Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Marcin Dulęba

OKREŚLENIE MOLEKULARNYCH MECHANIZMÓW MODULUJĄCYCH AKTYWNOŚĆ GENU MET W KOMÓRKACH MIĘSAKA POPRZECZNIE PRĄŻKOWANEGO

Praca doktorska

Promotor: **prof. dr hab. Marcin Majka**

Pracę wykonano w Zakładzie Transplantologii Katedry Immunologii Klinicznej i Transplantologii Uniwersytetu Jagiellonskiego Collegium Medicum

Kierownik Zakładu: **prof. dr hab. Marcin Majka**
Kierownik Katedry: **dr hab. Maciej Siedlar, prof. UJ**

Kraków, 2012

1 Spis treści

1 Spis treści ... 1
2 Wykaz skrótów ... 4
3 Streszczenie ... 5
Abstract ... 6
4 Wstęp ... 7
4.1 Mięsak prążkowanokomórkowy ... 7
4.1.1 Charakterystyka podtypów mięsaka prążkowanokomórkowego ... 7
4.1.2 Mięsak prążkowanokomórkowy – podłoże genetyczne ... 8
4.1.3 Terapia i rokowania ... 9
4.2 Oś sygnałowa HGF-MET ... 10
4.2.1 HGF/SF ... 10
4.2.2 MET ... 11
4.2.3 Oś HGF-MET w komórkach prawidłowych ... 11
4.2.4 Oś HGF-MET w komórkach nowotworowych ... 13
4.3 Struktura i organizacja genu MET ... 14
4.3.1 Regulacja transkrypcji genu MET ... 14
4.4 Epigenetyka ... 15
4.4.1 Posttranslacyjne modyfikacje histonów ... 15
4.4.2 Metylacja DNA ... 16
4.4.3 Mechanizmy sterujące metylacją DNA ... 17
4.4.4 Wyspy CpG ... 17
4.4.5 Zmiany metylacji DNA w komórkach nowotworowych ... 18
4.4.6 Dynamika zmian profilów metylacji w obrębie sekwencji promotorowych. ... 19
4.4.7 Wpływ środowiska na metylację DNA ... 19
4.4.8 Epigenetyka - perspektywy terapeutyczne ... 20
5. Cele pracy ... 22
6 Materiały i metody ... 23
6.1 Hodowle komórkowe ... 23
6.1.2 Izolacja i hodowla komórek prawidłowych ... 23
6.1.3 Stres komórkowy ... 23
6.1.3.1 Głodzenie ... 23
6.1.3.2 Hipoksja ... 24
6.1.3.3 Naświetlanie promieniowaniem gamma. ... 24

6.1.4 Stymulacja komórek ... 24
6.1.5 Różnicowanie komórek ... 24
6.2 Ocena poziomu ekspresji MET na powierzchni komórek ... 24
6.2.1 Cytofluorymetria przepływowa - barwienie komórek ... 24
6.2.3 Cytofluorymetria przepływowa - zbieranie i analiza danych ... 25
6.3 Ocena ekspresji genów za pomocą PCR w czasie rzeczywistym (Real-time PCR) ... 25
6.3.1 Izolacja RNA i reakcja odwrotnej transkrypcji ... 25
6.3.2 Reakcja PCR w czasie rzeczywistym (Real-time PCR) ... 26
6.4 Analiza genetyczna promotora MET ... 26
6.4.1 Izolacja DNA genomowego ... 26
6.4.2 Amplifikacja fragmentu promotora MET za pomocą PCR ... 27
6.4.3 Elektroforeza produktów PCR na żelu agarozowym ... 27
6.4.4 Ekstrakcja produktów PCR z żelu agarozowego ... 28
6.4.5 Klonowanie produktów PCR do wektora pCR 2.1 (Invitrogen) ... 28
6.4.6 Transformacja bakterii kompetentnych wektorem z wklonowanym produktem PCR ... 29
6.4.7 Selekcja hodowli bateryjnych i namnażanie plazmidów w hodowlach płynnych ... 29
6.4.8 Izolacja plazmidów z płynnych hodowli bakteryjnych ... 30
6.4.9 Analiza restrykcyjna wektorów plazmidowych ... 30
6.4.10 PCR sekwencyjny na matrycy wektora pCR 2.1 z wklonowanym fragmentem promotora MET ... 31
6.4.11 Oczyszczanie produktów sekwencyjnego PCR ... 31
6.4.12 Rozdział sekwencyjny produktów PCR ... 32
6.4.13 Analiza danych z sekwencjonowania ... 32
6.5 Analiza epigenetyczna promotora MET ... 32
6.5.1 Konwersja DNA genomowego przy pomocy wodorosiarczynu sodu. ... 32
6.5.2 Reakcja PCR na matrycy DNA traktowanego wodorosiarczynem sodu. ... 33
6.5.3 Sekwencjonowanie DNA traktowanego wodorosiarczynem sodu. ... 34
6.6 Analiza statystyczna ... 35
7 Wyniki ... 36
7.1 Ekspresja MET w liniach mięsaka prążkowanokomórkowego ... 36
7.2 Ilość kopii genu MET ... 38
7.3 Analiza genetyczna promotora MET ... 39
7.4 Analiza zmian metylacji promotora MET. ... 39
7.4.1 Optymalizacja BSP ... 39
7.4.2 Profil metylacji promotora MET w komórkach RMS ... 41
7.5 Wpływ czynników wzrostowych na ekspresję MET oraz na wzór metylacji jego promotora w komórkach RMS ... 42
7.5.1 Surowica ... 42

7.5.2 Czynnik wzrostu hepatocytów (HGF) ... 43
7.5.3 Czynnik zrębu 1 (SDF-1) ... 44
7.5.4 Chemokina CXCL 11 (ITAC) ... 46
7.6 Wpływ stresu komórkowego na ekspresję oraz profil epigenetyczny promotora MET ... 47
7.6.1 Wpływ braku czynników wzrostowych, hodowla w medium suplementowanym 0,5% BSA ... 47
7.6.2 Wpływ hipoksji, hodowla w warunkach niedoboru tlenowego ... 48
7.6.3 Wpływ promieniowania gamma, hodowla komórek naświetlanych ... 49
7.7 Wpływ różnicowania na poziom ekspresji MET ... 51
7.7.1 Różnicowanie mioblastów ... 51
7.7.2 Różnicowanie komórek mięsaka prążkowanokomórkowego. ... 53
8 Dyskusja ... 57
8.1 Ekspresja MET w komórkach mięsaka prążkowanokomórkowego i w mioblastach ... 57
8.2 Wpływ ilości kopii genu na ekspresję MET ... 57
8.3 Mutacje punktowe w sekwencji promotora MET ... 58
8.4 Analiza profilu metylacji promotora MET w komórkach prawidłowych i nowotworowych ... 59
8.4.1 Profil metylacji komórek hodowanych w warunkach standardowych ... 59
8.4.2 Wpływ czynników zewnętrznych na profil metylacji promotora MET ... 59
8.5 Zmiana ekspresji MET pod wpływem czynników zewnętrznych ... 60
8.5.1 Czynniki wzrostowe ... 60
8.5.2 Aktywacja osi CXCR4 i CXCR7 w komórkach mięsaka poprzez stymulację SDF-1 oraz ITAC ... 61
8.5.3 Wpływ stresu komórkowego na ekspresję MET ... 62
8.5.3.1 Hipoksja ... 62
8.5.3.2 Promieniowanie jonizujące ... 62
8.6 Różnicowanie komórek linii mięsaka prążkowanokomórkowego ... 63
8.7 Podsumowanie ... 64
9 Wnioski ... 65
10 Literatura ... 66

2 Wykaz skrótów

5m-C	5 metylocytozyna
ARMS	podtyp pęcherzykowy mięsaka prążkowanokomórkowego
BSA	albumina bydlęca
BSP	sekwencjonowanie DNA traktowanego wodorosiarczynem sodu
CpG	dinukleotyd CG
DMEM	medium hodowlane Dulbecco
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy
DNMT	DNA metylotransferaza
E-BOX	rodzina sekwencji regulatorowych
ERMS	podtyp zarodkowy mięsaka prążkowanokomórkowego
GAPD	dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego
HDAC	deacetylaza histonów
HGF/SF	czynnik wzrostu hepatocytów/czynnik rozproszenia
HIF-1	czynnik regulatorowy hipoksji 1
MCS	polilinker
MFI	średnia wartość fluorescencji
mRNA	matrycowy kwas rybonukleinowy
PBS	buforowany roztwór soli fizjologicznej
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy
PI3K	kinaza fosfatydyloinozytolu
RMS	mięsak prążkowanokomórkowy
RNA	kwas rybonukleinowy
SDF-1	czynnik zrębu 1
shRNA	krótkie interferujące RNA o strukturze spinki
SNP	polimorfizm jednonukleotydowy
Taq	termostabilna polimeraza
TPA	octan tetradekanyloforbolu

3 Streszczenie

Mięsak prążkowanokomórkowy (*rhabdomyosarcoma* – RMS) jest jednym z najczęściej diagnozowanym mięsakiem tkanek miękkich u dzieci. Stanowi ok. 5% wszystkich nowotworów złośliwych występujących u nieletnich. W oparciu o cechy kliniczne i biologię molekularną wyodrębniono trzy podtypy RMS: zarodkowy, pęcherzykowy i różnokształtno komórkowy.

Leczenie mięsaka prążkowanokomórkowego obejmuje zabiegi chirurgiczne oraz chemio- i radioterapię. Prawdopodobieństwo powodzenia terapii wcześnie wykrytych przypadków, głównie pacjentów z ERMS, u których nie zdiagnozowano przerzutów ocenia się na około 60%. Odsetek ten drastycznie maleje w momencie wznowy choroby, która następuje przeważnie wciągu trzech lat od diagnozy. U pacjentów ze wznową choroby tylko u 20% istnieją szanse na wyleczenie, u pozostałych rokowania są bardzo niekorzystne z przeżywalnością do pięciu lat.

Celem niniejszej pracy było zbadanie sekwencji promotora genu MET, jej profilu epigenetycznego oraz określenie wpływu zewnętrznych czynników molekularnych na ekspresję tego receptora w komórkach RMS. Zbadano również wpływ stresu komórkowego oraz różnicowania na poziom transkrypcji, ekspresję powierzchniową i profil metylacji promotora genu MET.

W wyników przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono obecność polimorfizmu w grupie badanych komórek, który może mieć związek z upośledzeniem różnicowania tych linii. Wykazano zmienność epigenetyczną promotora MET pod wpływem czynników zewnętrznych, szczególnie pod wpływem stresu komórkowego. Zaobserwowano również widoczny wzrost ekspresji MET powodowany działaniem promieniowania jonizującego.

Uzyskane wyniki są interesujące z punktu widzenia poprawy skuteczności obecnie stosowanych metod terapeutycznych. Mogą przyczynić się do opracowania nowych terapii oraz metod diagnostycznych.

Abstract

Rhabdomyosarcoma (RMS) is one of the most common soft tissue sarcomas diagnosed in children. It represents approximately 5% of all malignant tumors occurring in children and adolescents. Basing on clinical features and molecular biology, three subtypes of RMS can be identified: embryonal, alveolar and pleomorphic.

Treatment of RMS includes surgery, chemo- and radiotherapy. The probability of successful therapy in early detected cases, patients with ERMS with no metastatic tumors detected, is estimated to be approximately 60%. This percentage dramatically decreases in case of relapse, which occurs mostly in 3 years from diagnosis. In patients with recurrent disease, only 20% are likely to overcome disease, in others the prognosis is very unfavorable with survival up to five years.

The aim of this study was to investigate the MET promoter sequence, epigenetic profile and the impact of external molecular factors on expression of this receptor in RMS cells. Also the effect of stress and cellular differentiation on the transcription, surface expression level and gene promoter methylation profile of MET was investigated.

Results revealed the presence of polymorphisms in the studied cells that may be associated with impaired differentiation of these lines. Epigenetic profile of MET promoter demonstrated vulnerability to influence of external factors, especially radiation and hypoxia.

Obtained results appear to be interesting from the clinical point of view. Improving the effectiveness of current therapies as well as the perspective of developing new therapies and diagnostic methods, with use of gained experience seem to be possible.

4 Wstęp

4.1 Mięsak prążkowanokomórkowy

Mięsak prążkowano komórkowy (RMS, *ang. rhabdomyosarcoma*) jest jednym z najczęściej diagnozowanych mięsaków tkanek miękkich u dzieci. W oparciu o cechy kliniczne, patologiczne i biologię molekularną wyodrębniono trzy podtypy RMS: zarodkowy, pęcherzykowy i różnokształtnokomórkowy [1].

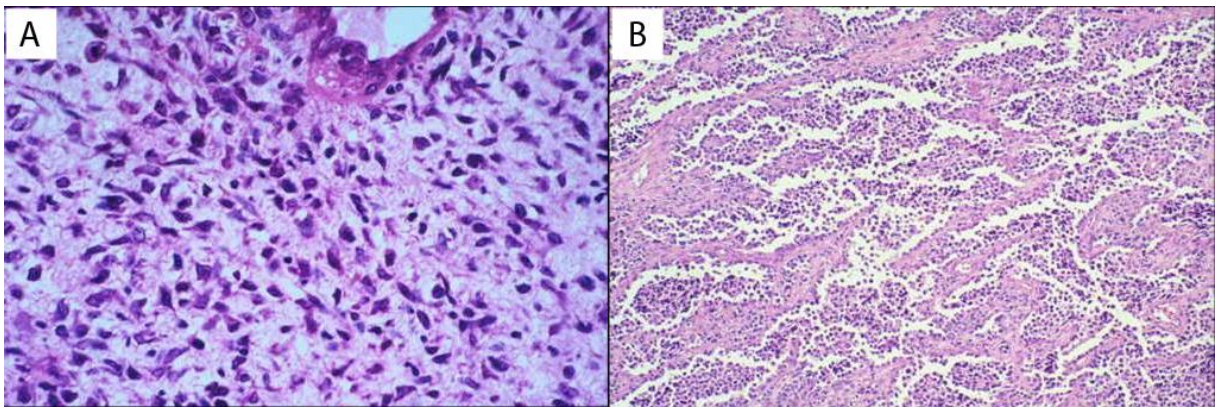
Cechą charakterystyczną RMS jest ekspresja genów typowych dla mięśni poprzecznie prążkowanych, jak: desmina, miozyna, aktyna sarkomeryczna czy mioglobina. Typowe dla RMS są też dostrzegalne w obrysie cytoplazmy charakterystyczne, prążkowane struktury sarkomeryczne, stąd powszechne jest przekonanie, że komórki RMS powstają z komórek satelitarnych mięśni [2]. Odnotowuje się jednak wiele przypadków zajęcia organów nie zawierających komórek mięśni poprzecznie prążkowanych takich jak prostata, pęcherz moczowy, czy woreczek żółciowy. Wskazuje to na możliwość pochodzenia niektórych linii RMS z wcześniejszych komórek mezenchymalnych [3].

4.1.1 Charakterystyka podtypów mięsaka prążkowanokomórkowego

Najczęstszym podtypem (ponad połowa diagnozowanych przypadków) jest podtyp embrionalny (ERMS, *ang. embryonal rhabdomyosarcoma*). ERMS rozwija się w okolicach głowy i szyi oraz układu moczowo-płciowego, tworząc struktury z wrzecionowatych komórek przypominających miocyty siedmio tygodniowego płodu (Rysunek 1 A). Mięsak ten występuje u pacjentów poniżej 10. roku życia. W obrębie ERMS można wyróżnić dodatkowo spotykany u pacjentów poniżej piątego roku życia, podtyp groniasty (*ang. botyroid rhabdomyosarcoma*). Zajmuje on przede wszystkim rozmaite jamy ciała jak jama nosowo-gardłowa, pochwa czy przewód żółciowy. Cechuje się on najlepszymi rokowaniami pośród wymienionych, jednakże opisane zostały przypadki późnej wznowy [1].

Podtyp pęcherzykowy (ARMS, *ang. alveolar rhabdomyosarcoma*), występuje przeważnie u pacjentów pomiędzy 10. a 30. rokiem życia. ARMS lokalizuje się głównie w obrębie tułowia i kończyn, tworząc przypominające pęcherzyki płucne struktury wypełnione okrągłymi komórkami (Rysunek 1 B). Guzy te charakteryzowane są jako bardziej złośliwe w porównaniu do podtypu embrionalnego, a rokowania pacjentów są znacznie gorsze.

Podtyp różnokształtnokomórkowy (*ang. pleomorphic rhabdomyosarcoma*) występuje niemal wyłącznie u pacjentów dorosłych. Rozwija się w obrębie mięśni szkieletowych w postaci dużych wrzecionowatych komórek o nieregularnych jądrach. Odmiana ta charakteryzuje się bardzo złym rokowaniem [1].



Rysunek 1 Obraz histopatologiczny komórek RMS typu: A) Embrionalnego. Komórki są rzadziej upakowane oraz i bardziej wrzecionowate. Aby potwierdzić diagnozę, należy wykonać immunohistochemiczne barwienie przeciwciałami przeciwko desminie, wimentynie miogeninie oraz aktynie. B) Pęcherzykowatego: komórki ARMS są zazwyczaj w mniejsze i bardziej okrągłe i gęsto upakowane. Widoczne przestrzenie przypominające obraz pęcherzyków płucnych. (http://sarcomahelp.org/learning_center/rhabdomyosarcoma.html)

4.1.2 Mięsak prążkowanokomórkowy – podłoże genetyczne

Podłoże genetyczne rozwoju RMS jest różne i zależne od podtypu. W przypadku ERMS często obserwuje się utratę heterozygotyczności regionu p15 w obrębie chromosomu 11, co w konsekwencji prowadzi do zniesienia aktywności supresorów nowotworowych, takich jak H19 czy CDKN1C, oraz zwiększenia ekspresji stymulatorów proliferacji jak IGF2. Uzupełnienie regionu 11p15 w linii komórkowej RD skutkuje wyraźnym zahamowaniem proliferacji [4].

Komórki podtypu ARMS często charakteryzują się translokacją chromosomalną, w wyniku której część genu PAX3 lub PAX7, kodująca domenę wiążącą DNA, przeniesiona zostaje na chromosom 11 gdzie tworzy białko fuzyjne z domeną transaktywacyjną FKHR (*ang. forkhead box*) – PAX3/PAX7-FKHR, będące silnym czynnikiem transkrypcyjnym.

PAX3 jest dodatnim regulatorem ekspresji MET, kontrolującego między innymi migrację satelitarnych komórek mięśni szkieletowych [5], natomiast PAX7 reguluje wzrost i regenerację mięśni. Transfekcja genu fuzyjnego PAX3-FKHR do fibroblastów NIH3T3 skutkuje rozwinięciem fenotypu nowotworowego [6].

4.1.3 Terapia i rokowania

Leczenie mięsaka prążkowanokomórkowego obejmuje zabiegi chirurgiczne oraz chemio- i radioterapię.

W przypadku chemioterapii, lekami z wyboru są najczęściej aktynomycyna D, cyklofosfamid, doksorubicyna, etopozyd, ifosfamid czy winkrystyna. Według wytycznych amerykańskiego Pediatrycznego Komitetu Onkologii Tkanek Miękkich (*ang Soft Tissue Sarcoma Committee of the Children's Oncology Group*), wszyscy pacjenci z wykrytym RMS poddawani są chemioterapii. Terapeutyki podaje się wlewem dożylnym. W większości przypadków leczenie trwa od 6 - 12 miesięcy, rzadziej dłużej ze względu na działania niepożądane. Infuzje w zależności od terapeutyka wykonuje się w 2 - 10 dziennych dawkach co 3 - 4 tygodnie. Ze względu na efekty uboczne leczenia, pacjentom przetacza się czerwone krwinki oraz płytki krwi. Ubytki białych krwinek kompensuje się podając czynniki takie jak: G-CSF, filgrastim, Neupogen [7].

W celu zwiększenia szans na wyleczenie, u wszystkich pacjentów z ARMS i w znacznej części grup ryzyka pacjentów z ERMS, stosuje się radioterapię. Naświetlania rozpoczyna się przeważnie po 4-5. cyklu chemioterapii (ok. 12 tydzień leczenia). W zależności od rodzaju, lokalizacji oraz rozmiaru wykrytego guza stosuje się 20 - 28 dawek promieniowania. Leczenie powinno być rozplanowane w oparciu o 3-wymiarowe obrazowanie oraz wstępną biopsję tkanki sprzed chemioterapii [8].

W związku z rozwojem biologii molekularnej, opracowywane są nowatorskie metody leczenia. Pośród nich wymienić można specyficzne blokowanie za pomocą przeciwciał monoklonalnych, autokrynnie stymulowanej pętli insulinopodobnego czynnika wzrostowego II (IGF II, *ang. insulin-like growth factor*) odpowiedzialnej za wzrost RMS [9, 10]. Kolejnym obiecującym kierunkiem badań jest immunizacja cytotoksycznych limfocytów T, na nieprawidłowe peptydy produkowane przez komórki RMS jak np. białko fuzyjne PAX-FKHR czy zmutowana forma białka p53 [11]. Terapie te w połączeniu z chemio- i radioterapią, testowane są na modelach zwierzęcych.

Ze względu na wysoka wrażliwość rhabdomyosarcoma na chemioterapeutyki, szanse na wyleczenie wcześnie wykrytych przypadków, głównie pacjentów z ERMS, u których nie zdiagnozowano przerzutów, szacowane są na około 60%. Odsetek ten drastycznie maleje w momencie wznowy choroby, która następuje przeważnie wciągu trzech lat od diagnozy.

Z wyjątkiem ok 20% grupy pacjentów której szanse na przeżycie szacuje się na ok 50%, rokowania dla pozostałej grupy są bardzo niekorzystne i zakładają przeżycie od 1-5 lat [12].

4.2 Oś sygnałowa HGF-MET

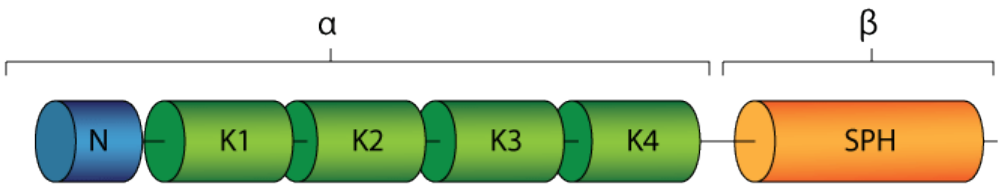
4.2.1 HGF/SF

Czynnik wzrostu hepatocytów/czynnik rozproszenia (HGF/SF, *ang. hepatocyte growth factor/scatter factor*) został odkryty i opisany, jako silny mitogen dla hepatocytów oraz komórek pochodzenia epitelialnego [13]. Strukturalnie HGF podobny jest do plazminogenu, proenzymu, którego aktywna forma odpowiedzialna jest za lityczny rozkład skrzepów krwi. Gen kodujący HGF zlokalizowany jest na siódmym chromosomie, składa się z 18 egzonów i 17 intronów, a dojrzały transkrypt złożony jest z około 6 tys par zasad.

HGF zbudowany jest z dwóch podjednostek ciężkiej (alfa-62 kDa) oraz lekkiej (beta-34 kDa), w skład których wchodzi sześć domen: domena N-końcowa (N) tworząca formę spinki do włosów, zbudowanej z 27 aminokwasów, cztery domeny K (K1 – K4, *ang. kringle domains*) - stanowiące 80 aminokwasowe globularne struktury, stabilizowane wewnętrznymi mostkami dwusiarczkowymi, oraz domena wykazująca homologię do proteinazy serynowej SPH (*ang. serine proteinase homology domain*), której aktywność enzymatyczna została utracona z powodu mutacji w obrębie kluczowych reszt w centrum aktywnym [14] (rysunek 2).

Tak jak plazminogen, HGF jest syntetyzowany w formie jedno łańcuchowego nie aktywnego prekursora (pro-HGF), którego konwersja w aktywny heterodimer następuje po przecięciu regionu za domeną K4. Proteoliza pro-HGF katalizowana jest przez szereg różnych proteinaz serynowych, włączając w to aktywatory plazminogenu takie jak uPA (*ang. urokinase plasminogen activator*), tPA (*ang. tissue type plasminogen activator*) oraz czynniki krzepliwości krwi (X, XI, XII).

Aktywna forma HGF wiąże się z receptorem za pomocą domen N i K1, tworzących wspólnie fragment nazywany NK1. Badania krystalograficzne wykazały zdolność cząsteczek NK1 do specyficznej dimeryzacji, która jak się podejrzewa może brać udział w mechanizmie wstępnej asocjacji receptorów MET poprzedzającej ich aktywację [15].



