX* pomiędzy konstruktami użytymi podczas transfekcji. Linie przerywane pod wykresami ramka-wąsy wskazują różnice pomiędzy konstruktami a kontrolą. Użyte oznaczenia istotności różnic: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Zauważono, że także na poziomie białkowym względny poziom ekspresji białka BAX (normalizowany względem poziomu białka GAPDH) był istotnie wyższy w komórkach transfekowanych konstruktami CGB 1.1 ($M = 0,238 \pm 0,011$), CGB 1.2 ($M = 0,254 \pm 0,005$) oraz CGB 2.1 ($M = 0,266 \pm 0,015$), w porównaniu do poziomu notowanego dla prób kontrolnych ($M = 0,194 \pm 0,001$) (odpowiednio: $p = 0,026$, $p = 0,002$, $p = 0,0003$); (Rycina 38. i 39.).



Rycina 38. Reprezentatywny wynik detekcji białek BAX oraz GAPDH w izolatach białkowych z linii komórkowej HeLa siedemdziesiąt dwie godziny po transfekcji, uzyskany metodą western blot. CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 - izolaty białkowe z komórek poddawanych transfekcji z użyciem wybranego konstrukt. K - komórki kontrolne, nietransfekowane.



Rycina 39. Względny poziom ekspresji białka BAX oznaczony w izolatach komórek HeLa, znormalizowany wobec białka referencyjnego GAPDH. CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 – izolaty białkowe z komórek poddawanych transfekcji z użyciem wybranego konstruktu. Kontrolę stanowiły komórki nietransfekowane. Linie ciągłe nad wykresami ramka-wąsy wskazują na różnice w poziomie białka BAX pomiędzy konstruktami użytymi podczas transfekcji. Linie przerywane pod wykresami ramka-wąsy wskazują różnice pomiędzy konstruktami a kontrolą. Oznaczenia istotności różnic: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Dodatkowo porównano wpływ poszczególnych konstruktów CGB na poziom białka BAX. Zastosowany w tym celu test *post hoc* Tukeya wykazał, iż zastosowanie konstruktów CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2 oraz CGB 5 wpływa na poziom białka BAX, zaś różnice występujące pomiędzy próbami są istotnie statystyczne (Tabela 22.).

Tabela 22. Wyniki analiz statystycznych względnych poziomów ekspresji białka BAX oznaczonych w izolatach komórek HeLa, znormalizowanych względem białka referencyjnego GAPDH. CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 – izolaty białkowe z komórek poddanych transfekcji wybranym konstruktom CGB

konstrukty			M, S		p	
CGB 1.1	vs	CGB 2.2	0,238 ± 0,011	vs	0,174 ± 0,012	0,002
CGB 1.1	vs	CGB 5	0,238 ± 0,011	vs	0,184 ± 0,006	0,014
CGB 1.2	vs	CGB 2.2	0,254 ± 0,005	vs	0,174 ± 0,012	0,0003
CGB 1.2	vs	CGB 5	0,254 ± 0,005	vs	0,184 ± 0,006	0,0002
CGB 2.1	vs	CGB 2.2	0,266 ± 0,0015	vs	0,174 ± 0,012	0,0002
CGB 2.1	vs	CGB 5	0,266 ± 0,0015	vs	0,184 ± 0,006	0,0002

Legenda:

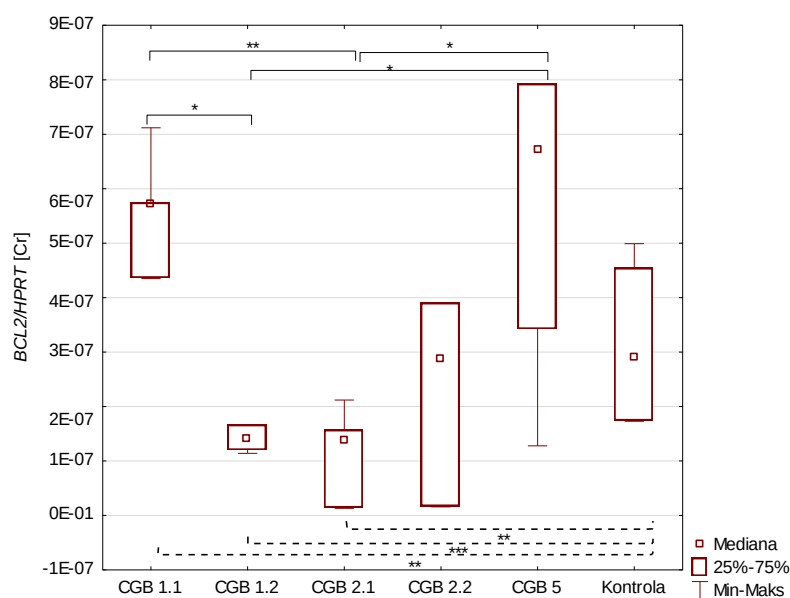
M – średnia arytmetyczna;

S – odchylenie standardowe;

p – poziom istotności statystycznej.

Kolejne analizy, tym razem poziomu transkryptów genu *BCL2* dowiodły, że w komórkach transfekowanych konstruktem CGB 1.1 dochodzi do istotnego ($p = 0,008$) wzrostu ekspresji *BCL2* ($Me = 5 E^{-7}$), w porównaniu do poziomu uzyskanego w komórkach kontrolnych ($Me = 2,9 E^{-7}$). Istotny statystycznie niższy poziom ekspresji *BCL2*, w porównaniu do komórek kontrolnych, zauważono w przypadku komórek transfekowanych konstruktem CGB 1.2 ($Me = 1 E^{-7}$) oraz CGB 2.1 ($Me = 1 E^{-7}$); (odpowiednio: $p = 0,0007$, $p = 0,008$). Nie zanotowano istotnych statystycznie różnic (względem komórek nietransfekowanych) w poziomie ekspresji *BCL2* w przypadku konstruktyw CGB 2.2 oraz CGB 5 ($p > 0,05$); (Rycina 40.).

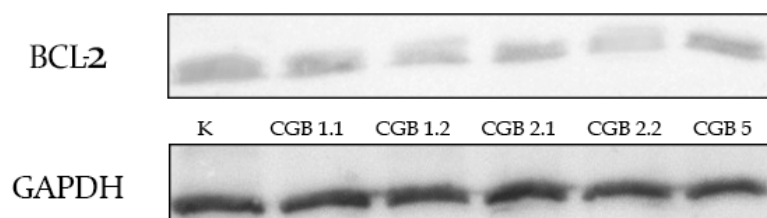
Przy pomocy testu *post hoc* Dunna określono również występowanie różnic w poziomie ekspresji *BCL2* pomiędzy stosowanymi w pracy konstrukcjami. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono istotne różnice we względnym poziomie ekspresji *BCL2* w przypadku konstruktyw: CGB 1.1 *vs* CGB 1.2 ($Me = 5 E^{-7}$ *vs* $Me = 1 E^{-7}$; $p = 0,016$), CGB 1.2 *vs* CGB 5 ($Me = 1 E^{-7}$ *vs* $Me = 6 E^{-7}$; $p = 0,033$), CGB 1.1 *vs* CGB 2.1 ($Me = 5 E^{-7}$ *vs* $Me = 1 E^{-7}$; $p = 0,009$) oraz CGB 2.1 *vs* CGB 5 ($Me = 1 E^{-7}$ *vs* $Me = 6 E^{-7}$; $p = 0,017$); (Rycina 40.).



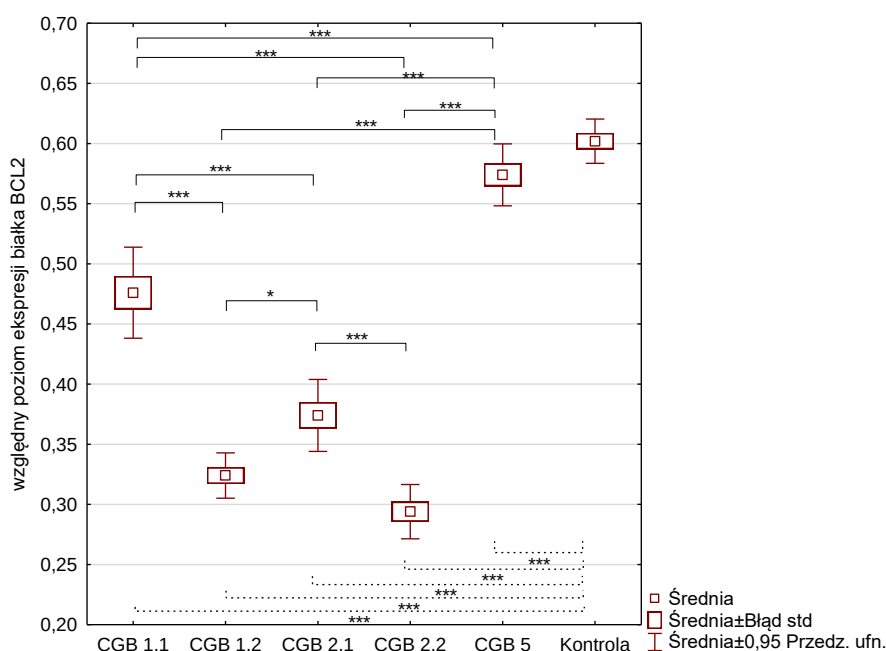
Rycina 40. Relatywny poziom ekspresji genu *BCL2* przyrównany do poziomu ekspresji genu referencyjnego *HPRT* w komórkach linii HeLa transfekowanych konstrukcjami CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5. Kontrolę stanowiły komórki niepoddane transfekcji. Linie ciągłe nad wykresami ramka-wąsy wskazują na różnice w poziomie ekspresji *BCL2* pomiędzy konstrukcjami użytymi podczas transfekcji. Linie przerywane pod wykresami ramka-wąsy wskazują różnice pomiędzy konstrukcjami a kontrolą. Oznaczenia istotności różnic: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

W celu zweryfikowania wyników eksperymentów qPCR przeprowadzono analizy metodą western blot wraz z oceną densytometryczną. Wyniki tych badań wykazały obniżoną ekspresję białka BCL-2 we wszystkich izolatach białkowych otrzymanych z komórek poddanych transfekcji konstrukcjami CGB względem rezultatów uzyskanych

dla prób kontrolnych ($M = 0,602 \pm 0,014$). Najniższy poziom białka BCL-2 zaobserwowano w komórkach transfekowanych konstruktem CGB 2.2 ($M = 0,294 \pm 0,018$); ($p < 0,0001$). Istotny statystycznie niższy poziom białka BCL-2, względem tego notowanego w komórkach kontrolnych, obserwowany był w przypadku transfekcji konstrukctami: CGB 1.1 ($M = 0,476 \pm 0,03$), CGB 1.2 ($M = 0,324 \pm 0,015$), CGB 2.1 oraz ($M = 0,374 \pm 0,024$); ($p < 0,0001$); (Rycina 41. i 42.).



Rycina 41. Reprezentatywny wynik detekcji białka BCL-2 oraz GAPDH metodą western blot, uzyskany dla izolatów białkowych komórek HeLa siedemdziesiąt dwie godziny od transfekcji. CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 – izolaty białkowe z komórek poddawanych transfekcji z użyciem wybranego konstruktów. K – komórki kontrolne, nietransfekowane.



Rycina 42. Względny poziom ekspresji białka BCL-2 oznaczony w izolatach linii HeLa, znormalizowany wobec białka referencyjnego GAPDH. CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 – izolaty białkowe z komórek poddanych transfekcji z użyciem wybranego konstruktów. Kontrolę stanowiły komórki nietransfekowane. Linie ciągłe nad wykresami ramka-wąsy wskazują na różnice w poziomie białka BCL-2 pomiędzy konstrukctami użytymi podczas transfekcji. Linie przerywane pod wykresami ramka-wąsy wskazują różnice pomiędzy konstrukctami a kontrolą. Użyte oznaczenia istotności różnic: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Porównano również poziom białka BCL-2 w komórkach transfekowanych poszczególnymi konstrukctami. Test *post hoc* Tukeya, wykazał, że zastosowanie

odpowiednich konstruktów, tj. CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2 oraz CGB 5 wpływało na poziom BCL-2, zaś różnice występujące pomiędzy próbami były istotne statystycznie (w każdym przypadku $p < 0,05$); (Tabela 23.).

Tabela 23. Wyniki analiz statystycznych względnych poziomów ekspresji białka BCL-2 oznaczonych w izolatach komórek HeLa, znormalizowanych wobec białka referencyjnego GAPDH. CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 – izolaty białkowe z komórek poddanych transfekcji wybranym konstruktem CGB

konstrukty			M, S		p	
CGB 1.1	vs	CGB 1.2	0,476 ± 0,03	vs	0,324 ± 0,015	0,0001
CGB 1.1	vs	CGB 2.1	0,476 ± 0,03	vs	0,374 ± 0,024	0,0001
CGB 1.1	vs	CGB 2.2	0,476 ± 0,03	vs	0,294 ± 0,018	0,0001
CGB 1.1	vs	CGB 5	0,476 ± 0,03	vs	0,574 ± 0,02	0,0001
CGB 1.2	vs	CGB 2.1	0,324 ± 0,015	vs	0,374 ± 0,024	0,012
CGB 1.2	vs	CGB 5	0,324 ± 0,015	vs	0,574 ± 0,02	0,0001
CGB 2.1	vs	CGB 2.2	0,374 ± 0,024	vs	0,294 ± 0,018	0,0002
CGB 2.1	vs	CGB 5	0,374 ± 0,024	vs	0,574 ± 0,02	0,0001
CGB 2.2	vs	CGB 5	0,294 ± 0,018	vs	0,574 ± 0,02	0,0001

Legenda:

M – średnia arytmetyczna;

S – odchylenie standardowe;

p – poziom istotności statycznej.

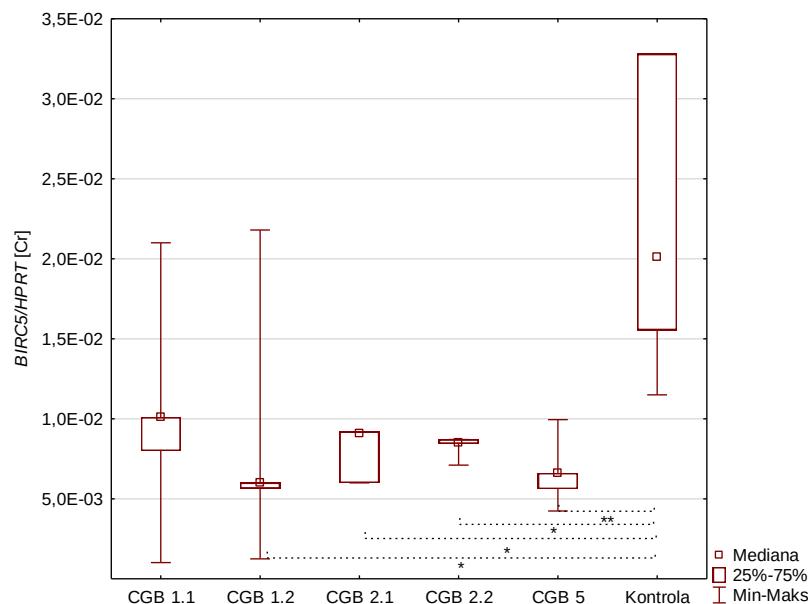
4.3.9. Ocena poziomu transkryptów oraz białka genów kodujących czynniki regulujące proces apoptozy: *BAX*, *BCL2* i *BIRC5* w komórkach linii Ishikawa poddanych transfekcji konstruktami CGB1, CGB2 oraz CGB5

Podobnie jak w przypadku komórek linii HeLa, siedemdziesiąt dwie godziny po transfekcji komórek linii Ishikawa, przeprowadzając reakcję qPCR oraz western blot, oceniano w nich poziomy transkryptów i białek genów: *BAX*, *BCL2* i *BIRC5*.

Wyniki poddano analizom statystycznym wykorzystując test Kruskala-Wallisa. Na jego podstawie w komórkach transfekowanych konstruktami CGB stwierdzono występowanie istotnych różnic w poziomie ekspresji badanych genów ($p < 0,0001$). Za pomocą testu U-Manna-Whitneya wykazano istotnie obniżony, w porównaniu do poziomu notowanego dla prób kontrolnych ($Me = 0,02$), poziom transkryptu *BIRC5* w przypadku komórek transfekowanych konstruktami: CGB 1.2 ($Me = 0,006$), CGB 2.1 ($Me = 0,009$), CGB 2.2 ($Me = 0,008$) oraz CGB 5 ($Me = 0,006$); (odpowiednio: $p = 0,022$,

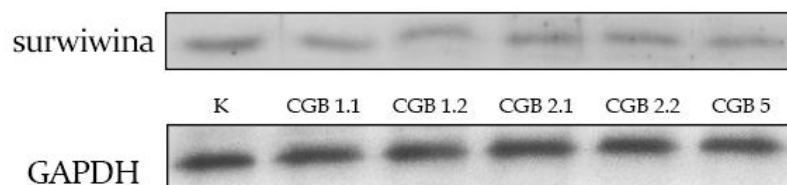
$p=0,011$, $p = 0,011$, $p = 0,005$). Różnicy w poziomie ekspresji *BIRC5* nie stwierdzono w przypadku komórek transfekowanych konstruktem CGB 1.1 (Rycina 43.).

Wyniki testu *post hoc* Dunna wykazały brak istotnych różnic we względnym poziomie ekspresji *BIRC5* w zależności od wykorzystanego konstrukt (Rycina 43.).

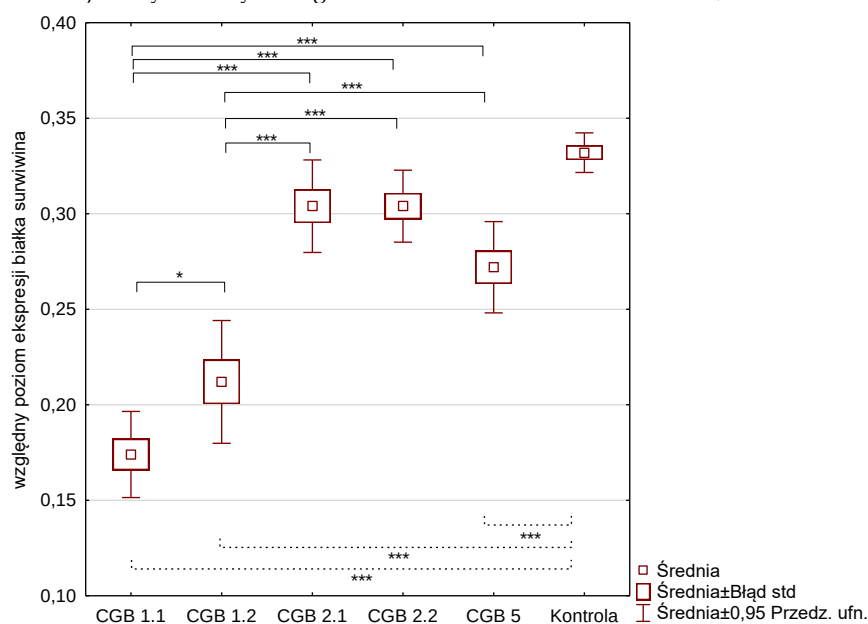


Rycina 43. Relatywny poziom ekspresji genu *BIRC5*, przyrównany do poziomu ekspresji genu referencyjnego *HPRT*, w komórkach linii Ishikawa transfekowanych konstrukcjami CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5. Kontrolę stanowiły komórki niepoddane transfekcji. Linie ciągłe nad wykresami ramka-wąsy wskazują na różnice w poziomie ekspresji *BIRC5* pomiędzy konstrukcjami użytymi podczas transfekcji. Linie przerywane pod wykresami ramka-wąsy wskazują różnice pomiędzy konstrukcjami a kontrolą. Użyte oznaczenia istotności różnic: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Zmiany poziomu ekspresji genu *BIRC5* w komórkach Ishikawa transfekowanych konstrukcjami CGB potwierdzano także na poziomie białka. Analizy prowadzono metodą western blot i densytometrycznie mierząc względną ilość białka surwiwiny, normalizowanego względem poziomu ekspresji referencyjnego białka GAPDH. Użycie testu *post hoc* Dunnetta dowiodło, że w przypadku konstrukcji: CGB 1.1 ($M = 0,174 \pm 0,018$), CGB 1.2 ($M = 0,212 \pm 0,025$) oraz CGB 5 ($M = 0,272 \pm 0,019$) ilość surwiwiny w transfektantach różniła się istotnie w porównaniu do poziomu zanotowanego dla prób kontrolnych ($M = 0,332 \pm 0,004$); ($p < 0,0001$); (Rycina 44. i 45.).



Rycina 44. Reprezentatywny wynik detekcji białka surwiwina oraz GAPDH w izolatach białkowych z linii komórkowej Ishikawa siedemdziesiąt dwie godziny po transfekcji, uzyskany metodą western blot. CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 – izolaty białkowe z komórek poddawanych transfekcji z użyciem wybranego konstruktu. K – komórki kontrolne, nietransfekowane.



Rycina 45. Względny poziom ekspresji białka surwiwina oznaczony w izolatach linii Ishikawa, znormalizowany wobec białka referencyjnego GAPDH. CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 – izolaty białkowe z komórek poddanych transfekcji z użyciem wybranego konstruktu. Kontrolę stanowiły komórki nietransfekowane. Linie ciągłe nad wykresami ramka-wąsy wskazują na różnice w poziomie białka surwiwina pomiędzy konstrukcjami użytymi podczas transfekcji. Linie przerywane pod wykresami ramka-wąsy wskazują różnice pomiędzy konstrukcjami a kontrolą. Użyte oznaczenia istotności różnic: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Dodatkowo porównano poziomy ekspresji białka surwiwiny w komórkach transfekowanych poszczególnymi konstrukcjami CGB. Zastosowany test *post hoc* Tukeya wykazał, iż konstrukty: CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2 oraz CGB 5 wpływają istotnie na zmiany poziomów surwiwiny (Tabela 24.).

