

im. Marii Skłodowskiej-Curie Państwowy Instytut Badawczy Oddział w Gliwicach

ROZPRAWA DOKTORSKA

Agnieszka Będzińska

Identyfikacja nowych genów regulowanych przez p53 w komórkach eksponowanych na aktynomycynę D i nutlinę-3a

Identification of novel genes regulated by p53 protein in cells exposed to actinomycin D and nutlin-3a

Praca wykonana pod kierunkiem

prof. dr hab. Marka Rusina

w Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów im. Prof. Mieczysława Chorążego, Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Państwowego Instytutu Badawczego, Oddział w Gliwicach

GLIWICE 2024



Praca została zrealizowana w ramach grantu badawczego nr 2019/35/O/NZ5/02600 zatytułowanego: "Identyfikacja przy pomocy aktynomycyny D i nutliny-3a nowych genów regulowanych przez p53 - nieznane oblicze głównego supresora nowotworów", w ramach programu "PRELUDIUM BIS" finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (NCN).

Podziękowania

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania dla Promotora, Profesora Marka Rusina, za wsparcie i przewodnictwo podczas realizacji niniejszego projektu doktorskiego. Pańska wiedza i doświadczenie były niezwykle inspirujące i motywujące dla mnie przez cały okres realizacji niniejszego projektu.

Chciałabym z całego serca podziękować Koleżankom z Pracowni Molekularnych Mechanizmów Terapii Nowotworów za Wasze wsparcie, współpracę i inspirację. Wasza życzliwość i gotowość do pomocy sprawiły, że praca nad niniejszym projektem była bardziej owocna i satysfakcjonująca.

Serdecznie dziękuję Koleżankom i Kolegom z Centrum Badań Translacyjnych im. Prof. Mieczysława Chorążego za prawdziwą motywację do pracy, przekazaną wiedzę oraz pomoc w zakresie technik eksperymentalnych.

Publikacje

Niektóre z przedstawionych wyników niniejszego projektu doktorskiego zostały już opublikowane:

- Będzińska, A.; Łasut-Szyszka, B.; Krześniak, M.; Gdowicz-Kłosok, A.; Rusin, M. Puzzling Regulation of Interferon Signaling System by p53 Tumor Suppressor Protein. Preprints 2024, 2024041169. https://doi.org/10.20944/preprints202404.1169.v1
- Łasut-Szyszka B, Gdowicz-Kłosok A, Małachowska B, Krześniak M, Będzińska A, Gawin M, Pietrowska M, Rusin M. *Transcriptomic and proteomic study of cancer cell lines exposed to actinomycin D and nutlin-3a reveals numerous, novel candidates for p53-regulated genes*. Chem Biol Interact. 2024 Apr 1;392:110946. doi: 10.1016/j.cbi.2024.110946

Lista pozostałych publikacji:

- Łasut-Szyszka, B.; Gdowicz-Kłosok, A.; Krześniak, M.; Głowala-Kosińska, M.; Będzińska, A.; Rusin, M. Strong Activation of p53 by Actinomycin D and Nutlin-3a Overcomes Resistance of Cancer Cells to the Pro-apoptotic Activity of FAS Ligand. Preprints 2023, 2023101608. https://doi.org/10.20944/preprints202310.1608.v1
- Krześniak, M.; Łasut-Szyszka, B.; Będzińska, A.; Gdowicz-Kłosok, A.; Rusin, M. The p53 tumor suppressor protein activates transcription of DUSP13 isoform from the alternative promoter in intron 3. Preprints 2023, 2023091653. https://doi.org/10.20944/preprints202309.16 53.v1
- Mytych J, Sołek P, Będzińska A, Rusinek K, Warzybok A, Tabęcka-Łonczyńska A, Koziorowski M. Klotho-mediated changes in the expression of Atg13 alter formation of ULK1 complex and thus initiation of ER- and Golgi-stress response mediated autophagy. Apoptosis. 2020 Feb;25(1-2):57-72. doi: 10.1007/s10495-019-01579-z
- Mytych J, Sołek P, Będzińska A, Rusinek K, Warzybok A, Tabęcka-Łonczyńska A, Koziorowski M. Towards Age-Related Anti-Inflammatory Therapy: Klotho Suppresses Activation of ER and Golgi Stress Response in Senescent Monocytes. Cells. 2020 Jan 21;9(2):261. doi: 10.3390/cells9020261

Spis treści

Streszczeni	e	9
Abstract		11
Wykaz najv	ważniejszych zastosowanych skrótów:	13
I. Wstęp	teoretyczny	15
1. Cha	arakterystyczne cechy nowotworu - Hallmarks of cancer	16
2. Hist	toria odkrycia białka p53	22
3. Reg	ulacja poziomu białka p53 w komórce – rola kompleksu p53/MDM2	23
4. "Sti	rażnik genomu", tylko czy aż? - funkcje białka p53	24
5. Mu	tacje genu <i>TP53</i>	28
6. Ukł aktynom	ad doświadczalny – synergistyczna aktywacja szlaku p53 za pomocą miesz ycyny D oraz nutliny-3a	zaniny 30
7. Rol	a układu immunologicznego w eliminacji komórek nowotworowych	31
7.1.	Rola komórek NK w odpowiedzi przeciwnowotworowej	33
7.2.	Aktywność cytotoksyczna komórek NK	35
7.3.	Rola komórek NK w immunoterapii	37
8. Szla	ıki interferonowe	38
II. Cele i te	za badań	40
III. Materia	ały i metody	41
1. Lin	ie komórkowe	41
1.1.	Hodowla komórkowa w warunkach <i>in vitro</i>	42
1.2.	Przygotowanie chemioterapeutyków i stresorów	44
2. Skła	ad wykorzystanych buforów oraz żeli do elektroforezy	45
3. Obi	niżenie ekspresji wybranych genów z wykorzystaniem mechanizmu CRISPR/Ca	189 .47
4. Ocena wybrany	miejsca wiązania genu <i>TP53</i> z wykorzystaniem układu reporterowego lucyfe ch genach	azy w 48
4.1.	Izolacja DNA z hodowli komórkowej	49
4.2. wykorz	Analiza potencjalnego miejsca wiązania białka p53 w sekwencji wybranych ge zystaniem metody PCR	e nów z 49
4.3.	Ocena jakości produktu reakcji PCR i jego izolacja z żelu agarozowego	50
4.4.	Trawienie oczyszczonego produktu enzymami restrykcyjnymi	51
4.5.	Reakcja ligacji	52
4.6.	Transformacja bakterii	52
4.7.	Izolacja plazmidowego DNA	53
4.8.	Trawienie sprawdzające	53
4.9.	Sekwencjonowanie uzyskanych wektorów z miejscem potencjalnego wiązan 54	ia p53
4.10. transfe	Ocena aktywności luminescencji w wybranych liniach komórkowych podd ekcji	anych

5. Im	munodetekcja badanych białek - metoda <i>Western Blotting</i> 56
5.1.	Przygotowanie lizatów białkowych56
5.2.	Oznaczanie stężenia białek metodą Bradford i denaturacja białek57
5.3.	Elektroforeza, elektrotransfer i inkubacja z przeciwciałami
6. Pro	oces izolacji całkowitego RNA60
6.1.	Ocena ilościowa i jakościowa uzyskanego RNA60
7. An	aliza ekspresji wybranych genów na poziomie mRNA (Real-Time PCR)61
7.1.	Synteza cDNA61
7.2.	Real-time PCR (RT-qPCR)61
8. Bao nowotwo	danie wpływu substancji aktywujących białko p53 na podatność komórek prowych na cytotoksyczne działanie komórek NK-9264
8.1.	Testy MTS64
8.2.	Medium kondycjonowane
9. An	aliza statystyczna i opracowanie wyników67
IV. Wyniki	
1. Prz indukow	zedstawienie modelu badawczego – synergistyczna aktywacja szlaku białka p53 zana przez aktynomycynę D i nutlinę-3a68
2. Wy	bór genów potencjalnie regulowanych przez białko p5369
3. An	aliza wybranych genów potencjalnie regulowanych przez białko p5373
3.1. A A459 2	naliza ekspresji genów w zmodyfikowanej linii niedrobnokomórkowego raka płuca ze zredukowaną ekspresją genu <i>TP53</i> 74
3.2. ze zree	Analiza ekspresji genów w zmodyfikowanej linii kostniakomięsaka U-2 OS dukowaną ekspresją genu <i>TP53</i> 76
3.3. o dzik	Analiza ekspresji genów w linii niedrobnokomórkowego raka płuca NCI-H460 im statusie genu <i>TP53</i>
4. An związany	aliza potencjalnego miejsca wiązania białka p53 w sekwencjach wybranych genów ych z odpornością wrodzoną – testy lucyferazowe
4.1. <i>SLAM</i>	Analiza potencjalnego miejsca wiązania białka p53 w sekwencji wzmacniającej genu IF7
4.2. <i>KLRG</i>	Analiza potencjalnego miejsca wiązania białka p53 w sekwencji wzmacniającej genu 2 80
4.3. <i>A</i> genu <i>I</i>	naliza potencjalnego miejsca wiązania białka p53 w sekwencji wzmacniającej N <i>CR3LG1</i>
5. Wp	oływ białka p53 na aktywację białka SLAMF782
5.1. miesza	Rola białka p53 w synergistycznej aktywacji białka SLAMF7 pod wpływem aniny aktynomycyny D i nutliny-3a
5.2. induk	Analiza roli innych chemioterapeutyków klinicznie stosowanych w kontekście cji białka SLAMF785
6. Zna z komór	aczenie białka p53 w cytotoksycznym mechanizmie komórek NK-92 w ko-kulturach kami niedrobnokomórkowego raka płuca91
6.1. A komói	naliza molekularnych skutków działania medium kondycjonowanego z hodowli rek NK-92

7. Analiza roli białka p53 w regulacji działania interferonów	97
8. Rola białka p53 w regulacji szlaku IFN-α1	100
8.1. Odpowiedź linii komórek A549 na różne stężenia IFN-α1 – wybór stężenia	100
8.2. Rola białka p53 w regulacji fosforylacji STAT1 indukowanej IFN-α1	101
8.3. Rola białka p53 w aktywacji genów regulowanych przez IFN-α1	102
9. Rola białka p53 w regulacji szlaku IFN-γ	105
9.1. Odpowiedź linii komórkowej A549 na różne dawki IFN-γ – wybór stężenia	105
9.2. Rola białka p53 w akumulacji białek kodowanych przez geny aktywowan IFN-γ 106	e przez
9.3. Analiza ekspresji wybranych genów uczestniczących w szlaku IFN-γ	109
10. Porównanie roli białka p53 w szlakach interferonów	113
11. Wstępna charakterystyka współdziałania IFN-γ i aktywacji p53 w regulacji aj indukowanej ligandem FAS.	poptozy 116
V. Dyskusja	118
1. Identyfikacja nowych genów zależnych od białka p53 w komórkach eksponowar aktynomycynę D oraz nutlinę-3a	nych na 118
2. Ścieżki aktywacji białka SLAMF7	124
3. Jaki jest wpływ białka p53 na cytotoksyczną odpowiedź komórek NK-92?	129
3.1. Substancje pochodzące z komórek linii NK-92 wykrywane w pożywce	131
4. Rola białka p53 w sygnalizacji szlaków interferonowych	132
4.1. Wpływ białka p53 na mechanizm aktywacji inhibitora szlaku JAK/STAT – SOCS1	- białka 132
4.2. Rola białka p53 w szlaku IFN-α1	133
4.3. Rola białka p53 w aktywacji szlaku IFN-γ	135
4.4. Porównanie roli białka p53 w szlakach interferonów	137
4.5. Wpływ IFN-γ na indukcję apoptozy	139
5. Podsumowanie	140
VI. Wnioski	142
VII. Bibliografia	143
VIII. Spis rycin i tabeli	156
Spis rycin:	156
Spis tabel:	160

Streszczenie

Białko p53 wykazuje silne działanie przeciwnowotworowe, a jego gen - *TP53* jest jednym z najczęściej zmutowanych w komórkach nowotworowych. Pomimo 40 lat badań pełne spektrum jego funkcji nie jest w pełni poznane. Ostatnie doniesienia wskazują, że może wpływać na działanie układu odpornościowego poprzez regulację aktywności genów i białek zaangażowanych w jego aktywność, choć jest to bardzo słabo poznany obszar funkcjonowania białka p53.

