

lek. Justyna Borucka

Analiza ekspresji IFI16 w raku jajnika i w oporności na leki cytotoksyczne

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: dr hab. Radosław Januchowski

Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu,
Wydział Medyczny, Katedra i Zakład Histologii i Embriologii

Promotor: prof. dr hab. Rodryg Ramlau

Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu,
Wydział Lekarski, Katedra i Klinika Onkologii

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii

Katedra i Klinika Onkologii



Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań

2021

Słowa kluczowe

białko 16 indukowane przez interferon gamma (IFI16), izoformy białka, lokalizacja komórkowa, oporność na leki cytotoksyczne, rak jajnika, podtypy histologiczne

Keywords

interferon gamma inducible protein 16 (IFI16), protein isoforms, cellular localization, cytotoxic drug resistance, ovarian cancer, histological types

Nazwa i numer projektu badawczego

OPUS 7, nr wniosku: 2014/13/B/NZ5/00334

„Ścieżki sygnalizacyjne nowotworowych komórek macierzystych jako cel terapeutyczny w leczeniu raka jajnika”

SONATA BIS 6, nr wniosku: 2016/22/E/NZ5/00381

„Ocena roli nowotworowych komórek macierzystych w produkcji macierzy zewnątrzkomórkowej i oporności raka jajnika na cytostatyki”

Spis treści

Spis tabel i rycin	5
Wykaz stosowanych skrótów	7
1. Wstęp	9
1.1. Epidemiologia raka jajnika	9
1.2. Etiologia raka jajnika	9
1.3. Czynniki prognostyczne raka jajnika	10
1.3.1. Czynniki związane z pacjentką – wiek i stan ogólny	11
1.3.2. Stopień zaawansowania klinicznego	11
1.3.3. Typ histologiczny nowotworu	12
1.3.4. Stopień zróżnicowania histopatologicznego	14
1.3.5. Typ molekularny	15
1.4. Leczenie raka jajnika	16
1.4.1. Leczenie chirurgiczne	16
1.4.2. Leczenie systemowe	17
1.4.2.1. Chemioterapia	17
1.4.2.2. Leki antyangiogenne	19
1.4.2.3. Inhibitory PARP	19
1.5. Mechanizmy oporności na leki cytotoksyczne	19
1.5.1. Komórkowe mechanizmy oporności na cytostatyki	20
1.5.2. Tkankowe mechanizmy oporności na chemioterapię	21
1.6. Białko IFI16	22
1.6.1. Ekspresja tkankowa IFI16	22
1.6.2. Budowa genu i białka IFI16	22
1.6.2.1. Budowa genu <i>IFI16</i>	22
1.6.2.2. Budowa białka IFI16	23
1.6.3. Regulacja ekspresji genu <i>IFI16</i>	25
1.6.3.1. Regulacja ekspresji genu <i>IFI16</i> przez interferony	25
1.6.3.2. Regulacja ekspresji genu <i>IFI16</i> przez receptor androgenowy	26
1.6.3.3. Regulacja ekspresji genu <i>IFI16</i> przez białko p53	27
1.6.3.4. Regulacja ekspresji przez inne czynniki	28
1.6.4. Regulacja lokalizacji komórkowej	29

1.6.5. Rola IFI16 w starzeniu się komórek i hamowaniu cyklu komórkowego	30
1.6.6. Rola IFI16 w odpowiedzi na uszkodzone DNA i infekcje wirusowe	33
1.6.7. Rola IFI16 w chorobach autoimmunologicznych	34
1.6.8. Znaczenie ekspresji białka IFI16 w nowotworach	34
1.6.8.1. Rola IFI16 w raku jajnika	35
1.6.8.2. Nowotwory z utratą ekspresji IFI16	35
1.6.8.3. Nowotwory ze wzrostem ekspresji IFI16	36
2. Założenia i cele pracy	37
3. Materiały i metody	38
3.1. Odczynniki i przeciwciała	38
3.2. Linie komórkowe i hodowla komórkowa	38
3.3. Analiza statystyczna	44
4. Wyniki	45
5. Dyskusja	57
6. Wnioski	68
Streszczenie	69
Summary	71
Piśmiennictwo	73
Opinia Komisji Bioetycznej UMP	83

Spis tabel i rycin

Tabela 1. Warianty transkrypcyjne genu i izoformy białka IFI16

Tabela 2. Sekwencje starterów użytych w reakcji q-PCR

Tabela 3. Analiza ekspresji genów związanych funkcjonalnie z IFI16 w liniach komórkowych wrażliwych i opornych na leki cytotoksyczne z zastosowaniem mikromacierzy RNA

Rycina 1. Schemat budowy genu i białka IFI16

Rycina 2. Regulacja ekspresji genu *IFI16* przez interferony

Rycina 3. Rola receptora androgenowego (AR) w regulacji ekspresji IFI16 oraz rola białka IFI16 w regulacji ekspresji genów zależnych od receptora AR

Rycina 4. Regulacja ekspresji genu *IFI16* przez białko p53

Rycina 5. Regulacja ekspresji genu *IFI16* przez inne czynniki

Rycina 6. Regulacja ekspresji genów przez białka p53 oraz IFI16

Rycina 7. Rola białka IFI16 w regulacji ekspresji genów zależnych od białka Rb

Rycina 8. Regulacja ekspresji i aktywności telomerazy przez białko IFI16

Rycina 9. Rola białka IFI16 w regulacji ekspresji IFN- β

Rycina 10. Analiza ekspresji (q-PCR) transkryptu *IFI16* w linii A2780 oraz liniach opornych na leki cytotoksyczne

Rycina 11. Analiza immunofluorescencyjna ekspresji białka IFI16 w liniach komórkowych A2780, A2780DR1, A2780DR2 i A2780PR1

Rycina 12. Analiza ekspresji białka IFI16 we frakcjach cytoplazmatycznej i jądrowej wyizolowanych z linii A2780 oraz z linii opornych na DOX i linii i opornej na PAC

Rycina 13. Analiza ekspresji genów *IFI16* i *MDR1* w linii komórkowej A2780 po krótkotrwałej ekspozycji na DOX lub PAC

Rycina 14. Analiza ekspresji (q-PCR) transkryptu *IFI16* w różnych liniach komórkowych raka jajnika

Rycina 15. Analiza immunofluorescencyjna ekspresji białka IFI16 w liniach komórkowych A2780, SKOV-3, OVCAR-3, PEA1, PEA2 i PEO23

Rycina 16. Analiza ekspresji białka IFI16 we frakcji cytoplazmatycznej i jądrowej izolowanych z linii komórkowych A2780, SKOV-3, OVCAR-3, PEA1, PEA2 i PEO23

Rycina 17. Ekspresja białka IFI16 u pacjentki z gruczolakerakiem endometrioidalnym (brak ekspresji), pacjentki z gruczolakerakiem śluzowym (brak ekspresji) i pacjentki z gruczolakerakiem surowicznym (silna ekspresja jądrowa)

Rycina 18. Podsumowanie roli izoform IFI16 w regulacji ekspresji genów i szlaków sygnałowych w komórce

Wykaz stosowanych skrótów

A2780 – linia komórkowa raka jajnika, *ovarian cancer cell line*

AIM2 – gen nieobecny w czerniaku, *absent in melanoma 2*

AP-1 – czynnik transkrypcyjny, *transcription factor*

AR – receptor androgenowy, *androgen receptor*

ATO – trójtlenek arsenu, *arsenic trioxide*

BAX – regulator apoptozy, *apoptosis regulator*

BCRP – białko oporności raka piersi, *breast cancer resistance protein*

Białka ABC – białka oporności wielolekowej nowotworów, *multidrug resistance proteins*

BRCA1 – gen podatności na raka piersi 1, *breast cancer gene 1*

BRCA2 – gen podatności na raka piersi 2, *breast cancer gene 2*

c-FOS – protoonkogen Fos, *Fos proto-oncogene*

c-JUN – protoonkogen Jun, *Jun proto-oncogene*

CAM-DR – oporność na leki indukowana adhezją komórek, *cell adhesion mediated drug resistance*

CCNA1 – cyklina A1, *cyclin A1*

CCNA2 – cyklina A2, *cyclin A2*

CCNE1 – cyklina E1, *cyclin E1*

CCNE2 – cyklina E2, *cyclin E2*

CDC6 – cykl podziału komórek 6, *cell division cycle 6*

CDK2 – kinaza zależna od cykliny 2, *cyclin dependent kinase 2*

CDK4 – kinaza zależna od cykliny 4, *cyclin dependent kinase 4*

dCTP – trifosforan deoksytydyny, *deoxycytidine triphosphate*

ECM – macierz zewnątrzkomórkowa, *extracellular matrix*

FIGO – Międzynarodowa Federacja Ginekologów i Położników, *International Federation of Gynecology and Obstetrics*

GLOBOCAN – Światowy Rejestr Nowotworów, *Global Cancer Observatory*

HBOC – zespół dziedzicznego raka piersi i jajnika, *hereditary breast-ovarian cancer syndrome*

HDF – komórki ludzkich fibroblastów skórnych, *human dermal fibroblasts*

HeLa – linia komórkowa raka szyjki macicy, *cervical cancer cell line*

HGSOC – rak surowicy jajnika o wysokiej złośliwości, *high-grade serous ovarian carcinoma*

HNPPC – dziedziczny rak jelita grubego niezwiązany z polipowatością, *hereditary non-polyposis colorectal cancer*

HNSCC – rak płaskonabłonkowy narządów głowy i szyi, *head and neck squamous cell carcinoma*

HOC – zespół dziedzicznego raka jajnika, *hereditary ovarian cancer syndrome*

hTERT – odwrotna transkryptaza telomerazy, *telomerase reverse transcriptase*

HTZ – hormonalna terapia zastępcza, *hormone replacement therapy*

IFI16 – białko 16 indukowane przez interferon gamma, *interferon gamma inducible protein 16*

IFN – interferon

IL-6 – interleukina 6, *interleukin 6*

IRF – czynnik regulacyjny interferonu, *interferon regulatory factor*

KRAS – protoonkogen KRAS, *KRAS proto-oncogene*

LGSOC – rak surowiczy jajnika o niskiej złośliwości, *low-grade serous ovarian carcinoma*

MDR – oporność wielolekowa, *multidrug resistance*

MLH2 – gen naprawy DNA, *DNA mismatch repair gene*

MMR – gen naprawy DNA, *DNA mismatch repair gene*

MSH1 – gen naprawy DNA, *DNA mismatch repair gene*

MSH2 – gen naprawy DNA, *DNA mismatch repair gene*

OS – czas całkowitego przeżycia, *overall survival*

OVCAR-3 – linia komórkowa raka jajnika, *ovarian cancer cell line*

P-gp – glikoproteina P, *P-glycoprotein 1*

PARP – polimeraza poli-adenozynodifosforanu rybozy, *poly ADP-ribose polymerase*

PAX8 – gen dla czynnika transkrypcyjnego, *paired box gene 8*

PCNA – antygen jądrowy komórek proliferujących, *proliferating cell nuclear antigen*

PEA1 – linia komórkowa raka jajnika, *ovarian cancer cell line*

PEA2 – linia komórkowa raka jajnika, *ovarian cancer cell line*

PEO23 – linia komórkowa raka jajnika, *ovarian cancer cell line*

PFS – czas wolny od progresji choroby, *progression-free survival*

RA – kwas retinowy, *retinoic acid*

SiHa – linia komórkowa raka szyjki macicy, *cervical cancer cell line*

SKOV-3 – linia komórkowa raka jajnika, *ovarian cancer cell line*

TP53 – gen kodujący białko supresorowe p53, *tumor protein P53 encoding gene*

VEGF – czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego, *vascular endothelial growth factor*

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia, *World Health Organization*

1. Wstęp

1.1. Epidemiologia raka jajnika

Nowotwory jajnika stanowią jedno z największych wyzwań w ginekologii onkologicznej. Według GLOBOCAN w 2020 roku raka jajnika rozpoznano u 313 959¹ pacjentek, natomiast liczbę zgonów z jego powodu oszacowano na 207 252².

W roku 2018 rak jajnika był piątym co do częstości występowania nowotworem u kobiet w Polsce – po raku piersi, płuca, jelita grubego i trzonu macicy – oraz czwartą co do częstości przyczyną zgonów nowotworowych w Polsce – po raku płuca, piersi i jelita grubego. Polska należy do krajów o najwyższej zachorowalności na raka jajnika na świecie.

Standaryzowany współczynnik zachorowalności na raka jajnika w Polsce w 2016 roku wynosił 14,7/100 000, natomiast standaryzowany współczynnik umieralności w 2016 roku wynosił 7,8/100 000³. Dla porównania na świecie w tym samym okresie standaryzowany współczynnik zachorowalności wynosił 6,6/100 000, a standaryzowany współczynnik umieralności 3,9/100 000⁴.

1.2. Etiologia raka jajnika

Większość raków jajnika ma nieustaloną etiologię, niemniej w około 5% przypadków znane są czynniki istotnie zwiększające ryzyko nowotworzenia. Na podstawie danych literaturowych wyróżnia się następujące czynniki ryzyka:

- nosicielstwo mutacji w genach *BRCA1* i *BRCA2* (około 15% wszystkich pacjentek z rakiem jajnika jest nosicielkami mutacji *BRCA1* lub *BRCA2*; oszacowano, że życiowe ryzyko zachorowania na raka jajnika dla genu *BRCA1* wynosi 35–45%, natomiast dla genu *BRCA2* 15–25%);
- zespoły dziedzicznego raka piersi i jajnika⁵ (HOC – *hereditary ovarian cancer*, HBOC – *hereditary breast-ovarian cancer*);
- zespół dziedzicznego raka jelita grubego niezwiązanego z polipowatością (zespół Lyncha, HNPCC – *hereditary non-polyposis colorectal cancer*) (około 1% pacjentek z rakiem jajnika jest nosicielkami mutacji w genach naprawy DNA [MMR – *mismatch repair*], a życiowe ryzyko zachorowania na raka jajnika w tych przypadkach wynosi 3–14%⁶);
- bezdzietność⁷;

- estrogenową i estrogenowo-progesteronową hormonalną terapię zastępczą (HTZ) stosowaną u kobiet po menopauzie⁸;
- wczesną pierwszą miesiączkę i późną menopauzę (powyżej 52 roku życia);
- zespół policystycznych jajników⁹;
- endometriozę (endometrioza zwiększa ryzyko raka jasnokomórkowego, endometrioidalnego oraz surowiczego typu *low-grade*¹⁰);
- otyłość.

Do czynników zmniejszających ryzyko występowania raka jajnika należą:

- karmienie piersią, którego łączny czas trwania wynosi powyżej 18 miesięcy;
- stosowanie antykoncepcji hormonalnej (ochronny efekt wzrasta z czasem stosowania i utrzymuje się także po zaprzestaniu jej stosowania);
- wycięcie jajników i jajowodów¹¹;
- wycięcie macicy;
- późna pierwsza miesiączka;
- dieta o niskiej zawartości tłuszczów¹².

1.3. Czynniki prognostyczne raka jajnika

Czynniki prognostyczne to cechy, które wskazują na przewidywany przebieg naturalny choroby i rokowanie. Wpływają na czas wolny od progresji choroby (PFS – *progression-free survival*) i czas całkowitego przeżycia (OS – *overall survival*). Do podstawowych czynników prognostycznych w raku jajnika należą:

- czynniki związane z pacjentką: wiek w chwili rozpoznania nowotworu oraz stan ogólny;
- stopień zaawansowania klinicznego według FIGO (*staging*);
- typ histologiczny nowotworu;
- stopień zróżnicowania histopatologicznego (*grading*);
- podtyp molekularny;
- masa pozostawionych tkanek nowotworowych (resztek) po pierwotnej operacji cytoredukcyjnej¹³.

Należy dodać, że na rokowanie pacjentki ma wpływ doświadczenie zespołu lekarskiego.

1.3.1. Czynniki związane z pacjentką – wiek i stan ogólny

Ważnym czynnikiem prognostycznym jest wiek chorej w chwili rozpoznania choroby. Rokowanie u kobiet przed 60 rokiem życia jest lepsze niż u kobiet starszych. Wynika to z większego odsetka nowotworów o granicznej złośliwości oraz raków wysokozróżnicowanych rozpoznawanych w grupie młodszych chorych. Poza tym w grupie kobiet młodszych w 50% rozpoznaje się nowotwory o niskim stopniu zaawansowania klinicznego¹⁴.

Gorsze rokowanie u starszych pacjentek wiąże się z różnicami w samej biologii nowotworu oraz gorszym stanem ogólnym w chwili rozpoznania. Ze względu na dodatkowe choroby u starszych kobiet stosuje się często suboptymalne leczenie, co ma wpływ na ogólną odpowiedź na terapię i przeżycie chorych¹⁵.

1.3.2. Stopień zaawansowania klinicznego

Kolejnym czynnikiem prognostycznym jest stopień zaawansowania klinicznego. Obecnie zaawansowanie kliniczne raka jajnika ocenia się na podstawie klasyfikacji zaproponowanej przez Międzynarodową Federację Ginekologów i Położników (FIGO) w 2014 roku. Według klasyfikacji FIGO wyróżnia się następujące stopnie zaawansowania klinicznego:

Stopień I: nowotwór ograniczony do jajników lub jajowodów	
IA	Guz ograniczony do 1 jajnika lub jajowodu (nienaruszona ciągłość torebki guza), brak zmian na powierzchni jajnika lub jajowodu, brak komórek nowotworowych w płynie lub w popłuczynach z jamy otrzewnowej
IB	Guz ograniczony do 2 jajników lub jajowodów (nienaruszona ciągłość torebki guzów), brak zmian na powierzchni jajników lub jajowodów, brak komórek nowotworowych w płynie lub w popłuczynach z jamy otrzewnowej
IC	Guz ograniczony do 1 lub 2 jajników lub 2 jajowodów:
IC1	ze śródoperacyjnym uszkodzeniem ciągłości torebki
IC2	z naruszoną ciągłością torebki przed operacją lub obecnością guza na powierzchni jajowodu lub jajnika
IC3	z komórkami nowotworowymi w płynie lub popłuczynach z jamy otrzewnowej

Stopień II: nowotwór ograniczony do jajników lub jajowodów z zajęciem struktury miednicy mniejszej (poniżej płaszczyzny wchodu miednicy) lub pierwotny rak otrzewnej	
IIA	Zajęcie i/lub wszczepy na powierzchni macicy i/lub jajowodu/jajowodów
IIB	Zajęcie innych struktur miednicy mniejszej

Stopień III: nowotwór obejmujący 1 lub 2 jajniki lub jajowód/jajowody lub pierwotny rak otrzewnej z przerzutami do otrzewnej poza miednicą mniejszą i/lub przerzuty do węzłów chłonnych zaotrzewnowych	
IIIA1	Przerzuty nowotworowe obecne tylko w węzłach chłonnych zaotrzewnowych (potwierdzone cytologiczne lub histologiczne)
IIIA1(i)	Przerzuty w największym wymiarze ≤ 10 mm
IIIA1(ii)	Przerzuty w największym wymiarze > 10 mm
IIIA2	Mikroskopowe przerzuty do otrzewnej poza miednicą mniejszą (powyżej płaszczyzny wchodu miednicy) z lub bez przerzutów do węzłów chłonnych zaotrzewnowych
IIIB	Makroskopowe przerzuty do otrzewnej poza miednicą mniejszą o średnicy ≤ 2 cm w największym wymiarze z lub bez przerzutów do węzłów chłonnych zaotrzewnowych (włączając w to zajęcie przez nowotwór torebki wątroby i śledziony bez naciekania ich mięszu)
IIC	Makroskopowe przerzuty do otrzewnej poza miednicą mniejszą o średnicy > 2 cm w największym wymiarze z lub bez przerzutów do węzłów chłonnych zaotrzewnowych (włączając w to zajęcie przez nowotwór torebki wątroby i śledziony bez naciekania ich mięszu)

Stopień IV: odległe przerzuty (wyluczając przerzuty do otrzewnej)	
IVA	Wysięk w jamie opłucnowej z potwierdzonym cytologicznie nowotworem
IVB	Śródmiąższowe przerzuty i przerzuty do narządów poza jamą brzuszną (włączając w to węzły chłonne pachwinowe i węzły chłonne poza jamą brzuszną)

Stopień zaawansowania klinicznego raka jajnika według FIGO uważany jest za najważniejszy czynnik rokowniczy¹³. Odsetek 5-letnich przeżyć w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego w latach 1999–2001 wynosił na świecie: IA – 89,9%, IB – 84,7%, IC – 80,0%, IIA – 69,9%, IIB – 63,7%, IIC (stopień uwzględniony we wcześniejszej klasyfikacji FIGO) – 66,5%, IIIA – 58,5%, IIIB – 39,3%, IIIC – 28,7%, IV – 25%¹⁶.

1.3.3. Typ histologiczny nowotworu

Podobnie jak w innych nowotworach, typ histologiczny znacząco wpływa na rokowanie.

Nowotwory złośliwe jajnika mogą się rozwijać z trzech rodzajów komórek: z komórek nabłonkowych, z komórek zrębu oraz z komórek germinalnych. Nowotwory wywodzące się z nabłonka pokrywającego jajnik i z podścieliska są najliczniejszą grupą pierwotnych nowotworów jajnika. Stanowią one około 60% wszystkich nowotworów jajnika i około 80–90% nowotworów złośliwych jajnika¹⁷. Badanie mikroskopowe, będące częścią wyniku

patomorfologicznego, dzieli **guzy nabłonkowe** jajnika według klasyfikacji WHO na następujące typy histologiczne:

- guzy surowicze;
- guzy śluzowe;
- guzy endometrioidalne;
- guzy jasnokomórkowe;
- guzy Brennera;
- guzy surowiczo-śluzowe;
- raki nie zróżnicowane.

Ze względu na częstość występowania największe znaczenie praktyczne ma podział nowotworów nabłonkowych na guzy surowicze (które rozpoznawane są w 75%), endometrioidalne (w około 10%), jasnokomórkowe (w około 10%) i śluzowe (w około 5%)¹⁸. Guzy Brennera stanowią około 1% guzów jajnika. Guzy surowiczo-śluzowe i raki nie zróżnicowane występują sporadycznie¹⁹.

Nowotwory nabłonkowe mogą mieć charakter łagodny, złośliwy lub mogą być nowotworami o złośliwości granicznej.

Rak surowiczy

Rak surowiczy jest najczęstszym rakiem nabłonkowym. Rozróżnia się dwa rodzaje raka surowiczego – o niskiej złośliwości (LGSOC – *low-grade serous ovarian carcinoma*) i o wysokiej złośliwości (HGSOC – *high-grade serous ovarian carcinoma*). Raki LGSOC stanowią około 10% raków surowiczych i występują w grupie młodszych pacjentek. Wzrost guzów jest wolny, przez co rozpoznawane są one w niższych stopniach zaawansowania klinicznego. Rokowanie jest dość dobre.

Raki HGSOC rokują znacznie gorzej, są bardzo agresywne i najczęściej rozpoznawane w III i IV stopniu zaawansowania.

Rak endometrioidalny

Rak endometrioidalny stanowi 10% nabłonkowych guzów jajnika i zajmuje drugie co do częstości miejsce wśród nabłonkowych raków jajnika. W 15–20% przypadków z endometrioidalnym rakiem jajnika współistnieje rak endometrium²⁰. Obydwa nowotwory mają podobne czynniki ryzyka. Rak endometrioidalny najczęściej jest ograniczony do jednego jajnika i rozpoznawany w porównaniu z rakiem surowiczym w niższym stopniu zaawansowania. W 30–50% przypadków ma komponent składający się z komórek

płaskonabłonkowych. Niestabilność mikrosatelitarna występuje w 13–20% przypadków i najczęściej dotyczy genów *MSH1* i *MLH2*²¹.

Rak jasnokomórkowy

Rak jasnokomórkowy stanowi około 10% przypadków raka jajnika. Większość przypadków jest związana z endometriozą²². Rak jasnokomórkowy częściej niż inne podtypy raka wiąże się z zespołem Lyncha, z charakterystyczną mutacją zlokalizowaną w genie *MSH2*²³.

Rak śluzowy

Rak śluzowy stanowi około 5% guzów nabłonkowych jajnika²⁴. Charakterystyczną jego cechą jest heterogenność. W obrębie jednego guza można spotkać obszary o cechach guza łagodnego, guza o granicznej złośliwości oraz guza złośliwego. Ta cecha sugeruje pochodzenie raka od guza o postaci łagodnej, poprzez raka o granicznej złośliwości, do nowotworu inwazyjnego. Najczęściej tego rodzaju guzy ograniczone są do jajników, a postaci rozlane występują rzadko²⁵.

Złośliwy guz Brennera

Złośliwy guz Brennera jest jednym z rzadziej występujących raków jajnika. Stanowi około 1% wszystkich raków jajnika. Swoją budową przypomina raka urotelialnego pęcherza. Wśród guzów Brennera złośliwy stanowi tylko 5%²⁶. Pomimo osiągnięcia dużych rozmiarów, dochodzących do 15 cm i więcej, guz Brennera jest dość dobrze rokującym nowotworem.

1.3.4. Stopień zróżnicowania histopatologicznego

Ocena stopnia złośliwości opiera się na badaniu mikroskopowym po barwieniu hematoksyliną i eozyną. Badanie można poszerzyć o dodatkowe metody, np. barwienia immunohistochemiczne. Badana jest architektonika tkanki nowotworowej oraz cechy cytologiczne komórek nowotworowych. Z cech cytologicznych uwzględnia się stopień anaplazji, wielkość i kształt jąder komórkowych, objętość cytoplazmy oraz względny odsetek dzielących się komórek (indeks mitotyczny), a z cech architektonicznych ocenia się histologiczną organizację tkanki i odgraniczenie nowotworu od sąsiadujących struktur.

System FIGO wyróżnia trzy stopnie oparte na kryteriach architektonicznych, uwzględniających proporcję struktur gruczołowych lub brodawkowych w stosunku do

obszarów wzrostu guza litego. Stopnie 1, 2 i 3 cechują się zawartością komponentu litego odpowiednio < 5%, 5–50% i > 50%²⁷.

W raku jajnika wyróżnia się następujące stopnie złośliwości:

- G1: wysoko dojrzały, czyli taki, który w swej budowie zbliżony jest do prawidłowej tkanki jajnika;
- G2: średnio dojrzały;
- G3: nisko dojrzały, w którym często bez użycia dodatkowych technik nie można ustalić pochodzenia nowotworu.

W przypadku raka surowiczego można zastosować dwustopniowy system oceny złośliwości histologicznej – *low grade* (co oznacza niską złośliwość histologiczną) oraz *high grade* (co oznacza wysoką złośliwość histologiczną)¹⁸.

1.3.5. Typ molekularny

Pomimo istniejącego podziału na typy histologiczne klinicyści w swojej praktyce częściej posługują się podziałem na typy molekularne. Typ molekularny znacząco wpływa na rokowanie pacjentek z rakiem jajnika.

Jak wcześniej wspomniano, wśród raków należących do jednego podtypu histologicznego przebieg choroby może być diametralnie różny. Wynika to z odmiennych szlaków kancerogenezy i, co za tym idzie, powstania różnego profilu molekularnego guzów. W 2004 roku zaproponowano podział raków jajnika na typ I i typ II.

Raki typu I są klinicznie mniej złośliwe, powstają w sposób stopniowy z guzów granicznych, zwykle rozpoznawane są we wcześniejszych stadiach klinicznego zaawansowania. Najczęściej są to raki surowicze o niskiej złośliwości (LGSOC), śluzowe, jasnokomórkowe i endometrioidalne o niskiej złośliwości (G1, G2)²⁴.