Tabela 24. Wyniki analiz statystycznych względnych poziomów ekspresji białka surwiwina w izolatach komórkowych linii Ishikawa, znormalizowanych wobec białka referencyjnego GAPDH. CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 - izolaty komórkowe poddawane transfekcji z użyciem wybranego konstruktów

konstrukty			M, S		p	
CGB 1.1	vs	CGB 1.2	0,174 ± 0,018	vs	0,212 ± 0,025	0,03
CGB 1.1	vs	CGB 2.1	0,174 ± 0,018	vs	0,304 ± 0,019	0,0001
CGB 1.1	vs	CGB 2.2	0,174 ± 0,018	vs	0,304 ± 0,015	0,0001
CGB 1.1	vs	CGB 5	0,174 ± 0,018	vs	0,272 ± 0,019	0,0001
CGB 1.2	vs	CGB 2.1	0,212 ± 0,025	vs	0,304 ± 0,019	0,0001
CGB 1.2	vs	CGB 2.2	0,212 ± 0,025	vs	0,304 ± 0,015	0,0001
CGB 1.2	vs	CGB 5	0,212 ± 0,025	vs	0,272 ± 0,019	0,0005

Legenda:

M - średnia arytmetyczna;

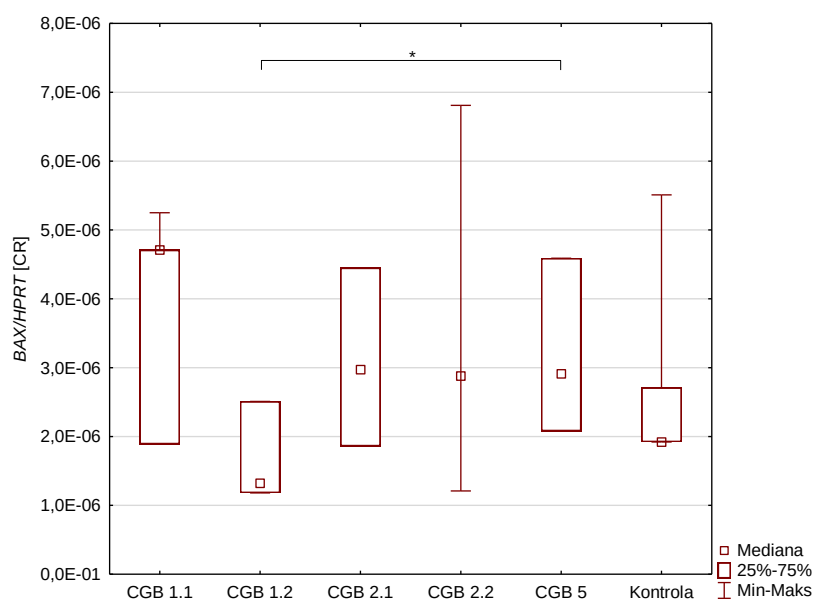
S - odchylenie standardowe;

p - poziom istotności statystycznej.

W dalszej kolejności określano wpływ nadekspresji podjednostki beta hCG w komórkach Ishikawa na zmiany w poziomie ekspresji genów *BCL2* i *BAX*.

Analiza statystyczna (test Kruskala-Wallisa) wyników doświadczeń wykonanych metodą qPCR nie wykazała istotnych różnic w poziomach transkryptów *BAX* w przypadku komórek transfekowanych wszystkimi konstruktami: CGB 1.1 ($Me = 5 E^{-6}$), CGB 1.2 ($Me = 1 E^{-6}$), CGB 2.1 ($Me = 3 E^{-6}$), CGB 2.2 ($Me = 3 E^{-6}$) oraz CGB 5 ($Me = 3 E^{-6}$), w porównaniu do prób kontrolnych ($Me = 2 E^{-6}$); ($p > 0,05$); (Rycina 46.).

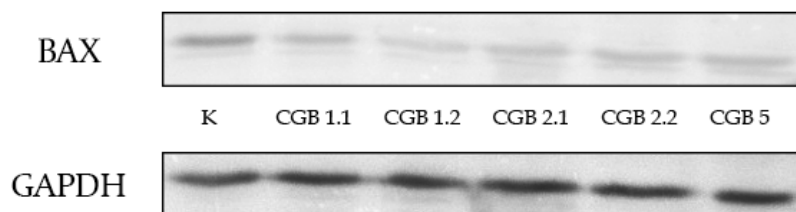
Za pomocą testu *post hoc* Dunna, określono obecność różnic pomiędzy poszczególnymi konstruktami CGB w potencjale do indukowania zmian w ekspresji genu *BAX*. Na podstawie wykonanych analiz stwierdzono istotne różnice we względnym poziomie ekspresji jedynie w przypadku wykorzystania w transfekcji następujących konstruktów: CGB 1.2 vs CGB 5 ($Me = 1 E^{-6}$ vs $Me = 3 E^{-6}$; $p = 0,04$); (Rycina 46.).



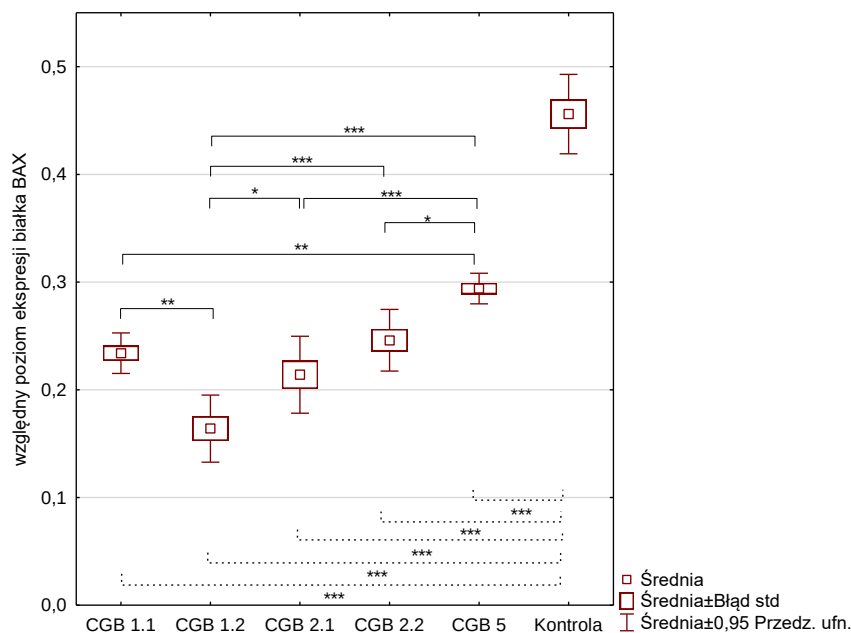
Rycina 46. Relatywny poziom ekspresji genu *BAX* przyrównany do poziomu ekspresji genu referencyjnego *HPRT* w komórkach linii Ishikawa transfekowanych konstrukcjami CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5. Kontrolę stanowiły komórki niepoddane transfekcji. Linie ciągłe nad wykresami ramka-wąsy wskazują na różnice w poziomie ekspresji *BAX* pomiędzy konstrukcjami użytymi podczas transfekcji. Linie przerywane pod wykresami ramka-wąsy wskazują różnice pomiędzy konstrukcjami a kontrolą. Oznaczenia istotności różnic: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Dokonując oceny (z użyciem testu *post hoc* Dunnetta) wpływu konstruktyw CGB na ekspresję *BAX* na poziomie białkowym dowiedziono, że względny poziom ekspresji białka *BAX* różnił się istotnie w komórkach transfekowanych wszystkimi konstrukcjami: CGB 1.1 ($M = 0,234 \pm 0,015$), CGB 1.2 ($M = 0,164 \pm 0,025$), CGB 2.1 ($M = 0,214 \pm 0,028$), CGB 2.2 ($M = 0,246 \pm 0,023$) oraz CGB 5 ($M = 0,294 \pm 0,011$), w odniesieniu do poziomu odnotowanego dla prób kontrolnych ($M = 0,456 \pm 0,029$); (we wszystkich przypadkach $p < 0,0001$); (Rycina 47. i 48.).

Dodatkowo wykonano porównanie poziomów ekspresji *BAX* na poziomie białka pomiędzy komórkami transfekowanymi poszczególnymi konstrukcjami. Wykorzystanie testu *post hoc* Tukeya, dowiodło, iż zastosowanie konstruktyw: CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2 oraz CGB 5 wpływało istotnie na poziom białka *BAX* w analizowanych próbach (Tabela 25.).



Rycina 47. Reprezentatywny wynik detekcji białek BAX oraz GAPDH w izolatach białkowych z linii komórkowej Ishikawa siedemdziesiąt dwie godziny po transfekcji, uzyskany metodą western blot. CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 – izolaty białkowe z komórek poddawanych transfekcji z użyciem wybranego konstruktu. K – komórki kontrolne, nietransfekowane.



Rycina 48. Względny poziom ekspresji białka BAX oznaczony w izolatach komórkowych linii Ishikawa, znormalizowany wobec białka referencyjnego GAPDH. CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 – izolaty białkowe z komórek poddawanych transfekcji z użyciem wybranego konstruktu. Kontrolę stanowiły komórki nietransfekowane. Linie ciągłe nad wykresami ramka-wąsy wskazują na różnice w poziomie białka BAX pomiędzy konstruktami użytymi podczas transfekcji. Linie przerywane pod wykresami ramka-wąsy wskazują różnice pomiędzy konstruktami a kontrolą. Oznaczenia istotności różnic: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabela 25. Wyniki analiz statystycznych względnych poziomów ekspresji białka BAX oznaczonych w izolatach białkowych Ishikawa, znormalizowanych wobec białka referencyjnego GAPDH. CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 – izolaty z komórek poddawanych transfekcji z użyciem wybranego konstruktu

konstrukty			M, S		p	
CGB 1.1	vs	CGB 1.2	0,234 ± 0,015	vs	0,164 ± 0,025	0,0011
CGB 1.1	vs	CGB 5	0,234 ± 0,015	vs	0,294 ± 0,011	0,005
CGB 1.2	vs	CGB 2.1	0,164 ± 0,025	vs	0,214 ± 0,028	0,02
CGB 1.2	vs	CGB 2.2	0,164 ± 0,025	vs	0,246 ± 0,023	0,0002
CGB 1.2	vs	CGB 5	0,164 ± 0,025	vs	0,294 ± 0,011	0,0001
CGB 2.1	vs	CGB 5	0,214 ± 0,028	vs	0,294 ± 0,011	0,0003
CGB 2.2	vs	CGB 5	0,246 ± 0,023	vs	0,294 ± 0,011	0,03

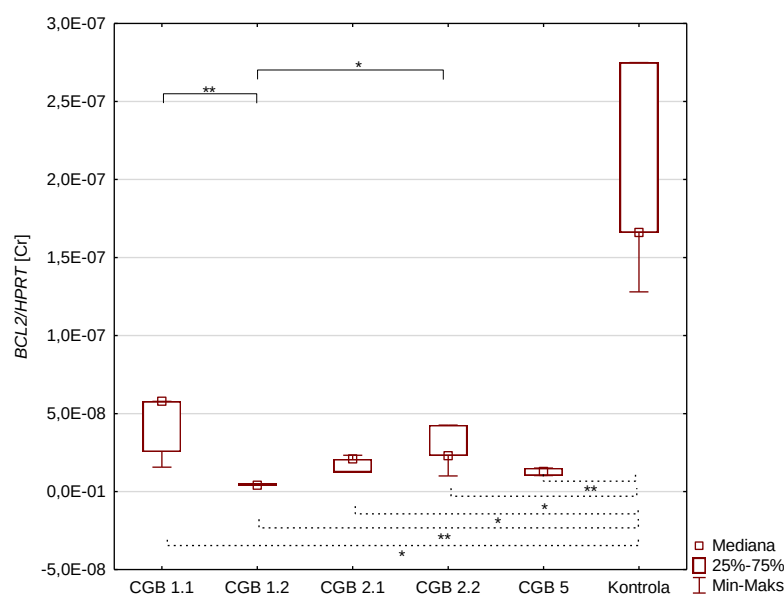
Legenda:

M – średnia arytmetyczna;

S – odchylenie standardowe;

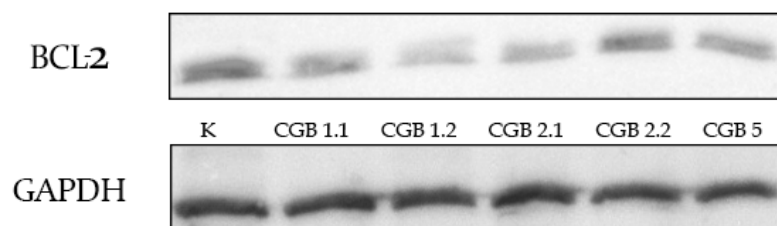
p – poziom istotności statystycznej.

W przypadku analiz (przeprowadzonych z wykorzystaniem testu U-Manna-Whitneya) zmian w poziomie transkryptów *BCL2* w komórkach Ishikawa transfekowanych konstrukcjami CGB zauważono istotnie obniżony poziom transkryptów *BCL2*, w porównaniu do poziomu mRNA tego genu odnotowanego dla prób kontrolnych ($Me = 2 \cdot 10^{-7}$). W przypadku komórek transfekowanych poszczególnymi konstrukcjami poziom ten wynosił odpowiednio: CGB 1.1 – $Me = 5 \cdot 10^{-8}$, CGB 1.2 – $Me = 4 \cdot 10^{-9}$, CGB 2.1 – $Me = 2 \cdot 10^{-8}$, CGB 2.2 – $Me = 2 \cdot 10^{-8}$ oraz CGB 5 – $Me = 1 \cdot 10^{-8}$; (odpowiednio: $p = 0,011$, $p = 0,002$, $p = 0,011$, $p = 0,011$, $p = 0,005$); (Rycina 49.). Różnice pomiędzy badanymi konstrukcjami określano także za pomocą testu *post hoc* Dunna. Jego wyniki pozwoliły na stwierdzenie występowania istotnych różnic we względnym poziomie ekspresji genu *BCL2* w przypadku zastosowania konstrukcji: CGB 1.1 vs CGB 1.2 ($Me = 5 \cdot 10^{-8}$ vs $Me = 4 \cdot 10^{-9}$; $p = 0,002$) oraz CGB 1.2 vs CGB 2.2 ($Me = 4 \cdot 10^{-9}$ vs $Me = 2 \cdot 10^{-8}$; $p = 0,04$); (Rycina 49.).

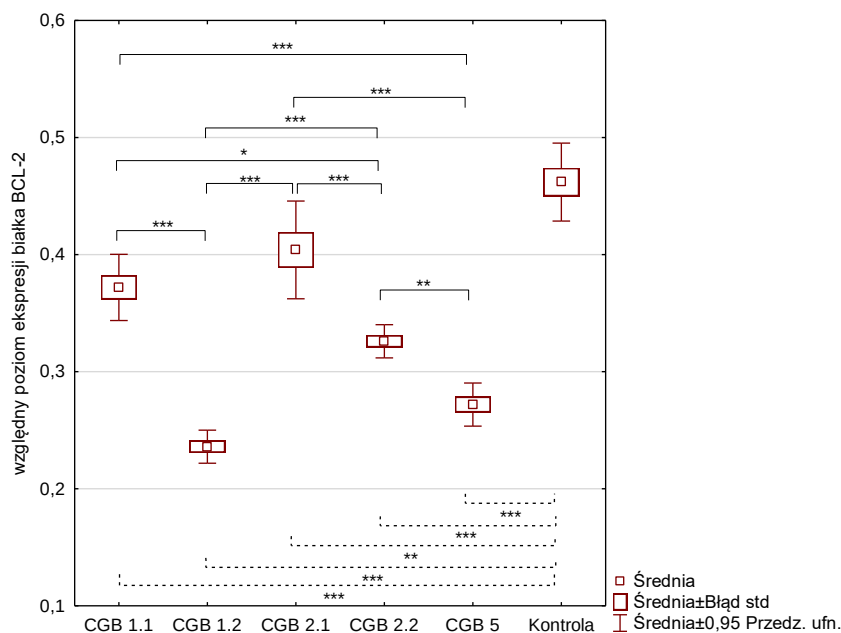


Rycina 49. Relatywny poziom ekspresji genu *BCL2* przyrównany do poziomu ekspresji genu referencyjnego *HPRT* w komórkach linii Ishikawa transfekowanych konstrukcjami CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5. Kontrolę stanowiły komórki niepoddane transfekcji. Linie ciągłe nad wykresami ramka-wąsy wskazują na różnice w poziomie ekspresji *BCL2* pomiędzy konstrukcjami użytymi podczas transfekcji. Linie przerywane pod wykresami ramka-wąsy wskazują różnice pomiędzy konstrukcjami a kontrolą. Użyte oznaczenia istotności różnic: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Badanie zmian ekspresji genu *BCL2* na poziomie białka przeprowadzone metodą western blot wykazało zmiany w ilości produkowanego białka w komórkach transfekowanych konstrukcjami CGB. Analizy densytometryczne pokazały obniżoną ekspresję BCL-2 we wszystkich izolatach białkowych otrzymanych z komórek poddawanych transfekcji. Stosując test *post hoc* Dunnetta zauważono, że w porównaniu do poziomu notowanego dla prób kontrolnych ($M = 0,462 \pm 0,026$), komórki transfekowane konstruktem CGB 1.2 cechuje najniższy poziom białka BCL-2 ($M = 0,236 \pm 0,011$); ($p < 0,0001$). Co więcej, istotnie niższy poziom białka BCL-2, względem komórek kontrolnych, obserwowany był również w przypadku transfekcji konstrukcjami: CGB 1.1 ($M = 0,372 \pm 0,022$; $p < 0,0001$), CGB 2.1 ($M = 0,404 \pm 0,033$; $p = 0,001$), CGB 2.2 oraz ($M = 0,326 \pm 0,011$; $p < 0,0001$) oraz CGB 5 ($M = 0,272 \pm 0,014$; $p < 0,0001$); (Rycina 50. i 51.).



Rycina 50. Reprezentatywny wynik detekcji białek BCL-2 oraz GAPDH w izolatach białkowych z linii komórkowej Ishikawa siedemdziesiąt dwie godziny po transfekcji, uzyskany metodą western blot. CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 – izolaty białkowe z komórek poddawanych transfekcji z użyciem wybranego konstruktu. K – komórki kontrolne, nietransfekowane.



Rycina 51. Względny poziom ekspresji białka BCL-2 oznaczony w izolatach białkowych linii Ishikawa znormalizowany wobec białka referencyjnego GAPDH. CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 – izolaty białkowe z komórek poddawanych transfekcji z użyciem wybranego konstruktu. Kontrolę stanowiły komórki nietransfekowane. Linie ciągłe nad wykresami ramka-wąsy wskazują na różnice poziomie białka BCL-2 pomiędzy konstruktami użytymi podczas transfekcji. Linie przerywane pod wykresami ramka-wąsy wskazują różnice pomiędzy konstruktami a kontrolą. Oznaczenia istotności różnic: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Wykorzystując test *post hoc* Tukeya porównano również poziomy białka BCL-2 pomiędzy analizowanymi konstruktami. Wykazano, iż zastosowanie konstruktów: CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2 oraz CGB 5 wpływa na poziom białka BCL-2, zaś różnice występujące pomiędzy próbami są istotne statystycznie (Tabela 26.).

Tabela 26. Wyniki analiz statystycznych względnych poziomów ekspresji białka BCL-2 oznaczonych w izolatach komórkowych linii Ishikawa, znormalizowanych wobec białka referencyjnego GAPDH. CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 - izolaty komórkowe poddawane transfekcji z użyciem wybranego konstruktu

konstrukty			M, S		p	
CGB 1.1	<i>vs</i>	CGB 1.2	0,372 ± 0,022	<i>vs</i>	0,236 ± 0,011	0,0001
CGB 1.1	<i>vs</i>	CGB 2.2	0,372 ± 0,022	<i>vs</i>	0,326 ± 0,011	0,03
CGB 1.1	<i>vs</i>	CGB 5	0,372 ± 0,022	<i>vs</i>	0,272 ± 0,014	0,0001
CGB 1.2	<i>vs</i>	CGB 2.1	0,236 ± 0,011	<i>vs</i>	0,404 ± 0,033	0,0001
CGB 1.2	<i>vs</i>	CGB 2.2	0,236 ± 0,011	<i>vs</i>	0,326 ± 0,011	0,0001
CGB 2.1	<i>vs</i>	CGB 2.2	0,404 ± 0,033	<i>vs</i>	0,326 ± 0,011	0,0001
CGB 2.1	<i>vs</i>	CGB 5	0,404 ± 0,033	<i>vs</i>	0,272 ± 0,014	0,0001
CGB 2.2	<i>vs</i>	CGB 5	0,326 ± 0,011	<i>vs</i>	0,272 ± 0,014	0,007

Legenda:

M - średnia arytmetyczna;

S - odchylenie standardowe;

p - poziom istotności statystycznej.

4.3.10. Ocena wpływu nadekspresji CGB1, CGB2 oraz CGB5 na indukowaną apoptozę komórek linii HeLa oraz Ishikawa

Aby ocenić wpływ nadekspresji podjednostki beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej na indukcję apoptozy, komórki linii HeLa oraz Ishikawa traktowano związkiem PK 11195.

Komórki poddano działaniu związku w początkowo testowanych stężeniach w zakresie 10 – 100 µM.

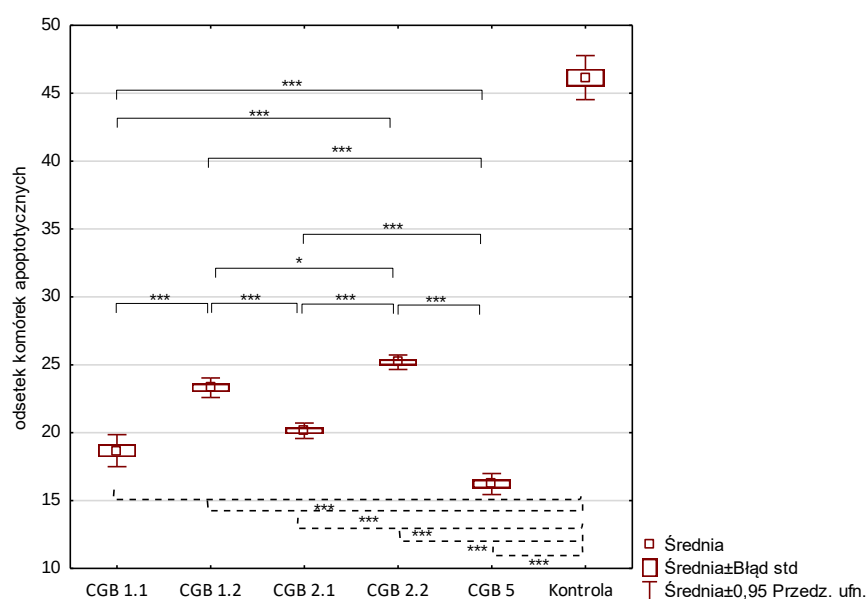
Zmiany morfologiczne charakterystyczne dla procesu apoptozy oceniano po 24 godzinach inkubacji z PK 11195, stosując mieszaninę barwników fluorescencyjnych – bisbenzimidu (Hoechst 33342) oraz jodku propidyny zgodnie z protokołem opisanym w podrozdziale 3.2.19.