Rysunek 2 Schemat struktury cząsteczki HGF. Łańcuch α: N - domena N-końcowa, K1-K4 domeny K, łańcuch β: SPH - domena homologiczna do proteazy serynowej.

4.2.2 MET

MET jest transbłonowym receptorem dla czynnika wzrostu hepatocytów – HGF (ang. *hepatocyte growth factor*). Jego cząsteczka zbudowana jest z dwóch łańcuchów polipeptydowych: znajdującego się na zewnątrz komórki łańcucha α o masie ok. 50 kDa, oraz znacznie większego, przebijającego błonę komórkową łańcucha β o masie ok 140 kDa (Rysunek3 A) [16]. Za selektywne wiązanie liganda odpowiedzialna jest domena semaforynowa łańcucha α. Przyłączenie cząsteczki HGF skutkuje fosforylacją reszt tyrozynowych części C-końcowej łańcucha β. Następstwem czego jest rekrutacja białek adaptorowych oraz aktywacja transduktorów wielu kaskad sygnałowych takich jak PI-3-K (*ang. phosphoinositide-3 kinase*) , PLC-γ (*ang. Phospholipase γ*), białka STAT (*ang. signal transducers and activator of transcription*), ERK1/2 (*ang. extracellular signal-regulated kinase*) czy białko FAK (*ang. focal adhesion kinase*) (Rysunek 3 B)[17].

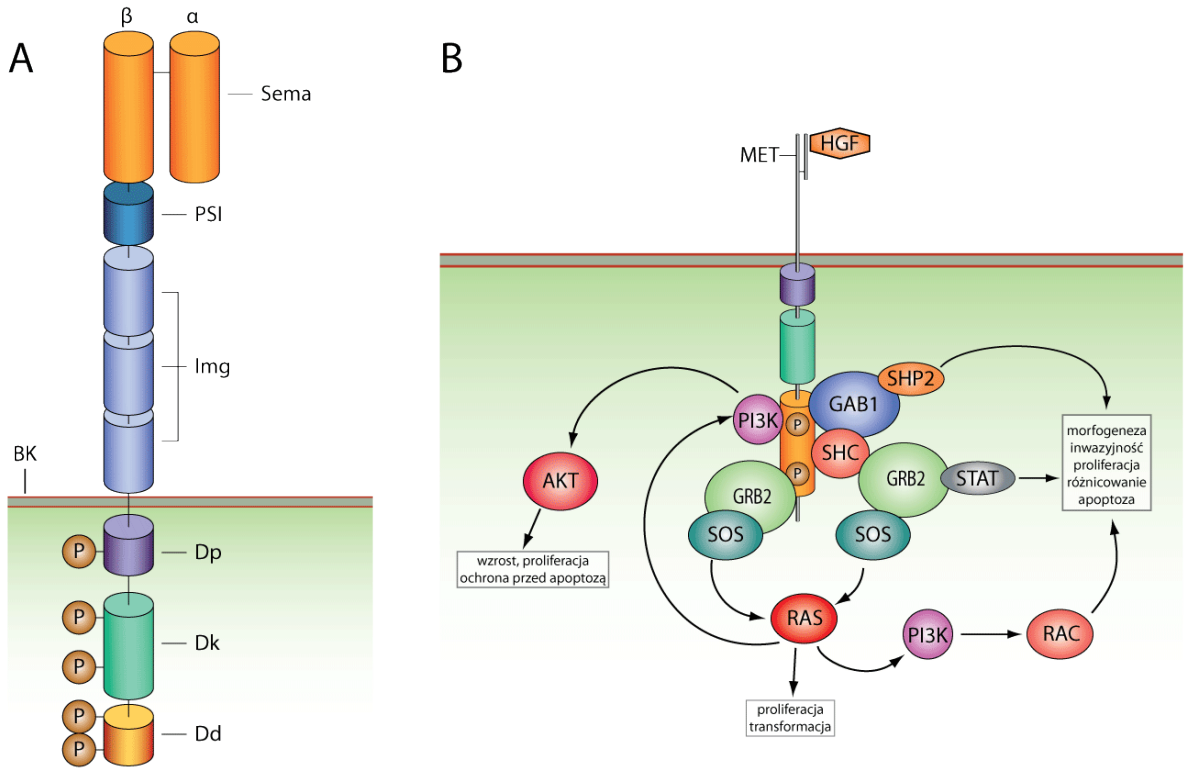
4.2.3 Oś HGF-MET w komórkach prawidłowych

Ekspresja MET oraz HGF odbywa się już we wczesnych stadiach embriogenezy w komórkach linii endodermalnej oraz mezenchymalnej, gdzie regulowana jest na drodze autokrynnej. W dalszych stadiach rozwoju zarodkowego, podczas organogenezy, produkcja HGF przechodzi na rzecz komórek pochodzenia mezenchymalnego, natomiast receptor MET występuję przeważnie na powierzchni komórek nabłonkowych formujących się organów.

Procesy kontrolowane przez oś HGF-MET związane są przede wszystkim ze wzrostem oraz ruchliwością komórek np. podczas formowania mięśni szkieletowych, gdzie dochodzi do dysocjacji komórek prekursorów mięśni a następnie ich ukierunkowanej migracji stymulowanej HGF. Podczas organogenezy oś HGF-MET koordynuje między innymi formowanie przez komórki rozgałęzionych struktur tubularnych [18].

U osobników dorosłych HGF silnie stymuluje komórek pochodzenia mezenchymalnego, co ma kluczowe znaczenie podczas procesów naprawczych wątroby oraz innych narządów i tkanek [19].

Badania przeprowadzone na modelu mysim wykazały, że blokada ekspresji MET lub HGF prowadzi do obumierania osobników już na etapie życia płodowego, głównie za sprawą upośledzonego rozwoju łożyska. Dodatkowo myszy z uszkodzoną osią HGF-MET wykazują brak organów powstałych w wyniku migracji komórek prekursorów z mięśni kończyn takich jak język czy przepona, oraz silne zaburzenia w budowie narządów wewnętrznych [18].



Rysunek 3 A) Schemat struktury MET. SEMA - domena o homologii z semaforynami, PSI - domena występujące w pleksynach, semaforynach i integrynach, Img - domeny o homologii z immunoglobulinami, Dp - domena przezbłonowa, Dk - domena o aktywności kinazy tyrozynowej, Dd - domena dokująca, P - reszty fosforanowe B) Kaskada przekazywania sygnału z aktywowanego MET. GAB1 - białko dokujjące (ang *GRB2-associated binder 1*), SHC (ang. *Src-homology-2 domain-containing transforming protein*), SHP2 (ang. *SH2-domain containing protein tyrosine phosphatase*), GRB2 - białko dokujące (*ang. growth factor receptor-bound 2*), SOS – aktywator wymiany nukleotydów guaninowych (ang. *son of sevenless*), STAT- czynnik transkrypcyjny (ang. *signal transducer and activator of transcription*), RAS – rodzina małych białek G powodujacych aktywacje GTP-azy, PI3K - kinaza 3-fosfatydyloinozytolu, Rac - podrodzina białek Rho aktywujących GTP-azy, AKT - kinaza białkowa B (ang. PKB ang. *protein kinase B*). (sporządzone w oparciu o: "MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer" Comoglio i wsp. Nature Reviews Molecular Cell Biology)

4.2.4 Oś HGF-MET w komórkach nowotworowych

Wielokrotnie demonstrowano istotną rolę MET w procesie rozwoju choroby nowotworowej. Komórki charakteryzujące się nadekspresja MET po przeszczepieniu do modelu mysiego zdradzały bardziej złośliwy charakter niż komórki nie wykazujące ekspresji MET [20]. Wykazano również, że wyłączenie MET za pomocą shRNA w komórkach RMS wpływa na obniżenie inwazyjności, zdolności do proliferacji oraz unikania szlaku apoptotycznego, co w konsekwencji prowadzi do znacznego obniżenia masy powstałych guzów w modelach mysich [21, 22]. Podobne rezultaty uzyskano na liniach komórek raka płuc. W typach o zwiększonej ekspresji MET wyciszenie tego receptora prowadziło do zahamowania wzrostu guza, bez wpływu na typy nie posiadające MET na powierzchni swoich komórek [23].

Aby zrozumieć rolę osi HGF-MET w rozwoju choroby nowotworowej należy przyjrzeć się zdarzeniom towarzyszącym procesowi przerzutowania. Pierwszym etapem jest oddzielenie się komórki nowotworowej od ogniska pierwotnego możliwe dzięki degradacji E-kadheryny, proces ten kontrolowany jest między innymi przez sygnały pochodzące od receptora MET [24]. Uwolniona komórka aby, przedostać się do układu krwionośnego, zmuszona jest do pokonania bariery jaką stanowi macierz zewnątrzkomórkowa oraz błona podstawna. W tym celu musi przyjąć migrujący fenotyp poprzez aktywację szeregu genów odpowiedzialnych za tworzenie kompleksów integrynowych, jak np.: FAK. Dodatkowo, w celu utorowania sobie drogi przez struktury macierzy zewnatrzkomórkowej, migrująca komórka wydziela białka z grupy metaloproteinaz, kolagenazę-1 oraz stromelizynę. Enzymy te, trawiąc białka macierzy zewnątrzkomórkowej otwierają drogę do krwioobiegu. Zarówno fosforylacja FAK, tworzenie połączeń zogniskowanych jak i wydzielanie enzymów proteolitycznych podlegają aktywacji poprzez oś HGF-MET [25-29]. Aby wydostać się z krwioobiegu komórki nowotworowe za pomocą integryn przylegają do komórek śródbłonka, skąd następnie torują sobie drogę do macierzy zewnątrz komórkowej. Wiadomo obecnie, że wydzielanie HGF w otoczeniu komórek śródbłonkowych powoduje zwiększenie ekspresji CD44, za interakcję śródbłonka z komórkami nowotworowymi, ułatwiając tym samym powstawanie przerzutów [30]. Ostatnim etapem tworzenia nowego ogniska nowotworowego jest stymulacja procesu angiogenezy w otoczeniu narastającego guza. Proces ten obejmuje min. stymulację proliferacji komórek śródbłonka, oraz ich organizację przestrzenną prowadzącą do uformowania nowego naczynia krwionośnego. Stymulacja MET

prowadzi do sekrecji czynników takich jak interleukina-8 (IL-8), czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF ,*ang. vascular endothelial growth factor*) oraz wstrzymuje wydzielanie trombospondyny-1 będącej inhibitorem angiogenezy [31, 32].

Aby wszystkie powyższe zdarzenia mogły dojść do skutku, niezbędna jest aktywacja osi HGF-MET. Zgodnie z obecnie panującą wiedzą, do konstytutywnej aktywacji MET w komórkach nowotworowych może dochodzić według trzech zaobserwowanych scenariuszy. Pierwszym z nich jest ustalenie autokrynnej pętli ligand receptor Drugim, nadekspresja receptora skutkująca oligomeryzacją białka na powierzchni komórki, w konsekwencji prowadzącej do aktywacji szlaków sygnałowych. Trzecim scenariuszem jest wystąpienie mutacji w obszarze domen odpowiedzialnych za aktywację szlaku sygnałowego prowadzącej do ciągłej aktywacji nawet bez obecności ligandu [33]. Najrzadziej występującym jest wariant trzeci, jednak sytuacja ta może ulec zmianie wraz z rozwojem technik wielkoskalowej analizy sekwencji DNA.

4.3 Struktura i organizacja genu MET

Gen MET zlokalizowany jest na krótkim ramieniu 7 chromosomu (7q31). W jego skład wchodzi 21 egzonów, które wraz z intronami tworzą strukturę o długości 120 kbp. W skład pierwszego egzonu wchodzi niekodujący region 5` - tzw. 5`UTR (ang. *5` untranslated reigon*) oraz kilka elementów regulujących transkrypcję. Egzon drugi zawiera zaledwie 14 bp 5`UTR oraz sekwencję dla 400 aminokwasów łańcucha polipeptydowego prekursora MET odpowiedzialna za jego proteolityczną aktywację. Kolejne egzony 2-12 kodują zewnątrzkomórkową część receptora, 13 i 14 część trans membranową, oraz reszta kodująca część wewnątrz komórkową i 3`UTR [34].

4.3.1 Regulacja transkrypcji genu MET

Ekspresja MET podlega kontroli promotora o bardzo wysokiej zawartości par GC (około 74%), charakteryzującego się brakiem takich elementów jak TATAA oraz CCAAT box. Obecnie uważa się, iż podstawowy promotor MET stanowi obszar ponad 700 bp zajmujący około 400 bp przed miejscem startu transkrypcji oraz mniej niż 400 bp pierwszego egzonu. W obszarze tym znajdują się potencjalne sekwencje *consensus* dla takich czynników transkrypcyjnych, jak Sp1, AP-2, GATA-1 and Ets-1. Ostatni znich jest elementem

pozytywnego sprzężenia zwrotnego powodującego autonomiczną stymulację ekspresji MET, który to równocześnie zwiększa produkcję Ets-1 będącego jednym z czynników aktywujących jego transkrypcję. Dodatkowo opisano regiony dalsze, w pozycji 2615 bp do 1621 bp przed miejscem startu transkrypcji, które w znacznym stopniu wzmacniają aktywność promotora oraz regiony wyciszające znajdujące się w okolicy 1621- 1093 bp przed pozycją start. Liczne miejsca wiązania czynnika Sp1, zlokalizowane w pozycji -68 bp do +60 bp względem początku transkrypcji, w modelach eksperymentalnych okazały się być niezbędne do utrzymania statusu sekwencji, jako promotora transkrypcji. W obrębie regionu flankującego gen MET od strony 5` znajdują się też miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych związanych ze stresem takich jak czynnik indukowany hipoksją (HIF-1, *ang. hypoxia inducible factor*), którego powiązanie ze stymulacją ekspresji MET zostało udokumentowane na komórkach glejaka hodowanych w warunkach obniżonego ciśnienia tlenu, oraz NFkβeta którego funkcja w obrębie promotora MET nie została jak dotąd opisana [35].

4.4 Epigenetyka

Epigenetyka jest bardzo ogólnym terminem obejmującym zespół procesów pozwalających na niezależną od sekwencji DNA regulacje ekspresji genów. Procesy te dotyczą w szczególności interakcji DNA z histonami, oraz modyfikacji chemicznej reszt zasad stanowiących budulec DNA, jak i posttranslacyjnej modyfikacji samych histonów.

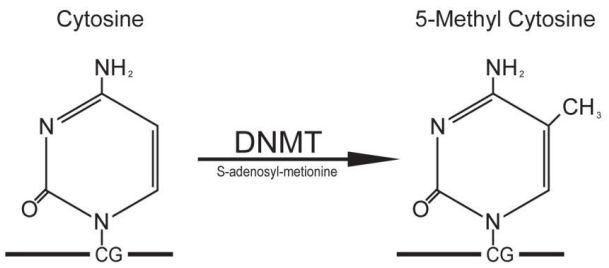
4.4.1 Posttranslacyjne modyfikacje histonów

Histony są jednym z fundamentalnych czynników regulacji aktywności kodujących regionów DNA. Białka te w wyniku modyfikacji poprzez metylację, acetylację, fosforylację lub ubikwitynację, mogą wchodzić w interakcje z białkami odpowiedzialnymi za remodelowanie chromatyny [36]. Modulacja sygnału genetycznego poprzez modyfikacje histonów jest bardzo skomplikowana i podlega ciągłym badaniom. Przykładowo, metylacja lizyny histonu H3, u większości znanych organizmów prowadzi do obniżenia ekspresji genu jednak nie do jego całkowitego wyciszenia [37]. Najlepiej zbadana na dzień dzisiejszy jest acetylacja lizyny histonu H4, która prowadzi do częściowej relaksacji chromatyny, co ułatwia dostęp czynnikom transkrypcyjnym do sekwencji promotorowych genów. Badania nad tzw. kodem histonowym utrudnia fakt, iż modyfikacje aminokwasów mogą zachodzić w różnych pozycjach, dodatkowo z zupełnie różnym skutkiem [38]. Jak dotąd nie udało się ustalić

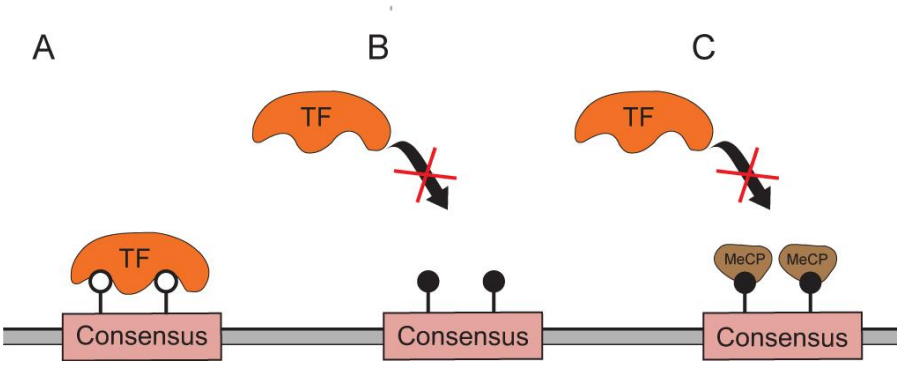
spójnych zasad rządzących wpływem postranslacyjnych modyfikacji histonów na ekspresję białek. Coraz popularniejsze staje się stwierdzenie, że zależności te nie są uniwersalne, jak np. kod genetyczny a co za tym idzie, będą różne dla różnych grup organizmów.

4.4.2 Metylacja DNA

W komórkach kręgowców, metylacja DNA jest procesem chemicznej modyfikacji reszt cytozynowych (zamiana cytozyny na 5-metylocytozynę) (rysunek 4), pozwalającym na niezależną od sekwencji regulację poziomu ekspresji genów. Profil metylacji poszczególnych fragmentów DNA może być dziedziczony, jednak odnotowano przypadki kiedy profile metylacji podlegały zmianom cyklicznym skorelowanym z cyklem komórkowym [39]. W prawidłowych komórkach metylacja uczestniczy w stabilizacji struktury chromosomów, regulacji długości telomerów oraz ekspresji części genów. Stanowi również jeden z mechanizmów sekwencyjnego wyłączania genów w procesie różnicowania komórkowego oraz rozwoju zarodkowego [40]. Podstawowy mechanizm powodujący represję metylowanego genu polega na rekrutacji kompleksu remodelującego chromatynę. Kompleks ten deacetyluje białka histonowe, co w konsekwencji prowadzi do kondensacji nukleosomów. Istnieją jednak bardziej subtelne zależności pomiędzy metylacją reszt cytozynowych a powinowactwem białek aparatu transkrypcyjnego do DNA [41]. Obecnie uznaje sie dwie teorie, z których pierwsza głosi, iż grupa metylowa na cytozynie stanowi barierę steryczną dla potencjalnego czynnika transkrypcyjnego, co zaś uniemożliwia powstanie kompleksu preinicjacyjnego polimerazy RNA (rysunek 5 B). Druga natomiast opisuje szereg białek specyficznie rozpoznających i wiążących 5-metylocytozynę powodując tym samym represję transkrypcji (rysunek 5C) [42, 43].



Rysunek 4 Proces konwersji cytozyny w 5-metylocytozynę. Enzymy katalizujące reakcję należą do rodziny transmetylaz DNA. Kofaktorem niezbędnym do zajścia tego procesu jest S-adenozylo metionina. ("Regulation of transcription in cancer" E Trzyna, M Duleba, M Faryna, M Majka, Frontiers in Bioscience)



Rysunek 5 Postulowane mechanizmy represji genów poprzez metylację CpG sekwencji promotorowych. TF - czynnik transkrypcyjny rozpoznający sekwencję w rejonie promotora, MeCP - białka wiążące 5-metylocytozynę. Okręgi wypełnione kolorem czarnym obrazują 5-metylocytozynę, okręgi nie wypełnione - cytozynę. ("Regulation of transcription in cancer" E Trzyna, M Duleba, M Faryna, M Majka, Frontiers in Bioscience)

4.4.3 Mechanizmy sterujące metylacją DNA

W chwili obecnej uważa się, że do prawidłowego zachodzenia procesów związanych z metylacją DNA w komórce niezbędne są trzy enzymy z grupy DNA-metylotransferaz (DNMT, *ang. DNA methyltransferase*). DNA metylotransferaza 1 - DNMT1, odpowiedzialna za utrzymywanie istniejącego wzoru metylacji, oraz DNA metylotransferazy 3a i 3b (DNMT3a, DNMT3b) odpowiedzialne za metylację DNA *de novo*. Opisano również dwa dodatkowe enzymy DNMT2 i DNMT3L charakteryzujące się wysoką homologią do wspomnianych 3a i 3b [44]. Ich podwyższoną produkcję zauważono między innymi w embrionalnych komórkach macierzystych. Jak dotąd nie ustalono skutków braku ekspresji DNMT2. DNMT3L, pomimo iż nie posiada domeny katalitycznej, bierze pośredni udział w procesie metylacji *de novo*, zwiększając aktywność DNMT3a i DNMT3b. Brak ekspresji DNMT3L powoduje obumieranie mysich embrionów w skutek powikłań związanych z imprintingiem genomowym [45].

4.4.4 Wyspy CpG

Szacuje się, iż w przeciętnym genomie u kręgowców ok. 70-80% dinukleotydów CpG zawiera metylowaną cytozynę. Pozostałe nie metylowane CpG najczęściej zgromadzone są w grupy nazywane wyspami CpG [46]. Wyspy te charakteryzują się wysoką zawartością nukleotydów G i C – minimum 55-60% oraz długością wahającą się pomiędzy kilkaset a kilka tysięcy par zasad. Wyspy CpG przeważnie mieszczą się w obrębie sekwencji promotorowych tzw. *house keeping genes,* czyli genów niezbędnych do podtrzymywania procesów życiowych komórki, oraz genów specyficznych tkankowo [47]. Coraz częściej spotyka się doniesienia na

temat tzw. "obrzeży wysp" CpG, regionów znajdujących się ok. 2000 bp przed miejscem startu transkrypcji. Zajmują one mniejszy obszar oraz charakteryzują się znacznie mniejszym zagęszczeniem dinukleotydów CpG. Metylacja reszt cytozynowych w obrębie wysp CpG, jak i ich obrzeży, ma nierzadko znaczący wpływ na poziom ekspresji sąsiadujących z nimi genów [48].

4.4.5 Zmiany metylacji DNA w komórkach nowotworowych

Do niedawna przypuszczano, że z epigenetycznego punktu widzenia, rozwój nowotworu związany jest z utratą metylacji w obrębie perycentromerycznych części chromosomów, co w konsekwencji miało prowadzić do destabilizacji struktury chromosomu oraz reaktywacji retrotransopozonów [49].

Gwałtowny rozwój technik molekularnych pozwolił jednak na bardziej kompleksowe podejście do powyższego tematu, co zaowocowało prezentacją licznych przypadków aktywacji protoonkogenów na skutek utraty metylacji w obrębie sekwencji ich promotorów. Przykładami takowych są cMYC oraz H-RAS [50], czy też gen N-Acetylotransferazy-1 w przypadku raka piersi [51].

Opisano też przypadki rozwoju nowotworu związane z hipermetylacją promotora, a co za tym idzie wyciszeniem genów z grupy supresorów protoonkogenów (TSG, *ang. Tumor suppressing genes*). Opisane przypadki obejmują wyciszenie poprzez hipermetylację takich genów jak gen białka p53 odpowiedzialnego między innymi za kontrolę cyklu komórkowego, czy też geny odpowiedzialne za przebieg apoptozy oraz procesów naprawy DNA jak np.: DAPK1 (*ang. Calmoduline dependent enzyme with kinase activity*) i BRCA1 (*ang. Breast cancer 1*) [52-54].

Tabela 1 Geny hipermetylowane w tkankach nowotworowych (na podstawie "Specific gene hypomethylation and cancer: new insights into coding region feature trends" Romeu i wsp. Bioinformation)

Gen	Pełniona funkcja	Atakowane narządy
APC	kontrola proliferacji, adhezji oraz migracji komórek	płuca, przełyk
BRCA1	mechanizmy naprawy DNA, supresja onkogenezy	jajniki, piersi
CDKN2A/p16	cyklino zależny inhibitor kinaz GIT 40, kontrola cyklu komórkowego	głowa, szyja, płuca
CDKN2B/p15	cyklino zależy inhibitor kinaz, kontrola cyklu komórkowego	szpik kostny, węzły chłonne
E-kadheryna	proliferacja, migracja	tarczyca, układ pokarmowy
MGMT	naprawa DNA	płuca, mózg
RASSF1A	kontrola proliferacji	płuca, jajniki, przełyk, nerki
GSTP1	transferaza glutationowa, procesy detoksyfikacyjne komórki	prostata, nerki, piersi

Przykłady hipermetylacji promotorów genów p15 oraz kalcytoniny opisane zostały w 65% przypadków zespołów mielodysplastycznych oraz 95% ostrych białaczek szpikowych [55].