Raki typu I dotyczą kobiet średnio o 10 lat młodszych niż w przypadku raków typu II²⁸. Guzy te często występują obustronnie i w większości pochodzą z surowiczych guzów granicznych²⁹. Komórki wykazują atypię od łagodnej do pośredniej. W 50–60% przypadków w obrębie guzów stwierdza się mutacje w genach *KRAS*, *BRAF*. Mutacje *KRAS* i *BRAF* dotyczą głównie raków LGSOC i raków śluzowych; inne mutacje, takie jak *BRAS*, *PAX8*, *CTNB1*, mogą występować także w pozostałych nowotworach należących do tej grupy³⁰. Cechą charakterystyczną tej podgrupy jest brak mutacji w obrębie genu *TP53*.

Rokowanie w guzach ograniczonych tylko do jajnika jest dobre; 5- i 10-letnie przeżycie w zaawansowanych stadiach wynosi odpowiednio 85% i 50%.

Opisywane guzy słabo reagują na chemioterapię cisplatyną (CIS), niemniej nie są całkowicie odporne i CIS również wśród tych guzów stanowi podstawowy lek wykorzystywany w leczeniu systemowym³¹.

Raki typu II powstają *de novo* i charakteryzują się wysokim stopniem złośliwości. Opisywane guzy mają bardzo niekorzystny przebieg kliniczny i odpowiadają za 75% zachorowań na raka jajnika. Należą do nich raki surowicze o wysokim stopniu złośliwości (HGSOC), raki endometrioidalne o wysokim stopniu złośliwości (G3), raki niezróżnicowane i mięsakeraki. Najwięcej zachorowań na ten typ raka rozpoznaje się w krajach Europy Środkowo-Wschodniej, w tym w Polsce. Średni wiek zachorowania wynosi 63 lata. Inną różnicującą cechą są mutacje w genie *TP53*. W raku jajnika spotyka się dwa typy mutacji w genie *TP53*. Częstsza jest mutacja typu *missense*, dotycząca około 60% komórek; druga, typu *nonsense*, występuje w pozostałych przypadkach. Mutacje w genie *BRCA1* lub *BRCA2* dotyczą około 50% przypadków w tej grupie chorych i wiążą się z lepszym rokowaniem³². Niemniej raki typu II są guzami źle rokującymi, wymagającymi agresywnego leczenia. U większości pacjentek występują wskazania do chemioterapii nawet we wczesnych stadiach zaawansowania. Najważniejszym czynnikiem rokowniczym w tym typie raka jest stadium zaawansowania choroby. Niestety objawy choroby pojawiają się późno i dlatego w 75–80% rozpoznanie dotyczy zaawansowanych stadiów choroby (III/IV stopień zaawansowania) i tylko 25% pacjentek w tej grupie ma szansę osiągnąć długoletnie przeżycie³³.

1.4. Leczenie raka jajnika

Podstawą terapii nowo rozpoznanego raka jajnika jest postępowanie skojarzone obejmujące leczenie chirurgiczne oraz leczenie systemowe. Zakres zabiegu operacyjnego oraz terapia uzupełniająca zależą głównie od zaawansowania klinicznego.

1.4.1. Leczenie chirurgiczne

Pierwotne leczenie chirurgiczne ma na celu:

- potwierdzenie rozpoznania raka jajnika;
- określenie stopnia zaawansowania klinicznego;
- przeprowadzenie całkowitej, a przy braku możliwości jej wykonania – optymalnej cytoredukcji (pozostawienie resztek < 1 cm średnicy) nowotworu.

Gdy nie jest możliwe osiągnięcie całkowitej ani optymalnej cytoredukcji, powinno się dążyć do ograniczenia zakresu zabiegu i możliwie szybkiego skierowania chorej do leczenia systemowego. Badania dowodzą, że nieoptymalne zabiegi w sposób istotny skracają czas do wystąpienia progresji oraz całkowity czas przeżycia³⁴. Pacjentki, u których nie można przeprowadzić co najmniej optymalnej cytoredukcji, są kandydatkami do chemioterapii neoadiuwantowej i ewentualnego przeprowadzenia operacji odroczonej.

1.4.2. Leczenie systemowe

1.4.2.1. Chemioterapia

Chemioterapię zwykle stosuje się po pierwotnej operacji. Standardem w leczeniu I linii raka jajnika jest schemat oparty na karboplatynie i paklitakselu (PAC). W III i IV stadium zaawansowania klinicznego, przy pozostawieniu resztek > 1 cm, dołącza się do leczenia bewacyzumab – antyangiogenne przeciwciało monoklonalne^{35,36,37}. W przypadku niemożliwej pierwotnej optymalnej cytoredukcji stosuje się chemioterapię neoadiuwantową, która znalazła poparcie w badaniach naukowych. Podaje się wówczas 3 kursy chemioterapii, a następnie przeprowadza się zabieg, po którym następuje dokończenie chemioterapii^{38,39,40}.

Mimo optymalnego leczenia chirurgicznego i systemowego u około 70% pacjentek dochodzi do wznowy choroby. Bardzo istotna w podejmowaniu decyzji o kolejnych liniach leczenia jest pierwotna odpowiedź na chemioterapię, oceniana mianem wrażliwości na platynę.

W grupie pacjentek **wrażliwych na związki platyny** nawrót choroby wystąpił powyżej 12 miesięcy od zakończenia leczenia (54,9%). Wśród nich wyróżnia się grupę pacjentek prawdopodobnie wyleczonych, u których nawrót nie nastąpił w ciągu 120 miesięcy od zakończenia leczenia (17,7%), grupę wrażliwą na platynę z nawrotem w ciągu 60–120 miesięcy (3,7%) oraz grupę wrażliwą na platynę z nawrotem w ciągu 12–60 miesięcy (33,5%).

Kolejna grupa pacjentek to chore **częściowo wrażliwe** na platynę, czyli takie, u których nawrót wystąpił między 6 a 12 miesiącem po zakończeniu leczenia (22,7%).

Najgorzej rokującymi podgrupami pacjentek są te **niewrażliwe** na związki platyny, z nawrotem choroby w ciągu 6 miesięcy (17,2%) od zakończenia leczenia, oraz pacjentki **oporne** na leczenie platyną, czyli takie, u których nie uzyskano odpowiedzi na leczenie lub u których doszło do progresji w trakcie leczenia (5,3%).

Odpowiedź na związki platyny jest szczególnie istotna przy podejmowaniu decyzji o leczeniu II linii. Jeśli wystąpiła odpowiedź na leczenie związkami platyny, w przypadku

braku toksyczności poprzedniego leczenia można zastosować ten sam schemat chemioterapii. Jeżeli natomiast chore należą do grupy pacjentek platynoopornych lub platynoniewrażliwych, a także gdy utrzymuje się toksyczność związana z poprzednim leczeniem, należy zastosować inne cytostatyki, takie jak **topotekan**, **doksorubicyna** lub **gemcytabina**^{37,38}. Odpowiedź na chemioterapię II linii wynosi 15–35%.

Cytostatyki stosowane w leczeniu raka jajnika wykazują różne mechanizmy działania na poziomie molekularnym.

Karboplatyna i cisplatyna należą do leków uszkadzających DNA. Działanie polega na wiązaniu się do DNA i tworzeniu wiązań krzyżowych w obrębie jednej nici lub pomiędzy niemi; uniemożliwia to jego syntezę (replikację) oraz transkrypcję RNA. W konsekwencji dochodzi do zahamowania podziałów komórek (działanie cytostatyczne) i ostatecznie do śmierci komórek nowotworowych.

Paklitaksel jest pochodną substancji otrzymywanej z kory cisu (*Taxus brevifolia*). Należy do leków fazowo swoistych i działa głównie w fazie mitozy (M) oraz G2 cyklu komórkowego. Paklitaksel wiąże się do podjednostek β -tubuliny. Hamując depolimeryzację mikrotubul, uniemożliwia zakończenie mitozy, a w konsekwencji podział komórki, co prowadzi do jej śmierci. Działanie preparatu szczególnie dotyczy komórek szybko dzielących się, jakimi są komórki nowotworowe.

Doksorubicyna jest antybiotykiem przeciwnowotworowym o działaniu cytotoksycznym. Główny mechanizm działania doksorubicyny polega na tworzeniu trwałych kompleksów z topoizomerazą II (enzymem odpowiedzialnym za wprowadzenie superskrętów w cząsteczce DNA po zakończeniu replikacji) i DNA. Prowadzi to do fragmentacji kwasu nukleinowego, uniemożliwia jego replikację oraz transkrypcję i w konsekwencji powoduje śmierć komórki. Dodatkowo doksorubicyna interkaluje pomiędzy zasady azotowe w cząsteczce DNA, blokując w ten sposób replikację i transkrypcję.

Topotekan – półsyntetyczna pochodna kamptotecyny – inhibitor topoizomerazy I, enzymu, który zmniejsza napięcie torsyjne w cząsteczce DNA przez indukowanie powstawania odwracalnych pęknięć w obrębie pojedynczych nici. Uniemożliwia odtwarzanie wiązań w miejscach pęknięć i uszkadza strukturę podwójnych łańcuchów DNA. Działa cytotoksycznie.

Gemcytabina to antymetabolit, analog nukleozydu pirymidynowego. Cytotoksyczne działanie gemcytabiny wynika z hamowania syntezy DNA przez dwa mechanizmy działania. Difosforan gemcytabiny hamuje aktywność reduktazy rybonukleotydowej. Zahamowanie aktywności tego enzymu zmniejsza wewnątrzkomórkowe stężenie wszystkich deoksynukleotydów, w szczególności dCTP. Trifosforan gemcytabiny współzawodniczy

z dCTP o wbudowywanie w nią DNA (zjawisko samowzmocnienia). Procesy te prowadzą do zakończenia replikacji DNA i apoptozy. Gemcytabina jest cytostatykiem swoistym dla fazy G1/S.

1.4.2.2. Leki antyangiogenne

Bewacyzumab to rekombinowane humanizowane przeciwciało monoklonalne. Wiąże się z czynnikiem wzrostu śródbłónka naczyniowego (VEGF), hamując jego wiązanie z receptorami Flt-1 (VEGFR-1) i KDR (VEGFR-2) na powierzchni komórek śródbłónka. Obniżenie ich aktywności zmniejsza unaczynienie nowotworów litych, co prowadzi do hamowania ich wzrostu.

1.4.2.3. Inhibitory PARP

Obecnym standardem leczenia pacjentek z potwierdzoną obecnością mutacji w genach *BRCA1* i/lub *BRCA2* jest leczenie podtrzymujące inhibitorami PARP (**olaparyb**). Działanie polega na blokowaniu enzymów zwanych ludzką polimerazą poli-adenozynodifosforanu rybozy (PARP), które wspomagają naprawę uszkodzonego DNA w komórkach podczas ich podziału. PARP pełni swoją funkcję zarówno w komórkach prawidłowych, jak i nowotworowych. Chemioterapia uszkadza DNA komórki nowotworowej, które dzięki białkom PARP jest naprawiane. W wyniku zahamowania aktywności białek PARP uszkodzenia DNA w komórkach nowotworowych nie mogą zostać naprawione, co przy dodatkowych mutacjach somatycznych towarzyszących komórkom nowotworowym prowadzi do śmierci tych komórek.

1.5. Mechanizmy oporności na leki cytotoksyczne

Pomimo ciągłego postępu medycyny i rozwoju onkologii problem oporności na cytostatyki jest wciąż aktualny. Na wydajność chemioterapii ma wpływ bardzo wiele czynników związanych zarówno z samym nowotworem, jak i z organizmem pacjenta. Wśród najważniejszych mechanizmów oporności na poziomie organizmu należy wymienić poziom ekspresji enzymów detoksyfikacyjnych w wątrobie, nerkach i jelicie, które mogą przyspieszać inaktywację i usuwanie leków lub zmniejszać szybkość aktywacji proleków. Do mechanizmów na poziomie organizmu należy również zaliczyć parametry osocza, które wpływają na wydajność dystrybucji leku w organizmie.

Jednak najważniejszymi mechanizmami odpowiedzialnymi za oporność na leczenie są te związane z tkanką nowotworową. Na podstawie odpowiedzi na pierwszą linię chemioterapii pacjentki z rakiem jajnika można podzielić na chore z nowotworem pierwotnie opornym na chemioterapię oraz te z nowotworami, które nabywają oporności na leki cytotoksyczne w trakcie leczenia.

Mechanizmy oporności można podzielić na:

- komórkowe;
- tkankowe.

W praktyce oba rodzaje mechanizmów występują równocześnie i wzajemnie się uzupełniają.

1.5.1. Komórkowe mechanizmy oporności na cytostatyki

Mechanizmy komórkowe zostały zbadane i opisane głównie na modelach *in vitro* w liniach komórek nowotworowych, w których porównywano ekspresję różnych genów/białek oporności w parach linia wrażliwa – linia oporna na cytostatyki. Powyższe mechanizmy można ekstrapolować na tkankę nowotworową.

Wśród najważniejszych mechanizmów komórkowych należy wskazać zwiększoną ekspresję transporterów błonowych należących do rodziny białek ABC, które dzięki energii pochodzącej z hydrolizy ATP mogą aktywnie usuwać leki z komórek^{41,42}. Do najlepiej poznanych białek ABC związanych z opornością na leki cytotoksyczne należą glikoproteina P (P-gp), kodowana przez gen *MDR1* (*ABCB1*), białko BCRP, kodowane przez gen *ABCG2*, oraz białko MRP2, kodowane przez gen *ABCC2*^{43,44,45}. Cechą białek ABC jest niska specyficzność substratowa. Mogą one usuwać z komórek nowotworowych różne niespokrewnione pod względem budowy chemicznej leki przeciwnowotworowe, co prowadzi do oporności wielolekowej komórek nowotworowych (MDR – *multi drug resistance*). Białko P-gp usuwa z komórek nowotworowych około 20 leków cytotoksycznych. W odniesieniu do raka jajnika najważniejszymi substratami białka P-gp są **paklitaksel**, **doksorubicyna** i **topotekan**⁴⁶. Ekspresja białka BCRP wiąże się z rozwojem oporności na **topotekan**, natomiast ekspresja białka MRP2 odpowiedzialna jest za rozwój oporności na **cisplatynę** i **karbolatynę**^{47,48}.

Wśród innych ogólnych mechanizmów oporności na poziomie komórkowym należy wymienić zwiększoną ekspresję enzymów naprawiających DNA (oporność na cisplatynę/karboplatinę), inaktywację cytostatyków przez glutation (cisplatyna, doksorubicyna) czy zwiększoną ekspresję metalotiotein (cisplatyna). Do innych mechanizmów

komórkowych można zaliczyć zmiany w szybkości wnikania leków do komórki, zmiany w szybkości aktywacji lub inaktywacji związków farmakologicznych w komórkach nowotworowych, oporność komórek nowotworowych na proces apoptozy. Wśród mechanizmów specyficznych dla leków można wymienić obniżenie ekspresji topoizomerazy I i II w przypadku oporności na topotekan i doksorubicynę, a także mutacje w β -tubulinie obniżające jej powinowactwo do paklitakselu⁴⁹.

1.5.2. Tkankowe mechanizmy oporności na chemioterapię

Tkankowe mechanizmy oporności na chemioterapię związane są w szerokim rozumieniu z tkanką nowotworową, a więc z budową anatomiczną i histologiczną guza. Niepoprawnie rozwinięte ukrwienie jest znacznie mniej wydajne i ogranicza dostarczanie leków do komórek guza⁵⁰. Przyrost masy guza prowadzi do niedokrwienia niektórych jego obszarów, w wyniku czego dostarczanie leków, szczególnie do komórek znajdujących się daleko od naczyń, jest znacznie ograniczone. Duża gęstość komórek nowotworowych dodatkowo przyczynia się do problemów z dystrybucją cytostatyków⁴⁹.

Do mechanizmów tkankowych zalicza się również zmiany w ekspresji białek macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM – *extracellular matrix*). Komórki raka, mimo że są komórkami pochodzenia nabłonkowego, wytwarzają znaczne ilości białek ECM, w tym kolagenów⁵¹. Rola składników ECM, o której mówi się coraz więcej w kontekście oporności na chemioterapię, może polegać na:

- blokowaniu dostępu leków cytotoksycznych do komórek nowotworowych poprzez ograniczenie ich dyfuzji (bariera fizyczna)⁵²;
- oddziaływaniu z receptorami komórkowymi (najczęściej integrzynami) i aktywowaniu ścieżek sygnalizacyjnych prowadzących do zwiększenia oporności na apoptozę indukowaną przez cytostatyki; mechanizm ten określany jest jako oporność na leki indukowana adhezją komórek (CAM-DR – *cell adhesion mediated drug resistance*)^{51,53}.

Podsumowując, należy powiedzieć, że opisane powyżej mechanizmy oporności są najczęściej występującymi i najlepiej opisanymi. Czasem jednak obserwuje się oporność komórek nowotworowych na chemioterapię pomimo braku ekspresji genów kodujących wyżej opisane białka. Oznacza to, że wciąż jeszcze nie poznano wszystkich genów i mechanizmów odpowiedzialnych za oporność komórek nowotworowych na chemioterapię. Porównywanie ekspresji całego transkryptomu pomiędzy linią wrażliwą i jej pochodną oporną na chemioterapię wskazuje na zmiany ekspresji bardzo wielu genów, opisanych często w zupełnie innych

tkankach i pełniących rozmaite funkcje fizjologiczne. Wyjaśnienie ich roli w rozwoju nowotworów i oporności na chemioterapię wymaga wielu dalszych badań, na różnym poziomie organizacji komórki i tkanki nowotworowej. Badania przeprowadzone na liniach komórkowych raka jajnika z zastosowaniem mikromacierzy RNA wskazały wiele nowych genów, które mogą być odpowiedzialne za rozwój oporności na leki cytotoksyczne. Jednym z najbardziej interesujących był *IFI16*, który stanowi przedmiot niniejszej rozprawy.

1.6. Białko IFI16

IFI16 należy do rodziny białek PYHIN-200, indukowanych przez interferon (IFN), kodujących białka powiązane ze sobą ewolucyjnie. Białka te posiadają wspólny motyw HIN, składający się z 200 aminokwasów^{54,55}. U ludzi można wyróżnić cztery białka należące do rodziny PYHIN: AIM2, IFIX, MNDA, IFI16⁵⁶.

1.6.1. Ekspresja tkankowa IFI16

Białko IFI16 zostało po raz pierwszy opisane w 1992 roku w komórkach limfoidalnych⁵⁷. Następnie przedstawiono jego związek z różnicowaniem się komórek szpikowych⁵⁸. Później, dzięki zastosowaniu immunohistochemii, ekspresję białka wykryto również w komórkach nabłonka dróg moczowo-płciowych, gruczołów i przewodów piersiowych, przewodu pokarmowego oraz skóry^{59,60}. Opisano zarówno jądrową, jak i cytoplazmatyczną lokalizację białka IFI16. W prawidłowych komórkach ludzkich fibroblastów skórnych (HDF) i w komórkach prawidłowego nabłonka gruczołu krokowego dominowała lokalizacja jądrowa^{61,62}. Z kolei polimorficzną postać białka IFI16 w linii komórek ludzkiego raka gruczołu krokowego (linia komórkowa PC-3) wykrywano przede wszystkim w cytoplazmie⁶².

1.6.2. Budowa genu i białka IFI16

1.6.2.1. Budowa genu *IFI16*

Analiza baz danych www.ensembl.org oraz www.uniprot.org wskazuje, że gen *IFI16* zbudowany jest z 12 eksonów, przy czym ekson 1 jest niekodujący we wszystkich izoformach (tabela 1). Wyróżnia się cztery warianty transkrypcyjne genu *IFI16*, odpowiadające czterem izoformom tego białka. Są to:

- izoforma 1 (IFI16A; masa cząsteczkowa: 88,256 kDa), pełnej długości sekwencja kanoniczna składająca się z 12 eksonów, kodujących 785 aa;
- izoforma 2 (IFI16B; masa cząsteczkowa: 82,096 kDa), składająca się z 11 eksonów, kodujących 729 aa; w izoformie tej brakuje aminokwasów 444–499 w stosunku do sekwencji kanonicznej (brak eksonu 8 według bazy www.ensembl.org);
- izoforma 3 (IFI16C; masa cząsteczkowa: 75,936 kDa), złożona 9 eksonów, kodujących 673 aa; brakuje w niej aminokwasów 444–555 (brak eksonów 8 i 9), nieobecny jest również ekson 1, niekodujący;
- izoforma 4 (masa cząsteczkowa: 82,588 kDa), złożona 11 eksonów, kodujących 729 aa; brakuje w niej aminokwasów 128–183, kodowanych przez ekson 4.

Izoformy 2 i 4, chociaż mają prawie identyczną masę cząsteczkową, różnią się pod względem sekwencji i prawdopodobnie funkcji.

Tabela 1. Warianty transkrypcyjne genu i izoformy białka IFI16

Izoforma	Nazwa transkryptu i ID*	Liczba eksonów*	Brakujący ekson*	Liczba aa i masa cząsteczkowa**	Brakujący region aa**
1 (IFI16A)	IFI16-201 ENST00000295809.11	12	wszystkie obecne	785 aa 88,256 kDa	wszystkie obecne
2 (IFI16B)	IFI16-204/205 ENST00000368131.8 ENST00000368132.7	11	8	729 aa 82,096 kDa	444–499 aa
3 (IFI16C)	IFI16-208 ENST00000448393.6	9	1 (niekodujący), 8, 9	673 aa 75,936 kDa	444–555 aa
4	IFI16-203 ENST00000359709.7	11	4	729 aa 82,588 kDa	128–183 aa

* www.ensembl.org, ** www.uniprot.org/uniprot/Q16666

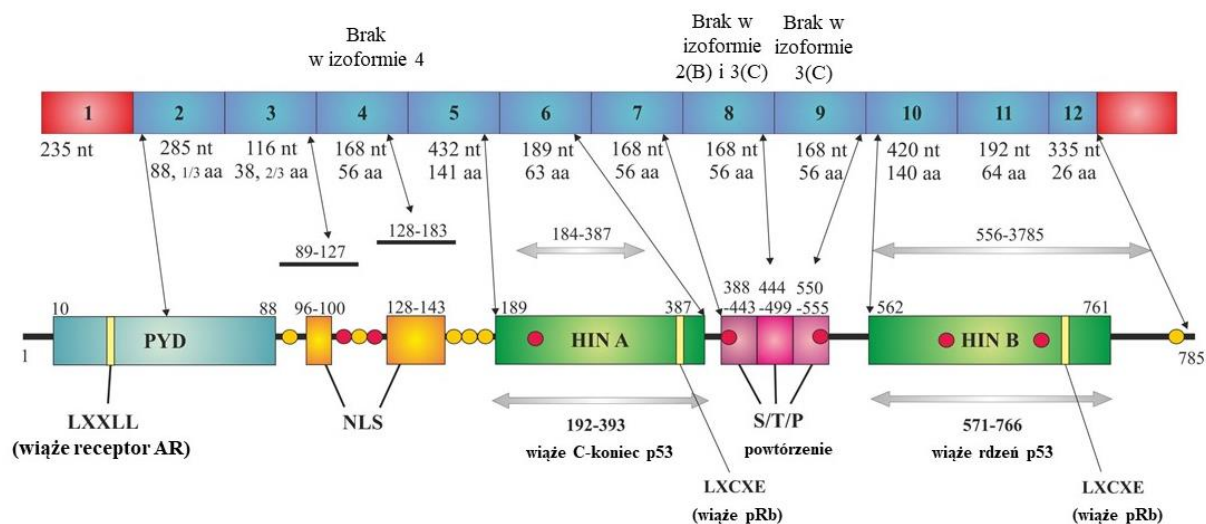
1.6.2.2. Budowa białka IFI16

W części N-końcowej białka zlokalizowana jest homotypowa domena PYRIN (PYD), uważana za czujnik zmian w środowisku komórkowym. Domena ta jest odpowiedzialna za homotypowe wiązanie z innymi cząsteczkami IFI16, jak również za interakcję z innymi białkami^{63,64}. Znajduje się w niej pięć motywów LXXLL odpowiedzialnych za oddziaływanie z receptorem androgenowym (AR)⁶⁵. Domena ta bierze też udział w oddziaływaniu z czynnikiem transkrypcyjnym SP1 oraz białkami ASC i BRCA1⁶³. Ponadto w N-końcowej części białka

zlokalizowany jest dwuczęściowy region lokalizacji jądrowej – NLS, obejmujący aa 96–100 oraz aa 128–143. Obie części wydają się odgrywać rolę w lokalizacji jądrowej białka^{63,64}. Należy zwrócić uwagę, że w izoformie 4 obecny jest tylko pierwszy motyw NLS – brak eksonu 4, kodującego aminokwasy 128–183. Acetylacja lizyn w motywie NLS może prowadzić do zwiększenia ilości białka w cytoplazmie⁶⁵.

W części C-końcowej białka IFI16 znajdują się dwie domeny HIN, zawierające po około 200 aa. Każda domena zawiera dwa zagłębienia OB odpowiedzialne za wiązanie DNA⁶⁶. Domeny HIN są również odpowiedzialne za oddziaływanie z innymi białkami. Domena HIN A (aa 192–393) odpowiada za wiązanie z C-kończącą częścią białka p53, podczas gdy domena HIN B (aa 571–766) wiąże się z fragmentem białka p53 odpowiedzialnym za wiązanie DNA⁶¹. W domenach HIN A i HIN B występują również motywy LXCXE odpowiedzialne za oddziaływanie z białkiem retinoblastoma (pRb) [30]. Pomiędzy dwiema domenami HIN znajduje się region bogaty w serynę-treoninę-prolinę (S/T/P), którego długość jest regulowana przez splicing mRNA. Region ten może zawierać jedną (izoforma 3 – IFI16C), dwie (izoforma 2 – IFI16B) lub trzy (izoforma 1 – IFI16A) kopie wysoce konserwatywnego fragmentu o długości 56 aa, kodowanego przez eksony 7, 8 i 9 (rycina 1)^{54,67,68}.

W białku IFI16 obecne są liczne potencjalne miejsca acetylacji i fosforylacji. Uważa się, że te modyfikacje potranslacyjne mogą wpływać na lokalizację komórkową i funkcję białka IFI16. Szczegółową strukturę genu i białka IFI16 przedstawiono na rycinie 1.



Rycina 1. Schemat budowy genu i białka IFI16. Liczby na rycinie odpowiadają białku pełnej długości – izoformie 1 (IFI16A). Gen zbudowany jest z 12 eksonów, z niekodującym eksonem 1 oraz kodonami START i STOP zlokalizowanymi w eksonach 2 i 12. W izoformie 2 (IFI16B) brakuje eksonu 8 (aa 444–499).

W izoformie 3 (IFI16C) brakuje eksonów 8 i 9 (aa 444–555). W izoformie 4 jest nieobecny ekson 4 (aa 128–183). Strzałki wskazują, które części białka są kodowane przez odpowiednie eksony. Domena PYD jest odpowiedzialna za homotypowe oddziaływanie z innymi cząsteczkami IFI16, a także z innymi białkami.

W domenie tej znajdują się motywy LXXLL odpowiedzialne za interakcję z AR (żółty prostokąt).

Dwuczęściowy motyw NLS kodowany przez eksony 3 i 4 jest przedstawiony jako pomarańczowe prostokąty. Domeny HIN A i B, odpowiedzialne za wiązanie DNA i interakcję z innymi białkami, przedstawiono na zielono.