Do dalszych doświadczeń, w których PK 11195 podawano do komórek 48 godzin po transfekcji konstruktami CGB, wybrano stężenie 100 µM. Wybrano je ze względu na fakt, że indukowało ono najwyższy – 50% odsetek apoptozy w kontrolnych komórkach przy jednocześnie niskim – 5% odsetku komórek nekrotycznych.

Na podstawie przeprowadzonego testu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA stwierdzono, iż odsetek komórek apoptotycznych, analizowany dwadzieścia cztery godziny od podania związku PK 11195 wykazywał występowanie istotnych różnic pomiędzy analizowanymi konstruktami, w porównaniu z rezultatami uzyskanymi dla

prób kontrolnych ($p < 0,0001$). Zastosowany test *post hoc* Dunnetta wykazał, iż najmniejszym odsetkiem komórek apoptotycznych charakteryzowały się komórki poddane transfekcji z wykorzystaniem konstruktu CGB 5 ($M = 16,22 \pm 0,3$) w porównaniu z odsetkiem zanotowanym w komórkach nietransfekowanych ($M = 46,15 \pm 0,63$); ($p < 0,0001$). Pozostałe konstrukty również wpływały modulująco na odsetek komórek apoptotycznych. Przeprowadzone analizy wykazały, iż w przypadku użycia konstruktów CGB 1.1 ($M = 18,68 \pm 0,46$), CGB 1.2 ($M = 23,31 \pm 0,29$), CGB 2.1 ($M = 20,14 \pm 0,22$) oraz CGB 2.2 ($M = 25,19 \pm 0,21$) odsetek komórek apoptotycznych był istotnie niższy, w porównaniu do komórek kontrolnych ($M = 46,15 \pm 0,63$); ($p < 0,0001$); (Rycina 52. i 53.).

Ponadto, wykorzystując test *post hoc* Tukeya analizowano wpływ poszczególnych konstruktów CGB na odsetki komórek apoptotycznych po indukcji procesu śmierci komórki (Tabela 27.). Wykazano istotne różnice w odsetku komórek apoptotycznych, w zależności od wykorzystanego do eksperymentu konstruktu. Jedynie pomiędzy CGB 1.1 i CGB 2.1 nie wykazano różnicy istotnej statystycznie ($p > 0,05$); (Rycina 52.).



Rycina 52. Odsetek komórek linii HeLa transfekowanych konstruktami CGB. Kontrolę stanowiły komórki nietransfekowane. Linie ciągłe nad wykresami ramka-wąsy wskazują na różnice obecne pomiędzy konstrukcjami użytymi podczas transfekcji. Linie przerywane pod wykresami ramka-wąsy wskazują różnice pomiędzy konstrukcjami a kontrolą.

Oznaczenia istotności różnic: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabela 27. Wyniki analiz statystycznych (test *post hoc* Tukeya) odsetka komórek apoptotycznych dla linii komórkowej HeLa. CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 – stosowane konstrukty CGB

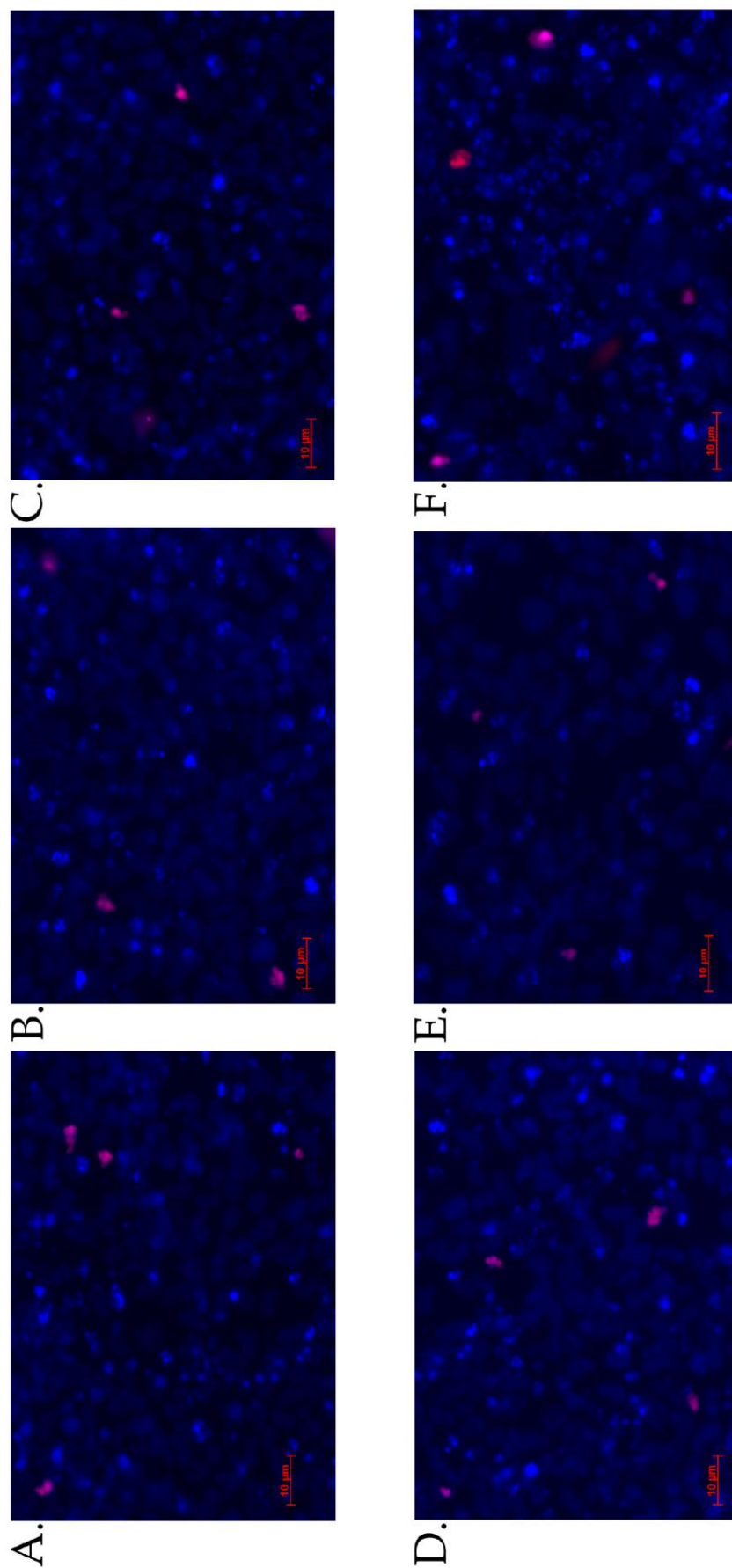
konstrukty			M, S		p	
CGB 1.1	<i>vs</i>	CGB 1.2	18,68 ± 0,46	<i>vs</i>	23,31 ± 0,29	0,0001
CGB 1.1	<i>vs</i>	CGB 2.2	18,68 ± 0,46	<i>vs</i>	25,19 ± 0,21	0,0001
CGB 1.1	<i>vs</i>	CGB 5	18,68 ± 0,46	<i>vs</i>	16,22 ± 0,3	0,001
CGB 1.2	<i>vs</i>	CGB 2.1	23,31 ± 0,29	<i>vs</i>	20,14 ± 0,22	0,0001
CGB 1.2	<i>vs</i>	CGB 2.2	23,31 ± 0,29	<i>vs</i>	25,19 ± 0,21	0,013
CGB 1.2	<i>vs</i>	CGB 5	23,31 ± 0,29	<i>vs</i>	16,22 ± 0,3	0,0001
CGB 2.1	<i>vs</i>	CGB 2.2	20,14 ± 0,22	<i>vs</i>	25,19 ± 0,21	0,0001
CGB 2.1	<i>vs</i>	CGB 5	20,14 ± 0,22	<i>vs</i>	16,22 ± 0,3	0,0001
CGB 2.2	<i>vs</i>	CGB 5	25,19 ± 0,21	<i>vs</i>	16,22 ± 0,3	0,0001

Legenda:

M – średnia arytmetyczna;

S – odchylenie standardowe;

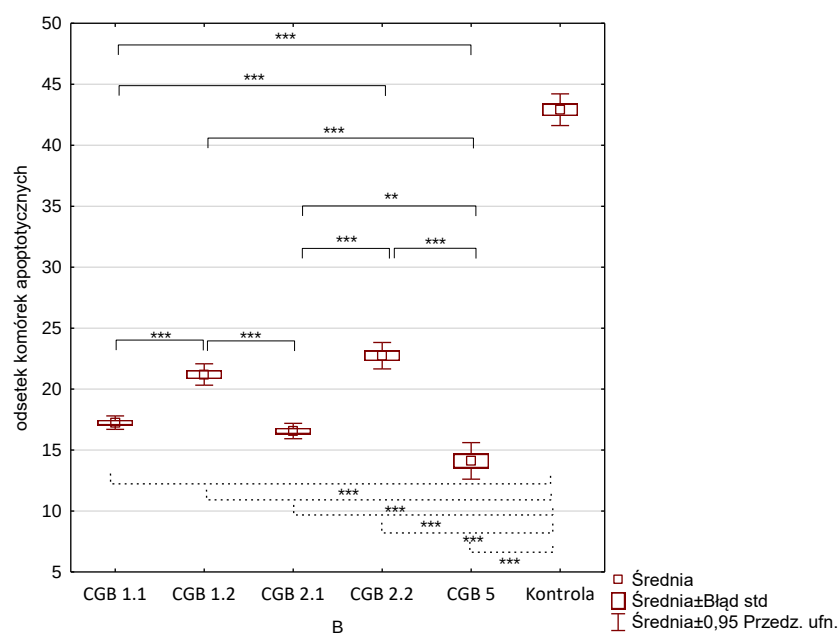
p – poziom istotności statycznej.



Rycina 53. Komórki linii HeLa wybarwione mieszaniną barwników: bisbenzynydu (Hoechst 33342) i jodku propidyny po 24 godzinach od chwili indukcji procesu apoptozy. Komórki transfekowane konstrukcjami: CGB 1.1 (A.); CGB 1.2 (B.); CGB 2.1 (C.); CGB 2.2 (D.); CGB 5 (E.) oraz komórki kontrolne (F.), nietransfekowane. Oryginalne powiększenie 400 x.

W przypadku komórek linii Ishikawa, na podstawie przeprowadzonego testu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA stwierdzono, iż odsetek komórek apoptotycznych, analizowany dwadzieścia cztery godziny od podania związku PK 11195, wykazywał występowanie istotnych różnic pomiędzy analizowanymi konstruktami, w porównaniu z rezultatami uzyskanymi dla prób kontrolnych ($p < 0,0001$). Zastosowany test *post hoc* Dunnetta wykazał, iż najmniejszym odsetkiem komórek apoptotycznych charakteryzowały się komórki poddane transfekcji z wykorzystaniem konstruktu CGB 5 ($M = 14,11 \pm 0,58$), w porównaniu z odsetkiem zanotowanym w komórkach nietransfekowanych ($M = 42,92 \pm 0,51$); ($p < 0,0001$). Pozostałe konstrukty również wpływały modulująco na odsetek komórek apoptotycznych. Przeprowadzone analizy wykazały, iż w przypadku użycia konstruktów CGB 1.1 ($M = 17,25 \pm 0,22$), CGB 2.1 ($M = 16,6 \pm 0,24$), CGB 1.2 ($M = 21,2 \pm 0,37$) oraz CGB 2.2 ($M = 22,74 \pm 0,42$) odsetek komórek apoptotycznych był istotnie niższy, w porównaniu do komórek kontrolnych ($M = 42,92 \pm 0,51$); ($p < 0,0001$); (Rycina 54. i 55.).

Ponadto, wykorzystując test *post hoc* Tukeya analizowano wpływ poszczególnych konstruktyw CGB na liczbę komórek apoptotycznych po indukcji procesu śmierci komórki (Tabela 28.). Wykazano istotne różnice w odsetku komórek apoptotycznych, w zależności od wykorzystanego do eksperymentu konstruktów. Jedynie pomiędzy CGB 1.1 i CGB 2.1 oraz CGB 1.2 i CGB 2.2 różnica nie wykazała istotności statystycznej ($p > 0,05$); (Rycina 54. i 55.).



Rycina 54. Odsetek komórek apoptotycznych linii Ishikawa transfekowanych konstrukcjami CGB. Kontrolę stanowiły komórki nietransfekowane. Linie ciągle nad wykresami ramka-wąsy wskazują na różnice obecne pomiędzy konstrukcjami użytymi podczas transfekcji. Linie przerywane pod wykresami ramka-wąsy wskazują różnice pomiędzy konstrukcjami a kontrolą. Oznaczenia istotności różnic: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabela 28. Wyniki analiz statystycznych (test *post hoc* Tukeya) odsetka komórek apoptotycznych dla linii komórkowej Ishikawa. CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 – stosowane konstrukty CGB

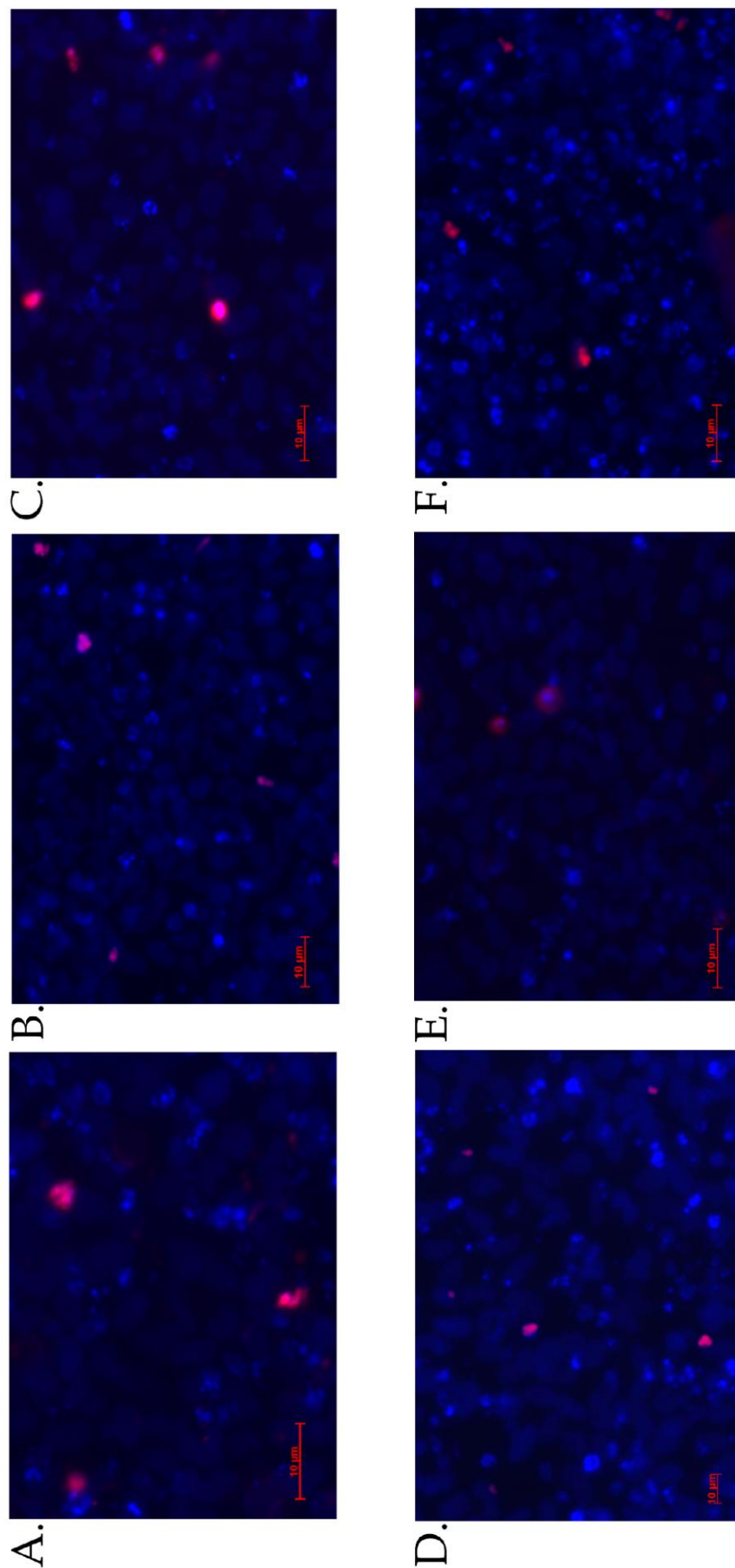
konstrukty			M, S		p	
CGB 1.1	vs	CGB 1.2	17,25 ± 0,22	vs	21,2 ± 0,37	0,0001
CGB 1.1	vs	CGB 2.2	17,25 ± 0,22	vs	22,74 ± 0,42	0,0001
CGB 1.1	vs	CGB 5	17,25 ± 0,22	vs	14,11 ± 0,58	0,0002
CGB 1.2	vs	CGB 2.1	21,2 ± 0,37	vs	16,6 ± 0,24	0,0001
CGB 1.2	vs	CGB 5	21,2 ± 0,37	vs	14,11 ± 0,58	0,0001
CGB 2.1	vs	CGB 2.2	16,6 ± 0,24	vs	22,74 ± 0,42	0,0001
CGB 2.1	vs	CGB 5	16,6 ± 0,24	vs	14,11 ± 0,58	0,003
CGB 2.2	vs	CGB 5	22,74 ± 0,42	vs	14,11 ± 0,58	0,0001

Legenda:

M – średnia arytmetyczna;

S – odchylenie standardowe;

p – poziom istotności statycznej.



Rycina 55. Komórki linii Ishikawa wybarwione mieszaniną barwników: bisbenzynydu (Hoechst 33342) i jodku propidyny po 24 godzinach od chwili indukcji procesu apoptozy. Komórki transfekowane konstrukcjami: CGB 1.1 (A.); CGB 1.2 (B.); CGB 2.1 (C.); CGB 2.2 (D.); CGB 5 (E.) oraz komórki kontrolne (F.), nietransfekowane. Oryginalne powiększenie 400x.

5. Dyskusja

Ludzka gonadotropina kosmówkowa jest glikoproteinowym hormonem, produkowanym przez komórki syncytiotrofoblastu, który odpowiada za podtrzymanie ciąży, stąd potocznie nazywana jest hormonem ciążowym⁹¹. Dotychczas udokumentowano istotny wpływ hCG na szereg procesów związanych z prawidłowym rozwojem i przebiegiem ciąży, między innymi na: implantację zarodka, rozwój kosmówki, prawidłowy przebieg procesów angiogenezy w łożysku, powstawanie tętnic spiralnych odżywiających płód. Gonadotropina kosmówkowa wpływa również na komórki układu immunologicznego, osłabiając odpowiedź matki aktywowaną w wyniku ekspozycji przez płód antygenów ojcowskich^{60,92-96}. Zaburzenia wydzielania hormonu prowadzą do szeregu powikłań, a pomiar jego stężenia w moczu i surowicy wskazuje na nieprawidłowości w przebiegu ciąży⁹⁷.

Innym niemniej ważnym aspektem działania ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej jest jej udział w procesach nowotworowych. Badania ostatnich lat wskazują, że hCG, a w szczególności jej podjednostka beta – hCG β , wpływa modulująco na funkcje życiowe zarówno komórek nowotworów trofoblastycznych, jak również tych niemających pochodzenia trofoblastycznego^{9,98-100}. Co więcej, obecność wolnej podjednostki beta hormonu cechuje przerzuty nowotworowe oraz koreluje ze słabszą odpowiedzią na chemio- i radioterapię i ogólnym złym rokowaniem^{77,101}.

Do powstania podjednostki beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej, zarówno w ciąży jak i podczas nowotworzenia, dochodzi wskutek ekspresji tkankowo zależnych genów mieszczących się na chromosomie 19 (19q13.3), opisanych jako *CGB1-CGB9*. Geny te zostały podzielone na dwa typy, tj. geny pierwszego typu, do których zaliczono *CGB7* i *CGB9* (ich produkt białkowy posiada alaninę w pozycji 117.), oraz geny drugiego typu, do których należą: *CGB3*, *CGB5*, *CGB6* oraz *CGB8* (ich produkt białkowy posiada kwas asparaginowy w pozycji 117.)^{102,103}. Do niedawna niesłusznie sądzono, iż *CGB1* oraz *CGB2* są pseudogenami. Na przestrzeni ostatnich lat wykazano bowiem obecność transkryptów tych genów w prawidłowych tkankach: łożyska, jąder, przysadki oraz tkankach zmienionych nowotworowo: sutka i jajnika oraz w ustalonych liniach komórkowych raka pęcherza moczowego (SCaBER i RT112) i raka piersi (C2235)^{15,20,22,24,90,104-106}.

Poziom ekspresji poszczególnych genów *CGB* nie jest równocenny. W przypadku prawidłowego łożyska genem najbardziej aktywnym transkrypcyjnie jest *CGB5*,

z ekspresją wyższą nawet dwadzieścia razy, w porównaniu do pozostałych genów *CGB*. Niższą aktywność wykazują odpowiednio pozostałe geny: *CGB3*, *CGB6*, *CGB7*, *CGB8*, *CGB9* oraz *CGB1* i *CGB2*, przy czym poziom ekspresji *CGB1* i *2* jest niższy aż tysiąckrotnie^{9,107}.

Mimo, że poziom ekspresji *CGB1* i *CGB2* jest nieproporcjonalnie niższy w porównaniu do całkowitej ekspresji pozostałych *CGB*, wykazano, że transkrypty tych genów odgrywają istotną rolę w procesie inwazji kosmówki i implantacji zarodka¹⁰⁷. Ponadto specyficzne zahamowanie ekspresji genów *CGB1* i *2* w warunkach hodowli *in vitro* jest znacznie bardziej skuteczne w zmniejszaniu liczby komórek rakowych niż wyciszanie pozostałych genów *CGB*¹⁰⁵. Stąd, mimo, iż dotychczas nie udało się wyizolować białkowego produktu *CGB1* oraz *CGB2* sugeruje się, że geny te można uznać za kluczowe dla rozwoju raka.

W świetle tych doniesień, w niniejszej pracy podjęto próbę wykazania aktywności genów *CGB1* i *CGB2* w wybranych rakach żeńskich narządów płciowych oraz określenia wpływu ich ekspresji na biologię komórek nowotworowych w warunkach *in vitro*.