Celem niniejszego projektu doktorskiego było zidentyfikowane genów, kodujących białka układu odpornościowego, kontrolowanych przez p53. W innowacyjny sposób aktywowano p53 za pomocą jednoczesnego traktowania aktynomycyną D i nutliną-3a (AN). Zidentyfikowano 17 genów, których białka są mediatorami funkcji komórek immunologicznych tj. limfocytów cytotoksycznych, komórek NK (natural killers), makrofagów czy neutrofilów. Inne białka kodowane przez geny aktywowane pod wpływem białka p53 biorą udział w regulacji stanu zapalnego, czy są zaangażowane w szlaki interferonowe. Spośród tych 17 genów wybrano trzy (SLAMF7, KLRG2 oraz NCR3LG1) do bardziej szczegółowych testów. Testy lucyferazowe potwierdziły silny wpływ p53 na aktywność transkrypcyjną sekwencji DNA pochodzących z genów SLAMF7 i KLRG2. Skupiono się na białku SLAMF7, kluczowym dla aktywacji funkcji cytotoksycznych komórek NK i zbadano jego aktywację w różnych typach linii komórkowych po ekspozycji na chemioterapeutyki. Potwierdzono, że p53 wpływa na akumulację SLAMF7 w komórkach eksponowanych na mieszaninę AN lub kamptotecynę. Odkryto także sekrecyjną formę SLAMF7 (~50 kDa) w medium kondycjonowanym komórek traktowanych mieszanina AN - wykrywana dotychczas we krwi pacjentów ze szpiczakiem mnogim. Niespodziewanie, białko SLAMF7 ulega silnej aktywacji niezależnie od białka p53 pod wpływem paklitakselu. Co więcej, mechanizm tej aktywacji sprawdzono także na liniach komórkowych o różnorodnym statusie genu TP53.

W początkowych etapach badań zauważono, że białko p53 aktywowane przez mieszaninę AN, może regulować odpowiedź komórek na cytotoksyczne limfocyty (w tym komórki NK) poprzez geny *TRANK1, TNFRSF14, NCR3LG1, SLAMF7, EOMES, ICOSLG.* Dlatego postanowiono sprawdzić, czy mieszanina AN i białko p53 mogą zwiększać wrażliwość komórek nowotworowych na niszczenie przez komórki NK. Wyniki wskazują, że komórki niedrobnokomórkowego raka płuca traktowane mieszaniną AN stają się bardziej wrażliwe na cytotoksyczne działanie komórek NK-92. Efekt ten jest wyraźniejszy w komórkach wykazujących prawidłową formę białka p53, co zaobserwowano w liniach niedrobnokomórkowego raka płuca A549 oraz NCI-H460.

Białko p53 aktywowane pod wpływem mieszaniny AN, poprzez aktywację genów *APOL3, SLAMF7, OTUD1, EOMES, ICOSLG* może mieć wpływ na działanie szlaków interferonowych. Potwierdzono, że białko p53 może aktywować gen *SOCS1*, który jest inhibitorem szlaku JAK/STAT, co sugeruje jego wpływ na ekspresję genów stymulowanych interferonem- α (IFN- α) oraz interferonem- γ (IFN- γ).

p53 wpływa negatywnie na ekspresję niektórych genów stymulowanych IFN-α. W przeciwieństwie do tego, wykazano, że białko p53 współdziała z IFN-γ (synergistycznie lub addytywnie) w stymulacji ekspresji niektórych genów kodujących białka odporności wrodzonej tj. *CASP1, IFIT1, IFIT3*.

Podsumowując, przeciwnowotworowe białko p53 wykazuje funkcje regulacyjne wrodzonej odpowiedzi immunologicznej poprzez aktywację dziesiątek genów, kodujących białka tego systemu. W ramach niniejszego projektu doktorskiego bardziej szczegółowo zbadano wpływ p53 na uwrażliwianie komórek nowotworowych na cytotoksyczne działanie komórek NK-92 oraz jego rolę w odpowiedzi na IFN-α i IFN-γ. Odkryto mechanizm aktywacji genu *SLAMF7* pod wpływem paklitakselu niezależnie od p53, jednak jest to nowo zdobyta wiedza, którą należy zgłębić. Opisane mechanizmy mogą mieć znaczenie praktyczne ze względu na istnienie terapii wykorzystującej zwiększoną ekspresję SLAMF7 jako celu przeciwciała (Elotuzumab) zwiększającego wrażliwość komórek nowotworowych na niszczące działanie układu odpornościowego.

Abstract

The p53 protein shows strong anticancer properties, hence its gene *TP53* is one of the most frequently mutated in human cancers. Despite over 40 years of research, the full range of its functions remains unknown. Recent studies suggest that p53 may influence the immune system by regulating the activity of genes and proteins involved in immune response, though this area of research is poorly explored.

This project was aimed at identifying new p53-dependent genes, which code proteins participating in the functioning of the immune system. p53 was activated in cells using an innovative combination of actinomycin D and nutlin-3a (AN). Seventeen genes were identified, encoding proteins, which mediate the functions of immune cells such as lymphocytes, NK cells, macrophages and neutrophils. Other identified genes are involved in inflammation and interferon pathways. Out of seventeen genes three (SLAMF7, KLRG2, and NCR3LG1) were selected for further detailed analysis. Luciferase assays confirmed a strong influence of p53 on the transcriptional activity of DNA sequences from SLAMF7 and KLRG2 genes. SLAMF7, crucial for NK cell cytotoxicity activation, was further examined in cancer cells treated with other chemotherapeutics. It was confirmed that p53 influences SLAMF7 accumulation following treatment with AN combination and camptothecin, which is a precursor of anticancer drugs. Moreover, a secretory form (~50 kDa) of SLAMF7 was found in the conditioned medium of AN-treated cells, similar to that found in serum of multiple myeloma patients. Unexpectedly, SLAMF7 was strongly activated by paclitaxel in p53-independent way, what was tested across various cell lines with different TP53 statuses.

At the outset of the project it was demonstrated that p53 activated by AN can potentially regulate cytotoxic immune cell responses through regulation of genes like *TRANK1*, *TNFRSF14*, *NCR3LG1*, *SLAMF7*, *EOMES* and *ICOSLG*. Therefore, it was tested whether AN combination and p53 can increase the sensitivity of cancer cells to the destruction induced by NK cells. It was found that the AN mix and p53 increased cancer cell sensitivity to NK cell-mediated elimination, particularly in the A549 and NCI-H460 lines (wild-type *TP53*).

Additionally, it was found that p53 activated by AN mix could influence the interferon pathways by activating genes such as *APOL3*, *SLAMF7*, *OTUD1*, *EOMES* and *ICOSLG*. It was confirmed that p53 activates the *SOCS1* gene, an inhibitor of the JAK/STAT pathway. This suggested the key role of p53 in regulating genes stimulated by interferon- α (IFN- α) and interferon- γ (IFN- γ). The experiments demonstrated that the p53 downregulated some genes induced by IFN- α , while synergistically or additively cooperating with IFN- γ in stimulating genes encoding some innate immunity proteins such as CASP1, IFIT1, and IFIT3.

In summary, the innate immune response might be regulated by the activation of dozens of p53-dependent genes. This project was focused on the impact of p53 on cancer cells sensitivity to

NK cells-mediated cytotoxicity and the role of p53 in modulating the response to alpha and gamma interferons. The discovered mechanisms of *SLAMF7* activation by various drugs open new therapeutic possibilities, especially for treatments employing the overexpressed SLAMF7 as a target for the antibody Elotuzumab, which sensitizes cancer cells to the destruction by the immune system.

Wykaz najważniejszych zastosowanych skrótów:

Skrót	Rozwinięcie
ACTB	ang. <i>Actin Beta</i> – gen kodujący β-aktynę
ADCC	ang. <i>Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity</i> – cytotoksyczność komórek zależna od przeciwciał
ADCP	ang. Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis – fagocytoza komórkowa zależna od przeciwciał
AN	ang. <i>Combination actinomycin D and nutlin-3a</i> - mieszanina aktynomycyny D i nutliny-3a
CAR-NK	ang. <i>Chimeric Antigen Receptor Natural Killer</i> – naturalne komórki NK z receptorami antyfenowymi chimerycznymi
CASP1	ang. Caspase-1- kaspaza-1
CASP3	ang. Caspase-3- kaspaza-3
CASP8	ang. Caspase-8- kaspaza-8
CASP9	ang. Caspase-9 - kaspaza-9
СРТ	ang. Camptothecine – kamptotecyna
CRACC	ang. <i>CD2-Related Adapter Molecule-1</i> – Molekuła 1 Adaptacyjna Powiązana z CD2
CRISPR/CAS9	ang. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR- associated protein 9 – Regularne, rozproszone, krótki powtarzające się sekwencje palindromowe/białko 9 związane z CRISPR
DEL	ang. Deletion – delecja
DMSO	ang. Dimethyl sulfooxide - dimetylosulfotlenek
EBV	ang. Epstein-Barr Virus – wirus Epstein-Barr
FASLG	ang. <i>Fas Ligand</i> – ligand Fas
FASR	ang. Fas Receptor – receptor Fas
GAPDH	ang. <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> - dehydrogenaza glicerynofosforanowa 3-fosforanowa
GAS	ang. Gamma interferon activation site - miejsce aktywacji interferonu gamma
HSPA8/HSC70	ang. Heat Shock Protein Family A (HSPA) member 8- rodzina białek szoku cieplnego o masie około 70 kDa
HPV	ang. Human Papillomavirus - Wirusek brodawczaka ludzkiego
IFIH1	ang. <i>Interferon Induced with Helicase C Domain 1</i> - Interferon Indukowany Helikazą z Domeną C 1
IFIT	ang. Interferon-induced proteins - Białka indukowane przez interferon
IFNAR	ang. Interferon-Alpha/Beta Receptor - receptor dla interferonu alfa/beta
IFNGR	ang. Interferon-Gamma Receptor - receptor interferonu gamma
IFN-a	ang. Interferon alpha – interferon alfa
IFN-γ	ang. Interferon gamma – interferon gamma
IGF	ang. Insulin-like Growth Factor - Czynnik Wzrostu Podobny do Insuliny
IRF	ang. Interferon Regulatory Factor - Czynnik Regulujący Interferon
ISG	ang. Interferon-Stimulated Genes - Geny Stymulowane przez Interferon