Szare strzałki wskazują obszary odpowiedzialne za interakcję z białkiem p53, podczas gdy żółte prostokąty wskazują motywy LXCXE odpowiedzialne za interakcję z białkiem pRb. Odcinek pomiędzy sekwencjami HIN, kodowany przez eksony 7, 8 i 9, przedstawiono jako fioletowe i różowe prostokąty. Znane miejsca fosforylacji i acetylacji zilustrowano odpowiednio jako żółte i różowe kulki

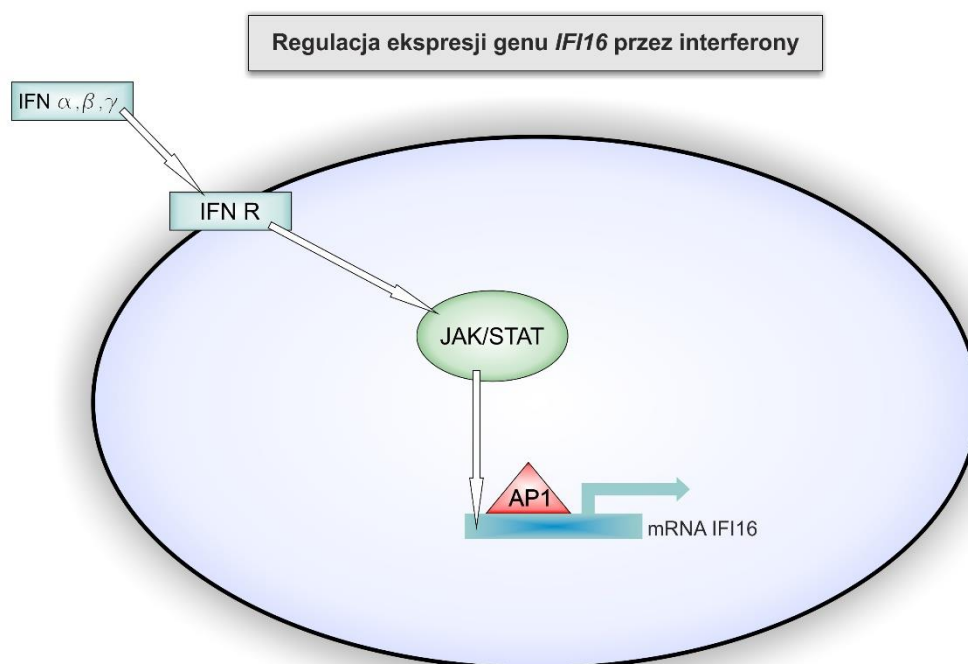
1.6.3. Regulacja ekspresji genu *IFI16*

Transkrypcja genu *IFI16* jest regulowana głównie przez interferony (α , β lub γ)⁶⁴. W komórkach nabłonka gruczołu krokowego opisano także regulację ekspresji *IFI16* przez AR⁶⁹. Innym ważnym czynnikiem regulującym ekspresję genu *IFI16* jest białko p53. Regulacja ekspresji *IFI16* zależna od p53 została opisana w ludzkich fibroblastach⁶¹ oraz komórkach nabłonka gruczołu krokowego⁶².

1.6.3.1. Regulacja ekspresji genu *IFI16* przez interferony

Gen *IFI16* został pierwotnie zidentyfikowany jako gen ulegający konstytutywnej ekspresji w ludzkich komórkach limfoidalnych, a jego ekspresja wzrastała pod wpływem interferonu

(IFN)^{61,62,70}. Obecnie wiadomo, że interferony typu I (IFN- α , IFN- β) i typu II (IFN- γ) mogą indukować ekspresję *IFI16* w różnych komórkach. Wiązanie IFN z receptorem powierzchniowym komórki w sposób autokrynnny i parakrynnny aktywuje szlak sygnałowy JAK/STAT⁵⁷. Szlak sygnałowy JAK/STAT stymuluje następnie ekspresję wielu genów hamujących cykl komórkowy, a wśród nich *IFI16*^{63,64,71}. Czynn timeranskrypcyjny AP-1 odgrywa ważną rolę zarówno w konstytutywnej, jak i w indukowanej przez IFN ekspresji genu *IFI16*⁷². Schemat regulacji ekspresji genu *IFI16* przez interferony przedstawiono na rycinie 2.

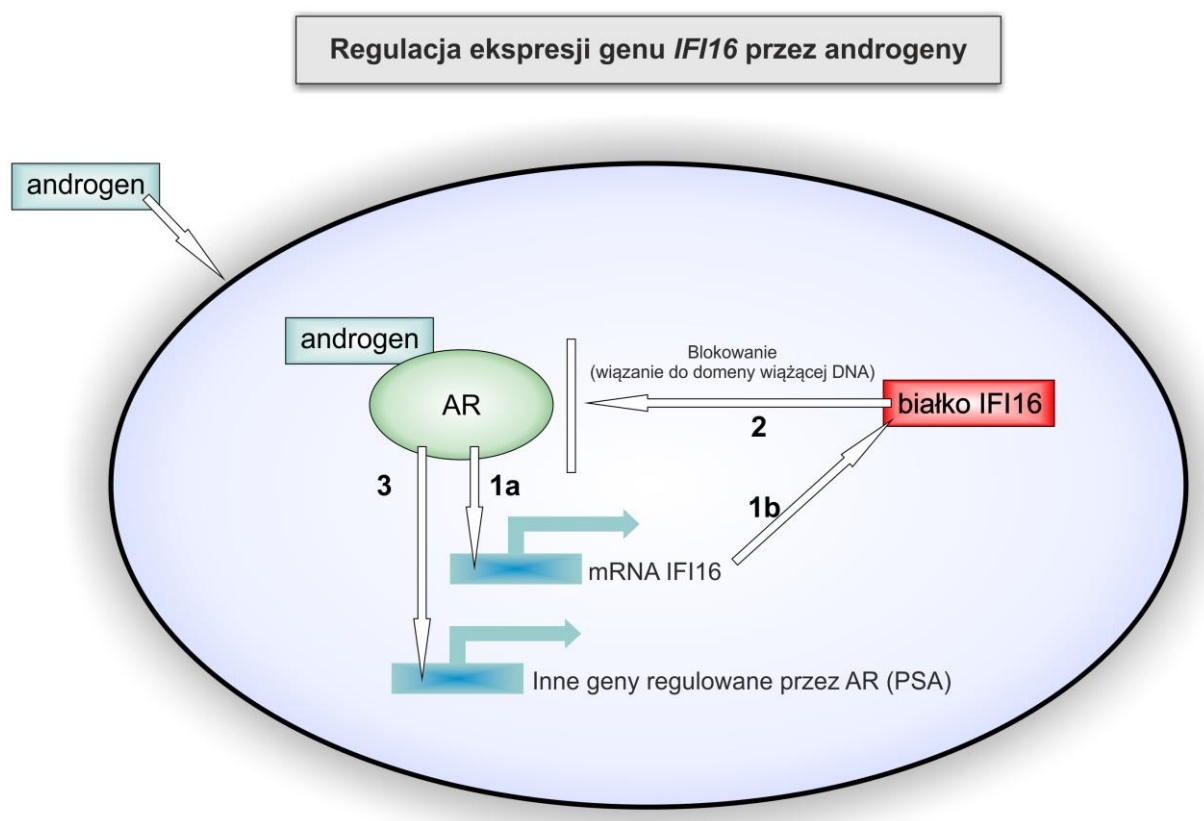


Rycina 2. Regulacja ekspresji genu *IFI16* przez interferony. Interferon typu I i II po połączeniu z receptorem w błonie komórkowej aktywuje szlak JAK/STAT, który przez czynnik transkrypcyjny AP1 aktywuje ekspresję genu *IFI16*

1.6.3.2. Regulacja ekspresji genu *IFI16* przez receptor androgenowy

Stymulacja receptora androgenowego (AR) przez androgeny w ludzkiej linii komórkowej raka gruczołu krokowego (PC-3) prowadzi do wzrostu ekspresji genu i białka *IFI16*^{69,73}. Ponadto nadekspresja białka *IFI16* w ludzkiej linii komórkowej raka gruczołu krokowego (LNCaP), która nie wykazuje ekspresji białka *IFI16*, hamuje aktywację genów zależnych od receptora

AR⁶⁹. Obserwacje te sugerują, że w komórkach reagujących na androgeny aktywacja AR przez androgeny reguluje ekspresję *IFI16*, a zwiększony poziom białka IFI16 w komórkach negatywnie reguluje funkcje receptora AR, a w konsekwencji ogranicza dalszy wzrost ekspresji *IFI16* w drodze ujemnego sprzężenia zwrotnego oraz hamuje ekspresję innych genów regulowanych przez AR. Rolę receptora AR w regulacji ekspresji genu *IFI16* przedstawiono na rycinie 3.

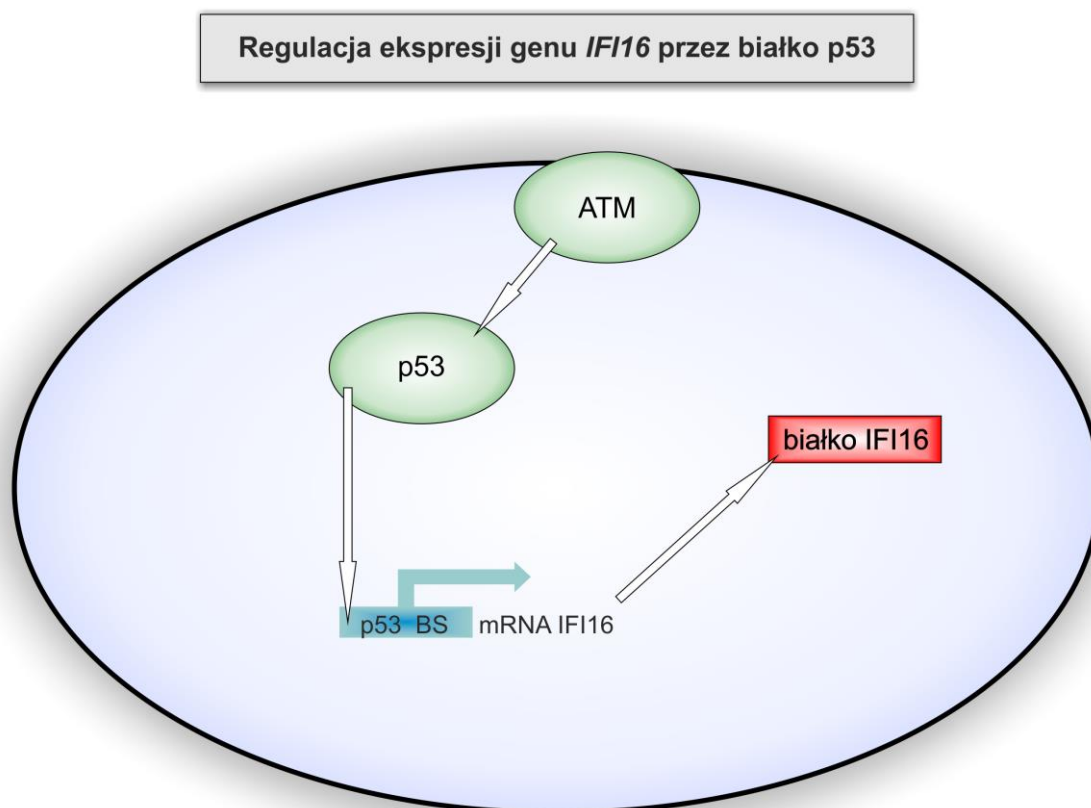


Rycina 3. Rola receptora androgenowego (AR) w regulacji ekspresji *IFI16* oraz rola białka *IFI16* w regulacji ekspresji genów zależnych od receptora AR. W komórkach raka gruczołu krokowego w wyniku wiązania androgenów z receptorem AR dochodzi do jego aktywacji i wzrostu ekspresji genów zależnych od AR, w tym *IFI16* (1a). Wzrost poziomu białka *IFI16* (1b) prowadzi do wiązania receptora AR i hamowania jego aktywności w drodze ujemnego sprzężenia zwrotnego (2), a w konsekwencji do zahamowania ekspresji genów zależnych od AR (3)

1.6.3.3. Regulacja ekspresji genu *IFI16* przez białko p53

Regulację ekspresji *IFI16* przez białko p53 opisano w komórkach HT-29⁷⁴, w prawidłowych „starych”, ale nie „młodych” ludzkich fibroblastach WI-38⁶¹ oraz w komórkach nabłonka gruczołu krokowego. Aktywacja białka p53 przez kinazę ATM prowadzi do stabilizacji białka

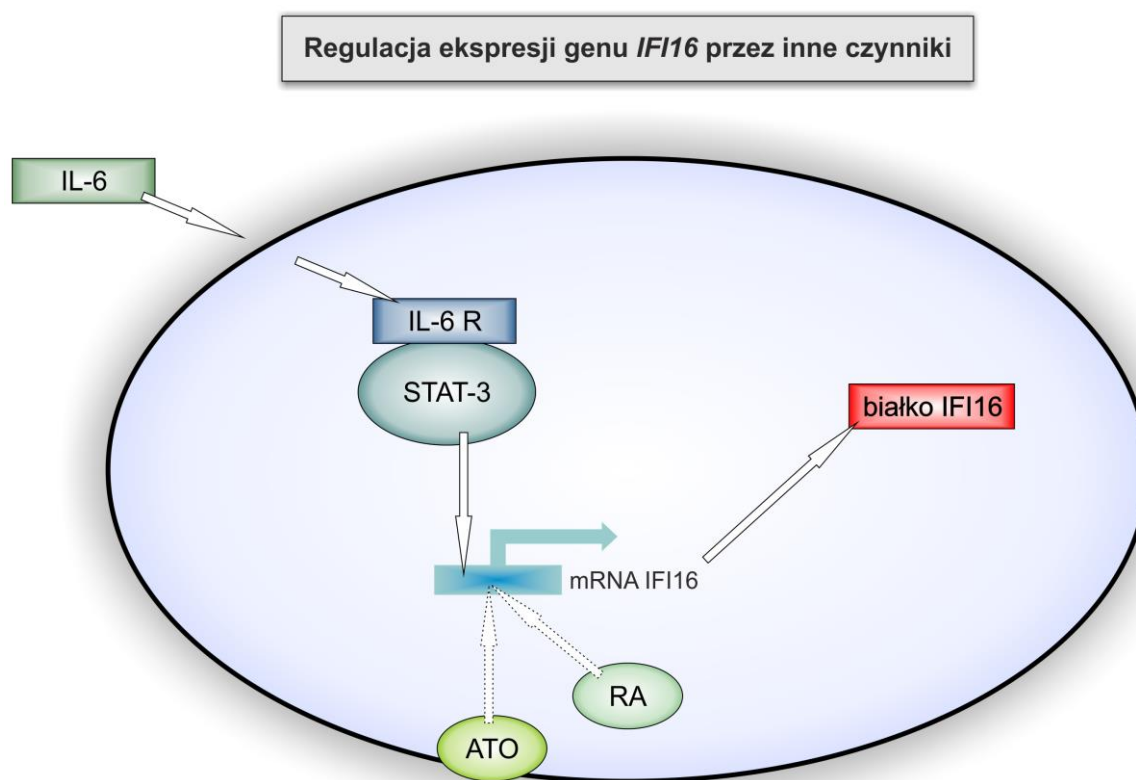
p53, jego wiązania w regionie regulatorowym 5' genu w miejscu określanym jako miejsce wiązania białka p53 (p53-BS)⁷⁵ i transkrypcji genów zależnych od p53, takich jak *p21*, *BAX*, *HDM2* i *IFI16*⁷⁶. Rolę białka p53 w regulacji ekspresji genu *IFI16* przedstawiono na rycinie 4.



Rycina 4. Regulacja ekspresji genu *IFI16* przez białko p53. Aktywacja białka p53 przez kinazę ATM prowadzi do stabilizacji białka p53. Następnie białko p53 wiąże do regionu regulatorowego genu (p53 BS) w obrębie promotora, co prowadzi do wzrostu ekspresji genów zależnych od p53, w tym *IFI16*

1.6.3.4. Regulacja ekspresji przez inne czynniki

Ekspresja *IFI16* jest również regulowana przez inne czynniki komórkowe i środowiskowe. Wiązanie IL-6 do receptora na powierzchni komórki zwiększa ekspresję *IFI16* w sposób zależny od białka STAT-3⁷⁷. Stymulacja linii komórkowej ostrej białaczki promielocytowej NB4 kwasem retinowym (RA) i trójtlenkiem arsenu (ATO) synergistycznie aktywuje transkrypcję genu *IFI16*, aczkolwiek mechanizm ten nie został jeszcze opisany⁷⁸. Regulację ekspresji genu *IFI16* przez IL-6 oraz ATO/RA przedstawiono na rycinie 5.



Rycina 5. Regulacja ekspresji genu *IFI16* przez inne czynniki. Wiązanie IL-6 do receptora na powierzchni komórki prowadzi do aktywacji białka STAT-3, regulującego ekspresję genu *IFI16*. Kwas retinowy (RA) i trójtlenek arsenu (ATO) synergistycznie aktywują transkrypcję genu *IFI16*

1.6.4. Regulacja lokalizacji komórkowej

W przeciwieństwie do lokalizacji wyłącznie jądrowej lub cytoplazmatycznej innych białek z rodziny PYHIN-200, białko IFI16 wykrywane jest zarówno w jądrze komórkowym, jak i w cytoplazmie. Lokalizacja komórkowa białka IFI16 wydaje się regulowana przez acetylację, fosforylację i wiązanie z innymi białkami^{63,79}. Acetylacja białka IFI16 w jądrze prowadzi do zmiany lokalizacji na cytoplazmatyczną⁶⁵. Fosforylacja natomiast wydaje się odpowiadać za lokalizację jądrową, jak miało to miejsce w transfekowanej linii komórkowej hepatomy u szczura⁸⁰. Białko IFI16 może również tworzyć heterodimery z innymi członkami rodziny PYHIN-200, takimi jak MNDA i AIM2⁸¹. Ponieważ białko AIM2 jest zlokalizowane głównie w cytoplazmie, a MNDA w jądrze komórkowym, względne poziomy tych dwóch białek w obrębie komórki mogą wpływać na subkomórkową lokalizację białka IFI16. Białko IFI16 może też tworzyć homo- i heterodimery z innymi białkami (np. p53, Rb, AR, GR, BRCA1), co prawdopodobnie wpływa na jego wewnątrzkomórkową lokalizację⁶⁴. Białko IFI16 wiąże się z receptorem androgenowym (AR) w obrębie domeny wiążącej DNA. Przy braku androgenów

większość AR jest zlokalizowana w cytoplazmie, więc interakcja między IFI16 i AR wpływa na cytoplazmatyczną lokalizację białka IFI16 w komórkach gruczołu krokowego⁶⁹. Po inkubacji komórek z kortykosteroidami białko IFI16 ulegało translokacji do jądra komórkowego wraz z receptorem glikokortykosteroidów (GR). Na uwagę zasługuje fakt, że tylko izoforma IFI16B (ale nie A i C) była zaangażowana w interakcję z GR⁸². Tak więc lokalizacja komórkowa IFI16 wydaje się również zależeć od tego, która z izoform podlega ekspresji.

1.6.5. Rola IFI16 w starzeniu się komórek i hamowaniu cyklu komórkowego

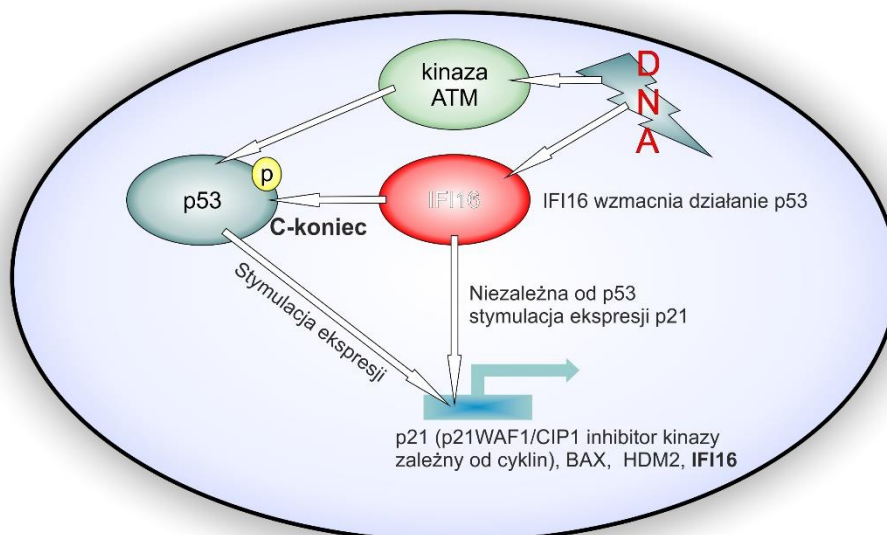
Jedną z najlepiej opisanych funkcji fizjologicznych białka IFI16 jest jego rola w hamowaniu proliferacji i starzeniu się komórek. Starzenie się komórek definiuje się jako brak powrotu do cyklu podziałów komórkowych w odpowiedzi na stymulację mitogenną i nabytą odporność na stymulację przez onkogeny^{83,84,85}. Zwiększona ekspresja białka IFI16 w starszych populacjach (w stosunku do młodych) prawidłowych ludzkich diploidalnych fibroblastów⁶¹ oraz w prawidłowych ludzkich komórkach nabłonka gruczołu krokowego⁶² łączy się z zatrzymaniem wzrostu komórek związanego ze starzeniem.

IFI16 uczestniczy w starzeniu się komórek i zatrzymywaniu cyklu komórkowego na co najmniej trzech różnych poziomach: poprzez interakcję z osią p53-p21^{61,62,86,87}, poprzez interakcję ze szlakiem pRB-E2F^{61,62} oraz poprzez hamowanie aktywności i transkrypcji telomerazy^{86,88}.

Oddziaływanie z białkiem p53 – wzmocnienie sygnalizacji ATM-p53 przez białko IFI16

Białko p53 odgrywa rolę supresorową poprzez hamowanie cyklu komórkowego i indukowanie apoptozy w komórkach^{89,90,91,92}. Po uszkodzeniu DNA białko p53 jest aktywowane przez kinazę białkową ATM, która fosforyluje białko p53 na reszcie Ser-15⁹³. Fosforylacja p53 prowadzi do jego aktywacji i stabilizacji, co skutkuje wzrostem poziomu białka p53 w komórce. Aktywowane białko p53 stymuluje transkrypcję swoich genów docelowych, takich jak *p21* (inhibitor kinazy zależnej od cyklin), *BAX*, *HDM2* i *IFI16*^{94,95,96}. Regulacja transkrypcji tych genów jest kluczowa dla zatrzymania cyklu komórkowego i początku procesu starzenia się w prawidłowych komórkach ludzkich^{91,92}. Wzrost poziomu białka IFI16 prowadzi do jego wiązania z białkiem p53, co zwiększa ekspresję genów zależnych od białka p53⁷⁶. W literaturze opisano również niezależną od białka p53 regulację ekspresji genu *p21* przez białko IFI16⁶². Rolę białka IFI16 w regulacji ekspresji genów zależnych od p53 przedstawiono na rycinie 6.

Oddziaływanie z białkiem p53

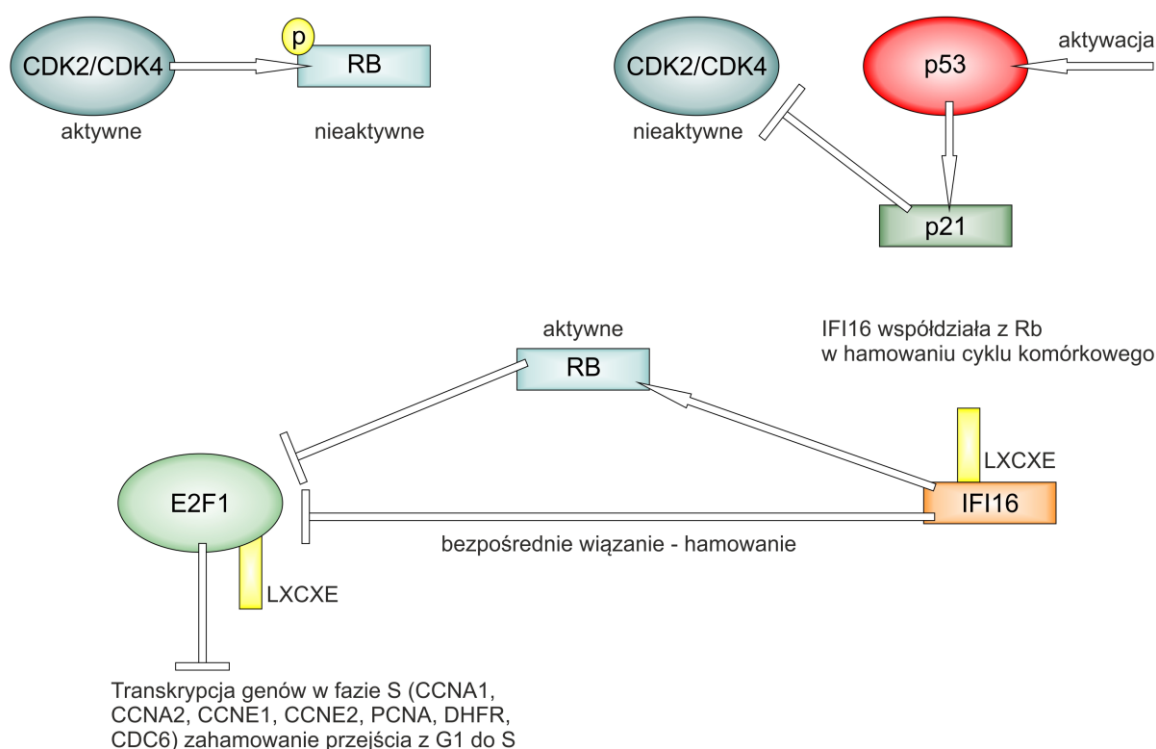


Rycina 6. Regulacja ekspresji genów przez białka p53 oraz IFI16. Uszkodzone DNA aktywuje kinazę białkową ATM, która fosforyzuje białko p53 na reszcie Ser-15. Fosforylacja p53 prowadzi do jego aktywacji i stabilizacji, co skutkuje wzrostem poziomu białka p53 w komórce. Aktywowane p53 stymuluje transkrypcję swoich genów docelowych, takich jak *p21*, *BAX*, *HDM2* i *IFI16*. Wzrost poziomu białka IFI16 prowadzi do wiązania białka p53, co dodatkowo wzmacnia ekspresję genów zależnych od p53. Ponadto białko IFI16 w sposób niezależny od białka p53 stymuluje ekspresję genu *p21*

Oddziaływanie z białkiem Rb

Białko Rb ulega fosforylacji przez kinazy zależne od cyklin – CDK2 i CDK4. W formie ufosforylowanej jest nieaktywne. Po aktywacji białka p53 dochodzi do ekspresji białka p21, które hamuje aktywność CDK2 i CDK4. W wyniku tego białko Rb przechodzi w formę nieufosforylowaną (aktywną) i hamuje czynnik transkrypcyjny E2F1, a w konsekwencji zależną od czynnika E2F1 transkrypcję genów fazy S cyklu komórkowego (*CCNA1*, *CCNA2*, *CCNE1*, *CCNE2*, *PCNA*, *DHFR*, *CDC6*)^{97,98,99}. Białko IFI16 zawiera motyw LXCXE na końcu C, poprzez który może wiązać się z białkiem Rb⁶¹. Wykazano, że zwiększona ekspresja białka IFI16 prowadziła do wiązania z białkiem Rb w komórkach i hamowania transkrypcji genów zależnych od E2F1 oraz indukowała fenotyp przypominający starzenie się komórek^{61,62}. Ponadto dowiedziono, że białko IFI16 również w sposób niezależny od białka Rb może

oddziaływać z czynnikiem transkrypcyjnym E2F1 i prawdopodobnie hamować ekspresję zależnych od niego genów (rycina 7)¹⁰⁰.