Tabela 2 Geny demetylowane w tkankach nowotworowych (na podstawie "The role of DNA hypermethylation and demethylation in cancer and cancer therapy" M. Szyf Curr Oncol).

Gen	Pełniona funkcja	Atakowane narządy
Cytochrom p450	białko mitochondrialne	prostata
SNCG	białko synukleina γ	pierś, okrężnica, jajniki, choroby neurodegeneracyjne
XIST	sekwencja na chromosomie X odpowiedzialna za jego inaktywację	prostata, jądra
MTA1	element kompleksu remodelującego chromatynę	piersi, okrężnica, trzustka, prostata, płuca
SERPINB5	inhibitor protez seronowych, supresja nowotworów	okrężnica, płuca, trzustka, jajniki
IGF2	insulinopodobny czynnik wzrostu II	okrężnica, płuca
CTCFL	czynnik o charakterze palca cynkowego, mechanizmy modulacji metylacji DNA	jądra
DIRAS3	gen wyciszany przez imprinting, rodzina białek wiążących białka RAS	piersi, jajniki

4.4.6 Dynamika zmian profilów metylacji w obrębie sekwencji promotorowych.

Przyjmuje się, że metylacja DNA genomowego jest stabilna w danym typie prawidłowych komórek oraz, że podlega dziedziczeniu podczas mitozy. Istnieją jednak opisane przypadki krótkofalowych, cyklicznych zmian metylacji w obrębie promotorów genów. Zmiany te zachodzą w relatywnie małej jak na biologię molekularną skali czasowej ok. 100 min. Ponieważ tak krótkotrwałe wahania nie mogą mieć wyraźnego wpływu na poziom ekspresji genu, uważa się, iż przejściowe zmiany w metylacji promotorów mogą stanowić mechanistyczne powiązanie transkrypcji z długoterminowymi zmianami epigenetycznego statusu promotorów [39].

4.4.7 Wpływ środowiska na metylację DNA

Mechanizmy kontrolujące zmiany epigenetyczne w komórce są wrażliwe na wpływ środowiska zewnętrznego. Poprzez środowisko zewnętrzne, można rozumieć zarówno bezpośrednie otoczenie komórki np. długotrwały stan zapalny, jak i warunki środowiska w którym znajduje się cały organizm.

Aby ocenić wpływ stanu zapalnego na zmiany epigenetyczne genomowego DNA, przebadano grupę pacjentów z chronicznym zapaleniem nerek. W oparciu o uzyskane

rezultaty wykazano, że poziom metylacji DNA genomowego leukocytów z krwi obwodowej u ludzi cierpiących na przewlekłe stany zapalne jest istotnie wyższy niż w grupie kontrolnej [56].

Eksperymenty przeprowadzone na szczurach, poddawanych wpływowi promieniowania jonizującego, wykazały ok 40% spadek metylacji genomowego DNA hepatocytów. Co ciekawe efekt ten nie został wykryty w komórkach mózgu oraz śledziony. Spadku metylacji nie wykryto również w hepatocytach hodowanych *in-vitro* [57]. Podobny wynik uzyskano badając hepatocyty populacji szczurów hodowanych w warunkach niedoboru tlenowego [58].

Zmiany wzoru metylacji zaobserwowano również u ludzi, których matki były narażone na głód w okresie ciąży. Przebadano 15 loci związanych ze wzrostem oraz chorobami metabolicznymi. W wyniku przeprowadzonych analiz wykazano obniżenie poziomu metylacji w obrębie locus INSIGF u osób narażonych na głód w porównaniu z ich młodszym rodzeństwem które mogło rozwijać się w normalnych warunkach. Sytuacja przedstawiała się odwrotnie w obrębie loci interleukiny 10 oraz leptyny.

Dodatkowo różnorodność wzorów metylacji wykazywała zależność od takich czynników jak płeć, czas oraz etap ciąży podczas ekspozycji na warunki głodu [59].

4.4.8 Epigenetyka - perspektywy terapeutyczne

Odwracalność zmian epigenetycznych może być celem terapii u chorych na raka [60]. Leki, które są w stanie wpłynąć na epigenetyczną strukturę chromatyny można podzielić na dwie grupy: inhibitory transmetylaz DNA (DNMT), oraz na inhibitory deacetylazy histonów (HDAC, *ang. histone deacetylase*). Do pierwszej można zaliczyć takie związki jak 5-azacytydyna (5-aza-CR), 5-aza-`-deoksycytydyna (5-aza-CdR) oraz 1-Beta-D-rybofuranozylo-2(1H)-pirymidon (Zebularine) [61]. 5-aza-CR i 5-aza-CdR hamują aktywność DNMT1, DNMT3A i DNMT3B już w mikromolowych stężeniach. Efektem takiego zahamowania jest demetylacja i aktywacja supresorów nowotworów takich jak CDKN2A, czy RB1 (*ang. retinoblastoma protein*). Można przypuszczać, iż takie działanie mogło by przywrócić normalne reakcje komórkom nowotworowym jak np. odpowiedź na sygnał do apoptozy, co pozwoliło by na opanowanie rozprzestrzeniania się choroby [62].

Zebularine został zsyntetyzowany w latach 80. XX wieku jako inhibitor deaminazy cytydynowej. Substancja ta wbudowuje się w sekwencję DNA, a następnie w pierwszym kontakcie z DNMT trwale je dezaktywuje. Czynnik ten testowany na komórkach in vitro oraz na modelu mysim wykazał się wysoką skutecznością w hamowaniu aktywności DNMT, jak i również trwałością w środowiskach o różnym pH, a co najważniejsze z terapeutycznego punktu widzenia, niską toksycznością [63].

Do grupy inhibitorów HDAC o potencjale terapeutycznym zaliczyć można takie związki jak: kwas hydroksamowy, trichostatyna A czy kwas walproinowy. Poprzez blokadę aktywności HDAC uniemożliwiają one zniesienie ekspresji genów niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania komórki. Wszystkie te czynniki tworzą kompleks z centrum aktywnym HDAC pozbawiając to białko możliwości pełnienia swojej funkcji [64].

Wszystkie wymienione ścieżki terapeutyczne poruszają problem przeciwdziałania hipermetylacji genów będących supresorami nowotworów. Brak jest na chwilę obecną doniesień o przeciwdziałaniu skutkom niespecyficznie zniesionej metylacji. Ze względu na wciąż ograniczoną wiedzę na temat działania mechanizmów epigenetycznych kręgowców trudno jest jednoznacznie powiedzieć czy i kiedy takie możliwości się pojawią.

5. Cele pracy

Niska skuteczność obecnie dostępnych terapii przeciwko RMS narzuca potrzebę poszukiwania alternatywnych metod leczenia tego schorzenia. Dobrze udokumentowana rola MET w procesie transformacji nowotworowej i przebiegu, skłania do bliższego poznania mechanizmów sterujących jego ekspresją. Coraz częstsze doniesienia o roli epigenetyki w progresji nowotworowej, charakter promotora MET oraz bardzo ograniczone wiadomości z zakresu wpływu metylacji jego ekspresję narzucają pytania, na część których odpowiedzi zostaną zasugerowane w niniejszej pracy.

5.1 Analiza genetyczna genu MET.

a) Mutacje punktowe (SNP, *ang. signle nucleotide polymorphism*) w obrębie promotora

b) Multiplikacje genu MET w obrębie genomu

5.2 Analiza epigenetyczna.

a) Opisanie „prawidłowego" profilu metylacji w komórkach kontrolnych Opisanie profili metylacji w liniach RMS Rh18, Rh28, Rh30, RD, CW9019 i SMS.

b) Opisanie zmian profilu metylacji promotora MET pod wpływem warunków środowiskowych (stres komórkowy wywołany promieniowaniem, głodem i niedoborem tlenowym), oraz pod wpływem czynników stymulujących (HGF, SDF, ITAC, FBS)

5.3 Analiza ekspresji MET.

a) Określenie zmian ekspresji MET pod wpływem stresu komórkowego oraz czynników stymulujących.

6 Materiały i metody

6.1 Hodowle komórkowe

Hodowle komórkowe linii mięsaka prążkowano komórkowego Rh30, Rh28, Rh18, CW9019, SMS oraz RD prowadzono w medium DMEM High Glucose (*ang. Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej (*ang. Fetal Bovine Serum - FBS*), 2 mM L-glutaminy oraz gentamycyny w 37 st. C, w atmosferze 5% CO_2 i 95% wilgotności powietrza. Linie komórkowe pasażowano 2-3 razy w tygodniu odrywając komórki od podłoża za pomocą trypsyny.

6.1.2 Izolacja i hodowla komórek prawidłowych

Mioblasty pobierano z ludzkiego ramienia (mięsień dwugłowy) poprzez biopsje igłową. Pobrane próbki były płukane w PBS z antybiotykami, oczyszczane z przylegającej tkanki tłuszczowe i ścięgien a natępnie cięte na małe kawałki i rozpuszczane w roztworze kolagenazy typu A (Sigma-Aldrich). Po 40 minutowej inkubacji w tmp. 37 st. C, trawienie przerywano poprzez dodanie medium hodowlanego z dodatkiem surowicy. Uzyskaną zawiesinę włókien homogenizowano przez pipetowanie po czym wirowano z prędkością 1500 obrotów na minutą przez 5 minut. Uzyskany pelet płukano roztworem PBS a następnie zawieszano w komercyjnym medium SKBM-2 (Lonza). Pierwszy posiew komórek wykonywano na naczynia powleczone żelatyną. Medium SKBM-2 wymieniano co trzy dni. Komórki hodowano aż do uzyskania 70% konfluencji. W eksperymentach wykorzystywano komórki z ok 3 pasażu.

6.1.3 Stres komórkowy

6.1.3.1 Głodzenie

Komórki poddawane głodzeniu wysiewano 24h przed ekspozycją w liczbie pozwalającej uzyskać ok. 70% konfluencji. Po upływie 24h hodowle przepłukano roztworem PBS a następnie dodano medium DMEM z dodatkiem 0,5 % bydlęcej albuminy (BSA, *ang. Bovine serum albumine*).

6.1.3.2 Hipoksja

Niedotlenienie badano hodując komórki przygotowane, podobnie jak w przypadku głodzenia, przez 24h w standardowym medium w szczelnej komorze inkubacyjnej pozwalającej na regulację składu mieszanki gazowej. Stężenie tlenu utrzymywano na poziomie 0,5%. Test hipoksji wykonano w pracowni profesora Dulaka.

6.1.3.3 Naświetlanie promieniowaniem gamma.

Stres radiacyjny indukowano poprzez naświetlanie zawiesiny komórek dawką 20 Gy (ekspozycja ok. 2 min). Komórki wysiewano do standardowego medium, a następnie inkubowano w standardowych warunkach przez 24h.

6.1.4 Stymulacja komórek

Pasażowane komórki wysiewano w liczbie pozwalającej uzyskać ok. 70% konfluencji. Po 24h komórki wyciszano poprzez 24h inkubację w medium DMEM z dodatkiem 0,5% BSA. Wyciszone komórki przepłukiwano roztworem PBS, a następnie inkubowano przez 24h w medium zawierającym jeden z czynników: HGF (20mg/ml), SDF (100mg/ml), ITAC (10mg/ml), FBS (10%).

6.1.5 Różnicowanie komórek

Komórki wysiewano w gęstości 3000/cm^2 do standardowego medium DMEM z dodatkiem 10% FBS i pozwalano im osiąść na podłożu przez noc. Następnego dnia rozpoczynano różnicowanie poprzez hodowlę w medium DMEM suplementowanym 0,5% końską surowicą (HS) oraz TPA (octan 12-O-tetradekanoilo- forbolu-13). Różnicowanie prowadzono przez 10 dni wymieniając medium co 2-3 dni.

6.2 Ocena poziomu ekspresji MET na powierzchni komórek

6.2.1 Cytofluorymetria przepływowa - barwienie komórek

Po inkubacji w odpowiednim środowisku, lub z odpowiednim czynnikiem komórki płukano roztworem PBS, a następnie odrywano od podłoża za pomocą nieenzymatycznego

czynnika - Cell Dissociation Solution Non-enzymatic 1 x (Sigma-Aldrich). Zebrane komórki liczono w komorze Burkera, a następnie barwiono przeciwko MET za pomocą mysich przeciwciał monoklonalnych znakowanych karboksyfluoresceiną (R&D Systems). Jako kontroli izotypowej użyto mysich przeciwciał IgG1 znakowanych karboksyfluoresceiną (R&D Systems). Do barwienia pobierano 1 x 10^5 komórek, które wirowano przez 5 minut w celu pozbycia się medium. Komórki zawieszano w 90 µl roztworu PBS i do tak przygotowanej zawiesiny dodawano 10 µl roztworu przeciwciał. Komórki z przeciwciałami inkubowano na kołysce przez 30 min w 4 st. C. Po upływie tego czasu komórki dwukrotnie przepłukiwano roztworem PBS w celu pozbycia się niezwiązanych przeciwciał. Ostatecznie zawieszając w 300 µl PBS i poddawano analizie na cytofluorymetrze przepływowym FACSCanto (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Z komórkami kontroli izotypowej postępowano analogicznie.

6.2.3 Cytofluorymetria przepływowa - zbieranie i analiza danych

Dane z urządzenia FACSCanto zbierano za pomocą oprogramowania BD FACSDiva Software (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Do analizy pobierano 10 x 10^3 zdarzeń pomiarowych. Ekspresję receptora MET na powierzchni komórek mierzono poprzez określenie średniej intensywności fluorescencji (MFI, *ang. mean fluorescence intensity*) badanej populacji komórek. Zmiany ekspresji MET pomiędzy populacjami danego typu porównywano na podstawie wartości różnicy MFI komórek barwionych przeciwko MET, a MFI komórek kontroli izotypowej.

6.3 Ocena ekspresji genów za pomocą PCR w czasie rzeczywistym (Real-time PCR)

6.3.1 Izolacja RNA i reakcja odwrotnej transkrypcji

RNA izolowano za pomocą zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Stężenie i czystość uzyskanego materiału określano za pomocą spektrofotometru UV NanoDrop 1000 (Thermoscientific) poprzez pomiar absorbancji fal o długości 260nm i 280nm. Odwrotną transkrypcję przeprowadzano na 1 µg wyizolowanego RNA za pomocą odwrotnej transkryptazy wirusa mysiej białaczki - M-MLV (ang. *Murine leukemia virus*) (Promega) według dwuetapowego protokołu obejmującego:

1) Denaturację RNA wraz z wolnymi nukleotydami (stężenie końcowe 0,5 mM) i niespecyficznymi starterami (ang. *random primers*) (stężenie końcowe 2,5 µM).

2) W drugim etapie do reakcji dodawano enzym w odpowiednim buforze oraz pecyficzny inhibitor RNAz - Rnasin (Promega) a następnie inkubowano mieszaninę reakcyjną przez 60 min w 37 st. C, kolejny krok: 72 st. C przez 10 min, po czym temperatura była obniżana do 4 st. C aż do wyjęcia próbek z termocyklera.

6.3.2 Reakcja PCR w czasie rzeczywistym (Real-time PCR)

Ocenę ekspresji genów przeprowadzono za pomocą ilościowej metody PCR w czasie rzeczywistym w oparciu o specyficzne sondy TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA,USA) w aparacie ABI PRISM 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Rekcję przeprowadzono z wykorzystaniem gotowej mieszaniny reakcyjnej TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems - Life Technologies)

Mieszanina reakcyjna zawierała następujące składniki:

TaqMan Gene Expression Assay 2x Master Mix	10 µl
Specyficzna sonda TaqMan	1 µl
cDNA	100ng
Woda	do końcowej objętości 20 µl

Do oceny ekspresji MET wykorzystano sondy MET (Hs01565589_m1), jako endogennej kontroli użyto sond dla ludzkiego GAPD dostarczone przez Applied Biosystems.

6.4 Analiza genetyczna promotora MET

6.4.1 Izolacja DNA genomowego

Do izolacji DNA genomowego wykorzystano zestaw Cell Culture DNA mini Kit (QIAGEN). Zebrane za pomocą trypsyny komórki wirowano w celu odpłukania medium hodowlanego. Uzyskany pelet zawieszano w 200 µl PBS. Tak przygotowana zawiesinę komórek traktowano buforem lizującym oraz alkaliczną proteazą. Uzyskany lizat komórkowy przepuszczano przez kolumny silikonowe o powinowactwie do kwasów nukleinowych. Związane z kolumną DNA eluowano czystą wodą. Stężenie oraz czystość pozyskanego materiału sprawdzano za pomocą urządzenia NanoDrop 1000 (Thermoscientific).

6.4.2 Amplifikacja fragmentu promotora MET za pomocą PCR

Fragment promotora amplifikowano za pomocą polimerazy Ampli Taq Gold (Applied biosystems). Z konieczności (brak produktu) standardowy protokół proponowany przez producenta zmodyfikowano poprzez obecność w mieszaninie ligacyjnej 10% DMSO (WAK-Chemie Medical GmbH) oraz 1 µl 10x stężonego odczynnika PCR Enchancer Solution (Invitrogen). Do reakcji używano ~300 ng DNA, stężenia końcowe starterów: 0,25 µM. Próbki inkubowano według następującego programu:

Wstępna denaturacja: 95 st. C przez 10 min

40 cykli:

95 st. C 60 s

45 st. C 40 s

72 st C 60 s

końcowa elongacja: 72 st. C przez 10 min.

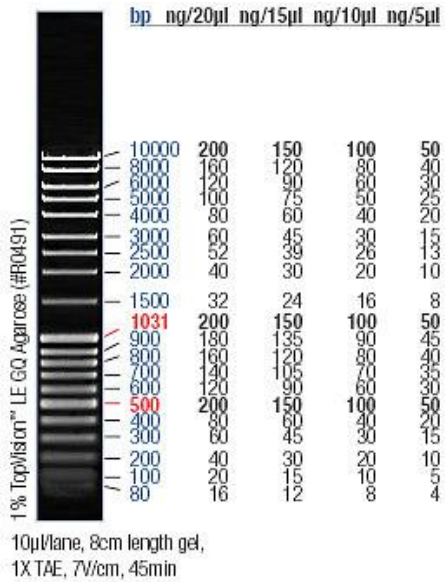
Sekwencje starterów wykorzystanych w reakcji:

F: 5' – CGC CTC TAA CAA TGA ACT CC - 3'

R: 5' – GGC TGG CAA TTT TAC CTT TCG - 3'

6.4.3 Elektroforeza produktów PCR na żelu agarozowym

Po skończonej reakcji PCR do mieszaniny dodawano 4 µl 6x stężonego buforu obciążającego (Fermentas). Tak przygotowaną próbkę nakładano na żel sporządzony z 1,5% roztworu agarozy (Promega), buforu TAE (40mM Tris, 20mM kwas octowy, 1mM EDTA) oraz bromku etydyny w stężeniu 0,5 µg/ml. Elektroforezę przeprowadzano przy napięciu 80 V przez 40 min w buforze TAE. Podgląd zakończonego rozdziału odbywał się w oświetleniu UV. Uzyskane produkty PCR wycinano z żelu agarozowego w celu ekstrakcji. Jako marker wielkości wykorzystano Mass Ruler Ladder Mix (Fermentas).



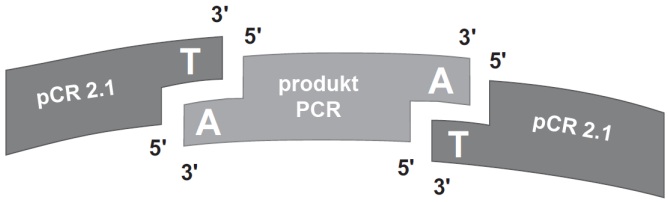
Rysunek 6 Marker wielkości wykorzystywany podczas elektroforezy na zelu agarozowym (www.fermentas.com)

6.4.4 Ekstrakcja produktów PCR z żelu agarozowego

Produkty PCR ekstrahowano z agarozy za pomocą zestawu QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Bloczki zawierające produkt PCR topiono w w buforze QG temp. 50 st. C przez 15 min mieszając średnio co 5 min. DNA odzyskiwano na kolumnie silikonowej poprzez elucję za pomocą czystej wody. Jakość i czystość uzyskanego DNA analizowano za pomocą aparatu NanoDrop1000 (Thermoscientific), oraz poprzez elektroforezę na żelu agarozowym.

6.4.5 Klonowanie produktów PCR do wektora pCR 2.1 (Invitrogen)

Klonowanie produktów PCR wykonano przy użyciu zestawu Original TA Cloning Kit (Invitrogen). Metoda ligacji oparta była o wyposażenie wektora pRC2.1 (Rysunek 8) w lepkie końce tymidynowe komplementarne do nadbudowanych przez polimerazę *Taq* końców adeninowych (Rysunek 7).



Rysunek 7 Metoda klonowania zastosowana w zestawie TA Cloning KIT (IVITROGEN)

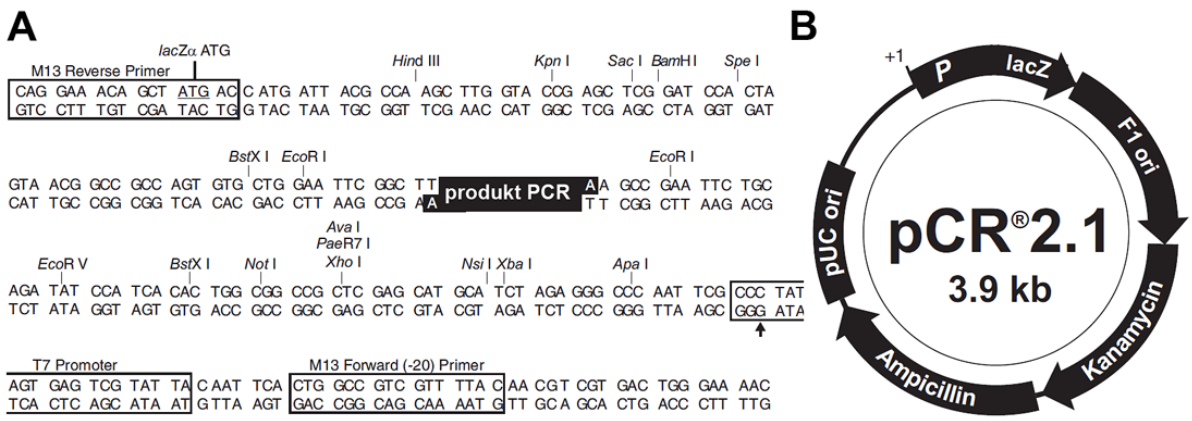
W skład mieszaniny ligacyjnej wchodziły:

zlinearyzowany wektor pCR 2.1	25 ng
10 x stężony bufor ligacyjny	1 µl
oczyszczony produkt PCR	ilość zależna od uzyskanego stężenia
ligaza	4 U
woda	dopełnianie do 10 µl

Reakcja przebiegała przez noc w temp. 14 st C.

