

UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
WYDZIAŁ LEKARSKI

MARTA CZERNIK

**ROLA WIRUSOWEGO ANTYGENU T W PROCESIE
NOWOTWORZENIA NA PRZYKŁADZIE LUDZKIEGO GLIOBLASTOMA**

Praca doktorska

Promotor: prof. dr hab. Marcin Majka

Pracę wykonano w Center for Neurovirology, Department of Neuroscience, Temple University School of Medicine, Philadelphia, USA, pod kierunkiem Doktor Nune Darbinian i Doktora Kamela Khalili oraz w Zakładzie Transplantologii Katedry Immunologii Klinicznej i Transplantologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem Prof. dr hab. Marcina Majki.

Kierownik Zakładu: prof. dr hab. Marcin Majka

Kierownik Katedry: dr hab. Maciej Siedlar prof. UJ

Kraków, 2011

Składam serdeczne podziękowania moim promotorom, Panu Profesorowi dr hab. Marcinowi Majce, Panu Doktorowi Kamelowi Khalili i Pani Doktor Nune Darbinian za inspirujące uwagi i cenną pomoc merytoryczną w powstawaniu tej pracy. Dziękuję również koleżankom i kolegom z Center for Neurovirology, Temple University za nieocenioną pomoc i liczne dyskusje. Chciałabym zadedykować tę pracę moim rodzicom, Halinie i Jerzemu Czernik

SPIS TREŚCI

SPIS TREŚCI	
SPIS WAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW	
I. STRESZCZENIE	7
II. ABSTRACT	8
III. WSTĘP	9
1. WIRUS JC.....	9
1.1. Charakterystyka wirusa JC.....	9
1.2. Budowa wirusa JC.....	10
1.3. Replikacja wirusa JC.....	12
2. MOLEKULARNE PODSTAWY TRANSFORMACJI KOMÓREK PRZEZ WIRUSA JC.....	15
2.1. Droga przekazywania sygnału Wnt.....	17
3. NOWOTWORY ZWIĄZANE Z WIRUSEM JC.....	19
4. ZNACZENIE MECHANIZMÓW NAPRAWY DNA W PROCESIE NOWOTWORZENIA.....	22
4.1. Mechanizmy naprawy DNA.....	23
4.1.1. Naprawa przez bezpośrednią rewersję uszkodzeń.....	23
4.1.2. Naprawa przez wycinanie zasad azotowych.....	25
4.1.3. Naprawa przez wycinanie nukleotydów.....	25
4.1.4. Naprawa przez rekombinacje.....	27
4.1.1.1. Rekombinacja niehomologiczna (NHEJ).....	27
4.1.1.2. Rekombinacja homologiczna (HR).....	28
4.2. Rola białka Rad-51 w naprawie podwójnych pęknięć nici DNA.....	28
5. GLEJAK WIELOPOSTACIOWY (łac. <i>Glioblastoma multiformis</i>).....	31
5.1. Charakterystyka i występowanie.....	31
5.2. Molekularne podstawy rozwoju glejaka wielopostaciowego.....	33
IV. CELE PRACY	35
V. MATERIAŁY I METODY	37
1. METODYKA.....	37
1.1. Uzasadnienie wyboru modeli badawczych.....	37
1.2. Uzasadnienie wyboru stężeń doksycykliny i cisplatyny.....	38
2. MATERIAŁY.....	38
2.1. Linie komórkowe i warunki ich hodowli.....	38
2.2. Plazmidy.....	39
2.3. Przeciwciała i siRNA.....	39

3.	PROCEDURY DOŚWIADCZALNE	40
3.1.	Regulacja ekspresji genu antygeny T w systemie pTet-ON	40
3.2.	Barwienie histochemiczne wycinków tkanek mózgowych	42
3.3.	Oznaczenie stężenia białek	42
3.4.	Oznaczenie ekspresji białek metodą Western blot.....	43
3.5.	Oznaczenie współdziałania między białkami (immunoprecypitacja)	44
3.6.	Oznaczenie poziomu mRNA metodą Northern blot	45
3.7.	Immunofluorescencyjna detekcja białek	46
3.8.	Oznaczenie kinetyki wzrostu komórek.....	46
3.9.	Analiza cyklu komórkowego metodą cytometrii przepływowej	47
3.10.	Transfekcja komórek	47
3.11.	Pomiary aktywności transkrypcyjnej promotorów metodą opartą na lucyferazie	48
3.12.	Oznaczenie tworzenia kolonii.....	48
3.13.	Opracowanie wyników i analiza statystyczna	48
VI.	WYNIKI.....	50
1.	BADANIA OBECNOŚCI BIAŁEK WIRUSOWYCH W TKANKACH NOWOTWOROWYCH	50
1.1.	Ekspresja białka wirusowego antygeny T w tkankach nowotworowych mózgu.....	50
2.	LUDZKA LINIA GLEJAKA WIELOPOSTACIOWEGO Z INDUKOWANYM PRZEZ DOKSYCYKLINĘ ANTYGENEM T	51
2.1.	Efektywność działania systemu pTet-ON.....	51
2.2.	Sprawdzenie aktywności transkrypcyjnej regionu późnego i wczesnego wirusa	53
2.3.	Efekt działania antygeny T na fizjologię komórek glejaka wielopostaciowego U87-MG	54
2.3.1.	Efekt antygeny T na zdolność proliferacyjną komórek U87-MG.....	54
2.3.2.	Efekt antygeny T na zdolność do tworzenia kolonii komórek U87-MG.....	56
2.3.3.	Antygen T powoduje oporność na działanie chemiostatyku cisplatyny	57
2.4.	Wpływ antygeny T na dystrybucję faz cyklu komórkowego	58
3.	ZBADANIE WPŁYWU BIAŁKA WIRUSOWEGO NA FUNKCJĘ BIOLOGICZNE BIAŁEK β -KATENINY I RAD-51	60
3.1.	Ekspresja białek i poziom mRNA Rad-51 i β -kateniny	60

3.2.	Zdolność do fizycznej interakcji pomiędzy białkiem Rad-51 i β -kateniny a białkiem antygeny T	63
3.2.1.	Współdziałanie pomiędzy antygenem T i białkiem Rad-51	64
3.2.2.	Współdziałanie pomiędzy antygenem T i białkiem β -kateniną.....	66
3.3.	Aktywność transkrypcyjna promotorów TCF-4 i c-myc w komórkach U87-MG	68
3.3.1.	Aktywność transkrypcyjna promotora TCF-4.....	69
3.3.2.	Aktywność transkrypcyjna promotora c-myc	70
4.	BIAŁKO WIRUSOWE ANTYGEN T STABILIZUJE mRNA β -KATENINY W JĄDRZE.....	71
5.	WPLYW ANTYGENU T NA NAPRAWĘ PODWÓJNYCH PĘKNIĘĆ NICI DNA	75
5.1.	Upośledzenie naprawy podwójnych pęknięć nici DNA przez białko antygeny T na drodze HR.....	76
VII.	DYSKUSJA.....	79
VIII.	WNIOSKI.....	91
IX.	LITERATURA	93

WYKAZ WAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW

AP-1	Activating Protein – 1 - czynnik transkrypcyjny 1
APC	Adenomatous polyposis coli
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor - Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów
BSA	Bovine Serum Albumin - Albumina surowicy wołowej
DAPI	4',6-Diamino-2-fenylindol
DBD	DNA Binding Domain - Domena wiążąca DNA
DMEM	medium hodowlane Dulbecco
DMSO	Dimetylosulfotlenek
DSB	Double Strand Break DNA - podwójne pęknięcie nici DNA
Dsh	Dishevelled receptor
EDTA	Kwas etylenodiaminotetraoctowy
EGF	Epidermal Growth Factor - Naskórkowy czynnik wzrostu
EGFR	Receptor for Epidermal Growth Factor – Receptor naskórkowego czynnika wzrostu
EGTA	Kwas etylenoglikolo-bis(2-aminoetyloeter)-N,N,N',N; tetraoctowy Fosforanowym
GAP	GTPase Activating Protein – białko aktywujące GTPazę
GBM	Glioblastoma Multiforme
GSK3 β	Glycogen Synthase Kinase 3 β - Kinaza syntazy glikogenu 3 β
HEPES	Kwas N-(2-hydroksyetylo) piperazyno-N'-(2-etanosulfonowy)
HR	Homologous Recombination
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1 - Insulinopodobny czynnik wzrostu
IR	Insulinowy Receptor
IRS-1	Insulin Receptor Substrate – 1
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LP1	Leader Protein 1
MGMT	O6-methylguanine-DNA methyltransferase
MOPS	Kwas 3-(N-morfolino)propanosulfonowy

NHEJ	Nonhomologous end-Joining
NLS	Nuclear Localization Signal
OUN	Ośrodkowy Układ Nerwowy
PBS	Phosphate Buffered Saline - Roztwór soli fizjologicznej w buforze
pH2A.X	Histone phosphorylated on Ser-139
PI3K	Phosphatidył-3-inozitol kinase – Kinaza fosfatydylo-3-inozytolu
PML	Progressive Multifocal Leukoencephalopathy
Rb	Białko Retinoblastoma
RTK	receptor Kinaz Tyrozynowych
SDS	Siarczan Dodecyłu Sodu
SDS PAGE	Elektroforeza na żelu poliakrylamidowym w obecności siarczanu dodecyłu sodu
SFM	Serum Free Medium - Medium pozbawione surowicy
siRNA	Small interfering RNA
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TCF-4	Transcription Factor 4
TCR	transcription control region NLS
TEMED	N, N, N',N'-tetrametylenodiamina

I. STRESZCZENIE

Antygen T jest wielofunkcyjnym, nowotworowym białkiem wirusa JC, niezbędnym do jego replikacji. Ma zdolność aktywowania replikacji wirusa, łączyć się i uszkadzać DNA, a także transformować komórki, głównie poprzez zaburzenie prawidłowej funkcji białek supresorowych takich jak m.in. p53 i Rb. Ma to wpływ na deregulację cyklu komórkowego czego efektem jest niestabilność chromosomalna i nagromadzenie uszkodzeń w nici DNA.

Celem prezentowanej pracy jest zbadanie wpływu antygeny T na zdolność transformowania komórek ludzkich poprzez wpływ na funkcje biologiczne białka β -kateniny, zaangażowane w ścieżkę sygnału Wnt oraz Rad-51, głównego białka naprawy podwójnych pęknięć nici DNA na drodze rekombinacji homologicznej. Jako model eksperymentalny wykorzystano ludzką linię glejaka wielopostaciowego U87-MG.

Zaprezentowane wyniki pokazują ochronne działanie antygeny T na komórki nowotworowe po inkubacji z cisplatiną. Wykorzystując metodę immunoprecypitacji Western blot i barwienia immunofluorescencyjnego udowodniono fizyczną interakcję pomiędzy białkami Rad-51, β -kateniną i antygenem T. Zaprezentowano wpływ ekspresji antygeny T i białka Rad-51 na wzrost aktywności promotora c-myc i TCF-4 (*Transcription factor-4*). Aktywność ta może prowadzić do nadmiernej proliferacji komórek, nagromadzenia licznych uszkodzeń, podwójnych pęknięć nici DNA i niestabilności genetycznej. Zaprezentowano, iż w komórkach wykazujących ekspresję antygeny T i β -kateniny 100% białka pH2A.X łączy się z białkiem Rad-51, co świadczy o wzroście liczby uszkodzeń nici DNA w tych komórkach.

Podsumowując, zaprezentowane wyniki pokazują, iż interakcja pomiędzy antygenem T, β -kateniną i białkiem Rad-51 odgrywa ważną rolę w zablokowaniu prawidłowo funkcjonujących procesów komórkowych, jest czynnikiem wpływającym na zaburzenie prawidłowej naprawy uszkodzonego DNA i stabilizację mRNA β -kateniny, efektem czego może być transformacja komórek.

II. ABSTRACT

The JCV early gene product large T-antigen is a multifunctional oncoprotein essential for viral replication. T-antigen has the ability to activate viral transcription, to bind and break DNA, and to transform cells, most likely by affecting function of several tumor suppressors such as p53 and Rb proteins. This makes T-antigen unique in its ability both to disrupt chromosomal integrity and to inactivate the cell cycle checkpoints that would limit clonal expansion of such damaged cells.

In this work the role of antigen T in tumorigenesis has been analysed by checking potential interaction between antigen T and β -catenin, the central protein of the Wnt signaling pathway and Rad51 a major component of homologous recombination-directed (HR) DNA repair.

Expression of T-antigen increased cell survival following cisplatin treatment. Immunoprecipitation/Western blot and immunofluorescence analyses indicated that both Rad51 and β -catenin bound to T-antigen. In reporter assays, T-antigen and β -catenin activated the c-myc promoter. Cells over-expressing both proteins revealed increased c-myc and TCF-4 (*Transcription Factor-4*) transcriptional activity. High rate of proliferation for cells overexpressing β -catenin and T-antigen might lead to the accumulation of mutations, double-strand DNA breaks and genomic instability. In cells co-expressing both T-antigen and β -catenin, a majority of pH2A.X was co-localized with Rad51 foci, suggesting that there was an increased DNA damage and homologous recombination in such cells.

Taken together, these studies demonstrate that T-antigen and Rad51 can stabilize β -catenin mRNA, and all three proteins can combine to regulate cellular processes and this interplay may be an important factor in T-antigen disruption of DNA repair mechanisms and cell transformation.

IV. CELE PRACY

Z medycznego punktu widzenia istotny jest fakt, iż w procesie formowania i progresji nowotworu złośliwego ważną rolę odrywają czynniki epidemiologiczne. Jednym z takich czynników jest wirus JC, a w szczególności jego duże białko antygeny T.

W niniejszej rozprawie postawiono za cel zbadanie ekspresji białka antygeny T oraz jego wpływu na funkcje biologiczne białka Rad-51 (białko zaangażowane w naprawę podwójnych pęknięć nici DNA na drodze rekombinacji homologicznej) oraz białka β -kateniny (główne białko ścieżki sygnałowej Wnt), a w szczególności skupiono się na wpływie powyższych interakcji na proces naprawy DNA. Jako model w badaniach wykorzystano ludzką linię glejaka wielopostaciowego z indukowanym przez doksycyklinę antygenem T - U87-MG (-/+ DOX).

W obrębie wymienionego celu sformułowano szczegółowe zadania badawcze, których wykonanie umożliwia weryfikację tezy pracy:

1. Określenie obecności białka wirusowego antygeny T w preparatach nowotworowych mózgu (*glioblastoma, astrocytoma, meduloblastoma*) za pomocą immunohistochemicznych barwień;
2. Stworzenie ludzkiej linii glejaka wielopostaciowego z indukowanym przez doksycyklinę antygenem T w celu lepszej kontroli nad ekspresją białka wirusowego a także braku "kontaminacji" ze strony pozostałych białek wirusowych (białek kapsydu czy agnoproteiny);
3. Zbadaniu wpływu antygeny T na funkcje biologiczne białek β -kateniny i Rad-51 poprzez:
 - a. Sprawdzenie wpływu dużego białka antygeny T JCV na proces proliferacji, zdolności do wzrostu klonalnego oraz dystrybucji faz cyklu komórkowego;
 - b. Określenie poziomu mRNA białek Rad51 i β -kateniny w ludzkiej linii glejaka - U87-MG z indukowanym antygenem T;
 - c. Określenie poziomu ekspresji białek Rad51 i β -kateniny w indukowanej ludzkiej linii glejaka - U87-MG- z indukowanym antygenem T;

-
- d. Sprawdzenie zdolności do współdziaływania białek Rad-51 i β -kateniny z antygenem T;
 4. Wyciszenie ekspresji białka β -kateniny przy użyciu interferencji RNA celem sprawdzenia efektu antygeny T na nowotworzenie komórek glejaka wielopostaciowego przy zahamowanej ekspresji białka β -kateniny;
 5. Zbadanie czy fizyczne współdziałanie pomiędzy β -kateniną i antygenem T wpływa na naprawę podwójnych pęknięć nici DNA.

III. WSTĘP

1. WIRUS JC

1.1. Charakterystyka wirusa JC

Wirus JC należy do rodziny *Polyomavirus* znajdującej się w obrębie rodziny Polyomaviridae. Materiał genetyczny wirusa stanowi dwuniciowy kolisty DNA wielkości ~ 5 kbp. [Shackelton et al., 2006]. JC wirus jest jednym z najmniejszych wirusów o podwójnej nici DNA. Jego naturalnym i jedynym gospodarzem jest człowiek [Eash et al., 2006]. Wirus JC jest mało znanym ale bardzo powszechnie występującym w populacji światowej. Obecność przeciwciał anty - JCV stwierdza się u 70 - 90% ludzi [Chang et al., 2002]. Natomiast, około 40% jest nim zarażona, co oznacza, że w ich moczu znajduje się wirusowe DNA, wykrywalne metodą PCR [Agostini et al., 1996].

Wirusa JC po raz pierwszy wyizolowano w roku 1970 od osoby chorej na postępującą wieloogniskową leukoencefalopatię (PML - *progressive multifocal leukoencephalopathy*) [Collier et al., 1996]. W komórkach mikrogleju chorego wyizolowano wiriony o budowie typowej dla polyiomawirusa, którego później nazwano JC od inicjałów pacjenta [Collier et al., 1996]. Późniejsze badania donoszą, iż wirus JC jest jednym z czynników etiologicznym postępującej wieloogniskowej leukoencefalopati [Khalili et al., 2006].

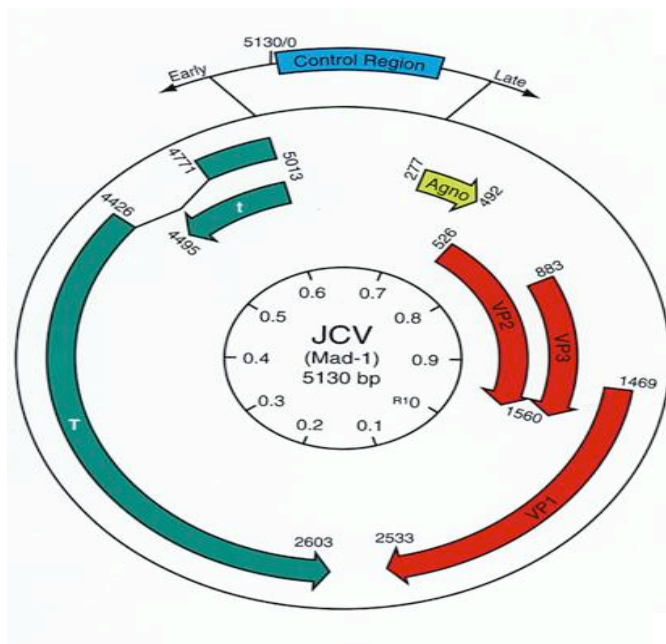
Wirus JC najprawdopodobniej przenosi się drogą kropelkową bądź pokarmową. Większość nosicieli zostaje zakażona wirusem we wczesnym dzieciństwie i wirus utrzymuje się w komórkach gospodarza przez całe jego życie [Sweet et al., 2006]. Wirus pozostaje w stanie uśpienia i nie wywołuje żadnych objawów chorobowych, za wyjątkiem przelotnych zaburzeń układu moczowego najczęściej u dzieci. Po wniknięciu do organizmu wirus pozostaje w tkance nerwowej, replikując się na stosunkowo niskim poziomie [White et al., 2005]. Jednak u osób z osłabionym układem immunologicznym, na przykład po przeszczepach lub podczas przyjmowania leków immunosupresyjnych (podczas zakażenia wirusem HIV), wirus może uaktywniać się [Gordon i Khalili, 1998]. Uaktywnienie się wirusa w takich przypadkach powoduje rozwój poważnej, śmiertelnej choroby PML polegającej na demielinizowaniu ośrodkowego układu nerwowego (OUN).

Choroba najczęściej objawia się porażeniem połowicznym, osłabieniem zdolności intelektualnych, zaburzeniami mowy i czucia [Berger i Concha, 1995].

Po uaktywnieniu wirus JC wnika do tkanki nerwowej, migdałków, okrężnicy, węzłów chłonnych, szpiku kostnego, śledziony, wątroby a także innych tkanek [Monace et al., 1996]. Te ostatnie najprawdopodobniej pomagają wirusowi w przemieszczaniu się pomiędzy nerkami a ośrodkowym układem nerwowym [Dell Valle et al., 2006].

1.2. Budowa wirusa JC

Wirion wirusa JC zawiera ikozaedralny kapsyd o średnicy 45-50 nm. Kapsyd zbudowany jest z 71 kapsomerów. Każdy z kapsomerów zbudowany jest z trzech białek kodowanych przez genom wirusa: VP1, o długości 360 reszt aminokwasowych, VP2 o długości 350 reszt aminokwasowych i VP3 o długości ok. 230 reszt aminokwasowych [Niv et al., 2004] (Rys. 1).



Rysunek 1 . Schematyczna budowa genomu wirusa JC (na podstawie Khalili et al., 2001).

W genomie wirusa JC można wyróżnić trzy regiony: tzw. wczesny i późny region kodujący oraz region regulatorowy (TCR - *transcription control region*) [Sariyer et al., 2006]. Wczesny region kodujący zawiera małe białko antygeny t i duże białko antygeny T. Białka te pojawiają się jako pierwsze w procesie transkrypcji, zaraz po wniknięciu wirusa do jądra i jego odpłaszczeniu. Białka te biorą udział w stymulacji komórek gospodarza do wytworzenia enzymów potrzebnych do replikacji DNA komórkowego, przygotowując tym samym komórkę do replikacji wirusowego DNA [Sock et al., 1993]. Białka późnego regionu kodującego nie biorą bezpośredniego udziału w ekspresji informacji genetycznej wirusa, powstają dopiero po replikacji wirusowego genomu. Należą do niego białka kapsydu (VP1, VP2, VP3 oraz viral protein 1-3) i małe białko agnoproteina [Khalili et al., 2002].

Wczesny prekursorowy mRNA wirusa podlega alternatywnemu składaniu do pięciu dojrzałych transkryptów, kodujących białka: duży antygen T (T-Ag), mały antygen t (t-Ag), T' (165), T' (136) oraz T' (135) [Prins et al., 2001]. Wszystkie te białka posiadają jednakowe końce aminowe (N-końce) złożone z 81 reszt aminokwasowych. Poza tym każde białko charakteryzuje się własnym, unikalnym końcem karboksylowym (C-koniec), z wyjątkiem antygeny T i T' (165) u których końce pokrywają się [Prins et al., 2001]. Obecność podobnych sekwencji pomiędzy białkami wczesnymi wirusa JC sugeruje, iż antygeny te wchodzi w interakcje między sobą, a funkcjonalną domeną odpowiedzialną za owe oddziaływania jest domena N-końcowa [Prins et al., 2001].

Najlepiej zbadanym białkiem wczesnym wirusa JC jest białko dużego antygeny T [Reiss i Khalili, 2003]. Około 95% tego białka zlokalizowane jest w jądrze komórki gospodarza. Występuje tam w nukleoplazmie w wolnej formie lub połączone do chromatyny i macierzy jądrowej [Reiss i Khalili, 2003]. Antygen T jest wieloczynnościowym białkiem, które przez bezpośrednie interakcje z czynnikami komórkowymi bierze udział w regulacji cyklu komórkowego i przetrwaniu komórki [Tyagarajan et al., 2006].

Duży antygen T jest jedynym białkiem wirusowym potrzebnym do replikacji własnego DNA, wiąże się z nim i wykazuje aktywność helikazy [Sweet et al., 2002, White et al., 2005]. Antygen T ulega modyfikacjom postranskrypcyjnym głównie przez

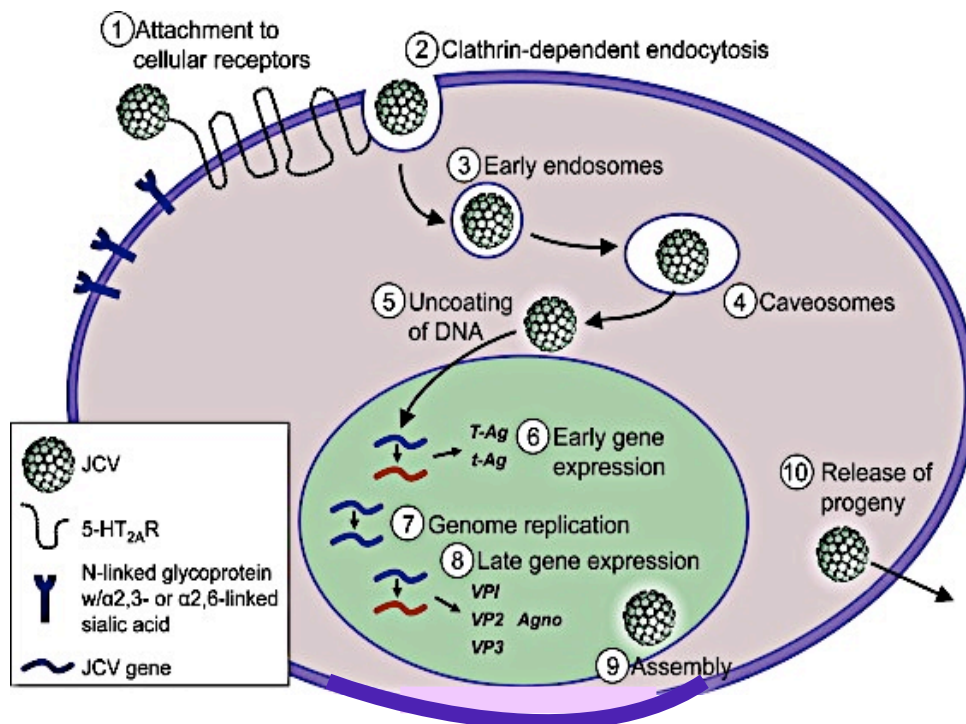
fosforylację reszt seryny i treoniny, ale także przez o-glikozylacje, acetylacje, adenyzacje, ADP-rybozylacje [Sweet et al., 2002].

Mały antygen t (t-ag) jest białkiem bogatym w cysteine, zlokalizowanym głównie w jądrze komórkowym, rzadziej w cytoplazmie. Posiada zdolność wiązania się z niektórymi białkami komórkowymi, czego efektem może być stymulacja wzrostu komórki [White et al., 2004]. Białka T'(135), T'(136), T'(165) są izomorfami dużego antygeny T, które powstają w wyniku alternatywnego składania prekursorowego wczesnego mRNA. Podobnie jak duży antygen T, mogą wiązać się z niektórymi białkami regulującymi komórki takimi jak: p107 i p130, należącymi do rodziny pRB, mogą upośledzać ich funkcje co w konsekwencji prowadzi do powstania nowotworów [Bollag et al., 2006].

Późny region kodujący wirusa JC zawiera geny agnoproteiny (LP1 – *leader protein 1*) oraz trzech białek kapsydu: VP1, VP2, Vp3. Agnoproteina jest 71-aminokwasowym białkiem o masie cząsteczkowej 8 kD. Produkowana jest w późnej fazie cyklu replikacyjnego wirusa, jednakże nie stwierdza się jej występowania w wirionie [Darbinyan et al., 2002; Endo et al., 2003]. W komórkach można ją znaleźć głównie w cytoplazmie, szczególnie w rejonie okołojądrowym, w jądrze występuje w śladowych ilościach [Darbinyan et al., 2002]. Agnoproteina jest białkiem dobrze poznanym i pełni rolę regulatorową w regulacji i ekspresji genów wirusa, jak również w składaniu wirionów i ich rozprzestrzenianiu [Khalili et al., 2003]. Badania pokazują iż białko agnoproteina może wiązać się do innych białek wirusowych np. białka antygeny T, jak również do innych białek komórkowych jak np. p53, Ku70, Ku80 deregulując tym samym cykl komórkowy [Khalili i White, 2005]. Obecność samej agnoproteiny, bez innych białek wirusa JC, wpływa hamująco na wzrost komórek poprzez zatrzymanie ich głównie w fazie G2/M. Dodatkowo, agnoproteina wywiera toksyczny wpływ na komórkę poprzez hamowanie i uniemożliwianie naprawy uszkodzonego DNA [Darbinyan et al., 2004]. Rola agnoproteiny w hamowaniu procesu naprawy DNA polega na jej wiązaniu się do dwóch czynników, Ku70, Ku80, biorących udział w tym procesie i inaktywację ich. Modulacja działania białkami Ku70, Ku80 może być jednym z ważniejszych czynników sterujących cyklem życiowym wirusa JC, a także przyczyną nowotworzenia [Darbinyan et al., 2004].

1.3. Replikacja wirusa JC

W cyklu replikacyjnym wirusa JC można wyróżnić dwie podstawowe fazy: fazę wczesną i fazę późną. Faza wczesna obejmuje absorpcję wirusów do komórki i trwa do rozpoczęcia replikacji DNA wirusa (Rys. 2). W tym czasie cząsteczka łączy się z powierzchnią komórki, wykorzystując do tego celu reszty kwasu sjałowego obecne w receptorach glikoproteinowych [Gee et al., 2006]. Po wnikięciu do komórki drogą endocytozy zależnej od białka komórkowego klatryny, cząsteczki wirusa zamknięte w endosomach ulegają przemieszczaniu w kierunku jądra komórkowego. Opuszczenie endosomów przez wiriony następuje dopiero przy zewnętrznej stronie błony jądrowej [Querbes et al., 2006]. Samo wejście wirusa JC do jądra następuje przez kompleks porowy jądra (*nuclear localization signal* – NLS) obecny w białku kapsydowym VP1 [Querbes et al., 2006]. W jądrze komórkowym genom wirusa ulega odpłaszczeniu i zachodzi jego transkrypcja z użyciem polimerazy II gospodarza, prowadząca do powstania mRNA. Proces ten zachodzi dzięki zdolności antygenu T do aktywacji ekspresji genów komórkowych oraz własnych [Sock et al., 1993]. Geny wirusowe są aktywowane po związaniu się antygenu T z rejonem wzmacniacza transkrypcji promotora wirusowego. Antygen T wiąże się także z polimerazą DNA α oraz z innymi białkami odpowiedzialnymi za regulację wzrostu komórki [Smith et al., 2003].



Rysunek 2. Wejście wirusa JC do komórki gospodarza (na podstawie Maginnis i Atwood, 2009).

Faza późna cyklu replikacyjnego wirusa JC rozpoczyna się wraz z inicjacją replikacji DNA wirusowego. Badania donoszą, iż sam proces replikacji nie jest do końca poznany w przypadku wirusa JC, a przedstawiona wiedza oparta jest na podstawie badań nad innym, blisko spokrewnionym wirusem SV40 czy BVK. Replikacja następuje w jądrze komórki gospodarza i bierze w niej udział duży antygen T oraz enzymy komórkowe [Sock et al., 2006]. Część cząsteczek antygeny T przyłącza się do DNA wirusa w miejscu startu replikacji i katalizuje rozplątanie nici DNA [Alexandrov et al., 2002]. Po rozpleceniu nici DNA białko to tworzy kompleks z białkiem replikacyjnym A (RPA), tworząc kompleks preinicjujący replikację do którego przyłącza się następnie α -prymaza polimerazy DNA, przekształcając go w kompleks inicjacyjny [Smith et al., 2003].

Synteza zachodzi w dwóch kierunkach wokół kolistego DNA wirusa. Przesuwanie się widełek replikacyjnych ułatwione jest dzięki aktywności helikazowej antygeny T [Alexandrov et al., 2003]. W fazie późnej zachodzi także ekspresja genów późnych kodujących białka kapsydu wirusa, składanie cząsteczek wirusa w jądrze zakażonej

komórki oraz uwolnienie wirusa z komórki. Proces uwolnienia wirusa JC prowadzi do lizy komórek [Duboi et al., 1997] (Rys. 2).