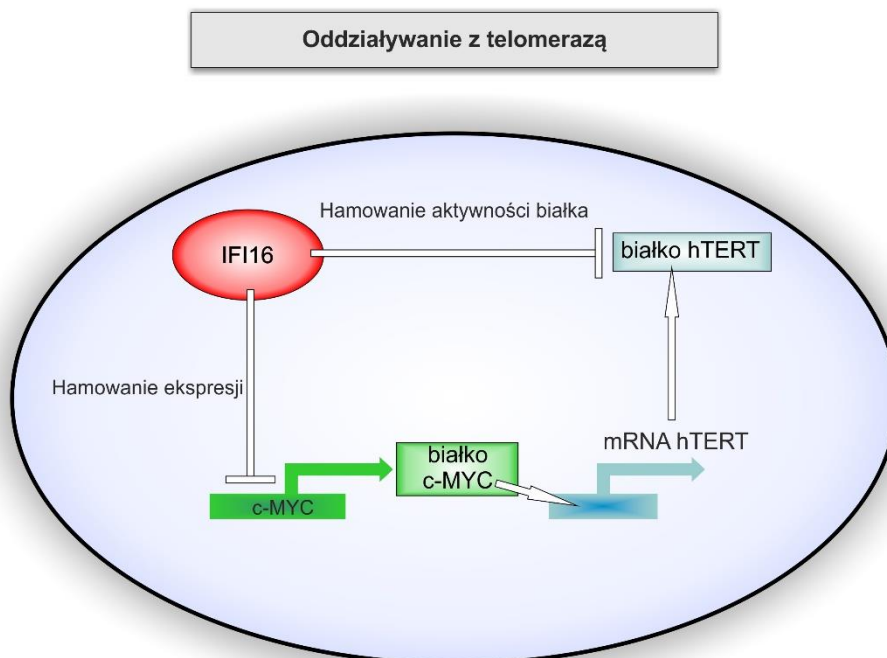


Rycina 7. Rola białka IFI16 w regulacji ekspresji genów zależnych od białka Rb. Kinazy zależne od cyklin, CDK2 i CDK4, fosforylują białko Rb, co prowadzi do jego inaktywacji. Białko p53 aktywuje ekspresję białka p21, które hamuje CDK2 i CDK4. W wyniku tego białko Rb przechodzi w formę nieufosforylowaną (aktywną) i hamuje czynnik transkrypcyjny E2F1, a w konsekwencji zależną od czynników E2F transkrypcję genów fazy S cyklu komórkowego. Białko IFI16 zawiera motyw LXCXE na końcu C, poprzez który może wiązać się z białkiem Rb i wzmacniać jego funkcję. Ponadto wykazano, że białko IFI16 również w sposób niezależny od białka Rb może hamować czynnik transkrypcyjny E2F1

Oddziaływanie z telomerazą

Wzrost ekspresji IFI16 prowadzi w sposób bezpośredni i pośredni do zahamowania aktywności telomerazy. W komórkach linii komórkowej raka piersi MCF-7 wykazano bezpośrednie oddziaływanie białka IFI16 z białkiem hTERT, co skutkowało wyraźnym spadkiem aktywności telomerazy oraz zahamowaniem cyklu komórkowego w fazie G1⁸⁸. Onkoproteina c-MYC stymuluje ekspresję genu *hTERT*. W komórkach HeLa wykazano, że białko IFI16 hamuje ekspresję genu *c-MYC*, co powoduje obniżenie poziomu białka c-MYC, a w konsekwencji zahamowanie ekspresji genu *hTERT*^{86,101}. Podsumowując, konsekwencją wzrostu poziomu ekspresji IFI16 było zahamowanie aktywności oraz ekspresji telomerazy oraz, co za tym idzie,

zahamowanie podziałów komórkowych. Rolę białka IFI16 w regulacji ekspresji i aktywności telomerazy przedstawiono na rycinie 8.



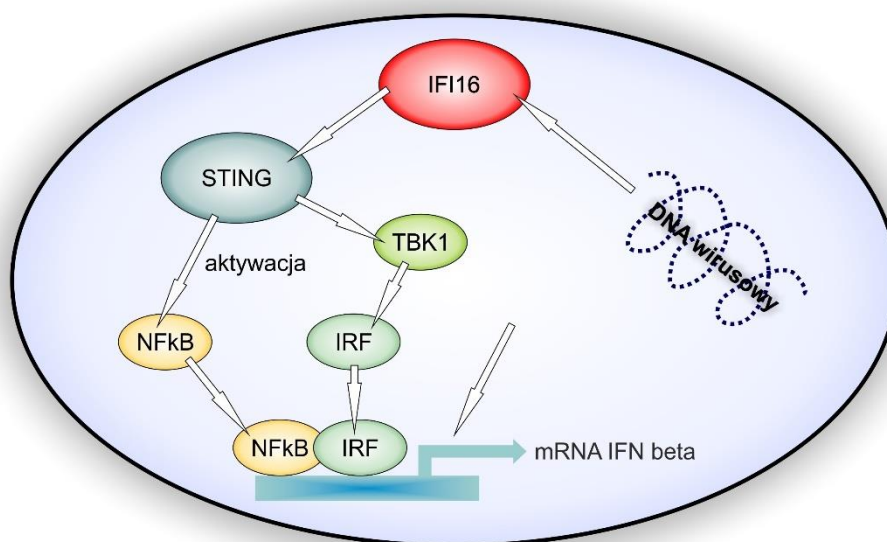
Rycina 8. Regulacja ekspresji i aktywności telomerazy przez białko IFI16. Białko IFI16 wiąże się z białkiem hTERT i bezpośrednio hamuje jego aktywność. IFI16 hamuje również ekspresję onkoproteiny c-MYC, regulującej ekspresję genu *hTERT*, co prowadzi do zahamowania ekspresji telomerazy

1.6.6. Rola IFI16 w odpowiedzi na uszkodzone DNA i infekcje wirusowe

Inną z opisanych funkcji białka IFI16 jest oddziaływanie z uszkodzonym lub wirusowym DNA. IFI16, określane jako czujnik wolnego DNA w komórce, odgrywa kluczową rolę w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej poprzez zwiększenie wytwarzania IFN- β ⁷¹.

W komórkach szpikowych, po wykryciu cytozolowego DNA (sygnał „niebezpieczeństwa”), białko IFI16 rekrutuje białko adaptorowe STING, które aktywuje oś TBK1-IRF3 oraz czynnik transkrypcyjny NF κ B. W wyniku aktywacji dochodzi do ich wiązania w rejonie promotorowym genu *IFN- β* i wzrostu jego ekspresji⁷¹ (rycina 9). Rolę białka IFI16 w regulacji ekspresji *IFN- β* przedstawiono na rycinie 9.

Regulacja ekspresji interferonu beta



Rycina 9. Rola białka IFI16 w regulacji ekspresji IFN- β . Białko IFI16 po wykryciu cytozolowego DNA rekrutuje białko adaptorowe STING, które następnie aktywuje oś TBK1-IRF3 oraz czynnik transkrypcyjny NFkB, co w konsekwencji prowadzi do ekspresji genu kodującego IFN- β

1.6.7. Rola IFI16 w chorobach autoimmunologicznych

Białko IFI16 jest również powiązane z patogenezą niektórych chorób autoimmunologicznych, takich jak toczeń rumieniowaty układowy. Wydzielane z komórek jako antygen alarmina, bierze udział w tworzeniu kompleksów antygenowych¹⁰².

1.6.8. Znaczenie ekspresji białka IFI16 w nowotworach

Badania dotyczące ekspresji genu/białka IFI16 w nowotworach są nieliczne, a ich wyniki niespójne, jak np. w raku jajnika. Nowotwory można podzielić na te, których progresja wiąże się z utratą ekspresji IFI16, i te, których progresja wiąże się ze wzrostem ekspresji IFI16.

1.6.8.1. Rola IFI16 w raku jajnika

W raku jajnika ekspresję IFI16 badano wyłącznie na poziomie transkryptu. W badaniach przeprowadzonych na próbkach z bazy danych TCGA stwierdzono, że wyższa ekspresja *IFI16* koreluje z lepszym przeżyciem pacjentek z HGSO¹⁰³. Należy jednak pamiętać, że w badaniach tych źródłem RNA nie były pojedyncze komórki nowotworowe, a tkanka nowotworowa, stanowiąca mieszaninę różnych komórek. Przeciwnie wyniki uzyskali Ju i wsp., którzy zaobserwowali, że surowicze guzy jajnika pierwotnie odporne na chemioterapię charakteryzują się wyższym poziomem ekspresji *IFI16* niż guzy wrażliwe¹⁰⁴.

1.6.8.2. Nowotwory z utratą ekspresji IFI16

Wśród nowotworów, w których dochodzi do utraty ekspresji IFI16, można wymienić raka piersi, raka gruczołu krokowego, raka głowy i szyi oraz kostniakomięsaka. W raku piersi utrata ekspresji IFI16 wydaje się korelować z progresją choroby. W porównaniu z prawidłowymi komórkami nabłonka gruczołu sutkowego, w których obserwowano wyraźną ekspresję trzech izoform IFI16 z dominującą izoformą B, w liniach komórkowych raka piersi nie odnotowano ekspresji IFI16⁷⁶. W badaniach immunohistochemicznych w prawidłowym nabłonku sutka obserwowano zarówno cytoplazmatyczną, jak i jądrową (dominującą) ekspresję IFI16. W tkance nowotworowej natomiast stwierdzono zdecydowanie niższą ekspresję i dominowała lokalizacja cytoplazmatyczna. Co więcej, komórki nowotworowe wykazywały różny poziom ekspresji IFI16 (od braku do silnej ekspresji)⁷⁶. W raku gruczołu krokowego również obserwowano utratę ekspresji IFI16. Ekspresję IFI16 wykryto w prawidłowych ludzkich komórkach nabłonka gruczołu krokowego oraz w tkance gruczołu krokowego⁶², nie wykryto jednak ekspresji IFI16 w liniach komórkowych raka gruczołu krokowego^{62,73}. W raku kolczystokomórkowym głowy i szyi IFI16 wydaje się odgrywać rolę supresorową. Wyższą ekspresję IFI16 odnotowano w mniej agresywnych guzach o niskim stopniu złośliwości, natomiast niską ekspresję lub brak ekspresji IFI16 obserwowano w bardziej agresywnych guzach o wysokim stopniu złośliwości¹⁰⁵. Przywrócenie ekspresji IFI16 w linii komórkowej HNSCC HNO136 prowadziło do zmniejszenia szybkości podziałów komórkowych i wzrostu apoptozy indukowanej DOX w warunkach *in vitro*¹⁰⁶ oraz znaczącego spowolnienia nowotworzenia w warunkach *in vivo*¹⁰⁷. Podobnie obserwowano znaczące obniżenie ekspresji IFI16 na poziomie transkryptu i białka w kostniakomięsaku w porównaniu z prawidłową tkanką

kostną. Nadekspresja IFI16 w liniach komórkowych kostniakomięsaka i chrzęstniakomięsaka skutkowała znaczącym zmniejszeniem szybkości wzrostu komórek i tworzenia kolonii¹⁰⁸.

1.6.8.3. Nowotwory ze wzrostem ekspresji IFI16

Wśród nowotworów, w których ekspresja IFI16 wzrasta, można wymienić: raka szyjki macicy, raka trzustki oraz nowotwory jądra. W raku szyjki macicy IFI16 wydaje się odgrywać rolę onkogenną. Znacząco wyższy poziom ekspresji IFI16 obserwowano w rakach HPV-dodatnich w porównaniu z rakami HPV-ujemnymi. Ponadto poprzez aktywację ścieżki STING-TBK1-NF-κB IFI16 indukował ekspresję PD-L1 i sprzyjał progresji raka szyjki macicy¹⁰⁹. W badaniu *in vitro* wyłączenie ekspresji IFI16 w linii komórkowej SiHa skutkowało zmniejszeniem poziomu ekspresji białka PD-L1, zmniejszeniem migracji i proliferacji komórek *in vitro* oraz spowolnieniem wzrostu guza i zmniejszeniem końcowej masy guza w badaniach *in vivo* na myszach¹⁰⁹. Poziom ekspresji IFI16 wyraźnie wiązał się zatem z progresją raka szyjki macicy. *IFI16* był również jednym z genów, które ulegały zwiększonej ekspresji w inwazyjnych śródprzewodowych brodawkowatych nowotworach śluzowych trzustki w porównaniu z prawidłowym nabłonkiem przewodowym trzustki, co może sugerować jego rolę w progresji tego nowotworu¹¹⁰. Nadekspresję *IFI16* opisano w nowotworach jądra *in situ*, nie obserwuje się jej natomiast w prawidłowej tkance gonady. Obserwacja ta sugeruje rolę IFI16 w rozwoju złośliwych guzów jąder¹¹¹.

2. Założenia i cele pracy

Rozwój oporności na chemioterapię w trakcie leczenia to jedna z głównych przyczyn niskiej skuteczności leczenia raka jajnika. Oporność na chemioterapię wiąże się ze zmianą ekspresji wielu genów, z których nie wszystkie zostały dotąd poznane. Jednym z genów/białek prawdopodobnie uczestniczących w rozwoju oporności na chemioterapię w raku jajnika jest IFI16.

Celem przedstawionych badań jest określenie roli genu i białka IFI16 w rozwoju oporności na chemioterapię w raku jajnika oraz określenie ekspresji IFI16 w liniach komórkowych i tkankach raka jajnika pochodzących z różnych typów histologicznych. Cel ten zostanie osiągnięty poprzez realizację poniższych celów szczegółowych:

1. Ocena ekspresji genu *IFI16* i białka IFI16 w liniach komórkowych raka jajnika wrażliwych i opornych na DOX i PAC.
2. Określenie, które izoformy białka IFI16 ulegają ekspresji w liniach opornych na DOX i PAC oraz jaka jest lokalizacja komórkowa poszczególnych izoform.
3. Ocena ekspresji genu *IFI16* po krótkotrwałej ekspozycji na DOX i PAC w linii wrażliwej.
4. Określenie, czy istnieje związek pomiędzy ekspresją IFI16 w badanych liniach opornych a jego dotychczas poznanymi funkcjami fizjologicznymi.
5. Ocena ekspresji genu *IFI16* i białka IFI16 w liniach komórkowych raka jajnika pochodzących z różnych typów histologicznych.
6. Określenie względnego poziomu ekspresji i lokalizacji komórkowej izoform białka IFI16 w liniach komórkowych raka jajnika pochodzących z różnych typów histologicznych.
7. Określenie ekspresji białka IFI16 w tkankach raka jajnika.

3. Materiały i metody

3.1. Odczynniki i przeciwciała

W badaniach wykorzystano odczynniki i przeciwciała zakupione u następujących producentów. Pożywki hodowlane dla komórek – MEM (nr kat. 51412C) i DMEM (nr kat. D5546), płodową surowicę bydlęcą – FBS (nr kat. F2442), roztwór antybiotyków i antymykotyków (nr kat. A5955), L-glutaminę (nr kat. G7513), pirogronian sodu (nr kat. S8636), medium DAPI (nr kat. 32670) oraz DOX (nr kat. 324380) i PAC (nr kat. 580556) zakupiono w firmie Sigma (St. Louis, MO, USA). Mysie monoklonalne przeciwciało anti-FI16, klon 2E3 zakupiono w firmie Abnova (Tajpej, Tajwan) (nr kat. H00003428-M03), królicze przeciwciało anti-GADPH, klon FL-335 (nr kat. Sc-25778) zakupiono z Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Monoklonalne przeciwciało królicze anti-kalneksyna, klon EPR3633 (nr kat. ab133615) oraz poliklonalne królicze przeciwciało anti-lamina B1 (nr kat. ab16048-100) zakupiono w firmie Abcam. Drugorzędowe poliklonalne antykrólicze przeciwciało kozie sprzężone peroksydazą chrzanową (HRP) (nr kat. 7074P2) zakupiono w firmie Cell Signaling (Danvers, MA, USA). Drugorzędowe przeciwciała do fluorescencji – Alexa Fluor®488 ośle antykrólicze (nr kat. 711-545-152) oraz Alexa Fluor®594 ośle antymysie (nr kat. 715-585-150) – zakupiono w firmie Jackson ImmunoResearch Laboratories (Cambridgeshire, Wielka Brytania). Odczynniki do reakcji Western blot (membrany, żele i marker masy białka) zakupiono w firmie Biorad (Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead, Wielka Brytania).

3.2. Linie komórkowe i hodowla komórkowa

Do analiz wykorzystano linie komórkowe reprezentujące różnorodne podtypy raka jajnika. Linie komórkowe ludzkiego raka jajnika SKOV-3 i OVCAR-3 zakupiono w firmie ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). Linie ludzkiego raka jajnika A2780, PEA1, PEA2 i PEO23 zakupiono w firmie Sigma (St. Louis, MO, USA).

Linie komórkowe A2780¹¹² oraz PEA1¹¹³ zostały wyizolowane od nieleczonych pacjentów. Linia komórkowa PEA2 została wyizolowana od tego samego pacjenta co linia PEA1, ale po nieskutecznej chemioterapii składającej się z CIS i prednimustyny¹¹³. Linia komórkowa PEO23 została wyizolowana od pacjentki z rakiem jajnika po nieskutecznej terapii

złożonej z CIS i chlorambucylu¹¹³. Linia komórkowa SKOV-3 została wyizolowana od pacjentki leczonej tiotepą¹¹², natomiast linia OVCAR-3 została wyizolowana z płynu jamy otrzewnej pochodzącego od pacjentki z rakiem jajnika po chemioterapii skojarzonej z cyklofosfamidem, DOX i CIS¹¹⁴.

Linie A2780 odporne na DOX [A2780DR1 i A2780DR2] i PAC [A2780PR1] wyprowadzono z linii A2780 w wyniku ekspozycji na wzrastające stężenia leków cytotoksycznych. Końcowe stężenia zastosowane do selekcji linii opornych wynosiły: 100 ng/ml DOX i 300 ng/ml PAC. Wzrost oporności w stosunku do rodzicielskiej linii komórkowej A2780 wrażliwej na leki był następujący: 58,0 razy dla linii A2780DR1, 73,0 razy dla linii A2780DR2 i 146 razy dla linii A2780PR1⁴⁸.

Komórki hodowano w pożywce MEM (A2780), RPMI-1640 (OVCAR-3, PEA1, PEA2, PEO23) lub DMEM (SKOV-3) z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej, 200 mM L-glutaminy, penicyliny (100 jednostek/ml), streptomycyny (100 jednostek/ml) i amfoterycyny B (25 µg/ml) w 37°C w środowisku o zawartości 5% CO₂.

Analiza ekspresji genów metodą łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (q-PCR – *quantitative polymerase chain reaction*)

Całkowite RNA wyizolowano z komórek, wykorzystując zestaw do izolacji RNA Gene Matrix Universal (nr kat. E3599-02) (EURx Ltd., Gdańsk, Polska) zgodnie z protokołem producenta. RNA oznaczano ilościowo metodami spektrofotometrycznymi, mierząc wartości absorbancji przy długościach fal 260 nm i 280 nm, a także ich stosunek 260/280 w celu oszacowania poziomu zanieczyszczenia białkami. Wszystkie wartości współczynnika 260/280 były w przedziale 1,8–2,0. Poziom degradacji RNA sprawdzano metodą elektroforezy z użyciem 1% żelu agarozowego. Następnie 2 µg RNA poddano reakcji odwrotnej transkrypcji z użyciem odwrotnej transkryptazy M-MLV (nr kat. 28025013/10777019) (Invitrogen przez Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) oraz startera oligo(dT). Powstałe w wyniku reakcji odwrotnej transkrypcji cDNA stanowiło matrycę w reakcji q-PCR. Reakcję q-PCR przeprowadzano z zastosowaniem odczynnika Maxima SYBR Green/ROX q-PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) oraz starterów specyficznych dla sekwencji badanych genów (tabela 2). Analizę przeprowadzono z wykorzystaniem aparatu do reakcji PCR w czasie rzeczywistym 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Zastosowano następujące warunki reakcji:

- denaturacja wstępna 95°C – 15 minut;
- a następnie 45 cykli obejmujących:

- denaturację 95°C – 15 sekund;
- przyłączanie starterów 60°C – 30 sekund;
- syntezę 72°C – 30 sekund.

Po syntezie DNA przeprowadzono analizę temperatury topnienia produktu. Produkty syntezy sprawdzono za pomocą analizy krzywej topnienia i elektroforezy w 3% żelu agarozowym.

Poziomy ekspresji genów badanych zostały znormalizowane do poziomu ekspresji genów referencyjnych: dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GADPH), β -aktyny (ACTB), fosforybozylotransferazy hipoksantynowo-guaninowej (HRPT1) i beta-2-mikroglobuliny (β 2M) – średnia geometryczna. Ekspresję genów analizowano metodą względnej kwantyfikacji (RQ – *relative quantification*). RQ określa poziom ekspresji genu względem kalibratora, który stanowiła linia wrażliwa lub bez leku (A2780). RQ kalibratora wynosi 1. Analiza została przeprowadzona z zastosowaniem następującego równania: $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$, gdzie $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ próbki (linia oporna na leki lub po stymulacji lekiem) – ΔC_t kalibratora (linia wrażliwa na leki – A2780). Wykresy wygenerowano z zastosowaniem oprogramowania SigmaPlot.

Tabela 2. Sekwencje starterów użytych w reakcji q-PCR

Transkrypt	Sekwencja (kierunek 5'-3')	Numer ENST (www.ensembl.org)	Długość produktu (pz)
IFI16	CTTCGGACTCCTCAGATGCC GGTCATGAACGGTCCTGGAA	00000295809	144 pz
GADPH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA GACAAGCTTCCCGTTCTCAG	00000229239	199 pz
β -actin	TCTGGCACACACCTTCTAC GATAGCACAGCCTGGATAGC	00000331789	169 pz
HRPT1	CTGAGGATTTGGAAGGGTG AATCCAGCAGGTCAGCAAAG	00000298556	156 pz
β 2M	CGCTACTCTCTCTTTCTGGC ATGTCGGATGGATGAAACCC	00000558401	133 pz

Izolacja RNA i przygotowanie mikromacierzy

RNA oznaczano ilościowo metodami spektrofotometrycznymi, mierząc wartości absorbancji przy długościach fal 260 nm i 280 nm, a także ich stosunek 260/280 w celu oszacowania poziomu zanieczyszczenia białkami. Każdy współczynnik próbek badanych mieścił się w przedziale

1,8–2,0. Poziom degradacji RNA sprawdzano metodą elektroforezy z użyciem 1% żelu agarozowego, jak również przez oszacowanie współczynnika RIN za pomocą aparatu Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). Oszacowane wartości RIN mieściły się w przedziale 8,5–10 (średnia: 9,2). Każdą próbkę rozcieńczono do końcowego stężenia roboczego 100 ng/μl. Wszystkie próbki przygotowano w trzech powtórzeniach. cDNA do analizy mikromacierzy zsyntetyzowano w dwóch etapach (oddzielna synteza dla pierwszej i drugiej nici) z użyciem zestawu Affymetrix GeneChip1 3' IVT Express (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Kolejnymi krokami były transkrypcja *in vitro* (prowadząca do populacji cRNA), znakowanie biotyną i fragmentacja cRNA.

Hybrydyzacja i skanowanie mikromacierzy

Po tej procedurze próbki załadowano i hybrydyzowano z mikromacierzami Affymetrix GeneChip Human Genome U219 wraz z kontrolnym cRNA i oligo B2. Proces hybrydyzacji prowadzono w piecu do hybrydyzacji AccuBlock™ Digital Dry Bath (Labnet International, Inc.) w 45°C przez 16 godzin. W kolejnym etapie mikromacierze oczyszczono i wybarwiono zgodnie z protokołem producenta z użyciem stacji Affymetrix GeneAtlas™ Fluidics. Następnie mikromacierze zeskanowano za pomocą stacji Affymetrix GeneAtlas™ Imaging. Zeskanowane mikromacierze zostały zapisane na dysku twardym jako pliki .CEL. Wszystkie wyniki mikromacierzy są dostępne w bazie danych GEO pod numerem ID GSE73935.

Izolacja jąder komórkowych

Frakcję jądrową i cytoplazmatyczną z komórek izolowano z zastosowaniem zestawu do izolacji frakcji komórkowych (NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit, nr kat. 78835) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Komórki z butelek hodowlanych o powierzchni 75 cm² odczepiano z użyciem roztworu trypsyny, zbierano i następnie wirowano z siłą 500 g przez 5 minut w 4°C. Osad komórek przemywano w roztworze PBS. Komórki liczone. Wszystkie procedury prowadzono według protokołu dostarczonego przez producenta. Do odpowiedniej ilości komórek zgodnie z protokołem producenta dodawano odpowiednią objętość lodowatego odczynnika CER I (zmieszanego z inhibitorami proteazy). Osad komórek zawieszonych w buforze energicznie wortexowano przez 15 sekund i pozostawiono na lodzie na 10 minut. Następnie do próbki dodano lodowaty odczynnik CER II. Komórki wirowano przez 5 sekund i ustawiono na lodzie na 1 minutę. W celu uzyskania supernatantu próbki wirowano przy 16 000 × g przez 5 minut w 4°C. Supernatant (frakcję cytoplazmatyczną) przenoszono do świeżej próbki i umieszczano w –80°C. Osad (jądra komórkowe)

zawieszono w lodowatym buforze NER (zmieszanym z inhibitorami proteazy). Probówkę z jądrami worteksowano przez 15 sekund co 10 minut, łącznie przez 40 minut. Następnie probówkę wirowano przy $16\,000 \times g$ przez 10 minut w 4°C . Supernatant przenoszono do środowiska o temperaturze -80°C .

Analiza Western blot

Stężenie białka oznaczono metodą Bradford z zastosowaniem odczynnika Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead, Wielka Brytania). Do analizy Western blot użyto $10\,\mu\text{g}$ białka z każdej próbki, które zawieszono w buforze obciążającym stężonym $4\times$ (Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead, Wielka Brytania) i naniesiono do każdej studzienki żelu gradientowego (4–20%) mini-PROTEAN[®] TGX[™]. Dokonano rozdziału elektroforetycznego białek z użyciem techniki SDS-PAGE. Wykonano transfer białek na membranę nitrocelulozową, którą preinkubowano w roztworze blokującym (5% roztwór odtłuszczonego mleka w 0,1 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,1% Tween 20). Następnie membranę nitrocelulozową inkubowano z króliczym poliklonalnym przeciwciałem anti-IFI16 w rozcieńczeniu 1:500 (1 godzina, temperatura pokojowa). Nadmiar przeciwciała odmyto przez 3-krotne przemycie w buforze TBST (3×10 minut). Następnie membranę inkubowano z przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z HRP. Do detekcji białek zastosowano zestaw do chemicznej luminescencji (ECL, Femto Super Signal Reagent) i Hyperfilm ECL (GE Healthcare, Buckinghamshire, Wielka Brytania). Kontroli jakości reakcji dokonano przez ponowną inkubację membrany z króliczym przeciwciałem anti-GAPDH (1:1000) i antykróliczym przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z HRP (oba z Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Dla frakcji cytoplazmatycznej jako kontrolę jakości stosowano przeciwciało anti-kalneksyna, a dla frakcji jądrowej przeciwciało anti-lamina B1.

Analiza immunofluorescencyjna

Pierwszym etapem było przygotowanie komórek, które hodowano w szklanych płytkach komorowych do stanu prawie 100% konfluencji, czyli pełnego pokrycia dołków przez komórki. Standardową procedurę przeprowadzono w następujący sposób. Pożywkę hodowlaną zastąpiono PBS do przepłukania, a następnie lodowatym acetonem/metanolem (1:1) przez 10 minut w celu utrwalenia i permeabilizacji. Następnie komórki przemyto PBS i zablokowano w 3% BSA przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Komórki inkubowano z przeciwciałem pierwszorzędowym anti-IFI16 w rozcieńczeniu 1:100. Po 2 godzinach inkubacji w temperaturze pokojowej komórki przemywano PBS i inkubowano z drugorzędowym

przeciwciałem Alexa Fluor® 488 znakowanym zielonym barwnikiem (Donkey Anti-Mouse IgG, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Cambridgeshire, Wielka Brytania) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Na koniec komórki przemyto PBS i osadzono w roztworze DAPI. Analizę ekspresji i zdjęcia wykonano pod mikroskopem fluorescencyjnym (Zeiss Axio-Imager.Z1).