Ilość produktu PCR niezbędną do reakcji obliczono na podstawie uniwersalnego wzoru:

$$\text{ilość (ng) produktu PCR} = \frac{\text{(ilość par zasad produktu PCR)(25 ng wektora pCR 2.1)}}{\text{(wielkość wektora pCR 2.1 ~3900 bp)}}$$



Rysunek 8 A) Mapa fragmentu MCS wektora pCR 2.1 B) Mapa wektora pCR 2.1. (INVITROGEN)

6.4.6 Transformacja bakterii kompetentnych wektorem z wklonowanym produktem PCR

Do namnażania wektora pCR 2.1 użyto chemokompetentnych bakterii *E. Coli* Dh5α (Invitrogen). Transformacji dokonano poprzez dodanie do zawiesiny baterii 1µl mieszaniny ligacyjnej oraz dalszą inkubację w 4 st. C przez 30 min. Po inkubacji bakterie poddawano szokowi cieplnemu w tmp. 42 st. C przez 30 s, a następnie zawieszano w medium wzbogaconym SOC (Invitrogen). Tak przygotowaną próbkę inkubowano przez 1,5 h w 37st. C. Gotowe bakterie wysiewano na płytki z agarozową pożywką LB (ang. *Lysogeny Broth* - Invitrogen) zawierające kanamycynę (Invitrogen) w stężeniu 50µg/ml wraz z dodatkiem 20 ul syntetycznego analogu galaktozy X-Gal (5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D-galactopiranozyd - Invitrogen) w roboczym stężeniu 20 mg/ml. Płytki z wysianymi bakteriami inkubowano przez noc w tmp. 37 st. C

6.4.7 Selekcja hodowli bateryjnych i namnażanie plazmidów w hodowlach płynnych

Dzięki zastosowaniu wektora pCR 2.1 wyposażonego w mechanizm selekcji Blue/White oparty na alfa-komplementacji genu galaktozydazy, dokonano wstępnego wyboru klonów zawierającego plazmid z pożądanym produktem PCR dokonywano w oparciu wyboru białych kolonii. Kolejnym etapem była selekcja klonów bakteryjnych za pomocą PCR. Metodę zoptymalizowano tak, aby można było przeprowadzić reakcję PCR w taki sposób, żeby zamiast czystego DNA jako matrycy używano kolonii bakteryjnej zawieszonej w czystej wodzie. Wybraną kolonie bakteryjną pobierano za pomocą sterylnej końcówki do pipety, a następnie zawieszano w 5 µl czystej wody. Do tak przygotowanej próbki dodawano gotową

2 x stężoną mieszaninę reakcyjną zawierającą polimerazę *Taq* (Euryx) oraz standardowe startery M13 F i M13 R.

Warunki reakcji PCR:

Wstępna denaturacja: 5 min 95 st. C

25 cykli:95 st. C	10 s
50 st. C	10 s
72 st C	60 s

Finalna elongacja: 15 min 72 st. C

Rezultaty sprawdzano za pomocą elektroforezy na żelu 1,5 % agarozowym.

Klony bakteryjne, które w wyniku selekcji okazały się zawierać plazmid z oczekiwanym produktem PCR, wykorzystywane były do inokulacji hodowli płynnych.

Namnażanie plazmidów przeprowadzono poprzez zakładanie hodowli w płynnej pożywce LB z dodatkiem Ampicyliny o końcowym stężeniu 100 µg/ml. Inokulacji dokonywano poprzez zawieszenie wybranej kolonii bakteryjnej w szklanej próbówce hodowlanej zawierającej 4 ml medium LB. Przygotowane hodowle inkubowano przez noc w cieplarce wyposażonej w wytrząsarkę (180 rpm).

6.4.8 Izolacja plazmidów z płynnych hodowli bakteryjnych

Do izolacji plazmidowego DNA użyto zestawu Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification system (Promega). Całonocne hodowle bakteryjne wirowano do uzyskania peletu (4000 g, prze 10 min), a następnie poddawano lizie alkaicznej zgodnie z zaleceniami producenta. DNA z uzyskanego lizatu izolowano za pomocą kolumn silikonowych, z których dokonywano elucji za pomocą wody. Oczyszczone DNA plazmidowe sprawdzano pod kątem iościowym i jakościowym na aparacie NanoDrop 1000 (Thermoscientific) i przechowywano w tmp. -20 st. C.

6.4.9 Analiza restrykcyjna wektorów plazmidowych

Oczyszczone plazmidy weryfikowano pod kątem obecności odpowiedniego insertu za pomocą cięcia enzymem restrykcyjnym EcoRI. Do mieszaniny reakcyjnej zawierającej 1 U restryktazy EcoRI i 2 µl 10x stężonego buforu reakcyjnego dodawano 500 ng DNA plazmidowego, dopełniając do końcowej objętości 20 µl wodą. Rekcję przeprowadzano w 37

st. C przez 120 min. Rezultaty sprawdzano za pomocą elektroforezy na 1,5% żelu agarozowym.

6.4.10 PCR sekwencyjny na matrycy wektora pCR 2.1 z wklonowanym fragmentem promotora MET

Poddane weryfikacji wektory, zawierające fragment promotora MET, sekwencjonowano za pomocą zestawu odczynników BigDye Terminators v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) suplementowanych dodatkiem DMSO. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziło:

BidDye Terminator MIX	4 µl
BigDye Terminator Sequencing Buffer	2 µl
startery M13 F/R	3,2 pmol
DMSO	2 µl
DNA plazmidowe	do objętości 20 µl

Sekwencje starterów M13:

M13 F : 5' - GTT GTA AAA CGA CGG CCA GT - 3'

M13 R : 5' - CAG GAA ACA GCT ATG ACC - 3'

Przebieg reakcji zgodnie z zaleceniami producenta zestawu do sekwencjonowania:

Wstępna denaturacja: 1 min 96 st. C

25 cykli:

96 st. C	1 min
50 st. C	5 s
60 st. C	4 min

6.4.11 Oczyszczanie produktów sekwencyjnego PCR

Produkty sekwencyjnego PCR oczyszczono za pomocą precypitacji DNA w roztworze etanolu. Pierwszym krokiem oczyszczania było dodanie do zakończonej reakcji 5 µl 125 mM roztworu EDTA, a następnie 60 µl czystego etanolu. Tak przygotowaną mieszaninę inkubowano w ciemności przez 15 min, po czym wirowano przez 30 min (2200 g) w temp. pokojowej. Odwirowane próbki płukano roztworem 70% etanolu i po raz kolejny wirowano przez 15 min 1450 g w 4 st. C. Po wirowaniu ściągano supernatant i suszono osadzone na

dnie próbówek pelety DNA przez ok. 15 min w ciemności. Osuszone próbki zawieszano w czystym formamidzie.

6.4.12 Rozdział sekwencyjny produktów PCR

Oczyszczone i zawieszone w formamidzie produkty PCR inkubowano minimum 10 min w temp pokojowej w celu dokładnego rozpuszczenia, a następnie poddawano 10 min denaturacji w temp 95 st. C. Denaturowane próbki natychmiast schładzano na lodzie w celu uniknięcia ich ponownej renaturacji. Rozdział sekwencyjny wykonywano przy pomocy aparatu ABI Prism 310 (Applied Biosystems) wyposażonego w 61 cm kapilarę wypełnioną polimerem POP6 (Applied Biosystems). Uzyskane elektroferogramy analizowano za pomocą oprogramowania Sequencing Analysis 3.1.2 software (AppliedBiosystems).

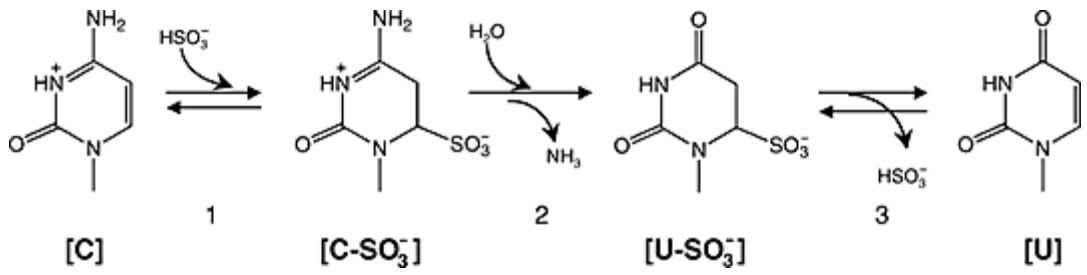
6.4.13 Analiza danych z sekwencjonowania

Uzyskane sekwencje sprawdzano pod kątem jakości rozdziału przy pomocy programu Ridom Trace Edit (Ridom Bioinformatics), a następnie uliniawiano przy pomocy oprogramowania CLC free Workbench 6.5.4. i zestawiano z sekwencja referencyjną o numerze NW_923640. Sekwencja *consensus* z 3 przeanalizowanych klonów została przeszukana pod kątem mutacji punktowych.

6.5 Analiza epigenetyczna promotora MET

6.5.1 Konwersja DNA genomowego przy pomocy wodorosiarczynu sodu.

Aby określić profil metylacji sekwencji genetycznej niezbędna jest modyfikacja chemiczna genomowego DNA za pomocą wodorosiarczynu sodu (SBS, *ang. sodium bisulfite sequencing*). Traktowane tym odczynnikiem DNA wchodzi w reakcję, w wyniku której reszty cytozynowe są konwertowane do reszt uracylowych (Rysunek 9). Reakcja ta nie zachodzi jeśli reszta cytozynowa jest metylowana w pozycji 5 [65].



Rysunek 9 Mechanizm konwersji DNA traktowanego wodorosiarczynem sodu [65].

Konwertowane DNA zawiera zatem 5 różnych par zasad: A, T, G, U, 5m-C, ponadto nie jest już cząsteczką składającą się z dwóch komplementarnych nici. DNA Traktowane wodorosiarczynem sodu jest cząsteczką jednoniciową.

W referowanym projekcie do konwersji genomowego DNA wykorzystano zestaw odczynników EpiTect Bisulfite Kit (QIAGEN). Skład mieszaniny reakcyjnej był następujący:

DNA genomowe	500 ng (w objętości 20µl)
Bufor zawierający wodorosiarczyn sodu	85 µl
Bufor stabilizujący DNA (Protect buffer)	35 µl

Reakcja przebiegała według następującego cyklu:

95 st. C	5 min
60st. C	25 min
95 st. C	5 min
60 st. C	85 min
95 st. C	5 min
60 st. C	175 min

Po zakończeniu cyklu inkubacji próbki oczyszczano za pomocą kolumn silikonowych. Konwertowane DNA przechowywano w -80 st. C w buforze elucyjnym (QIAGEN).

6.5.2 Reakcja PCR na matrycy DNA traktowanego wodorosiarczynem sodu.

W celu amplifikacji fragmentów promotora MET konwertowanych za pomocą SBS korzystano z polimerazy *Taq* (Applied Biosystems / Life Technologies) suplementowanej 2 µl 5% roztworu glicerolu zawierającego 5 mg/ml BSA. W związku z brakiem możliwości określenia stężenia konwertowanego DNA za pomocą spektroskopu UV, do reakcji użyto

eksperymentalnie zoptymalizowaną ilość eluatu - 1 ul przy finalnej objętości próbki 20 µl. Poniżej przedstawiono sekwencje wykorzystanych starterów:

F : 5` - TTTTAGATTGTTTGAGTTGGG - 3`

R : 5' - ACAAACCCCATTCTAATTTC - 3'

Startery projektowano przy pomocy oprogramowania Methyl Primer Express (Applied Biosystems).

Przebieg reakcji PCR był następujący:

Wstępna denaturacja: 96 st. C 10 min

30 cykli:

96s st. C 1 min

58 st. C 2 min

70 st. C 3 min

Końcowa elongacja: 72 st. C 15 min

Rezultaty reakcji sprawdzano za pomocą elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym.

6.5.3 Sekwencjonowanie DNA traktowanego wodorosiarczynem sodu.

Uzyskane produkty PCR oczyszczano i klonowano do wektora pCR 2.1 analogicznie do opisanych wcześniej protokołów. PCR sekwencyjny wykonywano wykorzystując startery M13F i M13R. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodził:

BigDye Terminator MIX 8 µl

starter M13 F/R (5 µM) 0,7 µl

DNA plazmidowe 11,3 µl

Przebieg reakcji był następujący:

Wstępna denaturacja: 96 st. C 1 min

30 cykli:

96 st. C 10 s

50 st. C 4 min

Uzyskane produkty PCR oczyszczano poprzez precypitację etanolem, następnie zawieszano w formamidzie i rozdzielano w aparacie do sekwencjonowania ABI Prism 310 (Applied Biosystems). Surowe dane z aparatu analizowano za pomocą zdalnie dostępnego oprogramowania PeakTrace:Box Basecaller System (Nucleics). Uzyskane sekwencje wstępnie

obrabiano i katalogowano w programie CLC Workbench. Końcowa analiza, połączona z generowaniem diagramów obrazujących wzory metylacji DNA w analizowanych sekwencjach, wykonywana była za pomocą zdalnie dostępnego programu QUMA: quantification tool for methylation analysis (Laboratory for Mammalian Epigenetic Studies, Center for Developmental Biology, RIKEN).

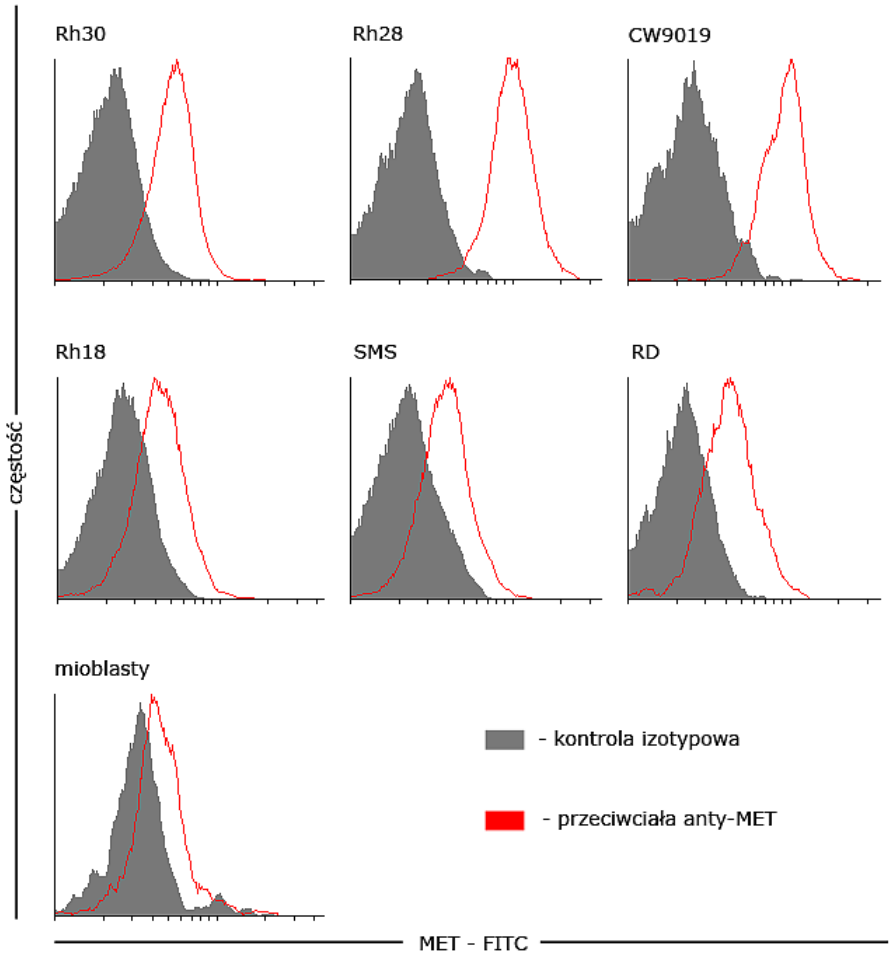
6.6 Analiza statystyczna

Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczna z powtórzeń. Słupki błędów wyznaczano na podstawie wartości odchylenia standardowego (SD).

7 Wyniki

7.1 Ekspresja MET w liniach mięsaka prążkowanokomórkowego

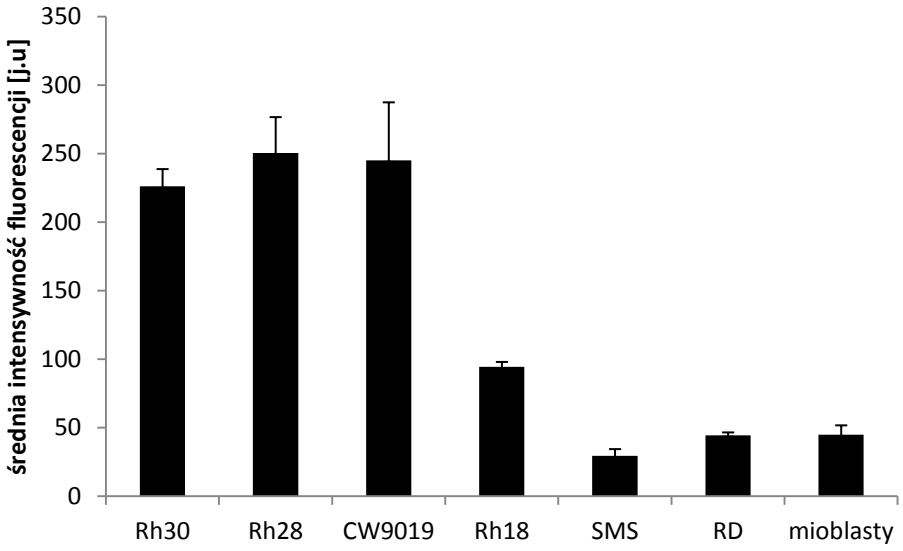
Ekspresję MET w komórkach RMS badano na dwóch płaszczyznach: jako faktyczną ekspresję receptora na powierzchni komórki - za pomocą cytofluorymetrii przepływowej (FACS) oraz jako ilość wyprodukowanego mRNA, przy pomocy real-time PCR. Pomiary wykonano w dwóch powtórzeniach na komórkach będących w ciągłej hodowli. Rezultaty uzyskane dla różnych linii zestawiono w celu porównania z wynikami zdrowych mioblastów, które w przedstawianym toku eksperymentów posłużą jako kontrole.



Rysunek 10 Histogramy przedstawiające wyniki analizy cytofluorymetrycznej.

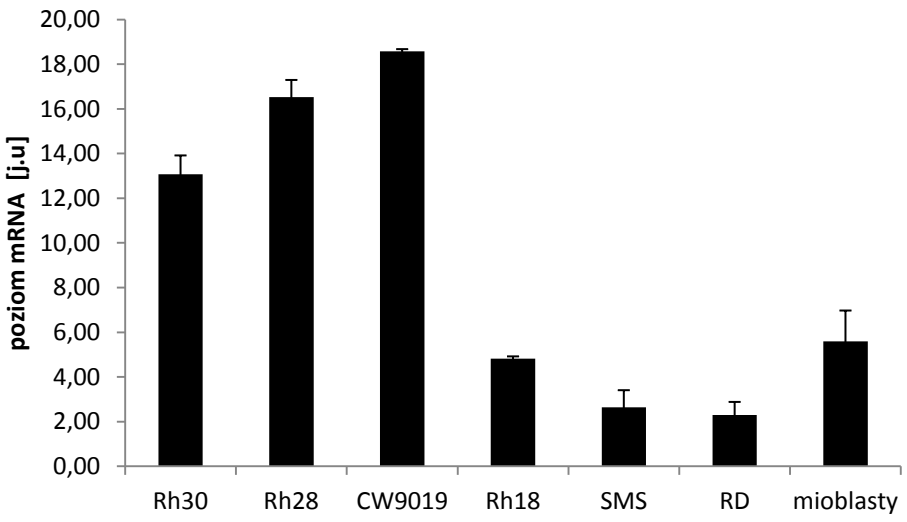
Analiza FACS wykazała ekspresję MET we wszystkich badanych liniach (Rysunek 10). W celu precyzyjnego oznaczenia różnic w ilości prezentowanego receptora na powierzchni komórek, porównano średnią intensywność fluorescencji (MFI) barwionych komórek

(Rysunek 11). Na podstawie uzyskanych danych stwierdzono, iż względem komórek prawidłowych znacząco wyższą ekspresję MET wykazują komórki Rh30, Rh28, CW9019 będące liniami podtypu alweolarnego. W liniach podtypu embrionalnego SMS i RD ustalono podobną ilość receptora jak w mioblastach. Komórki linii Rh18 wykazały pośredni poziom ekspresji MET pomiędzy liniami ARMS a ERMS. Średnia fluorescencja tej linii była ponad 2-krotnie wyższa niż w komórkach prawidłowych, jednakże ponad 2-krotnie niższa niż w komórkach linii podtypu ARMS.



Rysunek 11 Ilościowe porównanie ekspresji MET w liniach RMS.

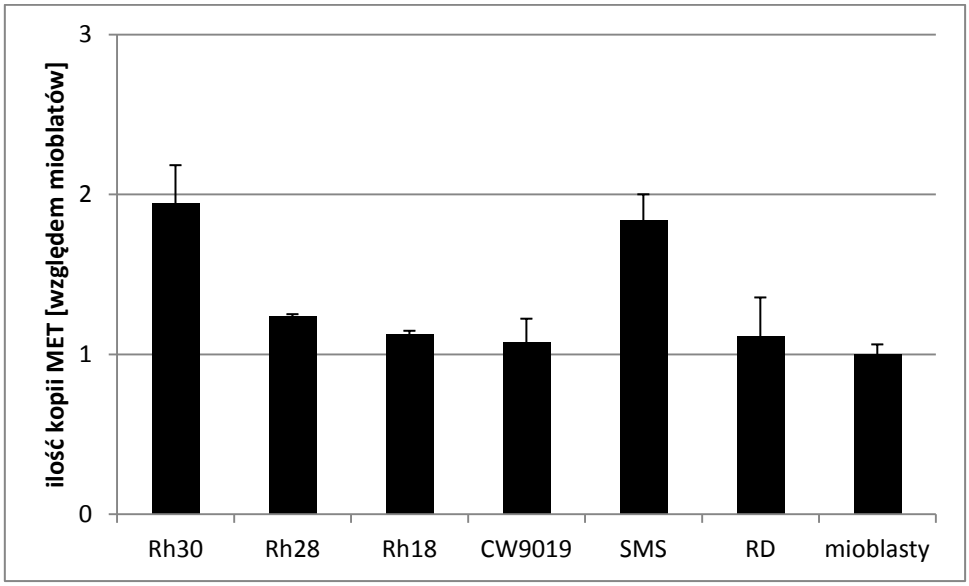
Analiza ilościowa izolowanego z komórek mRNA (Rysunek 12) potwierdziła wyniki uzyskane za pomocą FACS dotyczące różnej ekspresji MET w komórkach podtypu ARMS oraz ERMS. Stwierdzono natomiast różnice pomiędzy liniami danego podtypu. Wśród linii ARMS najwięcej mRNA dla receptora MET wykryto w komórkach CW9019. Dodatkowo linie ERMS wykazały się niższym poziomem mRNA niż komórki prawidłowe. Po raz kolejny komórki linii Rh18 wykazały odrębny charakter prezentując podobny poziom mRNA jak komórki prawidłowe.



Rysunek 12 Ekspresja MET mierzona na płaszczyźnie wykrytego w komórkach mRNA.

7.2 Ilość kopii genu MET

Podwyższona ekspresja genu może być spowodowana zwielokrotnieniem jego kopii w obrębie genomu. Za pomocą real-time PCR, wykorzystując zestaw odczynników TaqMan® Copy Number Assay (Applied Biosystems), zbadano czy w liniach RMS nie występuje multiplikacja genu MET.



Rysunek 13 Analiza ilości kopii genu MET w DNA genomowym komórek RMS.

Badanie przeprowadzono na 4 partiach DNA izolowanego z komórek prawidłowych oraz RMS. Aby możliwie zwiększyć precyzję pomiaru, każdą próbę wykonano w 4 powtórzeniach. Rezultat znormalizowano względem komórek prawidłowych. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono prawdopodobną multiplikację MET w liniach Rh30 oraz SMS.

7.3 Analiza genetyczna promotora MET

Na poziom ekspresji genu mogą wpływać mutacje występujące na obszarze kontrolującego go promotora. W celu wykrycia ewentualnych zmian promotora MET wklonowano go do wektora pCR2.1 a następnie sekwencjonowano. Łącznie wykryto trzy mutacje z czego jedna wystąpiła w czterech z sześciu badanych linii: Rh30, Rh18, SMS i RD. Wspólna mutacja obejmowała substytucję nukleotydową A -> C w pozycji -304 względem miejsca początku transkrypcji. Zamiana to prowadzi do likwidacji sekwencji *consensus* tzw. E-BOX, rozpoznawanego przez czynnik MRF4 (*ang. myogenic regulatory factor*). Kolejne mutacje wystąpiły wyłącznie w komórkach linii Rh28. Pierwsza z nich znajduje sie w pozycji 291, 2bp przed kolejnym E-BOX, jednak analiza *in silico* nie wykazała żadnych konsekwencji tej substytucji. Druga zmienność została wykryta w formie heterozygotyczności, którą można również interpretować jako zmienność populacyjną w badanej puli DNA.

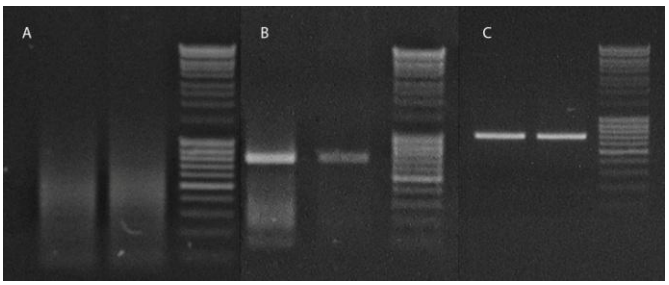
7.4 Analiza zmian metylacji promotora MET.