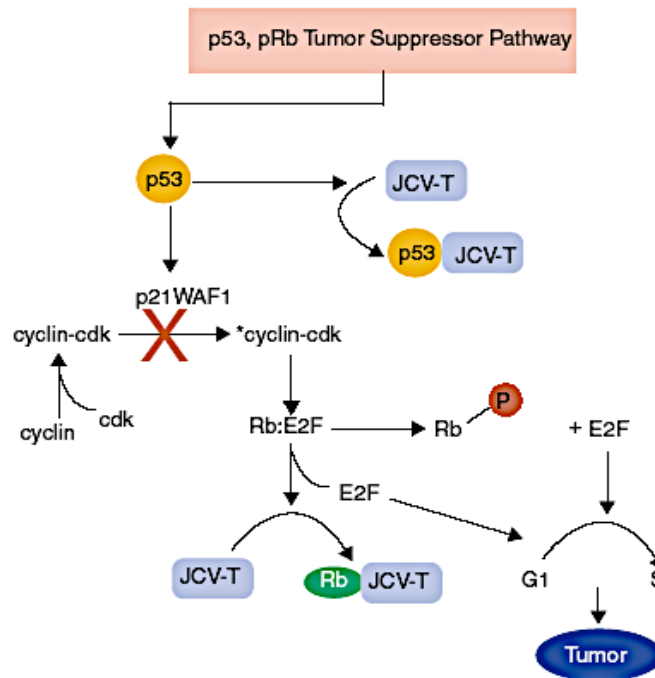
2. MOLEKULARNE PODSTAWY TRANSFORMACJI KOMÓREK PRZEZ WIRUS JC

Wiele doświadczeń przeprowadzonych na modelach zwierzęcych [Zu Rhein i Varakis, 1979; London et al., 1983; Ohsumi et al., 1985] donosi o roli antygeny T w procesie nowotworzenia poprzez zdolność do transformacji komórek *in vitro*. Wirus JC wykorzystuje genom gospodarza do replikacji własnego DNA. Wzajemne oddziaływanie pomiędzy czynnikami wirusowymi i gospodarza są niezbędne do cyklu replikacyjnego ale także powodują liczne zmiany w komórce gospodarza. Komórka zostaje przekierowana z fazy G1 cyklu komórkowego i zablokowana w fazie S. Antygen T ma zdolność wiązania się do białek należących do rodziny pRb (*retinoblastoma protein family*) [Dyson et al., 1990], p130 [Ludlow et al., 1995], p107 [Dyson et al., 1989] oraz p53 [Bollag et al., 1989], które w normalnych warunkach regulują prawidłowe funkcjonowanie cyklu komórkowego. Domeną odpowiedzialną za transformację komórkową w białku antygeny T jest domena N-końca, która zawiera sekwencje LXCXE [Bollag et al., 1989].

Antygen T wiążąc białka z rodziny Rb, które regulują przejście komórki z fazy G1 (G0) do fazy S cyklu komórkowego, powoduje ich inaktywację i zaburzenie w przebiegu cyklu komórkowego [Krynska et al., 1998]. Antygen T wiąże się z pRB połączonym w kompleksie z czynnikiem transkrypcyjnym E2F (E2F/pRB) co prowadzi do rozbitcia kompleksu E2F/pRB. Uwolniony w ten sposób czynnik transkrypcyjny E2F aktywuje liczne geny komórkowe, odpowiedzialne za wejście komórki w fazę syntezy [White et al., 2006] (Rys. 3). Formy alternatywne dużego antygeny T, T(135), T(136), T(165) także wiążą białka z rodziny pRB oraz wzmacniają replikację wirusowego DNA [Frisque et al., 2003].

Dodatkowo, antygen T (Ag-T) wiąże białko p53, które pełni rolę w utrzymaniu integralności genomu poprzez wpływ na ekspresję czynników biorących udział w naprawie DNA w przypadku jego uszkodzenia, a gdy uszkodzenia są zbyt duże, w

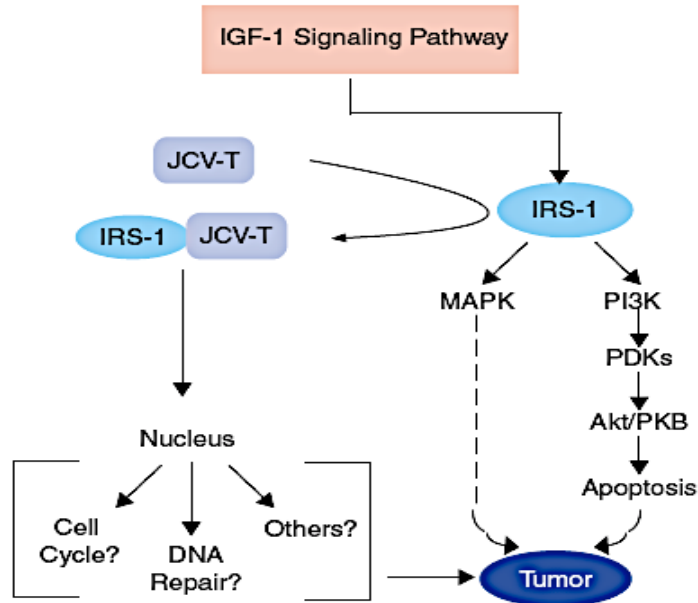
zahamowaniu podziału komórki i wyindukowaniu apoptozy [White et al., 2005]. Procesy te prowadzą do akumulowania się zmian w materiale genetycznym i niekontrolowanych podziałów komórki, która przez to może przekształcić się w komórkę nowotworową (Rys. 3).



Rysunek 3. Udział dużego białka wirusa JC - antygeny T w zablokowaniu prawidłowo funkcjonującego cyklu komórkowego (na podstawie Reiss i Khalili, 2003).

Badania donoszą także o wpływie dużego antygeny T na drogę sygnału aktywowaną przez substrat dla receptora insulinowego 1 (IGR-1 - *insulin receptor substrate 1*), główną cząsteczkę receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu I (IGF-IR - *insulin-like growth factor I receptor*) [Reiss et al., 2006]. Po przetransportowaniu IRS-IR do jądra, w czym uczestniczy duży antygen T, IRS-1 wiąże białko Rad-51 w miejscu uszkodzonego DNA powodując hamowanie jego naprawy na drodze rekombinacji homologicznej (HR - *homologous recombination*) [Reiss et al., 2006] (Rys. 4). W efekcie dochodzi do akumulacji mutacji w komórce, a wraz z nimi do niestabilności genetycznej, naruszając tym samym integralność materiału genetycznego. Zarówno wadliwa naprawa

uszkodzonego DNA, czy też defekty w zachowaniu telomerów, rozdziału chromosomów, mogą przyczynić się do rozwoju nowotworów [Reiss et al., 2006].



Rysunek 4. Rola wirusa JC w drodze przekazywania sygnału IGF-1 (na podstawie Reiss i Khalili, 2003).

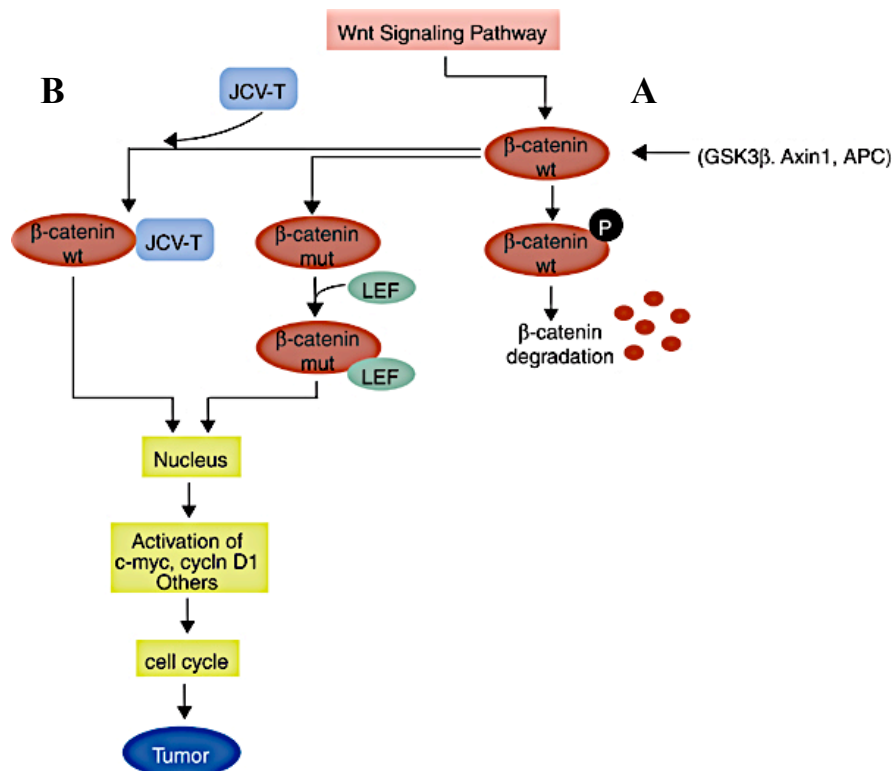
2.1. Droga przekazywania sygnału Wnt.

Droga ścieżki przekazywania sygnału Wnt odgrywa ważną rolę w regulacji proliferacji i różnicowaniu komórek [Van Es et al., 2003]. Wzrastające w ostatniej dekadzie zainteresowanie środowiska naukowego szlakiem zależnym od Wnt jest podparte licznymi badaniami wykazującymi znaczenie tej ścieżki zarówno w procesach fizjologicznych jak i patologicznych [Polakis et al., 1999]. Wykazano, że zaburzona regulacja i aktywacja tego szlaku jest związana z retinopatią, tetraamelią a także licznymi chorobami nowotworowymi, w szczególności rakiem przewodu pokarmowego [Polakis et al., 1997; Tejpar et al., 2001; Chan et al., 1999; Miyoshi et al., 1998; Morin et al., 1997].

W prawidłowo funkcjonującym organizmie gen APC (ang. *Adenomatous Polyposis Coli*) działa jako regulator cyklu komórkowego hamujący przez regulacje poziomu β -

katenuiny sygnał proliferacji pochodzący od transmembranowego białka E-kadhedryny. W przypadku utraty funkcjonalności tego genu w tkance zostaje zaburzona równowaga między podziałami i śmiercią komórki. Białkiem regulującym tworzenie kompleksu białka APC z β -katenuina jest kinaza białkowa ZW3/GSK3 β . Ufosforylowane białko APC aktywuje wiązanie β -katenuiny. Aktywność kinazy GSK3 β jest regulowane poprzez białko dsh (*Disheveled*), wchodzące w interakcje z produktem genu *WNT1*. Białko APC związane z kinazą ZW3/GSK3 β posiada zdolność hamowania transkrypcji indukowanej przez β -katenuinę. W warunkach prawidłowo funkcjonującego organizmu poziom β -katenuiny w cytoplazmie bardzo skrupulatnie kontrolowany jest przez białko APC [Munemitsu et al., 1995], axin [Zeng et al., 1997; Behrens et al., 1998] i GSK-3 β [Rubinfeld et al., 1996] (Rys. 5A) poprzez fosforylację i degradację w cytoplazmie.

W przypadku utraty funkcji produktu genu APC następuje nagromadzenie wolnej β -katenuiny w jądrze komórkowym i aktywacja m.in. czynnika transkrypcji TCF-4. Następnie komórka jest pobudzona do proliferacji w wyniku aktywacji transkrypcji genu c-myc przez TCF-4 [Van de Wetering et al., 1997] (Rys. 5B).



Rysunek 5. Ścieżka przekazywania sygnału Wnt (na podstawie Reiss i Khalili, 2003)
 A - przekazywanie sygnału w prawidłowo funkcjonującym organizmie;
 B- przekazywanie sygnału w nieprawidłowych warunkach ze wskazaniem na funkcję wirusa JC

Dowodami na to, że ścieżka zależna od Wnt ma istotne znaczenie w etiologii nowotworów są doniesienia m.in. o tym, że: (1) białko supresyjne APC jest zaangażowane w proces degradacji β -kateniny, która stabilizowana jest poprzez ścieżkę Wnt, (2) mutacje w białku APC prowadzą do stabilizacji β -kateniny oraz (3) mutacje β -kateniny związane z procesem nowotworzenia mogą prowadzić do jej stabilizacji i pozwalają kwalifikować białko to jako protoonkogen [Gao et al., 2002].

Liczne prace donoszą, iż β -katenina może wchodzić w interakcje z antygenem T [Gan i Khalili, 2004, Enam et al., 2002] (Rys. 5B). Duże białko wirusa JC stabilizuje β -kateninę i powoduje jej translokację z cytoplazmy do jądra komórkowego. W jądrze β -katenina wchodzi w interakcje ze swoistymi czynnikami transkrypcyjnymi, stymulując w ten sposób ekspresję genów, m.in. c-myc i TCF-4, którego produkt aktywuje cykl komórkowy i proliferację [He et al., 1998]. W przypadku równoczesnej produkcji i obecności tych

dwóch białek, tj. antygenem T oraz β -kateniny, dochodzi do wzmocnienia transkrypcji z promotora genu *c-myc* [Morin, 1999]. Ponadto, w nowotworach okrężnicy antygen T wirusa JC prowadzi, jak się wydaje, komórki do niestabilności genetycznej i epigenetycznej, wyłącznie poprzez interakcję m.in. z β -kateniną i p53, co przejawia się w postaci zmian chromosomalnych [Krynska et al., 1999].

3. NOWOTWORY ZWIĄZANE Z WIRUSEM JC

Bardzo dużą grupą nowotworów mających związek z wirusem JC są guzy mózgu. Liczne eksperymenty na modelach zwierzęcych dowiodły potencjalnie ważną funkcję wirusa JC w etiologii tych nowotworów. Kluczową rolę w nowotworzeniu odgrywa duże białko antygeny T [White et al., 2005]. Przeprowadzone badania donoszą o wysokiej częstotliwości występowania sekwencji genu VP1 oraz sekwencji TCR wirusa JC w guzach mózgu, co może sugerować, iż wirus JC jest czynnikiem etiologicznym tych nowotworów [Boldorini et al., 2005, Croul et al., 2003]. Dla przykładu, około 70% pacjentów z różnymi nowotworami mózgu wykazuje obecność sekwencji genów wczesnych wirusa JC w tych tkankach [Del Valle et al., 2004]. Inne badania donoszą o występowaniu sekwencji DNA charakterystycznych dla poliomawirusów w 50% badanych próbkach różnych guzów mózgu, z czego 40.6% było swoiste dla wirusa JC [Delbue et al., 2005]. Sekwencje te wyizolowano z takich nowotworów jak: rdzeniak (z łac. *medulloblastoma*), wyściółczak (z łac. *ependymoma*) czy glejak wielopostaciowy (z łac. *glioblastoma*).

Wirus JC może odgrywać ważną rolę w nowotworzeniu nie tylko do guzów mózgu. Wyniki przedstawione przez Del Valle i współpracowników na Uniwersytecie Temple wykazują obecność białek wirusowych w komórkach rakowych przewodu pokarmowego w tym żołądka, jelita grubego, przełyku a także piersi, płuc, wątroby, jajników a także skóry (Tabela 1.).

W badaniach dotyczących nowotworów przełyku (z łac. *esophageal carcinomas*) duży antygen T wirusa JC wykryto w 10 z 19 analizowanych próbek (53%) [Del Valle et al., 2005]. W żadnej z 51 próbek z przełyku, z normalną tkanką czy też ze zmianami

łagodnymi i przedrakowymi, nie stwierdzono obecności tego białka wirusowego [Del Valle et al., 2005]. Natomiast w wyniku analizy sekwencji DNA wirusa JC w wybranych 5 próbkach pochodzących z raka przełyku ustalono, że DNA JCV występuje we wszystkich próbkach (100%), a w badanych 13 próbkach kontrolnych w 11 z nich (85%) [Del Valle et al., 2005]. Tak duża częstość występowania wirusa JC w tkankach przełyku może potwierdzać hipotezę jego wnikania do organizmu drogą pokarmową [Boffi-Mass et al., 2001; Del Valle et al., 2005].

Podobnie jak w nowotworach przełyku, w nowotworach żołądka (z łac. *gastric cancers*) również stwierdzono następującą prawidłowość: obecność sekwencji DNA wirusa JC swoistych dla genu antygeny T w tkance nowotworowej i w otaczającej nowotwór tkance normalnej, ale tylko w tkance nowotworowej wykazano ekspresję antygeny T [Shin et al., 2006]. Z 37 analizowanych próbek nowotworu żołądka, sekwencje DNA swoiste dla dużego antygeny T JCV znaleziono w 21 (57%), a w badanych 23 próbek, dotyczących obecności białka T-Ag, w 9 uzyskano pozytywny wynik (39%) [Shin et al., 2006]. Ponadto, doniesienie na temat wykrycia sekwencji DNA wirusa JC w nabłonku gruczołowym prostaty stwarza możliwość udziału wirusa JC w kancerogenezie tego gruczołu [Zambrano et al., 2002].

Tabela 1. Rezultaty barwienia immunohistochemiczne preparatów z tkanek nowotworowych przeciwko białkom wirusa JC (opracowane na podstawie Del Valle i Khallili, 2010).

Tumor	Total cases	T-antigen
AccuMax A221(II) brain cancer tissues		
Pilocytic astrocytomas	8	0
Diffuse fibrillary astrocytomas	2	1
Anaplastic astrocytomas	7	4
Glioblastoma multiforme	13	6
Normal brain	2	0
AccuMax A203(I) colon cancer tissues		
Adenocarcinomas	50	17
Normal colon	2	0
AccuMax A201 various cancer tissues		
Glioblastoma multiforme	2	1
Esophageal carcinoma	2	1
Larynx squamous cell carcinoma	2	0
Thyroid papillary carcinoma	2	2
Thyroid follicular carcinoma	2	2
Breast ductal carcinoma	1	0
Breast lobular carcinoma	1	1
Gastric adenocarcinoma	2	0
Gastric signet ring cell carcinoma	2	0
Pancreatic adenocarcinoma	2	0
Lung squamous cell carcinoma	2	2
Lung adenocarcinoma	2	0
Poorly differentiated lung tumors	2	2
Hepatic colangiocarcinoma	1	0
Hepatic adenocarcinoma	1	0
Hepatocarcinoma	2	0
Kidney Wilm's tumor	1	1
Renal cell carcinoma	1	0
Ovary serous adenocarcinoma	2	1
Ovary mucinous adenocarcinoma	2	0
Endometrial squamous cell carcinoma	2	0
Endometrial adenocarcinoma	2	0
Colon adenocarcinoma	2	0
Rectal maltoma	1	0
Cecal adenocarcinoma	1	0
Dermatofibrosarcoma protuberans	1	0
Skin squamous cell carcinoma	1	0

Inne doniesienia wskazują, że obecność antygenu T-Ag w komórkach raka okrężnicy wpływa na wzór metylacji materiału genetycznego [Goel et al., 2006; Strazzullo et al., 2003]. W stu przebadanych próbkach tego nowotworu ze stwierdzonymi niestabilnościami mikrosatelitarnymi i chromosomalnymi sekwencje DNA właściwe dla antygenu T wirusa JC wykryto metodą PCR w 77% przypadków [Goel et al., 2006]. Następnie metodą immunohistochemiczną w 56% tych pozytywnych przypadków potwierdzono obecność dużego antygenu T [Goel et al., 2006]. Ponadto sprawdzono wzór metylacji regionów promotorowych dziewięciu genów supresorowych, których zmieniona ekspresja ma

znaczenie w powstawaniu raka okrężnicy i stwierdzono znaczącą korelację pomiędzy obecnością antygeny T, a stopniem metylacji promotorów tych genów, w porównaniu z próbkami, w których nie wykryto dużego białka wirusowego antygeny T [Goel et al., 2006].

W przypadku infekcji poliomawirusami postulowany mechanizm transformacji nowotworowej polega na tym, że JCV obecny w przewodzie pokarmowym uaktywnia się w przypadku zmian nowotworowych, lub wywołuje je, i poprzez swoje białko dużego antygeny T prowadzi do wyżej wymienionych procesów uszkadzających materiał genetyczny [Niv et al., 2005]. Kiedy w ich wyniku w komórkach nowotworowych dojdzie do inaktywacji wystarczającej liczby tkankowo-swoistych genów hamujących proces nowotworzenia, co zapewnia rozwój nowotworu, dalsze transformacje materiału genetycznego spowodowane działaniem wirusa JC mogą być potencjalnie niebezpieczne dla komórek nowotworowych i w jakiś sposób, metodą selekcji pozbywają się one wirusa [Niv et al., 2005].

4. ZNACZENIE MECHANIZMÓW NAPRAWY DNA W PROCESIE NOWOTWORZENIA

Genomy wszystkich organizmów narażone są na działanie czynników mających zdolność uszkadzania i modyfikacji DNA. Wszystkie uszkodzenia DNA w mniejszym lub większym stopniu zmieniają strukturę chromosomów i zaburzają procesy ich replikacji. Ponieważ replikacja DNA zawierającego uszkodzenia wiąże się z ryzykiem powstania mutacji, obecność takich uszkodzeń jest szczególnie niebezpieczna w komórkach dzielących się.

Komórki dysponują detektorami uszkodzeń DNA i po ich wykryciu uruchamiają kilka typów odpowiedzi. Podstawową odpowiedzią komórki na uszkodzenia DNA jest jego naprawa, pozwalająca na usunięcie uszkodzenia i odtworzenie prawidłowej struktury DNA. Jednocześnie z zainicjowaniem naprawy, w komórkach uruchomione są mechanizmy prowadzące do zablokowania cyklu komórkowego (*checkpoint control system*). Zablokowanie cyklu komórkowego wydłuża czas na naprawę DNA przed

replikacją i podziałem chromosomów. Uszkodzenia DNA, które nie mogą być naprawione są często eliminowane razem z całą komórką na drodze apoptozy.

Populacja ludzka cechuje się polimorfizmem wielu *loci* genowych, w tym genów kodujących białka związane z procesami o kluczowym znaczeniu dla przeżycia komórki. Osoby mające niektóre warianty polimorficzne ponoszą większe ryzyko rozwoju nowotworów w przypadku ekspozycji na substancje toksyczne niż osoby z bardziej dopasowanymi allelami.

Obniżona zdolność naprawy DNA może być również powodowana występowaniem określonych wariantów polimorficznych białek uczestniczących w szlaku naprawy DNA. Zwykle polimorficzne wersje cechują się aktywnością zbliżoną do typu dzikiego, jednak w przypadku występowania takich wariantów w wielu *loci* i ekspozycji na czynniki uszkodzające, ryzyko rozwoju choroby nowotworowej może być większe, co potwierdzają dane epidemiologiczne. Spośród genów związanych ze szlakiem naprawy DNA, liczne występują jako warianty polimorficzne, niektóre mają nawet po kilka miejsc podstawień aminokwasowych.

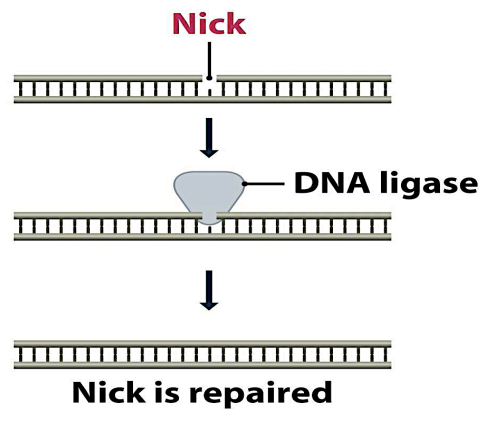
Zmiany DNA powstające w wyniku oddziaływania czynników uszkodzających oraz błędów replikacji mogą mieć dla komórki poważne konsekwencje. Aby możliwe było jej przetrwanie konieczne jest istnienie systemów naprawy DNA usuwających uszkodzenia i zmniejszenie częstości mutacji. Systemy te wykazują dużą specyficzność substratową i specjalizację.

4.1. Mechanizmy naprawy DNA

4.1.1. Naprawa przez bezpośrednią rewersję uszkodzeń

Jest to proces jednoetapowy i nie wymaga usunięcia zmienionych zasad azotowych DNA. U ssaków uczestniczy w niej metyltransferaza O6-metyloguaniny DNA (MGMT - *O6-methylguanine-DNA methyltransferase*) oraz obecne u niektórych grup systematycznych fotolizy, ich aktywności nie stwierdzono jednak u człowieka [Von Wronski et al., 1991]. Komórki, które wykazują defektywną budowę MGMT są szczególnie wrażliwe na czynniki alkilujące, a organizmy które nie wykazują obecności

aktywnego kompleksu są bardziej podatne na rozwój nowotworów [Tsuzuki et al., 1996]. Owy typ naprawy uszkodzonego DNA schematycznie przedstawia Rys. 6.



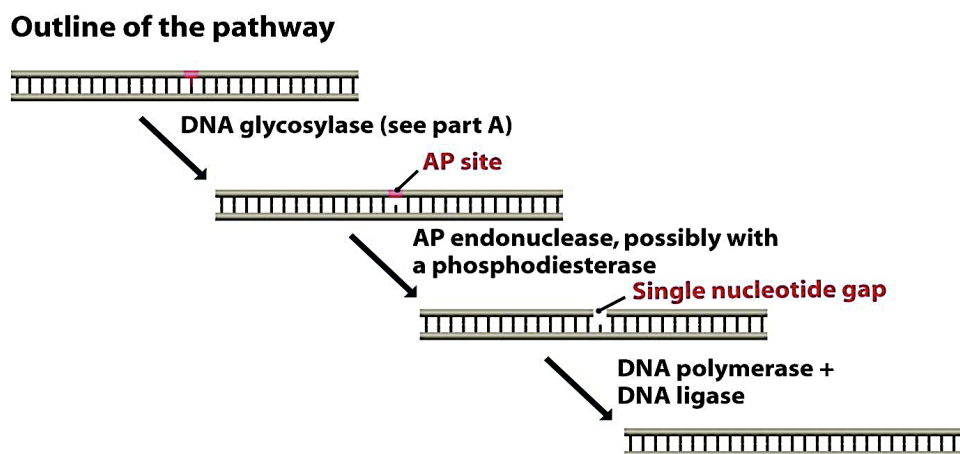
Rysunek 6. Mechanizm bezpośredniej naprawy DNA. (na podstawie Garland Science, 2007).

4.1.2. Naprawa przez wycinanie zasad azotowych.

Naprawa przez wycinanie zasad azotowych służy głównie do usuwania nieskomplikowanych, lecz niebezpiecznych w skutkach uszkodzeń DNA, jakimi są utlenione i N-alkilowane zasady azotowe. Naprawa zaczyna się od rozpoznania uszkodzonej lub niewłaściwej zasady przez specyficzny substratowo enzym – glikozylazę DNA. Dokonuje ona hydrolizy wiązania N-glikozydowego między zmodyfikowaną zasadą a resztą cukrową, prowadząc do utworzenia w łańcuchu DNA miejsca AP [Scharer et al., 2001]. Następny etap związany jest z usunięciem grupy 5- deoksyfosforanowej (dRp) przez enzym o aktywności deoksyrybofosfodiesterazy (polimeraze DNA- β z aktywnością liazy dRp oraz prawdopodobnie glikozylaze OGG1) [Matsumoto et al., 1998]. Po wypełnieniu luki dalsza naprawa przebiega wg dwóch odrębnych szlaków – podstawowego lub alternatywnego, jest to zależne od struktury 5' dRp [Nakamura et al., 2000].

W przypadku szlaku podstawowego następuje zastąpienie zmodyfikowanego nukleotydu prawidłowym, co stanowi ostatni etap naprawy. Natomiast szlak alternatywny

różni się od podstawowego przede wszystkim wymianą aż 2-10 nukleotydów. Proces naprawy przez wycinanie zasad azotowych schematycznie przedstawia Rys. 7.



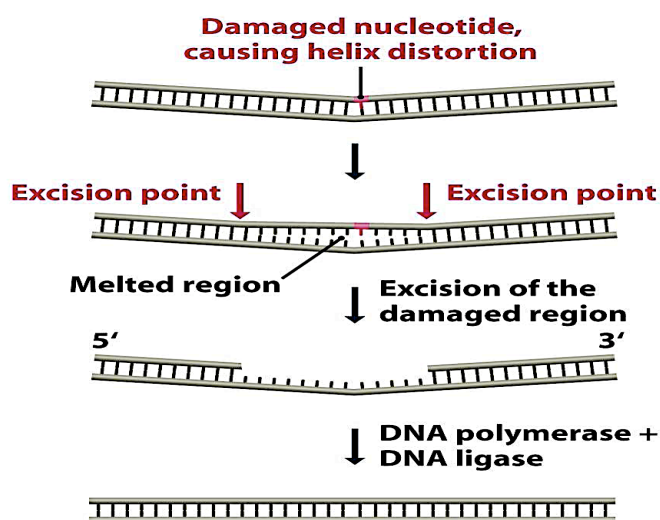
Rysunek 7. Naprawa uszkodzeń DNA przez wycinanie zasad azotowych (na podstawie Garland Science, Genome 3, 2007).

Główne geny zaangażowane w ten proces to m.in. OGG1, który ma kilka miejsc polimorficznych [Kohno et al., 1998]. Jedno z nich, 326 Cys [Janssen et al., 2001] szczególnie zwiększa ryzyko rozwoju kilku typów nowotworów [Goode et al., 2002], m.in. nowotwór płuc, przełyku i prostaty [Xing et al., 2002]. Kolejnym genem biorącym udział w naprawie DNA przez wycinanie zasad azotowych jest XRCC. Polimorfizm w pozycji 399 (ekson 10) jest związany z powstaniem Arg – Gln w domenie BRCT i może mieć wpływ na ryzyko rozwoju choroby nowotworowej, powodując zarówno jego wzrost, jak i spadek, w zależności od typu i lokalizacji raka [Goode et al., 2002].

4.1.3. Naprawa przez wycinanie nukleotydów

System naprawy przez wycinanie nukleotydów pozwala na usuwanie wielu rodzajów uszkodzeń, w tym bardzo złożonych m.in. foto-produktów, wewnątrznicowych wiązań, dużych adduktów powstałych w wyniku ekspozycji na aflatoksyny [Huang et al., 1994]. Naprawa obejmuje rozpoznanie uszkodzonego nukleotydu, jego wycięcie oraz syntezę

nowej nici DNA na matrycy nici komplementarnej. W proces ten zaangażowanych jest wiele białek, których uszkodzenie lub brak wiąże się z nadwrażliwością i rozwojem poważnych chorób, m.in. syndrom Cackayne'a [Vermeulen et al., 1994]. Szlak podstawowy jest niezależny od transkrypcji, umożliwia więc usuwanie uszkodzeń z nietranskrybowanych fragmentów genomu oraz nici kodującej (nietranskrybowanej) transkrybowanych obszarów DNA. Szlak sprzężony z transkrypcją uczestniczy w usuwaniu uszkodzeń blokujących syntezę mRNA prowadzoną przez polimerazę RNA II [Bohr et al., 1985]. Schematycznie proces ten przedstawiony jest na rysunku 8.



Rysunek 8. Schemat naprawa DNA przez wycinanie nukleotydów (na podstawie Garland Science, Genome 3, 2007).

Gen XPD koduje helikazę DNA, która uczestniczy między innymi w szlaku naprawy przez wycinanie nukleotydów. W obrębie genu XPD stwierdzono dotychczas istnienie 17 miejsc polimorficznych. Według niektórych badań allel 751GLN obniża ryzyko rozwoju niektórych nowotworów (m.in piersi), wg innych właściwości ochronne ma wariant 751 Gln [Spitz et al., 2001]. Dane uzyskane dla osób z nowotworami powiązanych z paleniem tytoniu wykazują, że wariant 751Gln zwiększa ryzyko rozwoju u osób niepalących,

natomiast ma właściwości ochronne u palących tytoń [Stern et al., 2002]. Nie została zaobserwowana wyraźna korelacja pomiędzy występowaniem wariantem owego genu a rozwojem choroby nowotworowej [Godde et al., 2002].