ISGF-3	ang. Interferon-Stimulated Gene Factor 3 - Czynnik 3 Genów Stymulowanych przez Interferon
ISRE	ang. Interferon-Stimulated Response Element - Element Odpowiedzi Stymulowanej przez Interferon
JAK/STAT	ang. Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription - Kinaza Janusowa/Przekaźnik Sygnału i Aktywator Transkrypcji
MDM2	ang. Mouse Double Minute 2 - Myszowy Podwójny Minutnik 2
MUT	ang. Mutation - mutacja
NFLA	ang. <i>Normalised Firefly Luciferase Activity</i> – znormalizowana aktywność lucyferazy świetlika
NK	ang. Natural Killer cell - naturalni zabójcy; komórki NK
РТХ	ang. <i>Paclitaxel</i> - Paklitaxel
rpm	ang. Revolutions Per Minute - obroty na minutę
RT	ang. <i>Room Temperature</i> – temperatura pokojowa
SLAMF7	ang. Signaling Lymphocytic Activation Molecule Family Member 7 - Członek Rodziny Molekuł Aktywujących Limfocyty Sygnałowe 7
SOCS1	ang. Suppressor of Cytokine Signaling 1 - Supresor Sygnalizacji Cytokin 1
STAT1	ang. <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 1</i> - Przekaźnik Sygnału i Aktywator Transkrypcji 1
SV40	ang. Simian Virus 40 – małpi wirus 40
TP53 (p53)	ang. Tumor Protein 53 – gen kodujący przeciwnowotworowe białko p53
WT	ang. <i>Wild Type</i> – typ dziki

I. Wstęp teoretyczny

Według Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organization*; WHO) choroba nowotworowa każdego roku jest jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie. Szacuje się, że w 2020 roku na całym świecie zdiagnozowano nowotwory złośliwe u 19,3 miliona osób i odnotowano prawie 10 milionów zgonów z tej przyczyny. Szacuje się, że w 2040 roku globalne obciążenie nowotworami może wynieść nawet 28,4 miliona przypadków, co oznacza wzrost o 47% w porównaniu z rokiem 2020 [1]. Zagrożenie nowotworami stale rośnie na całym świecie, co może wynikać z różnych czynników związanych z niestosowanie się do zasad zdrowego stylu życia tj. palenie tytoniu, niewłaściwa dieta, brak aktywności fizycznej, stres, nadmierna ekspozycja na promieniowanie słoneczne czy brak świadomości zdrowotnej.

Od starożytnych czasów ludziom i zwierzętom nieprzerwanie towarzyszyły nowotwory. Do najwcześniejszych dowodów występowania choroby nowotworowej niewątpliwie należy mumia ze starożytnego Egiptu, u której zaobserwowano narośla sugerujące kostniakomięsaka. Jednak nazwę "rak" przypisuje się greckiemu lekarzowi Hipokratesowi uznawanemu za ojca medycyny. Hipokrates prawdopodobnie po raz pierwszy użył terminu "rak" do opisania guzów piersi. W języku greckim słowo "karkínos" odnosi się do "kraba", który prawdopodobnie kojarzył się z tą chorobą, ponieważ przypominające odnogi rozprzestrzeniające się guzy nowotworowe przywodzą na myśl kształt kraba. Inny grecki lekarz, Galen do opisu "raka" użył słowa "oncos" (co w jezyku greckim oznacza obrzek). Chociaż analogia "kraba" Hipokratesa jest nadal używana do opisu nowotworów złośliwych, to termin Galena został użyty do opisania dziedziny medycyny zajmującej się nowotworami – onko (obrzęk) logia (nauka) [2]. Warto wspomnieć, że terminem "nowotwór złośliwy" opisuje się zmiany, które charakteryzują się nieograniczonym wzrostem i inwazyjnością, zdolne do naciekania sąsiednich komórek i tkanek oraz mające potencjał przerzutowy (szczegółowe cechy nowotworu złośliwego opisali Hannah i Douglas w artykułach "Hallmarks of cancer"). Natomiast nowotwór łagodny, jest ograniczony do określonej lokalizacji w narządach oraz charakteryzuje się powolnym wzrostem, często jest otoczony torebką łącznotkankową i rzadko bywa inwazyjny [3]. Po wielu stuleciach od pierwszych opisów nowotworu, dopiero XIX wiek przyniósł rozwój dziedzinie onkologii. Wówczas Rudolf Virchow, nazywany twórcą patologii komórkowej, wprowadził termin "rak" do nauk medycznych [4]. Kolejnym krokiem milowym w onkologii był dynamiczny rozwój mikroskopii, dzięki której można było po setkach lat domysłów zobaczyć komórkę nowotworowa. Rok 1953 przyniósł kolejne wielkie odkrycie, James Watson i Francis Crick na podstawie badań Rosalindy Franklin i Maurice'a Willkins'a, opisali strukturę DNA, co przyczyniło się do lepszego zrozumienia genetyki nowotworu. W latach 70-80. XX wieku zaczęła się szerzyć, jak na ówczesne czasy, kontrowersyjna hipoteza związku między paleniem papierosów, a rozwojem nowotworu płuca [2], [5]. W latach 70. odkryto dwie szczególnie ważne rodziny genów związane z procesem kancerogenezy: onkogeny i geny supresorowe. Onkogeny powstają z "protoonkogenów", czyli prawidłowych genów, które są odpowiedzialne

za proliferację i wzrost komórek. W wyniku mutacji protoonkogeny przekształcają się w onkogeny, bezpośrednio przyczyniające się do transformacji nowotworowej poprzez stymulowanie nieograniczonego potencjału proliferacyjnego (np. c-Myc; ang. cellular myelocytomatosis; opisany w dalszej części rozdziału) [6]. Geny supresorowe pełnią funkcje hamujące proces nowotworzenia zapobiegając nadmiernym podziałom komórkowym [7]. Mutacje w tych genach powoduja upośledzenie ich funkcji hamujacej podziały komórkowe. Istotnym odkryciem dla współczesnej onkologii było opisanie białka p53 i jego genu (TP53) w 1979 roku, który obecnie jest jednym z najlepiej przebadanych genów supresorowych. Gen TP53 jest jednym z genów, który najczęściej ulega mutacji w nowotworach złośliwych. Obecnie jedna ze strategii w terapii skierowanej przeciwko nowotworom jest przywrócenie działania szlaków kontrolowanych przez białko p53. Inną obiecująca strategią terapii onkologicznej jest niewątpliwie immunoterapia, której celem jest zaangażowanie komórek układu immunologicznego do eliminacji komórek nowotworowych. Coraz więcej badań donosi, że białko p53 jest zdolne modulować wrodzona i nabyta odpowiedź immunologiczna [8], [9], [10]. Poza zrozumieniem roli białka p53 w stymulowaniu odpowiedzi immunologicznej istotne jest też poznanie mechanizmów aktywacji szlaku p53, która prowadzi do eliminacji komórek nowotworowych przez komórki układu immunologicznego [11]. Jednak rola białka p53 w immunologicznej odporności przeciwnowotworowej jest wciąż słabo poznana. Dlatego niniejsza rozprawa skupia się na próbie poznania, w jaki sposób szlak białka p53 może uczestniczyć w odpowiedzi przeciwnowotworowej związanej z działaniem układu odpornościowego.

1. Charakterystyczne cechy nowotworu - Hallmarks of cancer

"Charakterystyczne cechy nowotworów złośliwych" (ang. *Hallmarks of cancer*) to cykl artykułów poświęcony podsumowaniu obecnego stanu wiedzy na temat procesu nowotworzenia. Ponad 20 lat temu autorzy cyklu – Robert Weinber i Douglas Hannahan po raz pierwszy opisali cechy charakteryzujące komórki nowotworowe oraz na podstawie ówczesnej wiedzy podali w sposób usystematyzowany przyczyny procesu kancerogenezy (ryc.1.) [12]. W pierwszej edycji artykułu opisane zostało sześć podstawowych cech komórki nowotworowej, a w kolejnych latach listę systematycznie poszerzano [13], [14].

Do charakteryzujących cech komórkę nowotworów złośliwych zaliczamy:

- Zdolność do utrzymania nieograniczonego potencjału proliferacji
- Oporność na sygnały hamujące wzrost
- Unikanie śmierci komórkowej
- Indukcja angiogenezy
- Inwazyjność i przerzutowość
- Nieograniczony potencjał replikacyjny
- Zmiany w metabolizmie komórkowym

- Ucieczka przed nadzorem układu odpornościowego
- Niestabilność genetyczna
- Indukcja stanu zapalnego
- Ucieczka przed mechanizmami starzenia komórkowego
- Plastyczność fenotypowa
- Polimorfizm mikrobiomu
- Przeprogramowanie epigenetyki



Hallmarks of cancer

Ryc. 1. Cechy komórki nowotworowej (Hallmarks of cancer). Opracowanie własne na podstawie publikacji [12], [13], [14] w BioRender.

Zdolność do utrzymania nieograniczonego potencjału proliferacji: Komórka nienowotworowa (określana również jako komórka prawidłowa) to zdrowa komórka, która podlega kontrolowanemu wzrostowi i podziałom komórkowym. Posiada określony limit podziałów (limit Hayflicka, opisano poniżej) i spełnia funkcje zgodnie z potrzebami tkanki. Dodatkowo do prawidłowej proliferacji komórki nienowotworowe potrzebują mitogennych sygnałów wzrostu np. czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *Fibroblast Growth Factor*; FGF), nabłonkowy czynnik wzrostu (ang. *Epidermal Growth Factor*; EGF), czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego (ang. *Platelet-Derived Growth Factor*; PDGF) czy insulinopodobny czynnik wzrostu (ang. *Insulin-Like Growth Factor*; IGF). Dodatkowo, limit podziałów jest związany z telomerami, których długość skraca się z każdym podziałem komórki. Natomiast, komórki nowotworowe charakteryzują się nieograniczoną liczbą podziałów nawet przy braku zewnętrznych sygnałów wzrostu (co odróżnia je od komórek prawidłowych). Powodem niekontrolowanego podziału komórki nowotworowej są nabyte mutacje lub zmiany

epigenetyczne w genach zaangażowanych w regulację wzrostu komórek, takich jak onkogeny, które mogą naśladować sygnały wzrostu [12], [15].