Metylacja reszt cytozynowych jest jednym z czynników wpływających na aktywność genów. Za pomocą sekwencjonowania DNA traktowanego wodorosiarczynem sodu (BSP - ang. *bisulfite sequencing PCR*) sporządzono mapy epigenetyczne promotora MET dla linii RMS oraz dla komórek prawidłowych.

7.4.1 Optymalizacja BSP

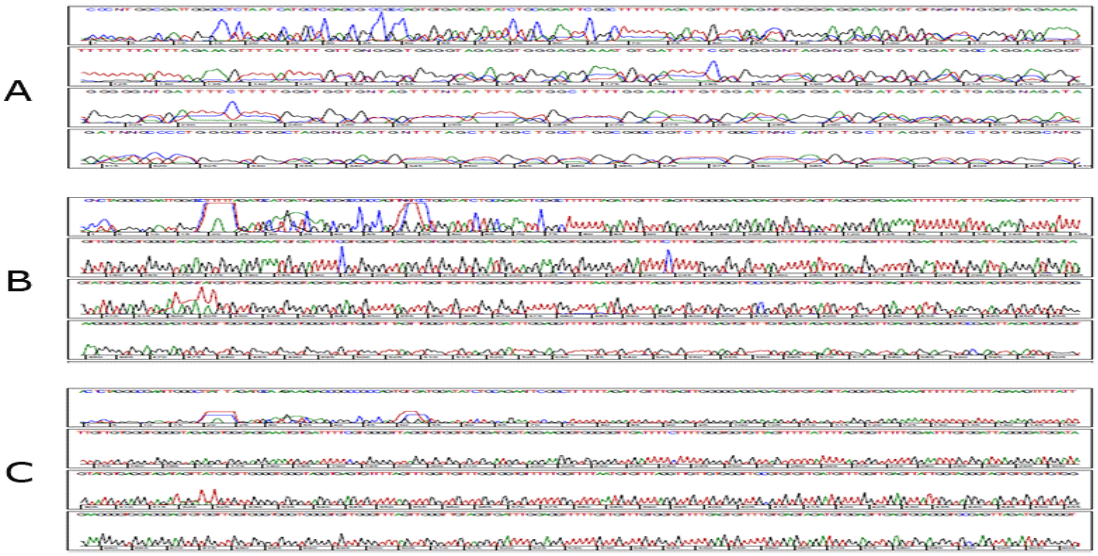
W celu ustalenia wzoru metylacji sekwencji DNA, konieczne jest sekwencjonowanie badanego fragmentu po potraktowaniu jej wodorosiarczynem sodu. Pozyskanie materiału do sekwencjonowania tj. fragmentu konwertowanego DNA wklonowanego do wektora pCR2.1 wymaga przeprowadzenia amplifikacji pożądanego fragmentu DNA za pomocą PCR. Charakter konwertowanej matrycy (wszystkie nie metylowane reszty cytozynowe zostają zamienione na reszty uracylowe) utrudnia pozyskanie specyficznego amplikonu z wydajnością pozwalającą na późniejsza ligację. Korzystając ze standardowego protokołu reakcji PCR dostarczonego przez producenta używanej polimerazy nie uzyskano żadnego produktu (Rysunek 14 A). Dopiero dodatek mieszaniny 5% glicerolu , suplementacja BSA, oraz wydłużenie czasu annealingu oraz elongacji dały rezultat w postaci wyraźnych

produktów (Rysunek 14 B), które ostatecznie wycięte i wyekstrahowane z żelu agarozowego po rozdziale elektroforetycznym umożliwiły skuteczną ligację (Rysunek 14 C).



Rysunek 14 Optymalizacja PCR na matrycy traktowanej wodorosiarczynem sodu

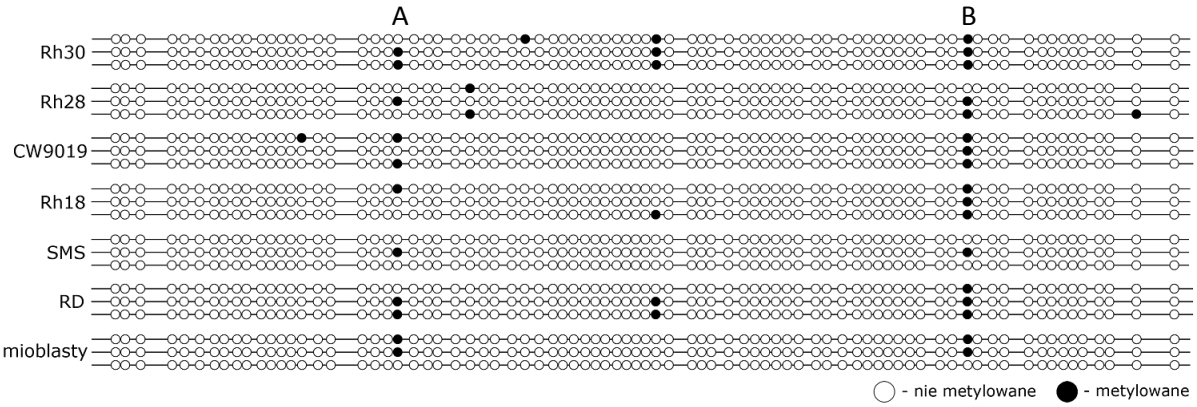
Kolejną napotkaną przeszkodą okazała się sekwencyjna reakcja PCR z wykorzystaniem dideoksy nukleotydów. Początkowe elektroferogramy "urywały sie" po ok. 150 bp, co sugerowało prawdopodobne ześlizgiwanie się polimerazy z matrycy (Rysunek 15 A). W celu rozwiązania tego problemu pominięto krok elongacji ze standardowego programu zalecanego przez producenta zestawu do sekwencjonowania i zastąpiono go 4 min krokiem annealingu: 50 st. C. Dzięki temu uzyskano pełne elektroferogramy, które jednak obarczone były bardzo wysokim poziomem szumu (Rysunek 15 B) co uniemożliwiało jednoznaczny odczyt badanej sekwencji. Rozwiązanie tego problemu przyniosło wykorzystanie, dodatkowego oprogramowania do analizy sygnału z aparatu sekwencjonującego - Peak Trace Online (Nucleics) (Rysunek 15 C).



Rysunek 15 Optymalizacja sekwencjonowania DNA traktowanego wodorosiarczynem sodu. A) Rozdział produktów PCR wykonanego zgodnie z zaleceniami producenta. B)Rozdział produktów po optymalizacji reakcji PCR sekwencyjnego. C) Wynik optymalizacji analizy sygnału z sekwenatora.

7.4.2 Profil metylacji promotora MET w komórkach RMS

Zestawienie profili metylacji promotora MET w komórkach linii RMS hodowanych w pełnym medium DMEM ujawniło obecność dwóch lokalizacji, których metylacja wystąpiła w każdej z badanych linii włącznie z komórkami prawidłowymi (Rysunek 16 A i B). Pierwsza z nich (A) położona jest w -17 zaś druga w 286 względem miejsca startu transkrypcji. Z pomocą analizy *in-silico* udało sie wykryć w promieniu 10 bp od wspomnianych pozycji sekwencje *consensus* dla dwóch rodzajów domen wiążących DNA: GCM (ang. *glial cell missing domain*) w przypadku pozycji -17 oraz domeny o charakterze palca cynkowego - ZF5-POZ w miejscu 286.



Rysunek 16 Zestawienie profili metylacji promotora MET w komórkach linii RMS typu dzikiego.

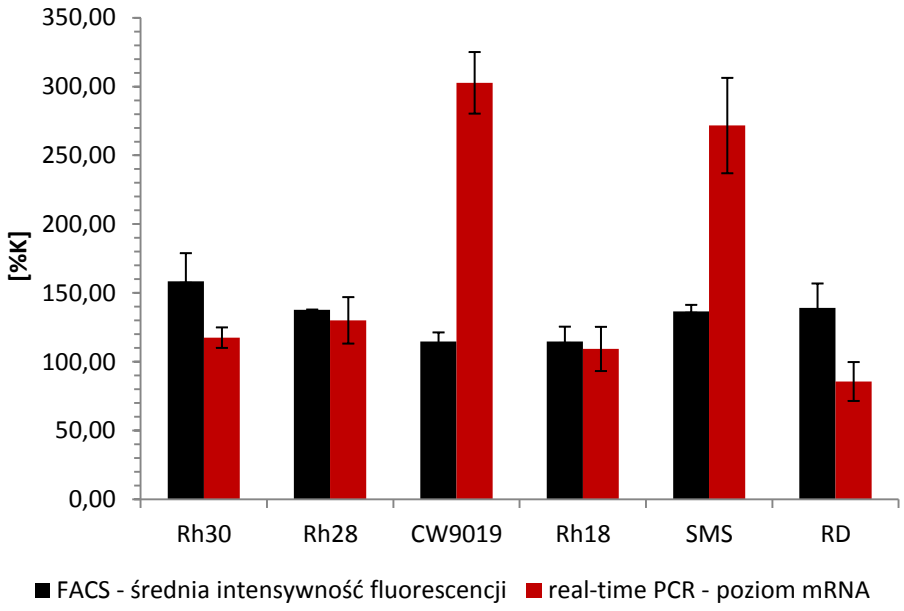
Metylację pozycji 286 wykryto w zdecydowanie większej ilości przebadanych klonów niż w przypadku pozycji -17. Poziom metylacji promotora MET w komórkach linii SMS jest widocznie niższy niż w przypadku innych linii. Metylacja pozycji -17 w komórkach linii Rh18 została wykryta w relatywnie mniejszej liczbie badanych klonów niż w pozycji 286.

7.5 Wpływ czynników wzrostowych na ekspresję MET oraz na wzór metylacji jego promotora w komórkach RMS

Czynniki wzrostowe aktywujące wewnętrzne kaskady sygnałowe w komórce, mogą mieć istotny wpływ na modulację ekspresji genów. W celu sprawdzenia korelacji ekspresji MET z aktywacją innych ścieżek sygnałowych przeprowadzono szereg stymulacji wyciszanych komórek linii RMS. Uzyskane wyniki zestawiono ze stworzonymi mapami metylacji badanej sekwencji promotora MET.

7.5.1 Surowica

W związku z ogromną ilością potencjalnych czynników wzrostowych, mogących mieć wpływ na komórki RMS, postanowiono do stymulacji wykorzystać bydlęcą surowicę, będącą mieszaniną trudnej do określenia, lecz bez wątpienia licznej grupy tych białek.

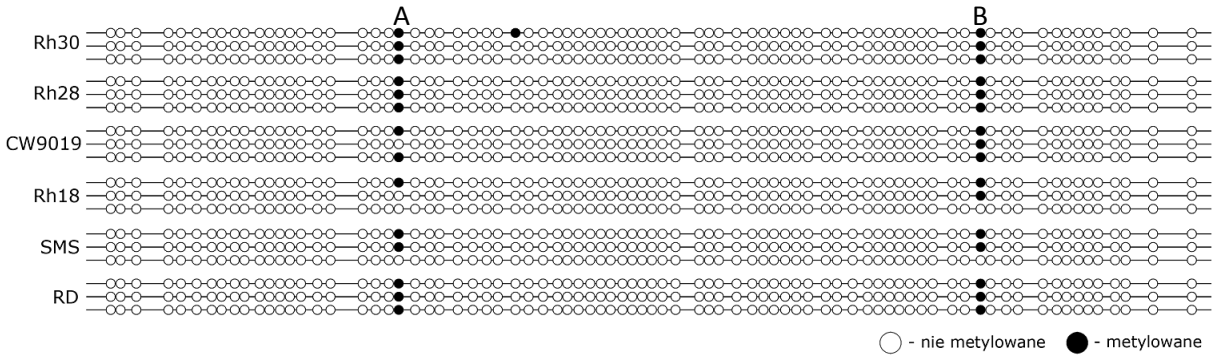


Rysunek 17 Wpływ stymulacji surowicą na ekspresję MET

Efekt symulacji za pomocą FBS mierzono poprzez zmianę ekspresji MET na powierzchni komórek (FACS), oraz poprzez ilościowy pomiar mRNA dla MET w badanych komórkach. Wyniki przedstawiono jako procent ekspresji zmierzony w komórkach kontrolnych, tj. hodowanych w medium DMEM suplementowanym 0,5% BSA.

W przypadku w niemal wszystkich badanych linii stymulacja FBS zaowocowała zwiększoną w podobnym stopniu ekspresją receptora MET na powierzchni komórek.

Wyjątek w badanej grupie stanowiła linia Rh18, która zarówno pod względem wykrytego na powierzchni receptora oraz ilości mRNA zachowała stan zbliżony do komórek kontrolnych. W liniach CW9019 oraz SMS odnotowano najwyższy, prawie 3-krotny wzrost poziomu mRNA (Rysunek 17).

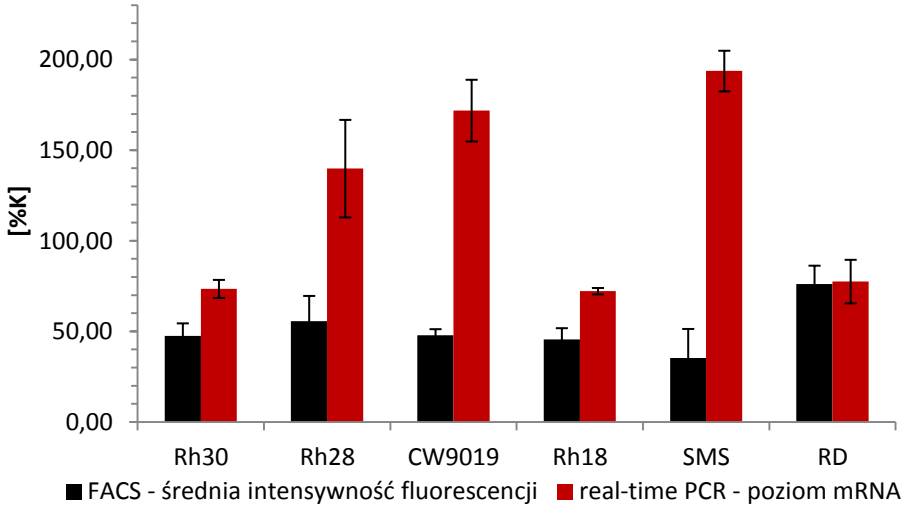


Rysunek 18 Wpływ stymulacji surowicą na metylację promotora MET.

Analiza panelu metylacji promotora MET, nie wykazała wyraźnych zmian. We wszystkich liniach nadal metylowane są pozycje -17 oraz 286. W liniach CW9019, Rh18 oraz SMS wykryto klony ze zdemetylowaną pozycją -17 oraz w przypadku linii Rh18 i SMS klony z całkowicie zdemetylowaną sekwencją promotora.

7.5.2 Czynnik wzrostu hepatocytów (HGF)

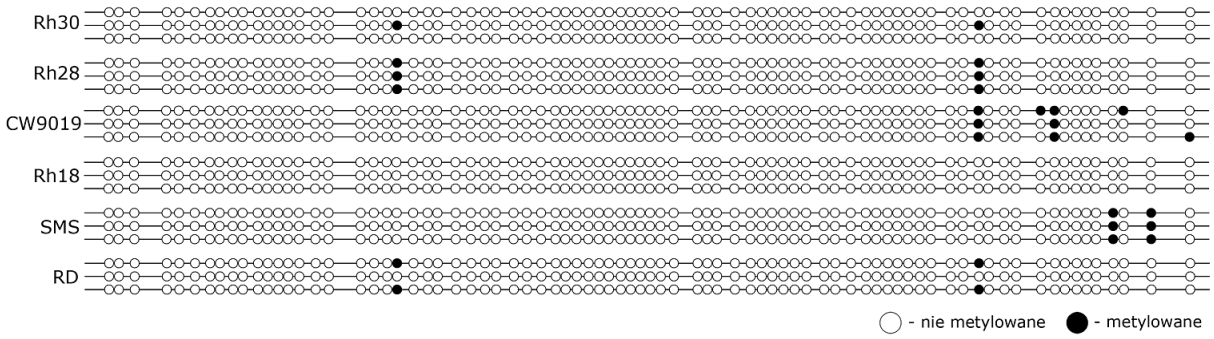
Zmiana ekspresji MET w komórkach linii RMS po stymulacji HGF okazała sie być zaskakująca. We wszystkich badanych komórkach ilość wykrytego na powierzchni receptora spadła o ok. 50% (Rysunek 19). Zbliżony spadek odnotowano też na poziomie mRNA, jednak



Rysunek 19 Wpływ stymulacji HGF na ekspresję MET w komórkach RMS

jedynie w liniach: Rh30, Rh18 i RD. Komórki linii Rh28, CW9019 oraz SMS zareagowały na stymulację czynnikiem wzrostu hepatocytów 150-200% wzrostem poziomu mRNA.

24h inkubacja komórek mięsaka w obecności HGF wpłynęła na zmianę wzoru metylacji promotora MET niektórych podtypów (Rysunek 20). Demetylację zaobserwowano w liniach Rh30 oraz Rh18. Linie RD oraz Rh28 pozostały bez zmiany, natomiast w liniach CW9019 i SMS doszło do zmiany profilu metylacji. W przypadku linii CW9019 demetylacji uległa pozycja -17. Dodatkowo 5-metylo cytozynę wykryto w nowej jak dotąd pozycji 337, będącej miejscem potencjalnie kompatybilnym z szeregiem czynników takich jak: MZF-1 (ang. *myeloid zinc finger factor-1*), czynnik elementu kompleksu preinicjacyjnego polimerazy II B (ang. *RNA polymerase II transcription factor II B*) oraz czynniki z grupy MAZ (ang. *Myc associated zinc fingers*).



Rysunek 20 Wpływ stymulacji HGF na metylację promotora MET w komórkach linii RMS

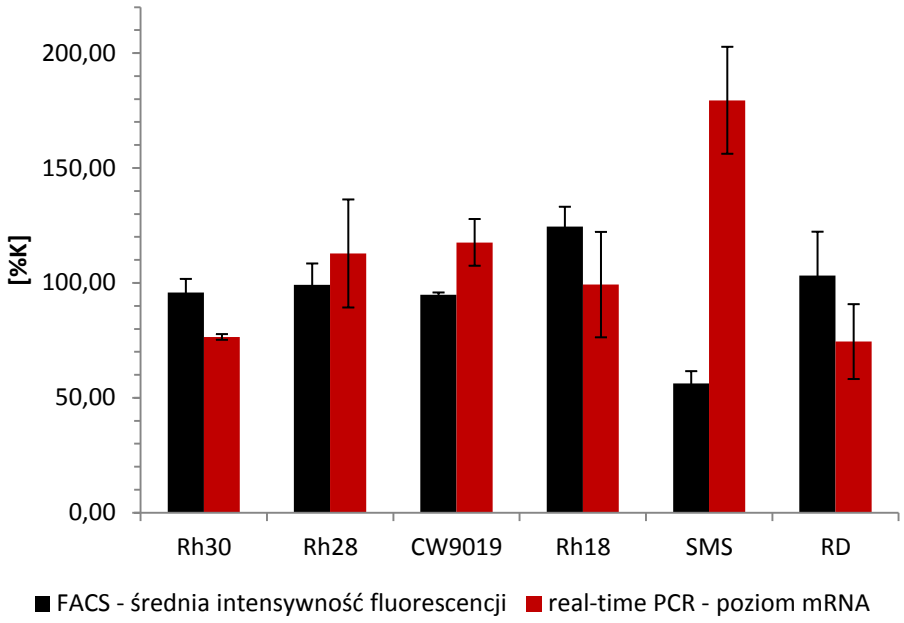
Wyraźnej zmianie uległ też profil metylacji promotora w komórkach linii SMS. Demetylacji uległy pozycje -17 i 286, natomiast metylację wykryto w dwóch innych pozycjach: 361, z którą nie udało się skorelować żadnych czynników transkrypcyjnych, oraz pozycja 393 znajdująca się w regionie rozpoznawanym przez takie czynniki jak białka z grupy PPAR (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor*) oraz NBRE (ang. *nerve growth factor IB response element*).

7.5.3 Czynnik zrębu 1 (SDF-1)

SDF-1 podobnie jak HGF jest czynnikiem wpływającym na ruchliwość komórek RMS. Ponadto wiadomo, że oś HGF/MET stymuluje ekspresję zarówno SDF-1 jak i jego receptora CXCR4 [66].

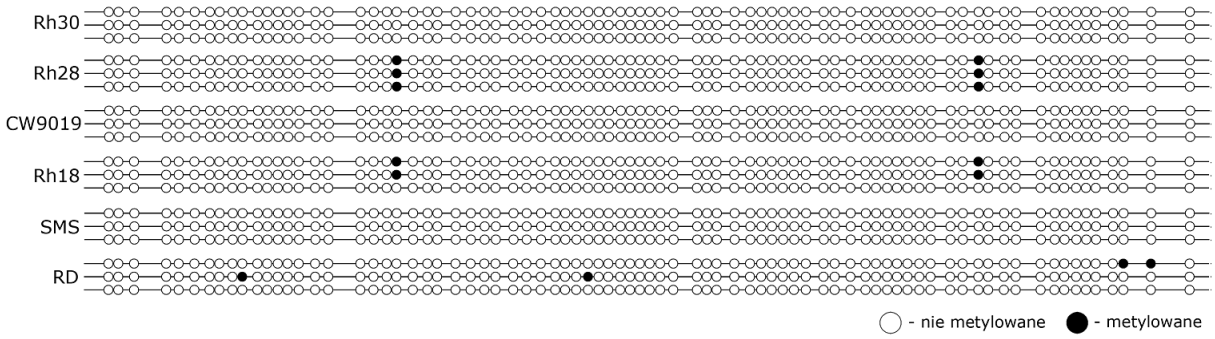
W wyniku aktywacji CXCR4 komórki większości linii RMS (Rh30, Rh28, CW9019 i RD) zachowały zbliżoną do kontroli ilość receptora MET. Odmienną reakcję odnotowano w

przypadku komórek linii Rh18 gdzie odnotowano ok. 20% wzrost ekspresji MET oraz SMS gdzie dał się zauważyć ok 50% spadek ekspresji badanej za pomocą FACS, co ciekawe w wyniku analizy real-time PCR stwierdzono ponad 50% wzrost poziomu mRNA dla MET (Rysunek 21).



Rysunek 21 Wpływ stymulacji SDF-1 na ekspresję MET w komórkach linii RMS

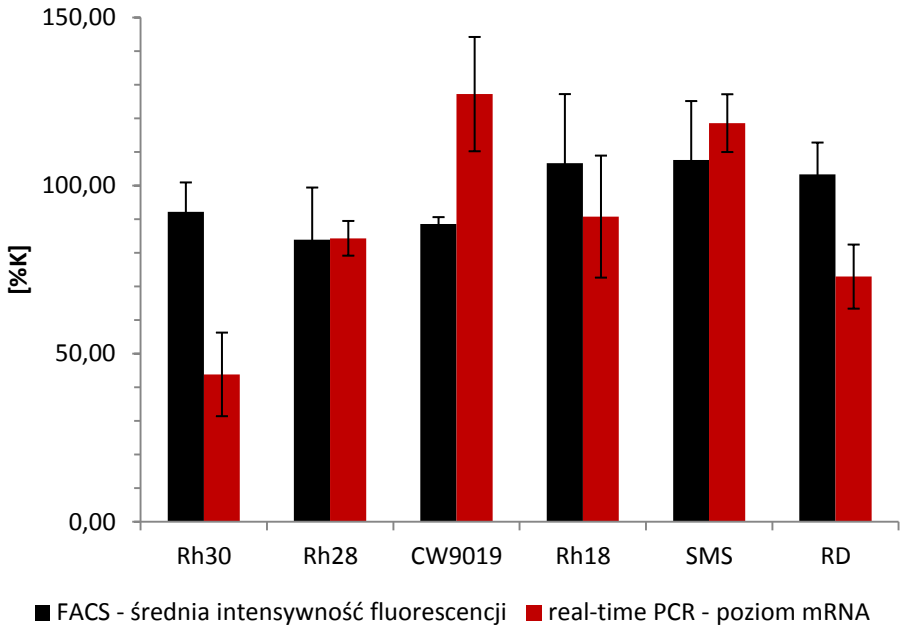
Analizując panel metylacji komórek linii RMS poddanych stymulacji SDF-1, stwierdzono całkowitą demetylację promotora w liniach Rh30, CW9019. Linie Rh28 i Rh18 zachowały status komórek hodowanych w warunkach normalnych. Wynik zaobserwowany w komórkach podtypu RD widoczny w jednym klonie na trzy analizowane, jest najprawdopodobniej artefaktem i powinien być traktowany jako całkowita demetylacja.