4.1.4. Naprawa przez rekombinację.

Podwójne pęknięcia nici DNA (DSBs DNA - *double-strand breaks DNA*) jest typem uszkodzenia, podczas którego dwie komplementarne nici podwójnej helisy DNA ulegają jednoczesnemu zniszczeniu w miejscach położonych blisko siebie. DSB należy do najbardziej niebezpiecznych uszkodzeń materiału genetycznego. Dane literaturowe wskazują na to iż, jedno podwójne pęknięcie nici wystarcza do indukcji procesu apoptozy komórki [Sonoda et al., 1998]. DSB może być wywołane przez czynniki fizyczne lub chemiczne, mogą także zaistnieć w prawidłowych komórkach jak np. podczas różnicowania limfocytów czy komórek rozrodczych. Pęknięcia te mogą powodować utratę części chromosomów oraz translokację materiału genetycznego między nimi. Ponadto są one silnymi induktorami programowanej śmierci komórki [Dikomey et al., 1998]. U eukariotów istnieją dwa główne szlaki naprawy pęknięć dwuniciowych – rekombinacja homologiczna (*homologous recombination* – HR) oraz rekombinacja niehomologiczna (*nonhomologous end-joining* – NHEJ).

4.1.4.1. Rekombinacja niehomologiczna (NHEJ)

Szlak naprawy DNA na drodze rekombinacji niehomologicznej umożliwia połączenie pękniętych nici, nie wymagających istnienia homologii między nimi. System ten cechuje się małą wiernością odtwarzania sekwencji wyjściowej. Pomimo tego może on stanowić główny szlak naprawy pęknięć dwuniciowych w komórkach ssaków [Jeggo et al., 1991].

W NHEJ bierze udział kompleks białkowy, który kieruje ligazę DNA do miejsca pęknięcia. W skład kompleksu wchodzi dwie cząsteczki białka Ku70 i Ku80, wiążące się z końcami DNA po obu stronach pęknięcia i powodujące zbliżanie do siebie obu końców

przerwanej cząsteczki DNA. Białko Ku wiąże się z DNA wraz z kinazą białkową DNA-PKCS, aktywującą trzecie białko, XRCC4, które oddziałuje z ligazą DNA IV, kierując to białko naprawcze w miejsce dwuniciowego pęknięcia. Proces ten jest niedokładny i często powoduje zmiany w sekwencji DNA, które mogą być rejestrowane jako wymiany chromatyd siostrzanych [Frank et al., 1998].

4.1.4.2. Rekombinacja homologiczna (HR)

Drugim sposobem naprawy DSBs jest system rekombinacji homologicznej. Po zajściu pęknięcia, na każdej z dwóch nici zachodzi wycięcie wielu nukleotydów. W efekcie pozostają w niej jednoniciowe końce 3'. Jeden z końców dokonuje inwazji homologicznej cząsteczki DNA (np. przez polimerazę DNA), tworząc strukturę Hollidaya, która może się przemieszczać wzdłuż heterodupleksu. Aby uzupełnić heterodupleks, druga z nici, która nie brała udziału w tworzeniu struktury Hollidaya, również jest wydłużana. W reakcji syntezy DNA wydłużanie nici odbywa się z użyciem odpowiednich obszarów nieprzeciętego elementu jako matrycy. Powstający po ligacji heterodupleks zawiera dwie struktury Hollidaya, które mogą być rozłączone wieloma sposobami. HR jest procesem efektywnym, charakteryzującym się dużą wiernością w odtwarzaniu informacji. Jednak naprawa w szlaku HR wymaga znacznie więcej czasu niż w systemie NHEJ, który częściej występuje u Eukariota. Naprawa typu HR wymaga występowania nieuszkodzonego, homologicznego, dwuniciowego fragmentu DNA [Brown, 2009].

4.2. Rola białka Rad-51 w naprawie podwójnych pęknięć nici DNA na drodze HR

Najważniejszym białkiem biorącym udział w naprawie przez rekombinację homologiczną jest Rad-51, stanowiący główny składnik kompleksu rekombinacyjnego z białkami pomocniczymi z jednoniciowym fragmentem powstałym na końcu uszkodzonej cząsteczki DNA, tworząc kompleks presynaptyczny, po czym rozpoznaje homologiczną sekwencję w obrębie nieuszkodzonej cząsteczki. Powstanie kompleksu rekombinacyjnego

ułatwiają białka pomocnicze będące paralogami RAD51, w tym RAD51B, C, D, XRCC2 i XRCC3 [Masson et al., 1998; Wiese et al., 2002].

Gen RAD51 zlokalizowany jest na chromosomie 15 (15q15.1), zajmuje 36,99 kpb. Rad-51, białko o masie cząsteczkowej 37 kDa składające się z 339 reszt aminokwasowych [Shinoshara et al., 1993], odgrywa kluczową rolę w naprawie dwuniciowych pęknięć DNA przez HR oraz w rekombinacji DNA w trakcie mitozy i mejozy. Białko to stanowi główny komponent kompleksu rekombinacyjnego RAD51/ /RAD52/RPA.

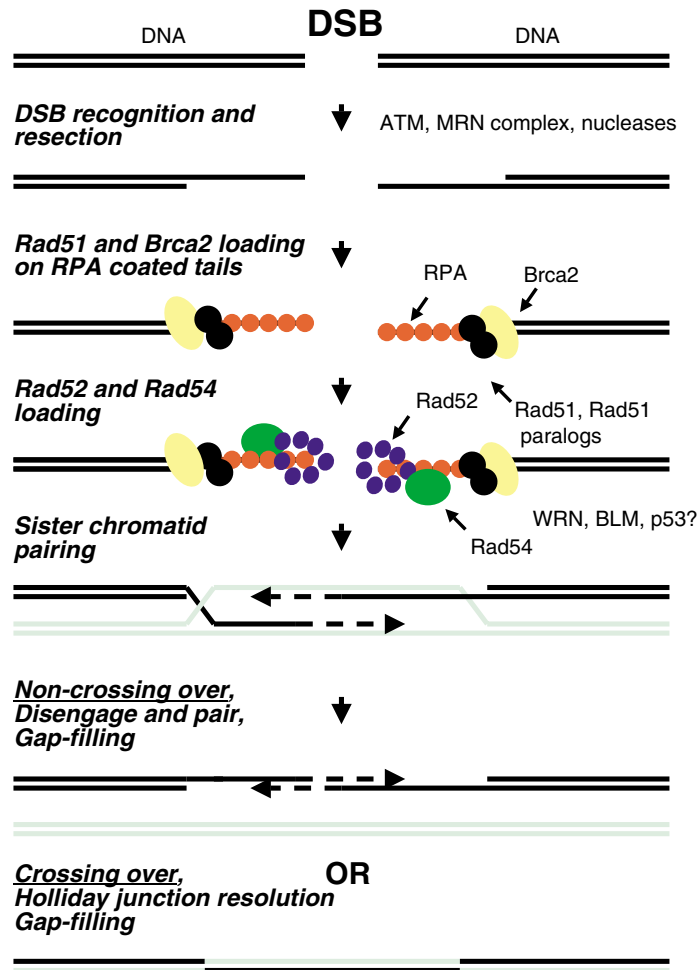
Białko Rad-51 uczestniczy w poszukiwaniu regionów homologii między niciami, tworzeniu kompleksu presynaptycznego (w którego skład wchodzi nica mająca ulec wymianie oraz białka związane z rekombinacją) oraz trójniciowego kompleksu synaptycznego. RAD51 promuje wymianę nici (w kierunku 3' → 5' w stosunku do nici tworzącej kompleks presynaptyczny), w trakcie której powstaje heterodupleks i pętla D.

Naprawę na drodze HR uważa się za wolną od błędów i najbardziej aktywną pod koniec S/G2 cyklu komórkowego [Et i Takata., 1998]. HR wiąże się ze znaczną liczbą białek, w tym RAD51, RAD52, RAD54, BRCA1, BRCA2, RAD51 paralogi RAD51b, c, d, XRCC2 i XRCC3 oraz kompleks białkowy - MRN [Karran, 2000; Thompson i Schild, 2001]. Oprócz tych wyżej wymienionych czynników, które są bezpośrednio zaangażowane w naprawę, istnieją liczne cząsteczki i białka które działają na zasadzie "czujników" uszkodzeń DNA. Są one często zaangażowane w regulację cyklu komórkowego przez co mogą samodzielnie regulować proces naprawy. Do "czujników" tych zaliczamy między innymi ATM, ATR i DNA-PKCS [Durocher i Jackson, 2001].

Jednym z najwcześniejszych etapów odpowiedzi komórkowej na uszkodzenie nici DNA jest fosforylacja białka ATM (ang. *ataxia telangiectasia mutated*). Białko ATM przekazuje sygnał o uszkodzeniu, w wyniku którego dochodzi do fosforylacji szeregu innych białek, m.in. p53 i Chk2 uczestniczących w regulacji punktów kontrolnych cyklu komórkowego G1/S i G2/M. Tworzy się wówczas kompleks funkcjonalny z białkami hMRE11, hRAD50, Rad-51 zwany MRN [Paull et al., 2005]. Białko MRE11 wykazuje aktywność egzo- i endoneklazy, przygotowując końce pękniętych nici DNA do ponownego połączenia po naprawieniu uszkodzeń [Paull et al., 1998]. Białko RAD51 wchodzi w skład rodziny białek tzw. kompleksu zachowania stabilności chromosomów i

jest elementem składowym kompleksu MRN. Lokalizuje miejsca uszkodzenia przez wiązanie z białkiem histonowym γ H2AX i przekazaniu sygnału do reszty składowych kompleksu MRN [De Jager M et al., 2001].

Kompleks MRN, najprawdopodobniej przy pomocy innych nukleaz, powoduje cięcie DNA w celu zapewnienia ssDNA lepkich końców, które później następują wymiany i łączenia. Kompleksy MRN ma właściwości replikacyjne od końca 3' -5' ale nigdy 5' -3', dlatego też, przypuszcza się, iż w proces ten mogą być zaangażowane inne nukleazy. Następnie BRCA2, łączy się do DSB poprzez BRCA1, dzięki czemu łączenie białka RAD51 do lepkich końców DNA jest znacznie ułatwione. W etap ten zaangażowane są także RAD52 i RAD54, które także łączą się do DNA prawdopodobnie za pomocą BLM i/ lub helikazy WRN. Wiele prac donosi o interakcji białka supresorowego p53 z BRCA1, RAD51, BLM i WRN, a także bezpośrednio do DNA. Interakcja ta powiązana jest z prawidłową kontrolą cyklu komórkowego. W tym momencie są dwie możliwości, aby zakończyć HR: (1) albo non-crossing-over, łączenie końców DNA i następnie wypełnienie luki, lub (2) przez crossing-over. Nie jest wiadomo, które polimerazy DNA i ligazy zaangażowane są w procesie polimeryzacji i ligacji (Rys. 9).



Rysunek 9. Schemat naprawy DNA na drodze homologii rekombinacyjnej (na podstawie Valerie K i Povirk L.F, 2003).

5. GLEJAK WIELOPOSTACIOWY (łac. *Glioblastoma multiforme*)

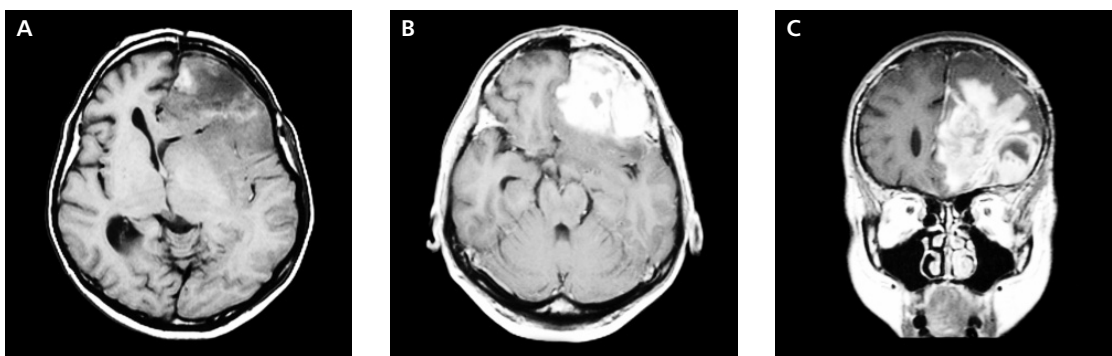
5.1. Charakterystyka i występowanie

Glejak wielopostaciowy (łac. *glioblastoma multiforme*, GBM) jest najczęściej występującym pierwotnym nowotworem złośliwym mózgu pochodzenia glejowego. Histologicznie jest jednym z najbardziej złośliwych guzów mózgu o najwyższym, IV stopniu złośliwości, wg Światowej Organizacji Zdrowia. Średni czas przeżycia wynosi około 50 tygodni, natomiast tylko w niektórych przypadkach chory przeżywa dłużej niż

2/3 lata [Reis et al., 2001; Walker et al., 1999]. Jego odmiany stanowią około 10–18% wszystkich guzów wewnątrzczaszkowych oraz 50–60% nowotworów gleju gwiaździstego.

Glejaki wielopostaciowe mogą powstawać w dowolnym miejscu mózgu, zwykle wykazując rozrost w kierunku podkorowym. Są guzami o największym stopniu złośliwości i inwazyjności, rosnącymi szybko i naciekającymi sąsiednie struktury (nie wyłączając opon). Niejednorodna struktura guza jest spowodowana obecnością licznych ognisk martwicy, obrzęku i krwawienia; może wystąpić wodogłowie. Rosnąc obustronnie w obrębie ciała modzelowatego, w obrazowaniu guz przypomina kształtem motyla (butterfly glioma). W obrazach TK i MR charakteryzuje się niejednorodnym współczynnikiem osłabienia -sygnałem związanym z obecnością zmian wstecznych, nieregularnymi granicami i rozległą strefą obrzęku; ulega silnemu, niejednorodnemu, zazwyczaj brzeżnemu wzmocnieniu kontrastowemu [Walecki, 2007].

Ten typ wzrostu guza utrudnia całkowitą chirurgiczną resekcję glejaka, stąd częste wznowienia guzów. Przerzuty GBM poza ośrodkowy układ nerwowy są bardzo rzadkie i obejmują mniej niż 0.5% przypadków [Cokgor et al., 1998].



Rysunek 10. Glejak wielopostaciowy u 42 letniej kobiety operowanej 15 miesięcy wcześniej z powodu glejaka lewej okolicy czołowej (na podstawie Walecki J., 2007).

A- guz w lewym płacie czołowym o zróżnicowanym sygnale wskazującym na obecność methemoglobiny (przebyte krwawienie) oraz z obszarami rozpadu; obrzęk III, efekty z wgłobieniem pod sierp mózgu;

BC - zdjęcie po podaniu środka kontrastowego silne wzmocnienie kontrastowe litej części guza ujawniające hipointensywne obszary rozpadu oraz naciekanie opon.

Typową cechą tych guzów są duże i liczne ogniska martwicy. Obserwuje się także zwyrodnienia tłuszczowe, świeże albo starsze ogniska krwotoków (makroskopowo daje to dużą różnorodność obrazów), bardzo często rozszerzający się obwodowo duży obrzęk okółoguzowy. Rozpoznanie glejaka wielopostaciowego wymaga spełnienia kilku kryteriów histologicznych: atypii jądrowej, dużej aktywności mitotycznej, proliferacji (namnażania się) mikronaczyń i/lub ognisk martwicy. Glejak wielopostaciowy bywa niekiedy tak mocno unaczyniony, że przypomina malformację naczyniową lub zawał mózgu ze strefą nadmiernego przepływu.

Dotychczas stosowane metody leczenia glejaków mózgu nie pozwalają na wyleczenie lub znaczne przedłużenie czasu przeżycia chorego. Ich najbardziej złośliwa postać, jaką jest glejak wielopostaciowy, ogranicza czas przeżycia chorego do kilkunastu miesięcy, co uległo niewielkiej zmianie w ciągu ostatnich kilku lat pomimo postępów w neurochirurgii, radio- i chemioterapii. Rokowanie w przypadkach złośliwych glejaków jest wciąż niepomyślne. Dlatego niezwykle istotne jest poznanie różnych aspektów nowotworzenia celem poszukiwania nowych możliwości terapii tych guzów. Postępy biologii molekularnej otwierają nowe możliwości leczenia jak i poznanie przyczyn występowania tej choroby.

5.2. Molekularne podstawy rozwoju glejaka wielopostaciowego.

Brak koordynacji takich procesów jak proliferacja, różnicowanie czy śmierć komórki może spowodować nowotworzenie. Przeważająca większość nowotworów jest wynikiem powstania krytycznego fenotypu zawierającego nagromadzenie mutacji DNA prowadzącej do nadmiernej proliferacji komórek, braku starzenia, kontroli nad apoptozą, nadmiernej angiogenezy. Takie fenotypy komórkowe prowadzi do powstania guza [Del Valle et al., 2004; Nupponen, 2006].

Nowotworowa transformacja komórek glejowych wymaga przekształceń DNA, mutacji w onkogenach powodujących reorganizację wielu właściwości komórkowych i zmieniających formę ekspresji genów. Zatem geny krytyczne dla fenotypu komórkowego mogą być rozpoznane poprzez analizę drogi sygnałowej. Wewnątrzkomórkowy szlak p53

chroni komórkę przed złośliwą transformacją indukując zahamowanie cyklu komórkowego. Przerwanie tej drogi zwiększa niestabilność genetyczną komórki. W glejaku wczesnie dochodzi do mutacji p53 [Makino et al., 2006]. W GBM prawie zawsze dochodzi do zaburzenia drogi EGFR. Amplifikacje tego genu charakteryzują szczególnie pierwotnego GBM. Są spotykane także we wtórnych GBM [Nathoo et al., 2004]. Droga sygnałowa Hedgehog jest decydująca dla utrzymania właściwego stanu komórek nerwowych a jej zaburzenie prowadzi również do nowotworzenia. Czynnikiem zaburzającym drogę Hedgehog są geny Gli1. W GBM obserwowano obecność wielu kopii tego genu [Marcotullio et al., 2006]. Stwierdzono również, że zaburzenie wewnątrzkomórkowego szlaku kinazy 3 fosfatydyloinozytolu (PI3K) jest niezwykle częste w glejakiach mózgu, a szczególnie w glejaku wielopostaciowym. Celowana terapia hamująca receptory kinaz tyrozynowych (RTK) powodująca hamowanie szlaku sygnałowego PI3K może być wykorzystywana w leczeniu tych guzów [Stommel et al., 2007]. W glejaku złośliwym wykazano także przerwanie szlaku retinoblastoma (Rb), gdzie gen retinoblastoma pełni rolę supresorową [Nevins, 2001].

Ostatnie prace donoszą o roli wirusa JC w procesie nowotworzenia. W kilku niezależnych laboratoriach udowodniono obecność białek wirusowych w tkankach nowotworowych, w tym także w guzach glejaka wielopostaciowego.

Poznanie funkcji wirusa JC, a w szczególności jego onkogennego białka antygeny T, w procesie transformacji komórek ludzkich, mogłoby odegrać znaczącą rolę w walce z tymi nowotworami.

IV. MATERIAŁY I METODY

1. METODYKA

1.1. Uzasadnienie wyboru modelu badawczego

W ponad 50% wycinków histopatologicznych tkanek nowotworowych wykryto obecność genu wirusa JC kodującego białko antygen T [Del Valle et al., 2001]. Sugeruje to, na potencjalny udział białka wirusowego w rozwoju niektórych nowotworów. Do zbadania roli antygeny T w nowotworzeniu wybrano ludzką linię glejaka wielopostaciowego - U87-MG gdyż:

- sekwencje genomu wirusa JC zostały wykryte zarówno w zdrowych jak i nowotworowych tkankach mózgu [Perez-Liz et al., 2008; Laghi et al., 1999];
- wykazano ekspresję białek wirusowych w komórkach glejaka wielopostaciowego [Del Valle et al., 2001; Enam et al., 2002];
- udowodniono rolę białka wirusowego antygeny T w procesie onkogenezy w modelach zwierzęcych, głównie poprzez deregulację ścieżki przekazywania sygnału Wnt, deregulację poziomu β -kateniny, jak również zmian w mechanizmach naprawy uszkodzonego DNA [Darbinyan et al., 2007; Gan et al., 2001];
- praca z komórkami glejaka U87-MG, w warunkach *in vitro*, jest dużo łatwiejsza w porównaniu z innymi liniami nowotworów złośliwych;
- komórki U87-MG bardzo łatwo podlegają transfekcji z plazmidem kodującym białko antygeny T;

Komórki ludzkiej linii glejaka wielopostaciowego - U87-MG zostały stabilnie transfekowane plazmidem kodującym białko dużego antygeny T, dzięki czemu wykazywały jego stabilną ekspresję. Jako linię kontrolną, użyto ludzką linię glioblastomy transfekowaną wektorem pustym, nie wykazującym ekspresji białka wirusowego.

Utworzony model badawczy pozwala na łatwą kontrolę nad ekspresją białka wirusowego, antygeny T.

1.2. Uzasadnienie wyboru stężeń doksycykliny i cisplatyny.

W doświadczeniach użyto stężenia doksycykliny równe 1 µg/ml, opierając się na danych literaturowych [Cunningham et al., 1997]. Stężenie to powoduje aktywację systemu pTet-ON i nie wpływa negatywnie na proliferację komórkową.

Stężenie cisplatyny użytej w doświadczeniach do wywołania podwójnych pęknięć DNA i aktywacji białka Rad-51, zostało ustalone na podstawie danych literaturowych [Trojanek et al., 2006] i wynosiło 1 µg/ml.

Prace podzielono na trzy części eksperymentalne: część (1) demonstrująca efektywność systemu pTet-ON i efekt ekspresji antygeny T na fizjologię komórek ludzkiej linii glejaka wielopostaciowego; część (2) obejmuje aspekty związane z ekspresją białek i poziomem mRNA antygeny T, Rad-51 i β-kateniny a także wzajemne ich oddziaływanie, oraz część (3) mającą wykazać wpływ współoddziaływania białek antygeny T i β-kateniny na uszkodzenie i naprawę podwójnych pęknięć nici DNA.

2. MATERIAŁY

2.1. Linie komórkowe i warunki ich hodowli.

Ludzką linię glejaka wielopostaciowego U87-MG z aktywowanym przez doksycyklinę antygenem T, hodowano w medium Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) z dodatkiem 10% bydlęcej surowicy płodowej, penicyliny (50 U/ml) i sterptomycyny (50 ng/ml) i dodatkiem 1 µg/ml doksycykliny, w temperaturze 37°C i atmosferze o 7% zawartości CO₂. Odczynniki do hodowli komórek, zbuforowany roztwór soli fizjologicznej (PBS) i roztwór trypsyny z EDTA pochodziły z firmy Invitrogen (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) oraz Sigma (Sigma, St Louis, MO, USA).

2.2. Plazmidy

W doświadczeniach wykorzystano następujące plazmidy:

- pLEGFP-N1 (Clontech Laboratories Inc, Mountain View, CA, USA) - plazmid ekspresyjny białka EGFP (ang. *enhance green fluorescent protein*), używany do kontroli wydajności transfekcji komórek;
- pRL-CMV (Promega, Medison, WI, USA) - plazmid ekspresyjny lucyferazy parzydełkowca *Renilla renformis*, używany do kontroli wydajności transfekcji w doświadczeniach z oznaczeniem aktywności lucyferazy;
- pCS2MT4145 (Upstate, Lake Placid, NY, USA) - plazmid kodujący białko β -kateninę;
- pcDNA3-JCT (Promega, Medison, WI, USA) - plazmid kodujący białko antygeny T wirusa SV40 (JC);
- pCMV-His6-Rad51 Clontech Laboratories Inc, Mountain View, CA, USA) - plazmid kodujący białko Rad-51.

1.3. Przeciwciała i siRNA

W doświadczeniach wykorzystano następujący zestaw przeciwciał i siRNA:

Tabela 2. Zestawienie użytych przeciwciał i siRNA

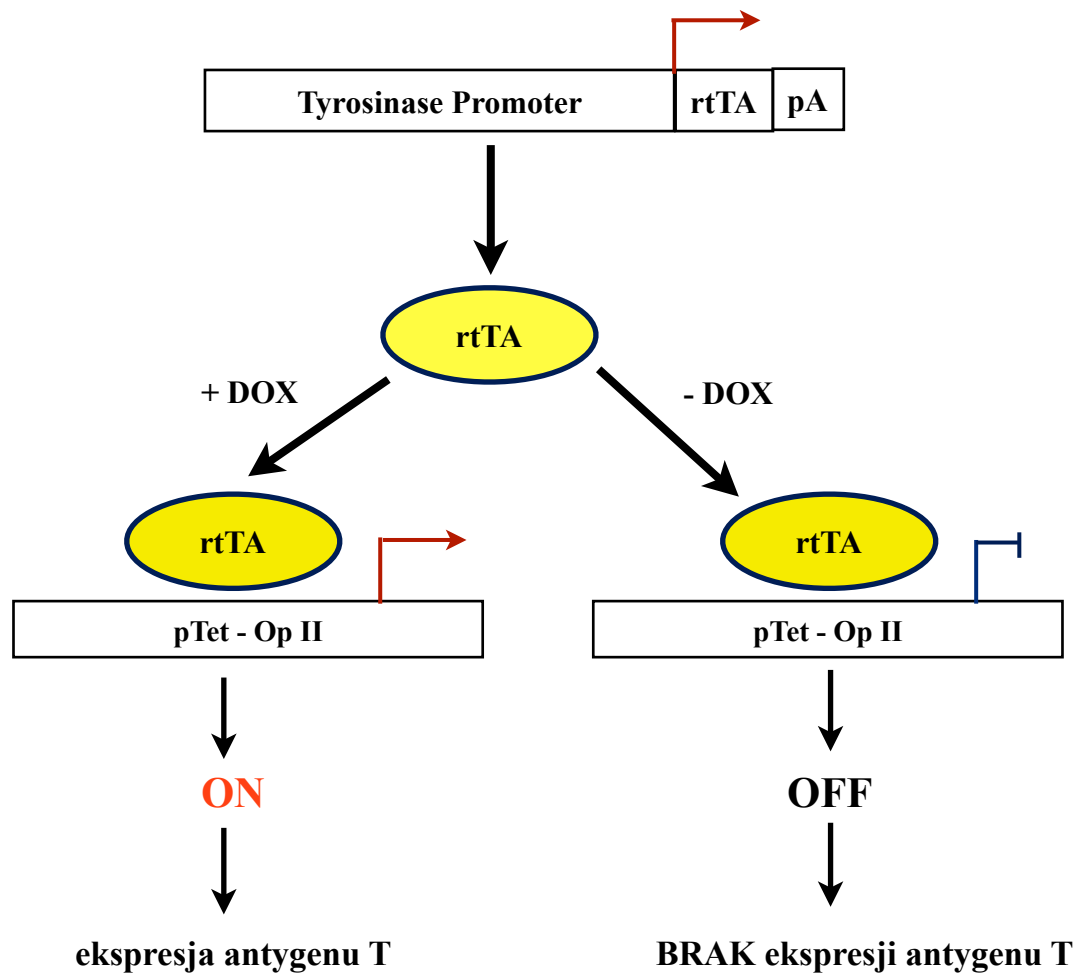
Antygen	Rodzaj przeciwciała	Producent	Zastosowanie (rozcieńczenie)
GRB2	Monoklonalne mysie	Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA	WB (1:1000)
β -tubulin	Poliklonalne królicze	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	WB (1:1000)
Rad-51	Monoklonalne mysie	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	WB (1:1000) IF (1:500)
β -katenina	Poliklonalne królicze	Abcam, Cambridge, Wielka Brytania	WB (1:1000) IF (1:500)

Antygen	Rodzaj przeciwciała	Producent	Zastosowanie (rozcieńczenie)
SV40 antygen -T	Monoklonalne mysie	Abcam, Cambridge, Wielka Brytania	WB (1:1000) IF (1:200)
pH2A.X	Poliklonalne królicze	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	WB (1:1000) IF (1:500)
c-myc	Monoklonalne mysie	Abcam, Cambridge, Wielka Brytania	WB (1:1000) IF (1:500)
β -katenina siRNA	Ludzkie	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	Transfekcja 1 μ g/ml
NT-siRNA	Ludzkie	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	Transfekcja 1 μ g/ml

3. PROCEDURY DOŚWIADCZALNE

3.1. Regulacja ekspresji genu antygen T w systemie pTet-ON w ludzkiej linii glijaka wielopostaciowego - U87-MG.

Istnieją dwa modele regulacji ekspresji genów przez antybiotyki z grupy tetracyklin: Tet-Off i Tet-On. W prezentowanej pracy wykorzystano system Tet-On. W systemie On do sekwencji TetR-VP16 doczepiony został fragment kodujący cztery aminokwasy (rTetR), co w konsekwencji odwróciło całkowicie funkcję białka tTA zmieniając to białko w aktywator rtTA (ang. *reverse TA*). Przy braku doksyicykliny białko to nie może przyłączyć się do promotora Tet-ON i nie dochodzi wówczas do ekspresji transgeny. Dopiero dodanie antybiotyku zmienia konformację rtTA, umożliwiając aktywację promotora Tet-On i w konsekwencji indukcję ekspresji genu. Typowy system Tet-On przedstawiono na Rysunku 11.



Rysunek 11. Schemat działania systemu ekspresyjnego Tet-ON regulowanego przez doksycyklinę.

Do transfekcji komórek U87-MG użyto gotowego zestawu plazmidów firmy Clontech. W zestawie tym znajdują się 4 plazmidy: pTet-ON, pBl-X, pTet-TS, pTK-hyg. Wszystkie transfekcje przeprowadzono metodą nukleoporacji. Użyto 0,5 µg plazmidu pTet-On oraz 5 µg plazmidu pTet-TS. W plazmidzie pTet-On pod kontrolą pełnego promotora CMV znajduje się gen białka rtTA, które pod nieobecność doksycykliny nie jest w stanie wiązać się z operatorem Tet-ON i aktywować transkrypcji genu wprowadzonego w plazmidzie p-Bl-antygen T.

3.2. Barwienie histochemiczne wycinków tkanek mózgowych

Preparaty histologiczne z mikronowymi skrawkami parafinowymi nowotworów mózgu i zdrowej tkanki mózgu poddane zostały w pierwszym kroku deparafinacji i uwodnienia, która obejmowała kolejno 15 minutową inkubację w 60 °C w celu zmiękczenia parafiny oraz 10 minutowe inkubacje kolejno w: ksylenie, 100% alkoholu etylowym, 95% alkoholu etylowym, 70% alkoholu etylowym, wodzie destylowanej. Następnie preparaty poddano obróbce w celu uwidocznienia antygeny. W tym celu inkubowano je w roztworze 0.01M Citrate/TBST o pH=6, w temperaturze 95 °C przez okres 40 minut i płukano w wodzie destylowanej. Następnie preparaty inkubowano w roztworze metanolu z 3% H₂O₂ przez 20 minut, co umożliwiło zablokowanie endogennej aktywności peroksydazowej. Tak przygotowane preparaty blokowano w roztworze 5% surowicy koziej w PBS / 0.1% BSA przez 2 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie przez 16 godzin w roztworze PBS/0.1%BSA zawierającym przeciwciała I-rzędowe (anty-SV40-antygen T, Abcam, Cambridge, Wielka Brytania, rozcieńczenie 1:200). Następnie preparaty dokładnie płukano w PBS i dodano roztwór z II-rzędowym biotynylowanym przeciwciałem (rozcieńczenie 1:500) na 1 godzinę w temperaturze pokojowej, następnie dodano kompleks awidyna-biotyna-peroksydaza (Victor Laboratories, USA). Ostatecznie reakcja uwidaczniana była za pomocą DAB (diaminobenzidine substrate, Sigma, USA), po której skrawki barwione były hematoksyliną i pokrywane szkiełkami nakrywkowymi.