W celu dokonania selekcji odpowiednich linii komórkowych mających stanowić model raka w prowadzonych badaniach *in vitro*, przestudiowano bazy danych TCGA – UALCAN oraz Provisional. W oparciu o przeprowadzone *in silico* analizy stwierdzono, że obecność transkryptów *CGB1*, *CGB2* oraz *CGB5* cechuje tkanki raka endometrium. Porównanie poziomów ekspresji badanych genów, wyrażonych w liczbie transkryptów na milion (TPM), w rakach oraz w tkankach niezmiennych nowotworowo wykazało, że wartości TPM dla tkanek raka endometrium oraz tkanek endometrium niezmiennych nowotworowo różnią się istotnie. Wartości median liczby kopii transkryptów *CGB1*, *CGB2* oraz *CGB5* były wyższe w przypadku tkanek nowotworowych. Dalsze analizy *in silico* pokazały, że prawidłowe tkanki szyjki macicy cechuje brak obecności transkryptów *CGB1* i *CGB2*. W tkankach raka szyjki macicy (typ histopatologiczny: płaskonabłonkowy i mieszany) odnotowano występowanie transkryptów *CGB1* i *CGB2*, jednak w wyniku porównania wartości TPM obu genów w tkankach zmienionych nowotworowo oraz tkankach prawidłowych nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy grupami. Z kolei zarówno tkanki szyjki macicy niezmiennych nowotworowo jak i raki cechowała ekspresja *CGB5*, przy czym wartości median liczby kopii transkryptów *CGB5* były wyższe w przypadku tkanek zmienionych nowotworowo; różnice były istotne statystycznie^{86,88}.

Zgodnie z powyższymi wynikami jako model eksperymentalny w przeprowadzonych w niniejszej pracy badaniach nad wpływem ekspresji genów *CGB1*

i CGB2 na biologię komórek nowotworowych *in vitro* wybrano dwie linie komórkowe – Ishikawa wywodzącą się z ludzkiego nabłonkowego gruczolakoraka endometrium oraz linię HeLa wyprowadzoną z gruczolakoraka szyjki macicy.

Ze względu na brak danych dotyczących białkowego produktu genów CGB1 oraz CGB2, przystępując do badań przeprowadzono analizy *in silico* sekwencji badanych genów, zdeponowane w bioinformatycznych bazach danych. Wykorzystując informacje dotyczące genów CGB1 i CGB2 przygotowano i zastosowano dwa rodzaje konstruktyw zawierających: 1) sekwencję kodującą hipotetyczne białka homologiczne do hCGβ – wektory CGB 1.1 i CGB 2.1 oraz 2) sekwencję uwzględniającą przesunięcie ramki odczytu powodującą powstanie 132. aminokwasowego białka różnego od hCGβ – konstrukty CGB 1.2 i CGB 2.2¹⁸. Jednocześnie jako kontrolę prowadzonych badań zastosowano konstrukt zawierający sekwencję kodującą genu CGB5. Gen ten wybrano ze względu na udowodnioną w literaturze przedmiotu najsilniejszą aktywność transkrypcyjną spośród genów CGB3-9 obserwowaną w różnych typach tkanek, w tym tkankach zmienionych nowotworowo^{9,108}.

Biorąc pod uwagę czas wymagany do przeprowadzenia syntezy białka na matrycy sekwencji kodowanych przez przygotowane konstrukty, wszystkie analizy i obserwacje transfekowanych komórek wykonano po upływie czterdziestu ośmiu i/lub siedemdziesięciu dwóch godzin od momentu transfekcji.

Aby potwierdzić nadekspresję genów kodujących podjednostkę beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej w transfekowanych komórkach, poziom transkryptów CGB sprawdzono metodą qPCR. Analiza wyników pokazała, że transfekcja komórek linii HeLa i Ishikawa wszystkimi przygotowanymi konstruktami prowadziła do zwiększenia ekspresji genów CGB, potwierdzonej na poziomie mRNA. Zanotowane wartości względnego poziomu ekspresji CGB były kilka tysięcy razy wyższe w porównaniu do poziomu obserwowanego w komórkach kontrolnych, niepoddanych transfekcji.

Wykorzystując metodę western blot potwierdzono również, że wykorzystane do transfekcji komórek HeLa i Ishikawa konstrukty CGB 1.1, CGB 2.1 oraz CGB 5 prowadziły do wzrostu poziomu białka hCGβ. W przypadku konstruktyw CGB 1.2 i CGB 2.2 w obu liniach komórkowych nie odnotowano zwiększenia syntezy hCGβ. Brak nadekspresji białka w izolatach z komórek poddawanych transfekcji tymi konstruktami, dowodzi słuszności hipotezy zakładającej, że w wyniku przesunięcia ramki odczytu i wykorzystania alternatywnego kodonu start na matrycy CGB1 i CGB2 powstają białka, różne od klasycznego hCGβ¹⁰⁵. Zatem produkty białkowe konstruktyw CGB 1.2 i CGB 2.2

zawierających sekwencje uwzględniające właśnie alternatywny kodon start mogły pozostać nierozpoznawane przez zastosowane w pracy przeciwciało, skierowane przeciwko klasycznemu hCG β .

Co ciekawe, mimo, iż w komórkach HeLa i Ishikawa transfekowanych wektorami CGB 1.2 i CGB 2.2 nie potwierdzono nadekspresji hCG β na poziomie białka, dalsze analizy wykazały, że transfekcja komórek tymi konstrukcjami, podobnie jak transfekcja komórek konstrukcjami CGB 1.1, CGB 2.1 oraz CGB 5 wpływa na ich czynności życiowe, takie jak proliferacja, zdolność do migracji i apoptoza.

Zróżnicowane, nienowotworowe komórki somatyczne organizmu ludzkiego cechuje określona, maksymalna liczba podziałów komórkowych, zwana limitem Hayflicka¹⁰⁹. Po przekroczeniu tego limitu, dochodzi do zainicjowania w komórkach programowanej śmierci, czyli apoptozy. Sam proces proliferacji komórkowej jest wynikiem złożonych mechanizmów molekularnych, interakcji pomiędzy inhibującymi i stymulującymi czynnikami wzrostowymi, mającymi na celu zapewnienie homeostazy. Także wzajemny stosunek ilościowy białkowych produktów określonych genów uczestniczących w procesie apoptozy decyduje o losach poszczególnych komórek. Komórki nowotworowe, na skutek gromadzonych mutacji w DNA, cechuje utrata kontroli regulacji cyklu komórkowego, co skutkuje m.in. ich ustawiczną proliferacją¹¹⁰. Jednym z kluczowych aspektów lepszego zrozumienia procesów nowotworzenia, także tych toczących się w mikrośrodowisku guza, jest wiedza na temat kinetyki cyklu komórkowego. Cykl komórek somatycznych podzielony jest na dwa główne etapy – mitozę i interfazę, w których, wyszczególnia się cztery fazy: M, G₀/G₁, S, G₂. Całość cyklu jest regulowana między innymi przez kinazy zależne od cyklin (CDK, ang. *cyclin-dependent kinase*). Aktywność CDK zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego jest ściśle kontrolowana; z jednej strony cykl jest zarządzany przez sygnały mitogenne, z drugiej strony może być hamowany przez aktywację punktów kontrolnych cyklu w odpowiedzi na uszkodzenie DNA¹¹¹. Oprócz kinaz zależnych od cyklin kluczowych, dla przejścia pomiędzy poszczególnymi fazami cyklu, ważny jest także szereg innych czynników. Jednym z takich czynników może być podjednostka beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej.

W celu oceny wpływu nadekspresji hCG β na cykl życiowy komórek nowotworowych linii HeLa i Ishikawa konstrukcjami kodującymi geny *CGB1*, *CGB2* i *CGB5*, transfektanty analizowano metodą cytometrii przepływowej, po wybarwieniu komórek jodkiem propidyny. Otrzymane wyniki wykazały, że użycie dwóch

z przygotowanych w pracy konstruktów: CGB 2.1 oraz CGB 5 zwiększało (o średnio prawie dziesięć punktów procentowych) liczebność komórek HeLa w fazie S (jednocześnie zmniejszając odsetek komórek w fazie G0/G1). Uzyskane wyniki dowodzą, iż konstrukty genowe CGB 2.1 oraz CGB 5 działają promująco na proliferację komórek linii HeLa.

Z kolei analiza cyklu komórek linii Ishikawa wykazała, że transfekcja komórek konstruktami: CGB 1.1, CGB 2.1 oraz CGB 5 istotnie zwiększała odsetek komórek proliferujących, znajdujących się w fazie S (przyrost wynosił średnio trzy-cztery punkty procentowe, względem odsetka zanotowanego dla komórek kontrolnych). Konstrukty CGB 2.1, CGB 2.2 oraz CGB 5 wpływały istotnie na zwiększenie odsetka komórek w fazie G2/M (wyniósł on średnio trzy-cztery punkty procentowe więcej niż odsetek zanotowany dla komórek kontrolnych).

Ocenę faz cyklu komórkowego wykorzystującą metodę barwienia DNA po raz pierwszy opisano w latach sześćdziesiątych XX wieku¹¹². Pomiar zawartości DNA komórkowego w jednym punkcie czasowym pozwala na stosunkowo prostą analizę cyklu. Takie oznaczenie pokazuje stan cyklu życiowego komórek znajdujących się w fazie G0/G1 (2n), S (2n-4n) i G2/M (4n)¹¹³. Należy zwrócić uwagę, iż mimo rozwoju technik wykorzystujących nowe barwniki fluorescencyjne, pozwalających na kompleksową analizę zawartości DNA i ocenę markerów związanych z proliferacją, ocena cyklu komórkowego może nadal wiązać się z pewnymi ograniczeniami. Nawet stosowanie kilku barwników nie pozwala na oszacowanie szczegółowych zmian w cyklu życiowym i tak na przykład powszechnie znanym jest fakt, iż ocena zawartości DNA nie jest w stanie odróżnić komórek będących w fazie G0 od komórek fazy G1¹¹⁴.

Stąd, aby określić, czy nadekspresja analizowanych w niniejszej pracy genów kodujących hCGB rzeczywiście reguluje proces proliferacji komórek, postanowiono przeprowadzić dodatkowe eksperymenty, pozwalające na rzeczywistą ocenę zmian liczebności komórek znajdujących się w fazie S cyklu komórkowego.

Obecnie znany jest szereg metod umożliwiających szczegółową ocenę cyklu życiowego komórek. I tak na przykład komórki będące w fazie G0/G1 oraz w fazie S można zidentyfikować za pomocą określonych białek związanych z proliferacją i/lub antygenów proliferacji jądrowej, takich jak Ki-67 i antygen jądrowy komórek proliferujących (PCNA, ang. *proliferating cell nuclear antigen*). Antygen Ki-67 jest rzadko wykrywany w fazie G0, natomiast jest silnie wyrażany w regionie jądrowym komórek proliferujących (maksimum w fazie G2 i wczesnej fazie M), a podczas anafazy i telofazy

podziału mitotycznego szybko ulega degradacji¹¹⁵. Z kolei PCNA jest dobrym markerem do oceny odsetka komórek aktywnie duplikujących materiał genetyczny, co okazuje się niezwykle przydatne do ścisłego szacowania liczebności komórek w fazie S¹¹⁶. W celu analizy stopnia proliferacji, genomowy DNA w aktywnie replikujących się komórkach można także wyznakować poprzez inkubację komórek w obecności analogu tymidyny, tj. 5-bromo-2'-deoksyurydyny (BrdU). Wbudowanie BrdU następuje podczas replikacji DNA, zaś jego detekcja możliwe jest dzięki zastosowaniu przeciwciał anty-BrdU, najczęściej znakowanych fluorescencyjnie i uwidacznianych metodą cytometrii przepływowej lub mikroskopii fluorescencyjnej czy konfokalnej¹¹⁷.

Na potrzeby tej pracy w celu dokładnego oszacowania liczebności aktywnie proliferujących komórek wykorzystano metodę inkorporacji BrdU. Komórki, które podczas replikacji do swojego DNA wbudowywały analog tymidyny uwidaczniano wykorzystując przeciwciała znakowane fluorescencyjnie i mikroskop konfokalny.

Wyniki przeprowadzonych badań dowiodły, że pod wpływem konstruktów kodujących podjednostkę beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej zmienia się tempo proliferacji komórek nowotworowych. Wykazano, że transfekcja komórek linii HeLa wszystkimi przygotowanymi w pracy konstruktami, tj. CGB 1.1 i 1.2, CGB 2.1 i 2.2 oraz CGB 5 prowadziła do istotnego wzrostu proliferacji. W przypadku użycia konstruktów kodującego gen *CGB5* odsetek komórek proliferujących był o ponad dwadzieścia punktów procentowych większy niż w kontroli. W przypadku konstruktów CGB 2.1 oraz CGB 1.2 odsetek komórek proliferujących był o ponad dziesięć punktów procentowych większy niż w komórkach kontrolnych. Z kolei konstrukty CGB 1.1 oraz CGB 2.2 prowadziły do wzrostu liczby komórek proliferujących o ponad sześć punktów procentowych, względem komórek nietransfekowanych.

Komórki Ishikawa transfekowane konstruktami CGB także wykazywały wzmożoną inkorporację BrdU. Wykorzystanie konstruktów genowych CGB 2.1 oraz CGB 1.1 skutkowało wzrostem tempa proliferacji komórkowej w porównaniu do komórek kontrolnych o odpowiednio ponad siedem oraz cztery punkty procentowe. Jednak, tak jak podczas analiz komórek HeLa, najwyższe tempo proliferacji, większe o ponad dziesięć punktów procentowych, odnotowano w przypadku transfekcji komórek konstruktem CGB 5.

Gen *CGB5* jest genem najczęściej poddawany analizom^{75,100,118}. Dzieje się tak ze względu na jego ekspresję w komórkach zarówno zmienionych jak i niezmienionych nowotworowo. Doniesień dotyczących aktywności *CGB1* oraz *CGB2* uważanych

do niedawna za pseudogeny jest wciąż niewiele. Dotychczasowe publikacje ograniczają się do udokumentowania jedynie obecności transkryptów obu genów^{24,25}. Nadal brakuje informacji o białkowych produktach *CGB1* i *CGB2*.

Przygotowane na potrzeby tej pracy dwa konstrukty: *CGB 1.1* oraz *CGB 2.1* kodujące hipotetyczne białka homologiczne do klasycznego *hCGβ*, podobnie jak konstrukt *CGB 5* umożliwiły detekcję białka w transfekowanych nimi komórkach. Jak opisano powyżej, te same konstrukty, zawierające sekwencję kodującą *CGB5* jak i konstrukty *CGB 1.1* i *CGB 2.1* przyczyniały się do zwiększenia liczby komórek proliferujących. Zastosowane w doświadczeniach przeciwciała, skierowane przeciwko *hCGβ*, nie pozwoliły na identyfikację produktów białkowych konstrukatów *CGB 1.2* i *CGB 2.2*. Zgodnie z przewidzianą *in silico* sekwencją białkowy produkt kodowany przez sekwencję uwzględniającą przesunięcie ramki odczytu powoduje powstanie białka różnego od klasycznego *hCGβ*, kodowanego przez pozostałe geny. Niemniej jednak zmiany proliferacji komórek transfekowanych tymi konstrukciami pozwalają przypuszczać, że także alternatywne, 132. aminokwasowe białko powstające na matrycy sekwencji wklonowanych do wektorów ekspresyjnych, oznaczonych tu jako *CGB 1.2* i *CGB 2.2*, pełni rolę w regulacji procesów życiowych badanych komórek.

Nie można także wykluczyć, że zgodnie z hipotezą zaproponowaną przez Parrota i współpracowników białkowy produkt genów *CGB1* i *CGB2* ulega w komórkach cięciu przez określone peptydazy, co może prowadzić do powstania neuroendokrynnych peptydów, pełniących niepoznaną dziś rolę²¹.

Sytuację dodatkowo komplikuje fakt, że geny *CGB1* i *CGB2* ulegają alternatywnemu splicingowi. W bazie danych RefSeq zdeponowana jest jedna sekwencja mRNA dla genu *CGB1* i dwa typy transkryptów *CGB2*. Z kolei Parrot i współpracownicy opisują trzy warianty *CGB1* i dwa warianty *CGB2* występujące w ludzkich jądrach oraz pojedyncze warianty splicingowe dla każdego z genów w prawidłowym łożysku²¹. Co prawda w zastosowanym w pracy modelu doświadczalnym wyeliminowano problem alternatywnego splicingu, jako że przygotowane konstrukty zawierają jedynie sekwencje kodującą, jednak rozważając hipotetyczną rolę pełnioną przez białkowe produkty tych genów należy mieć na uwadze bogactwo form białkowych powstających *in vivo*.

By potwierdzić fakt wzmożonej proliferacji komórek transfekowanych konstrukciami *CGB* w niniejszej pracy proliferację komórek nowotworowych linii HeLa i Ishikawa transfekowanych konstrukciami *CGB* dodatkowo oceniano przy pomocy systemu xCELLigence® RTCA DP. System ten umożliwia ocenę stopnia proliferacji

w czasie rzeczywistym. Wyniki tych analiz dowiodły, że największym (około trzykrotnie wyższym) stopniem proliferacji charakteryzowały się komórki obu linii transfekowane konstruktem CGB 5. Komórki HeLa poddane transfekcji konstrukciami CGB 1.1, CGB 1.2 oraz CGB 2.1 również cechowały się (około dwukrotnie) większym, w porównaniu do komórek kontrolnych, tempem proliferacji. W przypadku komórek linii Ishikawa tempo proliferacji zwiększały (około dwukrotnie) także konstrukty: CGB 1.1, CGB 2.1 oraz CGB 2.2.

Obserwacje przeprowadzonych w pracy analiz, wykorzystujących metody cytometrii przepływowej, inkorporacji BrdU oraz system xCELLigence® RTCA DP, są zgodne z doniesieniami przedstawianymi w literaturze przedmiotu. Dotychczasowe wyniki badań nad wpływem podjednostki beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej na procesy proliferacji komórkowej dokumentują bowiem, że białko to może działać dwojako.

Z jednej strony Gilliott i współpracownicy wykazali, że egzogenne hCG β podane komórkom raka pęcherza (linii: T24, SCaBER, RT112 oraz 5637), utrzymywanym w hodowli w warunkach *in vitro* wpływa na zwiększenie odsetka komórek proliferujących. Badacze za pomocą testów kolorymetrycznych MTT określili, iż komórki raka pęcherza moczowego zwiększają tempo proliferacji w zależności od stężenia hCG β . Dodatkowo zauważono, że komórki, które wydzielają najmniejsze ilości endogennego hCG β cechowały się największą odpowiedzią na egzogenne białko¹¹⁹. Podobne rezultaty uzyskał Zhao wraz ze współpracownikami, którzy analizowali wpływ egzogenego hCG β na biologię komórek raka żołądka linii SGC-7901¹²⁰. Co więcej, Hamada wraz z zespołem wykazała, iż zablokowanie genów CGB doprowadza do zmniejszenia tempa proliferacji komórek raka kosmówki linii JAr¹²¹. Podobnie Burczyńska i współpracownicy dowiedli, że zablokowanie CGB, w szczególności genów CGB1 oraz CGB2 sprzyja zmniejszeniu żywotności komórek raka pęcherza moczowego linii SCaBER. Dodatkowo autorzy ci utrzymują, że to nowotworowe linie komórkowe (C2235, RT112 i SCaBER) cechujące się ekspresją CGB1 oraz CGB2 na poziomie mRNA wydzielają białko hCG β do podłoża hodowlanego. Dla pozostałych badanych przez nich linii komórkowych: raka pęcherza (T24), raka piersi (C2238) oraz raka prostaty (LNCaP i PC-3) charakteryzujących się jedynie ekspresją pozostałych genów CGB, tj. genów CGB3-9 nie stwierdzono bowiem sekrecji hCG β . Zgodnie z tymi doniesieniami ekspresja CGB1 oraz CGB2 na poziomie transkryptu koreluje z ilością wydzielanego białka, a co za tym idzie może świadczyć o ich biologicznej aktywności¹²².

Z drugiej strony opublikowano także prace dokumentujące brak istotnego wpływu podjednostki beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej na proliferację linii komórkowych raka jelita grubego (DLD-1, HCT-8, HT-29, HCT-116, LOVO, SW480 oraz SW620)⁷⁷. Także doświadczenia prowadzone na komórkach linii HeLa wykazały, że wyciszenie genów *CGB* przy zastosowaniu snRNA nie wpływało istotnie na proces proliferacji, zaś indukowało w komórkach nowotworowych proces ich programowanej śmierci – apoptozy^{123,124}. Sugeruje to, iż wpływ $hCG\beta$ na biologię komórek nowotworowych może zależeć od rodzaju komórki, wliczając w to typowy dla danej komórki, ściśle określony zestaw receptorów pośredniczący działaniu ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej.

Wielofunkcyjność hCG tłumaczy także fakt występowania hormonu w kilku wariantach, będących wynikiem modyfikacji potranslacyjnych.

Cząsteczka hCG jest silnie glikozylowana, nawet 30% całości jej składu stanowią cukrowce. Dowiedziono, że w pierwszych tygodniach ciąży prawidłowej przeważającą formą hormonu jest hiperglikozylowana hCG ($hCG-H$), której rola związana jest z procesem inwazji rozwijającego się zarodka w głąb trzonu ściany macicy. Występowanie $hCG-H$ zostało również opisane w komórkach nowotworowych. Badania ostatnich lat wykazały, że obok wolnej podjednostki beta gonadotropiny kosmówkowej także hiperglikozylowana podjednostka beta – $hCG\beta-H$ może mieć stymulujący wpływ na potencjał proliferacyjny komórek nowotworowych. Co więcej, na podstawie dostępnych danych klinicznych obecność hiperglikozylowanej hCG i $hCG\beta-H$ odnotowano w zaśniedziałym oraz wielu nowotworach niewywodzących się z trofoblastu^{125,126}. Biologiczna rola tych cząsteczek przypuszczalnie związana jest z inwazyjnym fenotypem komórek i większym potencjałem guza do tworzenia przerzutów. Niemniej jednak należy pamiętać, iż poszczególne typy komórek nowotworowych może cechować odmienny wzór glikozylacji^{58,127}.

Jak wspomniano powyżej podjednostce beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej przypisuje się także protekcyjną rolę przed apoptozą względem komórek nowotworowych. Hipotezę o udziale $hCG\beta$ w regulacji procesu apoptozy potwierdzają wyniki eksperymentów z wyciszaniem ekspresji genów *CGB*. Także nasze wcześniejsze prace wpisują się w nurt tych badań. Rezultaty prac badawczych, w których wykorzystano alternatywną metodę bazującą na zmodyfikowanych cząsteczkach U1 snRNA dowodzą, że zablokowanie ekspresji podjednostki beta gonadotropiny kosmówkowej w komórkach linii HeLa prowadzi do apoptotycznej śmierci komórek

nowotworowych¹²⁴. Hipotezę o protekcyjnej roli podjednostki beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej potwierdzają również badania nad rakiem szyjki macicy, w których immunohistochemicznie wykazano, iż komórki nowotworowe o zwiększonej ekspresji hCG β charakteryzowały się zredukowanym odsetkiem apoptozy¹²⁸.