Rysunek 22 Wpływ stymulacji SDF-1 na metylację promotora MET w komórkach linii RMS

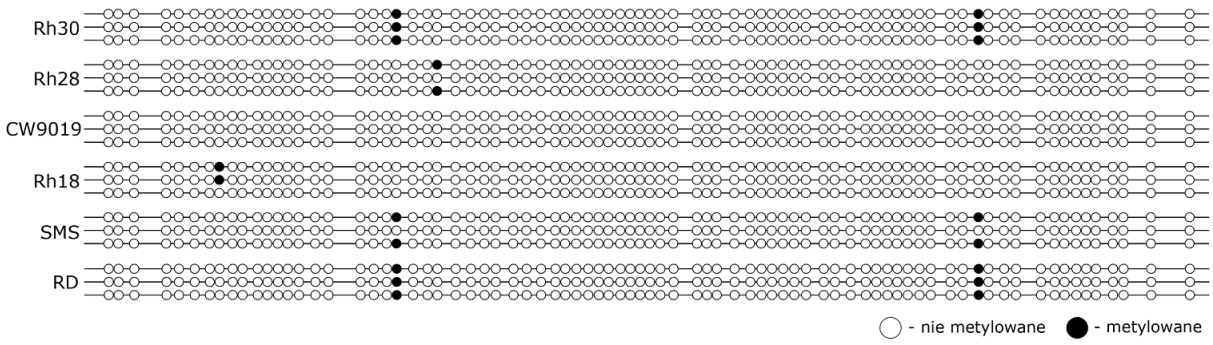
7.5.4 Chemokina CXCL 11 (ITAC)

Ilość MET na powierzchni komórek traktowanych ITAC pozostała bez zmian w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Odchylenia od kontroli zaobserwowano natomiast monitorując poziom mRNA dla MET. Największy spadek ekspresji MET zaobserwowano w komórkach Rh30 (ok 50%). Obniżony poziom mRNA dla MET wykryto również w linii RD. Natomiast linie CW9019 oraz SMS zareagowały ok. 25% wzrostem ekspresji MET na poziomie mRNA (Rysunek 23).



Rysunek 23 Wpływ ITAC na ekspresje MET w komórkach linii RMS

Aktywacja receptora CXCR7 spowodowała całkowitą demetylację promotora MET w komórkach linii CW9019. Zmiany metylacji wykryto w liniach Rh28 oraz Rh18. W pierwszej z wymienionych metylowana jest jedynie pozycja 7 zawarta w sekwencji consensus rozpoznawanej przez czynniki transkrypcyjne związane z kaskada sygnałową białek SMAD. W komórkach linii Rh18 metylację wykryto wyłącznie w pozycji -118 leżącej w bezpośrednim sąsiedztwie miejsca wiązania białek z rodziny Gli. Komórki linii Rh30, SMS i RD zachowały profil metylacji komórek hodowanych w warunkach standardowych.



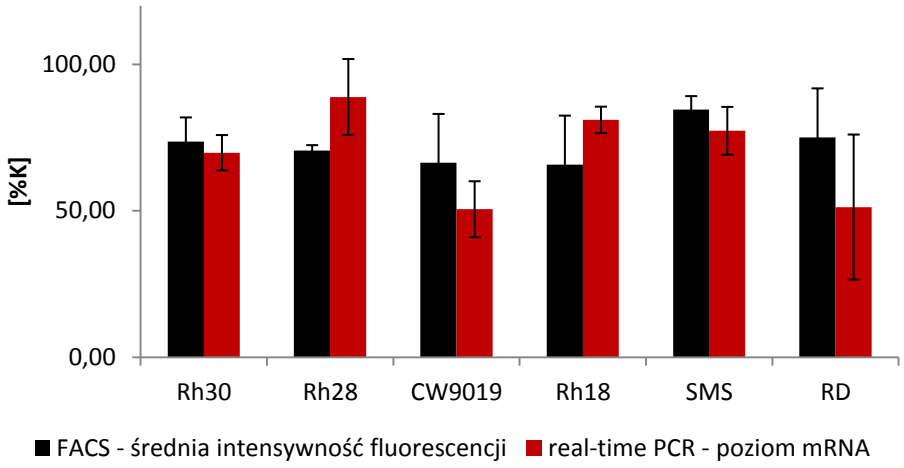
Rysunek 24 Wpływ stymulacji SDF-1 na metylację promotora MET w komórkach linii RMS

7.6 Wpływ stresu komórkowego na ekspresję oraz profil epigenetyczny promotora MET

7.6.1 Wpływ braku czynników wzrostowych, hodowla w medium suplementowanym 0,5% BSA

Niedobór substancji odżywczych oraz czynników wzrostowych może towarzyszyć komórkom nowotworowym znajdującym się w centralnych częściach guza. Często zdarza sie, że tempo wzrostu tkanki nowotworowej jest dużo szybsze niż rozwój sieci naczyń krwionośnych zasilających jej strukturę.

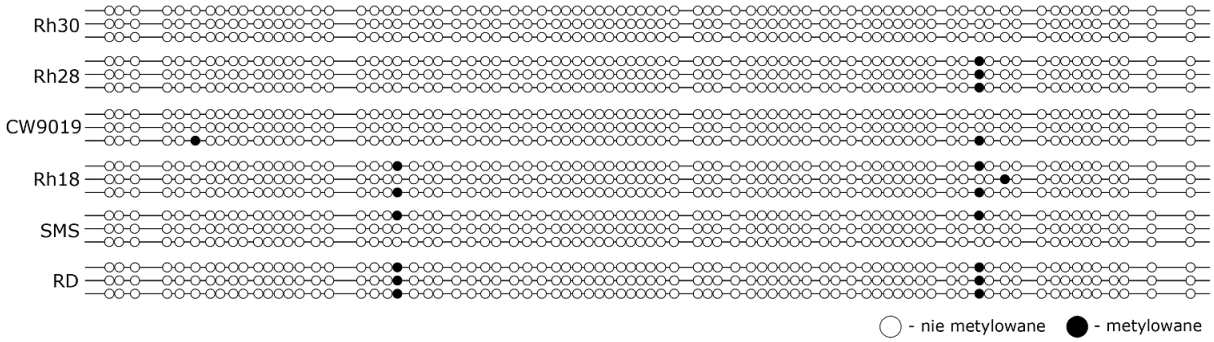
Podobny stres towarzyszył badanym komórkom, które w procesie wyciszania poprzedzającym stymulację hodowane były w medium suplementowanym jedynie 0,5% BSA zamiast 10% FBS.



Rysunek 25 Wpływ niedoboru czynników wzrostowych na ekspresje MET w komórkach linii RMS

Przeprowadzone badania wykazały ok. 20% spadek ekspresji MET na powierzchni wszystkich badanych komórek. Podobne rezultaty przyniosła analiza poziomów mRNA dla MET (Rysunek 25).

Analiza profilu metylacji promotora MET wykazała niemal całkowitą demetylację badanej sekwencji w komórkach linii Rh30, CW9019 oraz SMS (Rysunek 26).

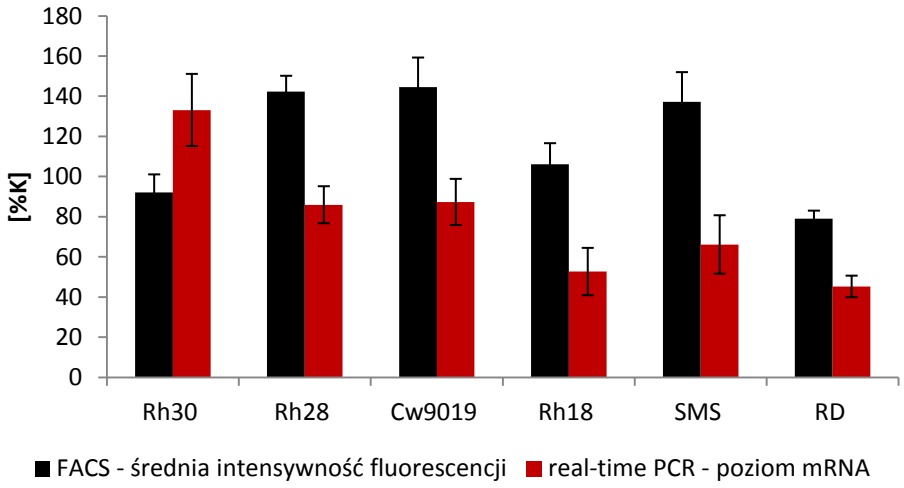


Rysunek 26 Wpływ niedobory czynników wzrostowych na profil metylacji promotora MET w komórkach linii RMS

7.6.2 Wpływ hipoksji, hodowla w warunkach niedoboru tlenowego

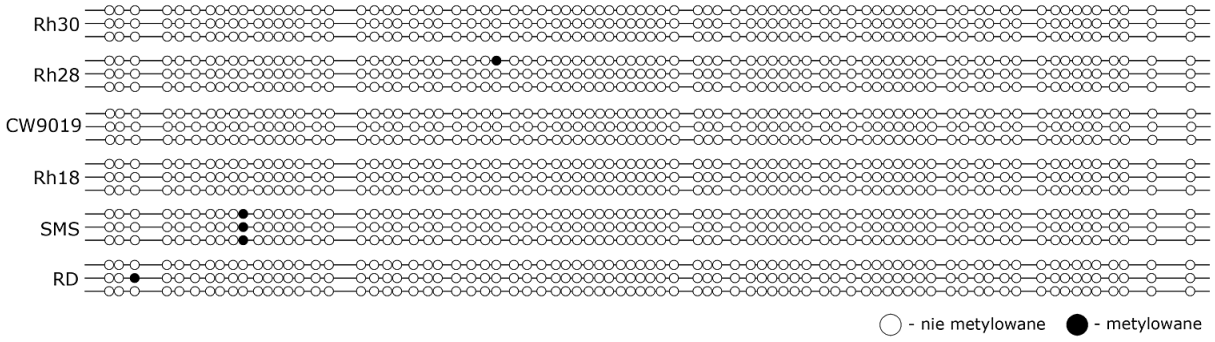
Niedobór tlenu jest czynnikiem stresowym na który eksponowane są komórki zarówno nowotworowe jak i komórki zdrowe. W przypadku komórek nowotworowych istotnym jest wpływ niedotlenienia komórek znajdujących się wewnątrz guza na ich ekspresje genów mogących indukować proces przerzutowania. Do genów takich z pewnością zalicza się MET.

Przeprowadzone badania wykazały ok. 50% wzrost ekspresji MET we wszystkich komórkach linii podtypu pęcherzykowatego. W przypadku komórek Rh30 podniesioną ekspresję wykryto jedynie na poziomie mRNA, natomiast w przypadku komórek linii Rh28 i CW9019 wyłącznie na powierzchni błony komórkowej.



Rysunek 27 Wpływ hipoksji na poziom ekspresji MET w komórkach RMS.

Pośród komórek podtypu embrionalnego ok. 50% spadek ekspresji odnotowano w komórkach linii RD (zarówno na powierzchni komórki jak i na poziomie mRNA), oraz w linii Rh18 (jedynie na poziomie mRNA). Komórki linii SMS zareagowały, podobnie jak komórki podtypu alweolarnego, ok 50% wzrostem ekspresji MET wykrytym jednak tylko na powierzchni błony komórkowej (Rysunek 27).

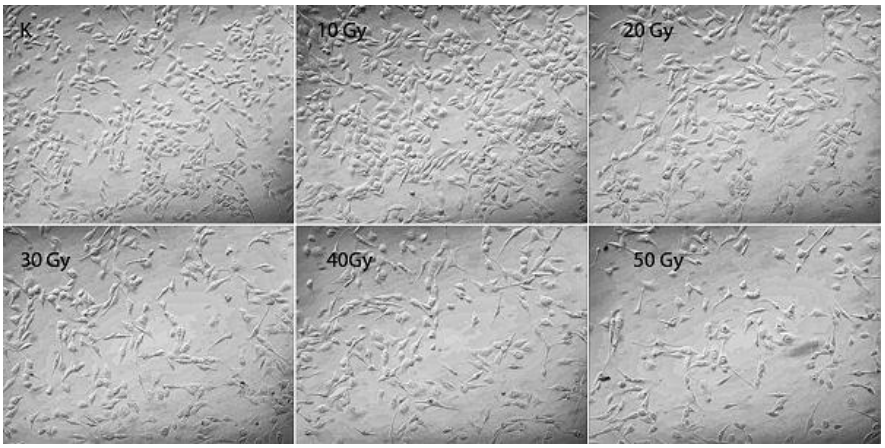


Rysunek 28 Wpływ hipoksji na profil metylacji promotora MET w komórkach RMS

W wyniku ekspozycji komórek RMS na warunki niedoboru tlenowego zaobserwowano całkowitą demetylację sekwencji promotora MET u niemal wszystkich badanych linii. Wyjątkiem była jedynie linia SMS w której doszło do reorganizacji profilu metylacji w wyniku której demetylacji uległy lokalizacje -17 oraz 286, natomiast metylowana została pozycja -109 znajdująca się w bezpośrednim sąsiedztwie sekwencji wiążącej białka z rodziny GLI.

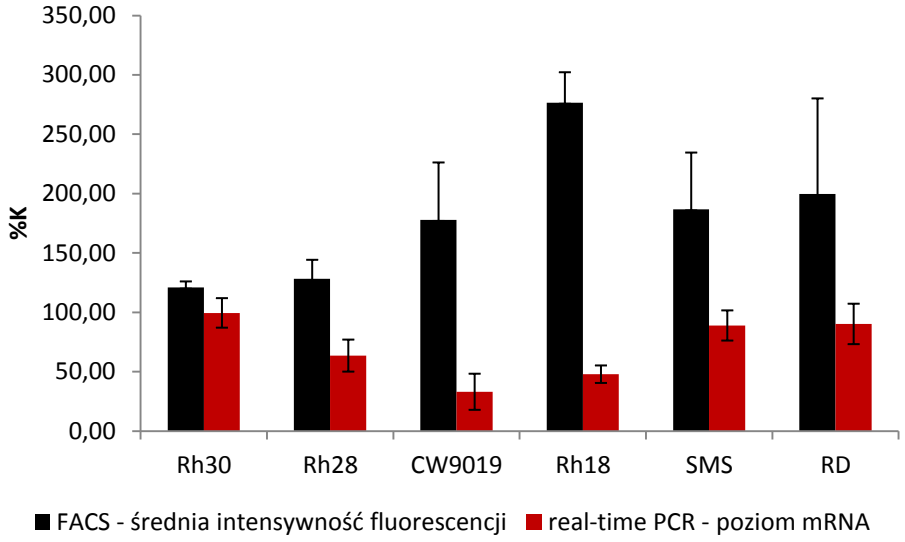
7.6.3 Wpływ promieniowania gamma, hodowla komórek naświetlanych

Naświetlanie promieniowaniem jonizującym jest jednym z podstawowych elementów terapii przeciwnowotworowej, jego wpływ na poziom ekspresji MET w komórkach RMS jest bardzo istotny z klinicznego punktu widzenia.



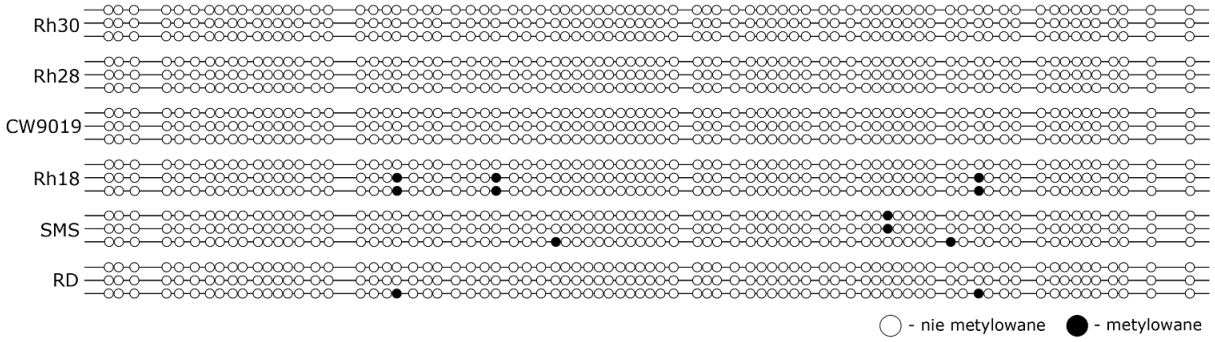
Rysunek 29 Wpływ różnych dawek promieniowania na komórki Rh30

Komórki naświetlano dawką 20 Gy, najniższą mającą wyraźnie hamujący wpływ na wzrost badanych komórek (Rysunek 29). Potraktowane dawką 20 Gy, linie RMS, zareagowały wzrostem ilości cząsteczek MET na swojej powierzchni (Rysunek 30). Procentowo względem komórek kontrolnych wzrost ten był większy w komórkach podtypu embrionalnego: ok 2-krotny w liniach SMS i RD oraz prawie 3 krotny w linii Rh18.



Rysunek 30 Wpływ promieniowania jonizującego na ekspresję MET w komórkach RMS

Wzrost odnotowano również na powierzchni komórek podtypu alweolarnego mniejszy ok 20% na komórkach Rh30 i Rh28 oraz ok 70% na komórkach linii CW9019. Zupełnie inny obraz przedstawiła analiza poziomu mRNA w badanych liniach. W wyniku przeprowadzonych naświetlań produkcja matrycy dla MET spadła o ok 50% lub więcej we wszystkich liniach za wyjątkiem komórek Rh30.



Rysunek 31 Wpływ promieniowania jonizującego na metylację promotora MET w komórkach RMS

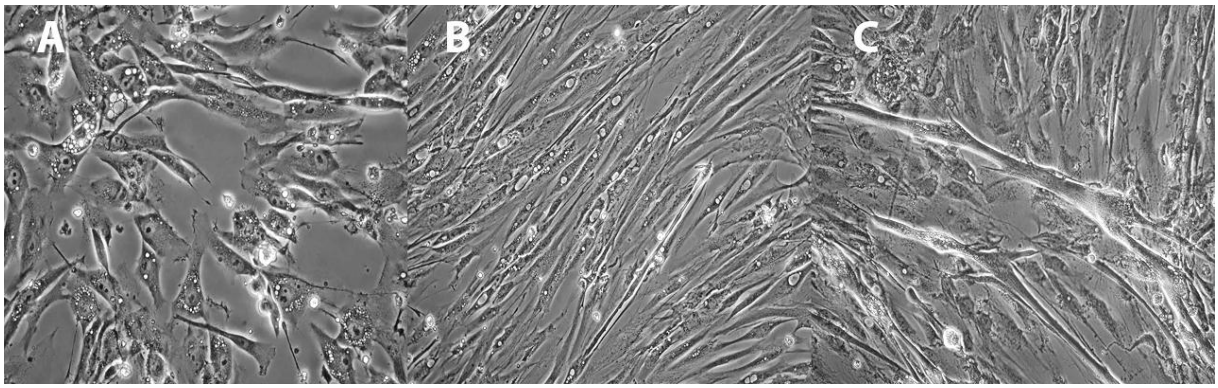
Analiza profilu metylacji wykazała całkowitą demetylację promotora MET w komórkach Rh30, Rh28, CW9019 oraz RD. W linii Rh18 metylację wykryto w opisanych już pozycjach -17 i 286 oraz w pozycji 44 znajdującej się w obrębie motywu rozpoznawanego przez rodzinę białek aktywatorowych E2F. Promotor w linii SMS metylowany był jedynie w pozycji 238 zawierającej motyw rozpoznawany przez białko GCF, będące czynnikiem represyjnym promotora genu receptora EGF (ang. *epidermal growth factor*).

7.7 Wpływ różnicowania na poziom ekspresji MET

Wiele komórek różnego rodzaju linii nowotworowych zachowuje pewien potencjał do różnicowania, które w konsekwencji może ograniczać ich zdolność do dalszego wzrostu oraz przerzutowania [67]. Od lat prowadzone są próby mające na celu wykorzystanie tej własności w celach terapeutycznych. Badania nad różnicowaniem komórek RMS wykazały szereg zamian w ekspresji genów prowadzących min. do rozwinięcia miotubularnych struktur oraz zmiany morfologii komórek. Zmienione komórki charakteryzuje znikoma mobilność oraz brak zdolności do proliferacji.

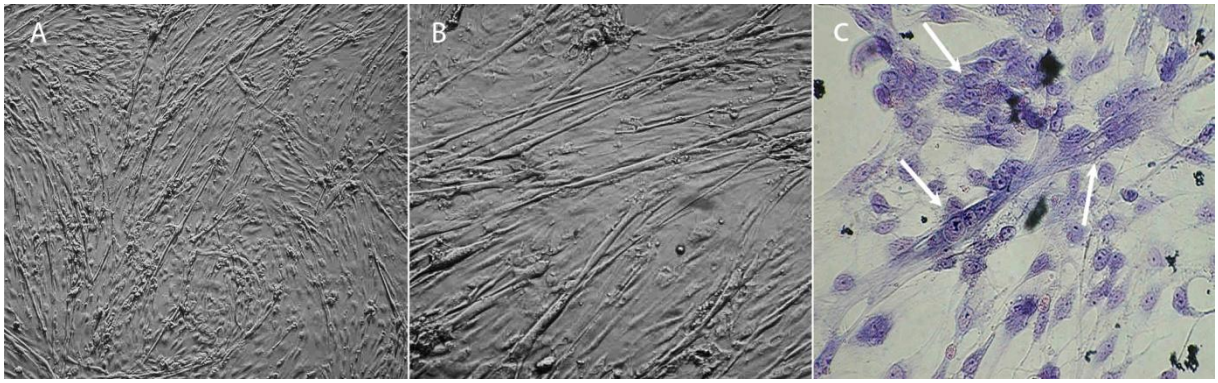
7.7.1 Różnicowanie mioblastów

W celu zbadania przebiegu różnicowania w komórkach prawidłowych, pobrane od pacjentów mioblasty (Rysunek 32 A), hodowano przez 10 dni w medium DMEM suplementowanym 2% końską surowicą oraz TPA. Po 5-ciu dniach, badane komórki, zmieniły swoją wzajemną orientację na równoległą oraz morfologię (Rysunek 32 B) wydłużając się. W ciągu kolejnych 5-ciu dni zaobserwowano sarkomeryczne struktury powstające w wyniku zlewania się pojedynczych komórek (Rysunek 32 C).



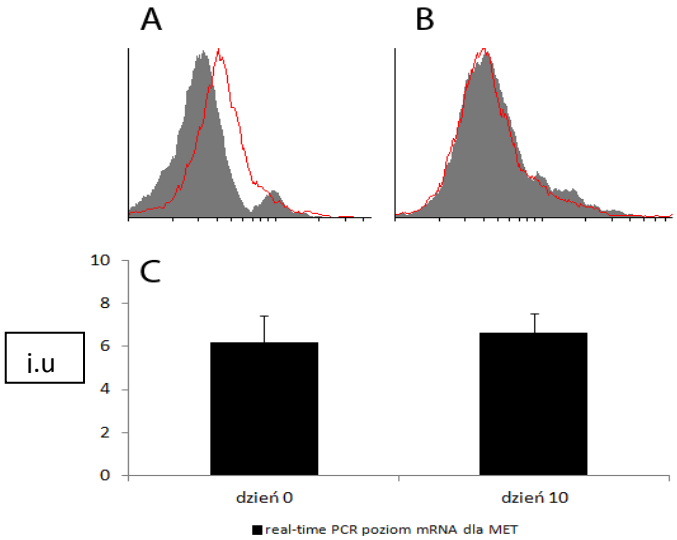
Rysunek 32 Zmiana morfologii mioblastów pod wpływem medium różnicującego

Obserwując cały obszar hodowli stwierdzono, iż proces różnicowania zachodzi w większości badanej populacji. Sarkomeryczne struktury można obecne były na całej powierzchni naczynia hodowlanego (Rysunek 33 B). Wybarwienie badanych komórek za pomocą eozyny pozwoliło zaobserwować akumulację jąder komórkowych w powstających syncytiach (Rysunek 33 C).