Wzrost ekspresji *IFI16* po krótkotrwałej ekspozycji na DOX i PAC

Komórki do eksperymentu hodowano na płycie 6-dółkowej. Na każdy dołek wysiewano $0,5 \times 10^6$ komórek w objętości medium hodowlanego 1 ml. Po 48 godzinach wymieniano medium na świeże w kontroli lub medium z DOX w stężeniach 15 ng/ml i 20 ng/ml lub medium z PAC w stężeniach 20 ng/ml i 25 ng/ml. Komórki inkubowano z cytostatykami przez 24, 48 i 72 godziny. Następnie zbierano komórki, izolowano RNA i analizowano ekspresję genów metodą q-PCR.

Analiza immunohistochemiczna

Barwienie immunohistochemiczne przeprowadzono na bloczkach parafinowych pochodzących od pacjentek z rakiem jajnika. Skrawki o grubości 5 μm umieszczono na szkiełkach podstawowych, odparafinowano ksylenem i stopniowo nawodniono w szeregu alkoholi o malejącym stężeniu (alkohol absolutny, 80%, 70%, 60%, woda). Skrawki poddano inkubacji w 1% H_2O_2 , blokowano surowicą kozią przez 30 minut w temperaturze pokojowej, a następnie przez noc z pierwszorzędowymi przeciwciałami anti-IFI16 w rozcieńczeniu w 1:200 w 4°C. Następnie inkubowano w roztworze do detekcji EnVision (system detekcji peroksydazy / DAB+, Dako REAL™EnVision™, królik/mysz, Dako, Glostrup, Dania) lub ImmPRESS™ HRP Reagent Kit (peroxidase/DAB, anti-goat, Vector Lab, Burlingame, CA, USA) przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Na koniec szkiełka płukano w wodzie destylowanej, barwiono kontrastowo hematoksyliną, odwodniano oraz zamykano histofluidem i szkiełkiem nakrywkowym. Analizę barwienia immunohistochemicznego wykonano pod mikroskopem optycznym Olympus BH-2 sprzężonym z aparatem cyfrowym. Ekspresję IFI16 ustalono na podstawie średniej proporcji immunopozytywnych komórek rakowych i komórek zrębu. Dla każdej próbki wynik immunoreaktywności (IRS) zliczono z 10 pól widzenia przy powiększeniu 400 $\times$ i uzyskano poprzez pomnożenie wyniku intensywności i ilości komórek immunopozytywnych. Intensywność barwienia komórek rakowych oceniono jako ujemną (0), słabą (1+), umiarkowaną (2+) lub silną (3+). Ilość komórek immunopozytywnych określono według skali: 0 (brak komórek pozytywnych), 1+ (mniej niż 10% komórek pozytywnych),

2+ (10–50% komórek pozytywnych), 3+ (51–80% komórek pozytywnych) lub 4+ (ponad 80% komórek pozytywnych). Wynik IRS interpretowano jako negatywny (IRS 0–1), słaby (IRS 2–3), umiarkowany (IRS 4–8) lub pozytywny (IRS 9–12). Intensywność barwienia w tkance otaczającej guz oceniono według skali: negatywny (0), słaby (1+), umiarkowany (2+) lub silny (3+).

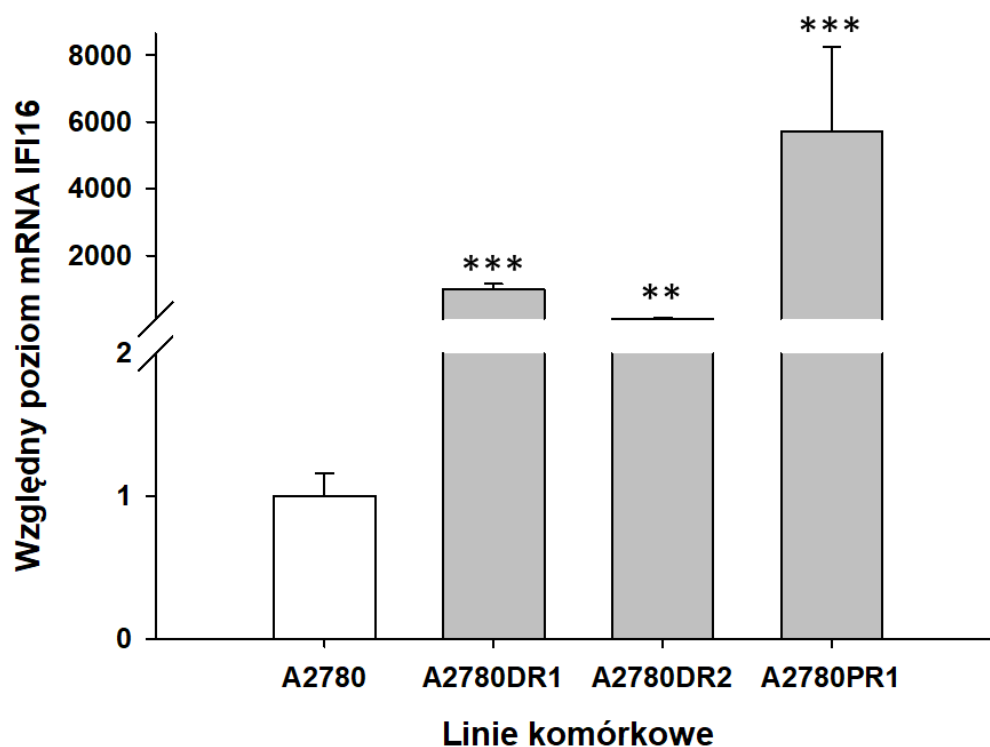
3.3. Analiza statystyczna

Dane są prezentowane jako błąd standardowy średniej (SEM – *standard error of mean*). Analizowano je za pomocą testu *t*-Studenta. Różnicę uznawano za statystycznie istotną przy wartości $p < 0,05$.

4. Wyniki

Analiza ekspresji genu *IFI16* w lekoopornych liniach komórkowych raka jajnika

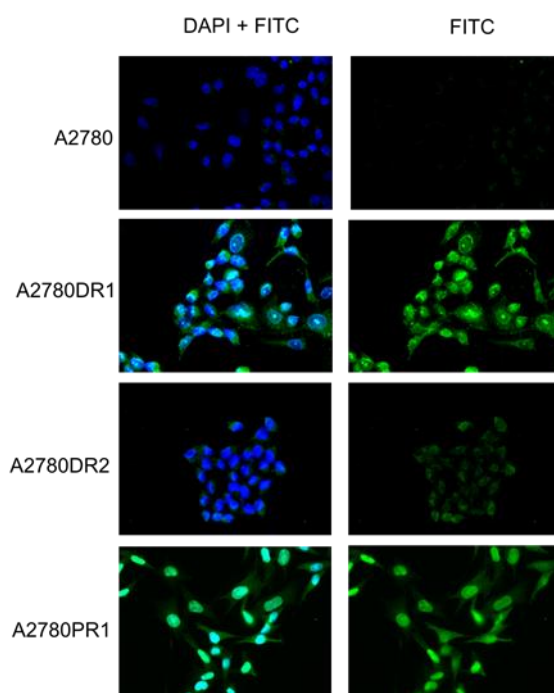
W celu ustalenia, czy rozwój oporności na leki cytotoksyczne w liniach opornych jest związany ze wzrostem ekspresji *IFI16*, oceniono poziom ekspresji mRNA *IFI16* w linii wrażliwej oraz w liniach opornych metodą q-PCR. Zaobserwowano statystycznie istotny wzrost poziomu transkryptu *IFI16* w liniach komórkowych A2780DR1 ($p < 0,001$), A2780DR2 ($p < 0,01$) i A2780PR1 ($p < 0,001$) (rycina 10). Pomimo że wysoki wzrost ekspresji odnotowano we wszystkich liniach komórkowych, stwierdzono dużą różnicę między opornymi liniami komórkowymi. W linii komórkowej A2780DR2 obserwowano około stukrotny wzrost poziomu ekspresji. Znacznie silniejszy wzrost wykryto w linii komórkowej A2780DR1 (około tysiąckrotny wzrost ekspresji) i w linii komórkowej A2780PR1 (tu poziom ekspresji wzrósł około 2500 razy).



Rycina 10. Analiza ekspresji (q-PCR) transkryptu *IFI16* w linii A2780 oraz liniach opornych na leki cytotoksyczne. Rycina przedstawia względny poziom ekspresji w opornych liniach komórkowych (szare słupki) w stosunku do wrażliwej linii komórkowej (biały słupek), której przypisano wartość 1. Wartości uznano za istotne statystycznie przy ** $p < 0,01$ oraz *** $p < 0,001$

Analiza immunofluorescencyjna ekspresji białka IFI16 w lekoopornych liniach komórkowych raka jajnika

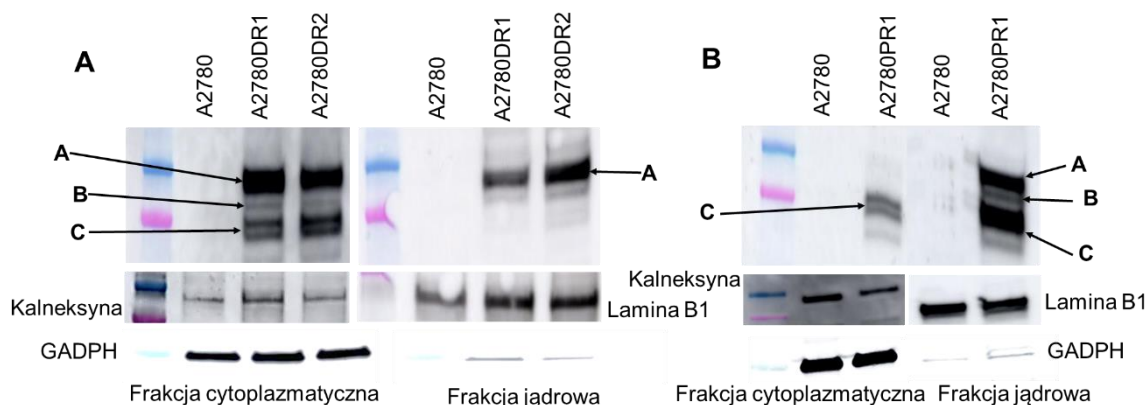
W celu określenia ekspresji białka IFI16 przeprowadzono analizę fluorescencyjną w liniach komórkowych A2780, A2780DR1, A2780DR2 i A2780PR1. W linii wrażliwej A2780 nie obserwowano sygnału fluorescencyjnego dla białka IFI16. W linii komórkowej A2780DR2 odnotowano słaby poziom fluorescencji. Wyraźny wzrost intensywności fluorescencji stwierdzono w liniach komórkowych A2780DR1 i A2780PR1 (rycina 11). Bardziej szczegółowa analiza wyników immunofluorescencji wskazuje na dwa istotne fakty. Wszystkie komórki w obrębie linii komórkowej wykazują podobny poziom ekspresji. W liniach komórkowych opornych na DOX wydaje się dominować ekspresja cytoplazmatyczna, podczas gdy w linii komórkowej odpornej na PAC wykazano wyraźną silną lokalizację jądrową, chociaż słaby sygnał pochodził również z cytoplazmy.



Rycina 11. Analiza immunofluorescencyjna ekspresji białka IFI16 w liniach komórkowych A2780, A2780DR1, A2780DR2 i A2780PR1. IFI16 wykrywano z użyciem przeciwciała przeciwko IFI16 i drugorzędowego przeciwciała sprzężonego z MFP488 (kolor zielony). Jądra komórkowe wykrywano z zastosowaniem barwnika DAPI (kolor niebieski)

Analiza Western blot ekspresji białka IFI16 we frakcji jądrowej i cytoplazmatycznej linii A2780 oraz linii komórkowych opornych na leki

W celu określenia lokalizacji komórkowej izoform białka IFI16 przeprowadzono analizę Western blot ekspresji IFI16 we frakcji jądrowej i cytoplazmatycznej. Ponieważ zaobserwowano dużą różnicę w poziomie ekspresji pomiędzy liniami komórkowymi opornymi na DOX i PAC, przeprowadzono dwa oddzielne eksperymenty Western blot, w każdym z nich stosując linię A2780 jako kontrolę. Nie odnotowano ekspresji białka IFI16 we frakcji jądrowej i cytoplazmatycznej w linii komórkowej A2780 (rycina 12A, B). W liniach komórkowych opornych na DOX stwierdzono wyższą ekspresję białka IFI16 we frakcji cytoplazmatycznej (rycina 12A), natomiast w linii komórkowej odpornej na PAC dominowała lokalizacja jądrowa (rycina 12B). Wykryto prążki o różnej masie cząsteczkowej, które mogą odpowiadać różnym izoformom białka IFI16. W obu liniach komórkowych opornych na DOX we frakcji cytoplazmatycznej najsilniejszy prążek odpowiadał białku o masie cząsteczkowej około 85–90 kDa. Zaobserwowano również silny podwójny prążek odpowiadający masie około 70–75 kDa. Pomędzy tymi silnymi prążkami stwierdzono także bardzo słaby prążek o masie około 80 kDa. We frakcji jądrowej najsilniejszy sygnał odnotowano dla prążka o masie około 85–90 kDa (rycina 12A). We frakcji cytoplazmatycznej linii odpornej na PAC zaobserwowano słaby sygnał odpowiadający masie cząsteczkowej około 70–75 kDa. Z kolei we frakcji jądrowej wykryto dwa silne prążki odpowiadające masie około 70–75 kDa oraz 85–90 kDa. Pomędzy nimi był również obecny bardzo słaby prążek o masie około 80 kDa (rycina 12B).

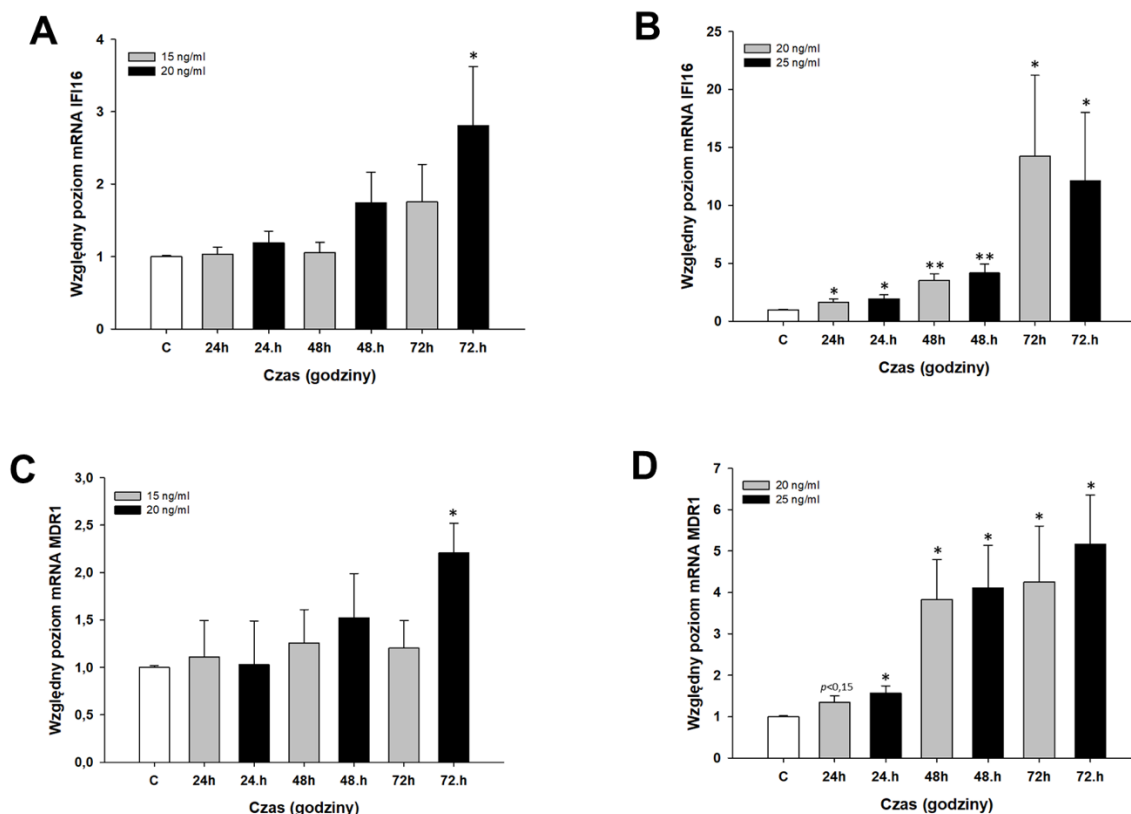


Rycina 12. Analiza ekspresji białka IFI16 we frakcjach cytoplazmatycznej i jądrowej wyizolowanych z linii A2780 oraz z linii opornych na DOX (A) i linii i opornej na PAC (B). Białka rozdzielono za pomocą żelu gradientowego (4–20%) i przeniesiono na membranę nitrocelulozową. Następnie białko wykrywano pierwszorzędowym przeciwciałem przeciwko IFI16 oraz przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z HRP. Przeciwciała przeciwko GADPH i kalneksynie zastosowano jako kontrolę dla frakcji cytoplazmatycznej, a przeciwciała przeciwko laminie B1 jako kontrolę dla frakcji jądrowej

Wczesna odpowiedź na stymulację PAC i DOX w linii wrażliwej na leki cytotoksyczne

Ponieważ IFI16 wydaje się odgrywać rolę w nabytej oporności na leki cytotoksyczne, w kolejnym etapie badań wrócono do sytuacji wyjściowej i sprawdzono, czy DOX i PAC mogą indukować ekspresję genu *IFI16* w linii wrażliwej podczas pierwszego kontaktu komórek nowotworowych z tymi lekami. W celu określenia wczesnej odpowiedzi na DOX i PAC linię komórkową A2780 hodowano w obecności niskich stężeń DOX (15 i 20 ng/ml) lub PAC (20 i 25 ng/ml) przez 24, 48 i 72 godziny. Następnie zbadano zmiany w ekspresji genu *IFI16* w stosunku do komórek hodowanych bez cytostatyku. Zastosowane startery rozpoznawały wszystkie warianty transkrypcyjne genu *IFI16*. W komórkach hodowanych w obecności DOX zaobserwowano statystycznie istotny wzrost ($p < 0,05$) poziomu transkryptu *IFI16* tylko dla stężenia 20 ng/ml i czasu hodowli 72 godziny (rycina 13A). Hodowla w obecności PAC prowadziła do zależnego od czasu wzrostu poziomu transkryptu *IFI16* z maksymalnym około 13-krotnym wzrostem po 72 godzinach hodowli ($p < 0,05$ lub $p < 0,01$) (rycina 13B).

Jako kontrolę zastosowano gen *MDR1*, kodujący białko P-gp, które odgrywa najważniejszą rolę w powstawaniu oporności na DOX i PAC⁴⁴. Podobnie jak w przypadku *IFI16*, zaobserwowano statystycznie istotny wzrost poziomu transkryptu *MDR1* tylko przy stężeniu DOX wynoszącym 20 ng/ml i czasie hodowli 72 godziny (rycina 13C). Hodowla w obecności PAC prowadziła do zależnego od stężenia i czasu wzrostu poziomu transkryptu *MDR1* (rycina 13D).



Rycina 13. Analiza ekspresji genów *IFI16* i *MDR1* w linii komórkowej A2780 po krótkotrwałej ekspozycji na DOX (A, C) lub PAC (B, D). Rycina przedstawia względną ekspresję genów w komórkach stymulowanych DOX lub PAC (szare i czarne słupki) w odniesieniu do kontroli (białe słupki), której przypisano wartość 1.

Wartości uznawano za istotne statystycznie przy * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$

Analiza ekspresji genów związanych funkcjonalnie z IFI16 w liniach komórkowych wrażliwych i opornych na leki cytotoksyczne z zastosowaniem mikromacierzy RNA

Ponieważ ekspresja IFI16 jest regulowana przez różne szlaki sygnalizacyjne, a IFI16 może również uczestniczyć w regulacji ekspresji różnych genów, przeanalizowano wyniki z mikromacierzy RNA pod kątem ekspresji genów „powiązanych z IFI16”. Prześledzono ekspresję wszystkich genów kodujących interferony i receptory interferonów, genów ze szlaków sygnalizacyjnych interferonów oraz genów regulowanych przez interferony, a także ekspresję innych genów zaangażowanych w stymulację ekspresji IFI16 i interakcję z białkiem IFI16, takich jak: geny kodujące receptory hormonów steroidowych, geny związane z białkiem p53, geny związane z białkiem Rb1 i inne geny regulowane przez IFI16 lub zaangażowane w ekspresję IFI16. Nie wykazano statystycznie istotnych różnic między liniami komórkowymi wrażliwymi i opornymi na leki w poziomie ekspresji analizowanych genów. Wyniki analizy podsumowano w tabeli 3.

Tabela 3. Analiza ekspresji genów związanych funkcjonalnie z IFI16 w liniach komórkowych wrażliwych i opornych na leki cytotoksyczne z zastosowaniem mikromacierzy RNA

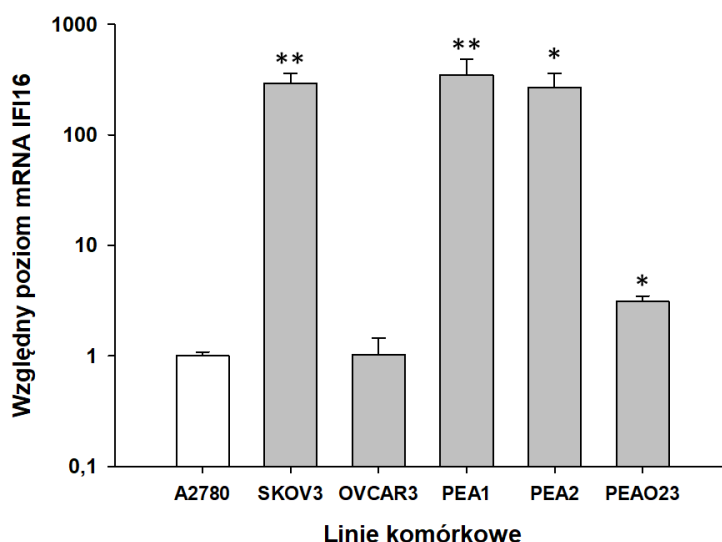
Opis	Gen	Numer transkryptu	A2780 vs. A2780DR1	A2780 vs. A2780DR2	A2780 vs. A2780PR1
Geny kodujące interferony i receptory interferonów	<i>IFNA1</i>	NM_006900	NS	NS	NS
	<i>IFNA2</i>	NM_000605	NS	NS	NS
	<i>IFNA4</i>	NM_021068	NS	NS	NS
	<i>IFNA5</i>	NM_002169	NS	NS	NS
	<i>IFNA6</i>	NM_021002	NS	NS	NS
	<i>IFNA7</i>	NM_021057	NS	NS	NS
	<i>IFNA8</i>	NM_002170	NS	NS	NS
	<i>IFNA10</i>	NM_002171	NS	NS	NS
	<i>IFNA13</i>	NM_024013	NS	NS	NS
	<i>IFNA14</i>	NM_002172	NS	NS	NS
	<i>IFNA16</i>	NM_002173	NS	NS	NS
	<i>IFNA17</i>	NM_021268	NS	NS	NS
	<i>IFNA21</i>	NM_002175	NS	NS	NS
	<i>IFNB1</i>	NM_002176	NS	NS	NS
	<i>IFNG</i>	NM_000619	NS	NS	NS
	<i>IFNAR1</i>	NM_000629	NS	NS	NS
	<i>IFNAR2</i>	NM_000874	NS	NS	NS
	<i>IFNGR1</i>	NM_000416	NS	NS	NS
	<i>IFNGR2</i>	NM_005534	NS	NS	NS
Geny związane ze szlakami sygnalizacyjnymi interferonów	<i>STAT1</i>	NM_007315	NS	NS	NS
	<i>STAT2</i>	NM_005419	NS	NS	NS
	<i>STAT3</i>	NM_003150	NS	NS	NS
	<i>STAT4</i>	NM_003151	NS	NS	NS
	<i>JAK1</i>	NM_002227	NS	NS	NS
	<i>JAK2</i>	NM_004972	NS	NS	NS
	<i>JAK3</i>	NM_000215	NS	NS	NS
Inne geny regulowane przez interferony	<i>CXCL10</i>	NM_001565	NS	NS	NS
	<i>CXCL11</i>	NM_005409	NS	NS	NS
	<i>STING</i>	NM_198282	NS	NS	NS
	<i>TBK1</i> <i>IRF1</i>	NM_013254 NM_002198	NS	NS	NS
	<i>IRF2</i>	NM_002199	NS	NS	NS
	<i>IRF3</i>	NM_001571	NS	NS	NS
	<i>IRF4</i>	NM_002460	NS	NS	NS
	<i>IRF5</i>	NM_001098627	NS	NS	NS

Opis	Gen	Numer transkryptu	A2780 vs. A2780DR1	A2780 vs. A2780DR2	A2780 vs. A2780PR1
	<i>IRF6</i>	NM_006147	NS	NS	NS
	<i>IRF7</i>	NM_001572	NS	NS	NS
	<i>IRF8</i>	NM_002163	NS	NS	NS
	<i>IRF9</i>	NM_006084	NS	NS	NS
Receptory hormonów steroidowych	<i>AR</i>	NM_000044	NS	NS	NS
	<i>ESR1</i>	NM_000125	NS	NS	NS
	<i>ESR2</i>	NM_001040275	NS	NS	NS
	<i>GR</i>	NM_000176	NS	NS	NS
Geny powiązane funkcjonalnie z białkiem p53	<i>TP53</i>	NM_000546	NS	NS	NS
	<i>p21 (CDKN1A/WAF1)</i>	NM_000389	NS	NS	NS
	<i>BAX</i>	NM_004324	NS	NS	NS
	<i>HDM2 (MDM2)</i>	NM_001145336	NS	NS	NS
Geny powiązane funkcjonalnie z białkiem Rb1	<i>RB1</i>	NM_000321	NS	NS	NS
	<i>E2F1</i>	NM_005225	NS	NS	NS
	<i>E2F2</i>	NM_004091	NS	NS	NS
	<i>E2F3</i>	NM_001949	NS	NS	NS
	<i>E2F4</i>	NM_001950	NS	NS	NS
	<i>E2F5</i>	NM_001083588	NS	NS	NS
	<i>E2F6</i>	NM_198256	NS	NS	NS
	<i>E2F7</i>	NM_203394	NS	NS	NS
	<i>E2F8</i>	NM_024680	NS	NS	NS
	<i>p16 (CDKN2A)</i>	NM_017632	NS	NS	NS
	<i>CCNA1</i>	NM_001111045	NS	NS	NS
	<i>CCNA2</i>	NM_001237	NS	NS	NS
	<i>CCNE1</i>	NM_001238	NS	NS	NS
	<i>CCNE2</i>	NM_057749	NS	NS	NS
	<i>CDC6</i>	NM_001254	NS	NS	NS
	<i>PCNA</i>	NM_002592	NS	NS	NS
	<i>DHFR</i>	NM_000791	NS	NS	NS
Inne geny	<i>TERT</i>	NM_198253	NS	NS	NS
	<i>MYC</i>	NM_002467	NS	NS	NS
	<i>FOS</i>	NM_005252	NS	NS	NS
	<i>JUN</i>	NM_002228	NS	NS	NS

NS (*not significant*) – brak istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji

Ekspresja genu *IFI16* w liniach komórkowych raka jajnika pochodzących z różnych typów histologicznych

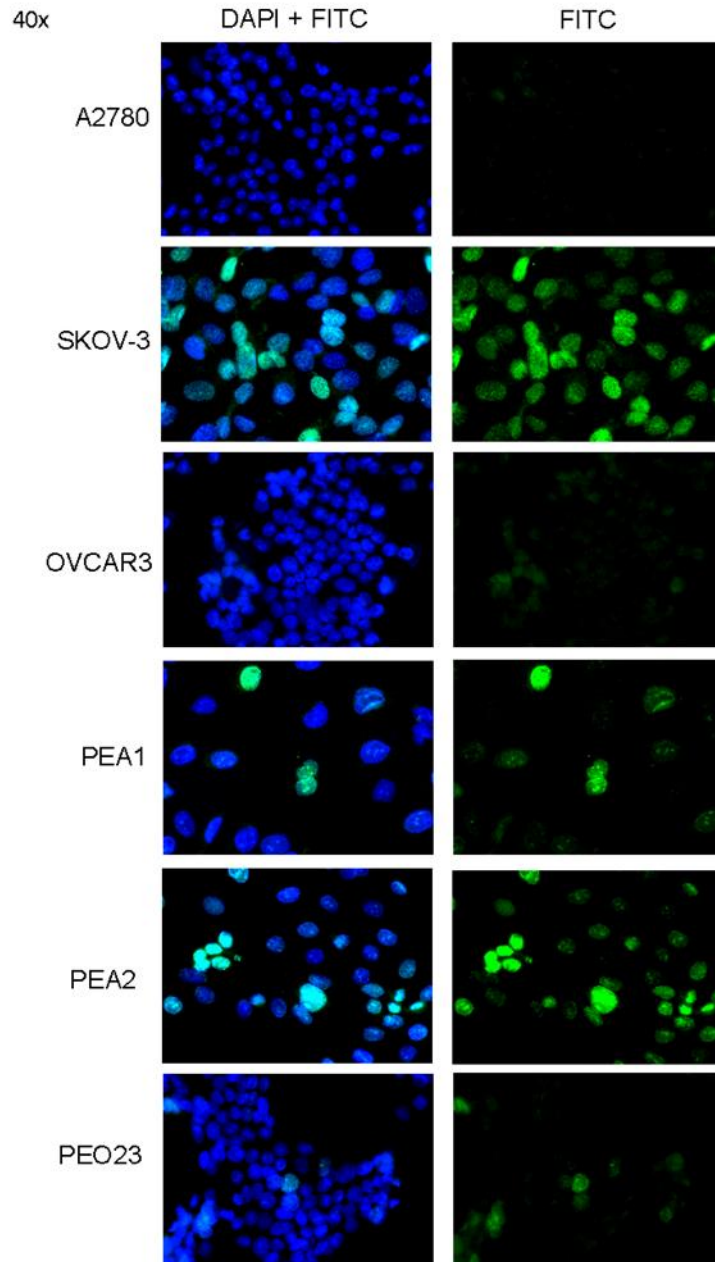
W drugiej części badań postanowiono sprawdzić, czy gen *IFI16* ulega również ekspresji w innych liniach komórkowych raka jajnika. Poziom ekspresji genu *IFI16* był badany w następujących liniach komórkowych raka jajnika: surowiczego raka jajnika o wysokim stopniu złośliwości histologicznej – OVCAR-3, PEA1, PEA2; surowiczego raka jajnika o niskim stopniu złośliwości – PEO23; surowiczego raka jajnika o nieustalonym stopniu złośliwości – SKOV-3; endometrioidalnego raka jajnika – A2780. Najniższy poziom transkryptu *IFI16* zaobserwowano w linii komórkowej A2780. Arbitralnie przyjęto, że poziom ekspresji w tej linii wynosi 1. Poziom ekspresji w pozostałych liniach komórkowych określono względem linii A2780. Podobny poziom ekspresji jak w linii A2780 odnotowano w linii komórkowej OVCAR-3. Około 3-krotny wzrost poziomu ekspresji *IFI16* ($p < 0,05$) stwierdzono w linii komórkowej PEO23. Najwyższą ekspresję genu *IFI16* wykazano w liniach komórkowych SKOV-3 ($p < 0,01$), PEA1 ($p < 0,01$) i PEA2 ($p < 0,05$), w których poziom ekspresji był około 300-krotnie wyższy niż w linii komórkowej A2780 (rycina 14). Ze względu na duże różnice w poziomie ekspresji między badanymi liniami komórkowymi wyniki przedstawiono w skali logarytmicznej.