Oporność na sygnały hamujące wzrost: W prawidłowych komórkach działa wiele sygnałów kontrolujących prawidłowy wzrost oraz podziały komórki. Jednym z takich czynników jest EGF, który działa jako ligand łącząc się z receptorem (ang. Epidermal Growth Factor Receptor; EGFR) na powierzchni komórek [16]. Po związaniu liganda z receptorem aktywowane są szlaki sygnałowe umożliwiające podział komórkowy, migrację czy przeżycie komórki. Sygnały kontrolujące wzrost mogą zatrzymać komórki w fazie G0 (stan spoczynku), z którego mogą kontynuować cykl proliferacyjny, gdy pozwolą na to sygnały zewnątrzkomórkowe. Alternatywnie, komórki mogą ulec zatrzymaniu w cyklu proliferacyjnym i przyjąć cechy związane z różnicowaniem. Komórki nowotworowe skutecznie unikają sygnałów hamujących proliferację. Kluczową rolę w tym procesie odgrywa białko pRB (ang. retinoblastoma protein), które pośredniczy w sygnalizacji hamującej proliferację i pełni funkcje Komórki nowotworowe wykorzystuja różne strategie, aby uniknać różnicowania. supresora. Jedna z nich jest związana z protoonkogenem c-Myc, który może przeciwdziałać procesowi różnicowania, promując wzrost komórki [17]. Protoonkogen c-Myc stymuluje geny zaangażowane w biosyntezę białek, metabolizm komórek nowotworowych oraz geny związane z cyklem komórkowym, jednocześnie hamując ekspresje genów supresorowych [12], [18].

Unikanie śmierci komórkowej: Dwie dekady temu apoptozę uważano za podstawową formę programowej śmierci komórkowej. Komitet ds. Nomenklatury Śmierci Komórkowej w 2018 r. zaproponował 13 różnych rodzajów programowej śmierci komórkowej [19]. Komórki nowotworowe posiadają zmienione mechanizmy wykrywające uszkodzenia lub nieprawidłowości, uniemożliwiając prawidłową sygnalizację i aktywacje apoptozy. Jednym z głównych celów terapii przeciwnowotworowych jest przywrócenie zdolności do ulegania apoptozie. Na przykład poprzez aktywację receptorów śmierci, które aktywując kaspazę-8 indukującą kaskadę kaspaz śmierci; kinaze RIP (ang. Receptor-Interacting Protein Kinases), która jest ważnym regulatorem stresu komórkowego. Inną strategią jest aktywacja szlaków proapoptotycznych, np. związanych z białkiem Bcl-2 (ang. *B-cell lymphoma 2*), które moduluje funkcje przeżycia poprzez regulacje mitochondrialnego cytochromu c. Wspomniane wyżej białko p53 odgrywa główną rolę w odpowiedzi komórkowej na uszkodzenia DNA i innych aberracjach genomowych [12], [20].

Indukcja angiogenezy: Angiogeneza to proces formowania nowych naczyń z już istniejących. Jest to istotny mechanizm w rozwoju embrionalnym, jak i w regeneracji tkanek czy reakcjach na urazy [21]. Komórki nowotworowe mogą aktywować ten proces poprzez uwalnianie czynników wzrostu np. czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (ang. *Vascular endothelial growth factor*; VEGF), którego aktywacja skutkuje powstawaniem nowych naczyń w celu pozyskiwania składników odżywczych i tlenu oraz usuwania ubocznych produktów przemian metabolicznych komórek nowotworowych. Zwiększona perfuzja krwi pomaga nie tylko rosnąć guzom, ale umożliwia rozprzestrzenianie się komórek nowotworowych do zdrowych tkanek [22]. Co bardzo istotne,

nowotworowe naczynia krwionośne są dysfunkcyjne (zaburzony przepływ krwi, rozszczelniony nabłonek itp.), co indukuje reakcje zapalne i niedotlenie, czyli napędza wzrost nowotworu i nabywanie potencjału przerzutowego [12].

Inwazyjność i przerzutowość: Przerzuty nowotworów są najpoważniejszą przyczyną niepowodzenia w leczeniu pacjentów onkologicznych. Inwazyjność to zdolność komórek nowotworowych do przenikania i rozprzestrzeniania się w otaczających tkankach. Zdolność do inwazji pobliskiej tkanki i przerzutowość do narządów odległych pozostaje główną cechą nowotworu złośliwego [12], [23], [24]. Nieograniczony potencjał replikacyjny: Komórki prawidłowe (z wyjątkiem komórek płciowych oraz komórek macierzystych) posiadają ograniczoną liczbę podziałów, wyznaczoną przez długość telomerów obecnych na końcach chromosomów. Telomery skracają się z każdym podziałem komórkowym, co prowadzi do aktywacji procesu starzenia komórkowego. Natomiast komórki nowotworowe unikają tej bariery dzięki enzymowi telomerazie, który ma zdolność do odbudowy długości telomerów. To umożliwia nielimitowane podziały komórkowe i unikanie starzenia. Prawidłowe komórki ssaków są wyposażone w mechanizmy zabezpieczające przed nieograniczonymi podziałami – limit Hayflicka - a także szlaki kontrolowane przez supresory nowotworowe tj. pRB oraz p53, które kontrolują cykl komórkowy [12], [25].

Zmiany w metabolizmie komórkowym: Przeprogramowanie metabolizmu komórkowego wynikające m.in. z mutacji protoonkogenów i genów supresorowych przyczynia się do powstawania nowotworów. Komórki nowotworowe potrafią pozyskiwać niezbędne składniki odżywcze z ubogiego środowiska, używając ich do przeżycia i budowy mikrośrodowiska guza [26]. Odkrycie Otto Warburga (efekt Warburga) sprzed ponad stu lat pokazało, że komórki nowotworowe preferencyjnie rozkładają glukozę tylko do etapu powstawania kwasu mlekowego (oddychanie beztlenowe) [27]. Ponieważ ten proces dostarcza ponad dziesięć razy mniej energii, niż pełny rozkład glukozy komórki nowotworowe intensywniej pobierają glukozę w porównaniu do komórek prawidłowych. Różne typy komórek w mikrośrodowisku nowotworowym takie jak fibroblasty, komórki śródbłonka i komórki układu odpornościowego (uczestniczące w odpowiedzi wrodzonej, jak i nabytej) ulegają charakterystycznym zmianom fenotypowym w związku z bliskością rosnącego guza. Mimo, że dokładny sposób przeprogramowania mikrośrodowiska guza wciąż nie jest w pełni poznany wiadomo, że jest ono wspomagane przez czynniki wzrostu, zmiany w macierzy zewnątrzkomórkowej oraz interakcje międzykomórkowe [13], [26], [28].

Ucieczka przed nadzorem immunologicznym: Mechanizmy, które pozwalają komórkom nowotworowym unikać kontroli ze strony układu odpornościowego, są istotne dla wzrostu nowotworu i jego zdolności do przerzutowania. Komórki nowotworowe posiadają zdolność do unikania nadzoru immunologicznego, zwanego także odpornością przeciwnowotworową. immunologicznego, Odporność przeciwnowotworowa to funkcja układu która polega identyfikacji i eliminacji komórek nowotworowych (dokładniej opisana w rozdziale na I.4 odporność przeciwnowotworowa). Pomimo aktywności przeciwnowotworowej układu

immunologicznego gospodarza, komórki nowotworowe potrafią skutecznie unikać nadzoru komórek odpornościowych poprzez różne mechanizmy, takie jak np. utrata zdolności prezentacji antygenu. To sprzyja postępowi nowotworu i oporności na immunoterapię [29]. Należy jednak pamiętać, że istnieją międzyosobnicze różnice aktywacji odporności przeciwnowotworowej u pacjentów onkologicznych. Wydaje się, że pacjenci o silniejszej wrodzonej odporności mogą skuteczniej walczyć z nowotworem [13], [30], [31].

Niestabilność genetyczna: Niestabilność genetyczna wynika z nieprawidłowego funkcjonowania mechanizmów utrzymujących stabilność genomu. W przypadku nowotworów dziedzicznych niestabilność genomu wynika z germinalnych mutacji w genach naprawy DNA, co przyspiesza rozwój nowotworu. W przypadku nowotworów niedziedzicznych molekularne podstawy niestabilności genomu są wciąż niejasne. W ostatnich latach przeprowadzono zaawansowane badania, za pomocą metod sekwencjonowania. Wskazują one, że mutacje w genach naprawy DNA w nowotworach niedziedzicznych występują rzadko przed terapią, a ich pojawienie się w trakcie lub po terapii może być spowodowane działaniem promieniowania lub substancji chemicznych stosowanych podczas leczenia [13], [32], [33].

Indukcja stanu zapalnego: Stan zapalny to reakcja organizmu gospodarza na infekcje i uszkodzenia tkanek, co zapobiega rozprzestrzenianiu się patogenów i sprzyja regeneracji organizmu [34], [35]. Wpływ stanu zapalnego w większości nowotworów działa niczym miecz obosieczny. Z jednej strony stan zapalny przyczynia się do nowotworzenia, a z drugiej strony jest wywoływany w trakcie terapii przeciwnowotworowej. Zwykle sygnalizacja stanu zapalnego umożliwia komórkom układu odpornościowego rozpoznanie zainfekowanego miejsca i usuwa patogeny czy komórki nowotworowe, co hamuje wzrost nowotworu. Jednakże przewlekły stan zapalny sprzyja procesowi nowotworzenia. Stan zapalny wywołany w ramach terapii przeciwnowotworowej ma na celu zaangażowanie komórek układu odpornościowego do zabijania komórek nowotworowych (np. komórki NK (ang. *Natural killer cells*), limfocyty pomocnicze Th1, limfocyty B) przy jednoczesnym hamowaniu komórek układu odpornościowego wykazujących pronowotworowy charakter (np. eozynofile, komórki tuczne, limfocyty pomocnicze Th2, limfocyty regulujące Treg itd.). Jednak, zapalenie wywołane terapią przeciwnowotworową często powoduje, że pozostałe komórki nowotworowe stają się oporne na kolejne cykle leczenia, co przyspiesza progresję nowotworu. W ramach terapii przeciwnowotworowy istotne jest poszukiwanie rozwiązań, które zapewniają równowagę stanu zapalnego [13], [36].

Ucieczka przed mechanizmami starzenia komórkowego: Starzenie komórkowe to odpowiedź komórki na czynniki stresowe charakteryzujące się zahamowaniem podziałów komórkowych oraz zmianami w morfologii i fizjologii komórki. Inicjacja procesu starzenia w komórce stanowi także mechanizm obronny, ponieważ na skutek terapii przeciwnowotworowej dochodzi do zatrzymania proliferacji, co zapobiega dalszej destabilizacji genomu. Za pośrednictwem interakcji międzykomórkowych - komórka nowotworowa inicjująca proces starzenia zmienia zestaw białek wydzielanych do środowiska (ang. *Senescence Associated Secreatory Phenotype*; SASP). To może

hamować proliferację innych komórek nowotworowych, poprawić dostarczenie leków i stymulować aktywną odpowiedź układu immunologicznego. Z drugiej strony, SASP może promować angiogenezę przyspieszając wzrost guza, co może nasilać migrację i przerzutowość. Obiecującym rozwiązaniem wydaje się być senoterapia, która eliminuje starzejące się komórki za pomocą środków zwanych senololitykami (mają na celu usuwanie komórek starzejących się (ang. *senescent cell*)) lub leków zwanych senomorfikami (substancje, które regulują starzenie komórkowe zmniejszając produkcję czynników SASP) [14], [37], [38].