W niniejszej pracy podjęto próbę weryfikacji słuszności tezy o protekcyjnej roli hCG β i ochronie komórek nowotworowych przed apoptozą, stosując odmienne niż dotychczas podejście doświadczalne. Komórki badanych tu linii, tj. HeLa oraz Ishikawa transfekowane konstruktami CGB traktowano związkiem PK 11195, który jest specyficznym ligandem obwodowego receptora benzodiazepinowego (PBR), indukującym apoptozę związaną z mitochondrialnym szlakiem śmierci komórki¹²⁹.

Na podstawie otrzymanych wyników dowiedziono, iż transfekcja komórek każdym z przygotowanych w pracy konstruktów CGB wpływała na zmniejszenie odsetka komórek apoptotycznych. Najniższe, o prawie 30 punktów procentowych niższe niż w komórkach kontrolnych, wartości odsetka komórek apoptotycznych zanotowano po zastosowaniu konstruktu z sekwencją genu *CGB5*. Jednak także po zastosowaniu konstruktów CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1 oraz CGB 2.2 liczba komórek apoptotycznych była o ponad dziesięć punktów procentowych niższa niż ta odnotowana dla komórek kontrolnych, niepoddanych transfekcji. Uzyskane wyniki w pełni potwierdzają antyapoptotyczny efekt wywierany przez hCG β , jednocześnie pozostając w zgodzie z wcześniejszymi doniesieniami. Jak pokazano komórki nowotworów z nadekspresją podjednostki beta hormonu cechuje bowiem zwiększona odporność na apoptozę.

Fakt ten wydaje się mieć implikacje kliniczne. Jak wspomniano powyżej, komórki nowotworowe, w wyniku licznych nieprawidłowości w materiale genetycznym mogą wykazywać ograniczoną zdolność do indukcji apoptozy i dzięki temu stawać się nieśmiertelne. Zaburza to homeostazę, która utrzymywana jest w organizmach wielokomórkowych dzięki odpowiednio zachowanej równowadze pomiędzy namnażaniem się komórek oraz ich śmiercią. Konserwatywny i uniwersalny mechanizm samobójstwa komórki umożliwiający wielokomórkowym organizmom utrzymanie homeostazy i eliminację komórek zbędnych, zmutowanych, uszkodzonych czy zagrażających organizmowi stanowi programowana śmierć komórki – apoptoza. Zaburzenie mechanizmów regulujących apoptozę, pozwalającą na eliminację komórek przyczynia się do rozwoju wielu schorzeń. I tak nadmierna redukcja liczby komórek prowadzi do chorób neurodegeneracyjnych, z kolei zahamowanie tego procesu doprowadza do rozwoju schorzeń autoimmunologicznych, nowotworowych, oraz sprzyja

występowaniu przewlekłych infekcji¹³⁰. Stąd od wielu lat trwają intensywne badania mające na celu wyjaśnienie mechanizmów regulujących proces apoptozy, zwłaszcza w przypadku komórek nowotworowych. Zaburzenia tego procesu leżą bowiem u podstaw oporności tych komórek na leki, które czynią nowotwór opornym na chemioterapię, ale także i na radioterapię.

Badania te wykazały, że istnieją dwie podstawowe drogi prowadzące do programowanej śmierci komórki – zewnątrzpochodna i wewnątrzpochodna. Zewnętrzny szlak apoptozy inicjowany jest w wyniku interakcji specyficznych receptorów błonowych DR (ang. *death receptors*) i ich ligandów. W grupie dobrze opisanych ligandów należących do nadrodziny czynnika martwicy nowotworów (TNF, ang. *tumor necrosis factor*) znajdują się między innymi: FAS, TRAIL, CD95L oraz TNF- α ¹³¹. Ligandy mogą być obecne na komórce efektorowej w formie związanej z błoną komórkową, lub mogą być ulokowane w przestrzeni zewnątrzkomórkowej w postaci rozpuszczalnej; mogą być nimi leki stosowane w onkologii. Po związaniu liganda z receptorem śmierci następują zmiany konformacyjne części cytoplazmatycznych receptora, zaś dalsza informacja o nieuniknionej śmierci dociera do wnętrza komórki¹³².

Z kolei w drugim szlaku – wewnątrzpochodnym, nazywanym również mitochondrialnym, dochodzi do aktywacji kaskady reakcji proteolitycznych z udziałem kaspaz indukowanych przez zaburzenia potencjału błonowego oraz zmianę przepuszczalności błony mitochondrialnej. Procesy degradacyjne mitochondriów doprowadzają do ewakuacji mitochondrialnych białek proapoptotycznych do cytozolu. Tworzący się tu kompleks zwany apoptosomem, w którego skład wchodzi: Apaf1 (ang. *apoptotic protease activating factor 1*), cytochrom c, oraz prokaspaza-9 przeprowadza destrukcję komórki¹³³.

Szlak mitochondrialny kontrolowany jest przez wewnątrzkomórkowe białka z rodziny BCL-2: aktywatory (m. in. Bax, Bad, Bid, Bik, Bak, Bim, Bok, Blk, Puma, Noxa) oraz represory (m. in. Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w). Dowiedziono, że deregulacja ekspresji białek z rodziny BCL-2 promujących proces apoptozy jest cechą umożliwiającą przetrwanie komórek zmienionych nowotworowo oraz może przyczyniać się do ich chemiooporności¹³⁴.

Kolejnym białkiem, zaangażowanym w proces apoptozy, a ekspresjonowanym przez szereg nowotworów, jest należące do rodziny IAP (ang. *inhibiting apoptosis proteins*), i kodowane przez gen *BIRC5* białko – surwiwina. Rola tego białka polega między innymi na hamowaniu aktywności inicjatorowych i efektorowych kaspaz, czego konsekwencją

jest uniemożliwienie zajścia apoptozy na drodze mitochondrialnej¹³⁵. Szereg badań wskazuje na występowanie surwiwiny w niemal wszystkich typach nowotworów; podwyższony poziom białka wykazano na przykład w nowotworach płuc, okrężnicy, wątroby, trzustki, żołądka, macicy, prostaty, jajników, piersi, przełyku i mózgu¹³⁶. W przypadku niektórych nowotworów (takich jak: nerwiak zarodkowy współczulny, rak przełyku, niedrobnokomórkowy rak płuca, rak okrężnicy i odbytnicy) wykazano ścisłą korelację pomiędzy wzrostem ekspresji surwiwiny a niekorzystnym rokowaniem¹³⁷⁻¹³⁹.

W indukcji programu odpowiedzialnego za przebieg apoptozy bierze udział wiele mechanizmów komórkowych. Oprócz wymienionych powyżej genów życia i śmierci kodujących białka anty- i proapoptotyczne także inne geny, bezpośrednio niezaangażowane w szlaki indukujące i regulujące apoptozę mogą być odpowiedzialne za nieprawidłowości w przebiegu tego procesu w komórkach nowotworowych. Przykładem takim są geny kodujące podjednostkę beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej.

Stąd uwzględniając wcześniejsze doniesienia literaturowe dokumentujące związek hCG β z procesem apoptozy, aby przybliżyć mechanizm antyapoptotycznego działania podjednostki hormonu, na potrzeby niniejszej pracy w komórkach transfekowanych konstruktami CGB poddano analizie aktywność genów kodujących czynniki anty- i proapoptotyczne. Oceniane tu geny, mianowicie: *BIRC5* kodujący surwiwinę oraz geny dwóch białek z rodziny BCL-2: *BCL2* i *BAX* wybrano ze względu na fakt, iż ich ekspresja została dobrze udokumentowana dla szeregu nowotworów, w tym płaskonabłonkowych raków endometrium i szyjki macicy oraz głowy i szyi, piersi, prostaty, czy płuca¹⁴⁰⁻¹⁴³. Co więcej, geny te wymienia się jako cele proapoptotycznej terapii genowej, która mogłaby znaleźć zastosowanie w leczeniu nowotworów. Przy czym strategia terapii genowej chorób nowotworowych mogłaby zostać wykorzystana także w kombinacji zarówno z klasycznymi chemioterapeutykami, jak i lekami inhibującymi specyficzne szlaki sygnałowe¹⁴²⁻¹⁴⁶.

Analizy komórek transfekowanych konstruktami CGB dowiodły, że nadekspresja genów CGB wpływa na poziom ekspresji wybranych modulatorów procesu apoptozy zarówno na poziomie transkryptu jak i białka.

Komórki linii HeLa transfekowane konstruktami CGB 1.2 oraz CGB 2.1 cechowały się dwukrotnie niższymi wartościami transkryptów *BCL2* względem komórek nietransfekowanych. Konstrukt genowy CGB 1.1 prowadził do ponad półtora krotnego wzrostu względnego poziomu ekspresji *BCL2* w komórkach

transfektantów. Pozostałe konstrukty nie wpływały istotnie na ekspresję *BCL2*. Z kolei analizując w transfekowanych komórkach poziom białka BCL-2 zauważono, że wszystkie zastosowane konstrukty genowe prowadziły do istotnego obniżenia poziomów białka BCL-2 w porównaniu z komórkami niepoddawanymi transfekcji.

Podobne wyniki uzyskano analizując komórki linii Ishikawa. Komórki tej linii transfekowane badanymi konstruktami CGB odznaczały się istotnie niższymi wartościami względnego poziomu transkryptów *BCL2*, względem komórek kontrolnych. Jednocześnie tę samą zależność – spadek ekspresji BCL-2 zaobserwowano w ocenie densytometrycznej białka, która potwierdziła, że wszystkie konstrukty CGB prowadziły do istotnego obniżenia poziomu białka BCL-2 w komórka poddanych transfekcji.

W niniejszej pracy w komórkach linii HeLa oraz Ishikawa nadekspresjonujących CGB ocenie poddano również poziom ekspresji genu *BAX*. Na podstawie przeprowadzonych analiz zaobserwowano, iż zastosowanie do transfekcji komórek linii HeLa konstruktów CGB 1.1, CGB 1.2 oraz CGB 2.1 dwukrotnie zwiększało względny poziom ekspresji *BAX*. Zbliżone zależności zauważono podczas analiz densytometrycznych białka BAX. Wykazano mianowicie, że konstrukty CGB 1.1, CGB 1.2 oraz CGB 2.1 doprowadzały do zwiększenia ilości białka BAX w transfektantach. W przypadku pozostałych konstruktów nie zanotowano różnic istotnych statystycznie.

Z kolei analizy względnego poziomu ekspresji genu *BAX* w komórkach linii Ishikawa nie wykazały istotnych różnic w ekspresji genu na poziomie mRNA w komórkach poddanych transfekcji konstruktami CGB w porównaniu do komórek kontrolnych. Natomiast poziom białka BAX w komórkach transfekowanych konstruktami CGB był istotnie niższy niż ten odnotowany dla komórek nietransfekowanych.

Ostatnim analizowanym w pracy genem był *BIRC5*, kodujący białko antyapoptotyczne – surwiwinę. Dowiedziono, że komórki linii HeLa transfekowane konstruktami CGB 1.2, CGB 2.2 oraz CGB 5 charakteryzuje istotnie wyższy względny poziom ekspresji *BIRC5*. Analiza densytometryczna surwiwiny w izolatach białkowych z komórek linii HeLa wykazała, iż w próbach transfekowanych konstruktami CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2 oraz CGB 5 notowane poziomy badanego białka były istotnie wyższe niż w próbach kontrolnych. W komórkach linii Ishikawa relatywny poziom ekspresji genu *BIRC5* był istotnie niższy po transfekcji konstruktami CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2 oraz CGB 5. Także na poziomie białka w komórkach transfekowanych konstruktami CGB 1.1, CGB 1.2 oraz CGB 5 odnotowano spadek (średnio półtorakrotnie niższy) względem poziomu notowanego w próbach kontrolnych.

Otrzymane wyniki dowodzą, że transfekcja komórek HeLa i Ishikawa konstruktami CGB moduluje ekspresję białek *BAX*, *BCL2* oraz *BIRC5* zaangażowanych w regulację procesu apoptozy. Odnotowane zmiany nie znalazły jednoznacznego potwierdzenia w literaturze. Biorąc jednak pod uwagę skomplikowane mechanizmy regulujące poszczególne ścieżki prowadzące do śmierci komórek i zaobserwowany jednocześnie w pracy ewidentny efekt nadekspresji genów CGB chroniący komórki przed apoptozą indukowaną przez PK 11195 należy założyć, że hCGβ działa także poprzez inne białka regulujące apoptozę. Wydaje się, że to raczej wypadkowa dostępności określonych białek, ich aktywność i wzajemne interakcje mogą chronić komórki przed śmiercią. Stąd aby wyjaśnić mechanizmy leżące u podstaw ochronnego działania hCGβ w komórkach nowotworowych należałoby kontynuować tę część badań i rozszerzyć panel białek zaangażowanych w regulację apoptozy.

Pojawiające się w pracy rozbieżności pomiędzy obserwowaną w tej części doświadczeń ekspresją genów na poziomie mRNA oraz białka są często dyskutowane w literaturze. Główny dogmat biologii molekularnej dotyczy przepływu informacji genetycznej, która zakodowana w DNA przepisywana jest na mRNA i następnie na białka. Wiadomo, w jaki sposób geny podlegają procesowi transkrypcji, jak mRNA jest przetwarzany oraz tłumaczony w sposób sekwencyjny na polipeptydy, a następnie odpowiednio modyfikowany i fałdowany w funkcjonalne białka. Należy jednak pamiętać, że możliwość powstawania kilku form transkryptu, które mogą być generowane z tego samego genu przez proces alternatywnego splicingu stanowi spore ograniczenie i w zasadzie uniemożliwia porównanie pomiędzy poziomem mRNA danego genu a ilością produkowanego białka. Powstające mRNA może też ulegać degradacji. Szereg prac donosi, że poziomy mRNA i białek mogą wykazywać słabą korelację. Dotychczas zidentyfikowano kilka czynników (między innymi: szybkość syntezy, dostępność rybosomów, stabilność białka), które wpływają na tę zależność. Ponadto również ograniczenia metodologii prowadzenia badań odgrywają rolę przy porównywaniu poziomów ekspresji mRNA z poziomem białka¹⁴⁷.

Należy również pamiętać, że biosynteza białek jest ograniczona na wiele sposobów. Z jednej strony nakład energetyczny i komponenty budulcowe takie jak aminokwasy stanowią typowe ograniczniki procesu translacji. Na przykładzie wzrostu komórek drożdży *S. cerevisiae* Warner i współpracownicy określili, że proces syntezy łańcucha aminokwasowego i dalsze fałdowanie białka pochłania nawet 50% całości energii ATP produkowanej przez komórkę, podczas gdy do procesu tworzenia

polimeru mRNA komórka wydatkuje jedynie 10% energii ATP¹⁴⁸. Z drugiej zaś strony komórkowe mechanizmy i enzymy katalizujące reakcje biosyntezy białka, takie jak na przykład: ilość polimerazy RNA oraz rybosomów, a także ich przestrzenny rozkład w kompartmentach komórki bywa niejednorodny. Całość zjawisk może prowadzić do konkurencji o dostęp do jednostek rybosomów i wpływać na ogół procesów biosyntezy białka¹⁴⁹.

Z pomocą badaczom analizującym ekspresję określonych genów przychodzi transkryptomika i proteomika. Transkryptom i proteom danej tkanki, czy organu może różnić się w zależności od rodzaju tkanki czy stanu biologicznej aktywności komórek ją budujących. Transkryptomika i proteomika pozwala na otrzymanie informacji o poziomie ekspresji genów, ich regulacji, pełnionej przez nie funkcji. Umożliwia to zrozumienie funkcjonowania komórek budujących określone tkanki i określenie korelacji genotyp-fenotyp.

Na potrzeby takich analiz stosuje się: ocenę zmienności poziomów RNA, ocenę miejsc przyłączania czynników transkrypcyjnych, profilowanie rybosomów (Ribo-seq), sekwencjonowanie RNA (RNA-seq) oraz spektrometrię masową (MS)^{150,151}. Rozwój zaawansowanych technik biologii molekularnej jest niezbędny do pełnego zrozumienia procesów biologicznych toczących się w żywych organizmach.

To właśnie te nowoczesne metody pokazują, że podczas rozwoju guza zwiększa się w nim ilość komórek nowotworowych manifestujących odmienny genotyp i fenotyp. Informacja ta ma kluczowe znaczenie, gdyż zmiany te mogą być swoistym celem dla komórek efektorowych układu immunologicznego. Makrofagi oraz polimorfojądrowe leukocyty są najbardziej zaangażowane w progresję nowotworu. Przez toczący się przetrwale stan zapalny oraz obecną hipoksję w strukturze guza nowotworowego dochodzi do tworzenia specyficznego mikrośrodowiska¹⁵². Stan niedotlenienia występujący w większości guzów litych jest wynikiem braku równowagi między zwiększonym zużyciem tlenu a nieodpowiednią jego podażą. Chociaż szybka proliferacja komórek guzów może indukować tworzenie nowego systemu naczyniowego w obrębie tkanki nowotworowej, to sama angiogeneza w guzie zachodzi w sposób mało zorganizowany. Skutkiem tej aktywności będzie nieregularna, chaotyczna architektura naczyń tkanki guza, spowodowana utrzymującymi się stanami niedotlenienia. Całkowite przewlekłe niedotlenienie lub niedotlenienie wynikające z ograniczonej dyfuzji gazów oddechowych doprowadza do martwicy komórek nowotworowych¹⁵²⁻¹⁵⁴.

W mikrośrodowisku guza komórki prawidłowe oraz nowotworowe wzajemnie na siebie oddziałują przez kontakt bezpośredni oraz wydzielanie substancji aktywnych, takich jak: czynniki wzrostu, cytokiny czy metaloproteiny. Całość tych zdarzeń przyczynia się to do zmiany fenotypu komórek guza w procesie tranzycji epithelialno-mezenchymalnej (EMT)¹⁵⁵.

EMT odgrywa ważną rolę w etapach rozwoju nowotworu. Po pierwsze, komórki uzyskują zdolności do migracji, co sprawia, że mogą odseparować się od reszty populacji komórek guza. Po drugie, proces tranzycji zezwala komórkom na dostęp do regionalnych węzłów chłonnych, a także naczyń krwionośnych; po trzecie umożliwia ustawiczne opuszczanie miejsca pierwotnego i tworzenie mikroprzerzutów¹⁵⁶.

Proces EMT jest szeroko opisywany w literaturze przedmiotu. Przypuszcza się, że za indukcję przejścia epithelialno-mezenchymalnego może odpowiadać wiele ligandów takich jak: transformujący czynnik wzrostu beta, białka morfogenetyczne kości, czy receptorowa kinaza tyrozyny. Dokumentuje się także dużą rolę szlaków sygnałnych: Wnt i Notch. Co więcej, przetrwały stan zapalny, niedotlenienie, stres oksydacyjny w miejscu kształtującego się guza nowotworowego to także procesy postulowane jako możliwe induktory przejścia EMT¹⁵⁷⁻¹⁵⁹.

Aktywacja procesu EMT wydaje się być kluczowa, aby nabłonkowe komórki pierwotnego guza nowotworowego nabrały cech komórek mezenchymalnych, a co za tym idzie wdrożyły realizację wielu etapów kaskady metastatycznej tj.: lokalnej inwazji komórek nowotworowych w podścielisko pierwotnego miejsca guza, przejście do naczyń krwionośnych, translokację drogą naczyń, dalsze wynaczynienie do miększej tkanek odległych i zasiedlenie nowej lokalizacji narządowej¹⁶⁰.

Co ciekawe, wśród czynników pośredniczących zdolność migracji komórek nowotworowych i regulujących proces EMT jest podjednostka beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej. I tak Wu i współpracownicy wykazali, iż komórki raka prostaty linii DU145 poddawane inkubacji z hCGβ charakteryzował zwiększony stopień fosforylacji kinaz ERK1/2 oraz zwiększona ekspresja i aktywność metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP-2). Dodatkowo wykazano, że komórki DU145 ze stabilną nadekspresją hCGβ zmieniały swój kształt z owalnego na wydłużony (wrzecionowaty) oraz cechowały się obniżoną ekspresją kadheryny E na poziomie mRNA oraz białka⁷⁸. Co więcej, ci sami badacze testowali inwazyjność komórek linii raka prostaty w matrigelu (preparat bogaty w laminę, oraz proteoglikany, kolagen typu IV i siarczan heparanu). Wyniki ich obserwacji dowiodły, iż komórki linii DU145

z nadekspresją hCG β cechowały się zwiększoną ruchliwością przez matrycę matrigelu, co wskazywało na ich inwazyjny charakter¹⁶¹. Konkludując otrzymane rezultaty badań sugerują, że ekspresja hCG β może odpowiadać za zwiększony potencjał przerzutowy gruczolakoraków prostaty, które wyrażają hCG β .

Podobne zależności dowodzące udziału hCG β w szlaku EMT wykazano w linach komórkowych raka jelita grubego oraz raka jajnika^{81,162–164}. W przypadku komórek raka jelita grubego linii HCA7, dodatkowo wykorzystując model myszy dowiedziono, że nadekspresja hCG β zwiększa inwazyjność, zdolność migracyjną i potencjał przerzutowy komórek. Wykazano, że hCG β wpływa na ekspresję genów związanych z procesem EMT, m. in.: kadheryny E, SNAIL i TWIST¹⁶⁴. Z kolei badania nad adhezją komórek raka jajnika pokazały, że komórki linii ES-2 i SKOV3 z nadekspresją hCG β cechuje większa zdolność do adhezji niż komórki kontrolne¹⁶².

W niniejszej pracy aspekt zwiększonej migracyjności komórek linii raka szyjki macicy oraz raka endometrium transfekowanych konstrukcjami CGB badano z wykorzystaniem systemu xCELLigence® RTCA DP. Zastosowany tu układ doświadczalny oparty na modelu komory Boydena, pozwala na monitorowanie komórek przechodzących przez mikroporowatą membranę. Złote elektrody na dolnej stronie membrany wykrywają obecność adherentnych komórek i rejestrują sygnał przekształcając go następnie na sygnał elektroniczny widoczny na monitorze komputera. W teście mierzona jest wartość impedancji przepływu elektronów spowodowana przez komórki, które pokonały barierę membrany o grubości 8 μ m, a następnie osiadały na dnie dolnej komory.

Rezultaty przeprowadzonych doświadczeń wskazały, że transfekcja komórek HeLa konstruktem CGB 2.1 przyczynia się do nasilenia migracyjności komórek w porównaniu do komórek kontrolnych. Wyższe tempo migracji odnotowano również w komórkach transfekowanych konstruktem CGB 5. Ocena komórek linii Ishikawa dowiodła, że zastosowanie wszystkich badanych tu konstrukcji istotnie zwiększa tempo migracji. Podobnie jak w przypadku linii HeLa, komórkami o najwyższym potencjale migracyjnym były te transfekowane konstruktem CGB 5.