Rycina 14. Analiza ekspresji (q-PCR) transkryptu *IFI16* w różnych liniach komórkowych raka jajnika. Rycina przedstawia względny poziom ekspresji w liniach komórkowych (szare słupki) w stosunku do linii komórkowej A2780 (biały słupek), której przypisano wartość 1. Zastosowano skalę logarytmiczną. Wartości uznano za istotne statystycznie przy * $p < 0,05$ oraz ** $p < 0,01$

Analiza immunofluorescencyjna ekspresji białka IFI16 w liniach raka jajnika o różnym pochodzeniu histologicznym

W celu porównania ekspresji białka IFI16 w różnych liniach komórkowych raka jajnika przeprowadzono analizę fluorescencyjną w liniach komórkowych A2780, SKOV-3, OVCAR-3, PEA1, PEA2 i PEO23. W linii komórkowej A2780 nie obserwowano sygnału fluorescencyjnego. W liniach komórkowych OVCAR-3 i PEO23 stwierdzono niski poziom fluorescencji. Jednak w przeciwieństwie do linii OVCAR-3, w której odnotowano równomiernie rozłożony poziom fluorescencji, w linii komórkowej PEO23 tylko pojedyncze komórki wykazały pozytywny sygnał. W liniach komórkowych SKOV-3, PEA1 i PEA2 zaobserwowano silny wzrost intensywności fluorescencji. We wszystkich trzech liniach komórkowych obecne były komórki o niskim, średnim i wysokim poziomie fluorescencji. W linii komórkowej PEA1 występował silny sygnał w około 25% komórek. W liniach PEA2 i SKOV-3 wysoki poziom fluorescencji zaobserwowano w około 50% komórek (rycina 15).

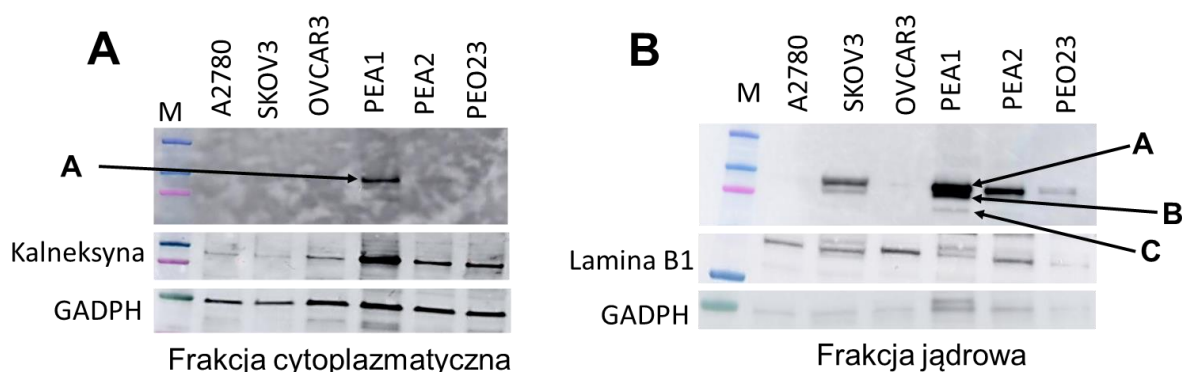


Rycina 15. Analiza immunofluorescencyjna ekspresji białka IFI16 w liniach komórkowych A2780, SKOV-3, OVCAR-3, PEA1, PEA2 i PEO23. IFI16 wykryto z użyciem przeciwciała przeciwko IFI16 i drugorzędowego przeciwciała sprzężonego z MFP488 (kolor zielony). Jądra komórkowe wykrywano z zastosowaniem barwnika DAPI (kolor niebieski)

Analiza Western blot ekspresji białka IFI16 w liniach komórkowych raka jajnika o różnym pochodzeniu histologicznym

W celu określenia lokalizacji komórkowej izoform białka IFI16 wykonano analizę Western blot we frakcji cytoplazmatycznej i jądrowej. We frakcji cytoplazmatycznej zaobserwowano tylko jeden wyraźny prążek w linii komórkowej PEA1 odpowiadający masie cząsteczkowej około 85–90 kDa (rycina 16A). We frakcji jądrowej stwierdzono wyraźny prążek odpowiadający

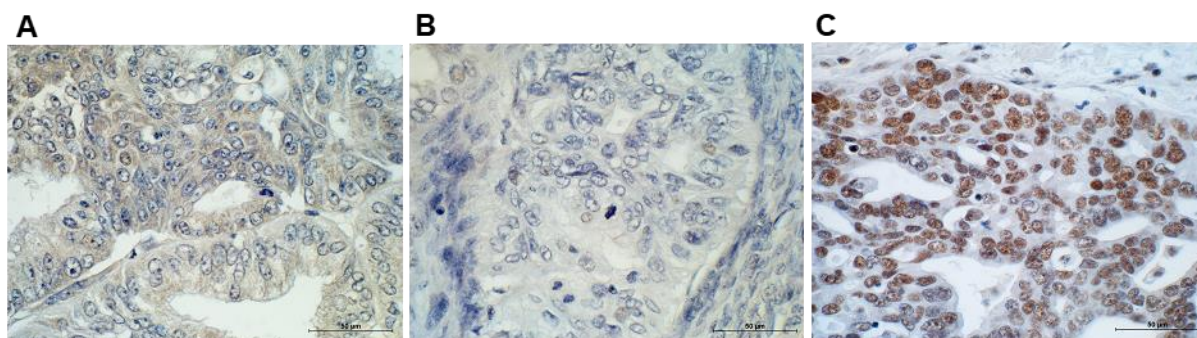
masie cząsteczkowej również około 85–90 kDa (rycina 16B). Najsilniejszy prążek wykazano w liniach komórkowych PEA1 i PEA2, chociaż był on również obecny w liniach komórkowych SKOV-3 i PEO23. We wszystkich tych liniach komórkowych wykryto również dodatkowy prążek poniżej, który może odpowiadać masie około 80–85 kDa. Ponadto w linii komórkowej PEA1 zaobserwowano bardzo słaby prążek o masie około 70–75 kDa.



Rycina 16. Analiza ekspresji białka IFI16 we frakcji cytoplazmatycznej (A) i jądrowej (B) izolowanych z linii komórkowych A2780, SKOV-3, OVCAR-3, PEA1, PEA2 i PEO23. Białka rozdzielono za pomocą żelu gradientowego (4–20%) i przeniesiono na membranę nitrocelulozową. Następnie białko wykrywano pierwszorzędowym przeciwciałem przeciwko IFI16 oraz przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z HRP. Przeciwciała przeciwko GADPH i kalneksynie zastosowano jako kontrolę dla frakcji cytoplazmatycznej, a przeciwciała przeciwko laminie B1 jako kontrolę dla frakcji jądrowej

Analiza immunohistochemiczna ekspresji IFI16 w tkankach raka jajnika

Immunohistochemiczną analizę ekspresji białka IFI16 przeprowadzono na tkankach nowotworowych pochodzących od pacjentek z rakiem jajnika. Przeanalizowano kilka przypadków endometrioidalnego, śluzowego i surowiczego raka jajnika w celu określenia ekspresji białka IFI16. Nie zaobserwowano żadnej ekspresji białka IFI16 w raku endometrioidalnym i śluzowym (rycina 17A, B). W raku surowiczym stwierdzono sygnał pochodzący z jądra komórkowego. Intensywność sygnału była zróżnicowana – od bardzo słabego do bardzo silnego (rycina 17C).



Rycina 17. Ekspresja białka IFI16 u pacjentki z gruczolakiem endometrioidalnym (brak ekspresji) (A), pacjentki z gruczolakiem śluzowym (brak ekspresji) (B) i pacjentki z gruczolakiem surowiczym (silna ekspresja jądrowa) (C). Skrawki wybarwiono kontrastowo hematoksyliną (kolor niebieski)

5. Dyskusja

Zdecydowana większość pacjentek z rozpoznaniem raka jajnika otrzymuje chemioterapię. Odpowiedź na leczenie chemioterapią pierwszego rzutu jest dobra. Tylko około 5% chorych rozpoczynających leczenie jest pierwotnie opornych na związki platyny. Problem w leczeniu raka jajnika stanowi lekooporność, która rozwija się po różnym czasie od zakończenia pierwszego rzutu chemioterapii¹¹⁵. W ostatnich dziesięcioleciach zostały odkryte i opisane różne przyczyny lekooporności. Najlepiej poznano i opisano mechanizmy związane z samymi komórkami nowotworowymi, a w szczególności z aktywnością transporterów błonowych aktywnie usuwających leki z komórek nowotworowych^{39,41,49}. W ostatnim czasie również coraz większą rolę w rozwoju oporności na leki cytotoksyczne przypisuje się mechanizmom związanym z tkanką nowotworową^{51,52}. Pomimo jednak znacznego postępu w rozumieniu zjawiska oporności na leki nadal nie wiemy, jak wszystkie poznane mechanizmy są regulowane i jak współdziałają.

W związku z powyższym w niniejszej pracy podjęto próbę poszerzenia wiedzy w zakresie lekooporności w raku jajnika. Jednym z podejść eksperymentalnych w poszukiwaniu nowych genów związanych z lekoopornością jest porównanie ekspresji genów pomiędzy liniami komórek nowotworowych wrażliwymi i opornymi na leki cytotoksyczne. Porównanie ekspresji genów metodą mikromacierzy pomiędzy linią wrażliwą A2780 a jej pochodnymi opornymi na leki cytotoksyczne wykazało zmianę w poziomie ekspresji około 20 genów dotychczas niekojarzonych z opornością na leczenie chemiczne¹¹⁶. Jednym z bardziej interesujących był gen *IFI16*, który ulegał zwiększonej ekspresji w liniach opornych na PAC i DOX. Ponieważ rola *IFI16* w rozwoju oporności na leki jest niedostatecznie opisana w literaturze, postanowiono zbadać ją bardziej szczegółowo.

Linie komórkową A2780 wyprowadzono z tkanki nowotworowej od nieleczzonej pacjentki z endometrioidalnym rakiem jajnika¹¹². Linia ta, ponieważ wykazuje dużą wrażliwość na niskie stężenia cytostatyków, stanowi dobry model do badania rozwoju lekooporności. Z tej linii dr hab. Radosław Januchowski wyprowadził linie komórkowe odporne na leki stosowane w chemioterapii raka jajnika⁴⁸.

Wyraźny wzrost poziomu transkryptu *IFI16* zaobserwowano w liniach komórkowych opornych na DOX i PAC. Ponieważ, jak wskazują dane literaturowe, białko IFI16 może być zlokalizowane zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrze komórkowym⁷⁹, przeprowadzono badanie ekspresji białka IFI16 z zastosowaniem immunofluorescencji oraz techniki Western

blot. Mimo że immunofluorescencja nie jest metodą ilościową, nie sposób nie zauważyć wysokiej korelacji jej wyników z q-PCR. W uzyskanych wynikach zaobserwowano dwa interesujące fakty:

1. W liniach komórkowych opornych na DOX białko IFI16 jest zlokalizowane w cytoplazmie i jądrze komórkowym, natomiast w liniach komórkowych opornych na PAC zdecydowanie dominuje lokalizacja jądrowa.

2. Nie stwierdzono różnic między poszczególnymi komórkami, co wskazuje, że ekspresja IFI16 jest porównywalna we wszystkich komórkach w obrębie danej linii komórkowej.

Według danych literaturowych białko IFI16 występuje w czterech izoformach, zlokalizowanych w różnych przedziałach komórkowych⁵⁸. W związku z tym przeprowadzono analizę ekspresji białka IFI16 we frakcji cytoplazmatycznej i jądrowej metodą Western blot. Uzyskane wyniki wyraźnie potwierdziły zwiększoną ekspresję białka IFI16 w lekoopornych liniach komórkowych. W liniach opornych na DOX obserwowano obecność białka zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrze komórkowym, natomiast w linii odpornej na PAC zdecydowanie dominowała lokalizacja jądrowa. Ze względu na małą różnicę masy cząsteczkowej między izoformami trudno było jednoznacznie określić, która izoforma molekularna jest dominująca. Zgodnie z doniesieniami najbardziej powszechnie występującą izoformą IFI16 w ludzkich fibroblastach, komórkach nabłonka i komórkach krwiotwórczych jest izoforma B, zbudowana z 729 aa, o masie cząsteczkowej około 82 kDa, chociaż izoforma A, zbudowana z 785 aa, o masie cząsteczkowej 88 kDa oraz izoforma C, zbudowana z 673 aa, o masie cząsteczkowej 76 kDa są również obecne¹¹⁷. Bardzo podobny rozkład izoform obserwowano w prawidłowym nabłonku gruczołu krokowego, z dominującą izoformą B⁶². Trzy różne prążki, prawdopodobnie reprezentujące izoformy A, B (silniejsze) i C (słabsze), były obecne w linii komórkowej fibroblastów WI-38. W pracy nie identyfikowano jednak poszczególnych izoform⁷⁵. Wyraźną obecność trzech prążków odpowiadających izoformom A, B i C i migrujących blisko siebie stwierdzono w linii komórkowej U2OS¹¹⁸. Jeszcze większą liczbę prążków wykazano w komórkach MTC po stymulacji szlaku JAK/STAT, co wskazuje na obecność dodatkowych izoform lub modyfikacji potranslacyjnych¹¹⁹. Jedną z modyfikacji potranslacyjnych, która prowadzi do zwiększenia masy białka, jest N-glikozylacja¹²⁰; w jej wyniku obserwuje się różny wzór migracji prążków w eksperymentach Western blot. W jednym z pierwszych badań opisujących trzy (A, B i C) izoformy IFI16 Johnstone i wsp. opisali N-glikozylację izoformy C (ale nie A i B), która spowodowała różną migrację prążków¹¹⁷. Podsumowując, w eksperymentach, w których były obecne trzy izoformy w obrazie Western blot, występowały

one bardzo blisko siebie. Odnosząc uzyskane wyniki do danych literaturowych, sformułowano następujące wnioski:

1. We frakcji cytoplazmatycznej obu linii komórkowych opornych na DOX obserwowano silny prążek odpowiadający masie cząsteczkowej około 85–90 kDa, reprezentujący prawdopodobnie izoformę 1 (IFI16A). Prążek ten był również obecny we frakcji jądrowej pochodzącej z obu linii komórkowych opornych na DOX.

2. Prążek odpowiadający masie cząsteczkowej około 75 kDa, który wydaje się podwójny, występował we frakcji cytoplazmatycznej i może reprezentować izoformę 3 (IFI16C) z różnym stopniem glikozylacji¹¹⁷. W przeciwieństwie do informacji wynikających z dostępnej literatury oba opisane powyżej prążki są wyraźnie rozgraniczone.

3. Między silnymi prążkami (izoformy A i C) widoczny jest bardzo słaby prążek, który może odpowiadać izoformie 2 (IFI16B).

4. W linii komórkowej odpornej na PAC – A2780PR1 – we frakcji cytoplazmatycznej obserwuje się podwójny prążek odpowiadający IFI16C, natomiast we frakcji jądrowej obecne są silne prążki odpowiadające izoformom 1 (IFI16A) i 3 (IFI16C). Te dwa prążki są oddzielone bardzo słabym prążkiem, który może odpowiadać izoformie 2 (IFI16B).

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdza się, że w opornych liniach komórkowych dominującymi izoformami wydają się izoformy A i C. W liniach opornych na DOX izoforma A jest zlokalizowana zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrze, podczas gdy izoforma C tylko w cytoplazmie. W linii komórkowej odpornej na PAC wyraźnie dominuje lokalizacja jądrowa, z podobną ekspresją izoform A i C. Wydaje się więc, że ekspresja izoform A i C ma związek z lekoopornością, natomiast ich lokalizacja komórkowa jest zależna od tego, na który lek komórki są odporne.

W poprzednich badaniach wykazano, że krótkotrwała stymulacja (do 72 godzin) wrażliwych linii komórkowych niskimi stężeniami leków cytotoksycznych prowadzi do zmiany poziomu ekspresji wielu genów oporności^{121,122,123,124,125,126,127}. Powyższe obserwacje sugerują, iż pierwotny kontakt z lekiem cytotoksycznym daje początek rozwijającej się na dalszym etapie leczenia lekooporności na cytostatyki. Aby dodatkowo potwierdzić rolę IFI16 w rozwoju lekooporności, podobny eksperyment przeprowadzono na linii komórkowej A2780, wrażliwej na leki. Stymulacja niskimi stężeniami DOX i PAC prowadziła do wzrostu ekspresji genu *IFI16*. Jako kontrolę wykorzystano gen *MDR1*, kodujący białko P-gp, najważniejsze białko odpowiedzialne za oporność na PAC i DOX⁴¹. Bardzo podobny wzrost ekspresji *MDR1* i *IFI16* po stymulacji DOX i PAC wskazuje, że w analizowanym modelu oba geny mogą brać udział w rozwoju lekooporności. Rzeczywiście oporność na DOX i PAC w badanych liniach

opornych jest głównie związana z nadekspresją *MDR1/P-gp*⁴⁸. Powyższy wynik dodatkowo sugeruje rolę ekspresji IFI16 w rozwoju lekooporności.

Dane literaturowe dotyczące roli IFI16 w rozwoju oporności na chemioterapię w raku jajnika są skąpe i niespójne. Rolę tę wydają się potwierdzać badania Ju i wsp., którzy zaobserwowali zwiększoną ekspresję *IFI16* w surowiczych guzach jajnika pierwotnie opornych na chemioterapię złożoną z karboplatyny i PAC w porównaniu z guzami wrażliwymi na te cytostatyki¹⁰⁴. W badaniu dotyczącym raka jajnika przeprowadzonym na pierwotnych hodowlach komórkowych pochodzących z surowiczego raka jajnika nie obserwowano różnic w ekspresji IFI16 między komórkami pochodzącymi z guzów chemiowrażliwych i chemioopornych. Ekspresja IFI16 w komórkach pochodzących z guzów wrażliwych obniżała się po inkubacji z karboplatiną, nie zmieniła się natomiast ekspresja w komórkach pochodzących z guzów opornych¹²⁸. W innych badaniach obniżenie ekspresji IFI16 po podaniu PAC stwierdzono w heteroprzeszczepie pochodzącym z linii komórkowej raka endometrioidalnego 1A9 wrażliwej na chemioterapię, ale nie obserwowano zmiany ekspresji IFI16 w heteroprzeszczepie pochodzącym z sublinii 1A9 odpornej na PAC. Co istotne, autorzy nie porównali poziomu ekspresji IFI16 między linią komórkową wrażliwą a linią oporną na PAC¹²⁹. Obniżenie ekspresji IFI16 w komórkach wrażliwych na cytostatyki po krótkim czasie ekspozycji na lek lub brak różnicy między komórkami wrażliwymi i opornymi^{128,129} nie pokrywa się z wynikami przedstawionymi w niniejszej pracy. Wy tłumaczeniem tej różnicy może być fakt, iż eksperymenty przebiegały w różnych warunkach doświadczalnych. W badaniach z karboplatiną komórki wyizolowane z guzów opornych w warunkach *in vivo* zostały przeniesione do hodowli komórkowej *in vitro*¹²⁸. Z kolei w badaniu z PAC komórki z hodowli komórkowej były przenoszone do modelu *in vivo*, gdzie tworzyły guzy¹²⁹. Warunki *in vitro* i *in vivo* to dwa odmienne środowiska wzrostu komórek nowotworowych, w których komórki mogą wytwarzać zupełnie odmienne mechanizmy oporności.

O ile uzyskane wyniki sugerują rolę IFI16 w rozwoju lekooporności, wyjaśnienie tej roli wydaje się znacznie trudniejsze, ponieważ białko IFI16 najprawdopodobniej nie ma w tym procesie bezpośredniego udziału, tak jak np. P-gp. Aby określić znaczenie zwiększonej ekspresji IFI16 w liniach opornych na leki cytotoksyczne, w pierwszej kolejności przeanalizowano ekspresję genów zaangażowanych w regulację ekspresji genu *IFI16* oraz dotychczas poznaną rolę fizjologiczną tego białka.

Wiadomo, że ekspresja IFI16 jest aktywowana przez interferony w wyniku stymulacji ścieżki sygnalizacyjnej JAK/STAT^{57,100,103}. Przeanalizowano więc wyniki uzyskane metodą mikromacierzy pod kątem zmian w ekspresji genów kodujących IFN- α , IFN- β i IFN- γ

między linią wrażliwą i liniami opornymi. Nie zaobserwowano jednak żadnych zmian w ekspresji tych genów. Nie odnotowano również żadnej różnicy w poziomie ekspresji genów kodujących receptory dla interferonów. Ponadto sprawdzono ekspresję genów związanych ze ścieżkami sygnalizacyjnymi interferonów: JAK i STAT. Tu również nie wykazano różnic w poziomie ekspresji genów między linią komórkową wrażliwą a liniami komórkowymi lekoopornymi.

W surowiczym raku jajnika o wysokim stopniu zróżnicowania (HGSOC) stymulacja IFN- γ prowadziła do skoordynowanej ekspresji genów *CXCL10*, *CXCL11* oraz *IFI16*¹⁰³. W związku z tym sprawdzono ekspresję wskazanych genów w badanych liniach komórkowych. Nie zaobserwowano jednak jakichkolwiek różnic między liniami komórkowymi opornymi i wrażliwymi. Z drugiej strony wiadomo, że IFI16 poprzez ścieżkę sygnalizacyjną STING-TBK1-IRF3 jest odpowiedzialny za stymulację ekspresji interferonów^{63,64,71}. Nie stwierdzono jednak żadnych zmian w poziomie ekspresji genów *STING*, *TBK1* i *IRF1-9* między liniami komórkowymi wrażliwymi na leki i opornymi.

Podsumowując, nie zaobserwowano żadnych różnic w ekspresji interferonów i genów związanych z interferonami pomiędzy linią wrażliwą i liniami opornymi na leki, w przeciwieństwie do bardzo dużych różnic w ekspresji genu *IFI16*. Wydaje się więc, że ekspresja IFI16 w badanych liniach komórkowych lekoopornych prawdopodobnie nie jest związana ze ścieżkami sygnalizacyjnymi interferonów.

W linii komórkowej raka gruczołu krokowego PC-3 ekspresja IFI16 była stymulowana przez androgeny⁶⁹. Obserwowano również bezpośrednią interakcję IFI16 z receptorem AR⁶⁹ i GR⁸². Sprawdzono zatem ekspresję genów kodujących receptory AR i GR. Nie odnotowano jednak żadnych zmian w ekspresji między liniami komórkowymi wrażliwą na leki i lekoopornymi. Podsumowując, regulacja ekspresji IFI16 przez hormony steroidowe prawdopodobnie również nie odgrywa roli w analizowanym modelu.

Aktywacja białka p53 przez kinazę ATM prowadzi do stabilizacji białka p53 i transkrypcji genów zależnych od p53, takich jak *p21*, *BAX*, *HDM2* i *IFI16*⁷⁶. Regulacja ekspresji IFI16 przez białko p53 została opisana w komórkach HT-29⁷⁴, w linii starzejących się ludzkich fibroblastów WI-38⁶¹ oraz w komórkach nabłonka gruczołu krokowego⁶². Według danych literaturowych gen *TP53* nie jest zmutowany w linii komórkowej A2780¹³⁰, a zatem białko p53 powinno być aktywne fizjologicznie. Dlatego też sprawdzono, czy ekspresja genów zależnych od p53 i samego genu *TP53* jest zmieniona w opornych na leki liniach komórkowych. Nie zaobserwowano jednak różnicy w poziomie ekspresji genu *TP53*, jak również genów regulowanych przez p53, takich jak *p21*, *BAX* i *HDM2*, pomiędzy linią

wrażliwą i liniami opornymi, w przeciwieństwie do znaczącej różnicy w ekspresji genu *IFI16*. Zatem ekspresja *IFI16* prawdopodobnie nie jest w analizowanym modelu regulowana przez szlak zależny od białka p53.

Podsumowując, w badanych opornych liniach komórkowych ekspresja *IFI16* prawdopodobnie nie jest regulowana przez znane fizjologiczne ścieżki sygnałowe.