Plastyczność fenotypowa (fenotypu): Plastyczność fenotypowa to zdolność komórek nowotworowych do zmiany fenotypu ("maskowania") w zależności od środowiska – jest to kluczowy mechanizm adaptacji do heterogeniczności środowiska. Powszechnie uważa się, że plastyczność fenotypu występuje m.in. podczas regeneracji tkanek czy gojenia się ran, jednak sam proces niesie ze sobą ryzyko nowotworzenia. Dlatego plastyczność fenotypu jest kluczowym zjawiskiem w zrozumieniu występowania i rozwoju choroby nowotworowej oraz oporności na leczenie [14], [39].

Polimorfizm mikrobiomu: Mikrobiom to zbiór mikroorganizmów takich jak bakterie, wirusy, grzyby i archeony, które występują w określonym środowisku np. organizmie człowieka, zarówno wewnątrz i zewnątrz organizmu. Organizmy te wpływają na fizjologię człowieka, a także na wiele funkcji np. metabolizm czy odporność [40]. Niektóre bakterie (np. Helicobacter pylori, Escherichia coli, Salmonella enterica) czy wirusy (np. wirus Epsteina-Barra) mogą promować proces onkogenezy poprzez cztery główne mechanizmy, tj.: indukcja uszkodzeń DNA i zmiany epigenetyczne, zakłócanie szlaków naprawy DNA, nieprawidłowa inicjacja szlaków sygnałowych oraz wywoływanie supresji immunologicznej. Z drugiej strony, endogenne drobnoustroje mogą wpływać na supresje nowotworu poprzez: zwiększanie odporności (poprzez stymulację interferonem-γ przez komórki immunologiczne), regulacje metabolizmu (np. poprzez produkcję maślanu, który może stymulować różnicowanie makrofagów zwiększając ich wrażliwość na bakterie). Do bakterii działających przeciwnowotworowo zalicza się: Lactobacillus spp., Faecalibaculum rodentium i Holdemanella biformis (ludzki homolog), czy Streptococcus termofile [41]. Mikrobiom odgrywa kluczową rolę w nowotworzeniu, ale nieprawidłowy mikrobiom może sprzyjać rozwojowi nowotworów i utrudniać terapię przeciwnowotworowa. Dlatego rekomenduje się suplementacje Lactobacillus spp. (bakterie kwasu mlekowego) jako suplementy diety podczas terapii. Na mysim modelu wykazano wpływ bakterii kwasu mlekowego związany z szlakiem sygnałowym cGAS/STING stymulowanym interferonem typu I [42]. Manipulacja mikrobiomem wydaje się być obiecującą szansą na poprawę wyników leczenia pacjentów onkologicznych [14], [43].

Przeprogramowanie epigenetyczne: Zmiany epigenetyczne sprzyjają niestabilności genomu, co przyczynia się do promowania procesu nowotworzenia oraz transformację w nowotwór złośliwy. Przeprogramowanie epigenetyczne nadaje komórkom nowotworowym specyficzny fenotyp tj. niekontrolowany wzrost, odporność na śmierć czy zwiększoną inwazyjność w stosunku do sąsiadujących tkanek, ale również nabywanie fenotypu przerzutowego [44].

miRNA (ang. *microRNA*) są jednymi z najlepiej scharakteryzowanych regulatorów ekspresji genów. Ich nieprawidłowa ekspresja przyczynia się do napędzania procesu kancerogenezy, zarówno nowotworów łagodnych czy złośliwych. Podobny wpływ obserwuje się w przypadku metylacji DNA, która może pośrednio wpływać na ekspresję miRNA poprzez hamowanie transkrypcji enzymów związanych z przetwarzaniem miRNA tj.: Dicer czy Drosha [45]. miRNA modulujące metylację DNA może zakłócać maszynerię epigenetyczną zmieniając ekspresję metylaz DNA lub białek pomocniczych. Na przykład miR-29 celują w metylazy DNA. Dotychczas ustalono, że miR-29 są komplementarne z 3'UTR DNMT3A i DNMT3B, a ich zaburzona ekspresja jest skorelowana z procesem powstawania raka płuca [46]. Przeprogramowaniu epigenetycznemu ulega wiele genów supresorowych, a nadmiernej ekspresji ulegają geny sprzyjające powstawaniu i progresji nowotworów [14], [44].

2. Historia odkrycia białka p53

Gen TP53 zlokalizowany jest na 17 chromosomie (17p13.1) i koduje białko p53 o 393 aminokwasach. Białko p53 zostało po raz pierwszy zidentyfikowane w 1979 roku (ryc.2.). Początkowo zostało opisane jako białko gospodarza, które wiąże się z antygenem wirusa SV40 (ang. Simian Vacuolating Virus 40 Tag) [47]. W analizie elektroforetycznej w żelu poliakrylamidowym SDS wykazano, że jego masa wynosi około 53 kDa, stąd nazwa "p53". Rzeczywista masa cząsteczkowa białka p53 wynosi 43,7 kDa. Ze względu na dużą liczbę reszt proliny w białku migracja w żelu poliakrylamidowym jest spowolniona, stad obserwacja prążka na wysokości ok. 53 kDa [48]. Początkowo uważano, że gen TP53 jest onkogenem, a wysokie stężenie białka p53 w embrionalnych fibroblastach szczura nadaje im potencjał nowotworowy [49], [50]. W komórkach nowotworowych gen TP53 jest często zmutowany lub tracony w wyniku delecji chromosomu 17 [51], [52]. Mutacje punktowe różnego typu (dokładniejszy opis mutacji zachodzących w genie TP53 opisano w rozdziale I.5) genu TP53 powoduje powstanie nieprawidłowego białka p53, co zaburza jego prawidłowe funkcje sprzyjając transformacji nowotworowej [53], [54]. Nadekspresja genu TP53 typu dzikiego w komórkach może skutecznie tłumić efekty wywoływane przez onkogeny tj. gen c-Myc czy gen RAS [53], [55]. Gen TP53 od ponad 40 lat jest jednym z najczęściej badanych genów supresorowych nowotworu stając się jednym z najlepiej przebadanych genów w ludzkim genomie [56], [57].



Ryc. 2. Kalendarium wybranych postępów w badaniach nad białkiem p53. Opracowanie własne na podstawie publikacji [57] w programie BioRender.

3. Regulacja poziomu białka p53 w komórce – rola kompleksu p53/MDM2

Białko p53 zlokalizowane jest głównie w jądrze komórkowym oraz w cytoplazmie. Ma zdolność wiązania się z DNA i regulacji wielu genów, które uczestniczą w różnych procesach komórkowych [58], [59]. W komórce prawidłowej poziom p53 jest niski, ponieważ podlega ścisłej kontroli inhibitorów p53 – tj. MDM2 (ang. *Mouse Double Minute 2*) i MDMX (ang. *Mouse Double Minute X*), które kierują p53 na drogę degradacji proteasomalnej przez jego ubikwitynację. W komórce narażonej na stres, zarówno zewnątrz- i wewnątrzkomórkowy - w tym uszkodzenia DNA, niedotlenienie, ograniczenie składników odżywczych, czy ryzyko mutacji (co może przyczynić się np. do aktywacji procesu nowotworzenia) - ubikwitynacja p53 zostaje zahamowana, co powoduje akumulację białka p53 wewnątrz komórki [60], [61]. Do aktywacji p53 przyczynia się zarówno fosforylacja i acetylacja C-końcowej domeny białka, ostatecznie doprowadzając do stabilizacji oraz akumulacji białka p53 w jądrze komórkowym. Stabilne p53 tworzy tetrametry tworząc kompleks z docelowym DNA i reguluje transkrypcję genów aktywując potrzebne szlaki sygnałowe [62], [63], [64].

Nadekspresja białka MDM2 przyczynia się do całkowitego zahamowania aktywności białka p53, co często jest obserwowane w nowotworach złośliwych, szczególnie w nowotworach płuca, piersi, wątroby, przełyku oraz jelita grubego. Rzadziej występują mutacje czy delecje genu *MDM2* [65].

Jednym z obiecujących podejść terapeutycznych w terapii przeciwnowotworowej jest hamowanie skutków nadekspresji genu *MDM2*. Pierwszymi zidentyfikowanymi inhibitorami MDM2 były nutliny, które są małymi cząsteczkami wykazującymi selektywne właściwości w zakłócaniu wiązania pomiędzy

białkami MDM2 i p53 [66], [67]. Związki te w pierwszym etapie działania aktywują szlak p53 hamując wzrost nowotworu. Mechanizm działania nutlin polega na wiązaniu się z hydrofobową szczeliną sekwencji aminokwasowej na N-końcu MDM2 naśladując reszty p53 Trp23, Leu26 i Phe19 [67]. W kilku badaniach przedklinicznych oceniano skuteczność nutliny-3a w leczeniu pacjentów onkologicznych z nowotworami hematologicznymi z amplifikacją genu *MDM2*. Stwierdzono wówczas, że nutlina-3a indukuje śmierć komórek niezależnie od białka p53 poprzez stabilizację białka p73, proapoptotycznego supresora nowotworu należącego do rodziny p53 – szczegółowy mechanizm działania nutliny-3a przedstawiono w rozdziale I.6. [68], [69], [70].

4. "Strażnik genomu", tylko czy aż? - funkcje białka p53

Gen *TP53* kodujący białko p53 od wielu lat jest znany jako "strażnik genomu", ponieważ geny zależne od p53 kodują białka uczestniczące w naprawie DNA oraz eliminujące komórki z uszkodzonym DNA w stopniu uniemożliwiającym efektywną naprawę. Białko p53 jest odpowiedzialne za utrzymanie homeostazy w komórce i prawidłowy przebieg jej rozwoju od podziału, aż do momentu jej śmierci. Prawdopodobnie białko p53 odgrywa istotną rolę w każdym procesie komórkowym (ryc.3.). Poniżej przedstawiono rycinę z wybranymi funkcjami białka p53 w komórce nowotworowej.



Ryc. 3. Wybrane charakterystyczne cechy białka p53. Opis znajduje się w tekście. Wykonanie własne za pomocą BioRender na podstawie publikacji [57], [71].