3.3. Oznaczenie stężenia białka

Stężenie białka w ekstraktach z komórek oznaczano kolorymetrycznie metodą Bradforda [Bradford, 1976]. Używano komercyjnie dostępnego roztworu Bradforda (Biorad, Hercules, CA, USA). Stężenie białka w próbkach określono w oparciu o krzywą wzorcową, którą sporządzano mierząc absorbancję roztworów BSA (0,125 µg/µl; 0,25 µg/µl; 0,5 µg/µl; 0,75 µg/µl; 1,0 µg/µl, 2,0 µg/µl).

3.4. Oznaczanie ekspresji białek metodą Western Blot

Ekstrakty do badania ekspresji białek metodą Western Blot sporządzano przez lizę komórek w buforze lizującym (50 mM HEPES, pH 7,5; 150 mM NaCl; 1,5 mM MgCl₂; 1 mM EGTA; 10% glicerol; 1% Triton X-100; inhibitory proteaz, 10μM fluorek fenylometylosulfonylu; 10μM ortowanadanu sodu) na lodzie przez 20 minut. Następnie próbki wirowano w temperaturze 4°C, 6000 obr/min, 5 min. Nadsącz zebrano do nowych probówek i przechowywano zamrożone w 20 °C.

Rozdział elektroforetyczny białek (50 μg) przeprowadzano w żelu poliakrylamidowym gradientowym (4 – 15%, precast ready gels, Biorad, Hercules, CA, USA) lub jednorodnym (10 %) w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) [Laemmli, 1970]. Przed umieszczeniem w żelu, próbki zawieszano w buforze (250 mM Tris-HCl, pH 6,8; 1 % SDS, 10 % glicerol; 0,025 % błękit bromofenolowy, β-merkaptioetanol) i denaturowano w temperaturze 95 °C przez 10 minut. Na każdy żel nakładano również marker mas cząsteczkowych białek (Biorad, Hercules, CA, USA). Białka były następnie przenoszone na membranę nitrocelulozową (Biorad, Hercules, CA, USA) metodą elektrotransferu [Glass et al., 1981; Towbin et al., 1979]. Po skończonym transferze jego wydajność sprawdzano poprzez barwienie membrany w roztworze Ponceau S, a niespecyficzne miejsca wiązania białek blokowano inkubując membranę w 5 % roztworze odtłuszczonego mleka lub BSA w pokojowej temperaturze przez 1 godzinę. Następnie inkubowano membranę w roztworze 1 % odtłuszczonego mleka lub BSA z dodatkiem przeciwciał I-rzędowych przez okres od 2 do 16 godzin. Po trzykrotnym płukaniu membrany w buforze PBST (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,1 % Tween-20), inkubowano ją przez 1 godzinę w roztworze przeciwciał II-rzędowych sprzężonych z peroksydazą chrzanową (rozcieńczenie 1:5000). Po trzykrotnym płukaniu w PBST, wyniki wizualizowano metodą chemiluminescencyjną (ECL Western blotting detection reagents, Amersham Biosciences) lub kolorymetryczną (DAB substrate, Roche, Mannheim, Niemcy). Kontrolę równomiernego naładowania ścieżek żelu wykonywano dla każdego blotu, używając metody ‘strippingu’ (membranę po wykonaniu detekcji inkubowano przez 30 minut w buforze: 0,6 M Tris-HCl, pH 6,7 z dodatkiem SDS (10 % wag./obj.) i 1 % β-merkaptioetanolu, w temperaturze 50 °C,

następnie płukano dwukrotnie w buforze PBST, blokowano w roztworze 5 % mleka odtłuszczonego), i wykorzystując przeciwciała I-rzędowe anty-GRB2.

3.5. Oznaczenie współdziałania między białkami (immunoprecypitacja)

Metoda immunoprecypitacji stosowana jest między innymi do badania współdziałania białek między sobą przy pomocy specyficznych dla nich przeciwciał. 80 µg ekstraktów białkowych otrzymanych z lizy komórek U87-MG, inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 4 °C z przeciwciałem anty-SV40 antygen T, anty p-H2A.X, anty-Rad-51, anty-β-katenina lub serum (użyte jako kontrole negatywną) w buforze PBS zawierającym 0,25% SDS, 0,25 % Triton X-100 oraz mieszaninę inhibitorów proteaz Complete (Roche, USA). Następnie dodawano proteinę A-agarozę (Sigma, USA) zawieszoną w buforze PBS i delikatnie mieszano przez 16 godzin w temperaturze 4°C. Po tym czasie komórki wirowano i zawieszano w buforze (250 mM Tris-HCl, pH 6,8; 1 % SDS, 10 % glicerol; 0,025 % błękit bromofenolowy, β-merkaptoetanol) i denaturowano w temperaturze 95 °C przez 10 minut i nałożono na 10% żel akryloamidowy. Na każdy żel nakładano również marker mas cząsteczkowych białek (Biorad, Hercules, CA, USA). Białka były następnie przenoszone na membranę nitrocelulozową (Biorad, Hercules, CA, USA) metodą elektrotransferu. Po skończonym transferze jego wydajność sprawdzano poprzez barwienie membrany w roztworze Ponceau S, a niespecyficzne miejsca wiązania białek blokowano inkubując membranę w 5 % roztworze odtłuszczonego mleka lub BSA w pokojowej temperaturze przez 1 godzinę. Następnie inkubowano membranę w roztworze 1 % odtłuszczonego mleka lub BSA z dodatkiem przeciwciał I-rzędowych przez okres od 2 do 16 godzin. Po trzykrotnym płukaniu membrany w buforze PBST, inkubowano ją przez 1 godzinę w roztworze przeciwciał II-rzędowych sprzężonych z peroksydazą chrzanową (rozcieńczenie 1:5000). Po trzykrotnym płukaniu w PBST, wyniki wizualizowano metodą chemiluminescencyjną.

3.6. Oznaczenie poziomu mRNA metodą Northern blot

Próbki RNA (10-20 µg) uzupełniono do objętości 10 µl wodą traktowaną DEPC i dodano 2 µl barwnika do nanoszenia na żel (100% glicerol, 500 mM EDTA pH 8,0; 0,025% błękit bromofenolowy; 0,025% cyjanoksylen). Mieszaninę ogrzano przez 5 min w temp 65°C i następnie, po krótkim wirowaniu (10 s, 12000 obr./min) próbki naniesiono w całości na denaturujący żel agarozowy, który przygotowano w następujący sposób: w 80 ml buforu 10 × MOPS (41.8 g MOPS, 3M NaoAc, 0.5M EDTA i woda traktowana DEPC) rozpuszczono 0,8 g agarozy. Następnie schłodzono do ok. 65°C i dodano 2 ml 37% formaldehydu i po wylaniu do saneczek pozostawiono do zakrzepnięcia. Po naniesieniu próbek na żel elektroforezę prowadzono przy napięciu 100V do momentu, aż dolny barwnik (cyjanoksylen) osiągnął odległość 2 cm od końca długości żelu. Rozdzielone próbki RNA przeniesiono na błonę nitrocelulozową Hybond - N (Amersham Pharmacia Biotech) metodą transferu kapilarnego w obecności 10× SSC (1,5 M NaCl, 150 mM cytrynian sodu). Transfer prowadzono przez noc. RNA wiąże się do błony przez naświetlanie światłem UV w aparacie Crosslinker (UVC 500 Hoefer) przy zastosowaniu energii 210 µJ/cm². Jako matryce do znakowania sond wykorzystano produkty PCR oczyszczone z żelu agarozowego przy użyciu zestawu QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Sondy znakowano radioaktywnie stosując [³²P]-dATP (3000 Ci · mmol⁻¹) według protokołu dołączonego do zestawu do znakowania HexaLabel™ DNA Labeling Kit (Fermentas). Do znakowania brano 5 ng oczyszczonego produktu PCR. Wyznakowaną sondę oczyszczano od niewłączonych nukleotydów na kolumnie ze złożem Sephadex G-50 i denaturowano (100°C, 10 min). Następnie utrwalone błony nitrocelulozowe poddano prehybrydyzacji w buforze PerfectHyb™ Plus (Sigma) przez 1-2 godz. Następnie do roztworu prehybrydyzacyjnego dodano zdenaturowaną sondę. Hybrydyzację przeprowadzono przez noc w temperaturze 65°C. Po tym czasie roztwór hybrydyzacyjny zlewano, a błonę przepłukno roztworami do płukania I (0,1% SDS, 2 × SSC) i II (0,1% SDS, 0,2 × SSC) odpowiednio przez 10 i 15 minut. Ekspozycję błony prowadzić w kasie fosforowej na filmie Kodak BioMax (Sigma - Aldrich, Corp.) przez 1 – 20 dni.

3.7. Immunofluorescencyjna detekcja białek

Komórki U87-MG inkubowane z doksycykliną wysiewano w komórkach LabTek Chambers (Nalge Nunc International, Dania) i po 24 h hodowli utrwalano w 4% roztworze formaldehydu w PBS, z 0,02 % Tritonem X-100 przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Komórki płukano trzykrotnie PBS, i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 37 °C w roztworze 1 % BSA w PBS z 0,02 % Tritonem X-100 blokującym niespecyficzne miejsca wiązania przeciwciał. Następnie roztwór blokujący zmieniano na roztwór przeciwciał I-rzędowych (anty-Rad 51, anty- β -katenina lub anty-antygen T) i inkubowano przez 16 godzin w temp. 4°C. Po 4 -krotnym płukaniu PBS szkiełka powtórnie blokowano w roztworze BSA (j.w.) przez 10 minut. Potem szkiełka barwiono w roztworze przeciwciał II-rzędowych sprzężonych z barwnikami fluorescencyjnymi (rozcieńczenie 1: 1000) przez godzinę w temp. 37 °C. Po końcowym płukaniu w PBS, szkiełka powtórnie utrwalano w roztworze formaldehydu (j.w.). Preparaty zamykano używając medium zawierające chlorowodorek 4,6-diamino-2'-fenyloindolu (DAPI) i przeciwdziałające blaknięciu (Vectashield mounting medium, Vector, Burlingame, CA, USA). Preparaty obserwowano i fotografowano pod mikroskopem fluorescencyjnym (Nikon Eclipse TE-300) wyposażonym w kamerę CCD (RGB-MS-C, CRI Inc., Boston, MA, USA).

W doświadczeniach gdzie badano współdziaływanie i lokalizację białek, komórki poddano podwójnemu barwieniu immunofluorescencyjnemu. Po ostatnim płukaniu po inkubacji z przeciwciałem II-rzędowym ponownie blokowano miejsca niespecyficzne w roztworze 1 % BSA w PBS z 0,02 % Tritonem X-100 i przeprowadzono podobną procedurę jak opisano powyżej. Preparaty obserwowano i fotografowano pod mikroskopem fluorescencyjnym, szukając miejsc współdziaływania (Nikon Eclipse TE300) wyposażonym w kamerę CCD (RGB-MS-C, CRI Inc., Boston, MA, USA).

3.8. Oznaczanie kinetyki wzrostu komórek

Kinetykę wzrostu wyznaczano dla komórek wysianych na płytkach 24 – dołkowych (5000 komórek/dołek) inkubowanych z doksycykliną lub cysplatyną (1 $\mu\text{g/ml}$) przez 16

godzin. Następnie komórki zbierano poprzez trypsynizację i liczone łącznie z komórkami, ewentualnie pływającymi w medium hodowlanym. Przed liczeniem w komorze Burkera komórki barwiono 0,2 % roztworem błękitu trypanu.

3.9. Analiza cyklu komórkowego metodą cytometrii przepływowej

Dystrybucję komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego oceniano na podstawie pomiarów zawartości wyznakowanego fluorescencyjnie DNA w populacji komórek. W celu przygotowania próbek do analizy w cytometrze przepływowym, komórki indukowane z doksycyklina, a także inkubowane z cisplatiną. Następnie komórki zbierano z szalek hodowlanych, płukano w PBS i utrwalano w 85 % etanolu trzymając na lodzie przez 30 minut. Następnie komórki wirowano (1600 obr/min. przez 5 minut), a osad zawieszano w roztworze do analizy (760 μ M cytrynian sodu, pH 7,0 z dodatkiem jodku propidyny (10 μ g/ml) i RNAzy A (10 μ g/ml)). Analizę wykonywano przy użyciu cytometru przepływowego DAKO Cytomation CyAN LX w Flow Cytometry Facility, The Wistar Institute, Philadelphia, PA, USA.

3.10. Transfekcja komórek

Wektory plazmidowe, zarówno dla transfekcji przejściowych (Rad-51 i β -katenina) jak i stabilnych (antygen T), wprowadzano do komórek stosując metodę elektroporacji (Cell line nucleofector kit R, Amaxa, Gaithersburg, MD, USA). Cząsteczki interferującego RNA (small interfering RNA, siGenome SMARTpool, Dharmacon, La Fayette, CO, USA) używane do blokowania ekspresji genów β -kateniny, wprowadzano do komórek przy użyciu odczynnika lipofilnego Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Grand Island, NY, USA). Transfekcję przeprowadzano w pożywce Opti-MEM (Invitrogen, Grand Island, NY, USA).

3.11. Pomiary aktywności transkrypcyjnej promotorów metodą opartą na lucyferazie

Do oznaczania aktywności lucyferazy używano zestawu Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega, Madison, WI, USA). Komórki U87-MG poddawano transfekcji plazmidem zawierającym gen lucyferazy świetlika pod kontrolą sekwencji PPRE (0,5 µg/3x10⁶ kom.), fragmentu promotora c-myc (1 µg/3x10⁶ kom), TCF-4 c-Fos (0.5 µg/3x10⁶ kom), JCVearly (1 µg/3x10⁶ kom), JCVlate (1 µg/3x10⁶ kom) łącznie z plazmidem ekspresyjnym lucyferazy Renilla (0,025 µg/3x10⁶ kom.), służącym do kontroli wydajności transfekcji. Zmieniano medium hodowlane po 6 godzinach i hodowano przez następne 24 h. Po tym czasie komórki poddawano lizie, zbierano do próbek, zamrażano i rozmrażano, po czym mierzono stężenie białka. Do reakcji wykorzystywano 20 µl lizatu z komórek. Pomiarów aktywności lucyferazy świetlika i Renilla dokonywano w czytniku luminescencji (Femtomaster FB12, Zylux Corporation), a wyniki wyrażano jako zmianę aktywności lucyferazy świetlika w komórkach po stymulacji względem nietraktowanej kontroli, po przeliczeniu na zawartość białka i aktywność lucyferazy Renilla w próbkach.

3.12. Oznaczanie tworzenia kolonii

Zdolność komórek do tworzenia kolonii oznaczono wysiewając komórki U87-MG na sześć-dołkową płytkę (1000 komórek /35mm dołek) i hodowaniu przez okres 14 dni w pożywce z 10% surowicą, oraz w pożywce z 10 % surowicą i doksycykliną. Po upływie dwóch tygodni komórki utrwalano roztworem Commasie stain przez 20 minut, płukano wodą i liczono utworzone kolonie .

3.13. Opracowanie wyników i analiza statystyczna

Eksperymenty wykonywane były w 3-6 powtórzeniach. Spośród wyników jakościowych (Western blot, zdjęcia żeli, zdjęcia mikroskopowe) wybrano i przedstawiono te reprezentatywne. Wyniki ilościowe, przedstawiono na wykresach lub w tabelach i wyrażono jako średnią arytmetyczną z błędem oznaczającym odchylenie standardowe lub

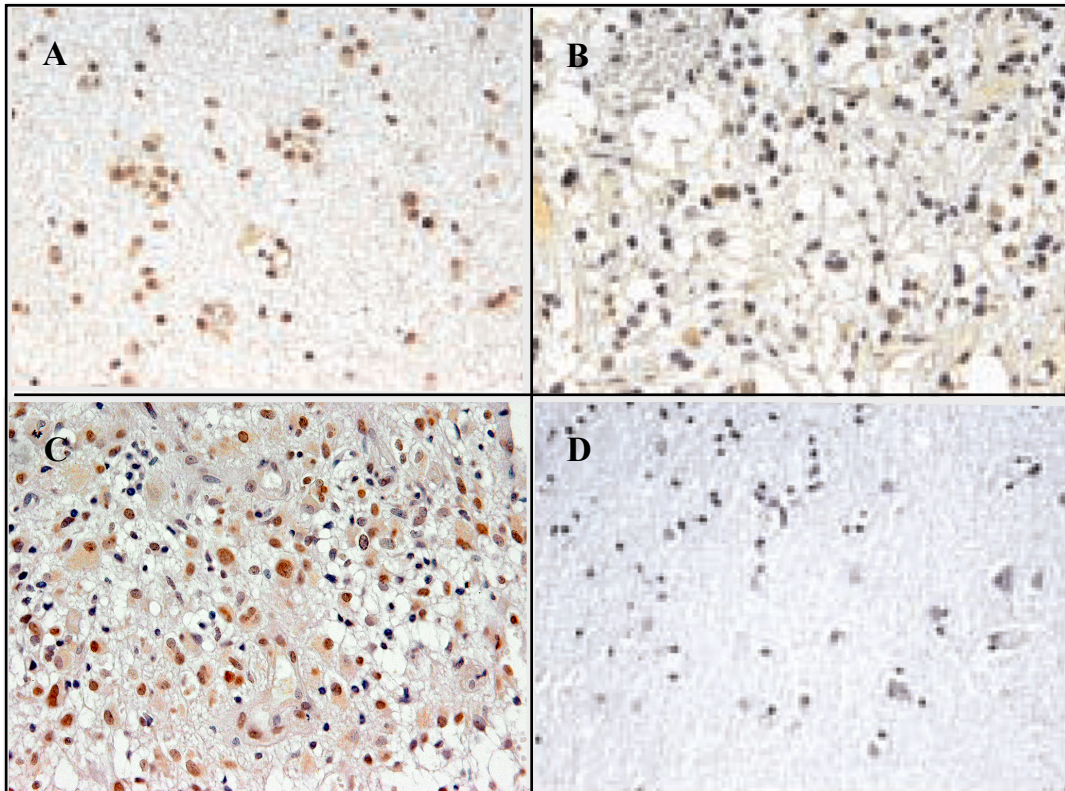
błąd standardowy. W podpisach pod wykresami podano z ilu eksperymentów pochodzi przedstawiony wynik i liczebność próby w pojedynczym eksperymencie. Istotność statystyczną różnic między grupami sprawdzano testem t-Studenta lub jednokierunkową analizą wariancji, na poziomie istotności 0,05.

V. WYNIKI

1. BADANIE OBECNOŚCI BIAŁEK WIRUSOWYCH W TKANKACH NOWOTWOROWYCH

1.1. Ekspresja białka wirusowego antygeny T w tkankach nowotworowych mózgu

W celu określenia obecności białka wirusa JC, antygeny T, w tkankach nowotworowych przeprowadzono barwienie immunohistochemiczne wykorzystując preparaty tkanek nowotworowych gwiaździstka rozproszonego (ang. *astrocytoma*), glejaka anaplastycznego (ang. *anaplastic astrocytoma*), glejaka wielopostaciowego (ang. *glioblastoma multiform*) oraz tkankę prawidłowego mózgu. Na Rysunku 11 przedstawiono zdjęcia reprezentujące wyniki barwienia immunohistochemicznego z wykorzystaniem przeciwciała rozpoznającego białko antygeny T. Analizując preparaty histologiczne guzów mózgu stwierdzono ekspresję białka wirusowego w 52% badanych tkanek guza astrocytomy (Rys.11A), 50% tkanek guza glejaka anaplastycznego (Rys. 11B) i w ponad 72% tkanek guza glejaka wielopostaciowego (Rys. 11C). Analizując tkanki zdrowego mózgu nie znaleziono żadnych komórek, które wykazywałyby pozytywną ekspresję białka wirusowego T (Rys. 11D).



Rysunek. 11. Immunohistochemiczna analiza ekspresji białka wirusowego antygeny T w tkankach nowotworowych. A - gwiaździak rozproszony, B - glejak anaplastyczny, C - glejak wielopostaciowy, D - tkanka zdrowego mózgu.

2. LUDZKA LINIA GLEJAKA WIELOPOSTACIOWEGO Z INDUKOWANYM PRZEZ DOKSYCYKLINĘ ANTYGENEM T

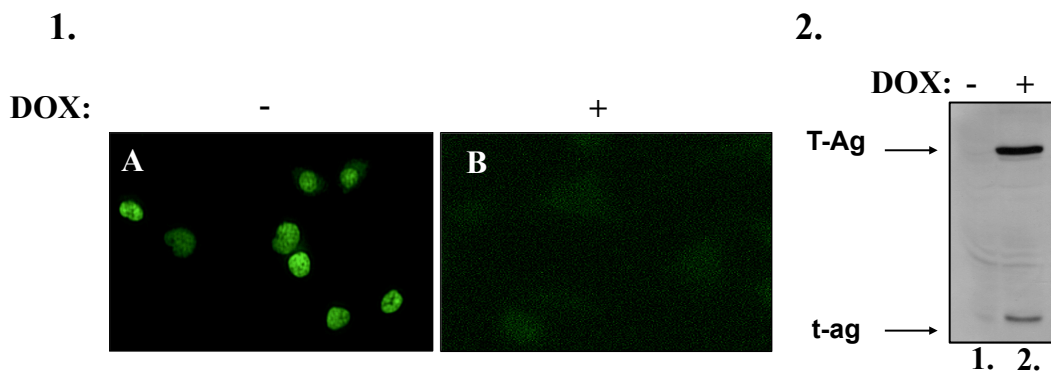
2.1. Efektywność działania systemu pTet-ON

Ludzka linia glejaka wielopostaciowego, U87-MG z indukowanym antygenem T utworzona była w celu lepszej kontroli nad ekspresją dużego białka wirusowego, antygeny T oraz braku “kontaminacji” innymi białkami wirusowymi (kapsydu lub agnoproteiny). Komórki nowotworowe były stabilnie transfekowane plazmidem kodującym białko antygeny T i dodatkowo wyznakowanym zielonym białkiem fluorescencyjnym (GFP), w wyniku czego, komórki z pozytywną ekspresją białka wirusowego, wykazywały zieloną fluorescencję.

W celu sprawdzenia prawidłowo funkcjonującego systemu pTet-On, komórki wysiano na płytki hodowlane i podzielono na dwie grupy eksperymentalne. Jedną z nich inkubowano z doksycykliną o stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$ przez 16 godzin. Grupę drugą hodowano w warunkach normalnych, bez doksycykliny. Po upływie czasu inkubacji, sprawdzono fluorescencje pod mikroskopem fluorescencyjnym. Wyniki zaprezentowane na Rysunku 12, wyraźnie przedstawiają różnice pomiędzy dwoma grupami eksperymentalnymi. Na zdjęciu 12A obserwowano wyraźną, stabilną, zlokalizowaną w jądrze komórkowym zieloną fluorescencję, co świadczy o ekspresji białka wirusowego, antygeny T. Na zdjęciu 12B zaprezentowano komórki hodowane w normalnych warunkach. W hodowli kontrolnej nie obserwowano fluorescencji. Wyniki prezentują stu procentową efektywność systemu pTet-ON.

Aby potwierdzić zaobserwowane wyniki, z podobnie hodowanych komórek przygotowano ekstrakty proteinowe, w celu określenia poziomu ekspresji białka antygeny T. Następnie, przeprowadzono analizę Western blot ekstraktów ludzkiej linii glejaka wielopostaciowego, U87-MG. Rysunek 12.2 przedstawia wyniki otrzymane po rozdziale elektroforetycznym. Ekstrakty proteinowe zostały nałożone na żel w następującym porządku: linia pierwsza zawiera ekstrakt białkowy uzyskany z komórek nieindukowanych doksycykliną (brak antygeny T), na linii drugiej znajduje się ekstrakt otrzymany z komórek U87-MG z ekspresją antygeny T, tj. indukowanych doksycykliną. Przystawione wyniki wyraźnie pokazują obecność białka wirusowego w linii indukowanej oraz brak antygeny T w liniach komórkowych hodowanych bez antybiotyku.

Poziomu ekspresji białek na drodze Western blot i intensywność fluorescencji pod mikroskopem, sprawdzana była przed każdym eksperymentem w prezentowanej rozprawie. Miało to na celu upewnienia się, że nie ma żadnych przecieków w systemie pTet-ON, a także białko antygeny T wykazuje ekspresję na właściwym poziomie. Zaobserwowano, że liczba pasaży i czas hodowli nie wpływa na intensywność ekspresji białka wirusowego, antygeny T w komórkach U87-MG. Świadczy to o 100% efektywności systemu indukcji białka wykorzystując zasadę pTet-On.



Rysunek 12. Ludzka linia glejaka wielopostaciowego U87-MG z indukowanym przez doksycyklinę antygenem T.

1- Zdjęcie mikroskopowe ekspresji białka antygeny T w komórkach U87-MG, inkubowanych (A) i nie inkubowanych (B) z doksycykliną;

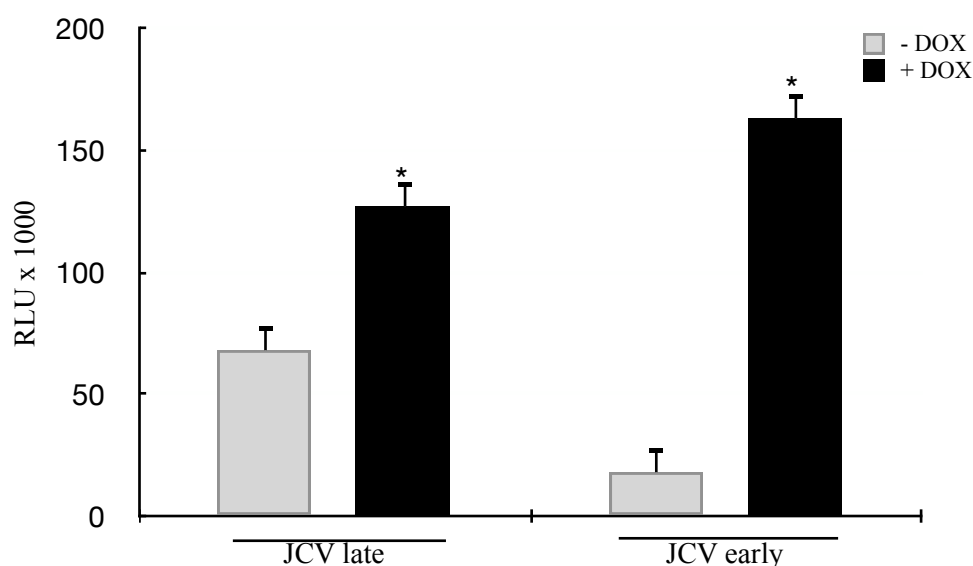
2 - Ekspresja białka wirusa JC, dużego antygeny T, w ekstraktach białkowych z linii komórkowej U87-MG, indukowanej doksycykliną (linia 2) w porównaniu z ekstraktem linii hodowanej w warunkach kontrolnych (1).

2.2. Sprawdzenie aktywności transkrypcyjnej regionu późnego i wczesnego wirusa JC

W genomie wirusa JC wyróżnić można trzy regiony, jednak na szczególną uwagę zasługuje region wczesny, który zawiera małe i duże białko antygeny T. Białka te biorą udział m.in. w stymulacji komórek gospodarza do replikacji DNA wirusowego.

Dlatego też, kolejnym krokiem eksperymentalnym było sprawdzenia aktywności transkrypcyjnej regionów wczesnych i późnych.

W tym celu komórki ludzkiej linii glejaka wielopostaciowego z indukowanym antygenem T zostały poddane procedurze opisanej w rozdziale procedury eksperymentalne. Rysunek 13 przedstawia wzrost ekspresji genu lucyferazy pod kontrolą promotora zawierającego sekwencje promotora późnego (JCVlate) i wczesnego (JCV early) wirusa JC, mierzony jako wzrost aktywności lucyferazy. Obserwowano prawie dwukrotny wzrost aktywności transkrypcyjnej promotora późnego (JCV late) i ponad 8-krotny wzrost promotora wczesnego (JCV early) w komórkach wykazujących ekspresję antygeny T, w porównaniu z grupą kontrolną (Rys. 13.).



Rysunek 13. Aktywność transkrypcyjna regionu wczesnego (JCV early) i późnego (JCV late) wirusa JC w ludzkiej linii glejaka wielopostaciowego z indukowanym antygenem T (+DOX) lub linią kontrolną (- DOX). Słupki: średnia + SE, n=3, *p<0.05.

2.3. Efekt dużego białka wirusowego, antygeny T, na fizjologię komórek nowotworowych na przykładzie ludzkiej linii glejaka - U87-MG (-/+ DOX)

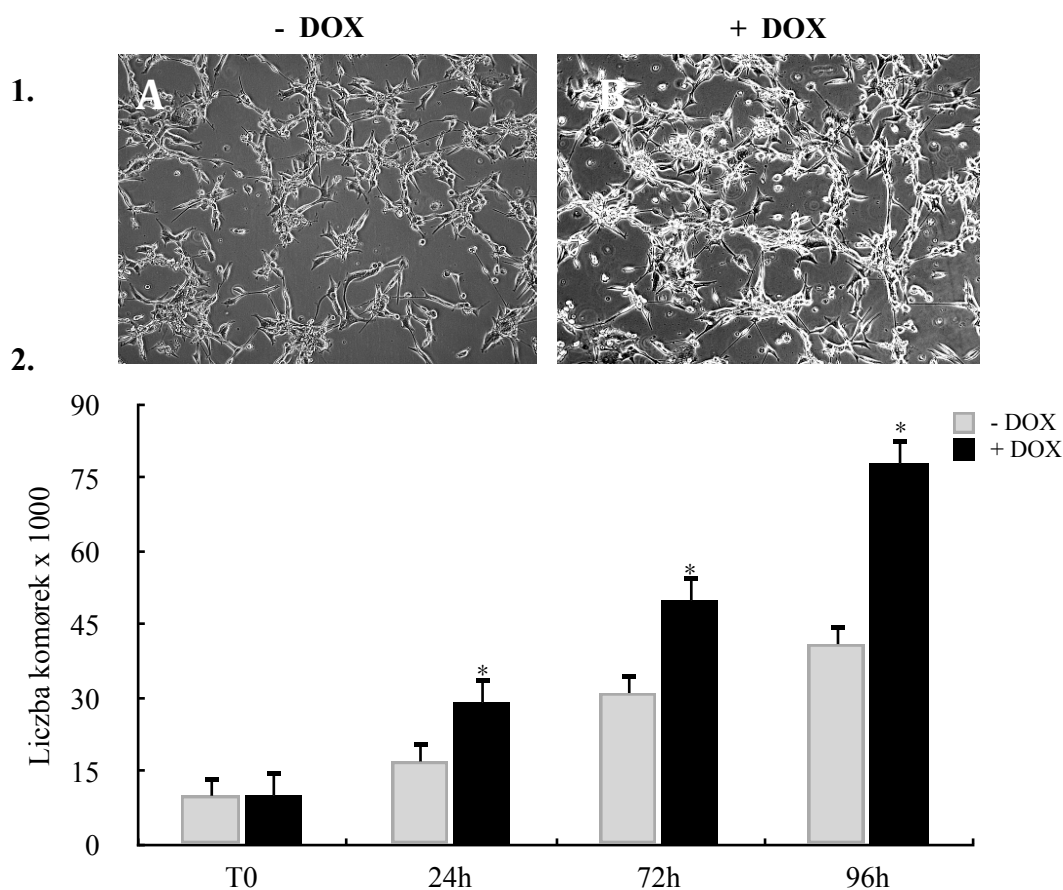
Z danych literaturowych wiadomo iż, aktywne duże białko antygeny T ma różnego rodzaju wpływ na fizjologię komórek [White et al., 2005; Safak et al., 2004; Khalili et al., 2005]. W zależności od rodzaju komórek obserwowano przyspieszenie proliferacji czy inhibicję apoptozy. Efekty te mogą być związane z wpływem antygeny na zahamowanie białek związanych z kontrolą cyklu komórkowego czy deregulacją głównych ścieżek sygnałowych. Aby sprawdzić czy owa zależność występuje także w linii U87-MG z indukowanym antygenem T, przeprowadzono doświadczenia w których, sprawdzono wpływ antygeny T na zdolności proliferacyjne, zdolność do tworzenia kolonii i dystrybucję w poszczególnych fazach cyklu komórkowego.