Jedną z najważniejszych funkcji fizjologicznych białka IFI16 jest udział w procesie starzenia się komórek. Zatrzymanie wzrostu komórek powiązane z ich starzeniem się oraz wzrostem ekspresji IFI16 obserwowano w różnych systemach komórkowych^{61,62,86,88,131}. IFI16 odgrywa rolę w starzeniu się komórki i zatrzymaniu cyklu komórkowego na co najmniej trzech różnych poziomach: poprzez interakcję ze szlakiem sygnalizacyjnym p53-p21^{61,62,86,87}, interakcję ze szlakiem sygnalizacyjnym Rb-E2F^{61,62} oraz hamowanie aktywności i ekspresji telomerazy^{86,88}.

Wiadomo, że IFI16 oddziałuje z białkiem p53, co prowadzi do wzrostu ekspresji genów zależnych od p53, takich jak *p21*, w komórkach gruczołu krokowego, ludzkich fibroblastach, komórkach nabłonkowych i innych typach komórek^{61,62,87,132}. W podobny sposób nadekspresja IFI16 w liniach komórkowych raka piersi MCF-7 prowadziła do interakcji z białkiem p53 i wzrostu ekspresji genów *p21*, *HDM2*, *BAX*⁷⁶. Dodatkowo w komórkach nabłonka gruczołu krokowego zaobserwowano niezależną od białka p53 aktywację genu *p21* przez białko IFI16, a dokładnie przez izoformę B⁶². Jednak w badanych liniach komórkowych opornych pomimo wysokiego poziomu ekspresji IFI16 nie odnotowano żadnych zmian w ekspresji genów *p21*, *HDM2* czy *BAX*, co ponownie sugeruje brak oddziaływania z fizjologicznym szlakiem p53.

Białko Rb hamuje cykl komórkowy przez wiązanie czynników transkrypcyjnych E2F i hamowanie ekspresji genów fazy S niezbędnych do przejścia z fazy G1 do fazy S w trakcie cyklu komórkowego^{98,99}. Opisano bezpośrednie wiązanie się białka IFI16 z białkiem Rb¹¹⁷. Ponadto zwiększona ekspresja IFI16 hamowała transkrypcję genów zależnych od E2F1 i indukowała fenotyp charakterystyczny dla starzejących się komórek^{61,62}. Hamowanie transkrypcji zależnej od E2F1 prawdopodobnie wynika nie tylko z interakcji z białkiem Rb i wzmocnienia jego interakcji z czynnikiem E2F1, ale także z bezpośredniej interakcji z samym czynnikiem E2F1⁶². Ponieważ linia komórkowa A2780 zawiera funkcjonalne (niezmutowane) białko Rb¹³⁰, można było oczekiwać, że zwiększona ekspresja IFI16 w liniach opornych będzie prowadziła do interakcji IFI16 z białkiem Rb i zahamowaniu cyklu komórkowego. Nie obserwowano jednak różnic w szybkości proliferacji pomiędzy linią A2780 a liniami opornymi. Nie wykazano też różnic w poziomie ekspresji genów *RB1* oraz *E2F1-8* między badanymi liniami komórkowymi. Następnie porównano ekspresję genów zależnych od E2F1^{133,134}, takich

jak *CCNA1*, *CCNA2*, *CCNE1*, *CCNE2*, *PCNA*, *DHFR*, *CDC6*, między linią wrażliwą i liniami opornymi. Tu również nie zaobserwowano żadnych różnic. Uzyskane wyniki wskazują, że IFI16 prawdopodobnie nie jest zaangażowane w interakcję z białkami Rb i E2F1 w przedstawionym systemie eksperymentalnym.

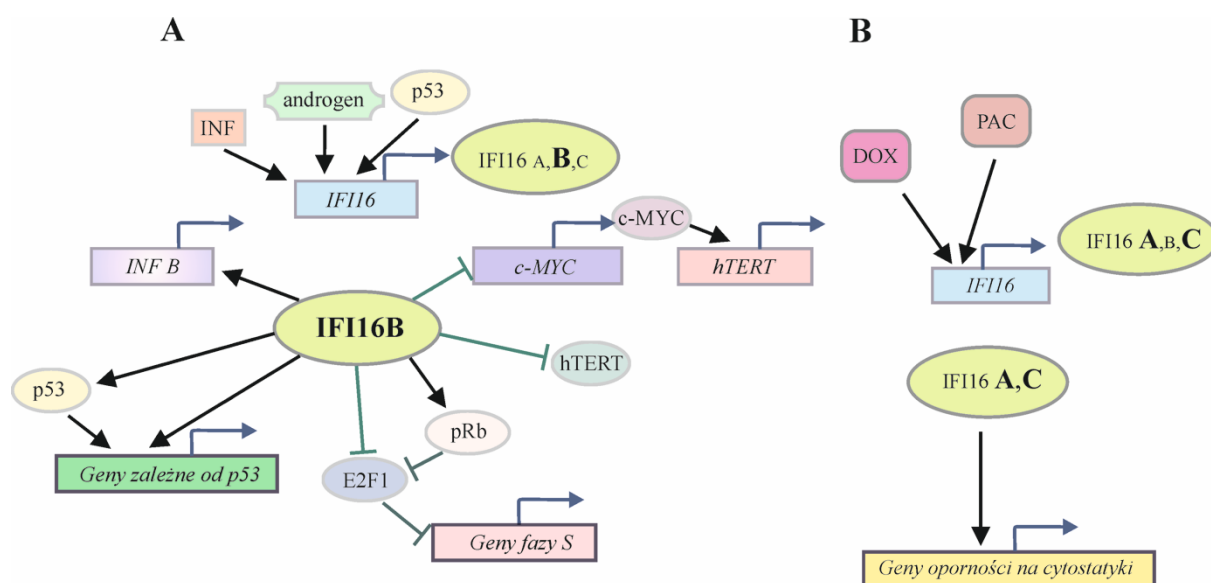
Nadekspresja IFI16 w linii komórkowej raka piersi MCF-7 skutkowała zmniejszeniem aktywności telomerazy w wyniku bezpośredniego wiązania IFI16 z hTERT⁸⁸. W komórkach HeLa wzrost ekspresji IFI16 prowadził do obniżenia ekspresji genu *hTERT* przez bezpośredni wpływ na gen *c-MYC*, który stymuluje ekspresję genu *hTERT*⁸⁶. W związku z tym sprawdzono również ekspresję genu *c-MYC* i *hTERT* w badanych wrażliwych i opornych na leki liniach komórkowych. Jednak poziom ekspresji tych genów w omawianych liniach komórkowych był również bardzo podobny, co wskazuje, że w liniach tych IFI16 prawdopodobnie nie reguluje ekspresji ani aktywności telomerazy.

Czynnik transkrypcyjny AP-1 jest krytyczny dla konstytutywnej i indukowanej interferonem ekspresji genu *IFI16*⁷². AP-1 to dimer tworzony przez białka c-JUN i c-FOS, a ekspresja obu jest również regulowana na poziomie transkrypcji¹³⁵. Porównanie ekspresji genów *c-JUN* i *c-FOS* w badanych liniach komórkowych nie wykazało różnic pomiędzy linią wrażliwą a liniami opornymi.

Podsumowując, przeanalizowano ekspresję wielu genów zaangażowanych w fizjologiczną rolę i szlaki regulacji ekspresji IFI16. Nie znaleziono jednak żadnej korelacji między ekspresją IFI16 i ekspresją badanych genów. Biorąc pod uwagę rolę IFI16 w „starzeniu się” komórki i zahamowaniu cyklu komórkowego, bardzo wysoki poziom ekspresji w liniach komórek lekoopornych powinien skutkować całkowitym zablokowaniem podziału komórek. Tymczasem nie zaobserwowano żadnej różnicy w proliferacji komórek między badanymi liniami komórkowymi. Zatem rola IFI16 w rozwoju oporności na leki w badanym modelu odzwierciedla prawdopodobnie nowy, nieopisany dotychczas mechanizm. Pytanie brzmi, czy nowa rola IFI16 w lekooporności wynika z ekspresji różnych izoform IFI16 między poszczególnymi liniami komórkowymi. W związku z tym przeanalizowano odnośne artykuły i zauważono, że w większości prac występują trzy izoformy IFI16^{61,62,69,71,75,76,117,118,119,132}, z dominującą w większości przypadków ekspresją izoformy B^{62,71,75,76,119,136}. Także w badaniach funkcjonalnych opisujących oddziaływanie IFI16 z innymi białkami zastosowano wyłącznie nadekspresję izoformy B^{61,62,69,86,88}. W przeciwieństwie do opisanych badań, w przedstawionych tu eksperymentach zaobserwowano głównie zwiększoną ekspresję izoform A i C. Można zatem postawić hipotezę, że brak aktywacji znanych szlaków sygnałowych powiązanych z IFI16 w zaprezentowanych

badaniach może wynikać z braku izoformy B. Z drugiej strony wydaje się, że rozwój lekooporności związany jest ze zwiększoną ekspresją izoform A i C. Lokalizacja komórkowa obu izoform zależy natomiast od tego, na który lek komórki są odporne. Można postawić hipotezę, że w zależności od lokalizacji komórkowej izoform białka IFI16 aktywowane są różne mechanizmy obronne komórek nowotworowych. Z drugiej strony wydaje się, że brak klasycznej izoformy B pozwala komórkom nowotworowym „normalnie funkcjonować”.

Rycina 18 podsumowuje rolę poszczególnych izoform białka IFI16 w regulacji ekspresji genów i szlaków sygnałowych w komórce.



Rycina 18. Podsumowanie roli izoform IFI16 w regulacji ekspresji genów i szlaków sygnałowych w komórce.

A: W różnych komórkach ekspresja genu *IFI16* jest regulowana przez odmienne białka/ścieżki sygnalizacyjne. Wśród najważniejszych należy wymienić interferony, androgeny oraz białko p53. Spośród trzech izoform, które mogą ulegać ekspresji, dominująca jest izoforma B. IFI16B jako czujnik wolnego DNA w komórce reguluje ekspresję interferonu β . Inna rola IFI16B polega na zahamowaniu cyklu komórkowego związanego ze starzeniem się komórek. IFI16 indukuje ekspresję genów zależnych od p53 przez wzmocnienie działania białka p53 oraz bezpośrednio indukując ekspresję genów zależnych od p53; IFI16 wzmacnia działanie białka pRb na czynnik E2F1 oraz bezpośrednio hamuje aktywność czynnika transkrypcyjnego E2F1, blokując ekspresję genów fazy S cyklu komórkowego; IFI16 hamuje aktywność telomerazy bezpośrednio oraz przez hamowanie ekspresji genu *c-MYC*, hamując w ten sposób ekspresję genu *hTERT*. **B:** Ekspresja izoform A i C wydaje się być regulowana przez leki cytotoksyczne. Ponieważ IFI16 nie jest białkiem oporności, jego rola w oporności na leki cytotoksyczne polega prawdopodobnie na regulacji ekspresji genów oporności

Druga część badań dotyczyła ekspresji IFI16 w liniach komórkowych raka jajnika pochodzących z różnych typów histologicznych oraz tkance raka jajnika. W celu porównania ekspresji między poszczególnymi liniami komórkowymi jako bazową wykorzystano linię

komórkową A2780. Nieznaczny wzrost poziomu ekspresji obserwowano w linii komórkowej surowiczego raka jajnika o niskim stopniu złośliwości – PEO23. Bardzo istotny wzrost poziomu ekspresji *IFI16* stwierdzono natomiast w liniach SKOV-3, PEA1 i PEA2. SKOV-3 jest linią wyizolowaną z komórek pochodzących z płynu po paracentezie u pacjentki z surowiczym rakiem jajnika¹¹². PEA1 i PEA2 zdefiniowane zostały jako HGSOE; wyizolowano je od tej samej pacjentki: PEA1 z komórek pochodzących z wysięku opłucnowego przed chemioterapią, natomiast PEA2 z komórek pochodzących z płynu po paracentezie, ale po zastosowanej wcześniej chemioterapii¹¹³. Podobny poziom ekspresji *IFI16* w obu liniach może wynikać z pochodzenia od tej samej pacjentki. Poziom ekspresji *IFI16* w innej linii komórkowej HGSOE – OVCAR-3 – był podobny do odnotowanego w linii A2780. Poziom ekspresji nie wydaje się więc korelować z pochodzeniem komórek. Porównując wyniki q-PCR z wynikami immunofluorescencji, można stwierdzić, że siła sygnału fluorescencyjnego koreluje z wynikami q-PCR. Wykazano jednak bardzo duże różnice w sygnale fluorescencji między komórkami w tej samej linii komórkowej (SKOV-3, PEA1, PEA2 i PEO23). Inny poziom ekspresji prawdopodobnie nie wynikał ze różnicowania komórek, ponieważ linie komórkowe PEA1, PEA2 i PEO23 zakupiono w krótkim czasie przed wykonaniem eksperymentów i wszystkie komórki w obrębie linii powinny być funkcjonalnie i morfologicznie identyczne. O ile morfologia wszystkich komórek w obrębie linii komórkowej wydaje się identyczna, o tyle różny poziom ekspresji *IFI16* wskazuje na różnice w fizjologii komórek. Zatem pytanie brzmi, dlaczego komórki w tej samej linii komórkowej cechuje różny poziom ekspresji *IFI16*. Uzyskanie odpowiedzi będzie wymagało bardziej szczegółowych badań.

Analiza wyników Western blot wskazuje na wysoką korelację między poziomem ekspresji białka i transkryptu z dominującą lokalizacją jądrową. Tylko w linii PEA1 prążek odpowiadający izoformie A białka *IFI16* był obecny we frakcji cytoplazmatycznej. W liniach PEA1, PEA2, SKOV-3 i PEO23 dominująca była izoforma A, obserwowano też jednak słabszy prążek odpowiadający izoformie B. W przeciwieństwie do omawianych wcześniej linii opornych, prążek odpowiadający izoformie C był prawie niewidoczny. Ponieważ ekspresję *IFI16* w raku jajnika badano tylko na poziomie transkryptu, nie można było porównać uzyskanych wyników z rezultatami dotyczącymi innych linii komórkowych raka jajnika czy tkanek raka jajnika^{103,128,129,137}. Wyniki z innych linii komórek nowotworowych odzwierciedlają jednak dominację ekspresji izoformy B^{118,119}.

Analiza immunohistochemiczna wskazuje na ekspresję białka *IFI16* w niektórych typach histologicznych raka jajnika. W przypadku podtypów endometrioidalnego i śluzowego

nie zaobserwowano jakiegokolwiek ekspresji białka IFI16. Nie badano ekspresji w linii komórkowej pochodzącej ze śluzowego raka jajnika, jednak brak ekspresji w podtypie endometrioidalnym odpowiada brakowi ekspresji w linii komórkowej A2780. Silną jądrową ekspresję białka IFI16 stwierdzono natomiast w tkance raka surowiczego. Podobnie jednak jak w liniach komórkowych, tutaj również obserwowano zróżnicowany poziom ekspresji IFI16 pomiędzy komórkami – od bardzo silnej do bardzo słabej.

Trudno odnieść wyniki uzyskane metodą immunohistochemiczną w małej grupie pacjentów do wyników innych autorów. Zarówno Cardenas i wsp.¹⁰³, jak i Ju i wsp.¹⁰⁴ badali ekspresję IFI16 w tkankach raka jajnika, ale na poziomie transkryptu, uzyskując odmienną korelację z progresją choroby. W obu badaniach źródłem RNA były nie tylko komórki nowotworowe, ale również inne komórki znajdujące się w guzie. Nie można więc bezpośrednio porównać tych wyników z wynikami badań immunohistochemicznych. W badaniach prowadzonych na innych nowotworach obserwowano korelację zarówno pomiędzy utratą ekspresji IFI16 i progresją choroby (rak piersi⁷⁶, rak gruczołu krokowego^{62,73}, rak głowy i szyi¹⁰⁵, kostniakomięsak¹⁰⁸), jak i pomiędzy wzrostem ekspresji IFI16 i progresją choroby (rak macicy¹⁰⁹, trzustki¹¹⁰, jądra¹¹¹). Były to jednak badania prowadzone metodą immunohistochemiczną i/lub na poziomie ekspresji RNA. Żadne z nich nie identyfikowało poszczególnych izoform IFI16. Nie wiadomo więc, czy odmienna rola IFI16 w różnych nowotworach wynika z ekspresji różnych izoform tego białka. Zweryfikowanie roli białka IFI16 w raku jajnika, w tym w różnych typach histologicznych, wymaga przeprowadzenia badań immunohistochemicznych w dużej grupie pacjentek oraz zestawienia uzyskanych wyników z danymi klinicznymi. By dokładnie ustalić rolę IFI16 w raku jajnika, należy wykonać badania metodami biologii molekularnej w celu zidentyfikowania izoform białka, które ulegają ekspresji.

Podsumowanie wyników

1. W liniach komórkowych raka jajnika opornych na DOX i PAC zaobserwowano wzrost poziomu transkryptu *IFI16* oraz wzrost poziomu białka IFI16.

2. W badanych opornych liniach komórkowych dominującymi izoformami były izoformy A i C. W liniach opornych na DOX izoforma A została zlokalizowana zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrze komórkowym, podczas gdy izoforma C tylko w cytoplazmie. W linii komórkowej odpornej na PAC dominuje lokalizacja jądrowa, z podobną ekspresją izoform A i C.

3. Poziom ekspresji *IFI16* w linii wrażliwej wzrasta po stymulacji DOX i PAC, podobnie jak poziom *MDR1*.

4. Nie zaobserwowano związku między ekspresją *IFI16* i ekspresją genów zaangażowanych w fizjologiczną rolę i szlaki regulacji ekspresji *IFI16*.

5. Wykazano zróżnicowany poziom ekspresji genu i białka *IFI16* w liniach raka jajnika o różnym pochodzeniu histologicznym. Najwyższy poziom ekspresji stwierdzono w liniach surowiczego raka jajnika PEA1, PEA2 oraz SKOV-3.

6. Ekspresję *IFI16* obserwowano w tkance surowiczego raka jajnika, nie występowała ona natomiast w tkance endometrioidalnego ani śluzowego raka jajnika.

7. W liniach komórkowych raka jajnika dominowała lokalizacja jądrowa oraz ekspresja izoformy A.

6. Wnioski

1. Wzrost ekspresji IFI16 w liniach komórkowych raka jajnika może być związany z rozwojem oporności na doksorubicynę i paklitaksel.

2. Wydaje się, że ekspresja izoform A i C ma związek z lekoopornością, natomiast ich lokalizacja komórkowa zależy od tego, na który lek komórki są odporne.

3. Wzrost ekspresji *IFI16* w linii wrażliwej po krótkotrwałej ekspozycji na niewielkie stężenia cytostatyków potwierdza jego rolę w rozwoju oporności.

4. Brak aktywacji znanych szlaków sygnałowych powiązanych z IFI16 w niniejszych badaniach może wynikać z braku izoformy B. Rola IFI16 w rozwoju oporności na leki w przedstawionym modelu prawdopodobnie wiąże się z obecnością izoform A i C i jest nowym, nieopisanym dotychczas zjawiskiem.

5. Ekspresja w większości linii surowiczego raka jajnika oraz w tkance surowiczego raka jajnika sugeruje związek IFI16 z tym typem histologicznym.

6. W przeciwieństwie do większości innych badań na liniach komórek nowotworowych, w których dominowała izoforma B, w liniach komórkowych raka jajnika dominuje izoforma A, co sugeruje odmienną rolę białka IFI16 w tym nowotworze.

Podsumowując, uzyskane wyniki sugerują rolę IFI16 w rozwoju lekooporności. Białko IFI16 najprawdopodobniej nie ma w tym procesie bezpośredniego udziału, tak jak np. P-gp. Dlatego wyjaśnienie jego roli wydaje się znacznie trudniejsze i wymaga dalszych, bardziej szczegółowych badań.

Streszczenie

Analiza ekspresji IFI16 w raku jajnika i w oporności na leki cytotoksyczne

Rak jajnika to jeden z największych problemów w ginekologii onkologicznej. Pomimo postępów w leczeniu chirurgicznym i systemowym przeżywalność w raku jajnika jest nadal niska. Jedną z głównych przyczyn niskiej skuteczności leczenia stanowi pierwotna lub rozwijająca się w trakcie leczenia oporność na chemioterapię. Choć poznano bardzo wiele białek i mechanizmów biorących udział w tym procesie, wciąż jeszcze nie do końca wiadomo, jak te mechanizmy są regulowane. Jednym z nowych genów regulujących oporność na chemioterapię wydaje się *IFI16*.

IFI16 jest białkiem cytoplazmatyczno-jądrowym biorącym udział w odpowiedzi na wirusowe DNA oraz w hamowaniu cyklu komórkowego związanym ze starzeniem się komórek. Oba procesom towarzyszy ekspresja izoformy B. Rola izoform A i C jest natomiast bardzo słabo poznana.

Celem badań było określenie roli genu i białka IFI16 w rozwoju oporności na chemioterapię w raku jajnika oraz ustalenie ekspresji IFI16 w liniach komórkowych i tkankach raka jajnika pochodzących z różnych typów histologicznych.

Badania przeprowadzono na linii raka jajnika wrażliwej na chemioterapię (A2780) oraz jej pochodnych opornych na doksorubicynę (DOX) i paklitaksel (PAC), jak również na liniach komórkowych i tkankach raka jajnika o różnym pochodzeniu histologicznym. Poziom ekspresji mRNA badano metodą łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym. Poziom ekspresji białka we frakcji jądrowej i cytoplazmatycznej określano techniką Western blot. Ekspresję białka w liniach komórkowych badano metodą immunofluorescencji, a w tkankach nowotworowych metodą immunohistochemiczną.

W liniach komórkowych raka jajnika opornych na DOX i PAC zaobserwowano wzrost poziomu transkryptu *IFI16* oraz wzrost poziomu białka IFI16. Dominujące były izoformy A i C, natomiast ekspresja izoformy B była obecna w śladowych ilościach. W liniach opornych na DOX dominowała lokalizacja cytoplazmatyczna, a w linii odpornej na PAC – lokalizacja jądrowa białka IFI16. Krótkotrwała ekspozycja linii wrażliwej na DOX i PAC prowadziła do wzrostu poziomu ekspresji IFI16. Analiza ekspresji IFI16 w różnych typach histologicznych raka jajnika wskazuje na ekspresję przede wszystkim w surowiczych rakach jajnika,

z przeważającą ekspresją izoformy A. Nie wykazano zależności pomiędzy ekspresją genu *IFI16* a ekspresją genów powiązanych z dotychczas poznaną fizjologiczną rolą tego białka.

Uzyskane wyniki sugerują związek ekspresji IFI16 z rozwojem oporności na cytostatyki w liniach komórkowych raka jajnika. Brak aktywacji dotychczas poznanych szlaków sygnałowych związanych z IFI16 wynika prawdopodobnie z braku ekspresji izoformy B. Izoformami, które odgrywają rolę w powstawaniu chemiooporności, są najprawdopodobniej izoformy A i C. Ponieważ IFI16 nie jest białkiem oporności na cytostatyki, jego rola polega prawdopodobnie na regulacji ekspresji innych genów związanych z opornością na chemioterapię.

Summary

Analysis of IFI16 expression in ovarian cancer and in resistance to cytotoxic drugs

Ovarian cancer is among the biggest problems in oncological gynecology. Despite the advances in the surgical and systemic treatment, the survival rate in ovarian cancer still remains low. Resistance to chemotherapy – primary or developing during treatment – is one of the main reasons for the low treatment effectiveness. Although numerous proteins and mechanisms involved in this process are already known, it is still not fully understood how these mechanisms are regulated. One of the new genes regulating resistance to chemotherapy seems to be *IFI16*.

IFI16 is a cytoplasmic and nuclear protein involved in the response to viral DNA and in cell cycle inhibition associated with cell aging. Both processes are related to the expression of the B isoform. Very little is known, however, about the role of the A and C isoforms.

The aim of the study was to determine the role of the IFI16 gene and protein in the development of resistance to chemotherapy in ovarian cancer and to verify IFI16 expression in ovarian cancer cell lines and in tissues from various histological types.

The investigation was performed with a chemotherapy sensitive ovarian cancer line (A2780) and its derivatives resistant to doxorubicin (DOX) and paclitaxel (PAC), as well as with ovarian cancer cell lines and tissues of different histological origin. The mRNA expression level was tested with real-time polymerase chain reaction. The level of protein expression in the nuclear and cytoplasmic fractions was assessed by using the Western blot technique. Protein expression in cell lines was evaluated with immunofluorescence, and that in tumor tissues with immunohistochemistry.

In ovarian cancer cell lines resistant to DOX and PAC, an increase in the level of the *IFI16* transcript and an increase in the level of the IFI16 protein were observed. Isoforms A and C were dominant, while isoform B expression was present in trace amounts. Cytoplasmic localization of the IFI16 protein dominated in the DOX-resistant lines; nuclear localization dominated in the PAC-resistant line. A short-term exposure of the DOX- and PAC-sensitive line led to an increase in IFI16 expression. The analysis of IFI16 expression in various histological types of ovarian cancer indicates the expression mainly in serous ovarian cancers, with predominant expression of isoform A. There was no correlation between the expression of the *IFI16* gene and that of genes related to the so far known physiological role of this protein.

The obtained results suggest a relationship between IFI16 expression and the development of resistance to cytostatics in ovarian cancer cell lines. The lack of activation of the known signaling pathways associated with IFI16 is probably due to the lack of isoform B expression. These are most likely the A and C isoforms that play a role in the development of chemoresistance. Since IFI16 is not a chemotherapy resistance protein, its role probably consists in regulating the expression of other genes associated with chemotherapy resistance.

Piśmiennictwo

1. Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr/>)[©], International Agency for Research on Cancer 2020. Estimated number of incident cases worldwide, females, all ages. Graph production (2018).
2. GLOBOCAN. Estimated number of deaths worldwide, females, all ages (2018).
3. Wojciechowska, U., Czaderny, K., Ciuba, A., Olasek, P. & Didkowska, J. *Nowotwory złośliwe w Polsce w 2016 roku*. Warszawa (2016).
4. GLOBOCAN. Estimated age-standardized incidence and mortality rates (world) in 2018, worldwide, females, all ages (2018).
5. Husseinzadeh, N., Chen, L.-M. & Karlan, B. Y. Early detection and risk reduction for familial gynecologic cancers. *Clin. Obstet. Gynecol.* **41**, 200–214 (1998). *J. Womens Health* **7**, 1056–1057 (1998).
6. Lynch, H. T. & de la Chapelle, A. Hereditary colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **348**, 919–932 (2003).
7. Whiteman, D. C., Siskind, V., Purdie, D. M. & Green, A. C. Timing of pregnancy and the risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **12**, 42–46 (2003).
8. Folsom, A. R., Anderson, J. P. & Ross, J. A. Estrogen replacement therapy and ovarian cancer. *Epidemiol. Camb. Mass* **15**, 100–104 (2004).
9. Vo, C. & Carney, M. E. Ovarian cancer hormonal and environmental risk effect. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* **34**, 687–700, viii (2007).
10. Chew, S., Tham, K. F. & Ratnam, S. S. A series of ovarian clear cell and endometrioid carcinoma and their association with endometriosis. *Singapore Med. J.* **38**, 289–291 (1997).
11. Schorge, J. O. *et al.* SGO White Paper on ovarian cancer: etiology, screening and surveillance. *Gynecol. Oncol.* **119**, 7–17 (2010).
12. Prentice, R. L. *et al.* Low-fat dietary pattern and cancer incidence in the Women's Health Initiative Dietary Modification Randomized Controlled Trial. *J. Natl. Cancer Inst.* **99**, 1534–1543 (2007).
13. Brun, J. L. *et al.* Long-term results and prognostic factors in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **78**, 21–27 (2000).