Cykl komórkowy: Kontrola cyklu komórkowego przez białko p53 jest jedną z charakterystycznych funkcji tego białka w prawidłowej komórce. W zatrzymaniu cyklu komórkowego pośredniczy białko p21 (WAF1) [72], [73]. Białko p21 wiąże się z kompleksem cykliny E/Cdk2 oraz cykliny D/Cdk4

powodując zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 [68]. Co więcej, białko p53 może uczestniczyć w zatrzymaniu komórki w fazie G2/M poprzez białko 14-3-3σ tłumiąc działanie kinazy cyklinozależnej Cdk2 [74], [75]. Dodatkowo białko p53 indukuje transkrypcje genów *Reprimo, B99* (znane także jako: *GTSE1* ang. *G2 And S-Phase Expressed 1*) oraz *mcg10* (znane także jako: *PCBP4*, ang. *Poly(RC) Binding Protein 4*), które także zatrzymują podział komórki w fazie G2. Z kolei, białko Gadd45 (ang. *Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein 45*), które uczestniczy w zatrzymaniu cyklu komórkowego oraz pośredniczy w naprawie DNA również jest regulowane przez białko p53. Rolą białka Gadd45 jest zakłócenie funkcji kompleksu cyklin B1/Cdk2, co także doprowadza do zablokowania cyklu w fazie G2 [75], [76], [77], [78].

Apoptoza: W 1991 roku zespół Orena po raz pierwszy opisał rolę białka p53 w apoptozie [79]. Termin "apoptoza" oznacza kontrolowany proces programowanej śmierci komórkowej mający na celu eliminację uszkodzonych, zbędnych lub potencjalnie szkodliwych komórek, zachowując przy tym homeostazę międzykomórkową bez wywołania stanu zapalnego. Podczas procesu apoptozy wyróżnia się dwa szlaki: wewnętrzny (mitochondrialny, regulowany przez rodziny białek BCL2) oraz zewnętrzny (szlak receptorów śmierci) [80]. Białka Bcl2 i Bcl-xL (należące do rodziny BCL2) hamuja apoptozę poprzez oddziaływanie z efektorowymi białkami BAK i BAX, a także innymi proapoptotycznymi białkami zawierającymi domenę BH3 [81]. Białko p53 bezpośrednio hamuje ekspresję genów kodujących białka Bcl2 i Bcl-xL prowadząc do aktywacji apoptozy [82]. Ponadto, p53 aktywuje ekspresję niektórych proapoptotycznych genów białek z rodziny BCL2 takich jak: BAX, BBC3 (ang. BCL2 Binding Component 3), PMAIP1 (ang. Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1). W przypadku zewnetrznego szlaku apoptozy białko p53 pośrednio indukuje transkrypcje genu kodującego receptor FAS - prawdopodobnie może kontrolować także inne receptory śmierci [83]. Aktywacja receptora FAS prowadzi do aktywacji kaspazy-8 za pośrednictwem białka adaptorowego FADD (ang. Fas-Associated protein with Death Domain) i w niektórych przypadkach, aktywacji TRADD (ang. TNF Receptor-Associated Death Domain) [84]. Jednak należy pamiętać, że białko p53 aktywuje również geny sprzyjające przeżyciu komórki odgrywając kluczową rolę w decydowaniu o losie komórki utrzymując równowagę homeostazy międzykomórkowej.

Pyroptoza: W 2015 roku zdefiniowano pyroptozę jako formę programowanej śmierć za pośrednictwem gasderminy (GDSMD). Nazwa "pyroptoza" wskazuje na wystąpienie stanu zapalnego - gr. "*pyro*" oznacza ogień, natomiast gr. "*ptoza*" oznacza opadanie lub obniżanie - odnosząc się do procesu śmierci komórkowej poprzez uwolnienie cytokin prozapalnych [85], [86]. Istnieje kluczowe podobieństwa pomiędzy pyroptozą a apoptozą, takie jak wystąpienie uszkodzenia DNA czy kondensacja chromatyny. Z drugiej strony, obserwuje się wiele różnic – np. komórki pyroptotyczne charakteryzują się występującym obrzękiem, a przed pęknięciem błony komórkowej pojawiają się liczne wypustki przypominających pęcherzyki. W przypadku obu rodzajów śmierci istotną rolę odgrywa kaspaza-3 [78], [87]. Szlak pyroptozy jest najczęściej aktywowany w odpowiedzi na infekcje, jednak może być zaangażowany w różne procesy patologiczne czy immunologiczne. Pyroptozę można wywołać

poprzez aktywacje prokaspazy-1, ale również za pośrednictwem innych kaspaz prozapalnych (u ludzi kaspazy-4 i kaspazy-5, a u myszy kaspazy-11). Aktywna kaspaza-1 aktywuje prekursory interleukin (IL-1 β i IL-18) w biologicznie czynne formy. Kaspazy zapalne (z wyjatkiem kaspazy-12) są aktywowane w obrębie inflamasomu. Inflamasom to wielkocząsteczkowy kompleks składający się z białek inicjujących inflamasom (NLRP1 (ang. NLR Family Pyrin Domain Containing 1), NLRP3 (ang. NLR Family Pyrin Domain Containing 3), NLRC4 (ang. NLR Family Pyrin Domain Containing 4), AIM2 (ang. Absent In Melanoma 2) lub piryna) i kaspaz prozapalanych, którym może towarzyszyć białko adaptorowe inflamasomu - ASC. Aktywacja kaspaz zapalnych związanych z inflamasomami napędza rozszczepienie czynnika propyroptotycznego - gasderminy D (GDSMD). To generuje N-końcowy fragment (N-GDSMD), który oligomeryzuje tworzac pory na błonie komórki gospodarza i wywołując lizę komórki [88]. Rola białka p53 w pyroptozie nie jest jeszcze w pełni poznana, ale dostępne badania sugerują, że może ono wpływać na ten proces. Szczególnie nadekspresja lub wyciszenie ekspresji genu TP53 w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuca A549 odpowiednio wywoływała lub hamowała pyroptozę. Potwierdzono, także interakcje pomiędzy p53 oraz NLRP3. Poziom p53 był podwyższony podczas pyroptozy wywołanej przez lipopolisacharyd (LPS) w linii komórkowej A549 [89]. Zespół Profesora Rusina (NIO-PIB; Gliwice) wykazał, że białko p53 może wpływać na aktywację kaspazy-1, a traktowanie komórek mieszaniną aktynomycyny D i nutliny-3a zwiększa produkcję kaspazy-1 [10]. Powyższe odkrycia jednoznacznie sugerują wpływ białka p53 na stymulowanie pyroptozy w komórkach nowotworowych.

Odporność przeciwnowotworowa: Przeciwnowotworowa odpowiedź immunologiczna jest jednym z najważniejszych czynników wpływających na odpowiedź organizmu na leczenie przeciwnowotworowe, czy rokowanie pacjentów nowotworowych. Odporność przeciwnowotworowa jest stosunkowo nowym pojęciem opisującym hipotezę "nadzoru immunologicznego" według, której komórki odpornościowe rozpoznają i eliminują komórki nowotworowe. Układ odpornościowy nie tylko eliminuje patogeny czy komórki nowotworowe, ale może także stymulować kancerogeneze [90]. Zespół Galona zaobserwował u pacjentów chorych na raka jelita grubego, że rodzaj, kumulacja i lokalizacja komórek odpornościowych naciekających nowotwór jest silnie skorelowana z przeżyciem pacjentów [91]. Białko p53 także bierze udział w odpowiedzi immunologicznej przeciwnowotworowej regulując geny takie jak: TRAIL, DR5, TLR, FAS, ULBP1/2 czy STING [71].

Gen *TRAIL* (ang. *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) jest docelowym genem p53, który ulega ekspresji głównie w komórkach odpornościowych (tj.: komórkach NK, limfocytach T, limfocytach NKT (ang. *Natural Killer T cells*), komórkach dendrytycznych czy makrofagach) [92], [93]. Białko TRAIL pośredniczy w apoptozie poprzez utworzenie kompleksu z receptorem DR5 [94]. Jedną z kluczowych funkcji TRAIL jest zdolność wywoływania apoptozy w komórkach nowotworowych jednocześnie chroniąc komórki prawidłowe [92], [95]. Dlatego TRAIL stał się przedmiotem badań jako potencjalny cel w terapii przeciwnowotworowej [96], [97].

Geny z rodziny TLR (ang. *Toll-like receptor*) są głównie zaangażowane we wrodzoną odpowiedź immunologiczną i wyzwalają syntezę interferonu typu I (IFN) poprzez czynniki regulacyjne interferony (ang. *Interferon Regulatory Factor*; IRF) [98]. Białko p53 może bezpośrednio aktywować geny białek IRF5 oraz IRF9 [99], [100]. IRF5 aktywuje transkrypcję genów cytokin prozapalnych, ale również może uczestniczyć w apoptozie komórek nowotworowych [101], [102], [103], [104]. W przypadku IRF9 uważa się, że p53 może sprzyjać aktywacji genów interferonów w odpowiedzi na wirusy, jednak może także promować przeżycie komórki nowotworowej poprzez zwiększenie wydzielania IL6 i fosforylacje białka STAT3 (ang. *Signal Transducer And Activator Of Transcription 3*) [100], [105].

Receptor FAS jest receptorem śmierci, kodowanym przez gen aktywowany bezpośrednio przez p53. Ulega on ekspresji na powierzchni wielu komórek i indukuje apoptozę po związaniu się z ligandem (FASLG). Powszechnie uważa się, że ligand receptora FAS na limfocytach T pośredniczy w aktywacji śmierci komórek swoiście rozpoznawanych przez limfocyty [106].

Komórki NK wykazują ekspresję receptorów NKG2D (ang. *Natural Killer Group 2D*), które wiążą się z ligandami ULBP1/2 (ang. *UL16-binding protein 1/2*), które są obecne na powierzchni komórek nowotworowych. Natomiast ligandy ULBP1/2 to białka, których geny są zależne od p53 i uczestniczą rozpoznawaniu komórek docelowych przez komórki NK [107].

Białko p53 odgrywa również istotną rolę w sygnalizacji szlaku cGAS/STING, który jest swojego rodzaju mediatorem stanu zapalnego, aktywowanym w odpowiedzi na obecność w cytoplazmie wolnego DNA, pochodzącego od drobnoustrojów lub chromosomów gospodarza [108]. Aktywowane białko STING (ang. *Stimulator Of Interferon Response CGAMP Interactor*) wyzwala fosforylacje białka IRF3, a następnie aktywne białko IRF3 w jądrze komórkowym aktywuje kaskadę genów białek prozapalnych. Dochodzi także do sygnalizacji szlaków interferonów, które odgrywają kluczową rolę w supresji nowotworu [109], [110]. Badania przeprowadzone przez grupę Profesora Rusina (NIO-PIB; Gliwice) wykazały, że traktowanie komórek raka płuca mieszaniną aktynomycyny D i nutliny-3a przygotowuje komórki nowotworowe do wydzielania interferonów poprzez zwiększenie ekspresji genu *STING* w sposób zależny od p53 [10].

Podsumowując, białko p53 może wpływać na odpowiedź przeciwnowotworową poprzez zwiększenie ekspresji genów aktywnych zarówno w komórkach nowotworowych, jak i w komórkach immunologicznych. Białko p53 może wpływać na szlaki IFN mogąc przyczyniać się do odpowiedzi komórek immunologicznych - nie tylko skierowanej na komórki nowotworowe, ale również patogeny [71]. Wpływ na immunologiczną odpowiedź przeciwnowotworową jest stosunkowo nowo poznaną funkcją białka p53, której poznanie wymaga szeroko zakrojonych badań.