Otrzymane wyniki pozostają w zgodzie z dotychczas opublikowanymi i dowodzą, że nadekspresja genów CGB prowadzi do zwiększenia migracyjności komórek nowotworowych raka szyjki macicy i raka endometrium.

Jak już wcześniej wspomniano, przerzuty komórek nowotworowych w nowe lokalizacje narządowe są odpowiedzialne za większość zgonów osób chorych na

nowotwór. Sam proces migracji komórek od guza pierwotnego do odległego miejsca i ostateczne rozwiniecie guza wtórnego zachodzi wieloetapowo. Okres pomiędzy infiltracją komórek zmienionych nowotworowo w miejscu odległym a kolonizacją prowadzącą stopniowo do wzrostu masy guza wtórnego może trwać nawet kilka lat¹⁶⁵. Pochodzenie tkankowe komórek nowotworowych, nałożone niestabilności genetyczne w DNA oraz powinowactwo do nowych lokalizacji narządowych determinują nie tylko miejsca rozprzestrzeniania się guza, ale także ich czasowy przebieg. W przypadku niektórych typów raka piersi proces przerzutowania do chwili ujawnienia pierwszych symptomów klinicznych może zająć kilkanaście miesięcy¹⁶⁶. Z kolei okres ten może być jedynie kilkumiesięczny w przypadku wyjątkowo złośliwych postaci raka płuc¹⁶⁷. Chociaż genetyczna i epigenetyczna podstawa właściwości przerzutowych nie została jeszcze w pełni ustalona, przypuszcza się, iż nabycie wszystkich cech niezbędnych do umożliwienia realizacji przerzutowania stanowi fundament tego procesu.

Zarówno w diagnostyce zmian pierwotnych jak i w monitorowaniu wznów miejscowych oraz rozsiewie komórek nowotworowych do narządów odległych wciąż poszukuje się markera idealnego¹⁶⁸. Oznaczanie specyficznych biochemicznych markerów nowotworowych, takich jak np. CEA, CA 15.3, CA 27.29, CA 125, AFP, czy PSA od lat stosowane jest w praktyce klinicznej. Jednak żadnego z wymienionych markerów nie można uznać za idealny. Stąd szereg laboratoriów skupia się na poszukiwaniu nowych markerów mogących w specyficzny i czuły sposób wykryć nowotwór na bardzo wczesnym etapie rozwoju. Pozwoliłoby to na zwiększenie możliwości diagnostyczno-terapeutycznych, a przez to na poprawienie jakości i czasu życia pacjentów, których liczba niestety stale rośnie. Jednocześnie poszukiwane są metody pozwalające nie tylko na wcześniejsze postawienie diagnozy, ale także dokładną ocenę zaawansowania choroby oraz monitorowanie terapii.

Jak przedstawiono w niniejszej pracy, jednym z czynników, który charakteryzuje komórki nowotworowe napędzając ich wzrost i umożliwiając migrację oraz chroniąc je przed apoptozą jest podjednostka beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej. Co więcej wiadomo, że hCG β cechuje zarówno guzy pierwotne jak i komórki nowotworowe krążące we krwi pacjenta, które są uważane za wyznacznik rozsiewu nowotworu (metastaza)¹⁶⁹. Obecność hCG β może być więc swoistym markerem, który może znaleźć zastosowanie w diagnostyce, ocenie odpowiedzi na leczenie, długoterminowej obserwacji po leczeniu i prognozowaniu wznowy.

Potencjał wykorzystania ekspresji hCG β jako markera nowotworowego pokazują dane już opublikowane jak i wyniki przedstawione w niniejszej pracy.

Przeprowadzone tu analizy, nie tylko potwierdzają rolę hCG β w procesach związanych z nowotworzeniem ale, zgodnie ze stanem aktualnej wiedzy, po raz pierwszy opisują wpływ nadekspresji genów *CGB1* oraz *CGB2* na procesy proliferacji, migracji i apoptozy komórek raka endometrium oraz raka szyjki macicy. W pełni uzasadnionym jest zatem twierdzenie, iż uważane do niedawna za pseudogeny *CGB1* oraz *CGB2* są genami transkrypcyjnie aktywnymi, co więcej genami istotnie wpływającymi na biologię komórek nowotworowych. Nadekspresja omawianych genów skutkuje bowiem zwiększeniem zdolności komórek raka endometrium oraz raka szyjki macicy do proliferacji, migracji oraz ogranicza aktywność mitochondrialnego szlaku apoptotycznego, co sugeruje zwiększenie odporności komórek na indukcję apoptozy, a przez to nabycie chemio- i radiooporności.

Funkcjonalność wykazują nie tylko homologiczne do hCG β warianty sekwencji kodującej *CGB1* i *CGB2* – konstrukty CGB 1.1 oraz CGB 2.1, ale również konstrukty CGB 1.2 oraz CGB 2.2 kodujące hipotetyczne białko różne od hCG β . Ze względu na fakt, iż zastosowane w pracy komercyjnie dostępne przeciwciało anti-hCG β nie było w stanie rozpoznać białkowego produktu konstruktów CGB 1.2 oraz CGB 2.2 celowym wydaje się przeprowadzenie dalszych badań ukierunkowanych na scharakteryzowanie białka kodowanego przez właśnie te warianty genowe.

Identyfikacja tych białek może mieć duże znaczenie kliniczne, ponieważ jak pokazują wcześniejsze badania, hCG β stanowiąc marker różnych typów nowotworów może być celem terapii przeciwnowotworowej. Dotychczasowe terapie skierowane przeciwko gonadotropinie kosmówkowej wykorzystują przeciwciała blokujące hCG β syntetyzowane przez tkanki guza¹²¹⁻¹²³. Niestety, ze względu na dużą różnorodność form biologicznych hCG w surowicy i moczu pacjentów działania te przynoszą efekty mniejsze od spodziewanych. Być może rozwiązaniem tego problemu będzie wykorzystanie możliwości blokowania poszczególnych genów kodujących gonadotropinę kosmówkową, które stanie się podstawą do określenia nowych dróg terapii raka.

6. Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników wysunięto następujące wnioski:

1. Geny *CGB1* i *CGB2* są aktywnie transkrypcyjnie – zgodnie z danymi zdeponowanymi w bazie TCGA obecność transkryptów tych genów cechuje raki endometrium oraz raki szyjki macicy.
2. Nadekspresja genów *CGB1* i *CGB2*, podobnie jak genu *CGB5*, kodujących podjednostkę beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej zwiększa tempo proliferacji komórek linii HeLa i Ishikawa, co wskazuje, że hCG β może przyspieszać wzrost guzów szyjki macicy i endometrium.
3. Indukcja ekspresji genów kodujących podjednostkę beta gonadotropiny kosmówkowej zwiększa inwazyjność komórek nowotworowych linii HeLa i Ishikawa, co sugeruje, że raki szyjki macicy i endometrium, które produkują hCG β mogą mieć bardziej agresywny charakter i większy potencjał metastatyczny.
4. Wyższa ekspresja podjednostki beta gonadotropiny kosmówkowej chroni komórki nowotworowe linii HeLa i Ishikawa przed indukcją procesu apoptozy, co zwiększa szanse przeżycia guza oraz może mieć wpływ na przebieg leczenia (chemio- i radiooporność).

7. Streszczenie

Ludzka gonadotropina kosmówkowa (hCG) jest heterodimerycznym sialoglikoproteinowym hormonem zbudowanym z dwóch podjednostek: alfa (hCG α) i beta (hCG β), produkowanym przez komórki syncytiotrofoblastu. Oprócz łożyska, rozrostów i nowotworów trofoblastu liczne guzy różnego pochodzenia cechuje zdolność wydzielania hCG, zwłaszcza podjednostki beta hormonu.

Wolna podjednostka beta ma wpływ na rozwój guza głównie poprzez stymulację proliferacji i inhibicję procesu apoptozy, ma działanie promujące angiogenezę, moduluje odpowiedź immunologiczną, wspiera inwazję i rozsiew nowotworów. Obecność hCG β wyróżnia przerzuty nowotworowe, w tym komórki raka krążące we krwi, oraz koreluje ze słabą odpowiedzią na leczenie i złym rokowaniem.

Podjednostka beta kodowana jest przez osiem allelicznych genów (*CGB1*, *CGB2*, *CGB3*, *CGB5*, *CGB6*, *CGB7*, *CGB8*, *CGB9*) zlokalizowanych w klastrze *LHB/CGB* na dłuższym ramieniu chromosomu dwunastego. Najsilniejsza ekspresja cechuje gen *CGB5* oraz *CGB3* i *CGB8*. *CGB1* i *CGB2* były przez długi czas uważane za pseudogeny i nie były szerzej analizowane. Jednakże obecność transkryptów genów *CGB1* i *CGB2* wykryto w łożysku, przysadce, jądrach oraz komórkach raka piersi i raka jajnika. Wcześniejsze badania wykazały, że hCG β w sposób zależny od dawki, zwiększa wzrost linii komórkowych raka; z kolei inkubacja komórek z przeciwciałami anti-hCG β lub wyciszenie genów kodujących podjednostkę beta hormonu wywołuje efekt odwrotny i prowadzi do apoptozy. Sugeruje to, że hCG β jest czynnikiem wzrostu komórek nowotworowych, który ułatwia progresję guza i metastazę.

Dotychczasowe badania dobrze dokumentują związek ekspresji hCG β z nowotworzeniem, jednak skupiają się na najbardziej aktywnych transkrypcyjnie genach, takich jak *CGB3*, *CGB5* i *CGB8*. Tymczasem najnowsze prace pokazują, że cząsteczką stymulującą wzrost guza o działaniu autokrynowym może być produkt białkowy, uważanych do niedawna za pseudogeny, genów *CGB1* i *CGB2*.

Stąd celem niniejszej pracy było wykazanie aktywności genów *CGB1* i *CGB2* kodujących wolną podjednostkę beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej w komórkach wybranych raków żeńskich narządów płciowych oraz określenie wpływu ich nadekspresji na biologię komórek nowotworowych *in vitro*.

Na podstawie wyników zdeponowanych w bazach TCGA, w pracy przeprowadzono *in silico* analizy poziomów transkryptów badanych tu genów w rakach

szyjki macicy i endometrium. Analizy bioinformatyczne potwierdziły, iż geny *CGB1* oraz *CGB2* są aktywnie transkrypcyjnie. Zgodnie z danymi zdeponowanymi w bazie TCGA ich transkrypty odnotowano w tkankach raka endometrium oraz raka szyjki macicy.

Modelem doświadczalnym w przeprowadzonych badaniach były dwie ustalone linie komórkowe – Ishikawa i HeLa. Ze względu na fakt, iż dotychczas białkowy produkt genów *CGB1* i *CGB2* nie został zidentyfikowany, podczas klonowania analizowanych genów wykorzystano sekwencje wskazane *in silico* i zdeponowane w bazie danych OMIM. Przygotowywano dwa rodzaje konstruktów zawierających: 1) sekwencję kodującą hipotetyczne białka homologiczne do hCG β – wektory: CGB 1.1 i CGB 2.1 oraz 2) sekwencję uwzględniającą przesunięcie ramki odczytu powodującej powstanie białka o długości 132. aminokwasów, odmiennego od hCG β – konstrukty: CGB 1.2 i CGB 2.2. Jako kontrolę prowadzonych badań zastosowano konstrukt zawierający sekwencję genu *CGB5*. Gen ten wybrano ze względu na udowodnioną największą aktywność transkrypcyjną spośród genów kodujących hCG β , obserwowaną w różnych typach tkanek, w tym tych zmienionych nowotworowo.

Przygotowane konstrukty wykorzystano do transfekcji komórek HeLa i Ishikawa. Pozwoliło to na uzyskanie nadekspresji genów *CGB1* i *CGB2* oraz kontrolnego genu – *CGB5*. Wpływ nadekspresji genów *CGB* na poziomie transkryptu i białka na badane komórki oceniano analizując ich: proliferację, inwazyjność, apoptozę oraz cykl życiowy.

Eksperymenty przeprowadzone *in vitro* dowiodły, że najwyższa aktywność proliferacyjna charakteryzowała komórki linii HeLa oraz Ishikawa transfekowane konstrukcjami CGB 5 oraz CGB 2.1. Z kolei największy potencjał do inwazji komórki linii HeLa wykazały po zastosowaniu konstruktu CGB 2.1 oraz CGB 5. Z kolei komórki linii Ishikawa najszybciej migrowały po zastosowaniu konstruktu CGB 5. Dalsze analizy pokazały, iż komórki linii HeLa cechowały się obniżonymi wartościami poziomów białek: BAX (po zastosowaniu konstrukcji CGB 2.2 i CGB 5), BCL-2 (po zastosowaniu każdego z konstrukcji: CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5) oraz surwiwiny (po zastosowaniu konstruktu CGB 1.1). W przypadku komórek linii Ishikawa zauważono, iż charakteryzowały się one obniżonymi wartościami poziomów białek BAX, BCL-2 oraz surwiwiny po zastosowaniu wszystkich konstrukcji CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2 oraz CGB 5. Dodatkowo zwiększenie ekspresji hCG β prowadziło do znacznego zmniejszenia liczby komórek apoptotycznych indukowanych działaniem związku PK11195.

Rezultaty przedawnionych w niniejszej pracy badań po raz pierwszy dokumentują rolę genów *CGB1* i *CGB2* w biologii komórek nowotworowych. Uzyskane wyniki potwierdzają aktywne działanie podjednostki beta ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej w komórkach nowotworowych. Dowodzą, że nadekspresja genów *CGB1*, *CGB2*, podobnie jak *CGB5*, prowadzi do zwiększenia potencjału proliferacyjnego i migracyjnego komórek raka szyjki macicy i raka endometrium oraz chroni je przed apoptozą.

Sugeruje to, że raki, w których dochodzi od ekspresji hCG β mogą mieć bardziej agresywny charakter i większy potencjał metastatyczny, ponadto antyapoptotyczne działanie podjednostki hormonu zwiększa szanse przeżycia guza oraz może mieć wpływ na przebieg leczenia (chemio- i radiooporność).

Uzyskane tu wyniki mają charakter czysto poznawczy, niemniej jednak identyfikacja molekularnych mechanizmów działania hCG β zaangażowanych w proces nowotworzenia w przyszłości może skutkować próbą wyznaczenia nowych terapii przeciwnowotworowych.

8. Summary

Human chorionic gonadotropin is a glycoprotein hormone produced by syncytiotrophoblastic cells of the placenta. It is composed of two subunits: alpha (hCG α) and beta (hCG β). CG alpha subunit is common to all gonadotropin hormones, and the beta subunit determines hormone specificity.

The free beta subunit has an effect on tumour development mainly through stimulation of proliferation and inhibition of the process of apoptosis, promoting angiogenesis, modulating the immune response, supporting the invasion and dissemination of tumours. The presence of hCG β characterizes tumour metastases, including circulating tumour cells and correlates with unsatisfactory response to treatment and poor prognosis.

The beta subunit is encoded by eight allelic genes (*CGB1*, *CGB2*, *CGB3*, *CGB5*, *CGB6*, *CGB7*, *CGB8*, *CGB9*) located at the *LHB/CGB* cluster on chromosome 19q13.32. The *CGB5* gene as well as *CGB3* and *CGB8* have the highest expression. *CGB1* and *CGB2* were considered as pseudogenes for a long time and were not analyzed in details. However, the presence of *CGB1* and *CGB2* gene transcripts was detected in placenta, pituitary gland, breast and ovarian cancer tissues. Previous studies have shown that hCG β in a dose-dependent manner increases the growth of cancer cell lines, while incubating cells with anti-hCG β antibodies or silencing the genes encoding the hormone subunit produces the opposite effect and leads to apoptosis. This suggests that hCG β may be an autocrine neoplastic cell growth factor that facilitates tumour progression and metastasis.

Many papers documented hCG β expression in cancers, but they focused on the most transcriptionally active genes such as *CGB3*, *CGB5* and *CGB8*. Concurrently, recent articles show that the autocrine tumour growth-promoting molecule may be a protein product of the *CGB1* and *CGB2* genes, recently considered as pseudogenes.

Hence, this study aimed to demonstrate the activity of the *CGB1* and *CGB2* genes encoding the free beta subunit of human chorionic gonadotropin in cancers of the female genital organs (cervical and endometrium) and to determine the effect of their overexpression on tumour cell biology *in vitro*.

The experimental models used in the study were two cancer cell lines - Ishikawa and HeLa. Because the protein product of *CGB1* and *CGB2* genes has not been identified so far, in this study the sequences of cloned and analyzed genes were based on the *in silico* analysis and information deposited in the OMIM database. Two types of gene constructs

were prepared, which contained: 1) the sequence coding hypothetical homologous proteins for hCG β – gene constructs: CGB 1.1 and CGB 2.1, and 2) the sequence arising from the reading frame shift resulting in the formation of the polypeptide build of 132 amino acid, different from regular hCG β : CGB 1.2 and CGB 2.2. The gene construct containing the coding sequence of the *CGB5* gene was used as a control, as this gene's activity is observed in various types of tissues, including cancers.

All prepared gene constructs were used to transfect HeLa and Ishikawa cells, which allowed for the overexpression of the *CGB1* and *CGB2* genes and the control gene - *CGB5*. The effect of *CGB* genes overexpression at transcript and protein levels on the cells was evaluated by analyzing their proliferation, invasiveness, apoptosis and cell cycle. Moreover based on the results deposited in TCGA databases, the study included an *in silico* analysis of the examined genes transcript levels in cervical and endometrial cancers.

Bioinformatic analyzes have confirmed that the *CGB1* and *CGB2* genes are transcriptionally active. According to the data deposited in the TCGA database, their transcripts were detected in endometrial cancer tissues; *CGB1* and *CGB2* transcripts are also presented in cervical cancer.

In vitro experiments showed that the highest proliferative activity was detected in HeLa and Ishikawa cells transfected with CGB 5 and CGB 2.1 gene constructs. The highest potential for invasion of HeLa cells showed while using the CGB 2.1 and CGB 5 gene constructs. Ishikawa cells migrated the fastest while using the CGB 5 gene construct. Further analysis revealed that HeLa cells showed reduced levels of protein levels: BAX (while using the gene constructs CGB 2.2 and CGB 5), BCL-2 (while applying all gene constructs CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5) and survivin (while using the gene construct CGB 1.1). In the case of Ishikawa cells, it was noted that cells were characterized by reduced levels of BAX, BCL-2 and survivin protein levels while using all *CGB* gene constructs. In addition, an increase in hCG β expression leads to a decrease in the number of apoptotic cells induced by the action of PK11195.

The results described in this thesis for the first time document the role of *CGB1* and *CGB2* genes in cancer cell biology. They confirm the biological activity of the human beta chorionic gonadotropin in cancer cells. The results show that overexpression of the *CGB1*, *CGB2*, and *CGB5* genes leads to an increase in the proliferative and migration potential of cervical and endometrial cancer cells as well as protects against apoptotic cell death.

This suggests that cancers secreting hCG β might have a more aggressive nature and high metastatic potential, moreover, the anti-apoptotic effect of hCG β increases the chances of tumor survival and may affect the course of treatment (inducing chemo- and radio-resistance).

The results obtained here are purely cognitive, but the identification of the molecular mechanisms of hCG β involved in the cancer process in the future may result in an attempt to designate new cancer therapies.

9. Piśmiennictwo

1. Pierce, J. G. i Parsons, T. F. Glycoprotein Hormones: Structure and Function. *Annu. Rev. Biochem.* 50, 465–495 (1981).
2. Fiddes, J. C. i Goodman, H. M. The gene encoding the common alpha subunit of the four human glycoprotein hormones. *J. Mol. Appl. Genet.* 1, 3–18 (1981).
3. Policastro, P. F., Daniels-McQueen, S., Carle, G. i Boime, I. A map of the hCG beta-LH beta gene cluster. *J. Biol. Chem.* 261, 5907–16 (1986).
4. Nwabuobi, C. i in. Molecular Sciences hCG: Biological Functions and Clinical Applications. doi:10.3390/ijms18102037.
5. Herr, F. i in. hCG in the Regulation of Placental Angiogenesis. Results of an In Vitro Study. *Placenta* 28, S85–S93 (2007).
6. Bansal, A. S. i in. Mechanism of human chorionic gonadotrophin-mediated immunomodulation in pregnancy. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 8, 747–753 (2012).
7. Poloski, Z. i in. Regulator of Pregnancy Immune Tolerance Human Chorionic Gonadotropin as a Central. *J Immunol Ref.* 190, 2650–2658 (2013).
8. Iles, R. K., Delves, P. J. i Butler, S. A. Does hCG or hCG β play a role in cancer cell biology? *Mol. Cell. Endocrinol.* 329, 62–70 (2010).
9. Hotakainen, K., Lintula, S., Jarvinen, R., Paju, A. i Stenman, J. Overexpression of human chorionic gonadotropin beta genes 3, 5 and 8 in tumor tissue and urinary cells of bladder cancer patients. *Tumor Biol.* 28, 52–56 (2007).
10. Talmadge, K., Boorstein, W. R., Vamvakopoulos, N. C., Gething, M. J. & Fiddes, J. C. Only three of the seven human chorionic gonadotropin beta subunit genes can be expressed in the placenta. *Nucleic Acids Res.* 12, 8415–36 (1984).
11. Julier, C. i in. The beta chorionic gonadotropin-beta luteinizing gene cluster maps to human chromosome 19. *Hum. Genet.* 67, 174–7 (1984).
12. Policastro, P. et al. The beta subunit of human chorionic gonadotropin is encoded by multiple genes. *J. Biol. Chem.* 258, 11492–9 (1983).
13. Fiddes, J. C. i Goodman, H. M. The cDNA for the beta-subunit of human chorionic gonadotropin suggests evolution of a gene by readthrough into the 3'-untranslated region. *Nature* 286, 684–7 (1980).
14. Bidart, J. M., Baudin, E., Troalen, F., Bellet, D. & Schlumberger, M. Eutopic and ectopic production of glycoprotein hormones alpha and beta subunits. *Ann. Endocrinol. (Paris)*. 58, 125–8 (1997).
15. Bo, M. i Boime, I. Identification of the transcriptionally active genes of the chorionic gonadotropin beta gene cluster in vivo. *J. Biol. Chem.* 267, 3179–84 (1992).
16. Maston, G. A. i Ruvolo, M. Chorionic Gonadotropin Has a Recent Origin Within Primates and an Evolutionary History of Selection. *Mol. Biol. Evol.* 19, 320–335 (2002).
17. Hollenberg, A. N., Pestell, R. G., Albanese, C., Boers, M. E. & Jameson, J. L. Multiple promoter elements in the human chorionic gonadotropin beta subunit genes distinguish their expression from the luteinizing hormone beta gene. *Mol. Cell. Endocrinol.* 106, 111–9 (1994).
18. Hallast, P., Rull, K. i Laan, M. The evolution and genomic landscape of CGB1 and CGB2 genes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 260–262, 2–11 (2007).
19. Rull, K. i in. Fine-scale quantification of HCG beta gene transcription in human trophoblastic and non-malignant non-trophoblastic tissues. *Mol. Hum. Reprod.* 14, 23–31 (2008).
20. Madersbacher, S., Kratzik, C., Gerth, R., Dirnhofer, S. & Berger, P. Human chorionic gonadotropin (hCG) and its free subunits in hydrocele fluids and neoplastic tissue of testicular cancer patients: insights into the in vivo hCG-secretion pattern. *Cancer Res.* 54, 5096–100 (1994).
21. Parrott, A. M., Sriram, G., Liu, Y. i Mathews, M. B. Expression of type II chorionic gonadotropin genes supports a role in the male reproductive system. *Mol. Cell. Biol.* 31, 287–99 (2011).
22. Dirnhofer, S. i in. Expression of the human chorionic gonadotropin-beta gene cluster in human pituitaries and alternate use of exon 1. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 4212–4217 (1996).