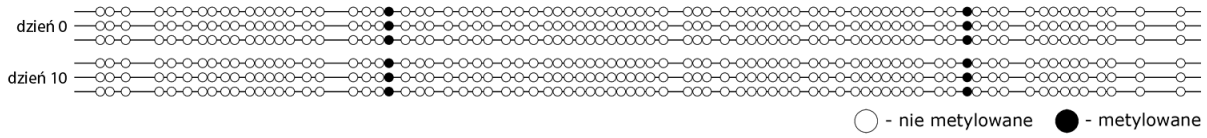


Rysunek 33 Wpływ różnicowania na mioblasty. A) Komórki nie różnicowane B) Komórki z 10-tego dnia różnicowania. C) Różnicowane mioblasty barwione eozyną. Strzałkami oznaczono wielojądrzaste struktury sarkomeryczne.

Badanie różnicowanych komórek za pomocą cytometrii przepływowej wykazało spadek ekspresji MET na ich powierzchni w porównaniu z komórkami nie różnicowanymi (Rysunek 34 A, B). Analiza poziomu mRNA (Rysunek 34 C), oraz analiza epigenetyczna statusu metylacji promotora (Rysunek 35) genu MET nie wykazały żadnych zmian w następstwie różnicowania.



Rysunek 34 Wpływ różnicowania na ekspresję MET w mioblastach. Ekspresja powierzchniowa, detekcja za pomocą cytometrii przepływowej. A) Komórki nie różnicowane. B) komórki różnicowane. C) Analiza poziomu mRNA w badanych komórkach.

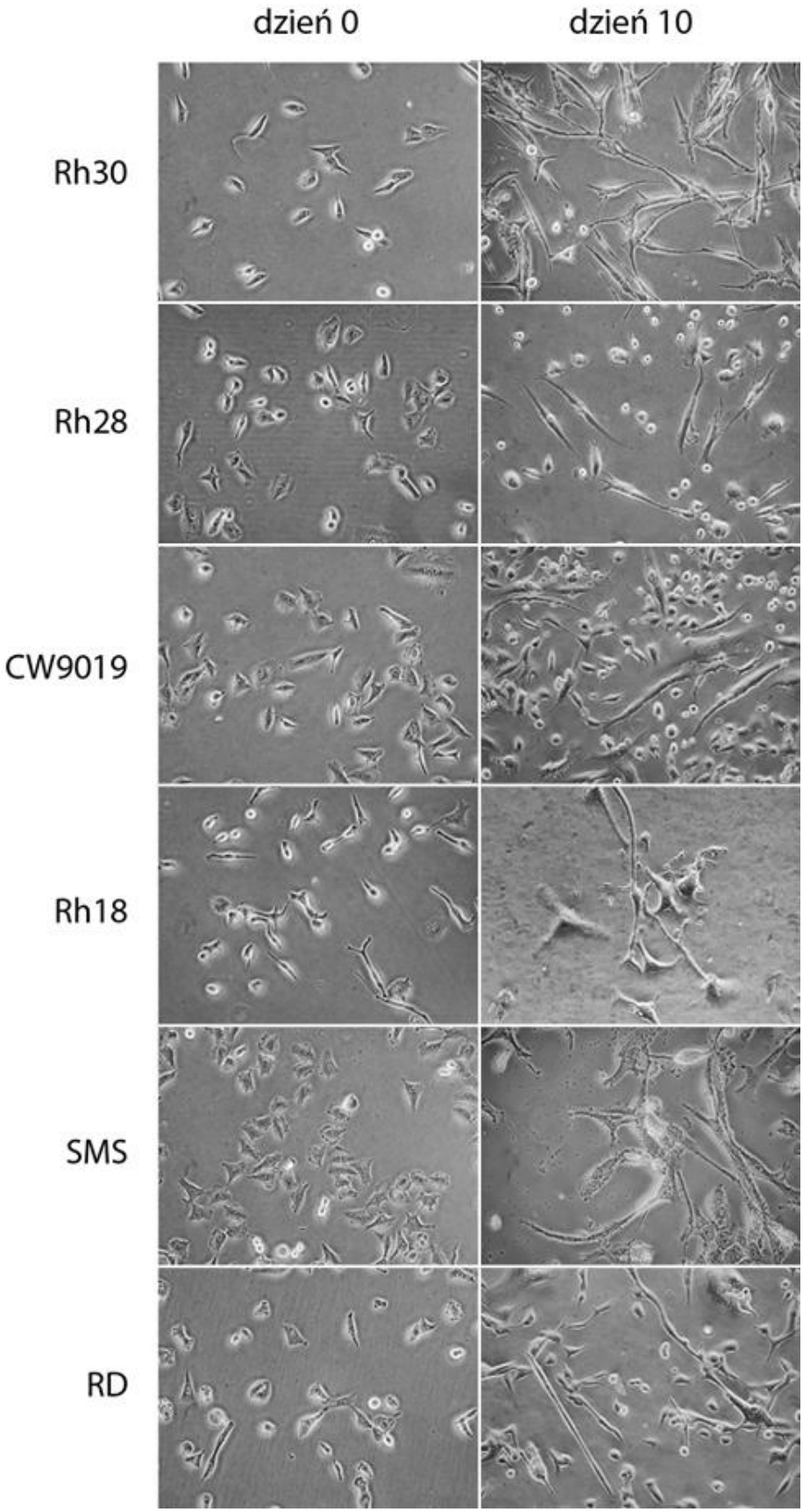


Rysunek 35 Wpływ różnicowania na metylację promotora MET w mioblastach.

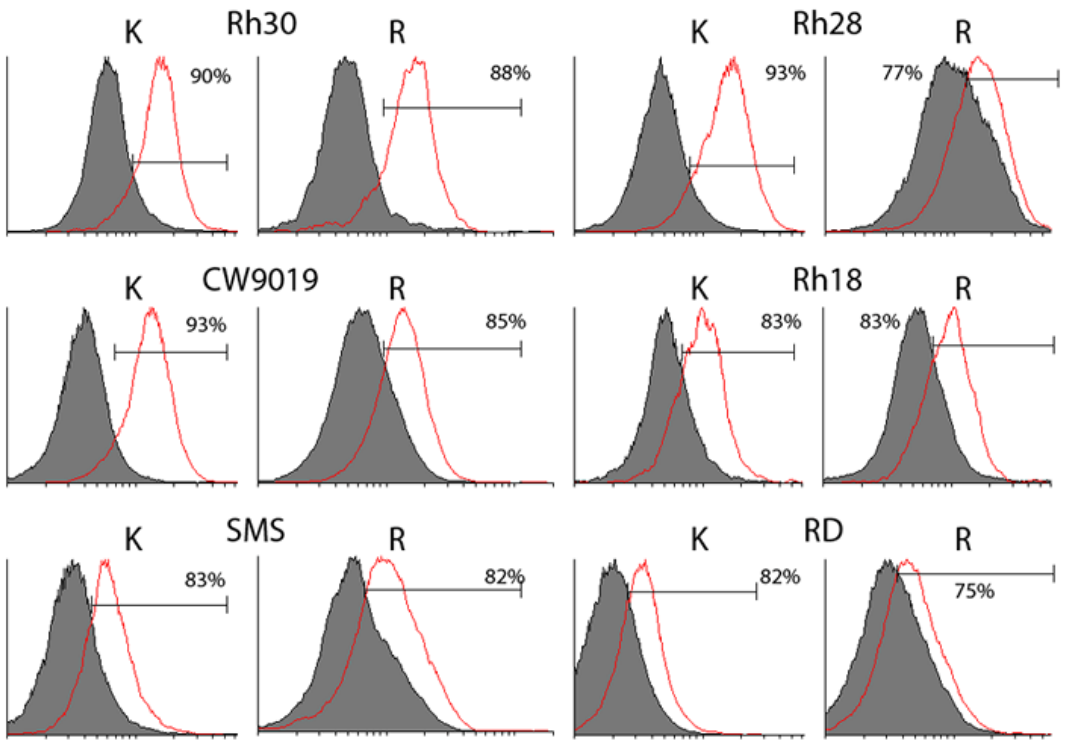
7.7.2 Różnicowanie komórek mięsaka prążkowanokomórkowego.

Komórki linii RMS pod wpływem medium różnicującego, zmieniły swoją morfologię z wrzecionowatej na bardziej wydłużoną (Rysunek 36). W porównaniu z mioblastami, linie RMS różnicowały w znacznie mniejszym stopniu. Po upływie 10 dni, w warstwie komórek wciąż można było zauważyć komórki nie zróżnicowane. Rzadziej też, niż w przypadku mioblastów, dochodziło do zlewania się komórek. Analiza FACS wykazała widoczny spadek ekspresji receptora HGF na powierzchni komórek linii Rh28, CW9019 oraz RD (Rysunek 37).

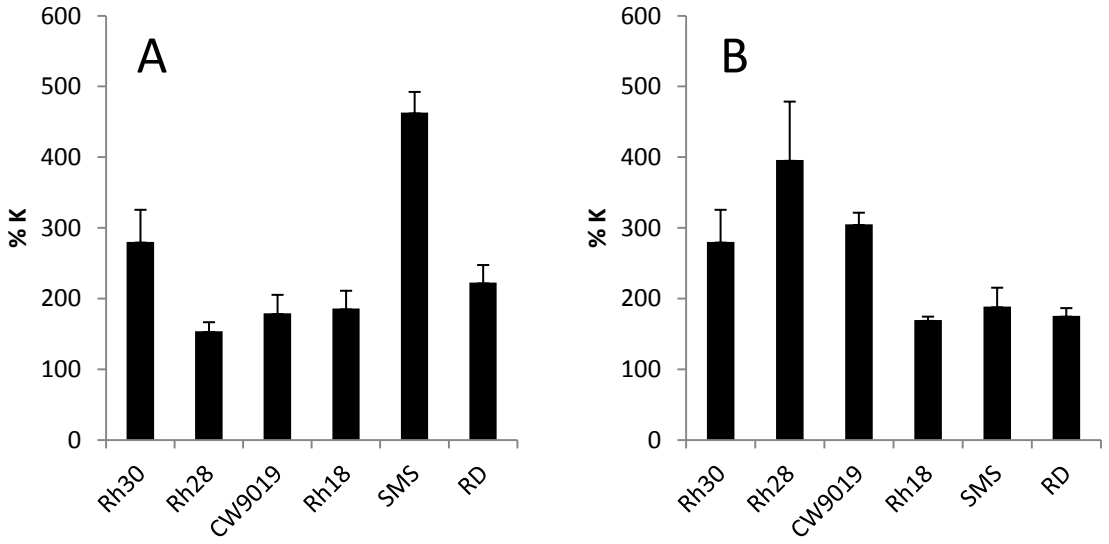
Przeciwny wynik dała analiza ekspresji MET na poziomie mRNA, która wykazała znaczy wzrost ekspresji we wszystkich badanych liniach (Rysunek 38). Ponieważ w skład medium różnicującego wchodzi TPA, który według dostępnych publikacji jest silnym aktywatorem promotora MET [68], przeprowadzono 24h stymulację badanych komórek mającą wykazać wpływ obecności TPA na ekspresję receptora MET. Na podstawie uzyskanych wyników ustalono, iż obecność TPA w medium hodowlanym powoduje niemal 3-krotny wzrost ekspresji MET w komórkach podtypu alweolarnego oraz ok. 2-krotny wzrost w komórkach podtypu embrionalnego (Rysunek 38 B). Na podstawie analizy profilu metylacji promotora MET różnicowanych komórek mięsaka prążkowanokomórkowego, stwierdzono metylację pozycji -17 we wszystkich badanych liniach za wyjątkiem linii SMS, oraz metylację pozycji 283 w komórkach każdej różnicowanej linii (Rysunek 39).



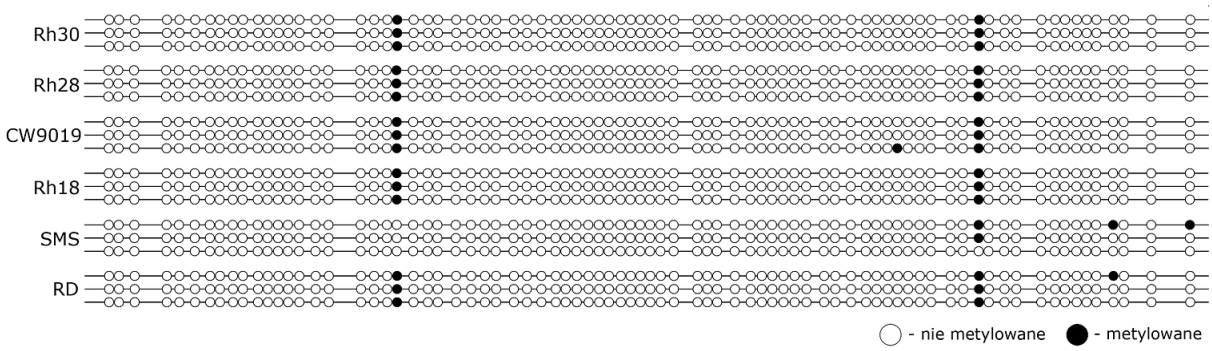
Rysunek 36 Wpływ różnicowania na morfologię komórek RMS



Rysunek 37 Wpływ różnicowania na ekspresję receptora MET na powierzchni komórek RMS. Kolor szary - kontrola izotypowa. Kolor czerwony - przeciwciało anty-MET. K - komórki kontrolne. R - komórki różnicowane.



Rysunek 38 A) Wpływ różnicowania na ekspresję MET na poziomie mRNA. B) Wpływ TPA na ekspresję mRNA genu MET.



Rysunek 39 Wpływ różnicowania na profil metylacji promotora MET w komórkach RMS

8 Dyskusja

8.1 Ekspresja MET w komórkach mięsaka prążkowanokomórkowego i w mioblastach

Przeprowadzone badania wykazały, że zgodnie z danymi literaturowymi komórki linii RMS oraz prawidłowe mioblasty, wykazują ekspresję MET na poziomie mRNA i białka. Poziom tej ekspresji pokrywa się z obecnie obowiązującą klasyfikacją podtypów, wg. której ekspresja receptora MET w komórkach ARMS jest istotnie wyższa od ekspresji komórek ERMS [69]. Zaobserwowane różnice w aktywności genu MET w badanych liniach pozwalają na korelację poziomu ekspresji MET ze złośliwością nowotworów przynależących do poszczególnych linii. W dostępnej literaturze guzy, w których wykryto komórki ARMS, definiuje się jako gorzej rokujące oraz mniej wrażliwe na dostępne metody terapeutyczne. Sytuacja jest odwrotna w przypadku komórek podtypu embrionalnego, które pod kątem ekspresji MET są podobne do komórek prawidłowych [1].

W świetle uzyskanych wyników stwierdzono, iż w normalnych warunkach hodowlanych poziom ekspresji MET na powierzchni komórek, zarówno nowotworowych jak i prawidłowych, jest proporcjonalny do poziomu wyizolowanego z nich mRNA. Pozwala to uważać, iż podstawowe mechanizmy regulujące ekspresję MET na powierzchni komórek, mają swoje źródło na poziomie regulacji transkrypcji.

8.2 Wpływ ilości kopii genu na ekspresję MET

Badanie ilości kopii genu jest procesem obarczonym bardzo dużym błędem metodycznym. Przeprowadzone badania oparto o metodę ilościowego PCR w czasie rzeczywistym, pozwalającą na relatywne ustalenie różnic ilościowych genu badanego względem genu referencyjnego. Wykorzystany zestaw odczynników został zaprojektowany i udostępniony komercyjnie przez firmę Applied Biosystems - Life Technologies, jednak jest obecny na rynku stosunkowo niedługo, co dopuszcza możliwość uzyskiwania mylnych wyników. Uzyskane wyniki nie pokrywają się z ustalonymi poziomami ekspresji MET. Linie, w których wykryto prawdopodobną multiplikacje MET, to linia Rh30, należąca do podtypu alweolarnego, a co za tym idzie charakteryzująca się znaczną ekspresja receptora MET oraz linia SMS będąca linią podtypu embrionalnego. Zważywszy na dynamikę genetyczną linii nowotworowych znajdujących się w ciągłej hodowli *in vitro* można przypuścić, iż uzyskany

rezultat jest wynikiem interferencji na wskutek obecności jakiegoś pseudogenu, który choć nie aktywny transkrypcyjnie, daje się wykryć jako dodatkowa kopia MET. Przyjmując takie założenie można podejrzewać, iż ilość kopii genu MET w genomie badanych komórek jest taka sama, natomiast ilość wykrywanego mRNA i w konsekwencji ekspresja MET na powierzchni błony komórkowej, zależna jest od aktywności mechanizmów kontrolnych związanych z sekwencją promotora, mechanizmów potranskrypcyjnych lub postranslacyjnych.

8.3 Mutacje punktowe w sekwencji promotora MET

Substytucja nukleotydowa wykryta w pozycji -304, może mieć istotne znaczenie w procesie transformacji nowotworowej komórek mięsaka prążkowanokomórkowego. Zmutowany fragment promotora zawarty jest w sekwencji E-BOX (*ang. enchancer box*), której ogólną postać można zapisać w następujący sposób: 3'-C**A**NNTG-5', gdzie N oznacza dowolne nukleotydy [70]. Forma tej sekwencji (3'-CATCTG-5'), która uległa mutacji w badanych liniach jest sekwencją *consensus* dla białka MRF4/ Myf6 (*ang. myogenic regulatory factor/myogenic factor*) [71]. W literaturze czynnik ten opisywany jest jako jeden z grupy czynników MyoD aktywujących szlaki sygnałowe prowadzące do różnicowania miogenicznego [72]. Choć nazwa *enchancer box* sugeruje upregulacyjny charakter tego elementu, może on pełnić również funkcje represora. Wykryta substytucja, A -> C, powoduje zmianę jednej z czterech podstawowych par zasad rdzenia opisywanej sekwencji tworząc 3'-CCTCTG-5'. Wprowadzona modyfikacja może mieć znaczący wpływ na rolę jaką pełni ten element regulatorowy w modulacji aktywności promotora MET.

Druga mutacja wykryta wyłącznie w komórkach linii Rh28 ulokowana jest w odległości 2 bp od drugiego E-BOX, z trzech wykrytych w promieniu 1000 bp od miejsca początku transkrypcji. Choć substytucja ta nie ingeruje bezpośrednio w strukturę powyższej sekwencji, nie można wykluczyć jej wpływu na poziom ekspresji receptora MET.

8.4 Analiza profilu metylacji promotora MET w komórkach prawidłowych i nowotworowych

8.4.1 Profil metylacji komórek hodowanych w warunkach standardowych

Badania metylacji promotora genu MET, przeprowadzone na komórkach znajdujących się w ciągłej hodowli, wyłoniły trzy pozycje, które metylowane były w każdej analizowanej grupie. Pierwsza ulokowana -17 bp względem miejsca startu transkrypcji związana jest z sekwencją homologiczną dla sekwencji *consensus* rozpoznawanej przez czynniki GCM (*ang. glial cell missing domain*) należące do grupy białek aktywatorowych biorących udział w procesie rozwoju tkanki glejowej [73]. Lokacja ta metylowana jest w liniach Rh30, CW9019, RD oraz w mioblastach, w związku z czym trudno powiązać ją z poziomem aktywności badanego promotora. Kolejny metylowany dinukleotyd CpG ulokowany jest w pozycji 286 i wchodzi w skład sekwencji charakterystycznej dla domen typu palca cynkowego ZF5, spotykanych w czynnikach regulatorowych, mogących działać zarówno jako aktywatory jak i represory [74]. Pozycja ta metylowana jest we wszystkich badanych liniach za wyjątkiem komórek SMS, w związku z czym jej rola w modulacji podstawowej ekspresji MET jest również wątpliwa. Jedyną pozycją, której obecność można powiązać z modulacją aktywności promotora MET, jest pozycja 113 zawarta w *consensusie* wspomnianych domen ZF5. Lokacja ta metylowana jest jedynie w komórkach Rh30 oraz RD. W przypadku komórek Rh30 jest to istotne ze względu na to, iż wykazują one najniższą ekspresję MET z badanych linii podtypu alweolarnego. W świetle powyższego można przypuścić, iż region ten mogły być związany z aktywnością ewentualnego *enhancera* transkrypcji, którego powinowactwo do DNA malałoby wraz z metylacją rozpoznawanej przezeń sekwencji. Za powyższą hipotezą przemawia również fakt, iż poziom mRNA dla MET, mierzony w komórkach RD, jest również najniższy pośród badanych komórek podtypu embrionalnego, a nawet niższy niż w komórkach prawidłowych.

8.4.2 Wpływ czynników zewnętrznych na profil metylacji promotora MET

Profil metylacji promotora MET w komórkach RMS zmienia się w wyniku stymulacji czynnikami zewnętrznymi. Zmiany te jednak trudno skorelować z konkretnym wpływem na poziom ekspresji receptora MET. Pozyskanie takich informacji wymagałoby dokładniejszych badań, a założeniem tego projektu było stwierdzenie istnienia profilu metylacji w obrębie promotora MET oraz określenie jego stabilności pod wpływem ingerencji zewnętrznej.

Nie wykryto charakterystycznych różnic pomiędzy profilami metylacji linii alweolarnych i embrionalnych, co świadczy o tym, iż odmienne poziomy ekspresji MET różniące te linie mają swoje źródło w innych mechanizmach molekularnych.

Najwidoczniejszy wpływ na metylację promotora MET można było zauważyć podczas analizy profilów danych z komórek poddawanych warunkom stresowym. Demetylacja sekwencji promotorowych innych genów pod wpływem stresu komórkowego jest zjawiskiem dobrze opisanym. W związku z towarzyszącym stresowi komórkowemu wzrostem ekspresji MET można przypuszczać istnienie związku tego wzrostu z procesem demetylacji. Zgodnie z cytowanymi uprzednio publikacjami regiony nazywane wyspami CpG, do których można zaliczyć promotor MET, otoczone są sekwencjami o znacznie mniejszym zagęszczeniu dinukleotydów CpG, które okazały się mieć istotny wpływ na modulację aktywności sąsiadujących z nimi promotorów. Sekwencje te również podlegają kontroli epigenetycznej poprzez metylację. Przeprowadzone analizy *in silico* wykazały obecność takich sekwencji w odległości ok -1800 bp od miejsca początku transkrypcji MET. Jest bardzo prawdopodobne, że jednym z mechanizmów modulujących poziom ekspresji genu tego receptora jest zmienność epigenetyczna tych właśnie sekwencji.

8.5 Zmiana ekspresji MET pod wpływem czynników zewnętrznych

8.5.1 Czynniki wzrostowe

Reakcje poszczególnych linii badanych komórek na czynniki wzrostowe były zróżnicowane poza dwoma wyjątkami. Pierwszym podczas stymulacji surowicą, która spowodowała upregulację MET we wszystkich badanych liniach. Oraz drugim, podczas stymulacji komórek czynnikiem wzrostu hepatocytów - ligandem receptora MET, który spowodował spadek receptora na powierzchni wszystkich badanych linii. W przypadku stymulacji FBS doszło do zwiększenia zarówno ilości cząsteczek receptora MET na powierzchni błony komórkowej, jak i na poziomie transkryptu mRNA. Nie doprowadziło to jednak do wyrównania poziomu obserwowanej ekspresji pomiędzy badanymi komórkami. Fakt ten może świadczyć o złożoności układu czynników wpływającą na poziom transkrypcji MET oraz różnicach pomiędzy badanymi liniami. Podobny efekt stymulacji surowicą został zaobserwowany na komórkach nowotworowych płuc mających pochodzenie epitelialne [35].

Odnotowany spadek, MET związany z obecnością w medium hodowlanym czynnika wzrostu hepatocytów, był wspólny dla wszystkich badanych linii jedynie na poziomie ilości receptora na powierzchni błony komórkowej. Zgodnie z dostępną literaturą, stymulacja osi HGF/MET może skutkować zwiększoną ekspresją receptora MET a akumulację jego mRNA można zaobserwować już po 4h od stymulacji [75]. Uzyskane wyniki są zgodne z powyższymi jedynie co do akumulacji mRNA zaobserwowanej w przypadku komórek Rh28, CW9019 oraz SMS. Pozostałe linie wykazały obniżenie ekspresji MET zarówno na poziomie błony komórkowej jak i mRNA. Wyjaśnieniem tego może być internalizacja receptora indukowana jego ligandem. Taką internalizację, w przypadku MET, opisał w 1996 roku Jeffers i wsp.. Ma ona na celu obniżenie podatności komórki na ponowne wzbudzenie tym samym sygnałem. Mechanizm taki może być jednym z głównych czynników zapobiegających transformacji nowotworowej na skutek zbyt silnej aktywacji potencjalnie onkogennych osi sygnałowych. W świetle wyników, uzyskanych za pomocą cytofluorymetrii przepływowej, wszystkie badane linie na stymulację HGF zareagowały internalizacją receptora. Podwyższona ekspresja tego genu na poziomie mRNA w liniach Rh28, CW9019 oraz SMS świadczyć może o wspólnym defekcie prowadzącym do natychmiastowej rekonstytucji zinternalizowanego receptora. Komórki tych linii wykazały również najwyższą czułość na czynniki stymulujące, rozumianą jako wzrost ekspresji MET względem komórek kontrolnych.