5. Mutacje genu TP53

Po raz pierwszy mutacje somatyczne genu TP53 zostały opisane przez zespół Vogelsteina [111]. Wkrótce odkryto, że gen TP53 jest jednym z najczęściej zmutowanych genów obserwowany w wielu różnych typach nowotworów (mutacje występują w ok. 50% wszystkich nowotworów). Najczęściej obserwuje się mutacje w domenie wiążącej DNA pomiędzy resztami aminokwasowymi 102-292 (z 393 aminokwasów w białku o pełnej długości). Około 10% z nich to mutacje, które skutkują utrata prawidłowej funkcji i nie zostaje wytworzone funkcjonalne białko (ang. loss of function *mutations*), natomiast pozostałe mutacje powodują wytworzenie dysfunkcyjnego białka (ang. *missense* mutations). Utrata prawidłowej funkcji spowodowana mutacjami charakteryzuje się zmniejszeniem zdolności do specyficznego wiązania się z DNA w miejscach pośredniczących w transkrypcji genów regulowanych przez p53 [112]. Główne typy mutantów TP53 obejmują: mutacje zmiany sensu, mutacje skracające, mutacje zmieniające ramkę odczytu oraz mutacje splicingowe. Mutacje zmiany sensu powodują podstawienie pojedynczych aminokwasów, co może powodować uzyskanie nowej funkcji, która promuje powstawanie nowotworu (ang. gain of function mutations). Do takich mutantów należą: p53 R175H i R273H, które promują inwazyjność i migracje komórek nowotworowych. Z kolei, mutacje skutkujące skróconą formą białka, np. w eksonie 6 genu TP53, R196* oraz R213* sprzyjają proliferacji i przerzutom komórek nowotworowych. Mutacje zmieniające ramkę odczytu są spowodowane delecjami lub insercjami nukleotydów. Mutacje splicingowe zachodzą w miejscu wycinania intronów, co zmienia łączenie eksonów w obróbce postranskrypcyjnej. W genie TP53 zachodzą różne mutacje wywołane odrębnymi mechanizmami, które przyczyniają się do aktywacji procesu nowotworzenia [113]. Przeprowadzone sekwencjonowanie genu TP53 w materiale pochodzącym z różnych typów nowotworów wykazało, że zdecydowana większość ze 190 aminokwasów w domenie wiążącej DNA ulega mutacji. W przeciwieństwie do genu TP53 większość genów supresorowych ulega w nowotworach inaktywacji poprzez rozległe delecje lub mutacje punktowe, zmieniające ramkę odczytu lub generujące kodony terminacji translacji [114].

Inne badania wskazują, że około 80% mutacji genu *TP53* wykazuje mutacje zmiany sensu, a ich lokalizacje obserwuje się w eksonach 5-8, które kodują domenę wiążącą DNA. Najczęstsze miejsca występowania mutacji to: R175, G245, R248, R249, R273 oraz R282 są to tzw. "mutacje w gorących punktach" (ang. *hotspot mutations*). Analiza bazy danych COSMIC wykazała, że najwięcej mutacji punktowych to zamiana miejsc zasad azotowych guaniny (G) na adeninę (A) oraz substytucja cytozyny (C) w tyminę (T). Mutacje zmiany sensu dzieli się zwykle na dwie kategorie. Jedną z kategorii są mutacje kontaktowe DNA i dotyczą tych aminokwasów białka p53, które bezpośrednio stykają się z DNA tj. mutanty R273H i R248Q. Drugą kategorią są mutacje konformacyjne, które występują w aminokwasach utrzymujących poprawną strukturę domeny wiążącej DNA. W wyniku tych mutacji powstają cząsteczki o tak zmienionym kształcie, które tracą zdolność swoistego wiązania się z DNA są nimi na przykład: mutanty R175H, Y220C czy R249S [113]. Mutacja Y220C jest specyficzną

mutacją, ponieważ dotyczy aminokwasu oddalonego od miejsca wiązania DNA w cząsteczce białka p53. Wykazano, że niektóre sztucznie wytworzone cząsteczki organiczne mają zdolność do wiązania się w centrum hydrofobowym mutanta Y220C przywracając w ten sposób poprawny kształt i funkcję białka p53 [57], [113], [115].

Mutacje w domenie transaktywacji transkrypcji znajdującej się na końcu aminowym powodujące skrócenie formy p53 występują stosunkowo rzadko, ponieważ pojedyncza substytucja aminokwasowa w tym regionie zwykle nie powoduje utraty funkcji białka p53. Jednak większość mutacji występująca w domenie wiążącej DNA prowadzi do inaktywacji jego funkcjonalnej formy. Znaczenie funkcjonalne mutacji zależy nie tylko od aminokwasu, który zostaje zmieniony, ale również od rodzaju substytucji aminokwasowej. Mutant p53 R175C zachowuje zdolność zatrzymania cyklu komórkowego oraz indukcji apoptozy, z kolei mutant p53 R175D traci obie funkcje, natomiast mutant R175P traci zdolność indukcji apoptozy, ale zachowuje zdolność zatrzymania cyklu komórkowego. Dzieje się tak prawdopodobnie dlatego, że mutanty wybiórczo tracą zdolność aktywacji genów odpowiedzialnych za regulację apoptozy lub/i przechodzenia przez cykl komórkowy [116]. Ponadto istnieją mutacje genu *TP53*, które sprzyjają tworzeniu agregatów p53, które są wykrywalne m.in. w surowiczym raku jajnika, raku jelita grubego czy prostaty o wysokim stopniu złośliwości; co powoduje utratę funkcji supresora lub wzmocnienia funkcji sprzyjającej procesowi nowotworzenia [113].

6. Układ doświadczalny – synergistyczna aktywacja szlaku p53 za pomocą mieszaniny aktynomycyny D oraz nutliny-3a

Mieszanina aktynomycyny D i nutliny-3a (AN) synergistycznie aktywuje szlak p53 w różnych liniach komórkowych o dzikim statusie białka p53, zarówno nowotworowych i prawidłowych (nienowotworowych); schemat działania mieszaniny przedstawiono na ryc. 4. [117], [118].



Ryc. 4. Schemat działania mieszaniny AN, opis znajduje się w tekście poniżej. Wykonanie własne za pomocą programu BioRender, na podstawie: [117].

Aktynomycyna D (ActD) jest lekiem przeciwnowotworowym, który hamuje syntezę RNA poprzez wiązanie się z resztami guaniny oraz hamuje zależną od DNA polimerazę RNA typu I (RNA Pol I) produkującą rybosomalne RNA. ActD w komórkach nowotworowych działa jako cytotoksyczny induktor apoptozy wywołanej przez stres jąderka, który związany jest z blokowaniem RNA Pol I. ActD powoduje fosforylację p53, jednak dokładny mechanizm działania tego chemioterapeutyku nie jest do końca poznany [10], [119]. Z kolei, wcześniej wspominania nutlina-3a (mechanizm działania opisany w rozdziale I.3) zapobiega utworzeniu kompleksu MDM2/p53, co prowadzi do zwiększonej akumulacji p53 przez komórkę [67]. Grupa Profesora Rusina (NIO-PIB; Gliwice) w swoich badaniach przedstawiła obserwacje, które jednoznacznie wskazują, że stosowanie kombinacji ActD oraz Nut3a hamuje MDM2 i jednocześnie powoduje fosforylację p53, między innymi fosforylację seryny 46 [117]. Fosforylacja Ser46 jest związana z aktywacją proapoptotycznych właściwości białka p53 [120]. Zastosowanie osobno powyższych związków nie powoduje znaczącej fosforylacji Ser46. W omówionych badaniach wykazano podwyższoną aktywację białka p53 z fosforylowaną seryną 46

(Ser46) i wzrost poziomu białek oraz mRNA kodowanych przez geny zależne od p53 [117], [118]. Jednak mechanizm działania kombinacji aktynomycyny D oraz nutliny-3a nie jest w pełni poznany.

Jedna z hipotez zakłada, że działanie kombinacji AN wynika z faktu, że białko MDM2 nie tylko promuje degradację p53 poprzez jego ubikwitynację, ale również okrywa jego domenę aktywacji transkrypcji znajdującą się na końcu aminowym. W fizjologicznych warunkach hamuje to zdolność białka p53 do aktywacji transkrypcji. Nutlina-3a blokując wiązanie MDM2 z p53 nie tylko przeciwdziała ubikwitynacji, ale również może przeciwdziałać okrywaniu domeny aktywacji transkrypcji. Aktynomycyna D także stymuluje kinazy aktywujące p53 poprzez fosforylacje jego domeny aminowej. Nutlina-3a blokując MDM2 przeciwdziała okrywaniu p53, co daje aktywowanym przez ActD kinazom łatwy dostęp do p53 i aktywuje fosforylację wielu cząsteczek tego białka, które są w stanie silnie zaktywować liczne geny uczestniczące w szlaku białka p53.

Podobny do działania kombinacji AN efekt wykazuje lek przeciwnowotworowy, jakim jest kamptotecyna (CPT), która hamuje topoizomerazę I. Działanie CPT zakłóca prawidłową replikację i transkrypcje DNA indukując apoptozę prowadząc do zahamowania proliferacji [121].

Stosowanie zarówno CPT, czy mieszaniny AN sprzyja ekspresji genów zależnych od białka p53. Dowiedziono, że pod wpływem ww. substancji następuje aktywacja m.in genów odporności wrodzonej czy związanych z chorobą Alzheimera [10], [122]. Zastosowanie mieszaniny AN posiada tę zaletę, że aktywuje liczne geny zależne od p53, które nie podlegają aktywacji przez inne powszechnie stosowane czynniki stresu w badaniach nad białkiem p53. Dzięki zastosowaniu kombinacji AN można zidentyfikować nowe geny podlegające regulacji przez białko p53.

7. Rola układu immunologicznego w eliminacji komórek nowotworowych

Układ immunologiczny odgrywa kluczową rolę w obronie organizmu przed komórkami zakażonymi przez patogeny, a także komórkami nowotworowymi. Naturalną funkcją układu odpornościowego jest odporność przeciwnowotworowa (opisana wcześniej w rozdziale I.4.), która obejmuje zarówno elementy swoiste i nieswoiste. Do głównych komórek efektorowych układu odpornościowego o działaniu przeciwnowotworowym należą: komórki NK (ang. *natural killer cells*), komórki dendrytyczne (ang. *dendritic cells*; DC), makrofagi, leukocyty wielojądrzaste (ang. *polymorphonuclear neutrophils*; PMN – w tym neutrofile, eozynofile i bazofile), komórki tuczne i cytotoksyczne limfocyty T (limfocyty Tc). Komórki NK, DC, PMN, komórki tuczne i makrofagi są pierwszą linią obrony w odpowiedzi na komórki nowotworowe [123]. Komórki nowotworowe na swojej powierzchni często prezentują cząsteczki CD47 (tzw. "cząsteczki nie jedz mnie"), które blokują fagocytozę. Obecnie w terapii przeciwnowotworowej próbuje się poszukiwać terapii blokujących antygeny CD47 [124].