14. Ries, L. A. Ovarian cancer. Survival and treatment differences by age. *Cancer* **71**, 524–529 (1993).
15. Hoskins, P. J. & Le, N. Identifying patients unlikely to benefit from further chemotherapy: a descriptive study of outcome at each relapse in ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **97**, 862–869 (2005).
16. Boyle, P., La Vecchia, C. & Walker, A. Annual report on the results of treatment in gynecological cancer. *J. Epidemiol. Biostat. Ed.* **6** (2001).
17. Manys, G. Czynniki prognostyczne w raku jajnika. W: Markowska, J. (red.), *Ginekologia onkologiczna*. Urban & Partner, Wrocław, 847–855 (2006).
18. Nasierowska-Guttmejer, A. & Górnicka, B. *Zalecenia do diagnostyki histopatologicznej nowotworów*. Centrum Onkologii, Oddział Gliwice, Polskie Towarzystwo Patologów (2013).
19. Ramalingam, P. Morphologic, immunophenotypic, and molecular features of epithelial ovarian cancer. *Oncol. Williston Park N.* **30**, 166–176 (2016).
20. Storey, D. J. *et al.* Endometrioid epithelial ovarian cancer: 20 years of prospectively collected data from a single center. *Cancer* **112**, 2211–2220 (2008).
21. Kurman, R. J. & Shih, I.-M. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am. J. Surg. Pathol.* **34**, 433–443 (2010).
22. Fukunaga, M., Nomura, K., Ishikawa, E. & Ushigome, S. Ovarian atypical endometriosis: its close association with malignant epithelial tumours. *Histopathology* **30**, 249–255 (1997).
23. Cai, K. Q. *et al.* Microsatellite instability and alteration of the expression of hMLH1 and hMSH2 in ovarian clear cell carcinoma. *Hum. Pathol.* **35**, 552–559 (2004).
24. Köbel, M. *et al.* Differences in tumor type in low-stage versus high-stage ovarian carcinomas. *Int. J. Gynecol. Pathol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Pathol.* **29**, 203–211 (2010).
25. Zaino, R. J. *et al.* Advanced stage mucinous adenocarcinoma of the ovary is both rare and highly lethal: a Gynecologic Oncology Group study. *Cancer* **117**, 554–562 (2011).
26. Zheng, R. & Heller, D. S. Borderline Brenner tumor: a review of the literature. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **143**, 1278–1280 (2019).
27. Cho, K. R. & Shih, I.-M. Ovarian cancer. *Annu. Rev. Pathol.* **4**, 287–313 (2009).
28. Szyfelbein, W. M., Young, R. H. & Scully, R. E. Struma ovarii simulating ovarian tumors of other types. A report of 30 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* **19**, 21–29 (1995).
29. Malpica, A. *et al.* Grading ovarian serous carcinoma using a two-tier system. *Am. J. Surg. Pathol.* **28**, 496–504 (2004).

30. Kaldawy, A. *et al.* Low-grade serous ovarian cancer: a review. *Gynecol. Oncol.* **143**, 433–438 (2016).
31. Gershenson, D. M. *et al.* Recurrent low-grade serous ovarian carcinoma is relatively chemoresistant. *Gynecol. Oncol.* **114**, 48–52 (2009).
32. Bolton, K. L. *et al.* Association between BRCA1 and BRCA2 mutations and survival in women with invasive epithelial ovarian cancer. *JAMA* **307**, 382–390 (2012).
33. Bookman, M. A. First-line chemotherapy in epithelial ovarian cancer. *Clin. Obstet. Gynecol.* **55**, 96–113 (2012).
34. Elattar, A., Bryant, A., Winter-Roach, B. A., Hatem, M. & Naik, R. Optimal primary surgical treatment for advanced epithelial ovarian cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD007565 (2011).
35. Stuart, G. C. E. *et al.* 2010 Gynecologic Cancer InterGroup (GCIG) consensus statement on clinical trials in ovarian cancer: report from the Fourth Ovarian Cancer Consensus Conference. *Int. J. Gynecol. Cancer Off. J. Int. Gynecol. Cancer Soc.* **21**, 750–755 (2011).
36. Bookman, M. A. *et al.* Harmonising clinical trials within the Gynecologic Cancer InterGroup: consensus and unmet needs from the Fifth Ovarian Cancer Consensus Conference. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **28**, viii30–viii35 (2017).
37. Vergote, I. *et al.* Neoadjuvant chemotherapy or primary surgery in stage IIIC or IV ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* **363**, 943–953 (2010).
38. Vergote, I. *et al.* Neoadjuvant chemotherapy versus debulking surgery in advanced tubo-ovarian cancers: pooled analysis of individual patient data from the EORTC 55971 and CHORUS trials. *Lancet Oncol.* **19**, 1680–1687 (2018).
39. Zahreddine, H. & Borden, K. L. B. Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Front. Pharmacol.* **4**, 28 (2013).
40. Kehoe, S. *et al.* Primary chemotherapy versus primary surgery for newly diagnosed advanced ovarian cancer (CHORUS): an open-label, randomised, controlled, non-inferiority trial. *Lancet Lond. Engl.* **386**, 249–257 (2015).
41. Fletcher, J. I., Haber, M., Henderson, M. J. & Norris, M. D. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 147–156 (2010).
42. Fletcher, J. I., Williams, R. T., Henderson, M. J., Norris, M. D. & Haber, M. ABC transporters as mediators of drug resistance and contributors to cancer cell biology. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* **26**, 1–9 (2016).
43. Gottesman, M. M., Fojo, T. & Bates, S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 48–58 (2002).

44. Choi, C.-H. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell Int.* **5**, 30 (2005).
45. Robey, R. W., Polgar, O., Deeken, J., To, K. W. & Bates, S. E. ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance. *Cancer Metastasis Rev.* **26**, 39–57 (2007).
46. Ozben, T. Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. *FEBS Lett.* **580**, 2903–2909 (2006).
47. Januchowski, R., Wojtowicz, K., Sujka-Kordowska, P., Andrzejewska, M. & Zabel, M. MDR gene expression analysis of six drug-resistant ovarian cancer cell lines. *BioMed Res. Int.* **2013**, 241763 (2013).
48. Januchowski, R. *et al.* Analysis of MDR genes expression and cross-resistance in eight drug resistant ovarian cancer cell lines. *J. Ovarian Res.* **9**, 65 (2016).
49. Pan, S.-T., Li, Z.-L., He, Z.-X., Qiu, J.-X. & Zhou, S.-F. Molecular mechanisms for tumour resistance to chemotherapy. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **43**, 723–737 (2016).
50. Jain, R. K. Determinants of tumor blood flow: a review. *Cancer Res.* **48**, 2641–2658 (1988).
51. Correia, A. L. & Bissell, M. J. The tumor microenvironment is a dominant force in multidrug resistance. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* **15**, 39–49 (2012).
52. Cho, A., Howell, V. M. & Colvin, E. K. The extracellular matrix in epithelial ovarian cancer – a piece of a puzzle. *Front. Oncol.* **5**, 245 (2015).
53. Morin, P. J. Drug resistance and the microenvironment: nature and nurture. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* **6**, 169–172 (2003).
54. Gariglio, M., Mondini, M., De Andrea, M. & Landolfo, S. The multifaceted interferon-inducible p200 family proteins: from cell biology to human pathology. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* **31**, 159–172 (2011).
55. Cridland, J. A. *et al.* The mammalian PYHIN gene family: phylogeny, evolution and expression. *BMC Evol. Biol.* **12**, 140 (2012).
56. Jakobsen, M. R. & Paludan, S. R. IFI16: at the interphase between innate DNA sensing and genome regulation. *Cytokine Growth Factor Rev.* **25**, 649–655 (2014).
57. Trapani, J. A. *et al.* A novel gene constitutively expressed in human lymphoid cells is inducible with interferon-gamma in myeloid cells. *Immunogenetics* **36**, 369–376 (1992).
58. Trapani, J. A., Dawson, M., Apostolidis, V. A. & Browne, K. A. Genomic organization of IFI16, an interferon-inducible gene whose expression is associated with human myeloid cell differentiation: correlation of predicted protein domains with exon organization. *Immunogenetics* **40**, 415–424 (1994).

59. Gariglio, M. *et al.* Immunohistochemical expression analysis of the human interferon-inducible gene IFI16, a member of the HIN200 family, not restricted to hematopoietic cells. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* **22**, 815–821 (2002).
60. Wei, W. *et al.* Expression of IFI 16 in epithelial cells and lymphoid tissues. *Histochem. Cell Biol.* **119**, 45–54 (2003).
61. Xin, H., Pereira-Smith, O. M. & Choubey, D. Role of IFI 16 in cellular senescence of human fibroblasts. *Oncogene* **23**, 6209–6217 (2004).
62. Xin, H., Curry, J., Johnstone, R. W., Nickoloff, B. J. & Choubey, D. Role of IFI 16, a member of the interferon-inducible p200-protein family, in prostate epithelial cellular senescence. *Oncogene* **22**, 4831–4840 (2003).
63. Choubey, D. & Panchanathan, R. IFI16, an amplifier of DNA-damage response: role in cellular senescence and aging-associated inflammatory diseases. *Ageing Res. Rev.* **28**, 27–36 (2016).
64. Choubey, D., Deka, R. & Ho, S. Interferon-inducible IFI16 protein in human cancers and autoimmune diseases. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **13**, 598–608 (2008).
65. Li, T., Diner, B. A., Chen, J. & Cristea, I. M. Acetylation modulates cellular distribution and DNA sensing ability of interferon-inducible protein IFI16. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 10558–10563 (2012).
66. Albrecht, M., Choubey, D. & Lengauer, T. The HIN domain of IFI-200 proteins consists of two OB folds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **327**, 679–687 (2005).
67. Choubey, D. *et al.* Interferon-inducible p200-family proteins as novel sensors of cytoplasmic DNA: role in inflammation and autoimmunity. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* **30**, 371–380 (2010).
68. Dell’Oste, V. *et al.* The interferon-inducible DNA-sensor protein IFI16: a key player in the antiviral response. *New Microbiol.* **38**, 5–20 (2015).
69. Alimirah, F., Chen, J., Xin, H. & Choubey, D. Androgen receptor auto-regulates its expression by a negative feedback loop through upregulation of IFI16 protein. *FEBS Lett.* **580**, 1659–1664 (2006).
70. Stark, G. R., Kerr, I. M., Williams, B. R., Silverman, R. H. & Schreiber, R. D. How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 227–264 (1998).
71. Unterholzner, L. *et al.* IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat. Immunol.* **11**, 997–1004 (2010).

72. Clarke, C. J. P. *et al.* Critical role of the transcription factor AP-1 for the constitutive and interferon-induced expression of IFI 16. *J. Cell. Biochem.* **89**, 80–93 (2003).
73. Alimirah, F., Chen, J., Davis, F. J. & Choubey, D. IFI16 in human prostate cancer. *Mol. Cancer Res. MCR* **5**, 251–259 (2007).
74. McKay, B. C. *et al.* Regulation of ultraviolet light-induced gene expression by gene size. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 6582–6586 (2004).
75. Song, L. L., Alimirah, F., Panchanathan, R., Xin, H. & Choubey, D. Expression of an IFN-inducible cellular senescence gene, IFI16, is up-regulated by p53. *Mol. Cancer Res. MCR* **6**, 1732–1741 (2008).
76. Fujiuchi, N. *et al.* Requirement of IFI16 for the maximal activation of p53 induced by ionizing radiation. *J. Biol. Chem.* **279**, 20339–20344 (2004).
77. Ni, Z. & Bremner, R. Brahma-related gene 1-dependent STAT3 recruitment at IL-6-inducible genes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **178**, 345–351 (2007).
78. Zheng, P.-Z. *et al.* Systems analysis of transcriptome and proteome in retinoic acid/arsenic trioxide-induced cell differentiation/apoptosis of promyelocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 7653–7658 (2005).
79. Veeranki, S. & Choubey, D. Interferon-inducible p200-family protein IFI16, an innate immune sensor for cytosolic and nuclear double-stranded DNA: regulation of subcellular localization. *Mol. Immunol.* **49**, 567–571 (2012).
80. Briggs, L. J. *et al.* Novel properties of the protein kinase CK2-site-regulated nuclear-localization sequence of the interferon-induced nuclear factor IFI 16. *Biochem. J.* **353**, 69–77 (2001).
81. Dawson, M. J. & Trapani, J. A. IFI 16 gene encodes a nuclear protein whose expression is induced by interferons in human myeloid leukaemia cell lines. *J. Cell. Biochem.* **57**, 39–51 (1995).
82. Berry, A. *et al.* Interferon-inducible factor 16 is a novel modulator of glucocorticoid action. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **24**, 1700–1713 (2010).
83. Campisi, J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu. Rev. Physiol.* **75**, 685–705 (2013).
84. Salama, R., Sadaie, M., Hoare, M. & Narita, M. Cellular senescence and its effector programs. *Genes Dev.* **28**, 99–114 (2014).
85. Sharpless, N. E. & Sherr, C. J. Forging a signature of in vivo senescence. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 397–408 (2015).

86. Song, L. L. *et al.* Interferon-inducible IFI16, a negative regulator of cell growth, down-regulates expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene. *PLoS One* **5**, e8569 (2010).
87. Liao, J. C. C. *et al.* Interferon-inducible protein 16: insight into the interaction with tumor suppressor p53. *Struct. Lond. Engl.* **19**, 418–429 (2011).
88. Clarke, C. J. P., Hii, L. L., Bolden, J. E. & Johnstone, R. W. Inducible activation of IFI 16 results in suppression of telomerase activity, growth suppression and induction of cellular senescence. *J. Cell. Biochem.* **109**, 103–112 (2010).
89. Levine, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**, 323–331 (1997).
90. Bargonetti, J. & Manfredi, J. J. Multiple roles of the tumor suppressor p53. *Curr. Opin. Oncol.* **14**, 86–91 (2002).
91. Campisi, J. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol.* **11**, S27–S31 (2001).
92. Feng, Z., Hu, W., Rajagopal, G. & Levine, A. J. The tumor suppressor p53: cancer and aging. *Cell Cycle Georget. Tex* **7**, 842–847 (2008).
93. Shiloh, Y. & Ziv, Y. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 197–210 (2013).
94. Riley, T., Sontag, E., Chen, P. & Levine, A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 402–412 (2008).
95. Duan, X., Ponomareva, L., Veeranki, S. & Choubey, D. IFI16 induction by glucose restriction in human fibroblasts contributes to autophagy through activation of the ATM/AMPK/p53 pathway. *PLoS One* **6**, e19532 (2011).
96. Duan, X. *et al.* Differential roles for the interferon-inducible IFI16 and AIM2 innate immune sensors for cytosolic DNA in cellular senescence of human fibroblasts. *Mol. Cancer Res. MCR* **9**, 589–602 (2011).
97. Nevins, J. R. Disruption of cell-cycle control by viral oncoproteins. *Biochem. Soc. Trans.* **21**, 935–938 (1993).
98. Thomas, D. M., Yang, H.-S., Alexander, K. & Hinds, P. W. Role of the retinoblastoma protein in differentiation and senescence. *Cancer Biol. Ther.* **2**, 124–130 (2003).
99. Ben-Porath, I. & Weinberg, R. A. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 961–976 (2005).
100. Caposio, P. *et al.* A novel role of the interferon-inducible protein IFI16 as inducer of proinflammatory molecules in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 33515–33529 (2007).

101. Hahn, W. C. & Meyerson, M. Telomerase activation, cellular immortalization and cancer. *Ann. Med.* **33**, 123–129 (2001).
102. Gugliesi, F. *et al.* Nuclear DNA sensor IFI16 as circulating protein in autoimmune diseases is a signal of damage that impairs endothelial cells through high-affinity membrane binding. *PLoS One* **8**, e63045 (2013).
103. Cardenas, H. *et al.* Interferon- γ signaling is associated with BRCA1 loss-of-function mutations in high grade serous ovarian cancer. *NPJ Precis. Oncol.* **3**, 32 (2019).
104. Ju, W. *et al.* Identification of genes with differential expression in chemoresistant epithelial ovarian cancer using high-density oligonucleotide microarrays. *Oncol. Res.* **18**, 47–56 (2009).
105. Azzimonti, B. *et al.* Altered patterns of the interferon-inducible gene IFI16 expression in head and neck squamous cell carcinoma: immunohistochemical study including correlation with retinoblastoma protein, human papillomavirus infection and proliferation index. *Histopathology* **45**, 560–572 (2004).
106. De Andrea, M. *et al.* Effects of IFI16 overexpression on the growth and doxorubicin sensitivity of head and neck squamous cell carcinoma-derived cell lines. *Head Neck* **29**, 835–844 (2007).
107. Mazibrada, J. *et al.* In vivo growth inhibition of head and neck squamous cell carcinoma by the interferon-inducible gene IFI16. *Cancer Lett.* **287**, 33–43 (2010).
108. Zhang, Y. *et al.* IFI16 inhibits tumorigenicity and cell proliferation of bone and cartilage tumor cells. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **12**, 4855–4863 (2007).
109. Cai, H., Yan, L., Liu, N., Xu, M. & Cai, H. IFI16 promotes cervical cancer progression by upregulating PD-L1 in immunomicroenvironment through STING-TBK1-NF-kB pathway. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* **123**, 109790 (2020).
110. Sato, N. *et al.* Gene expression profiling identifies genes associated with invasive intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Am. J. Pathol.* **164**, 903–914 (2004).
111. Almstrup, K. *et al.* Improved gene expression signature of testicular carcinoma in situ. *Int. J. Androl.* **30**, 292–302; discussion 303 (2007).
112. Hernandez, L. *et al.* Characterization of ovarian cancer cell lines as in vivo models for preclinical studies. *Gynecol. Oncol.* **142**, 332–340 (2016).
113. Stukova, M. *et al.* Reduced accumulation of platinum drugs is not observed in drug-resistant ovarian cancer cell lines derived from cisplatin-treated patients. *J. Inorg. Biochem.* **149**, 45–48 (2015).

114. Hamilton, T. C. *et al.* Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer Res.* **43**, 5379–5389 (1983).
115. Chien, J., Kuang, R., Landen, C. & Shridhar, V. Platinum-sensitive recurrence in ovarian cancer: the role of tumor microenvironment. *Front. Oncol.* **3**, 251 (2013).
116. Januchowski, R. *et al.* Microarray-based detection and expression analysis of new genes associated with drug resistance in ovarian cancer cell lines. *Oncotarget* **8**, 49944–49958 (2017).
117. Johnstone, R. W., Kershaw, M. H. & Trapani, J. A. Isotypic variants of the interferon-inducible transcriptional repressor IFI 16 arise through differential mRNA splicing. *Biochemistry* **37**, 11924–11931 (1998).
118. Kwak, J. C., Ongusaha, P. P., Ouchi, T. & Lee, S. W. IFI16 as a negative regulator in the regulation of p53 and p21(Waf1). *J. Biol. Chem.* **278**, 40899–40904 (2003).
119. Kim, E.-J., Park, J.-I. & Nelkin, B. D. IFI16 is an essential mediator of growth inhibition, but not differentiation, induced by the leukemia inhibitory factor/JAK/STAT pathway in medullary thyroid carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 4913–4920 (2005).
120. Wojtowicz, K. *et al.* Inhibitors of N-glycosylation as a potential tool for analysis of the mechanism of action and cellular localisation of glycoprotein P. *Acta Biochim. Pol.* **59**, 445–450 (2012).
121. Sterzyńska, K. *et al.* The role of matrix Gla protein (MGP) expression in paclitaxel and topotecan resistant ovarian cancer cell lines. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 2901 (2018).
122. Sterzyńska, K. *et al.* Mutual expression of ALDH1A1, LOX, and collagens in ovarian cancer cell lines as combined CSCs- and ECM-related models of drug resistance development. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 54 (2018).
123. Sterzyńska, K. *et al.* Expression of osteoblast-specific factor 2 (OSF-2, periostin) is associated with drug resistance in ovarian cancer cell lines. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 3927 (2019).
124. Klejewski, A. *et al.* The significance of lumican expression in ovarian cancer drug-resistant cell lines. *Oncotarget* **8**, 74466–74478 (2017).
125. Klejewski, A. *et al.* New and old genes associated with topotecan resistance development in ovarian cancer cell lines. *Anticancer Res.* **37**, 1625–1636 (2017).
126. Świerczewska, M. *et al.* New and old genes associated with primary and established responses to cisplatin and topotecan treatment in ovarian cancer cell lines. *Mol. Basel Switz.* **22**, 1717 (2017).

127. Świerczewska, M. *et al.* PTPRK expression is downregulated in drug resistant ovarian cancer cell lines, and especially in ALDH1A1 positive CSCs-like populations. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 2053 (2019).
128. Peters, D., Freund, J. & Ochs, R. L. Genome-wide transcriptional analysis of carboplatin response in chemosensitive and chemoresistant ovarian cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **4**, 1605–1616 (2005).
129. Bani, M. R. *et al.* Gene expression correlating with response to paclitaxel in ovarian carcinoma xenografts. *Mol. Cancer Ther.* **3**, 111–121 (2004).
130. Beaufort, C. M. *et al.* Ovarian cancer cell line panel (OCCP): clinical importance of in vitro morphological subtypes. *PLoS One* **9**, e103988 (2014).
131. Kim, K. S., Kang, K. W., Seu, Y. B., Baek, S.-H. & Kim, J.-R. Interferon-gamma induces cellular senescence through p53-dependent DNA damage signaling in human endothelial cells. *Mech. Ageing Dev.* **130**, 179–188 (2009).
132. Johnstone, R. W., Wei, W., Greenway, A. & Trapani, J. A. Functional interaction between p53 and the interferon-inducible nucleoprotein IFI 16. *Oncogene* **19**, 6033–6042 (2000).
133. DeGregori, J. The genetics of the E2F family of transcription factors: shared functions and unique roles. *Biochim. Biophys. Acta* **1602**, 131–150 (2002).
134. Harbour, J. W. & Dean, D. C. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev.* **14**, 2393–2409 (2000).
135. Karin, M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* **270**, 16483–16486 (1995).
136. Dawson, M. J., Elwood, N. J., Johnstone, R. W. & Trapani, J. A. The IFN-inducible nucleoprotein IFI 16 is expressed in cells of the monocyte lineage, but is rapidly and markedly down-regulated in other myeloid precursor populations. *J. Leukoc. Biol.* **64**, 546–554 (1998).
137. Ju, W. *et al.* Identification of genes with differential expression in chemoresistant epithelial ovarian cancer using high-density oligonucleotide microarrays. *Oncol. Res.* **18**, 47–56 (2009).

Opinia Komisji Bioetycznej UMP



UNIwersytet Medyczny Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym
Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Collegium Stomatologicum
ul. Bukowska 70
60-812 Poznań

tel. (+48 61) 854 73 36
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 347/20

Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (t.j. Dz. U. z 2018 r., poz. 617 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. z 1999 r., Nr 47, poz. 489); Ustawy z dnia 6 września 2001 r. Prawo farmaceutyczne (t.j. Dz. U. z 2017 r., poz. 2211 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. z 2004 Nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005 r. zmieniającego rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. z 2005 r. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. z 2004 r. Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie zgłaszania niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. z 2004 r. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 17 lutego 2016 r. w sprawie wzorów wniosków związanych z badaniem klinicznym wyrobu medycznego lub aktywnego wyrobu medycznego do implantacji oraz wysokości opłat za złożenie tych wniosków (Dz. U. z 2016 r., poz. 208); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (t.j. Dz. U. z 2017 r., poz. 211, z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego wyrobów (Dz. U. z 2010 r. Nr 194, poz. 1290); Ustawy z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (t.j. Dz. U. z 2016 r., poz. 1718 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012 r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. z 2012 r., poz. 489); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 12 października 2018 r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. z 2018 r., poz. 1994); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznych z Udziałem Ludzi oraz przepisy ICH GCP.

Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 14 maja 2020 r.

rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.

Kierownik projektu: dr hab. Radosław Januchowski

Miejsce prowadzenia badań:

**Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu**

Główny badacz: dr hab. Karolina Sterzyńska

Członkowie zespołu

badawczego: prof. dr hab. Michał Nowicki, dr hab. Radosław Januchowski, dr n. med. Monika Świerczewska, prof. dr hab. Rodryg Ramlau, lek. Justyna Borucka, prof. dr hab. Ewa Nowak-Markwitz, dr hab. Radosław Mądry, dr n. med. Emilia Gąsiorowska, lek. Natalia Iżycka, lek. Dariusz Rusek

Temat badań:

„Badanie ekspresji nowych genów związanych z rozwojem oporności na cytostatyki w raku jajnika”.

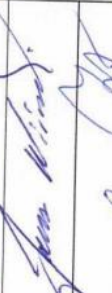
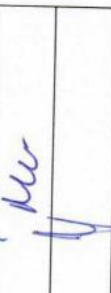
Okres prowadzenia badań: maj 2020 r. – maj 2021 r.

Komisja wydała uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu tego wniosku

Przewodniczący Komisji

prof. zw. dr hab. med. Paweł Chęciński

Podpisy członków Komisji Bioetycznej podejmujących Uchwałę nr 347/20 z dnia 14.05.2020r.

Lp.	Imię i Nazwisko	Specjalność	Miejsce Pracy	Podpis
1.	Przewodniczący Komisji prof. dr hab. Paweł Chęciński	chirurgia ogólna, naczyniowa i angiologia	Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej oraz Angiologii UMP, ZOZ MSWiA, ul. Dojazd 34, 60-631 Poznań.	
2.	Z-ca Przewodniczącego Komisji prof. dr hab. Janusz Wiśniewski	filozof	Wydział Nauk Politycznych i Dziennikarstwa UAM, ul. Umultowska 89A, 61-614 Poznań.	
3.	prof. dr hab. Zygmunt Adamski	dermatologia i wenerologia	Katedra i Klinika Dermatologii UMP, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań	
4.	dr Krystyna Babiak	prawnik	Kancelaria Rady Prawnego, dr Krystyna Babiak, ul. Czarтория 1/2, 61-102 Poznań.	
5.	ks. prof. UAM dr hab. Andrzej Bohdanowicz	teologia	Wydział Teologiczny Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu, ul. Wieżowa 2/4, Poznań	
6.	prof. dr hab. Maciej Krawczyński	genetyka kliniczna, okulistyka	Katedra i Zakład Genetyki Medycznej UMP, ul. Rokietnicka 8, 60-806 Poznań.	
7.	mgr Jolanta Lojko-Kołodziejczak	pielęgniarka	Pielęgniarka Oddziałowa Izby Przyjęć Pediatrii Szpitala Klinicznego im. Karola Jonschera UMP, ul. Szpitalna 27/33, 60-572 Poznań.	
8.	mgr Krystyna Malinger	farmaceuta	Apteka Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego UMP, ul. Polna 33, 60-535 Poznań.	
9.	prof. dr hab. Andrzej Marszałek	patomorfologia	Katedra i Zakład Patologii i Profilaktyki Nowotworów UMP, ul. Garbary 15, 61-866 Poznań.	
10.	prof. dr hab. Maciej Owecki	choroby wewnętrzne, endokrynologia	Katedra Medycyny Społecznej UMP, ul. Rokietnicka 4, 60-806 Poznań.	
11.	prof. dr hab. Wojciech Służewski	pediatria, neurologia dziecięca, choroby zakaźne	Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej UMP, ul. Szpitalna 27/33, 60-572 Poznań.	
12.	prof. dr hab. Robert Spaczyński	ginekologia i położnictwo	Klinika Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu UMP, ul. Polna 33, 60-535 Poznań.	
13.	dr med. Piotr Tomczak	onkologia kliniczna, radioterapia	Klinika Onkologii UMP, ul. Szamarzewskiego 82/84, 60-569 Poznań.	
14.	prof. dr hab. Joanna Twarowska- Hauser	psychiatria	Klinika Psychiatrii Dorosłych, Zakład Genetyki w Psychiatrii UMP, ul. Rokietnicka 8, 60-806 Poznań.	
15.	prof. dr hab. Henryk Wysocki	choroby wewnętrzne, kardiologia	Wyższa Szkoła Pedagogiki i Administracji im. Mieszka I w Poznaniu, ul. Bułgarska 55, 60-320 Poznań.	