23. Berger, P. *i in.* Human chorionic gonadotropin (hCG) in the male reproductive tract. *Mol. Cell. Endocrinol.* 260–262, 190–196 (2007).
24. Giovangrandi, Y. *i in.* Analysis of the human CGB/LHB gene cluster in breast tumors by real-time quantitative RT-PCR assays. *Cancer Lett.* 168, 93–100 (2001).
25. Kubiczak, M., Walkowiak, G. P., Nowak-Markwitz, E. & Jankowska, A. Human chorionic gonadotropin beta subunit genes CGB1 and CGB2 are transcriptionally active in ovarian cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 12650–60 (2013).
26. Morgan, F. J., Birken, S. i Canfield, R. E. The amino acid sequence of human chorionic gonadotropin. The alpha subunit and beta subunit. *J. Biol. Chem.* 250, 5247–58 (1975).
27. de Medeiros, S. F. i Norman, R. J. Human choriogonadotrophin protein core and sugar branches heterogeneity: basic and clinical insights. *Hum. Reprod. Update* 15, 69–95 (2008).
28. Cole, L. A. Human chorionic gonadotropin and associated molecules. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 9, 51–73 (2009).
29. Laphorn, A. J. *i in.* Crystal structure of human chorionic gonadotropin. *Nature* 369, 455–461 (1994).
30. Sun, P. D. i Davies, D. R. The Cystine-Knot Growth-Factor Superfamily. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 24, 269–292 (1995).
31. Ruddon, R. W., Sherman, S. A. i Bedows, E. Protein folding in the endoplasmic reticulum: lessons from the human chorionic gonadotropin beta subunit. *Protein Sci.* 5, 1443–52 (1996).
32. Xing, Y. *i in.* Glycoprotein Hormone Assembly in the Endoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* 279, 35458–35468 (2004).
33. Cole, L. A. HCG variants, the growth factors which drive human malignancies. *Am J Cancer Res* 2, 22–35 (2012).
34. Elliott, M. M., Kardana, A., Lustbader, J. W. i Cole, L. A. Carbohydrate and peptide structure of the α - and β -subunits of human chorionic gonadotropin from normal and aberrant pregnancy and choriocarcinoma. *Endocrine* 7, 15–32 (1997).
35. Wehmann, R. E. i Nisula, B. C. Metabolic and renal clearance rates of purified human chorionic gonadotropin. *J. Clin. Invest.* 68, 184–94 (1981).
36. Korhonen, J., Alfthan, H., Ylöstalo, P., Veldhuis, J. & Stenman, U. H. Disappearance of human chorionic gonadotropin and its alpha- and beta-subunits after term pregnancy. *Clin. Chem.* 43, 2155–63 (1997).
37. Trinchard-Lugan, I., Khan, A., Porchet, H. C. & Munafo, A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human chorionic gonadotrophin in healthy male and female volunteers. *Reprod. Biomed. Online* 4, 106–15 (2002).
38. Nisula, B. C., Blithe, D. L., Akar, A., Lefort, G. i Wehmann, R. E. Metabolic fate of human choriogonadotropin. *J. Steroid Biochem.* 33, 733–7 (1989).
39. Amr, S., Rosa, C., Birken, S., Canfield, R. i Nisula, B. Carboxyterminal peptide fragments of the beta subunit are urinary products of the metabolism of desialylated human choriogonadotropin. *J. Clin. Invest.* 76, 350 (1985).
40. Ziminski, S. J., Rorke, E. A., Sickel, M. A. i Vaitukaitis, J. L. Fate of Human Chorionic Gonadotropin Bound to Rat Corpora Lutea*. *Endocrinology* 111, 625–634 (1982).
41. Conn, P. M., Conti, M., Harwood, J. P., Dufau, M. L. i Catt, K. J. Internalisation of gonadotrophin–receptor complex in ovarian luteal cells. *Nature* 274, 598–600 (1978).
42. Amsterdam, A., Nimrod, A., Lamprecht, S. A., Burstein, Y. i Lindner, H. R. Internalization and degradation of receptor-bound hCG in granulosa cell cultures. *Am. J. Physiol.* 236, E129–38 (1979).
43. de Medeiros, S. F. *i in.* Distribution of the β -core human chorionic gonadotrophin fragment in human body fluids. *J. Endocrinol.* 135, 175–188 (1992).
44. Johnson, W. i Jameson, J. L. AP-2 (Activating Protein 2) and Sp1 (Selective Promoter Factor 1) Regulatory Elements Play Distinct Roles in the Control of Basal Activity and Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Responsiveness of the Human Chorionic Gonadotropin- β Promoter. *Mol. Endocrinol.* 13, 1963–1975 (1999).
45. Sacchi, S., Sena, P., Degli Esposti, C., Lui, J. i La Marca, A. Evidence for expression and functionality of FSH and LH/hCG receptors in human endometrium. *J. Assist. Reprod. Genet.* 35, 1703–1712 (2018).
46. Chambers, A. E. i Banerjee, S. Natural antisense LHCGR could make sense of hypogonadism, male-limited precocious puberty and pre-eclampsia. *Mol. Cell. Endocrinol.* 241, 1–9 (2005).

47. Perrier d'Hauterive, S. *i in.* Dialogue between Blastocyst hCG and Endometrial LH/hCG Receptor: Which Role in Implantation? *Gynecol. Obstet. Invest.* 64, 156–160 (2007).
48. Srisuparp, S., Strakova, Z. i Fazleabas, A. T. The role of chorionic gonadotropin (CG) in blastocyst implantation. *Arch. Med. Res.* 32, 627–34.
49. Rao, C. V. i Lei, Z. M. The past, present and future of nongonadal LH/hCG actions in reproductive biology and medicine. *Mol. Cell. Endocrinol.* 269, 2–8 (2007).
50. Abdallah, M. A. *i in.* Human Fetal Nongonadal Tissues Contain Human Chorionic Gonadotropin/Luteinizing Hormone Receptors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 952–956 (2004).
51. Goldsmith, P. C., McGregor, W. G., Raymoure, W. J., Kuhn, R. W. i Jaffe, R. B. Cellular Localization of Chorionic Gonadotropin in Human Fetal Kidney and Liver. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 57, 654–661 (1983).
52. Lei, Z. M., Rao, C. V., Kornyei, J. L., Licht, P. & Hiatt, E. S. Novel expression of human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor gene in brain. *Endocrinology* 132, 2262–2270 (1993).
53. Toth, P. *i in.* Expression of functional human chorionic gonadotropin/human luteinizing hormone receptor gene in human uterine arteries. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79, 307–315 (1994).
54. Guibourdenche, J. *i in.* Hyperglycosylated hCG Is a Marker of Early Human Trophoblast Invasion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, E240–E244 (2010).
55. Handschuh, K. *i in.* Human Chorionic Gonadotropin Produced by the Invasive Trophoblast But Not the Villous Trophoblast Promotes Cell Invasion and Is Down-Regulated by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ . *Endocrinology* 148, 5011–5019 (2007).
56. Rizov, M., Andreeva, P. i Dimova, I. Molecular regulation and role of angiogenesis in reproduction. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* vol. 56 127–132 (2017).
57. Nouri, K. *i in.* Polymorphisms of VEGF and VEGF receptors are associated with the occurrence of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) - A retrospective case-control study. *J. Ovarian Res.* 7, (2014).
58. Sasaki, Y., Ladner, D. G. i Cole, L. A. Hyperglycosylated human chorionic gonadotropin and the source of pregnancy failures. *Fertil. Steril.* 89, 1781–1786 (2008).
59. Chen, C. Y., Hwu, Y. M., Chen, C. P. i Chang, C. C. Quantitative analysis of total β -subunit of human chorionic gonadotropin concentration in urine by immunomagnetic reduction to assist in the diagnosis of ectopic pregnancy. *Int. J. Nanomedicine* 10, 2475–2483 (2015).
60. Tsampalas, M. *et al.* Human chorionic gonadotropin: A hormone with immunological and angiogenic properties. *J. Reprod. Immunol.* 85, 93–98 (2010).
61. Wan, H. *i in.* Chorionic gonadotropin can enhance innate immunity by stimulating macrophage function. *J. Leukoc. Biol.* 82, 926–933 (2007).
62. Zhong, T. *i in.* Lectin histochemical analysis of uterine natural killer cells in normal, hydatidiform molar and invasive molar pregnancy. *Oncol. Lett.* 16, 6458–6464 (2018).
63. Palomino, W. A., Argandoña, F., Azúa, R., Kohen, P. i Devoto, L. Complement C3 and Decay - Accelerating Factor Expression Levels Are Modulated by Human Chorionic Gonadotropin in Endometrial Compartments During the Implantation Window. *Reprod. Sci.* 20, 1103–1110 (2013).
64. Kayisli, U. A., Selam, B., Guzeloglu-Kayisli, O., Demir, R. i Arici, A. Human Chorionic Gonadotropin Contributes to Maternal Immunotolerance and Endometrial Apoptosis by Regulating Fas-Fas Ligand System. *J. Immunol.* 171, 2305–2313 (2003).
65. Dauven, D., Ehrentraut, S., Langwisch, S., Zenclussen, A. C. i Schumacher, A. Immune Modulatory Effects of Human Chorionic Gonadotropin on Dendritic Cells Supporting Fetal Survival in Murine Pregnancy. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 7, 146 (2016).
66. Mavrellos, D. *i in.* Efficacy and safety of a clinical protocol for expectant management of selected women diagnosed with a tubal ectopic pregnancy. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 42, 102–107 (2013).
67. Szczerba, A., Białas, P., Pięta, P. P. i Jankowska, A. hCG - related molecules and their measurement. *Polish Gynaecol.* 84, 65–70 (2016).
68. Taran, F.-A. *i in.* The Diagnosis and Treatment of Ectopic Pregnancy. *Dtsch. Arztebl. Int.* 112, 693–703; 704–5 (2015).
69. Giakoumelou, S. *i in.* The role of infection in miscarriage. *Hum. Reprod. Update* 22, 116–33 (2016).
70. Freis, A. *i in.* Cytokines in relation to hCG are significantly altered in asymptomatic women with miscarriage - a pilot study. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 16, 93 (2018).

71. Seckl, M. J. *i in*. Gestational trophoblastic disease: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. (2013).
72. Shiefa, S., Amargandhi, M., Bhupendra, J., Moulali, S. i Kristine, T. First Trimester Maternal Serum Screening Using Biochemical Markers PAPP-A and Free β -hCG for Down Syndrome, Patau Syndrome and Edward Syndrome. *Indian J. Clin. Biochem.* 28, 3 (2013).
73. Roig, J., Krause, J.-M., Berger, P. i Merz, W. E. Time-dependent folding of immunological epitopes of the human chorionic gonadotropin β -subunit. *Mol. Cell. Endocrinol.* 260–262, 12–22 (2007).
74. Hussa, R. *The clinical marker hCG*. (ABC-CLIO, Incorporated, 1987).
75. Yang, Y., Shi, Y., Hou, Y., Lu, Y. i Yang, J. CGB5 expression is independently associated with poor overall survival and recurrence-free survival in patients with advanced gastric cancer. *Cancer Med.* 7, 716–725 (2018).
76. Cole, L. A. i Butler, S. A. Hyperglycosylated human chorionic gonadotropin and human chorionic gonadotropin free beta-subunit: tumor markers and tumor promoters. *J. Reprod. Med.* 53, 499–512 (2008).
77. Li, J. *i in*. B Subunit of Human Chorionic Gonadotropin Promotes Tumor Invasion and Predicts Poor Prognosis of Early-Stage Colorectal Cancer. *Cell. Physiol. Biochem.* 45, 237–249 (2018).
78. Li, Z., Li, C., Du, L., Zhou, Y. & Wu, W. Human chorionic gonadotropin β induces migration and invasion via activating ERK1/2 and MMP-2 in human prostate cancer DU145 cells. *PLoS One* 8, (2013).
79. Sotgia, F., Fiorillo, M. i Lisanti, M. P. Mitochondrial markers predict recurrence, metastasis and tamoxifen-resistance in breast cancer patients: Early detection of treatment failure with companion diagnostics. *Oncotarget* 8, 68730–68745 (2017).
80. Giampazolias, E. i Tait, S. W. G. Mitochondria and the hallmarks of cancer. *FEBS J.* 283, 803–814 (2016).
81. Wu, W. *i in*. β -hCG promotes epithelial ovarian cancer metastasis through ERK/MMP2 signaling pathway. *Cell Cycle* 18, 46–59 (2019).
82. Davies, S., Bax, C., Chatzaki, E., Chard, T. i Iles, R. K. Regulation of endometrial cancer cell growth by luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH). *Br. J. Cancer* 1730–1734 (2000).
83. Taliouri, E., Vrekoussis, T., Vergetaki, A., Agorastos, T. & Makrigiannakis, A. Corticotropin-releasing hormone (CRH) is expressed in the human cervical carcinoma cells (HeLa) and upregulates the expression of Fas ligand. *Tumor Biol.* 34, 125–130 (2013).
84. Schmid, F., Fliegert, R., Westphal, T., Bauche, A. & Guse, A. H. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) degradation by alkaline phosphatase. (2012).
85. Butler, S. A. i Iles, R. K. *Ectopic Human Chorionic Gonadotropin Secretion by Epithelial Tumors and Human Chorionic Gonadotropin-Induced Apoptosis in Kaposi's Sarcoma: Is There a Connection?* (2003).
86. Cerami, E. *i in*. The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics. *Cancer Discov.* 2, 401–404 (2012).
87. Gao, J. *i in*. Integrative Analysis of Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the cBioPortal. *Sci. Signal.* 6, p11–p11 (2013).
88. Chandrashekar, D. S. *i in*. UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses. *Neoplasia* 19, 649–658 (2017).
89. Maaser, K., Sutter, A. P. i Scherübl, H. Mechanisms of mitochondrial apoptosis induced by peripheral benzodiazepine receptor ligands in human colorectal cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332, 646–652 (2005).
90. Rull, K. i Laan, M. Expression of β -subunit of HCG genes during normal and failed pregnancy. *Hum. Reprod.* 20, 3360–3368 (2005).
91. Casarini, L., Santi, D., Brigante, G. i Simoni, M. Two hormones for one receptor: Evolution, biochemistry, actions, and pathophysiology of LH and hCG. *Endocrine Reviews* vol. 39 549–592 (2018).
92. Tilburgs, T. *i in*. Human Chorionic Gonadotropin as a Central Regulator of Pregnancy Immune Tolerance. *J. Immunol.* 190, 2650–2658 (2013).
93. Ascoli, M. & Segaloff, D. L. On the structure of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor. *Endocr. Rev.* 10, 27–44 (1989).
94. Zygmunt, M. *i in*. Characterization of human chorionic gonadotropin as a novel angiogenic factor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 5290–5296 (2002).

95. Schumacher, A. *i in.* Human Chorionic Gonadotropin Attracts Regulatory T Cells into the Fetal-Maternal Interface during Early Human Pregnancy. *J. Immunol.* 182, 5488–5497 (2009).
96. Cole, L. A. New discoveries on the biology and detection of human chorionic gonadotropin. *Reproductive Biology and Endocrinology* vol. 7 8 (2009).
97. Eskild, A., Monkerud, L., Jukic, A. M., Åsvold, B. O. i Lie, K. K. Maternal concentrations of human chorionic gonadotropin (hCG) and risk for cerebral palsy (CP) in the child. A case control study. *Eur. J. Obstet. Gynecol.* 228, 203–208 (2018).
98. Iles, R. K., Delves, P. J. i Butler, S. A. Does hCG or hCG?? play a role in cancer cell biology? *Mol. Cell. Endocrinol.* 329, 62–70 (2010).
99. Cole, L. A. i Khanlian, S. A. Hyperglycosylated hCG: A variant with separate biological functions to regular hCG. *Molecular and Cellular Endocrinology* vols 260–262 228–236 (2007).
100. Szczerba, A., Sliwa, A., Kubiczak, M., Nowak-Markwitz, E. i Jankowska, A. Human chorionic gonadotropin β subunit affects the expression of apoptosis-regulating factors in ovarian cancer. *Oncol. Rep.* 35, 538–545 (2016).
101. Schüler-Toprak, S., Treeck, O. & Ortmann, O. Human chorionic gonadotropin and breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 18 (2017).
102. Bellet, D. *i in.* Malignant transformation of nontrophoblastic cells is associated with the expression of chorionic gonadotropin β genes normally transcribed in trophoblastic cells. *Cancer Res.* 57, 516–523 (1997).
103. Span, P. N. *i in.* Analysis of expression of chorionic gonadotrophin transcripts in prostate cancer by quantitative Taqman and a modified molecular beacon RT-PCR. *J. Endocrinol.* 172, 489–495 (2002).
104. Kubiczak, M., Walkowiak, G. P., Nowak-Markwitz, E. i Jankowska, A. Human chorionic gonadotropin beta subunit genes CGB1 and CGB2 are transcriptionally active in ovarian cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 12650–12660 (2013).
105. Burczynska, B. B., Kobrouly, L., Butler, S. A., Naase, M. i Iles, R. K. Novel insights into the expression of CGB1 1-2 genes by epithelial cancer cell lines secreting ectopic free. *Anticancer Res.* 34, 2239–2248 (2014).
106. Afsharpad, M. *i in.* Cancer-Testis Antigens as New Candidate Diagnostic Biomarkers for Transitional Cell Carcinoma of Bladder. *Pathol. Oncol. Res.* 25, 191–199 (2019).
107. Rull, K. i Laan, M. Expression of β -subunit of HCG genes during normal and failed pregnancy. *Hum. Reprod.* 20, 3360–3368 (2005).
108. Cocquebert, M. *i in.* Comparative expression of hCG β -genes in human trophoblast from early and late first-trimester placentas. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 303, E950–8 (2012).
109. Hayflick, L. i Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25, 585–621 (1961).
110. Keibler, M. A. *i in.* Metabolic requirements for cancer cell proliferation. *Cancer Metab.* 4, 16 (2016).
111. Otto, T. i Sicinski, P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* vol. 17 93–115 (2017).
112. Van Dilla, M. A., Trujillo, T. T., Mullaney, P. F. i Coulter, J. R. Cell microfluorometry: A method for rapid fluorescence measurement. *Science (80-.).* 163, 1213–1214 (1969).
113. Darzynkiewicz, Z., Huang, X. & Zhao, H. Analysis of Cellular DNA Content by Flow Cytometry. *Curr. Protoc. Cytom.* 82, 7.5.1–7.5.20 (2017).
114. Kim, K. H. i Sederstrom, J. M. Assaying cell cycle status using flow cytometry. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2015, 28.6.1–28.6.11 (2015).
115. Gerdes, J. *i in.* Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J. Immunol.* 133, 1710–5 (1984).
116. Kurki, P., Vanderlaan, M., Dolbeare, F., Gray, J. i Tan, E. M. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. *Exp. Cell Res.* 166, 209–219 (1986).
117. Rothaeusler, K. i Baumgarth, N. Assessment of Cell Proliferation by 5-Bromodeoxyuridine (BrdU) Labeling for Multicolor Flow Cytometry. *Curr. Protoc. Cytom.* 40, Unit7.31 (2007).
118. Gao, S. *i in.* Effects of HCG on human epithelial ovarian cancer vasculogenic mimicry formation in vivo. *Oncol. Lett.* 12, 459–466 (2016).