2.3.1. Efekt antygeny T na zdolność proliferacyjną komórek U87-MG

W celu sprawdzenia efektu antygeny T na zdolność proliferacyjną komórek U87-MG z indukowanym antygenem T, komórki wysiano na płytki i hodowano w temperaturze

37°C i atmosferze o 7% zawartości CO₂ i w obecności bądź braku doksycykliny, przez 16 godzin. Po upływie czasu inkubacji zrobiono zdjęcia pod mikroskopem w kontraście faz. Rezultaty przedstawiono na Rysunku 14.1.

Antygen T aktywuje komórki do proliferacji co wyraźnie przedstawia zdjęcie 14.1B. Po 16 godzinach inkubacji z doksycykliną obserwowano znacznie większą liczbę komórek niż w hodowli kontrolnej (Rys. 14.1A). Obserwowano, iż komórki wykazujące ekspresję antygeny T rosły w koloniach, warstwowo, jedna na drugiej, co jest jedną z cech świadczącą o złośliwości nowotworu. Aby upewnić się w otrzymanych wynikach komórki hodowano w obecności doksycykliny lub jej braku przez 96h. Następnie w odstępach czasowych 0, 24, 72 i 96 godzin komórki trypsynizowano i liczono.



Rysunek 14. Efekt ekspresji antygeny T na proliferację komórek U87-MG (-/+ DOX).

1- Zdjęcia w kontraście faz; A-komórek ludzkiej linii glejaka hodowanej bez doksycykliny i nie wykazującej ekspresji antygeny T, B - komórki hodowane z antybiotykiem i wykazującym ekspresje antygeny T.

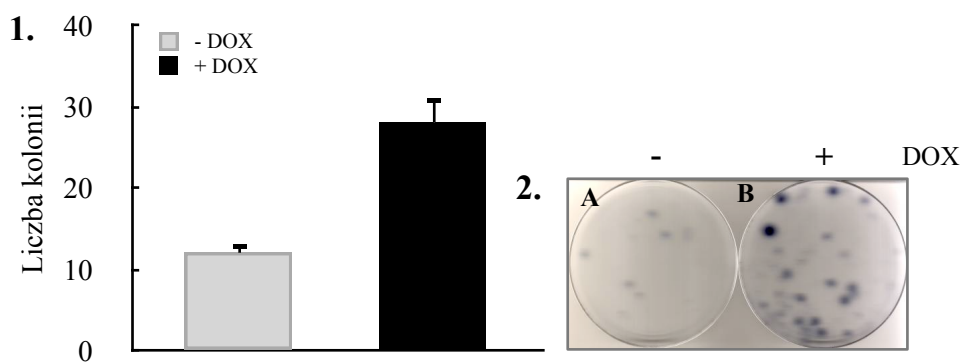
2 - Wykres przedstawiający kinetykę wzrostu komórek U87-MG z ekspresją lub brakiem antygeny T w odstępach czasowych 24, 72 i 96 godzin. Słupki : średnia + SD, n=4, *p<0.05,

Otrzymane wyniki (średnia z 4 powtórzeń) przedstawiono na rysunku 14.2. Czarne słupki przedstawiają liczbę komórek hodowanych w pożywce z dodatkiem 1 µg/ml doksycykliny. Słupki szare reprezentują liczbę komórek hodowanych w warunkach kontrolnych. Już po upływie 24 h przyrost liczby komórek względem liczby komórek wysianych (T0) w warunkach kontrolnych (DMEM 10% FBS) jest wyraźnie niższy niż w przypadku komórek wykazujących ekspresję antygeny T. Po 96 godzinach przyrost liczby komórek U87-MG z aktywnym antygenem T jest ponad 2-krotnie większy niż w przypadku komórek nie wykazujących ekspresję białka wirusowego (Rys. 14.2).

2.3.2. Efekt antygeny T na zdolność do tworzenia kolonii

Jednym z parametrów świadczących o stopniu złośliwości komórek nowotworowych jest ich zdolność do tworzenia kolonii z pojedynczej komórki. W przedstawionym eksperymencie zbadano jak obecność antygeny T wpływa na tworzenie kolonii przez komórki ludzkiego glejaka wielopostaciowego U87-MG z indukowanym antygenem T. W tym celu przeprowadzono test wzrostu klonalnego komórek, hodowanych w obecności doksycykliny w porównaniu z komórkami nie wykazującymi ekspresji antygeny T (tj. hodowanych bez dodatku doksycykliny).

Z zaprezentowanych wyników na rysunku 15 wyraźnie widać, że liczba kolonii utworzonych z pojedynczych komórek wykazujących ekspresję antygeny T, jest 2 razy większa od liczby kolonii otrzymanym po hodowli w warunkach kontrolnych. Indukcja wzrostu kolonii może być konsekwencją wpływu antygeny na proces wzrostu proliferacji komórek.



Rysunek 15. Wpływ ekspresji antygenu T na formowanie i wzrost kolonii.

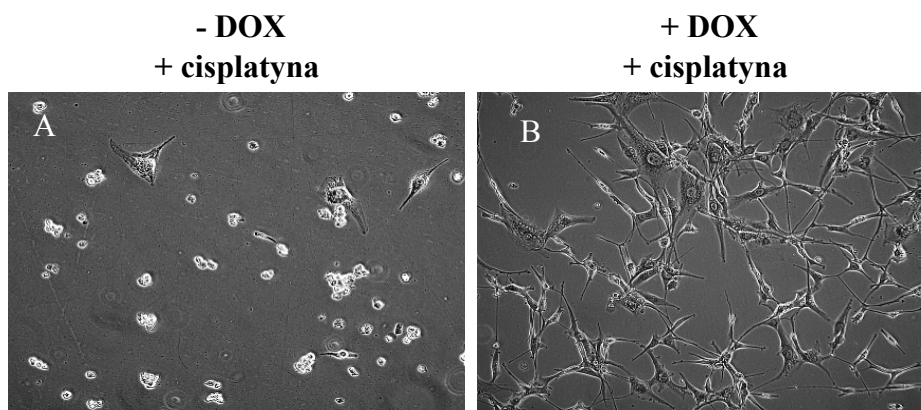
1 – wykres przedstawia średnią liczbę kolonii z trzech niezależnych eksperymentów. Słupki: średnia + SE, n=3; p<0.05

2 - kolonie ludzkiej linii glejaka wielopostaciowego A- grupa kontrolna (nie wykazujące ekspresji antygenu T); B- komórki inkubowane z doksycykliną (wykazujące ekspresję antygenu T).

2.3.3. Antygen T powoduje oporność na działanie chemioterapeutyku - cisplatyny

Interesujące wyniki otrzymano porównując wpływ cisplatyny na zdolność proliferacyjną komórek U87-MG z aktywowanym antygenem T. Cisplatyna jest jednym z najpopularniejszych chemioterapeutyków fazowo-niespecyficznym, swoistym dla cyklu komórkowego. Jego działanie polega na utworzeniu krzyżowych wiązań między sąsiadującymi nićmi DNA oraz w obrębie tej samej nici. Tworzenie tych poprzecznych wiązań uniemożliwia replikację DNA i podział komórki. Wywiera też wpływ na funkcje metaboliczne, uruchamiając proces apoptozy komórki.

W celu sprawdzenia jak obecność antygenu T wpływa na przeżywalność komórek U87-MG po inkubacji z chemioterapeutykiem, komórki hodowano przez 24 h z 1 $\mu\text{g/ml}$ cisplatyny.



Rysunek 16. Wpływ cisplatyny na proliferację komórek U87-MG. A –komórki nie wykazujące ekspresji antygenu T i inkubowane z cisplatyną, B – komórki wykazujące ekspresję antygenu T i inkubowane z cisplatyną.

Jak widać na zaprezentowanych zdjęciach (Rys. 16), komórki bez ekspresji antygenu T i hodowane z cisplatyną (A) wykazują niezdrowy, zaokrąglony, apoptotyczny kształt. Natomiast, komórki z ekspresją dużego białka wirusowego i inkubowane z mutagenem (cisplatyną), wykazują zdrowy kształt a także normalną zdolność proliferacyjną. Doświadczenie to przedstawia bardzo interesujące wyniki, świadczące o ochronnym wpływie antygenu T na komórki glejaka wielopostaciowego.

2.4. Wpływ antygenu T na dystrybucję faz cyklu komórkowego

Następnym krokiem doświadczalnym była analiza dystrybucji faz cyklu komórkowego komórek U87-MG (-/+ DOX), a także traktowanych cisplatyną. Analizując otrzymane wyniki (Tabela 3.), obserwujemy iż, obecność dużego białka wirusowego w komórkach wywołuje wzrost udziału komórek w fazie S (2-krotny) i w fazie G2/M w porównaniu do komórek które nie wykazywały ekspresji antygenu T. Odbywa się to kosztem udziału komórek w fazie spoczynku (G0/G1) gdzie liczba komórek jest nieco mniejsza. W wyniku ekspresji antygenu T maleje liczba komórek martwych osiągając około 1,8%. Niski poziom komórek w fazie apoptozy lub nekrozy świadczy o wpływie antygenu T na białka odpowiedzialne za prawidłową regulację cyklu komórkowego.

Natomiast w hodowli gdzie komórki inkubowane były z cisplatyną bez doksycykliny, wzrasta frakcja komórek w spoczynku (faza G0/G1) w porównaniu z linią komórkową z aktywnym antygenem T, natomiast maleje frakcja komórek w fazie S. Proporcja komórek w fazie podziału (G2/M) ulega nieznacznym wahaniom. Na szczególną uwagę zasługuje procent liczby komórek martwych (apoptotycznych i nekrotycznych). Obserwujemy wyraźny spadek liczby tych komórek w linii U87-MG z indukowanym antygenem T i inkubowanym z cisplatyną w porównaniu do grupy kontrolnej (różnica 5%). Zmniejszenie tempa wzrostu pod wpływem antygeny T i cisplatyny można tłumaczyć działaniem cytostatycznym antygeny T. Może on wpływać na zahamowanie białek odpowiedzialnych za regulację cyklu komórkowego, wynikiem czego może być nagromadzenie mutacji w komórce.

Tabela 3. Dystrybucja faz cyklu komórkowego dla komórek U87MG z indukowanym bądź nie antygenem T, a także inkubowanych z cisplatyną. G0/G1 – faza G0/G1, S – faza S, G2/M – faza G2/M. Wyniki pochodzą z trzech niezależnych eksperymentów.

	G0/G1	S	G2/M	% apoptozy
- antygen T (-DOX)	42.8	10.8	26.5	3.7
+ antygen T (+DOX)	35.3	21.2	33.7	1.8
- antygen T (-DOX) + cisplatyna	60	8.9	22	6
+ antygen T (+DOX) + cisplatyna	46	13	19	1.6

3. ZBADANIE WPLYWU BIAŁKA WIRUSOWEGO NA FUNKCJE BIOLOGICZNE BIAŁEK β -KATENINY I RAD-51

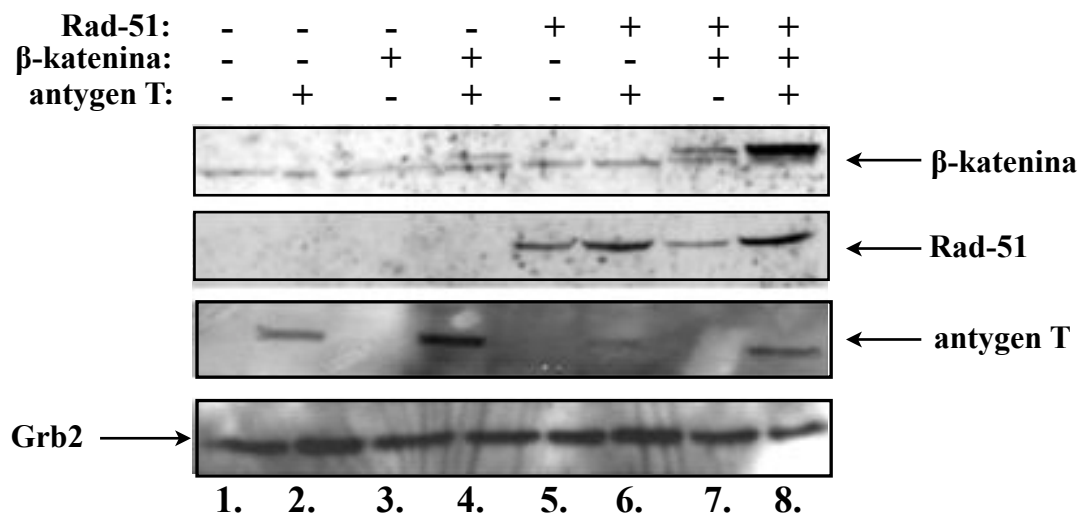
3.1. Ekspresji białek i poziomu mRNA Rad 51 i β -kateniny w linii komórkowej U87-MG z indukowanym przez doksycyklinę Ag-T

Jednym z celów pracy było sprawdzenie jak antygen T oddziałuje na ścieżki sygnałowe β -kateniny i Rad-51. Dlatego też, kolejnym etapem rozprawy było zbadanie ekspresji białek Rad 51 i β -kateniny w komórkach U87-MG z indukowanym przez doksycyklinę antygenem T.

W celu określenia poziomu ekspresji białek przeprowadzono analizę Western blot ekstraktów proteinowych otrzymanych z komórek U87-MG. Ekstrakty proteinowe nałożono na żel w następującej kolejności:

- (1) komórki hodowane w warunkach kontrolnych (nie wykazujące ekspresji antygenu T);
- (2) komórki inkubowane 16 h z doksycykliną (wykazujące ekspresję antygenu T);
- (3) komórki hodowane w warunkach kontrolnych (nie wykazujące ekspresji antygenu T) i transfekowane plazmidem kodującym białko β -kateninę;
- (4) komórki inkubowane 16 h z doksycykliną (wykazujące ekspresję antygenu T) i transfekowane plazmidem kodującym białko β -kateninę;
- (5) komórki hodowane w warunkach kontrolnych (nie wykazujące ekspresji antygenu T) i transfekowane plazmidem kodującym białko Rad-51;
- (6) komórki inkubowane 16 h z doksycykliną (wykazujące ekspresję antygenu T) i transfekowane z plazmidem kodującym białko Rad-51;
- (7) komórki hodowane w warunkach kontrolnych (nie wykazujące ekspresji antygenu T) i transfekowane plazmidem kodującym białko Rad-51 i β -kateninę;
- (8) komórki inkubowane 16 h z doksycykliną (wykazujące ekspresję antygenu T) i transfekowane z plazmidem kodującym białko Rad-51 i β -kateninę;

Komórki U87-MG zostały dodatkowo transfekowane z plazmidami kodującymi białka Rad-51 i β -kateninę, gdyż naturalny poziom tych białek w warunkach normalnych jest zbyt niski i bardzo słabo wykrywalny.



Rysunek 17. Ekspresja białek β -kateniny, Rad-51, antygeny T w komórkach U87-MG (Western blot). Kontrola równomiernego naładowania ścieżek żelu: detekcja białka GRB2.

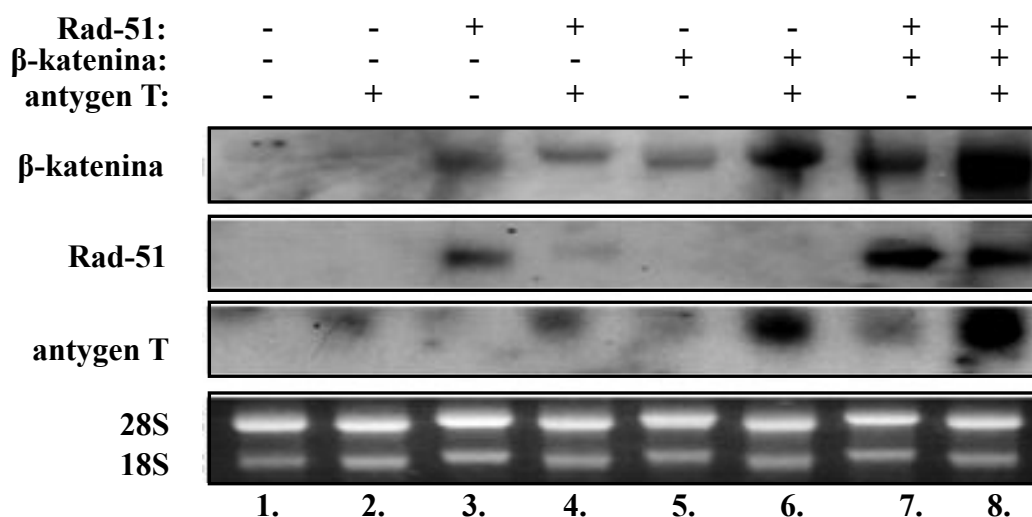
Komórki U87-MG wykazujące ekspresję białek Rad-51 i antygeny T produkowały białko β -katenine (Rys. 17, linia 8) na poziomie znacznie wyższym niż w momencie gdy białka te występowały pojedynczo (Rys. 17, linia 4,6 lub 7.). Świadczyć to może o wpływie białek Rad-51 i antygeny T na ścieżkę sygnałową β -kateniny, stabilizację i akumulację jej w komórkach glejaka.

Zaobserwowano także, iż ekspresja antygeny T wpływa na wzrost produkcji białka Rad-51 w komórkach U87-MG. Białko Rad-51 zaangażowane jest w naprawę podwójnych pęknięć nici DNA. Wynik ten świadczyć może, o tym, iż antygen T może powodować uszkodzenia materiału genetycznego, przez co aktywność białka zaangażowanego w jego naprawę wzrasta. Komórki po inkubacji z doksycykliną wykazywały ekspresję białka antygeny T na jednakowym poziomie we wszystkich grupach eksperymentalnych. Jako kontrolę równomiernego nałożenia ścieżek żelu użyto białka GRB-2.

Wobec niewielkiej ilości informacji dostępnych w literaturze na temat poziomu mRNA Rad-51 i β -kateniny w komórkach glejaka wielopostaciowego, następnym etapem pracy było zbadanie ekspresji mRNA w linii U87-MG z indukowanym antygenem T.

W celu określenia poziomu ekspresji przeprowadzono analizę Northern blot. Próbkę nałożono na żel w następującej kolejności:

- (1) komórki hodowane w warunkach kontrolnych (nie wykazujące ekspresji antygeny T);
- (2) komórki inkubowane 16 h z doksycykliną (wykazujące ekspresję antygeny T);
- (3) komórki hodowane w warunkach kontrolnych (nie wykazujące ekspresji antygeny T) i transfekowane plazmidem kodującym białko Rad-51;
- (4) komórki inkubowane 16 h z doksycykliną (wykazujące ekspresję antygeny T) i transfekowane plazmidem kodującym białko Rad-51;
- (5) komórki hodowane w warunkach kontrolnych (nie wykazujące ekspresji antygeny T) i transfekowane plazmidem kodującym białko β -kateninę;
- (6) komórki inkubowane 16 h z doksycykliną (wykazujące ekspresję antygeny T) i transfekowane z plazmidem kodującym białko β -kateninę;
- (7) komórki hodowane w warunkach kontrolnych (nie wykazujące ekspresji antygeny T) i transfekowane plazmidem kodującym białko Rad-51 i β -kateninę;
- (8) komórki inkubowane 16 h z doksycykliną (wykazujące ekspresję antygeny T) i transfekowane z plazmidem kodującym białko Rad-51 i β -katenin;



Rysunek 18. Poziom mRNA β-kateniny, Rad-51 i antygeny T w linii U87-MG z indukowanym antygenem T (Northern blot). Kontrola równomiernego naładowania ścieżek żelu: detekcja 28S i 18S mRNA.

Zaobserwowano, iż ekspresja antygeny T i białka Rad-51 powoduje wzrost poziom ekspresji mRNA β-kateniny (Rys. 18, linia 6). Wynik ten potwierdza wcześniejsze obserwacje, gdzie zanotowano wyższą ekspresję białka β-kateniny w wyniku obecności antygeny T i białka Rad-51. Nie zaobserwowano znaczącej różnicy w poziomie mRNA Rad-51 zależnej od obecności antygeny T czy β-kateniny (Rys. 18, linie 5-8).

3.2. Zdolności do fizycznej interakcji pomiędzy białkiem Rad-51 i β-kateniny a białkiem wirusowym, antygenem T

Wiele danych literaturowych donosi o współdziałaniu dużego białka antygeny T z białkami β-kateniną [Gan i Khalili, 2004] oraz białkiem Rad-51 [Trojanek et al., 2002]. Dowiedziono, iż białko wirusowe może wpływać na deregulację tych ścieżek sygnałowych a nieprawidłowe funkcjonowanie owych dróg sygnału może odgrywać ważną rolę w nowotworzeniu i transformacji komórkowej. Wyciągając także wnioski z poprzedniego rozdziału pracy, gdzie zaobserwowano biologiczne interakcje pomiędzy

białkami Rad-51, antygenem T i β -kateniną, postanowiono sprawdzić fizyczną interakcję pomiędzy tymi proteinami.

3.2.1. Współdziałania pomiędzy antygenem T i białkiem Rad-51

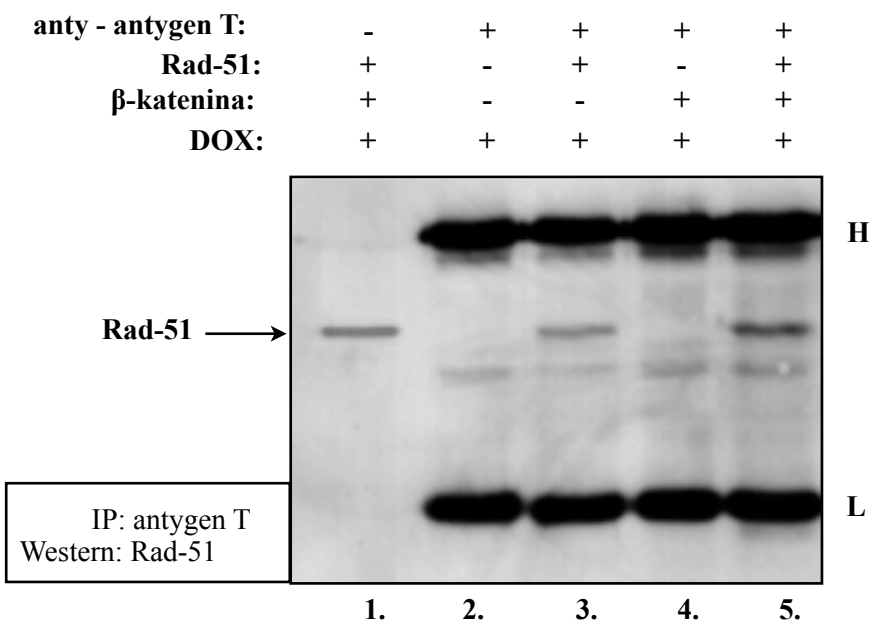
W pierwszej kolejności sprawdzono fizyczną interakcję pomiędzy antygenem T i białkiem Rad-51, na drodze immunoprecypitacji. W tym celu uzyskane ekstrakty proteinowe inkubowano z przeciwciałem anti-SV40 antygen T, następnie rozdzielono je elektroforetycznie i uzyskaną po transferze membranę inkubowano z przeciwciałem I rzędowym przeciwko Rad-51.

Komórki inkubowane były z doksycykliną przez co wykazywały ekspresję antygenu T. Komórki z linii 1,3,5 na rysunku 19A, dodatkowo transfekowane były z plazmidem kodującym białko Rad-51, natomiast komórki z linii 1,4,5 transfekowane były z plazmidem kodującym białko β -kateninę.

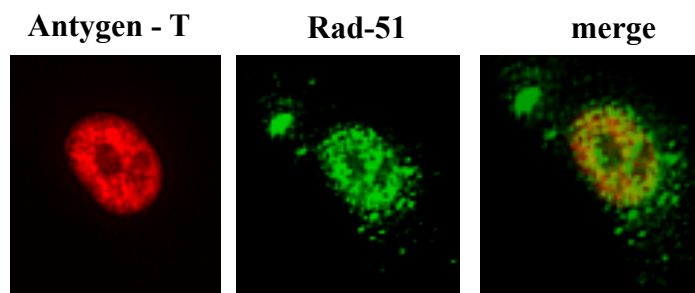
W komórkach U78-MG obserwowano wyraźną, fizyczną interakcję pomiędzy białkiem Rad-51 i antygenem T. Znacznie mocniejszy sygnał ekspresji obserwowany był w komórkach gdzie oba plazmidy były obecne. Obserwowano także nieco mocniejszy sygnał w komórkach które wykazywały obecność wszystkich trzech białek (Rys. 19A, linia 5).

Ekspresję obu białek (antygenu T i Rad-51) w komórkach ludzkiej linii glejaka wielopostaciowego U87-MG z indukowanym antygenem T potwierdzono barwieniem immunofluorescencyjnym (Rys. 19B). Na zdjęciach widoczne jest białko antygenu T (kolor czerwony) obecne w jądrze i białko Rad-51 (kolor zielony) obecne w cytoplazmie, a także w dużym stopniu w jądrze komórkowym. Po nałożeniu obu zdjęć na siebie widoczna jest koekspracja obu białek w jądrze komórki.

A.

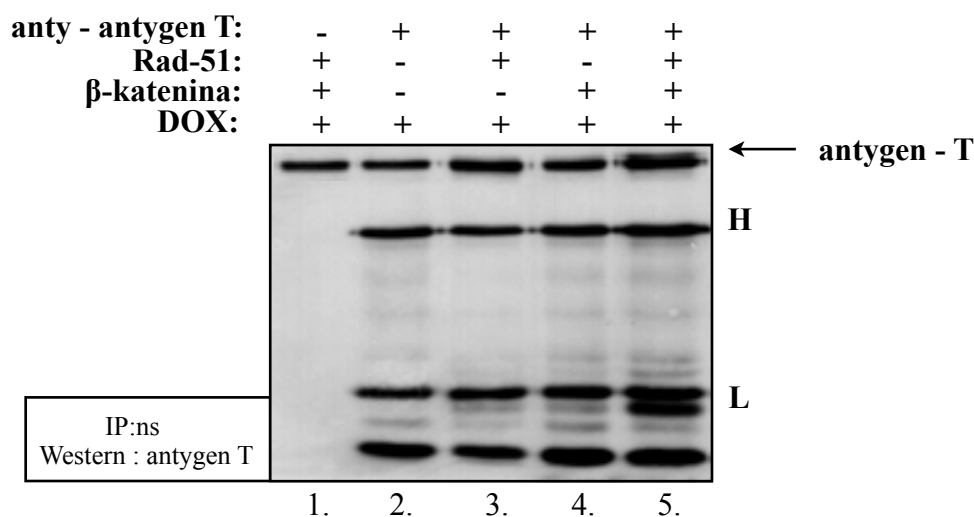


B.



Rysunek 19. Współdziałanie białek Rad-51 i antygenu T w komórkach U87-MG z indukowanym przez doksycyklinę antygenem T. A - Interakcja pomiędzy białkami Rad51 i antygenem T na drodze immunoprecypitacji, B - barwienie immunofluorescencyjne komórek U87-MG, antygen T - kolor czerwony, Rad-51 - kolor zielony; merge - dwa zdjęcia nałożone na siebie.

Kontrolę równomiernego naładowania ścieżek żelu wykonano, używając metody ‘strippingu’ i wykorzystując przeciwciała I-rzędowe przeciwko SV40-antygen T. Obserwowano, iż wszystkie ekstrakty komórkowe wykazywały stałą ekspresję antygenu T (Rys. 20).



Rysunek 20. Immunoprecypitacja ekstraktów białkowych z komórek U87MG inkubowanych z przeciwciałem przeciwko SV40-antygen T.

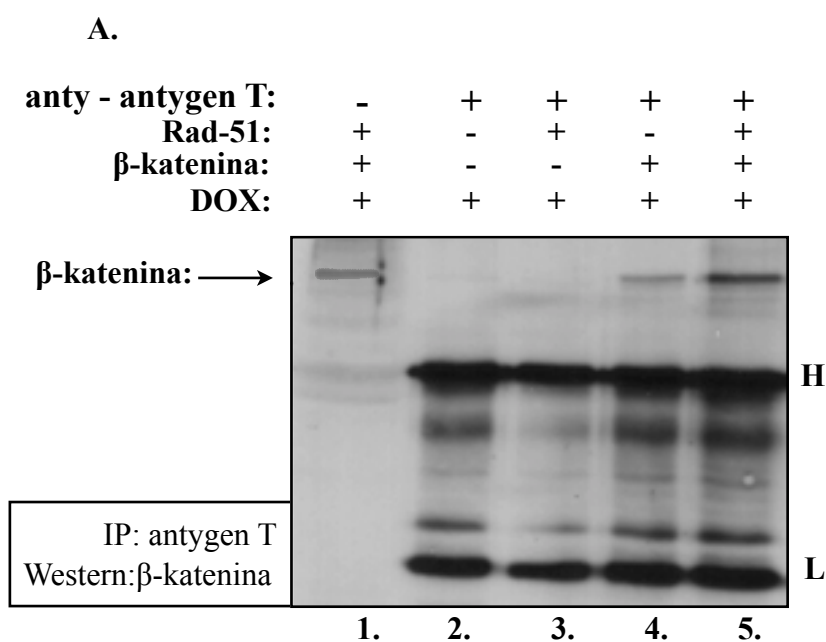
3.2.2. Współdziałania pomiędzy antygenem T i białkiem β -kateniną.

Następnym etapem było sprawdzenie fizycznej interakcji pomiędzy antygenem T i białkiem β -kateniną, na drodze immunoprecypitacji. W tym celu uzyskane ekstrakty proteinowe inkubowano z przeciwciałem przeciwko SV40-antygen T, następnie rozdzielono je elektroforetycznie i uzyskaną po transferze membranę inkubowano z przeciwciałem anty β -katenina.

Wszystkie komórki inkubowane były z doksycykliną przez co wykazywały ekspresję antygeny T. Komórki z linii 1,3,5 na rysunku 21A, dodatkowo transfekowane były plazmidem kodującym białko Rad-51, natomiast komórki z linii 1,4,5 transfekowane były plazmidem kodującym białko β -kateninę.

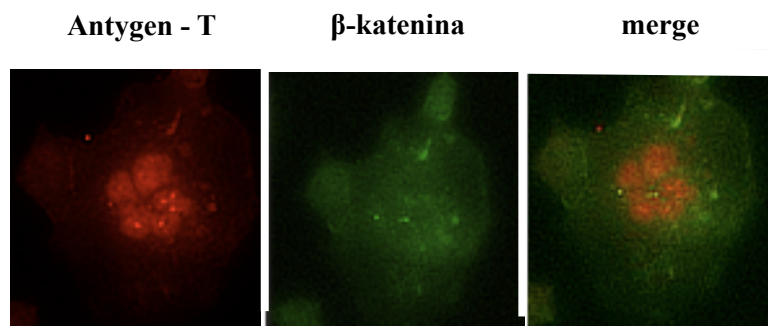
W komórkach U87-MG obserwowano wyraźną, fizyczną interakcję pomiędzy białkiem β -kateniną i antygenem T. Znacznie mocniejszy sygnał ekspresji obserwowany był w komórkach gdzie oba plazmidy były obecne. Obserwowano także nieco mocniejszy sygnał w komórkach, które wykazywały obecność wszystkich trzech białek (Rys. 21A, linia 5).