8.5.2 Aktywacja osi CXCR4 i CXCR7 w komórkach mięsaka poprzez stymulację SDF-1 oraz ITAC

Komórki SMS, stymulowane SDF-1, zareagowały internalizacją receptora MET oraz wyraźną akumulacją jego mRNA w sposób podobny jak w przypadku stymulacji HGF, co może świadczyć o powiązaniu tych szlaków sygnałowych w owej linii. Co ciekawe komórki te charakteryzują się niską ekspresją receptora dla SDF-1 - CXCR4 [66]. Najprawdopodobniej jego funkcję w opisywanym przypadku pełni receptor CXCR7, który również może być aktywowany tym czynnikiem i o którym wiadomo, że tworzy z CXCR4 heterodimery [76]. Kolejną istotną obserwacją dotyczącą roli tej osi w linii SMS był fakt, iż komórki te silniej zareagowały na aktywację SDF-1 niż czynnikiem specyficznym dla CXCR7 - ITAC. Efekt ten można próbować wyjaśnić w ten sposób, że SDF-1 silniej wpływa na ekspresje MET, koaktywując wspomniane receptory, przez co prowadzi do aktywacji receptora.

8.5.3 Wpływ stresu komórkowego na ekspresję MET

8.5.3.1 Hipoksja

Hodowla komórek linii RMS w warunkach niedoboru tlenowego spowodowała zwiększenie powierzchniowej ekspresji MET we wszystkich badanych liniach za wyjątkiem Rh30, której komórki wykazały zwiększoną ekspresję na poziomie mRNA oraz komórek linii RD, w których ekspresja MET spadła na obydwu badanych płaszczyznach. Wzrost ekspresji MET w wyniku niedoboru tlenowego został opisany dla ulokowanych w słabo unaczynionych częściach guza komórek raka gruczołu śliniankowego [77]. W tych samych komórkach wykryto również wzrost czynnika transkrypcyjnego HIF-1α, którego potencjalne miejsca wiązania na promotorze MET opisał Liu. W oparciu o uzyskane wyniki, powyższy mechanizm aktywacji MET przyporządkować można jedynie do komórek linii Rh30. Pozostałe linie wykazały wzrost ekspresji receptora na powierzchni błony komórkowej, jednak na poziomie transkrypcyjnym zareagowały spadkiem. Przyczyną takiego stanu może być to, iż 24h interwał czasowy po którym dokonywano pomiarów, był w okresem którym nastąpiło podniesienie oraz późniejsze zahamowanie syntezy mRNA dla receptora MET. Możliwe jest też działanie innego mechanizmu regulującego poziom powierzchniowej ekspresji MET na etapie potranslacyjnym. Rozwiązanie takie pozwalałoby na znacznie szybszą reakcję komórek na warunki niedoboru tlenu, co jest istotne w związku z udziałem osi HGF/MET w procesach związanych z angiogenezą.

Zaobserwowany wzrost receptora MET ekspresji w komórkach linii podtypu alweolarnego był wyższy niż w przypadku komórek podtypu embrionalnego, co znajduje odzwierciedlenie w opisie klinicznym. Guzy tworzone przez linie alweolarne charakteryzują się znacznie szybszym wzrostem oraz zdolnością do tworzenia przerzutów. Można podejrzewać iż rozrost tkanki guza implikuje powstanie fragmentów niedotlenionych, co może skutkować przechodzeniem niedotlenionych komórek w indukowany nadekspresją MET stan metastatyczny.

8.5.3.2 Promieniowanie jonizujące

Komórki linii RMS w wyniku naświetlania promieniowaniem jonizującym, wykazały znaczny wzrost ekspresji receptora HGF na powierzchni błony komórkowej z jednoczesnym spadkiem ekspresji na poziomie transkrypcyjnym. Podobną reakcję komórek raka trzustki

opublikował w 2011 roku Tanaka i wsp. demonstrując towarzyszące, indukowanemu promieniowaniem wzrostowi ekspresji MET, nasilenie cech metastatycznych. Zdaniem autorów za zwiększoną ekspresję MET odpowiedzialna jest aktywowana przerwaniem integralności DNA genomowego kinaza ATM (*ang. ataxia telangiectasia mutated*) oraz aktywacja czynnika NF-κβ (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) związanego z odpowiedzią na stres komórkowy związany np. z działaniem wolnych rodników, które mogą powstawać podczas procesu naświetlania. Zaobserwowany wzrost ekspresji MET był wyższy względem komórek kontrolnych w liniach podtypu embrionalnego. Może to mieć związek z opisywaną przez Ratajczaka i wsp. wyższą wrażliwością na promieniowanie jonizujące wśród linii RMS o słabej ekspresji MET, do których zalicza się komórki ERMS.

W publikowanym przez Liu i wsp. opisie sekwencji promotora MET, zawarte są informacje o miejscu wiązania wspomnianego czynnika NF-κβ. Może to tłumaczyć wzrost ekspresji MET na wskutek stresu radiacyjnego, natomiast następujące później obniżenie aktywności transkrypcyjnej można wyjaśnić prawdopodobnym zatrzymaniem cyklu komórkowego wywołanym poradiacyjnymi pęknięciami w DNA.

Świadomość konsekwencji wynikających z naświetlania komórek nasuwa potrzebę rozwinięcia protokołów postępowania w przypadku aplikacji radioterapii. W świetle przytoczonych informacji w czasie prowadzenia leczenia, konieczne wydaje się być, zastosowanie specyficznych inhibitorów szlaków sygnałowych koordynowanych przez min. receptor MET.

8.6 Różnicowanie komórek linii mięsaka prążkowanokomórkowego

Komórki mięsaka prążkowanokomórkowego poddane różnicowaniu zmieniały swoją morfologię upodabniając się do komórek mięśniowych. Jednak odsetek komórek RMS, w których udało się uruchomić szlaki różnicowania, w porównaniu z mioblastami był znikomy. Analiza ekspresji MET w komórkach RMS wykazała widoczne zmniejszenie ilości receptora na powierzchni komórek linii CW9019 i Rh28. Pozostałe linie zachowały stan sprzed różnicowania. W 2002 Geert van Leendersa i wsp. porównał komórki z biopsji zdrowego epitelium ze złośliwymi komórkami raka prostaty. Próbki zostały wybarwione immunohistochemicznie na obecność MET. Zestawienie wykazało wysoki poziom ekspresji

MET w niezróżnicowanych komórkach epitelialnych, jak i w niezróżnicowanych komórkach nowotworowych. Komórki prawidłowe jednak w procesie różnicowania traciły ekspresję receptora MET, czego nie zaobserwowano w komórkach raka prostaty. Informacje te znajdują odzwierciedlenie w wynikach analizy różnicowania prawidłowych mioblastów, zestawionych z wynikami różnicowania komórek linii RMS.

Spowodowany różnicowaniem spadek ekspresji powierzchniowej MET w komórkach Rh28 i CW9019 można połączyć z obecnością miejsca wiązania czynnika MRF4, które uległo mutacji w pozostałych badanych liniach. MRF4 jest jednym z czynników regulujących ekspresję genów podczas różnicowania komórek [72]. Uwzględniając reakcję komórek prawidłowych można podejrzewać, iż w kinetyce ekspresji MET może pełnić rolę represora.

Ekspresja MET zaobserwowana podczas różnicowania komórek może być również reakcją na obecność TPA w medium różnicującym. Prezentowane wyniki świadczą o silnym wzroście poziomu mRNA dla MET w komórkach stymulowanych tym czynnikiem. Rezultaty te są zgodne z publikowaną przez Comoglio charakterystyką sekwencji promotora MET, który pod wpływem TPA ulega silnej aktywacji. Choć rola TPA w indukcji różnicowania komórek nowotworowych jest dobrze udokumentowana, jest bardzo prawdopodobne, iż stosowanie go podczas badań nad zmianami ekspresji MET nie jest wskazane.

8.7 Podsumowanie

Ocena poziomu ekspresji MET potwierdziła przynależność poszczególnych linii komórkowych do konkretnych podtypów. Sekwencyjna analiza promotora tego genu umożliwiła wykrycie polimorfizmu w grupie badanych komórek, który w świetle uzyskanych wyników może mieć wpływ na proces różnicowania tych linii. Analiza epigenetyczna, wykazała ponad wszelką wątpliwość zmienność profilu metylacji promotora MET pod wpływem czynników zewnętrznych, szczególnie pod wpływem stresu komórkowego.

Z klinicznego punktu widzenia, istotne są wyniki świadczące o zwiększonej ekspresji MET na skutek działania promieniowania jonizującego. Rozwinięcie badań w tym kierunku mogłoby, poprzez wykorzystanie specyficznych inhibitorów osi HGF-MET, zwiększyć skuteczność radioterapii w leczeniu mięsaka prążkowanokomórkowego.

9 Wnioski

W wyniku analizy genetycznej, epigenetycznej sekwencji promotora MET, oraz zmian ekspresji tego receptora pod wpływem różnych czynników na komórki mięsaka prążkowanokomórkowego, uzyskano wyniki, na podstawie których wyprowadzono następujące wnioski:

1. Multiplikacje MET występują zarówno w komórkach linii podtypu alweolarnego jak i embrionalnego i prawdopodobnie nie mają związku z różnymi poziomami ekspresji tego receptora w liniach tych podtypów.
2. Alweolarne linie Rh28 i CW9019, różnią się pod względem sekwencji promotora od reszty badanych linii.
3. Profil epigenetyczny sekwencji promotora MET w komórkach RMS, zmienia się pod wpływem czynników stymulujących, jednak zaobserwowane zmiany trudno jednoznacznie skorelować z poziomem transkrypcji samego genu.
4. Pod wpływem promieniowania jonizującego oraz hipoksji promotor MET ulega całkowitej demetylacji we wszystkich liniach komórkowych.
5. Ekspresja MET w komórkach RMS rośnie pod wpływem promieniowania jonizującego.
6. Komórki RMS w znacznie mniejszym stopniu poddają się procesowi różnicowania za pomocą TPA i końskiej surowicy, niż prawidłowe mioblasty.

10 Literatura

1. Parham, D.M. and D.A. Ellison, *Rhabdomyosarcomas in adults and children: an update.* Arch Pathol Lab Med, 2006. **130**(10): p. 1454-65.
2. Merlino, G. and L.J. Helman, *Rhabdomyosarcoma--working out the pathways.* Oncogene, 1999. **18**(38): p. 5340-8.
3. Hettmer, S. and A.J. Wagers, *Muscling in: Uncovering the origins of rhabdomyosarcoma.* Nat Med, 2010. **16**(2): p. 171-3.
4. Loh, W.E., Jr., et al., *Human chromosome 11 contains two different growth suppressor genes for embryonal rhabdomyosarcoma.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(5): p. 1755-9.
5. Buckingham, M., *Skeletal muscle formation in vertebrates.* Curr Opin Genet Dev, 2001. **11**(4): p. 440-8.
6. Scheidler, S., et al., *The hybrid PAX3-FKHR fusion protein of alveolar rhabdomyosarcoma transforms fibroblasts in culture.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(18): p. 9805-9.
7. Ferrari, A. and M. Casanova, *Current chemotherapeutic strategies for rhabdomyosarcoma.* Expert Rev Anticancer Ther, 2005. **5**(2): p. 283-94.
8. Raney, R.B., et al., *Results of the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group D9602 protocol, using vincristine and dactinomycin with or without cyclophosphamide and radiation therapy, for newly diagnosed patients with low-risk embryonal rhabdomyosarcoma: a report from the Soft Tissue Sarcoma Committee of the Children's Oncology Group.* J Clin Oncol, 2011. **29**(10): p. 1312-8.
9. El-Badry, O.M., et al., *Insulin-like growth factor II acts as an autocrine growth and motility factor in human rhabdomyosarcoma tumors.* Cell Growth Differ, 1990. **1**(7): p. 325-31.
10. Yang, L., et al., *Cancer-associated immunodeficiency and dendritic cell abnormalities mediated by the prostaglandin EP2 receptor.* J Clin Invest, 2003. **111**(5): p. 727-35.
11. Yanuck, M., et al., *A mutant p53 tumor suppressor protein is a target for peptide-induced CD8+ cytotoxic T-cells.* Cancer Res, 1993. **53**(14): p. 3257-61.
12. Neville, H.L., et al., *Preoperative staging, prognostic factors, and outcome for extremity rhabdomyosarcoma: a preliminary report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study IV (1991-1997).* J Pediatr Surg, 2000. **35**(2): p. 317-21.
13. Miura, Y., et al., *Hepatocyte growth factor stimulates proliferation and migration during wound healing of retinal pigment epithelial cells in vitro.* Jpn J Ophthalmol, 2003. **47**(3): p. 268-75.
14. Nakamura, T., *Structure and function of hepatocyte growth factor.* Prog Growth Factor Res, 1991. **3**(1): p. 67-85.
15. Holmes, O., et al., *Insights into the structure/function of hepatocyte growth factor/scatter factor from studies with individual domains.* J Mol Biol, 2007. **367**(2): p. 395-408.
16. Schiering, N., et al., *Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the hepatocyte growth factor receptor c-Met and its complex with the microbial alkaloid K-252a.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(22): p. 12654-9.
17. Appleman, L.J., *MET signaling pathway: a rational target for cancer therapy.* J Clin Oncol, 2011. **29**(36): p. 4837-8.
18. Andermarcher, E., M.A. Surani, and E. Gherardi, *Co-expression of the HGF/SF and c-met genes during early mouse embryogenesis precedes reciprocal expression in adjacent tissues during organogenesis.* Dev Genet, 1996. **18**(3): p. 254-66.
19. Neuss, S., et al., *Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing.* Stem Cells, 2004. **22**(3): p. 405-14.

20. Toyoda, M., et al., *Overexpression of hepatocyte growth factor/scatter factor promotes vascularization and granulation tissue formation in vivo.* FEBS Lett, 2001. **509**(1): p. 95-100.
21. Taulli, R., et al., *Validation of met as a therapeutic target in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma.* Cancer Res, 2006. **66**(9): p. 4742-9.
22. Lesko, E. and M. Majka, *The biological role of HGF-MET axis in tumor growth and development of metastasis.* Front Biosci, 2008. **13**: p. 1271-80.
23. Lutterbach, B., et al., *Lung cancer cell lines harboring MET gene amplification are dependent on Met for growth and survival.* Cancer Res, 2007. **67**(5): p. 2081-8.
24. Hiscox, S. and W.G. Jiang, *Association of the HGF/SF receptor, c-met, with the cell-surface adhesion molecule, E-cadherin, and catenins in human tumor cells.* Biochem Biophys Res Commun, 1999. **261**(2): p. 406-11.
25. Dunsmore, S.E., et al., *Mechanisms of hepatocyte growth factor stimulation of keratinocyte metalloproteinase production.* J Biol Chem, 1996. **271**(40): p. 24576-82.
26. Jeffers, M., S. Rong, and G.F. Vande Woude, *Enhanced tumorigenicity and invasion-metastasis by hepatocyte growth factor/scatter factor-met signalling in human cells concomitant with induction of the urokinase proteolysis network.* Mol Cell Biol, 1996. **16**(3): p. 1115-25.
27. Nabeshima, K., et al., *Front-cell-specific expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and gelatinase A during cohort migration of colon carcinoma cells induced by hepatocyte growth factor/scatter factor.* Cancer Res, 2000. **60**(13): p. 3364-9.
28. Matsumoto, K., T. Nakamura, and R.H. Kramer, *Hepatocyte growth factor/scatter factor induces tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (p125FAK) and promotes migration and invasion by oral squamous cell carcinoma cells.* J Biol Chem, 1994. **269**(50): p. 31807-13.
29. Lai, J.F., et al., *Involvement of focal adhesion kinase in hepatocyte growth factor-induced scatter of Madin-Darby canine kidney cells.* J Biol Chem, 2000. **275**(11): p. 7474-80.
30. Hiscox, S. and W.G. Jiang, *Regulation of endothelial CD44 expression and endothelium-tumour cell interactions by hepatocyte growth factor/scatter factor.* Biochem Biophys Res Commun, 1997. **233**(1): p. 1-5.
31. Dong, G., et al., *Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced activation of MEK and PI3K signal pathways contributes to expression of proangiogenic cytokines interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in head and neck squamous cell carcinoma.* Cancer Res, 2001. **61**(15): p. 5911-8.
32. Zhang, Y.W., et al., *Hepatocyte growth factor/scatter factor mediates angiogenesis through positive VEGF and negative thrombospondin 1 regulation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(22): p. 12718-23.
33. Ferracini, R., et al., *The Met/HGF receptor is over-expressed in human osteosarcomas and is activated by either a paracrine or an autocrine circuit.* Oncogene, 1995. **10**(4): p. 739-49.
34. Liu, Y., *The human hepatocyte growth factor receptor gene: complete structural organization and promoter characterization.* Gene, 1998. **215**(1): p. 159-69.
35. Gambarotta, G., et al., *Structure and inducible regulation of the human MET promoter.* J Biol Chem, 1994. **269**(17): p. 12852-7.
36. Billon, P. and J. Cote, *Precise deposition of histone H2A.Z in chromatin for genome expression and maintenance.* Biochim Biophys Acta, 2012. **1819**(3-4): p. 290-302.
37. Barski, A., et al., *High-resolution profiling of histone methylations in the human genome.* Cell, 2007. **129**(4): p. 823-37.
38. Jenuwein, T. and C.D. Allis, *Translating the histone code.* Science, 2001. **293**(5532): p. 1074-80.
39. Kangaspeska, S., et al., *Transient cyclical methylation of promoter DNA.* Nature, 2008. **452**(7183): p. 112-5.
40. Fulka, H., et al., *DNA methylation pattern in human zygotes and developing embryos.* Reproduction, 2004. **128**(6): p. 703-8.
41. Schubeler, D., *Epigenomics: Methylation matters.* Nature, 2009. **462**(7271): p. 296-7.

42. Eden, S. and H. Cedar, *Role of DNA methylation in the regulation of transcription.* Curr Opin Genet Dev, 1994. **4**(2): p. 255-9.
43. Boyes, J. and A. Bird, *DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein.* Cell, 1991. **64**(6): p. 1123-34.
44. Riggs, A.D. and Z. Xiong, *Methylation and epigenetic fidelity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(1): p. 4-5.
45. Suetake, I., et al., *DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction.* J Biol Chem, 2004. **279**(26): p. 27816-23.
46. Gardiner-Garden, M. and M. Frommer, *CpG islands in vertebrate genomes.* J Mol Biol, 1987. **196**(2): p. 261-82.
47. Saxonov, S., P. Berg, and D.L. Brutlag, *A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(5): p. 1412-7.
48. Irizarry, R.A., et al., *The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores.* Nat Genet, 2009. **41**(2): p. 178-86.
49. Feinberg, A.P. and B. Tycko, *The history of cancer epigenetics.* Nat Rev Cancer, 2004. **4**(2): p. 143-53.
50. Feinberg, A.P. and B. Vogelstein, *Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers.* Biochem Biophys Res Commun, 1983. **111**(1): p. 47-54.
51. Kim, S.J., et al., *Promoter hypomethylation of the N-acetyltransferase 1 gene in breast cancer.* Oncol Rep, 2008. **19**(3): p. 663-8.
52. Harden, S.V., et al., *Gene promoter hypermethylation in tumors and lymph nodes of stage I lung cancer patients.* Clin Cancer Res, 2003. **9**(4): p. 1370-5.
53. Stirzaker, C., et al., *Extensive DNA methylation spanning the Rb promoter in retinoblastoma tumors.* Cancer Res, 1997. **57**(11): p. 2229-37.
54. Dobrovic, A. and D. Simpfendorfer, *Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer.* Cancer Res, 1997. **57**(16): p. 3347-50.
55. Leone, G., et al., *DNA methylation and demethylating drugs in myelodysplastic syndromes and secondary leukemias.* Haematologica, 2002. **87**(12): p. 1324-41.
56. Stenvinkel, P., et al., *Impact of inflammation on epigenetic DNA methylation - a novel risk factor for cardiovascular disease?* J Intern Med, 2007. **261**(5): p. 488-99.
57. Koturbash, I., I. Pogribny, and O. Kovalchuk, *Stable loss of global DNA methylation in the radiation-target tissue--a possible mechanism contributing to radiation carcinogenesis?* Biochem Biophys Res Commun, 2005. **337**(2): p. 526-33.
58. Nanduri, J., et al., *Epigenetic regulation of hypoxic sensing disrupts cardiorespiratory homeostasis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(7): p. 2515-20.
59. Tobi, E.W., et al., *DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific.* Hum Mol Genet, 2009. **18**(21): p. 4046-53.
60. Egger, G., et al., *Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy.* Nature, 2004. **429**(6990): p. 457-63.
61. Gore, S.D., *Combination therapy with DNA methyltransferase inhibitors in hematologic malignancies.* Nat Clin Pract Oncol, 2005. **2 Suppl 1**: p. S30-5.
62. Zhou, L., et al., *Zebularine: a novel DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases.* J Mol Biol, 2002. **321**(4): p. 591-9.
63. Champion, C., et al., *Mechanistic insights on the inhibition of c5 DNA methyltransferases by zebularine.* PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12388.
64. Thurn, K.T., et al., *Rational therapeutic combinations with histone deacetylase inhibitors for the treatment of cancer.* Future Oncol, 2011. **7**(2): p. 263-83.
65. Chen, H. and B.R. Shaw, *Kinetics of bisulfite-induced cytosine deamination in single-stranded DNA.* Biochemistry, 1993. **32**(14): p. 3535-9.

66. Grymula, K., et al., *Overlapping and distinct role of CXCR7-SDF-1/ITAC and CXCR4-SDF-1 axes in regulating metastatic behavior of human rhabdomyosarcomas.* Int J Cancer, 2010. **127**(11): p. 2554-68.
67. Hiti, A.L., et al., *Expression of the MyoD1 muscle determination gene defines differentiation capability but not tumorigenicity of human rhabdomyosarcomas.* Mol Cell Biol, 1989. **9**(11): p. 4722-30.
68. Boccaccio, C., et al., *Hepatocyte growth factor (HGF) receptor expression is inducible and is part of the delayed-early response to HGF.* J Biol Chem, 1994. **269**(17): p. 12846-51.
69. Diomedi-Camassei, F., et al., *Clinical significance of CXC chemokine receptor-4 and c-Met in childhood rhabdomyosarcoma.* Clin Cancer Res, 2008. **14**(13): p. 4119-27.
70. Chaudhary, J. and M.K. Skinner, *Basic helix-loop-helix proteins can act at the E-box within the serum response element of the c-fos promoter to influence hormone-induced promoter activation in Sertoli cells.* Mol Endocrinol, 1999. **13**(5): p. 774-86.
71. Tan, X., et al., *Molecular structure and expression patterns of flounder (Paralichthys olivaceus) Myf-5, a myogenic regulatory factor.* Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2006. **145**(2): p. 204-13.
72. Sirri, V., M.P. Leibovitch, and S.A. Leibovitch, *Muscle regulatory factor MRF4 activates differentiation in rhabdomyosarcoma RD cells through a positive-acting C-terminal protein domain.* Oncogene, 2003. **22**(36): p. 5658-66.
73. Soustelle, L., et al., *Neurogenic role of Gcm transcription factors is conserved in chicken spinal cord.* Development, 2007. **134**(3): p. 625-34.
74. Kaplan, J. and K. Calame, *The ZiN/POZ domain of ZF5 is required for both transcriptional activation and repression.* Nucleic Acids Res, 1997. **25**(6): p. 1108-16.
75. Rong, S., et al., *Invasiveness and metastasis of NIH 3T3 cells induced by Met-hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine stimulation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(11): p. 4731-5.
76. Levoye, A., et al., *CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling.* Blood, 2009. **113**(24): p. 6085-93.
77. Hara, S., et al., *Hypoxia enhances c-Met/HGF receptor expression and signaling by activating HIF-1alpha in human salivary gland cancer cells.* Oral Oncol, 2006. **42**(6): p. 593-8.