119. Gillott, D. J., Iles, R. K. i Chard, T. The effects of beta-human chorionic gonadotrophin on the in vitro growth of bladder cancer cell lines. *Br. J. Cancer* 73, 323–326 (1996).
120. Zhao, R. *i in*. Human chorionic gonadotropin promotes cell proliferation through the activation of c-Met in gastric cancer cells. *Oncol. Lett.* 16, 4271–4278 (2018).
121. Hamada, A. L. *i in*. Transfection of Antisense Chorionic Gonadotropin β Gene into Choriocarcinoma Cells Suppresses the Cell Proliferation and Induces Apoptosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 4873–4879 (2005).
122. Burczynska, B. *i in*. Stable knockdown of hCG β mRNA expression in bladder cancer cells results in significant growth inhibition. *Anticancer Res.* 33, 3611–4 (2013).
123. Jankowska, A. *i in*. Reduction of human chorionic gonadotropin beta subunit expression by modified U1 snRNA caused apoptosis in cervical cancer cells. *Mol. Cancer* 7, 1–9 (2008).
124. Jankowska, A. *i in*. Reduction of human chorionic gonadotropin beta subunit expression by modified U1 snRNA caused apoptosis in cervical cancer cells. *Mol. Cancer* 7, 26 (2008).
125. Banach, P., Zaborowski, M. P., Izycka, N., Romala, A. i Nowak-Markwitz, E. The value of an initial drop in Human Chorionic Gonadotropin levels in predicting a response to methotrexate in women with low-risk Gestational Trophoblastic Neoplasia. *Ginekol. Pol.* 90, 141–147 (2019).
126. Ngan, H. Y. S. *i in*. Update on the diagnosis and management of gestational trophoblastic disease. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 143, 79–85 (2018).
127. Cole, L. A. Hyperglycosylated hCG, a review. *Placenta* 31, 653–664 (2010).
128. Li, D. *i in*. hCG β expression by cervical squamous carcinoma - In vivo histological association with tumour invasion and apoptosis. *Histopathology* 53, 147–155 (2008).
129. Mendonça-Torres, M. C. i Roberts, S. S. The translocator protein (TSPO) ligand PK11195 induces apoptosis and cell cycle arrest and sensitizes to chemotherapy treatment in pre- and post-relapse neuroblastoma cell lines. *Cancer Biol. Ther.* 14, 319–326 (2013).
130. Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C. i De Laurenzi, V. Role of apoptosis in disease. *Aging* vol. 4 330–349 (2012).
131. Chu, W. M. Tumor necrosis factor. *Cancer Letters* vol. 328 222–225 (2013).
132. Walczak, H. Death receptor-ligand systems in cancer, cell death, and inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, (2013).
133. Martin, L. J. Mitochondrial and Cell Death Mechanisms in Neurodegenerative Diseases. *Pharmaceuticals* 3, 839–915 (2010).
134. Rojas-Rivera, D. i Hetz, C. TMEM16 protein family: Ancestral regulators of cell death. *Oncogene* vol. 34 269–280 (2015).
135. Tamm, I. *i in*. IAP-family protein Survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res.* 58, 5315–5320 (1998).
136. Altieri, D. C. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* vol. 22 8581–8589 (2003).
137. Hirano, H. *i in*. Survivin expression in lung cancer: Association with smoking, histological types and pathological stages. *Oncol. Lett.* 10, 1456–1462 (2015).
138. Zhu, H. *i in*. High expression of survivin predicts poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma following radiotherapy. *Tumour Biol.* 32, 1147–1153 (2011).
139. Fraunholz, I. *i in*. High survivin expression as a risk factor in patients with anal carcinoma treated with concurrent chemoradiotherapy. *Radiat. Oncol.* 7, 88 (2012).
140. Zhang, M., Li, X., Zhang, Y. i Zhou, K. Bax inhibitor-1 mediates apoptosis-resistance in human nasopharyngeal carcinoma cells. *Mol. Cell. Biochem.* 333, 1–7 (2010).
141. Lu, B. *i in*. Bax inhibitor-1 is overexpressed in non-small cell lung cancer and promotes its progression and metastasis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 1411–1418 (2015).
142. Lebeauupin, C., Blanc, M., Vallée, D., Keller, H. i Bailly-Maitre, B. BAX inhibitor-1: between stress and survival. *FEBS J.* febs.15179 (2020) doi:10.1111/febs.15179.
143. Mirakhor Samani, S., Ezazi Bojnordi, T., Zarghampour, M., Merat, S. i Fouladi, D. F. Expression of p53, Bcl-2 and Bax in endometrial carcinoma, endometrial hyperplasia and normal endometrium: a histopathological study. *J. Obstet. Gynaecol. (Lahore)*. 38, 999–1004 (2018).

144. Cui, J. i Placzek, W. J. Post-transcriptional regulation of anti-apoptotic BCL2 family members. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 19 (2018).
145. Mittal, R., Jaiswal, P. i Goel, A. Survivin: A molecular biomarker in cancer. *Indian J. Med. Res.* 141, 389 (2015).
146. Nyen, T. Van, Moiola, C. P., Colas, E., Annibali, D. i Amant, F. Modeling endometrial cancer: Past, present, and future. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 19 (2018).
147. Liu, Y., Beyer, A. i Aebersold, R. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell* vol. 165 535–550 (2016).
148. Warner, J. R. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends in Biochemical Sciences* vol. 24 437–440 (1999).
149. Chu, D., Barnes, D. J. i von der Haar, T. The role of tRNA and ribosome competition in coupling the expression of different mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 39, 6705–14 (2011).
150. Reid, D. W., Shenolikar, S. i Nicchitta, C. V. Simple and inexpensive ribosome profiling analysis of mRNA translation. *Methods* 91, 69–74 (2015).
151. Hrdlickova, R., Toloue, M. i Tian, B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* vol. 8 (2017).
152. Muz, B., de la Puente, P., Azab, F. i Azab, A. K. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia* 3, 83 (2015).
153. Jing, X. i in. Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment. *Molecular Cancer* vol. 18 1–15 (2019).
154. Wigerup, C., Pählman, S. i Bexell, D. Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacology and Therapeutics* vol. 164 152–169 (2016).
155. Smith, B. i Bhowmick, N. Role of EMT in Metastasis and Therapy Resistance. *J. Clin. Med.* 5, 17 (2016).
156. Aiello, N. M. i Kang, Y. Context-dependent EMT programs in cancer metastasis. *Journal of Experimental Medicine* vol. 216 1016–1026 (2019).
157. Timmerman, L. A. i in. Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev.* 18, 99–115 (2004).
158. Li, X. i in. Snail induction is an early response to Gli1 that determines the efficiency of epithelial transformation. *Oncogene* 25, 609–621 (2006).
159. Kim, K., Lu, Z. i Hay, E. D. Direct evidence for a role of β -catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT. *Cell Biol. Int.* 26, 463–476 (2002).
160. Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R. i Weinberg, R. A. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell* vol. 168 670–691 (2017).
161. Wu, W. i Walker, A. M. Human chorionic gonadotropin β (HCG β) down-regulates E-cadherin and promotes human prostate carcinoma cell migration and invasion. *Cancer* 106, 68–78 (2006).
162. Liu, N. i in. Human chorionic gonadotropin beta regulates epithelial-mesenchymal transition and metastasis in human ovarian cancer. *Oncol. Rep.* 1464–1472 (2017) doi:10.3892/or.2017.5818.
163. Li, J. i in. B Subunit of Human Chorionic Gonadotropin Promotes Tumor Invasion and Predicts Poor Prognosis of Early-Stage Colorectal Cancer. *Cell. Physiol. Biochem.* 45, 237–249 (2018).
164. Kawamata, F. i in. Chorionic Gonadotropin- β Modulates Epithelial-Mesenchymal Transition in Colorectal Carcinoma Metastasis. *Am. J. Pathol.* 188, 204–215 (2018).
165. Jiang, W. G. i in. Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives. *Seminars in Cancer Biology* vol. 35 S244–S275 (2015).
166. Redig, A. J. i Mcallister, S. S. Breast cancer as a systemic disease: A view of metastasis. *Journal of Internal Medicine* vol. 274 113–126 (2013).
167. Wang, X. i Adjei, A. A. Lung cancer and metastasis: new opportunities and challenges. *Cancer Metastasis Rev.* 34, 169–171 (2015).
168. Białas, P. i Jankowska, A. Biochemical markers in breast and ovarian cancer. *Polish Rev. Heal. Sci.* 42, 115–121 (2015).
169. He, W. i in. Clinical significance of circulating tumor cells in predicting disease progression and chemotherapy resistance in patients with gestational choriocarcinoma. *Int. J. Cancer* 144, 1421–1431 (2019).

10. Spis tabel, rysunków i rycin

10.1. Spis rysunków i rycin

Rysunek 1. Estymowane sekwencje aminokwasowe w strukturze pierwszorzędowej białka hCG β	22
Rycina 1. Ułożenie genów <i>CGB</i> w klastrze <i>LHB/CGB</i> na chromosomie 19..	8
Rycina 2. Struktura genów <i>CGB</i> ulokowanych na chromosomie 19	9
Rycina 3. Układ podjednostek alfa i beta hCG po uformowaniu struktury heterodimeru.	11
Rycina 4. Poziom ekspresji genu <i>CGB1</i> wyrażony w liczbie transkryptów na milion [TPM] w tkankach raka szyjki macicy oraz w tkankach szyjki macicy niezmienionych nowotworowo	40
Rycina 5. Poziom ekspresji genu <i>CGB2</i> wyrażony w liczbie transkryptów na milion [TPM] w tkankach raka szyjki macicy oraz w tkankach szyjki macicy niezmienionych nowotworowo	40
Rycina 6. Poziom ekspresji genu <i>CGB5</i> wyrażony w liczbie transkryptów na milion [TPM] w tkankach raka szyjki macicy oraz w tkankach szyjki macicy niezmienionych nowotworowo	41
Rycina 7. Poziom ekspresji genu <i>CGB1</i> wyrażony w liczbie transkryptów na milion [TPM] w tkankach raka endometrium oraz w tkankach endometrium niezmienionych nowotworowo	41
Rycina 8. Poziom ekspresji genu <i>CGB2</i> wyrażony w liczbie transkryptów na milion [TPM] w tkankach raka endometrium oraz w tkankach endometrium niezmienionych nowotworowo	42
Rycina 9. Poziom ekspresji genu <i>CGB5</i> wyrażony w liczbie transkryptów na milion [TPM] w tkankach raka endometrium oraz w tkankach endometrium niezmienionych nowotworowo	42
Rycina 10. Względny poziom ekspresji genów <i>CGB</i> przyrównany do poziomu ekspresji genu referencyjnego <i>HPRT</i> oraz znormalizowany względem krzywych wzorcowych w komórkach linii HeLa transfekowanych konstruktami <i>CGB 1.1</i> , <i>CGB 1.2</i> , <i>CGB 2.1</i> , <i>CGB 2.2</i> , <i>CGB 5</i>	44
Rycina 11. Reprezentatywny wynik detekcji białek hCG β oraz GAPDH uzyskany metodą western blot z izolatów linii komórkowej HeLa siedemdziesiąt dwie godziny od momentu transfekcji.	45

Rycina 12. Względny poziom ekspresji białka hCg β oznaczony densytometrycznie w izolatach komórkowych linii HeLa, znormalizowany wobec białka referencyjnego GAPDH.....	45
Rycina 13. Relatywny poziom ekspresji genów CGB przyrównany do poziomu ekspresji genu referencyjnego HPRT w komórkach linii Ishikawa transfekowanych konstruktami CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5.....	47
Rycina 14. Reprezentatywny wynik detekcji białek hCg β oraz GAPDH w izolatach białkowych z linii komórkowej Ishikawa siedemdziesiąt dwie godziny po transfekcji, uzyskany metodą western blot	47
Rycina 15. Względny poziom ekspresji białka hCg β oznaczony w izolatach komórkowych linii Ishikawa znormalizowany wobec białka referencyjnego GAPDH.....	48
Rycina 16. Komórki linii HeLa aktywnie inkorporujące BrdU podczas replikacji DNA, uwidocznione podczas reakcji z przeciwciałem przeciwko BrdU, skoniugowanym z FITC.....	52
Rycina 17. Zmiany proliferacji komórek linii HeLa transfekowanych konstruktami CGB: CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 wykazane podczas analizy z wykorzystaniem bromodeoksyurudyny (BrdU).....	53
Rycina 18. Reprezentatywny wykres zmian proliferacji komórek HeLa podczas siedemdziesięciodwugodzinnej obserwacji z wykorzystaniem systemu xCELLigence® RTCA DP.....	54
Rycina 19. Zmiany w proliferacji komórek HeLa obserwowane z wykorzystaniem systemu xCELLigence® RTCA DP, w siedemdziesiątej drugiej godzinie od przeprowadzenia transfekcji konstruktami CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5.....	55
Rycina 20. Komórki linii Ishikawa aktywnie inkorporujące BrdU podczas replikacji DNA, uwidocznione podczas reakcji z przeciwciałem przeciwko BrdU, skoniugowanym z FITC.....	58
Rycina 21. Zmiany proliferacji komórek linii Ishikawa transfekowanych konstruktami CGB: CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 uwidocznione metodą inkorporacji bromodeoksyurudyny (BrdU).....	59
Rycina 22. Reprezentatywny wykres zmian w proliferacji komórek Ishikawa podczas siedemdziesięciodwugodzinnej obserwacji z wykorzystaniem systemu xCELLigence® RTCA DP.....	60
Rycina 23. Wykres zmian proliferacji komórek Ishikawa uzyskany dzięki wykorzystaniu systemu xCELLigence® RTCA DP w siedemdziesiątej drugiej godzinie od przeprowadzenia transfekcji konstruktami: CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5.....	61
Rycina 24. Reprezentatywny wykres zmian potencjału inwazyjności komórek HeLa podczas dwudziestoczworgodzinnej obserwacji z wykorzystaniem systemu xCELLigence® RTCA DP.....	62

Rycina 25. Wykres potencjału inwazyjności komórek linii HeLa poddanych transfekcji z zastosowaniem badanych konstruktów: CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5	63
Rycina 26. Reprezentatywny wykres zmian potencjału inwazyjności komórek Ishikawa podczas dwudziestoczterogodzinnej obserwacji z wykorzystaniem systemu xCELLigence® RTCA DP.....	64
Rycina 27. Wykres potencjału inwazyjności komórek linii Ishikawa poddanych transfekcji badanymi konstruktami: CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5.....	64
Rycina 28. Reprezentatywne histogramy jednowymiarowe cyklu komórkowego komórek linii HeLa transfekowanych analizowanymi konstruktami.....	66
Rycina 29. Wykresy rozkładów licznosci komórek HeLa znajdujących się w poszczególnych fazach cyklu życiowego (A. faza apoptozy; B. faza G0/G1; C. faza S; D. faza G2/M) poddanych transfekcji z zastosowaniem badanych konstruktów: CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5.....	67
Rycina 30. Reprezentatywne histogramy jednowymiarowe cyklu komórkowego komórek linii Ishikawa transfekowanych analizowanymi konstruktami	69
Rycina 31. Wykresy rozkładów licznosci komórek znajdujących się w poszczególnych fazach cyklu życiowego (A. faza apoptozy; B. faza G0/G1; C. faza S; D. faza G2/M) dla komórek linii Ishikawa poddanych transfekcji z zastosowaniem badanych konstruktów: CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5.....	70
Rycina 32. Komórki linii HeLa wybarwione mieszaniną barwników: bisbenzimidu (Hoechst 33342) i jodku propidyny.	71
Rycina 33. Komórki linii Ishikawa wybarwione mieszaniną barwników: bisbenzimidu (Hoechst 33342) i jodku propidyny.	71
Rycina 34. Względny poziom ekspresji genu <i>BIRC5</i> , przyrównany do poziomu ekspresji genu referencyjnego <i>HPRT</i> w komórkach linii HeLa transfekowanych konstruktami: CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5.....	72
Rycina 35. Reprezentatywny wynik detekcji białka surwiwina oraz GAPDH w izolatach białkowych z linii komórkowej HeLa siedemdziesiąt dwie godziny po transfekcji, uzyskany metodą western blot.	73
Rycina 36. Względny poziom ekspresji białka surwiwina oznaczony w izolatach białkowych linii HeLa, znormalizowany wobec białka referencyjnego GAPDH	73
Rycina 37. Relatywny poziom ekspresji genu <i>BAX</i> przyrównany do poziomu ekspresji genu referencyjnego <i>HPRT</i> w komórkach linii HeLa transfekowanych konstruktami CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5.....	75
Rycina 38. Reprezentatywny wynik detekcji białek BAX oraz GAPDH w izolatach białkowych z linii komórkowej HeLa siedemdziesiąt dwie godziny po transfekcji, uzyskany metodą western blot.....	75

- Rycina 39. Względny poziom ekspresji białka BAX oznaczony w izolatach komórek HeLa, znormalizowany wobec białka referencyjnego GAPDH. CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 – izolaty białkowe z komórek poddawanych transfekcji z użyciem wybranego konstruktu.76
- Rycina 40. Relatywny poziom ekspresji genu *BCL2* przyrównany do poziomu ekspresji genu referencyjnego *HPRT* w komórkach linii HeLa transfekowanych konstruktami CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5.....77
- Rycina 41. Reprezentatywny wynik detekcji białka BCL-2 oraz GAPDH metodą western blot, uzyskany dla izolatów białkowych komórek HeLa siedemdziesiąt dwie godziny od transfekcji. CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 – izolaty białkowe z komórek poddawanych transfekcji z użyciem wybranego konstrukt.78
- Rycina 42. Względny poziom ekspresji białka BCL-2 oznaczony w izolatach linii HeLa, znormalizowany wobec białka referencyjnego GAPDH. CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 – izolaty białkowe z komórek poddanych transfekcji z użyciem wybranego konstrukt.78
- Rycina 43. Relatywny poziom ekspresji genu *BIRC5*, przyrównany do poziomu ekspresji genu referencyjnego *HPRT*, w komórkach linii Ishikawa transfekowanych konstruktami CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5..80
- Rycina 44. Reprezentatywny wynik detekcji białka surwiwina oraz GAPDH w izolatach białkowych z linii komórkowej Ishikawa siedemdziesiąt dwie godziny po transfekcji, uzyskany metodą western blot.81
- Rycina 45. Względny poziom ekspresji białka surwiwina oznaczony w izolatach linii Ishikawa, znormalizowany wobec białka referencyjnego GAPDH. CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5 – izolaty białkowe z komórek poddanych transfekcji z użyciem wybranego konstrukt. Kontrolę stanowiły komórki nietransfekowane.81
- Rycina 46. Relatywny poziom ekspresji genu *BAX* przyrównany do poziomu ekspresji genu referencyjnego *HPRT* w komórkach linii Ishikawa transfekowanych konstruktami CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5.....83
- Rycina 47. Reprezentatywny wynik detekcji białek BAX oraz GAPDH w izolatach białkowych z linii komórkowej Ishikawa siedemdziesiąt dwie godziny po transfekcji, uzyskany metodą western blot.84
- Rycina 48. Względny poziom ekspresji białka BAX oznaczony w izolatach komórkowych linii Ishikawa, znormalizowany wobec białka referencyjnego GAPDH.....84
- Rycina 49. Relatywny poziom ekspresji genu *BCL2* przyrównany do poziomu ekspresji genu referencyjnego *HPRT* w komórkach linii Ishikawa transfekowanych konstruktami CGB 1.1, CGB 1.2, CGB 2.1, CGB 2.2, CGB 5..86

Rycina 50. Reprezentatywny wynik detekcji białek BCL-2 oraz GAPDH w izolatach białkowych z linii komórkowej Ishikawa siedemdziesiąt dwie godziny po transfekcji, uzyskany metodą western blot	87
Rycina 51. Względny poziom ekspresji białka BCL-2 oznaczony w izolatach białkowych linii Ishikawa znormalizowany wobec białka referencyjnego GAPDH.....	87
Rycina 52. Odsetki komórek linii HeLa transfekowane konstruktami CGB oraz uwidocznione podczas obserwacji mikroskopowej po zaindukowaniu procesu apoptozy.	89
Rycina 53. Komórki linii HeLa wybarwione mieszaniną barwników: bisbenzimidu (Hoechst 33342) i jodku propidyny po 24 godzinach od chwili indukcji procesu apoptozy.....	91
Rycina 54. Odsetki komórek linii Ishikawa transfekowane konstruktami CGB oraz uwidocznione podczas obserwacji mikroskopowej po zaindukowaniu procesu apoptozy.	93
Rycina 55. Komórki linii Ishikawa wybarwione mieszaniną barwników: bisbenzimidu (Hoechst 33342) i jodku propidyny po 24 godzinach od chwili indukcji procesu apoptozy..	94

10.2. Spis tabel

Tabela 1. Zestawienie komponentów używanych do reakcji odwrotnej transkrypcji	22
Tabela 2. Charakterystyka starterów wykorzystywanych do klonowania genów <i>CGB</i>	23
Tabela 3. Zestawienie komponentów PCR.....	24
Tabela 4. Profil temperaturowy PCR	24
Tabela 5. Zestawienie składników zastosowanych w reakcjach cięcia restrykcyjnego.....	25
Tabela 6. Zestawienie składników zastosowanych w reakcjach ligacji.....	25
Tabela 7. Zestawienie starterów wykorzystywanych do reakcji qPCR.....	29
Tabela 8. Charakterystyka sond użytych do reakcji qPCR	29
Tabela 9. Skład mieszaniny reakcyjnej qPCR.....	30
Tabela 10. Profil termiczny reakcji qPCR z użyciem Light Cycler TaqMan Master i sond hydrolizujących.....	30
Tabela 11. Charakterystyka składników użytych do przygotowania żelu poliakrylamidowego stosowanego podczas procedury western blot.....	35
Tabela 12. Charakterystyka stosowanych przeciwciał podczas detekcji białek.....	36
Tabela 13. Wyniki analiz statystycznych względnych poziomów ekspresji białka hCG β oznaczonych w izolatach komórkowych linii HeLa, znormalizowanych wobec białka referencyjnego GAPDH.	46
Tabela 14. Wyniki analiz statystycznych względnych poziomów ekspresji białka hCG β oznaczonych w izolatach komórkowych linii Ishikawa znormalizowanych wobec białka referencyjnego GAPDH	49
Tabela 15. Wyniki analiz statystycznych odsetka komórek inkorporujących BrdU dla linii HeLa ..	53
Tabela 16. Wyniki analiz statystycznych tempa proliferacji komórek HeLa w siedemdziesiątej drugiej godzinie po transfekcji.....	55
Tabela 17. Wyniki analiz statystycznych odsetka komórek inkorporujących BrdU dla linii Ishikawa	59
Tabela 18. Wyniki analiz statystycznych proliferacji komórek Ishikawa w siedemdziesiątej drugiej godzinie obserwacji	61
Tabela 19. Procentowy udział poszczególnych faz cyklu komórkowego komórek HeLa transfekowanych konstruktami CGB	65
Tabela 20. Procentowy udział komórek znajdujących się w poszczególnych fazach cyklu komórkowego linii komórkowej Ishikawa poddanej transfekcji.	68
Tabela 21. Wyniki analiz statystycznych względnych poziomów ekspresji białka surwiwina oznaczonych w izolatach komórek HeLa, znormalizowanych wobec białka referencyjnego GAPDH	74

Tabela 22. Wyniki analiz statystycznych względnych poziomów ekspresji białka BAX oznaczonych w izolatach komórek HeLa, znormalizowanych względem białka referencyjnego GAPDH	76
Tabela 23. Wyniki analiz statystycznych względnych poziomów ekspresji białka BCL-2 oznaczonych w izolatach komórek HeLa, znormalizowanych wobec białka referencyjnego GAPDH	79
Tabela 24. Wyniki analiz statystycznych względnych poziomów ekspresji białka surwiwina w izolatach komórkowych linii Ishikawa, znormalizowanych wobec białka referencyjnego GAPDH.	82
Tabela 25. Wyniki analiz statystycznych względnych poziomów ekspresji białka BAX oznaczonych w izolatach białkowych Ishikawa, znormalizowanych wobec białka referencyjnego GAPDH.	85
Tabela 26. Wyniki analiz statystycznych względnych poziomów ekspresji białka BCL-2 oznaczonych w izolatach komórkowych linii Ishikawa, znormalizowanych wobec białka referencyjnego GAPDH.	88
Tabela 27. Wyniki analiz statystycznych odsetka komórek apoptotycznych dla linii komórkowej HeLa.....	90
Tabela 28. Wyniki analiz statystycznych odsetka komórek apoptotycznych dla linii komórkowej Ishikawa.	93