Ekspresję obu białek (antygen T i β -kateniny) w komórkach ludzkiej linii glejaka wielopostaciowego U87-MG z indukowanym przez doksycyklinę antygenem T potwierdzono barwieniem immunofluorescencyjnym (Rys. 21B). Na zdjęciach widoczne jest białko antygen T (kolor czerwony) obecne w jądrze i białko β -katenina (kolor zielony) obecne głównie w cytoplazmie i w niewielkim stopniu w jądrze komórek. Po nałożeniu obu zdjęć na siebie widoczne jest wspólne występowanie obu białek w jądrze komórkowym (kolor pomarańczowy).



Rysunek 21A. Koekspresja białek β -kateniny i antygen T w komórkach U87-MG z indukowanym przez doksycyklinę antygenem T. A - immunoprecypitacja ekstraktów białkowych z komórek U87-MG przeciwko β -kateninie;

B.



Rysunek 21B. Koekspresja białek β -kateniny i antygeny T w komórkach U87-MG z indukowanym przez doksycyklinę antygenem T. B - barwienie immunofluorescencyjne antygen T - kolor czerwony, Rad-51 - kolor zielony. merge - dwa zdjęcia nałożone na siebie

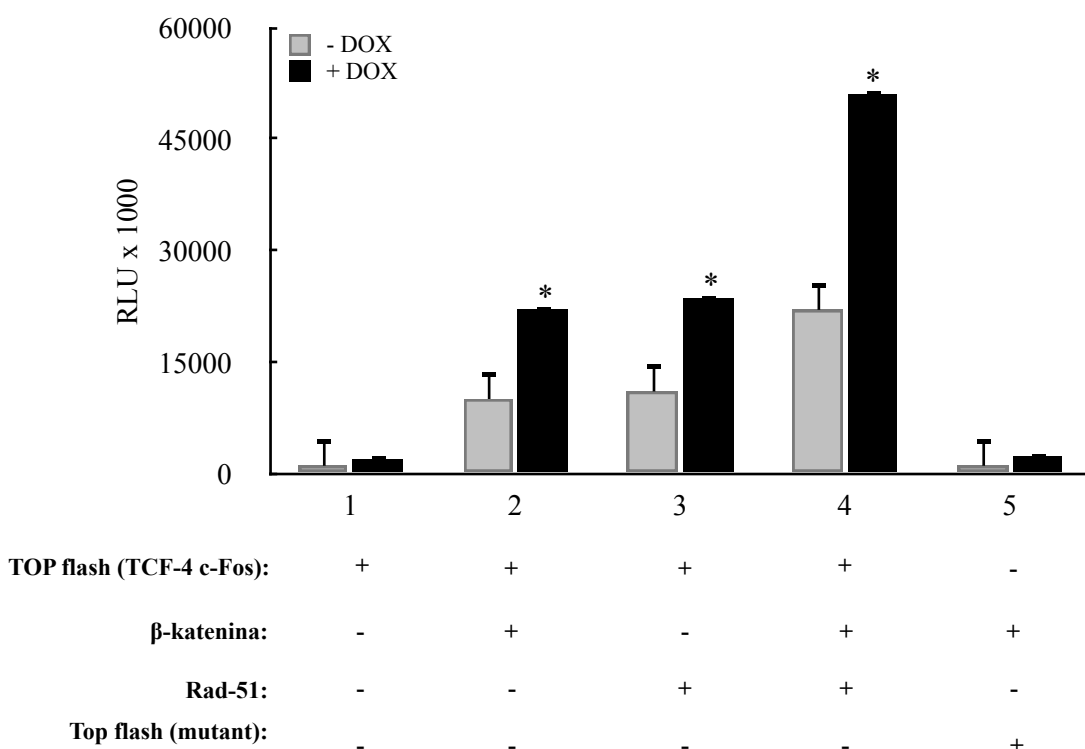
Podobnie jak w poprzednim eksperymencie przeprowadzono kontrolę równomiernego naładowania ścieżek żelu, używając metody 'strippingu' i wykorzystując przeciwciało I-rzędowe anti-SV40-antygenT. Wszystkie ekstrakty komórkowe wykazywały stałą ekspresję antygeny T (nie zamieszczono zdjęć, gdyż były one identyczne jak zamieszczone na Rys. 20). Jako dodatkową kontrolę wykonano immunoprecypitację tych samych ekstraktów białkowych z normalnym serum i następnie wykonano Western blot z przeciwciałem przeciwko SV40-antygen T. Wyniki nie wykazały żadnych niespecyficznych wiązań.

3.3. Aktywność transkrypcyjna promotorów c-myc i TCF-4 w komórkach U87-MG z indukowanym przez doksycyklinę antygenem T.

Wiele prac donosi o tym, iż antygen T może stabilizować β -kateninę przez co następuje nagromadzenie jej w jądrze komórkowym i zablokowanie czynników transkrypcyjnych, które odpowiedzialne są za kontrolowanie prawidłowo funkcjonującego cyklu komórkowego. W tym celu kolejnym krokiem w pracy było sprawdzenie aktywności transkrypcyjnej promotorów TCF-4 i c-myc.

3.3.1. Aktywność transkrypcyjna promotora TCF-4 w komórkach glejaka - U87-MG

Aktywność promotora TCF-4 odgrywa kluczową rolę w kontroli nad prawidłowo funkcjonującym cyklem komórkowym. Odpowiedzialny jest za proliferację i zablokowanie cyklu w chwili zagrożenia. Jest on silnie związany ze ścieżką sygnałową Wnt. Gdy β -katenina przetransportowana jest do jądra komórkowego tam łączy się m.in. z takimi czynnikami transkrypcyjnym jak TCF-4, który ma potencjał stymulowania genów kontrolujących cykl komórkowy, jakimi są c-myc czy cyklina D1. Dlatego też, ważnym etapem w pracy było sprawdzenie czy białko wirusowe, antygen T, wpływa na aktywność promotora TCF-4 w komórkach U87-MG. Rysunek 23 przedstawia wzrost ekspresji genu lucyferazy pod kontrolą promotora zawierającego sekwencje TCF-4, mierzony jako wzrost aktywności lucyferazy.



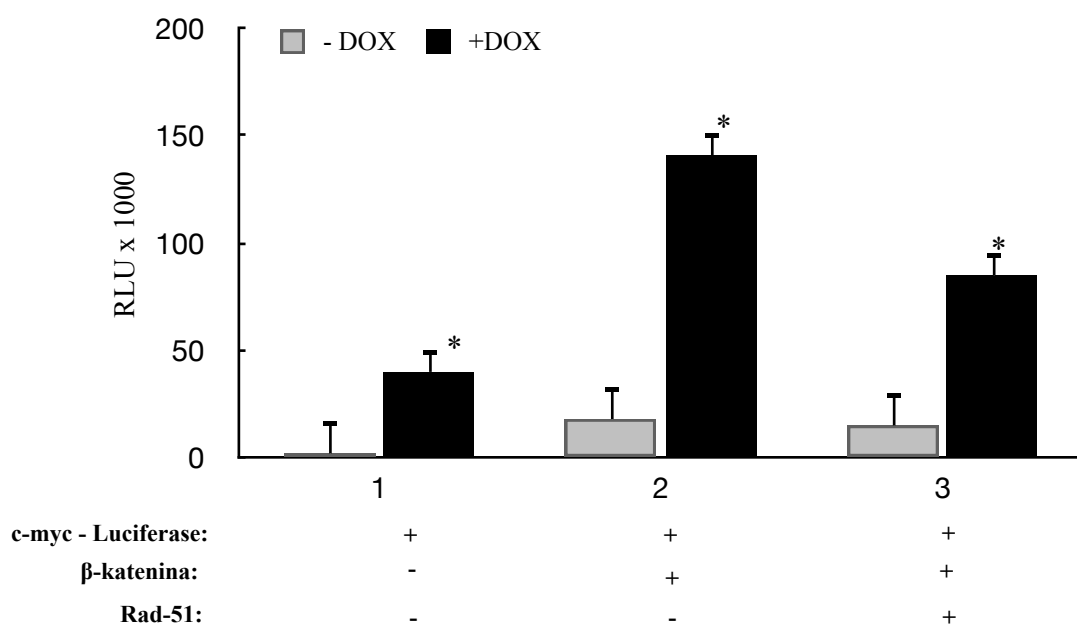
Rysunek 23. Aktywność transkrypcyjna promotora TCF-4 w komórkach U87-MG. Aktywność względem lucyferazy wyrażona jest jako krotność indukcji względem kontroli. Słupki: średnia + SE, 3 eksperymenty, istotność statystyczna różnic: * $p < 0.05$.

Komórki U87-MG z indukowanym przez doksycyklinę antygenem T zostały także transfekowane plazmidem kodującym białka Rad-51 i β -kateninę aby sprawdzić czy ich współdziałanie z antygenem T wpływa na aktywność promotora.

Obserwowano różnice statystyczne pomiędzy grupami kontrolnymi (komórki bez ekspresji antygeny T), a grupami komórek gdzie antygen T został zaktywowany (Rys. 23). Wskazuje, to iż antygen T wywołuje wzrost aktywności transkrypcyjnej promotora TCF-4 w komórkach U87-MG z indukowanym antygenem T. Komórki transfekowane plazmidem kodującym Rad-51 powoduje nieznaczne wzmocnienie aktywności promotora. W komórkach wykazujących ekspresję jednocześnie białka Rad-51 i β -kateniny obserwowano ponad 2-krotny wzrost aktywności lucyferazy. Jako negatywną kontrolę użyto zmutowanego promotora Top Flash - TCF-4, który nie wykazywał aktywności transkrypcyjnej. Jak widać na przedstawionym wykresie (Rys. 23), zmutowany promotor nie wpływa na jego aktywność co świadczy o specyficznym działaniu TCF-4 c-Fos (Top flash).

3.3.2. Aktywność transkrypcyjna promotora c-myc w komórkach U87-MG z indukowanym przez doksycyklinę antygenem T

C-myc, podobnie jak TCF-4, odgrywa bardzo ważną rolę w regulacji cyklu komórkowego. Zablokowanie jego funkcji może wiązać się z występowaniem choroby nowotworowej. Kolejnym krokiem było sprawdzenie jak antygen T wpływa na aktywność promotora c-myc. Komórki U87-MG były transfekowane plazmidem kodującym β -kateninę i Rad-51 w celu sprawdzenia jak interakcja pomiędzy tymi białkami a antygenem T wpływa na aktywację promotora c-myc.



Rysunek 24. Aktywność transkrypcyjna promotora c-myc w komórkach U87-MG z indukowanym przez doksycyklinę antygenem T. Słupki: średnia + SE, 3 eksperymenty, istotność statystyczna różnic: * p<0.05

Rysunek 24 przedstawia wzrost ekspresji genu lucyferazy pod kontrolą promotora zawierającego sekwencje c-myc, mierzony jako wzrost aktywności lucyferazy. Obecność samego antygeny T wpływa na wzrost aktywność promotora w porównaniu z grupą kontrolną (obserwowano 4-krotny wzrost aktywności). Komórki wykazujące ekspresję białka wirusowego i β-kateniny wykazywały ponad 8-krotny wzrost aktywności promotora c-myc. Gdy komórki glejaka wykazywały obecność wszystkich trzech białek aktywność promotora była 4-krotnie większa niż w grupie kontrolnej.

4. BIAŁKO WIRUSOWE ANTYGEN T STABILIZUJE mRNA β-KATENINY W JĄDRZE

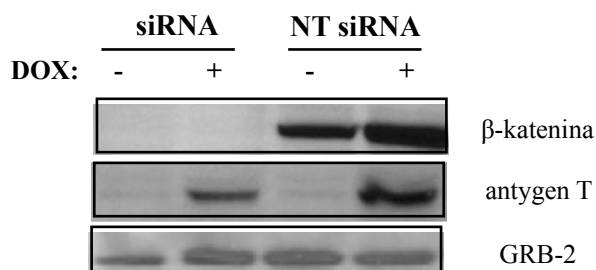
Za pomocą techniki interferencji RNA, przy użyciu syntetycznych siRNA, można wywołać znaczące zahamowanie ekspresji określonego genu. Zbadano zatem czy stosując

siRNA skierowane przeciw mRNA dla β -kateniny, można skutecznie obniżyć ekspresję β -kateniny zarówno na poziomie mRNA jak i białka.

Komórki U87-MG z indukowanym przez doksycyklinę antygenem T transfekowano 1 μ g siRNA β -katenina lub siNT stosując 4 μ l Lipofectamine 2000. Procedurę tą powtórzono 2-krotnie w 24 godzinnych odstępach czasowych, w celu maksymalnego wyciszenia genu β -kateniny. Następnym krokiem było przygotowanie ekstraktów białkowych i rozdzielenie ich elektroforetycznie używając metody Western blot. Otrzymane próbki nałożono na żel w następującej kolejności:

- (1) komórki hodowane w warunkach kontrolnych i transfekowane siRNA β -katenina;
- (2) komórki hodowane z doksycykliną i transfekowane siRNA β -katenina;
- (3) komórki hodowane w warunkach kontrolnych i transfekowane NT siRNA (negatywna kontrola),
- (4) komórki hodowane z doksycykliną i transfekowane NT siRNA (negatywna kontrola);

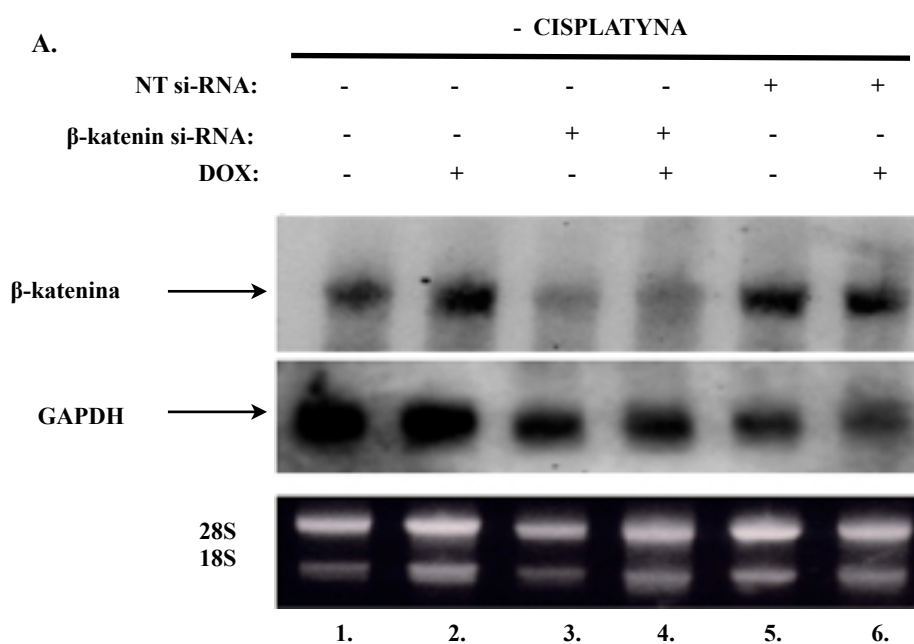
W wyniku zastosowania siRNA uzyskano 100% wyciszenie ekspresji genu β -kateniny na poziomie białka (Rys. 25). Obecność antygenu T nie wpływa na stopień wygaszenia genu β -kateniny. NT siRNA użyto jako kontrolę negatywną.



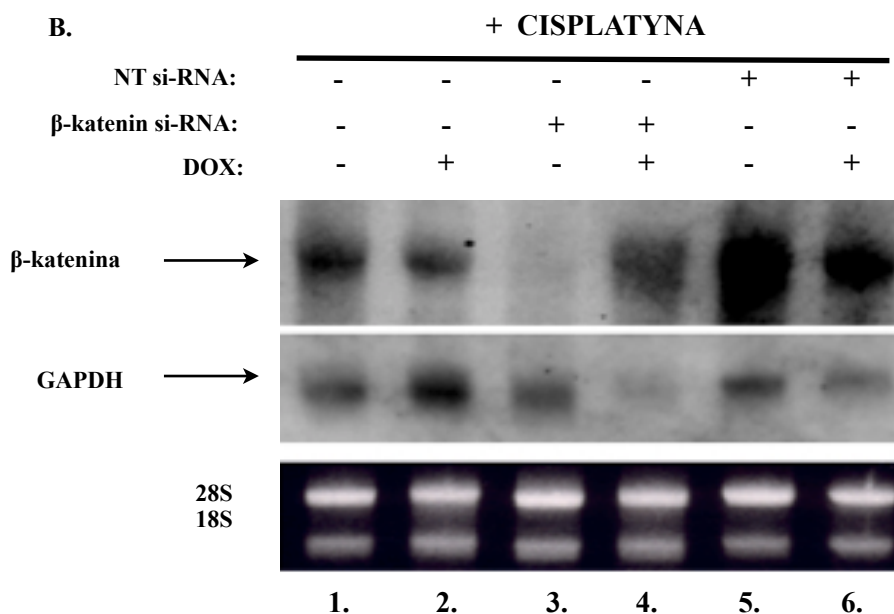
Rysunek 25. Wpływ siRNA β -kateniny na ekspresję białka w komórkach U87-MG z indukowanym przez doksycyklinę antygenem T. Kontrola równomiernego naładowania ścieżek żelu: detekcja białka GRB2.

Po upewnieniu się, iż technika interferencji RNA działa na bardzo wysokim poziomie w komórkach U87-MG, następnym krokiem było wyizolowanie mRNA z podobnie przygotowanych komórek i sprawdzenie poziomu mRNA β -kateniny metodą Northern blot.

W wyniku zastosowania siRNA uzyskano obniżenie ekspresji β -kateniny na poziomie mRNA (Rys. 26A). Obecność antygeny T nie zmieniała poziomu ekspresji mRNA β -kateniny. Następnie zaktywowano podwójne pęknięcia nici DNA poprzez inkubację komórek U87-MG z 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cisplatyny, transfekowano z siRNA i wyizolowano mRNA. Podobnie jak uprzednio poziom mRNA β -kateniny sprawdzono używając metody Northern blot. W wyniku aktywacji podwójnych pęknięć nici DNA i ekspresji białka wirusowego, antygeny T, mimo zahamowania ekspresji mRNA β -kateniny obserwowano silną stabilizację głównego białka ścieżki sygnałowej Wnt- β -kateniny (Rys. 26B, linia 4).

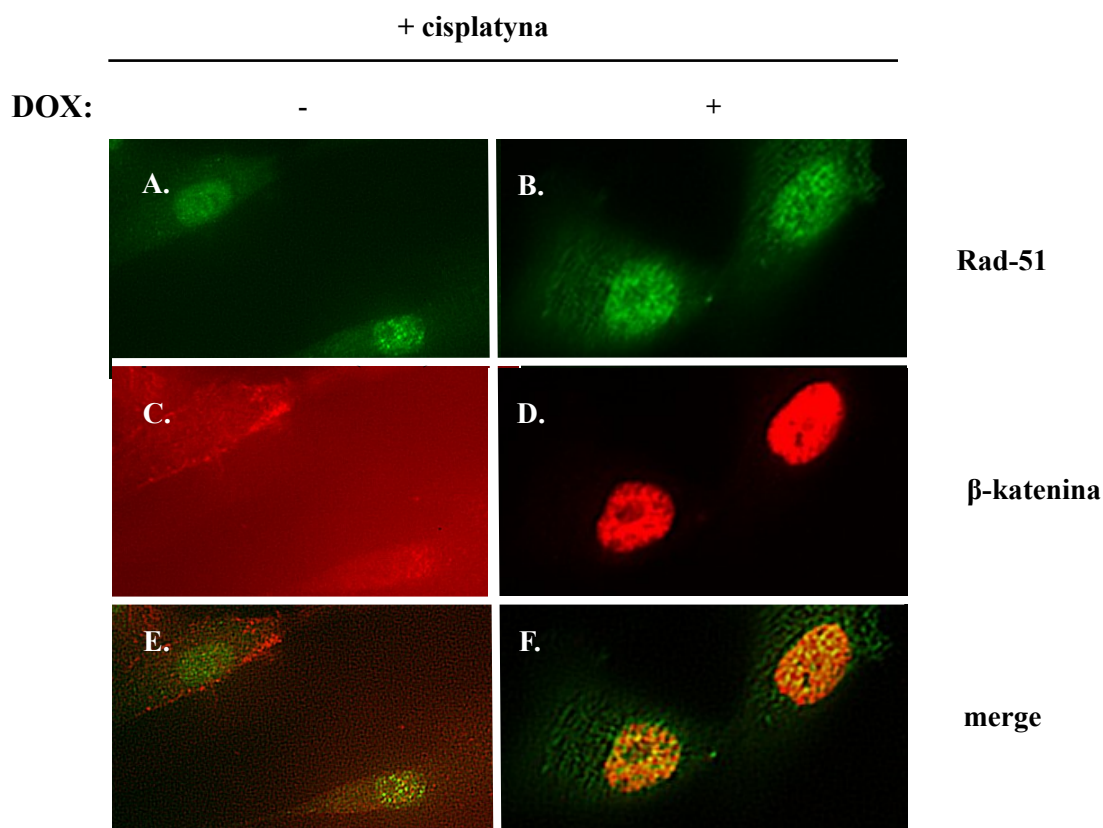


Rysunek 26A. Wpływ siRNA β -kateniny na poziom mRNA w komórkach U87-MG z indukowanym antygenem T. Kontrola równomiernego naładowania ścieżek żelu: detekcja białka 28S i 18S.



Rysunek 26B. Wpływ zahamowania ekspresji β -kateniny i aktywacji białka Rad-51 na poziom mRNA w komórkach U87-MG z indukowanym antygenem T. Kontrola równomiernego naładowania ścieżek żelu: detekcja 28S i 18S.

Aby potwierdzić stabilizację β -kateniny przez antygen T i Rad-51 przeprowadzono podwójne, barwienie immunofluorescencyjne komórek U87-MG z indukowanym antygenem T, używając I rzędowych przeciwciał przeciwko Rad-51 i β -kateninie. Aktywność białka Rad-51 zaktywowano inkubując komórki z cisplatyną (1 μ g/ml przez 6 godzin). Wyniki zaprezentowano na Rysunek 27. Zdjęcia wyraźnie przedstawiają silną, nuklearną lokalizację białka Rad-51 w komórkach wykazujących ekspresję antygenu T (zdjęcie B). Bardzo ciekawe wyniki otrzymano po immunofluorescencji z przeciwciałem przeciwko β -kateninie. Lokalizacja białka w komórkach gdzie zaktywowane są tylko podwójne pęknięcia DNA była głównie cytoplazmatyczna (zdjęcie C), natomiast gdy komórki wykazywały obecność białka wirusowego, lokalizacja ta została przetransportowana do jądra komórkowego (zdjęcie D).



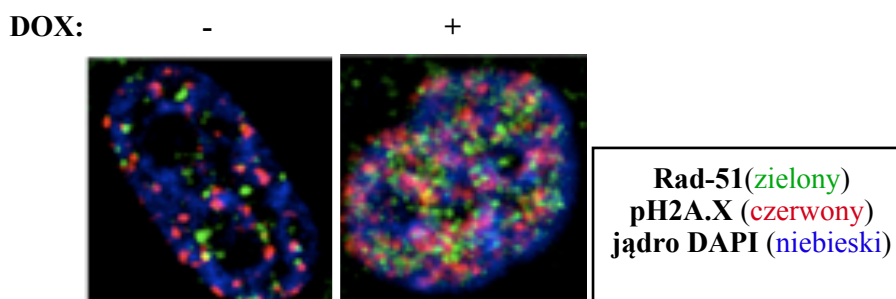
Rysunek 27. Barwienie immunofluorescencyjne komórek U87-MG z indukowanym antygenem T przez doksycyklinę i białkiem Rad-51 przez cisplatynę. Kolor zielony - Rad-51, kolor czerwony - β -katenina.

5. WPLYW ANTYGENU T NA NAPRAWĘ PODWÓJNYCH PĘKNIĘĆ NICI DNA.

W poprzednich rozdziałach pokazano, że rezultatem aktywacji białka wirusowego antygeny T są zmiany cech komórek U87-MG mogące rzutować na ich potencjał do procesów nowotworzenia. Udowodniono także, iż zmiany te wywołane są przez modulację ekspresji białek i szlaków przekazywania sygnału. Nadmierny, nieograniczony wzrost jak również nagromadzenie β -kateniny w jądrze komórkowym może być konsekwencją upośledzenia procesów naprawy uszkodzonego DNA. Sprawdzone zatem, czy aktywacja antygeny T wpływa na zdolność naprawy podwójnych pęknięć nici DNA, przez białko Rad-51, na drodze rekombinacji homologicznej w komórkach U87-MG.

5.1. Upośledzenie naprawy podwójnych pęknięć nici DNA przez białko antygeny T na drodze HR

Naprawa podwójnych pęknięć nici DNA na drodze rekombinacji homologicznej jest jednym z najskuteczniejszych procesów naprawy uszkodzonego DNA. W proces ten zaangażowane są liczne białka i kompleksy białkowe ale jak się okazuje najważniejszą rolę odgrywa białko Rad-51, które jest jednym z białek inicjujących proces naprawy. Aby przekonać się czy aktywacja antygeny T w komórkach U87-MG wpływa na proces naprawy, sprawdzono stopień kolokalizacji białka Rad-51 i pH2A.X na drodze pośredniego barwienia immunofluorescencyjnego.



Rysunek 28. Podwójne barwienie immunofluorescencyjne komórek U87-MG z indukowanym antygenem T. Zdjęcia spod mikroskopu konfokalnego: kolor zielony - Rad-51; kolor czerwony - pH2A.X; kolor niebieski - jądro komórkowe, DAPI.

W komórkach U87-MG aktywowano antygen T poprzez inkubację przez 16 godz. z doksycykliną, podwójne pęknięcia aktywowano poprzez inkubację z chemioteratykiem - cisplatyną. Po upływie 6 godzin inkubacji z cisplatyną komórki poddano podwójnemu barwieniu immunofluorescencyjnemu używając 1 rzędowych przeciwciał przeciwko Rad-51 i pH2A.X. Wyraźnie widać na przedstawionych zdjęciach (Rys. 28), iż antygen T powoduje wzrost aktywności białka Rad-51 i jego interakcji z białkiem pH2A.X, odpowiedzialnym za naprawę nici DNA na drodze rekombinacji homologicznej.

Następnym krokiem było sprawdzenie czy współdziałanie pomiędzy β -kateniną i białkiem wirusowym a także stabilizacja mRNA β -kateniny przez antygen T ma wpływ na naprawę nici DNA przez białko Rad-51. W tym celu komórki przygotowano

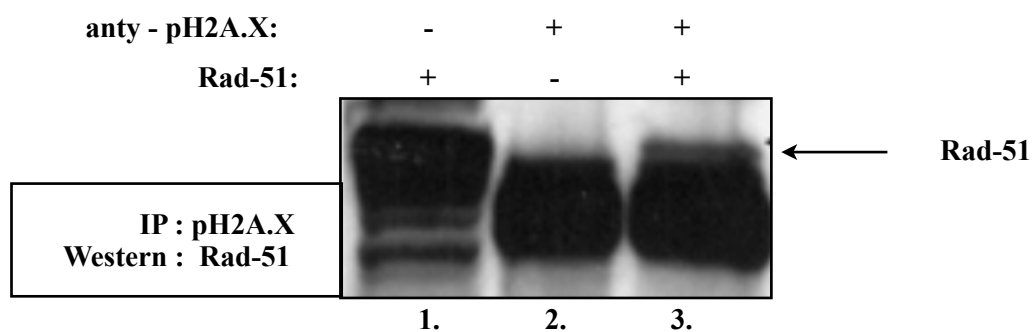
w podobny sposób jak opisano powyżej. Dodatkowo komórki U87-MG zostały transfekowane plazmidem kodującym β -kateninę i poddane podwójnemu barwieniu immunofluorescencyjnemu. Otrzymane zdjęcia spod mikroskopu konfokalnego zostały przygotowane odpowiednio w programie Photoshop i została policzona liczba koekspresji (*foci*) pomiędzy białkiem Rad-51 i pH2A.X.

Tabela 4. Procent aktywnych białek Rad-51 (linia pierwsza) i procent miejsc w których białka Rad-51 i pH2A.X wykazują koekspresję (linia druga). Wyniki pochodzą z trzech niezależnych eksperymentów

antygen T β -katenina	- -	+ -	- +	+ +
Rad-51 % kolokalizacji z pH2A.X	14% 32%	32% 51%	46% 75%	55% 100%

Otrzymano bardzo interesujące wyniki, które pokazują, iż ekspresja antygeny T i β -kateniny znacznie zwiększa aktywność białka Rad-51. Obserwowano 100% kolokalizacji białek Rad-51 i pH2A.X co świadczy o występowaniu licznych uszkodzeń nici DNA w tych komórkach.

Ostatnie doświadczenie zostało zaplanowane w celu udowodnienia, że podczas procesu naprawy podwójnych pęknięć DNA białka Rad-51 i pH2A.X współdziałają ze sobą. W tym celu przygotowano ekstrakty proteinowe i na drodze immunoprecypitacji sprawdzono czy białka te wykazują fizyczną interakcję.



Rysunek 30. Immunoprecypitacja pomiędzy białkami Rad-51 i pH2A.X w komórkach U87-MG.

Ekstrakty proteinowe z komórek U87-MG inkubowano z przeciwciałem anty pH2A.X i następnie rozdzielono elektroforetycznie. Otrzymaną membranę inkubowano z przeciwciałem I rzędowym przeciwko Rad-51. Otrzymane wyniki, prezentują wyraźną, fizyczną interakcję pomiędzy badanymi proteinami (Rys. 30, linia 3).

VI. DYSKUSJA

Od lat 60-dziesiątych, kiedy to Richardson udowodnił związek pomiędzy wirusem JC i PML zainteresowanie patogenem wzrosło. Badania donoszą, o związku pomiędzy JCV i licznymi chorobami nowotworowymi, m.in. wieloogniskową astrocytomą [Sima et al., 1983], anaplastyczną astrocytomą, meduloblastomą, glejakiem wielopostaciowym [Del Valle et al., 2002a, 2002b], a także licznymi nowotworami układu pokarmowego [Laghi et al., 1999; Enam et al., 2002; Hori et al., 2005; Lin et al., 2008; Nosho et al., 2009].

O tym, iż wirus JC bierze pośredni / bezpośredni udział w procesie nowotworzenia pokazują liczne badania przeprowadzone na modelach eksperymentalnych. Zwierzęta doświadczalne (chomiki i szczury), które zostały zainfekowane wirusem JC, wykazują rozwój szerokiej gamy nowotworów, w tym neuroektodermalnych i guzów glejowych [Zu Rhein i Varakis, 1979; London et al., 1983; Ohsumi et al., 1985]. Ponadto, u kilka linii myszy transgenicznych wykazujących ekspresję antygeny T, również zaobserwowano rozwój nowotworów pierwotnych neuroektodermalnych, guzów glejowych i przysadki.

Aby udowodnić onkogenną funkcję wirusa JC należy zbadać dokładne molekularne mechanizmy nowotworzenia. Wiele prac donosi o tym, iż białko wirusowe, antygen T pełni główną rolę w transformowaniu komórek, głównie poprzez zdolność do interakcji z białkami supresorowymi w tym NF2, pRB a także p53 [Tan et al., 1986; Krynska et al., 1997, 1999; Shollar et al., 2004]. Świadczyć to może o roli wirusa JC w deregulacji procesów odpowiedzialnych za regulację cyklu komórkowego i proliferację. Poza tym antygen T ma zdolność do deregulowania kilku szlaków przekazywania sygnału, takich jak Wnt/ β -kateniny (odpowiedzialne za kontrolę proliferacji komórek) [Gan et al., 2001; Enam et al., 2002; Bhattacharya et al., 2007], czy ścieżka IGF-IR/IRS-1 [Reiss et al., 2006]. Lassak i wsp. pokazują, że T-antygen jest w stanie transportować IRS-1 do jądra, i tam ingeruje na prawidłową naprawę uszkodzonego DNA, czego efektem jest gromadzenie się mutacji [Lassak et al., 2002; Trojanek et al., 2006].

Mimo tych licznych doniesień, mechanizm jakim wirus JC powoduje transformację komórek nie jest dokładnie poznany. Dlatego też w prezentowanej rozprawie

zaproponowano model eksperymentalny, który pozwoli zrozumieć jedną z dróg procesu nowotworzenia w komórkach ludzkich zainfekowanych wirusem JC.

Pierwszym krokiem doświadczalnym w pracy było potwierdzenie obecności białek wirusowych w ludzkich tkankach nowotworowych. W tym celu, tkanki guzów mózgu wybarwiono immunocytochemicznie w celu wykrycia antygeny T. Udowodniono, że około 50% wszystkich badanych tkanek nowotworowych wykazywały obecność białka wirusowego (Rys. 11). Istotnym jest również, aby zwrócić uwagę na to, że wirus JC wykazuje 75% homologii z wirusami SV40 i BKV, które należą do tej samej rodziny. Przeciwciała stosowane do wykrywania antygeny T wirusa JC może także reagować z wirusami SV40 i BKV, dlatego też obserwowane wyniki nie mogą wykluczać ewentualnej obecności również tych wirusów w badanych tkankach. Jednak opierając się na wynikach amplifikacji genów, Enam i wsp. a także Del Valle i wsp. wykluczają zależność pomiędzy nowotworami mózgu a wirusem SV40 czy BKV [Enam et al., 2002]. A zatem obecny antygen T w badanych tkankach nowotworowych jest najprawdopodobniej produkowany przez wirusa JC.

Nie jest to pierwsze doniesienie o obecności białek wirusa JC w ludzkich tkankach nowotworowych mózgu. Wyniki te potwierdzają wcześniejsze obserwacje dokonane przez Del Valle i wsp. [Del Valle et al., 2001b]. Naukowcy z Uniwersytetu Temple udowodnili obecność białek wirusa JC także w nowotworach pochodzenia nie glejowego. Uzyskane wyniki pokazują, że wirus JC występuje także w nowotworach jelita grubego, piersi czy płuc [Del Valle et al., 2001b]. Del Valle i wsp. dodatkowo wybarwiali tkanki przeciwko pozostałym białkom wirusowym - białkom kapsydu VP-1 i agnoproteinie. Wszystkie tkanki, które wykazywały pozytywną ekspresję antygeny T, wykazywały też pozytywną reakcję dla agnoproteiny. Żadnej z badanych nowotworów nie wykazywał ekspresji białek kapsydu co sugeruje, że w komórkach zmienionych nowotworowo nie dochodzi do replikacji wirusa zakończonej pojawieniem się wirionów potomnych. Jako kontrolę wykorzystano tkankę zdrowego mózgu i jelita grubego. Podobnie jak w prezentowanej rozprawie (Rys. 11D) jak i omawianym artykule, nie zaobserwowano, żadnej pozytywnej ekspresji białek wirusowych w komórkach zdrowej tkanki [Del Valle et al., 2001b; Perez-Liz et al., 2008].

Wyniki, pokazujące wybiórczą obecność białek wirusowych w tkankach nowotworowych mózgu, są pierwszym dowodem na to, iż wirus JC może odgrywać rolę w rozwoju chorób nowotworowych u ludzi.

Wpływ dużego białka wirusowego antygeny T, na fizjologię komórek glejaka wielopostaciowego U87-MG.

Dostępna literatura donosi o tym, iż głównym białkiem onkogennym wirusa JC jest duże białko antygeny T. Dlatego też, w prezentowanej rozprawie skupiono się głównie na roli tego białka w procesie nowotworzenia.

Safak i wsp. pokazali, że antygen T może oddziaływać z innymi białkami wirusowymi takimi jak agnoproteina [Khalili et al., 2005]. Udowodniono fizyczną interakcję pomiędzy tymi białkami wirusowymi jak również, zaprezentowano iż współdziałanie to, wpływa na aktywację promotorów odpowiedzialnych za regulację transkrypcji i replikacji DNA. Udowodniono, iż agnoproteina, która produkowana jest w fazie wczesnej cyklu wirusowego wpływa na funkcje białek wirusowych fazy późnej, takich jak antygen T. Dlatego też, linie komórkowe pozyskane z modeli zwierzęcych, zainfekowanych wirusem JC nie pozwalają na czystą ocenę funkcji antygeny T. Obserwowany efekt może być wynikiem interakcji pomiędzy białkami wirusowymi, a nie samego antygeny T [Safak et al., 2001].

Z tego względu, w prezentowanej rozprawie zaproponowano nowy model *in vitro*, który pozwala ocenić wpływ antygeny T na zdolność transformowania komórek nowotworowych. W tym celu stworzono ludzką linię glejaka wielopostaciowego z indukowanym przez doksycyklinę antygenem T (U87-MG \rightarrow + DOX). Komórki U87-MG stabilnie transfekowano antygenem T i inkubując z doksycykliną (stosując system pTet-ON), bardzo efektywnie indukowano ekspresję antygeny T. Jak wspomniano w rozdziale poświęconym procedurom eksperymentalnym, w plazmid cmv-antygen T był dodatkowo wklonowany fragment kodujący zielone białko GFP, co w wyniku ekspresji antygeny T wywoływało zieloną fluorescencję komórek (Rys. 12.1A). Zaobserwowano także, iż w przypadku ekspresji białka wirusowego w komórkach wzrasta aktywność

lucyferazy, której gen znajdował się pod kontrolą promotora wczesnego wirusa JC, co potwierdza obecność białek wirusowych w komórkach nowotworowych (Rys. 14).

Po pierwszej serii eksperymentów, która pozwoliła upewnić się, iż system indukcji działa na bardzo wysokim poziomie, przystąpiono do analizy wpływu dużego białka wirusowego antygeny T, na fizjologię komórek glejaka wielopostaciowego (U87-MG).

Wszystkie komórki nowotworowe cechują się zdolnością do niekontrolowanych, nadmiernych podziałów na skutek albo autokrynej regulacji wzrostu, albo ignorowania systemów odpowiedzialnych za kontrolę prawidłowo namnożonych komórek lub braku właściwej regulacji proliferacji. Poza tym komórki nowotworowe nie zachowują kontaktowego dystansu pomiędzy sobą, są inwazyjne, mogą pozyskać zdolności do nieograniczonego przeżywania oraz wzrostu (jest to związane głównie z nieobecnością reakcji na czynniki, które wywołują apoptozę). Komórki nowotworowe tracą zdolność wypełniania charakterystycznych dla siebie funkcji, co spowodowane jest nadmierną proliferacją i mutacjami DNA. Najbardziej inwazyjną cechą komórki nowotworowej jest zdolność do tworzenia przerzutów (tzw. metastaza).

Wszystkie wyżej wymienione cechy komórek nowotworowych zostały udowodnione w prezentowanych liniach glejaka wielopostaciowego (U87-MG \pm DOX). Zaprezentowano, iż antygen T powoduje nieograniczoną zdolność proliferacyjną komórek (Rys. 14), zdolność do wzrostu klonalnego (Rys. 15) a także braku kontaktowego zahamowania wzrostu (Rys. 14B).

Deregulacja ta jest najprawdopodobniej efektem zablokowania funkcji białek odpowiedzialnych za kontrolowanie i regulowanie proliferacji komórek. Jednym z najczęściej mutowanych białek w komórkach ludzkich nowotworów jest białko p53, które jest białkiem supresorowym transformacji nowotworowej. Jest m.in. odpowiedzialne za kontrolowanie prawidłowej proliferacji komórek. Białko supresorowe p53, ze względu na swój krótki okres półtrwania jest rzadko wykrywane w wolnej formie. Natomiast mutacja genu, bądź interakcja z różnego rodzaju onkoproteinami, także antygenem T [Gordon et al., 2000, Krynska et al., 2000], mogą stabilizować i inaktywować białko supresorowe. Del Valle i wsp. udowodnili obecność antygeny T i białka p53 w tkankach

nowotworowych między innymi glejaka wielopostaciowego [Del Valle et al., 2000], natomiast Gordon i wsp. przeprowadzając doświadczenia na antygen T - transgenicznych myszach udowodnili fizyczną interakcję pomiędzy dużym białkiem wirusowym a białkiem p53 w komórkach nowotworowych mózgu. Najprawdopodobniej w prezentowanym modelu eksperymentalnym antygen T wiąże białko p53, inaktywuje jego działanie, efektem czego jest brak kontroli nad proliferacją i nieograniczony, niepohamowany wzrost. Wyniki te potwierdzone są także niezaprezentowanymi w pracy wynikami z preteolitycznej analizy profili białkowych linii U87-MG z indukowanym antygenem T. Zaobserwowano ponad 19-krotną nadekspresję białek jądrowych i około jądrowym, m.in. białka neuroforminy. Z literatury wiadomo, że neuroformina może hamować działanie białka p53 i p21 [Kurki et al., 2004].

Aby upewnić się w powyższych przypuszczeniach, sprawdzono jak białko wirusowe wpływa na dystrybucję faz cyklu komórkowego. Zaobserwowano, iż aktywacja antygenu T w komórkach U87-MG wywołuje zmniejszenie proporcji komórek w fazie G₀/G₁ kosztem frakcji w fazie S, co może świadczyć o cytotoksycznym efekcie antygenu T (Tabela 3.). Wyniki te potwierdzają nasze wcześniejsze obserwacje dotyczące efektu dużego białka wirusowego na wzrost proliferacji komórek glejaka wielopostaciowego.

Ciekawe obserwacje otrzymano inkubując komórki U87-MG z cisplatyną. Podawanie tego chemioterapeutyku komórkom, które nie wykazywały ekspresji antygenu T wywoływało zwiększenie frakcji komórek apoptotycznych (6%), natomiast w komórkach, które wykazywały ekspresję białka wirusowego, cisplatyna nie wykazywała skuteczności działania. Procent komórek apoptotycznych wynosił tylko 1.6%. Za mechanizm cytotoksyczności cisplatyny uważana jest jej interkalacja w mały rowek podwójnej helisy DNA, co wywołuje zagięcie nici o około 47 stopni i 110 – stopniowe rozwinięcie helisy. Jednocześnie cisplatyna reagując z resztami guaniny powoduje powstanie wiązań krzyżowych w obrębie jednej nici i pomiędzy niemi [Dronkert i Kanaar, 2001]. Podczas syntezy DNA gdy widełki replikacyjne natrafiają na takie połączenia i następuje pęknięcie obu nici DNA [Hoeijmakers, 2001; Wang et al., 2005]. Uszkodzenia DNA wywołują zaburzenia w cyklu komórkowym, a gdy szybkość ich powstawania w komórce jest dużą (na przykład w czasie chemioterapii), tempo naprawy jest

niewystarczające i nagromadzenie uszkodzeń wywołuje apoptozę [Dronkert i Kanaar, 2001]. Zatem na działanie cisplatyny najbardziej wrażliwe są szybko dzielące się komórki nowotworowe. Białko wirusowe - antygen T zwiększając frakcję komórek w fazie S, lecz nie zabijając ich, chroni komórki glejaka przed cisplatyną. Stosowanie tego leku nie powoduje całkowitej eliminacji komórek nowotworowych, nie jest więc wskazane z punktu widzenia terapii ale zostały wykorzystany jako czynnik aktywujący podwójne pęknięcia nici DNA.

Efekt antygeny T na ścieżkę przekazywania sygnału Wnt

Wyniki eksperymentalne przedstawione w pierwszej części pracy, pokazały, że antygen T zaburza prawidłową funkcję cyklu komórkowego, a także wpływa na wzrost proliferacji komórek glejaka wielopostaciowego U87-MG +/- DOX. Dostępna literatura donosi o onkogennym efekcie antygeny T głównie poprzez zablokowanie prawidłowej funkcji białka supresorowego p53 [Del Valle et al., 2000, Krynska et al., 1997], a także poprzez wpływ na prawidłową funkcję ścieżek przekazywania sygnałów [Reiss i Khalili 2003, Gordon et al., 2000, Del Valle et al., 2002d].

Droga przekazywania sygnału Wnt odpowiedzialna jest za prawidłowy wzrost, podział a także różnicowanie komórki. Zaburzenia w czasie aktywacji ścieżki Wnt obserwowane są m.in. w przypadku chorób nowotworowych. Prace prezentowane przez Enam i wsp. a także Gan mówią o roli wirusa JC w rozwoju raka jelita grubego i meduloblastomy poprzez wpływ na drogę przekazywania sygnału Wnt. Autorzy przedstawiają wyniki, w których białko wirusowe, antygen T, łączy się z β -kateniną i powoduje błędną aktywację drogi przekazywania sygnału Wnt. Dlatego też kolejnym założeniem rozprawy było sprawdzenie jak antygen T wpływa na ścieżkę przekazywania sygnału Wnt w komórkach glejaka wielopostaciowego z aktywnym przez doksycyklinę antygenem T [Enam et al., Gan et al., 2001].

Aby dokładnie zrozumieć działanie antygeny T na ścieżkę przekazywania sygnału Wnt, należy przypomnieć, że β -katenina jest centralnym białkiem tego szlaku. Białka Wnt, będące białkami sekrecyjnymi, oprócz wiązania z receptorami Fzd (ang. *Frizzled*) wymagają obecności także innych białek transbłonowych, takich jak LRP5 oraz LRP6

należących do rodziny receptorów LDL (ang. *Low-Density Lipoprotein-Receptor Related Proteins*), które odpowiadają za działania para- lub autokrynne. Po związaniu liganda Wnt z Fzd cytoplazmatyczne białko Dvl (Dishevelled) ulega fosforylacji i zostaje przetransportowane do błony komórkowej prawdopodobnie przy udziale fosfolipidów i/lub białek Fzd. W ten sposób następuje aktywacja Dvl, które po związaniu z kompleksem APC-Aksyna hamuje GSK3 β oraz kinazy kazeiny 1 α (CK1 α). Prowadzi to do zablokowania fosforylacji β -kateniny. Fosforylacja β -kateniny na N-końcu przez GSK3 β oraz CK1 α jest konieczna do rozpoznania tego białka przez składnik kompleksu ligazy ubikwitynowej E3, która odpowiada za degradację w lizosomach. Natomiast brak fosforylacji β -kateniny prowadzi do jej stabilizacji oraz przetransportowania do jądra, gdzie tworzy kompleksy z czynnikami transkrypcyjnymi TCF-4, co z kolei prowadzi do indukcji ekspresji genów zależnych od Wnt [Gallet et al., 1998; 1999].

W prezentowanej rozprawie doktorskiej zaprezentowano, po raz pierwszy, wzrost poziomu ekspresji białka i mRNA β -kateniny w komórkach glejaka wielopostaciowego pod wpływem antygeny T (Rys. 17, Rys. 18). Na drodze immunofluorescencji, jak również immunoprecypitacji/Western blot, udowodniono fizyczną interakcję pomiędzy białkiem antygeny T i głównym białkiem ścieżki przekazywania sygnału Wnt β -kateniną (Rys. 21 A, B). Antygen T wchodzi w interakcję z β -kateniną, której ilość w cytozolu, a następnie w jądrze zwiększa się w wyniku aktywacji ścieżki Wnt [Enam et al., 2002]. W jądrze β -katenina wchodzi w interakcję ze swoistymi czynnikami transkrypcyjnymi, stymulując w ten sposób wzmocnienia transkrypcji z promotora genu TCF-4 (Rys. 23) a także c-myc (Rys. 24), których produkty aktywują cykl komórkowy i proliferację.

Wyniki te wyraźnie pokazują, że białko wirusowe, antygen T, stabilizuje β -kateninę, powoduje jej akumulację w komórce, aktywuje czynnik transkrypcyjny TCF-4 i c-myc, co z kolei wpływa na wzrost proliferacji komórek nowotworowych.

Wpływ antygeny T w naprawie podwójnych pęknięć nici DNA na drodze HR

Zaburzenie mechanizmów kontroli cyklu komórkowego, kontaktowego zahamowania wzrostu i prawidłowo funkcjonujących dróg przekazywania sygnału może prowadzić do zwiększenia częstości podziałów komórkowych, jak również wzrostu liczby błędów powstających podczas podziału. Prowadzi to do gromadzenia zmian w materiale genetycznym, i w efekcie dochodzi do nagromadzenia mutacji w komórce, a wraz z nimi do niestabilności genetycznej.

Reiss i wsp. pokazują wpływ antygeny T na ścieżkę sygnałową aktywowaną przez substrat dla receptora insulinowego 1 (IRS-1). Po translokacji IRS-1 do jądra, w czym uczestniczy antygen T, IRS-1 wiąże białko Rad-51 na miejscu uszkodzonego DNA powodując hamowanie jego naprawy na zasadzie rekombinacji homologicznej (HR) [Reiss et al., 2006]. Darbinyan i wsp. także udowodnili, iż antygen T hamuje bardzo dokładny system naprawy podwójnych pęknięć nici DNA, co powodowało akumulację mutacji w zainfekowanych komórkach nowotworowych [Darbinyan et al., 2007, Trojanek et al. 2006]. Zarówno wadliwa naprawa uszkodzonego DNA, czy też defekty w zachowaniu telomerów, rozdziału chromosomów, mogą przyczynić się do rozwoju choroby nowotworowej [Reiss et al., 2006]. Wiadomo, że duże białko wirusa JC, antygen T, posiada zdolność transformacji komórek *in vitro*, jak również przyczynia się do rozwoju nowotworów u zwierząt doświadczalnych. Fakt, iż może on wpływać na naprawę DNA może odgrywać ważną rolę w powstawaniu nowotworów u ludzi.

Dlatego też, kolejnym krokiem eksperymentalny było sprawdzenie jak antygen T, wpływa na zdolność naprawy DNA przez komórki glejaka wielopostaciowego. Po pierwsze, udowodniono iż antygen T zwiększa ekspresję białka i mRNA Rad-51, głównego białka zaangażowanego w naprawę podwójnych nici DNA na drodze rekombinacji homologicznej. Otrzymane wyniki analizy fizycznej interakcji pomiędzy antygenem T i białkiem Rad-51, na drodze immunoprecypitacji potwierdzono metoda immunofluorescencji używając przeciwciał specyficznym dla SV40-antygeny T i białka Rad-51 (Rys. 19). Pokazano także, że obecność antygeny T wpływa na akumulację białka Rad-51 w jądrze komórki (Rys. 17). Wyniki te świadczą o wpływie antygeny T na wzrost

aktywności białka Rad-51, co może być wynikiem zwiększonej liczby uszkodzeń nici DNA w komórkach glejaka wielopostaciowego.

W odpowiedzi na powstanie DSB w komórce dochodzi do fosforylacji histonu typu H2A, zwanego H2AX, w pozycji Ser139 [Paull et al., 2000]. Powstaje wówczas fosforylowana postać H2A.X, γ H2A.X [Fernandez et al., 2004]. γ H2A.X akumuluje się w miejscach uszkodzenia DNA, gdzie uruchamia kaskadę czynników naprawczych i aktywuje białka biorące udział w naprawie DNA, m.in. białko Rad-51. Ilościowe oznaczenie dwuniciowych pęknięć DNA powstałych w komórce odbywa się na drodze immunofluorescencji, używając przeciwciał specyficznych dla ufosforyzowanego histonu. Metoda ta pozwala na bardzo dokładną identyfikację pojedynczych ognisk immunofluorescencji γ H2A.X, odpowiadających obecności pojedynczych pęknięć podwójnej nici DNA w jądrze komórkowym [Sedelnikova et al., 2002].

W prezentowanej pracy, po pierwsze, udowodniono na drodze immunoprecypitacji/Western blot, że białka Rad-51 i γ H2A.X wykazują fizyczną interakcję w jądrze komórkowym (Rys. 30). Następnie przystąpiono do oceny roli antygeny T w procesie naprawy podwójnych pęknięć nici DNA w komórkach glejaka wielopostaciowego. Uzyskane wyniki z immunofluorescencji i analizy komputerowej uzyskanych zdjęć, potwierdzają wcześniejsze doniesie o wpływie antygeny T na naprawę podwójnych pęknięć nici DNA w komórkach glejaka. Pokazano, że w komórkach wykazujących ekspresję białka wirusowego, liczba podwójnych pęknięć nici DNA wzrasta o 20% w porównaniu do komórek kontrolnych (Tabela 4.). Należy pamiętać, że ekspresja białka wirusowego w komórkach, wpływa także na rozkład faz cyklu komórkowego (Tabela 2.). Komórki glejaka z aktywnym antygenem T wykazywały wysoki procent komórek w fazie G2/M. Zatrzymanie w tej fazie ma na celu opóźnienie wejścia komórki w fazę mitozy w odpowiedzi na uszkodzenia nici DNA. Przerwa G2/M daje komórkom czas na naprawę powstałych uszkodzeń.

Trudno jest ocenić mechanizm działania wirusa JC w tym systemie. Z jednej strony wirus JC może bezpośrednio powodować uszkodzenia nici DNA w wyniku czego aktywowane są białka naprawy. Z drugiej jednak strony, możliwe jest, że wirus JC ingeruje

na białka naprawcze, błędnie je aktywując. Wynikiem czego jest wadliwa naprawa i w efekcie uszkodzenie nici DNA.

White i wsp. którzy transfekowali komórki ludzkie, plazmidem JCV antygen T, zaobserwowali silny wzrost transkrypcji promotora genu Rad-51 [White et al., 2006]. Indukcja ta była obserwowana w linii komórkowej p-53 null, to jest nie wykazującej ekspresji białka supresorowego p-53, które jest represorem dla promotora Rad-51 [Arias-Lopez et al., 2006]. Znaczący to, że wzrost aktywności promotora był niezależny od białka p53. Nadekspresja białka Rad-51 powodowała błędne uruchomienie drogi naprawy podwójnych pęknięć nici DNA, efektem czego była niestabilność genomu, uszkodzenie chromosomów i aneuploidia [Richardson et al., 2004]. Redukcja naprawy podwójnych pęknięć nici DNA na drodze HR w wyniku nadekspresji białka Rad-51, jest najprawdopodobniej wynikiem blokowania wymiany nici DNA przez nadmiar białka Rad-51 [Kim et al., 2001]. Możliwym jest, że antygen T aktywuje promotor białka Rad-51 i wzrost jego ilości powoduje niestabilność genetyczną.

Antygen T powoduje wzrost ekspresji białka Rad-51, co może powodować wzrost niestabilności genetycznej w komórce. Niestabilność ta, z kolei może przyczyniać się do rozwoju choroby nowotworowej, związanej z wirusem JC.

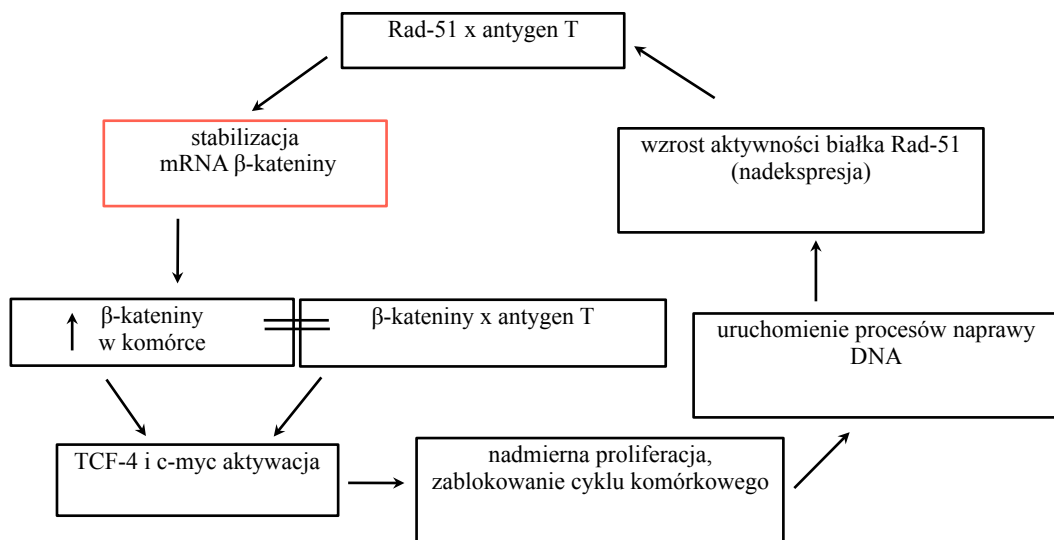
W prezentowanej pracy postanowiono także zbadać zależność pomiędzy białkiem drogi przekazywania sygnału Wnt - β -kateniny i białkiem zaangażowanym w naprawę podwójnych pęknięć nici DNA - białkiem Rad-51, w linii glejaka wielopostaciowego i indukowanym przez doksycyklinę antygenem T.

Analiza poziomu białka β -kateniny metodą Western blot i mRNA metodą Northern blot, pokazują że interakcja pomiędzy białkiem Rad-51 i antygenem T wpływa na znaczny wzrost poziomu białka i mRNA β -kateniny w komórkach glejaka (Rys. 17, Rys. 18). Wyniki te pokazują, że stabilizacja β -kateniny w komórce jest znacznie silniejsza w wyniku współdziałania pomiędzy białkami Rad-51 i antygenem T. Wzrost aktywności transkrypcyjnej promotora TCF-4 w komórkach wykazujących ekspresję antygeny T i białka Rad-51 jest 2-krotnie wyższy niż w komórkach gdzie tylko jedno z tych białek było obecne (Rys. 23). Następnie, wykorzystując technikę interferencji RNA udowodniono, że białko Rad-51 oddziałując z białkiem wirusowym antygenem T,

powoduje stabilizację mRNA β -kateniny. Posttranslacyjna modyfikacja głównego białka drogi przekazywania sygnału Wnt, poprzez Rad-51 i antygen T, powoduje stabilną akumulację białka głównie w jądrze komórkowym (Rys. 27).

Analizowano także jak nadekspresja białka β -kateniny wpływa na proces naprawy podwójnych pęknięć nici DNA w linii komórkowej glejaka z indukowanym przez doksycyklinę antygenem T. Analizując otrzymane zdjęcia, uzyskano bardzo interesujące wyniki. Sama obecność β -kateniny w komórkach powodowała znaczny wzrost procentu miejsc uszkodzeń nici DNA i naprawy na drodze homologii rekombinacyjnej. W komórkach, które wykazywały nadekspresja białka β -kateniny i obecność białka wirusowego antygeny T, obserwowana była 100% kolokalizacja białka Rad-51 i γ H2A.X, co świadczy o bardzo wysokim stopniu uszkodzeń podwójnej nici DNA w komórkach glejaka.

Na rysunku 31. przedstawiono schematyczny mechanizm działania wirusa JC w komórkach nowotworowych zaproponowany przez autora rozprawy doktorskiej.



Rysunek 31. Schemat działania wirusa JC w komórkach glejaka wielopostaciowego U87-MG.

Białko Rad-51 stabilizuje mRNA β -kateniny w linii komórkowej glejaka z indukowanym antygenem T. Stabilizacja ta, powoduje wzrost wolnej β -kateniny w komórce. Nadekspresja głównego białka drogi przekazywania sygnału Wnt, aktywuje czynniki transkrypcyjne TCF-4 i c-myc (β -katenina może również na tym etapie łączyć się z białkiem wirusowym i wzmacniać ten efekt). Gdy czynniki transkrypcyjne są aktywne, uruchomiona zostaje kaskada czynników które wpływają na wzrost niekontrolowanej proliferacji i uszkodzeń nici DNA. W chwili wystąpienia podwójnych pęknięć nici DNA, zostaje zaktywowany m.in. Rad-51. Antygen T ma zdolność do łączenia się z białkiem Rad-51 i blokowanie jego działania, dodatkowo nadekspresją białka Rad-51 powoduje stabilizację β -kateniny, która powoduje wzrost liczby uszkodzeń, co jest najprawdopodobniej efektem niestabilności genetycznej i pierwszym etapem rozwoju choroby nowotworowej w komórkach zakażonych wirusem JC.

Podsumowanie

Wykazano obecność białka wirusowego w ponad 50% badanych tkankach nowotworowych mózgu. W prezentowanej pracy, po raz pierwszy, zaprezentowano stabilizację mRNA β -kateniny przez duże białko wirusowe, antygen T i białko Rad-51. Przedstawiono także, iż stabilizacja ta, wpływa na wzrost uszkodzeń podwójnych pęknięć nici DNA i mechanizmy naprawy. W rozprawie zaproponowano także nowy model umożliwiający kontrolę ekspresji białka przez stworzenie indukowanej ludzkiej linii komórkowej, a także nową strategię badania podwójnych pęknięć nici DNA.

Podsumowując w zaprezentowanej rozprawie doktorskiej została udowodniona rola antygeny T w transformacji komórek ludzkiego glejaka wielopostaciowego i zaproponowana nowa strategia badania naprawy podwójnych pęknięć DNA.

VIII. LITERATURA

1. AGOSTINI HT, RYSCHKEWITSCH CF, STONER GL. (1996). Genotype profile of human polyomavirus JC excreted in urine of immunocompetent individuals. *J. Clin. Microbiol.* 34, 159–164.
2. ALEXANDROV AI, BOTCHAN MR, COZZARELLI NR. (2002). Characterization of simian virus 40 T-antigen double hexamers bound to a replication fork. The active form of the helicase. *J. Biol. Chem.* 277, 44886-44897.
3. ARIAS-LOPEZ C, LAZARO-TRUEBA I, KERR P, LORD CJ, DEXTER T, IRAVANI M, ASHWORTH A, SILVA A. (2006). p53 modulates homologous recombination by transcriptional regulation of the RAD51 gene. *EMBO Rep.* 7, 219–224.
4. BEHRENS, J, VON KRIES JP, KUHL M, BRUHN L, WEDLICH D, GROSSCHEDL R, BIRCHMEIER W. (1996). Functional interaction of β -catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature.*
5. BERGER JR CONCHA M. (1995). Progressive multifocal leukoencephalopathy: the evolution of a disease once considered rare. *J. Neurovirol.* 1, 15–18.
6. BHATTACHARYA R, NOCH EK, KHALILI K. (2007). A novel role of Rac1 GTPase in JCV T-antigen mediated β -catenin stabilization. *Oncogene.* 26, 7628–7636.
7. BOFFIL-MASS S, FORMIGA-CRUZ M, CLEMENTE-CASARES P, CALA-FELL F, GIRONES R. (2001). Potential Transmission of Human Polyomaviruses through the Gastrointestinal Tract after Exposure to Virions or Viral DNA. *J. Virol.* 75, 10290–10299.
8. BOHR V, KOBER L. (1985). DNA repair in lymphocytes from patients with secondary leukemia as measured by strand rejoining and unscheduled DNA synthesis. *Mutant Res. Sep:* 146, 2, 219-25.
9. BOLDORINI R, VEGGIANI C, BARCO D, MONGA G. (2005). Kidney and urinary tract polyomavirus infection and distribution: molecular biology investigation of 10 consecutive autopsies. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 129, 69–73.
10. BOLLAG B, KILPATRICK L.H, TYAGARAJAN S.K, TEVETHIA M.J, FRISQUE R.J. (2006). JC virus T'135, T'136 and T'165 proteins interact with cellular p107 and p130 in vivo and influence viral transformation potential. *J. Neurovirol.* 12, 428–442.
11. BOLLAG RJ, WALDMAN AS, LISKAY RM. (1989). Homologous recombination in mammalian cells. *Annu Rev Genet.* 23, 199-225.
12. BRADFORD, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding dye. *Anal Biochem* 72, 248-254
13. CHAN E.F, U. GAT J.M, MCNIFF, FUCHS E. (1999). A common human skin tumour is caused by activating mutations in beta-catenin. *Nat. Genet.* 21, 410–413.
14. CHANG H, WANG M, TSAI R.T, LIN H.S, HUAN J.S, WANG W.C, CHANG D. (2002). High incidence of JC viruria in JC-seropositive older individuals. *J. Neurovirol.* 8, 447–451.
15. COKGOR I, FRIEDMAN AH, FRIEDMAN H.S. (1998). Paediatric update. Gliomas. *Eur. J Cancer.* 34, 1910-1918.

-
16. COLLIER L, OXFORD J. (1996). *Wirusologia. Podręcznik dla studentów medycyny, stomatologii i mikrobiologii*, PZWL, Warszawa, 328.
 17. CROUL S, OTTE J, KHALILI K. (2003) Brain tumors and polyomaviruses. *J. Neurovirol.* 9, 173–182.
 18. CUNNINGHAM CC, LECLERC N, FLANAGAN LA, LU M, JANMEY P A, KOSIK KS. (1997). Microtubule-associated protein 2c reorganizes both microtubules and microfilaments into distinct cytoplasmic structures in an actin-binding protein-280-deficient melanoma cell line. *J Cell Biol.* 136, 845-857.
 19. DARBINYAN A, WHITE MK, AKAN S, RADHAKRISHNAN S, DEL VALLE L, AMINI A, KHALILI K. (2007). Alterations of DNA damage repair pathways resulting from JCV infection. *Virology.* July 20, 364(1): 73–86.
 20. DARBINYAN A, DARBINIAN N, SAFAK M, RADHAKRISHNAN S, GIORDANO A, KHALILI K. (2002). Evidence for dysregulation of cell cycle by human polyomavirus, JCV, late auxiliary protein. *Oncogene.* 21, 5574–5581.
 21. DARBINYAN A, SIDDIQUI K.M, SLONINA D, DARBINIAN N, AMINI S, WHITE M.K, KHALILI K. (2004). Role of JC virus agnoprotein in DNA repair. *J. Virol.* 78, 8593–8600.
 22. DE JAGER M, VAN NOORT J, VAN GENT. (2001). Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol Cell.* 8, 1129–35.
 23. DEL VALLE L, PIÑA-OVIEDO S. (2006). HIV disorders of the brain: pathology and pathogenesis. *Front Biosci.* Jan 1, 11, 718-32.
 24. DEL VALLE L, AZIZI SA, KRYNSKA B, ENAM S, CROUL SE, KHALILI K. (2000). Reactivation of human neurotropic JC virus expressing oncogenic protein in a recurrent glioblastoma multiforme. *Ann Neurol.* Dec, 48(6), 932-6.
 25. DEL VALLE L, ENAM S, LARA C, MIKLOSSY J, KHALILI K, GORDON J. (2004) Primary central nervous system lymphoma expressing the human neurotropic polyomavirus, JC virus, genome. *J Virol.* 78, 3462–3469.
 26. DEL VALLE L, ENAM S, LARA C, ORTIZ-HIDALGO C, KATSETOS CD, KHALILI K. (2002a). Detection of JC polyomavirus DNA sequences and cellular localization of T-antigen and Agnoprotein in oligodendrogliomas. *Clin Cancer Res.* 8, 3332–3340.
 27. DEL VALLE L, GORDON J, ASSIMAKOPOULOU M, ENAM S, GEDDES JF, VARAKIS JN, KATSETOS CD, CROUL S, KHALILI K. (2001B). Detection of JC virus DNA sequences and expression of the viral regulatory protein T- antigen in tumors of the central nervous system. *Cancer Res* 2001b. 61, 4287–4293.
 28. DEL VALLE L, GORDON J, ENAM S, DELBUE S, CROUL S, ABRAHAM S, RADHAKRISHNAN S, ASSIMAKOPOULOU M, KATSETOS CD, KHALILI K. (2002b). Expression of human neurotropic polyomavirus JCV late gene product Agnoprotein in human medulloblastoma. *J Natl Cancer Inst.* 94, 267–273.
 29. DEL VALLE L, KHALILI K. (2010). Detection of human polyomavirus proteins, T-antigen and agnoprotein, in human tumor tissue arrays. *J Med Virol.* May, 82, (5): 806-11.
 30. DEL VALLE L, WHITE MK, ENAM S, PIÑA-OVIEDO S, BROMER MQ, THOMAS RM, PARKMAN HP, KHALILI K. (2005). Detection of JC virus DNA sequences and expression of viral T-antigen and Agnoprotein in esophageal carcinoma. *Cancer.*103, 516–527.

-
31. DEL VALLE L, ENAM S, LARA C, MIKLOSSY J, KHALILI K, GORDON J. (2004). Primary central nervous system lymphoma expressing the human neurotropic polyomavirus, JC virus, genome. *J. Virol.* 78, 3462–3469
 32. DEL VALLE L, WHITE M.K, ENAM S, OVIEDO S.P, BROMER M.Q, THOMAS R.M, PARKMAN HP, KHALILI K. (2005). Detection of JC virus DNA sequences and expression of viral T antigen and agnoprotein in esophageal carcinoma. *Cancer.* 103, 516–527.
 33. DEL VALLE , GORDON J, FERRANTE P, KHALILI K. (2001a). JC virus in experimental and clinical brain tumors. In: Khalili K, Stoner GL, editors. *Human polyoviruses molecular and clinical perspectives.* New York: Wiley-Liss, Inc, p. 409-430.
 34. DELBUE S, PAGANI E, GUERINI FR, AGLIARDI C, MANCUSO R, BORGHI E, ROSSI F, BOLDORINI R, VEGGIANI C, CAR PG, FERRANTE P. (2005). Distribution, characterization and significance of polyomavirus genomic sequences in tumors of the brain and its covering. *J. Med. Virol.* 77, 447–454.
 35. DIKOMEY E, DAHM-DAPHI J, BRAMMER I, MARTENSEN R, KAINA B. (1998). Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines. *Int J Radiat Biol.* Mar, 73(3), 269-78.
 36. DRONKERT M L, KANAAR R. (2001). Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutat Res* 486, 217-247.
 37. DUBOIS V, DUTRONC H, LAFON M.E, POINSOT V, PELLEGRIN J.L, RAGNAUD J.M, FERRER A.M, FLEURY H.J.A. (1997). Latency and Reactivation of JC Virus in Peripheral Blood of Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Patients. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2288–2292.
 38. DUROCHER D AND JACKSON SP. (2001). *Curr. Opin. Cell Biol.*, 13, 225–231.
 39. DYSON N, BUCHKOVICH K, WHYTE P, HARLOW E. (1989). The cellular 107K protein that binds to adenovirus E1A also associates with the large T antigens of SV40 and JC virus. *Cell.* Jul 28, 58(2), 249-55.
 40. DYSON N, BERNARDS R, FRIEND SH, GOODING LR, HASSELL JA, MAJOR EO, PIPAS JM, VANDYKE T, HARLOW E. (1990). Large T antigens of many polyomaviruses are able to form complexes with the retinoblastoma protein. *J Virol.* Mar, 64 (3), 1353-6.
 41. EASH S, MANLEY K, GASPAROVIC M, QUERBES W, WTWOOD WJ. (2006). The human polyomaviruses. *Cell. Mol. Life Sci*, 63, 865-876.
 42. ENAM S, DEL VALLE L, LARA C, GAN DD, ORTIZ-HIDALGO C, PALAZZO JP, KHALILI K. (2002). Association of human polyomavirus JCV with colon cancer: Evidence for interaction of viral T-antigen and beta-catenin. *Cancer Res .* 62, 7093–7101.
 43. ENDO S, OKADA Y, ORBA Y, NISHIHARA H, TANAKA S, NAGASHIMA K, SAWA H. (2003). JC virus agnoprotein colocalizes with tubulin. *J. Neurovirol.* 1, 10–14.
 44. ET, TAKATA M, SASAKI MS, SONODA E, (1998). Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J.* 17, 5497-508.

-
45. FERNANDEZ-CAPETILLO O, LEE A, NUSSENZWEIG M, NUSSENZWEIG A. (2004). H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)*. Aug-Sep, 3(8-9): 959-67.
 46. FRISQUE RJ, BOLLAG B, TYAGARAJAN SK, KILPATRICK LH. (2003). T⁷ proteins influence JC virus biology. *J. Neurovirol.* 9 (Suppl. 1), 15–20.
 47. GALLET A, ERKNER A, CHARROUX B, FASANO L, AND S. KERRIDGE. (1998). Trunk-specific modulation of wingless signalling in *Drosophila* by teashirt binding to armadillo. *Curr. Biol.* 8, 893–902.
 48. GALLET AC, ANGELATS A, ERKNER B, CHARROUX L, FASANO KERRIDGE S. (1999). The C-terminal domain of armadillo binds to hypophosphorylated teashirt to modulate wingless signalling in *Drosophila*. *EMBO J.* 18, 2208–2217.
 49. GAN DD, KHALILI K. (2004). Interaction between JCV large T-antigen and beta catenin, *Oncogene*. Jan 15, 23(2):483-90.
 50. GAN DD, REISS K, CARRILL T, DEL VALLE L, CROUL S, GIORDANO A, FISHMAN P, KHALILI K. (2001). Involvement of Wnt signaling pathway in murine medulloblastoma induced by human neurotropic JC virus. *Oncogene*. 20, 4864–4870.
 51. GAO ZH, SEELING JM, HILL V, YOCHUM A AND VIRSHUP DM. (2002). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 1182–1187.
 52. GEE GV, TSOMAIA N, MIERKE DF, ATWOOD W. (2004) Modeling a Sialic Acid Binding Pocket in the External Loops of JC Virus VP1. *J. Biol. Chem.* 279, 49172–49176.
 53. GLASS, W. F., 2ND, BRIGGS, R. C., i HNILICA, L. S. (1981). Identification of tissue-specific nuclear antigens transferred to nitrocellulose from polyacrylamide gels. *Science*. 211, 70-72.
 54. GOODE EL, ULRICH CM, POTTER JD. (2002). Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers*. 11, 1513-30.
 55. GOEL A, LI MS, NAGASAKA T, SHIN SK, FUERST F, RICCIARDIELLO L, WASSERMAN L, BOLAND CR. (2006). Association of JC virus T-antigen expression with the methylator phenotype in sporadic colorectal cancers. *Gastroenterology*.130, 1950–1961.
 56. GORDON J, KHALILI K. (1998). The human polyomavirus, JCV, and neurological diseases (review). *Int J Mol Med*. Apr, 1(4),647-55.
 57. GORDON J, GALLIA GL, DEL VALLE L, AMINI S, KHALILI K. (2000). Human polyomavirus JCV and expression of myelin genes. *J Neurovirol*. May, 6 Suppl 2:S92-7.
 58. FRANK KM, GEKIGUCHI JM, SEIDL KJ, et al. (1998). Late embryonic lethality and impaired V (D) J recombination in mice lacking DNA ligase IV. *Nature*. 396, 173-7.
 59. HE TC, SPARKS AB, RAGO C, HERMEKING H, ZAWEL L, DA COSTALT, MORIN PJ, VOGELSTEIN B, KINZLER KW. (1998). *Science*. 281, 1509–1512.
 60. HOEIJMAKERS, JH. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. 411, 366-374.
 61. HORI R, MURAI Y, TSUNAYAMA K, ABDEL-AZIZ HO, NOMOTO K, TAKAHASHI H, CHENG CM, KUCHINA T, HARMAN BV, TAKANO Y. (2005). Detection of JC virus DNA sequences in colorectal cancers in Japan. *Virchows Arch*. 447, 723–730

-
62. HUANG JC, HSU DS, KAZANTSEV A, SANCAR A. (1994). Substrate spectrum of human excinuclease: repair of abasic sites, methylated bases, mismatches, and bulky adducts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91, 12213-7.
 63. JOHNSON RD, LIU N, JASIN M. (1999). Mammalian XRCC2 promotes the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination. *Nature*. 401, 397-99.
 64. JANSSEN K, SCHLINK K, GÖTTE W. (2001). DNA repair activity of 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1) in human lymphocytes is not dependent on genetic polymorphism Ser326/Cys326. *Mutat Res*. 486, 207-16.
 65. JEGGO PA, TESMER J, CHEN DJ. (1991). Genetic analysis of ionizing-radiation sensitive mutants of cultured mammalian cell lines. *Mutat Res*. 254, 125-33.
 66. KARRAN P. (2000). *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 10, 144–150
 67. KHALILI K, DEL VALLE L, OTTE J, WEAVER M, GORDON J. (2003). Human neurotropic polyomavirus, JCV, and its role in carcinogenesis. *Oncogene*. Aug 11, 22 (33), 181-91.
 68. KHALILI K. (2001). Human neurotropic JC virus and its association with brain tumors. *Dis Markers*. 17(3), 143-7.
 69. KHALILI K, CROUL S, DEL VALLE L, KRYSNSKA B, GORDON J. (2001). Oncogenic potential of human neurotropic virus: laboratory and clinical observations. *Isr Med Assoc J*. Mar, 3(3):210-5.
 70. KHALILI K, WHITE MK, SAWA H, NAGASHIMA K, SAFAK M. (2005). The agnoprotein of polyomaviruses: a multifunctional auxiliary protein. *J Cell Physiol*. Jul, 204(1):1-7.
 71. KHALILI K, GORDON J, WHITE MK. (2006). The polyomavirus, JCV and its involvement in human disease. *Adv. Exp. Med. Biol*. 577, 274–287.
 72. KHALILI K, WHITE MK. (2006). Human demyelinating disease and the polyomavirus JCV. *Mult. Scler*. 12, 133–142.
 73. KIM PM, ALLEN C, WAGENER BM, SHEN Z, NICKOLOFF JA. (2001). Overexpression of human RAD51 and RAD52 reduces double-strand break-induced homologous recombination in mammalian cells. *Nucl Acids Res*. 29, 4352–4360.
 74. KOHNO T, SHINMURA K, TOSAKA M. (1998). Genetic polymorphisms and alternative splicing of the hOGG1 gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA. *Oncogene*. 16, 3219-25.
 75. KRISTOFFER V, LAWRENCE FP. (2003). Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair *Oncogene*. 22, 5792–5812.
 76. KRYSNSKA B, DEL VALLE L, GORDON J, OTTE J, CROUL S, KHALILI K. (2000). Identification of a novel p53 mutation in JCV-induced mouse medulloblastoma. *Virology*. Aug 15, 274(1):65-74.
 77. KRYSNSKA B, GORDON J, OTTE J, FRANKS R, KNOBLER R, DELUCA A, GIORDANO A, KHALILI K. (1997). Role of cell cycle regulators in tumor formation in transgenic mice expressing the human neurotropic virus, JCV, early protein. *J Cell Bioc*. 67, 223–230.
 78. KRYSNSKA B, OTTE J, FRANKS R, KHALILI K, CROUL S. (1999). Human ubiquitous JCV·CY T-antigen gene induces brain tumors in experimental animals. *Oncogene*. 18, 39–46.

-
79. KRYNSKA B, LEWIN-KOWALIK J, SIERON AL. (1998). Disturbance of the normal cell cycle by T antigens of SV40 viruses and JC cause some tumors. *Post. Hig. Med. Dośw.* 52, 237–257.
 80. KURKI S, PELTONEN K, LAIHO M. (2004). Nucleophosmin, HDM2 and p53: players in UV damage incited nucleolar stress response. *Cell Cycle.* Aug, 3(8):976-9.
 81. LAEMMLI UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
 82. LAGHI L, RANDOLPH AE, CHAUHAN DP, MARRA G, MAJOR EO, NEEL JV, BOLAND CR. (1999). JC virus DNA is present in the mucosa of the human colon and in colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96, 7484–7489.
 83. LASSAK A, DEL VALLE L, PERUZZI F, WANG JY, ENAM S, CROUL S, KHALILI K, REISS K. (2002). Insulin receptor substrate I translocation to the nucleus by the human JC virus T-antigen. *J Biol Chem.* 277, 17231–17238.
 84. LIN PY, FUNG CY, CHANG FP, HUANG WS, CHEN WC, WANG JY, CHANG D. (2008). Prevalence and genotype identification of human JC virus in colon cancer in Taiwan. *J Med Virol.* 80, 1828–1834.
 85. LONDON WT, HOUFF SA, MCKEEVER PE, WALLEN WC, SEVER JL, PADGETT BL, WALKER DL. (1983). Viral-induced astrocytomas in squirrel monkeys. *Prog Clin Biol Res.* 105, 227–237
 86. LUDLOW JW, NELSON DA. (1995). Control and activity of type-1 serine/threonine protein phosphatase during the cell cycle. *Semin Cancer Biol.* Aug, 6(4), 195-202.
 87. MAGINNIS MS, ATWOOD WJ. (2009). JC virus: an oncogenic virus in animals and humans? *Semin Cancer Biol.* Aug, 19(4):261-9.
 88. MAKINO K, NAKAMURA H, KINO T, TAKESHIMA H, KURATSU L. (2006). Rising incidence of primary central nervous system lymphoma in Kumamoto, Japan. *Surg. Neurol.* 66, 503-506
 89. DI MARCOTULLIO L, FERRETTI E, DE SMAELE E, SCREPANTI I, GULINO A. (2006). Suppressors of hedgehog signaling: Linking aberrant development of neural progenitors and tumorigenesis. *Mol Neurobiol.* Dec, 34(3), 193-204.
 90. MASSON M, NIEDERGANG C, SCREIBER V. (1998). XRCC1 is specifically associated with poly (ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol Cell Biol.* 18, 3563-71. 56.
 91. MATSUMOTO Y, KIM K, KATZ DS, FENG JA. (1998). Catalytic center of DNA polymerase beta for excision of deoxyribose phosphate groups. *Biochemistry.* 37, 6456-64.
 92. MIYOSHI ET ALL. (1992). Somatic mutation of the APC gene in colorectal tumors> mutation cluer region in the APC gene, *Hum Mol Genet.* 1(4), p.229-33.
 93. MONACO MC, ATWOOD W J, GRAVELL M, TORNATORE CS, MAJOR EO. (1996). JC virus infection of hematopoietic progenitor cells, primary B lymphocytes, and tonsillar stromal cells: implications for viral latency. *J. Virol.* 70, 7004–7012.
 94. MORIN P. J. (1999). Beta-Catenin signaling and cancer. *Bioessays,* 21: 1021–1030.
 95. MORIN PJ, SPARKS AB, KORINEK V, BARKER N, CLEVERS HB. (1997). Vogelstein, and K.W. Kinzler. Activation of beta- catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta- catenin or APC. *Science.* 275, 1787–1790.

-
96. MUNEMITSU, S, ALBERT I, SOUZA B, RUBINFELD B, POLAKIS P. (1995). Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 3046–3050.
 97. NAKAMURA J, LA DK, SWENBERG JA. (2000). 5'-nicked apurinic/apyrimidinic sites are resistant to beta-elimination by beta-polymerase and are persistent in human cultured cells after oxidative stress. *J Biol Chem.* 275, 5323-8.
 98. NATHOO N, GOLDLUST S, VOGELBAUM MA. (2004). Epidermal growth factor receptor antagonists: novel therapy for the treatment of high-grade gliomas. *Neurosurgery.* Jun, 54(6), 1480-8.
 99. NEVINS JR. (2001). The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum Mol Genet.* Apr, 10 (7), 699-703.
 100. NIV Y, GOEL A, BOLAND CR. (2005). JC virus and colorectal cancer: a possible trigger in the chromosomal instability pathways. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 21, 85-89.
 101. NOSHO K, SHIMA K, KURE S, IRAHARA N, BABA Y, CHEN L, KIRKNER GJ, FUCHS CS, OGINO S. (2009). JC virus T- antigen in colorectal cancer is associated with p53 expression and chromosomal instability, independent of CpG island methylator phenotype. *Neoplasia.* 11, 87–95.
 102. NUPPONEN NN, VISAKORPI T. (2000). Molecular cytogenetics of prostate cancer. *Microsc Res Tech.* Dec,1:51(5), 456-63.
 103. OSTROWSKI LE, VON WRONSKI MA, BIGNER SH, RASHEED A, SCHOLD SC JR, BRENT TP, MITRA S, BIGNER DD. (1991). Expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in malignant human glioma cell lines. *Carcinogenesis.* Sep, 12 (9), 1739-44.
 104. OHSUMI S, IKEHARA I, MOTOI M, OGAWA K, NAGASHIMA K, YASUI K. (1985). Induction of undifferentiated brain tumors in rats by a human polyomavirus (JC virus). *Jpn J Cancer Res.* 76, 429–431.
 105. OHSUMI S, MOTOI M, OGAWA K. (1986). *Acta Pathol. Jpn.* 36, 815–825.
 106. PAULL TT, ROGAKOU EP, YAMAZAKI V, KIRCHGESSNER CU, GELLERT M, BONNER WM. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol.* 10, 886– 895.
 107. PAULL TT, GELLERT M. (1998). The 3' to 5' exonuclease activity of Mre11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell.* 1, 969-79.
 108. PAULL TT, LEE JH. (2005). The MRE11/RAD50/NBN complex and its role as a DNA double-strand break sensor for ATM. *Cell Cycle.* 4, 737–40
 109. PEREZ-LIZ G, DEL VALLE L, GENTILELLA A, CROUL S, KHALILI K. (2008). Detection of JC virus DNA fragments but not proteins in normal brain tissue. *Ann Neurol.* 64, 379–387.
 110. POLAKIS P. (1997). The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. *Biochim. Biophys. Acta* 1332, F127–F147.
 111. PRINS C, FRISQUE R.J. (2001). JC virus T' proteins encoded by alternatively spliced early mRNAs enhance T antigen-mediated viral DNA replication in human cells. *J. Neurovirol.* 7, 250–264.
 112. QUERBES W, O'HARA BA, WILLIAMS G, ATWOOD W.J. (2006). Invasion of host cells by JC virus identifies a novel role for caveolae in endosomal sorting of noncaveolar ligands. *J. Virol.* 80, 9402–9413.

-
113. REIS RM, HERVA R, BRANDNER S, KOIVUKANGAS L, MIRONOV N, BAR W, KLEIHUES P, OHGAKI H. (2001). Second Primary Glioblastoma. *J Neuropathol. Ex. Neurol.* 60, 208-215
 114. REISS K, KHALILI K. (2003). Viruses and cancer: lessons from the human polyomavirus, JCV. *Oncogene.* Sep 29, 22(42):6517-23.
 115. REISS K, KHALILI K, GIORDANO A, TROJANEK J. (2006). JC virus large T-antigen and IGF-I signaling system merge to affect DNA repair and genomic integrity. *J. Cell. Physiol.* 206, 295–300.
 116. RICHARDSON C, STARK JM, OMMUNDSEN M, JASIN M. (2004). Rad51 overexpression promotes alternative double-strand break repair pathways and genome instability. *Oncogene.* 23, 546–553.
 117. RUBINFELD, B, ALBERT I, PORFIRI E, FIOL C, MUNEMITSU S, POLAKIS P. (1996). Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science.* 272, 1023–1026.
 118. SAFAK M, BARRUCCO R, DARBINYAN A, OKADA Y, NAGASHIMA K, KHALILI K. (2001). Interaction of JC virus agno protein with T antigen modulates transcription and replication of the viral genome in glial cells. *J Virol.* Feb;75(3):1476-86.
 119. SAFAK M, KHALILI K. (2003). An overview: Human polyomavirus JC virus and its associated disorders. *J Neurovirol.* 9 Suppl 1, 3-9.
 120. SARIYER IK, AKAN I, PALERMO V, GORDON J, KHALILI K, SAFAK M. (2006). Phosphorylation mutants of JC virus agnoprotein are unable to sustain the viral infection cycle. *J Virol.* Apr, 80(8), 3893-903.
 121. SCHÄRER OD, JIRICNY J. (2001). Recent progress in the biology, chemistry and structural biology of DNA glycosylases. *Bioessays.* 23, 270-81.
 122. SEDELNIKOVA OA, ROGAKOU EP, PANYUTIN IG, BONNER WM. (2002). Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat. Res.* 158, 486–492
 123. SHACKELTON LA, RAMBAUT A, PYBUS OG, HOLMES EC. (2006). JC virus evolution and its association with human populations. *J. Virol.* 80, 9928–9933.
 124. SHIN SK, LI MS, FUERST F, HOTCHKISS E, MEYER R, KIM IT, GOEL A, BOLAND CR. (2006) Oncogenic T-antigen of JC virus is present frequently in human gastric cancers. *Cancer.* 107, 481–488.
 125. SHINOHARA A, OGAWA H, MATSUDA Y (1993). Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to RAD51 and recA. *Nat Genet.* 4, 239-43
 126. SHOLLAR D, DEL VALLE L, KHALILI K, OTTE J, GORDON J. (2004). JCV T-antigen interacts with the neurofibromatosis type 2 gene product in a transgenic mouse model of malignant peripheral nerve sheath tumors. *Oncogene.* 23, 5459–5467.
 127. SIMA AA, FINKELSTEIN SD, MCLACHLAN DR. (1983). Multiple malignant astrocytomas in a patient with spontaneous progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann Neurol.* Aug, 14(2):183-8.
 128. SMITH RW P, NASHEUER HP. (2003). Initiation of JC virus DNA replication in vitro by human and mouse DNA polymerase – primase. *Eur. J. Biochem.* 270, 2030–2037.

-
129. SOCK E, WEGNER M, FORTUNATO EA, GRUMMT F. (1993). Large T-antigen and sequences within the regulatory region of JC virus both contribute to the features of JC virus DNA replication. *Virology*. 197, 537–548.
 130. SONODA E, SASAKI MS, BUERSTEDDE JM, BEZZUBOVA O, SHINOHARA A, OGAWA H, TAKATA M, YAMAGUCHI-IWAI Y AND TAKEDA S. (1998). *EMBO J*. 17, 598–608.
 131. SPITZ MR, WU X, WANG Y, (2001). Modulation of nucleotide excision repair capacity by XPD polymorphisms in lung cancer patients. *Cancer Res*. 6, 1354-7.
 132. STERN MC, JOHNSON LR, BELL DA, TAYLOR JA. (2002). XPD codon 751 polymorphism, metabolism genes, smoking, and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 11, 1004-11.
 133. STOMMEL JM, KIMMELMAN AC, YING H, NABIOULLIN R, PONUGOTI AH, WIEDEMAYER R, STEGH AH, BRADNER JE, LIGON KL, BRENNAN C, CHIN L, DEPINHO RA. (2007). Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies. *Science*. 2007 Oct ,12, 318(5848), 287-90.
 134. STRAZZULLO M, COSSU A, BALDINU P, COLOMBINO M, SATTA MP, TANDA F, DE BONIS ML, CERASE A, D'URSO M, D'ESPOSITO M, PALMIERI G. (2003). High-resolution methylation analysis of the hMLH1 promoter in sporadic endometrial and colorectal carcinomas. *Cancer*. 98, 1540–1546.
 135. SWEET T, KHALILI K, SAWAYA BE, AMINI S. (2006). Identification of a novel protein from glial cells based on its ability to interact with NF-kappaB subunits. *J Cell Biochem*. Dec 1, 90(5), 884-91.
 136. SWEET TM, DEL VALLE L, KHALILI K. (2002). Molecular biology and immunoregulation of human neurotropic JC virus in CNS. *J. Cell. Physiol*. 191, 249-256.
 137. TAN TH, WALLIS J, LEVINE AJ. (1986). Identification of the p53 protein domain involved in formation of the simian virus 40 large T-antigen-p53 protein complex. *J Virol*. 59, 574–583.
 138. TEJPAR S, CASSIMAN JJ, VAN CUTSEM E. (2001). The molecular basis of colorectal cancer. *Acta Gastroenterol Belg*. Jul-Sep, 64(3):249-54.
 139. THOMPSON LH, SCHILD D. (2001). *Mutat. Res*. 477, 131–153.
 140. TOWBIN H, STAHELIN T, GORDON J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76, 4350-4354.
 141. TROJANEK J, CROUL S, HO T, WANG JY, DARBINYAN A, NOWICKI M, DEL VALLE L, SKORSKI T, KHALILI K, REISS K. (2006). T-antigen of the human polyomavirus JC attenuates faithful DNA repair by forcing nuclear interaction between IRS-1 and Rad51. *J Cell Physiol*. 206, 35–46.
 142. TSUZUKI T, FUJII Y, SAKUMI K, TOMINAGA Y, NAKAO K, SEKIGUCHI M, MATSUSHIRO A, YOSHIMURA Y AND MORITAT. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93, 6236–6240.
 143. TYAGARAJAN SK, FRISQUE RJ. (2006). Stability and function of JC virus large T antigen and T' proteins are altered by mutation of their phosphorylated threonine 125 residues. *J. Virol*. 80, 2083–2091.
 144. VAN DE WETERING M, CAVALLO R, DOOIJES D, VAN BEEST M, VAN ES J, LOUREIRO J, YPMA A, HURSH D, JONES T, BEJSOVEC A ET AL. (1997). *Armadillo*

-
- coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell*. 88, 789–799.
145. VERMEULEN W, SCOTT RJ, RODGERS S, MÜLLER HJ, COLE J, ARLETT CF, KLEIJER WJ, BOOTSMA D, HOEIJMAKERS JH, WEEDA G. (1994). Clinical heterogeneity within xeroderma pigmentosum associated with mutations in the DNA repair and transcription gene ERCC3. *Am J Hum Genet*. Feb, 54(2), 191-200.
 146. VON WRONSKI MA, SHIOTA S, TANO K, et al. (1991). Structural and immunological comparison of indigenous human O6-methylguanine-DNA methyltransferase with that encoded by a cloned cDNA. *J Biol Chem*. 266, 1064-70.
 147. WALECKI J, JURKIEWICZ E. (2007). Diagnostyka obrazowa nowotworów ośrodkowego układu nerwowego, *Polski Przegląd Neurologiczny*. Tom 3, nr.3.
 148. WALKER DG, PAMPHLETT R. (1999). Prolonged survival and pulmonary metastasis after local cure of glioblastoma multiforme. *J Clin. Neurosci*. 6, 67-68.
 149. WHITE MK, GORDON J, REISS K, DEL VALLE L, CROUL S, GIORDANO A, DARBINYAN A, KHALILI K. (2005). Human polyomaviruses and brain tumors. *Brain Res. Rev*. 50, 69–85.
 150. WHITE MK, KHALILI K. (2005). Expression of JC virus regulatory proteins in human cancer: potential mechanisms for tumorigenesis. *Eur J Cancer*. Nov, 41(16): 2537-48.
 151. WIESE C, COLLINS CC, ALBALA JS. (2002). Interactions involving the Rad51 paralogs Rad51C and XRCC3 in human cells. *Nucleic Acids Res*. 30, 1001-8.
 152. XING D, MIA X, (2002). Polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and XPD and their associations with risk of esophageal squamous cell carcinoma in a Chinese population. *Int J Cancer*. 100, 600-5.
 153. ZAMBRANO A, KALANTARI M, SIMONEAU A, JENSEN JL, VILLARREAL LP. (2002). Detection of human polyomaviruses and papillomaviruses in prostatic tissue reveals the prostate as a habitat for multiple viral infections. *Prostate*. 53, 263–276.
 154. ZENG L, FAGOTTO T, ZHANG W, HSU TJ, VASICEK W, PERRY 3RD, JI LEE, SM TILGHMAN, BM GUMBINER, F COSTANTINI. (1997). The mouse Fused locus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation. *Cell*. 90, 181–192.
 155. ZU RHEIN GM, VARAKIS JN. (1979). Perinatal induction of medulloblastomas in Syrian golden hamsters by a human polyoma virus (JC). *Natl Cancer Inst Monogr*. 51, 205–208.