Dotychczasowy stan wiedzy wskazuje, że układ immunologiczny jest kluczowym mechanizmem obrony organizmu przeciw nowotworom. Oddziaływania pomiędzy układem odpornościowym, a komórkami nowotworowymi trafnie opisuje koncepcja "immunoredagowania nowotworu". Celem immunoredagowania jest stymulowanie lub modyfikacja odpowiedzi immunologicznej tak, aby uzyskać odpowiedź przeciwnowotworową. Rozróżnia się trzy główne etapy tego procesu: eliminację, równowagę oraz ucieczkę (ryc. 5.). W I etapie (eliminacja) układ odpornościowy rozpoznaje i hamuje wzrost nowotworu indukując śmierć komórkową. W etapie eliminacji uczestniczą komórki cytotoksyczne, takie jak limfocyty T czy komórki NK. Podczas etapu II (równowaga) dochodzi do przywrócenia równowagi pomiędzy eliminacja komórek nowotworowych, a ich powstawaniem. Komórki nowotworowe moga ulec pewnym modyfikacjom genetycznym, aby uniknać następnego ataku komórek układu odpornościowego (selekcja klonalna nowotworowych komórek niewykrywalnych przez układ odpornościowy). W ostatni etapie (ucieczka) komórki nowotworowe mogą "wymknąć się" spod nadzoru immunologicznego. Wówczas komórki nowotworowe moga nadal rozwijać mechanizmy unikania reakcji odpornościowych poprzez modyfikacje antygenów na błonie komórkowej lub hamujących aktywność układu wydzielanie substancji komórek odpornościowego. Skutecznie działające komórki układu immunologicznego, eliminując komórki nowotworowe na etapie przedinwazyjnym nie dopuszczając do trzeciego etapu immunoredagowania [125], [126], [127].



Ryc. 5. Mechanizm immunoredagowania nowotworu. Opis znajduje się w tekście powyżej. Wykonanie własne za pomocą program BioRender, na podstawie [125].

7.1. Rola komórek NK w odpowiedzi przeciwnowotworowej

Komórki NK są limfocytami o wyjątkowych właściwościach, ponieważ ich cytotoksyczne działanie nie wymaga wcześniejszej ekspozycji na antygen nowotworowy czy komórki zainfekowane wirusem. Mają zdolność do spontanicznego zabijania komórek docelowych [128]. Komórki NK stanowią 5-15% limfocytów w krwi obwodowej, a ich specyficzne formy występują także w tkankach np. w endometrium macicy. Jedną z charakterystycznych cech morfologicznych komórek NK jest duża liczba ziaren azurofilnych, które zawierają perforynę, granzynę czy granulizynę. To dzięki tym składnikom komórki NK posiadają cytotoksyczne właściwości umożliwiające im niszczenie komórek docelowych. Identyfikuje się je na podstawie markerów powierzchniowych: CD56 i CD16, których ekspresja umożliwia rozróżnienie dwóch głównych subpopulacje komórek NK (ryc. 6.):

- O dużej ekspresji CD56, nie mające na powierzchni CD16 lub o niskiej ekspresji subpopulacja CD56^{BRIGHT}CD16^{+/-}
- O umiarkowanej ekspresji CD56 i dużej ekspresji CD16 subpopulacja CD56^{DIM}CD16⁺.

Forma CD56^{DIM}CD16⁺ stanowi 90% komórek NK we krwi, natomiast w węzłach limfatycznych dominuje subpopulacja niedojrzałych komórek NK CD56^{BRIGHT}CD16^{+/-} (prawdopodobnie ze względu na intensywniejszą produkcję cytokin). Uznaje się populację CD56^{DIM}CD16⁺ za dojrzalszą, ponieważ wykazuje silniejszą aktywność cytotoksyczność czy zdolność do produkcji cytokin. Warto zaznaczyć, że populacja CD56^{bright}CD16^{+/-} może dojrzewać do formy o większej lityczności - CD56^{DIM}CD16⁺ [129].



Ryc. 6. Subpopulacje komórek NK we krwi człowieka: mniej dojrzałe CD56^{BRIGHT}CD16^{+/-} oraz w pełni dojrzała CD56^{DIM}CD16⁺. W nawiasach zaznaczono cząsteczki powierzchniowe o małej ekspresji i cytokiny wydzielane w mały ilościach. Opracowanie własne. Wykonane w programie BioRender na podstawie publikacji: [125], [130].

Ludzkie komórki NK rozwijają się głównie w szpiku kostnym, jednak mogą dojrzewać w tkankach poza szpikowych tj. migdałki i węzły chłonne. Bazując na zdolności do przekształcania się komórek NK w sprzyjających warunkach Freud i Caliguiri przedstawili liniowy model rozwoju i dojrzewania ludzkich komórek NK [130], [131]. Jak wszystkie leukocyty komórki NK wywodza się z komórek macierzystej hematopoetycznej (HSC; ang. hematopoietic stem cell). Następnie HSC przekształca się w wspólna (dla limfocytów B, limfocytów T i komórek NK) komórke progenitorowa limfopoezy. Nabycie fenotypu IL-1R1/CD122 oznacza, że komórka przekształci się w prekursorowa komórkę NK, a proces ten jest nieodwracalny. Różnicowanie się komórek NK w dalsze formy wymaga wpływu cytokin z których najważniejsza jest IL-15 (ryc.7.). Komórki te dojrzewają najpierw do komórek NK CD56^{BRIGHT}, a następnie mogą przekształcać się w NK CD56^{DIM} [131], [132]. Niewiele wiadomo o pochodzeniu adaptacyjnych (pamięciowych) komórek NK. Sugeruje się, że wywodza się z cytotoksycznych komórek NK (cNK) - CD56^{BRIGHT} oraz CD56^{DIM}. Koncepcja adaptacyjnych komórek NK sugeruje, że wykazują one niską ekspresję CD56, ale podobnie jak limfocyty T i B mają zdolność "zachowania" pamięci immunologicznej. Istnieją poszlaki sugerujące, że watroba może być miejscem "gromadzenia" pamięci przez komórki NK, ponieważ jest to narząd gdzie komórki NK często integruja z patogenami w sprzyjającym mikrośrodowisku. Główną różnicą adaptacyjnych komórek NK, a cNK jest "pamięć" ponownej ekspozycji na cytokiny. Adaptacyjnej komórki NK wykazują większą produkcję interferonu-γ. Jednak moga wykazywać na swojej powierzchni inne receptory od cNK [130].

Należy jednak podkreślić, że badania nad adaptacyjnymi komórkami NK są nadal w toku, a pełny zakres ich funkcji i roli w obronie immunologicznej wymaga lepszego zrozumienia.



Ryc. 7. Dojrzewanie komórek NK. Opracowanie własne wykonane w programie BioRender, na podstawie źródeł: [132], [133].

7.2. Aktywność cytotoksyczna komórek NK

Do czynników aktywujących i sprzyjających proliferacji komórek NK zalicza się głównie IL-2, ale także: IL-12, IL-15, IL-18 oraz IL-21. Cytotoksyczna odpowiedź komórek NK może być aktywowana bezpośrednio lub pośrednio. Komórki NK mają na swojej powierzchni liczne receptory, a ich aktywność lityczna jest wypadkową działania receptorów aktywujących i hamujących (ryc.8.). Do receptorów aktywujących należą receptory z nadrodziny cząsteczek immunoglobulinopodobnych. Rozpoznają one epitopy w łańcuchu α klasycznych cząsteczek MHC klasy I np.: KIR, NCR, NKp46, NKp44 itd. Natomiast do receptorów hamujących zaliczamy receptory lektynowe rozpoznające nieklasyczne cząsteczki MHC klasy I np.: CD94/NKG2, NKR-P1 (CD161) [133]. W zależności od tego, które z sygnałów przeważają komórka docelowa jest oszczędzana, bądź eliminowana. Sygnały hamujące dominują w zdrowym organizmie.



Ryc. 8. Model aktywacji cytotoksycznych funkcji komórek NK w zależności od przewagi sygnałów z receptorów – hamujących lub aktywujących. (A) Kiedy dominuje ekspresja receptorów hamujących komórka docelowa zostaje oszczędzona, ponieważ nie dochodzi do aktywacji cytotoksycznych właściwości komórek NK. (B) Jednak kiedy komórka docelowa ulegnie infekcji, bądź transformacji - wówczas przeważają sygnały aktywujące - dochodzi do uwolnienia cytokin przez komórki NK i eliminacji komórki docelowej. (C) Natomiast, kiedy ligandy MHC klasy I receptorów ulegają obniżeniu, co często występuje w komórkach nowotworowych dochodzi do utraty sygnałów hamujących i komórki NK mogą wyeliminować komórkę docelową. Wykonanie własne w programie BioRender na podstawie publikacji: [134].

Ligandami dla receptorów komórek NK są również cząsteczki MHC klasy I. Ich ekspresja jest informacją dla komórek NK, że dana komórka jest prawidłowa i nie powinna zostać zaatakowana (ryc.8.). Jest to podstawowy proces umożliwiający zachowanie homeostazy [128], [135]. Badania nad mechanizmami aktywującymi i hamującymi cytotoksyczne działanie komórek NK oraz ich interakcji z różnymi komórkami i cząsteczkami stanowią istotny obszar badań w immunologii.

Komórki NK aktywowane są poprzez interleukiny, między innymi IL-15, ale także IL-2 i IL-12. Bezpośrednio hamująco na aktywność NK wpływa prostaglandyna PGE₂ (wydzielana przez monocyty czy makrofagi), ale także kortyzol (hydrokortyzon). Po aktywacji komórki NK ulegają degranulacji, a następnie tworzą synapsę immunologiczną z komórką docelową. Utworzenie synapsy powoduje uwolnienie perforyn i granzymów (z ziaren azurofilnych), które po wniknięciu do wnętrza komórki docelowej aktywują kaspazy inicjując kaskadę zdarzeń, które prowadzą do indukcji apoptozy. Apoptoza inicjowana przez komórki NK może być także stymulowana poprzez produkcję TNF-α lubbezpośredni kontakt komórka-komórka za pośrednictwem aktywacji szlaków TRAIL
i FAS [136], [137]. Komórki NK w obecności komórki nowotworowej zwiększają ekspresję ligandów śmierci (tj. FAS i TRAIL) oraz wytwarzanie cytokin, takich jak interferon-γ.

Aktywacja pośrednia komórek NK zachodzi za pośrednictwem mechanizmu zależnego od przeciwciał - ADCC (ang. *antibody-dependent cellular cytoxicity*). W ADCC przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko antygenom prezentowanym na powierzchni komórek nowotworowych rekrutują komórki NK poprzez interakcje FcγR-Fc, co prowadzi do aktywacji komórek NK [138].

7.3. Rola komórek NK w immunoterapii

Dowiedziono, że występowanie zwiększonej liczby komórek NK w krwi obwodowej koreluje z lepszym rokowaniem w przypadku czerniaka, raka piersi, raka prostaty czy raka jelita grubego [139], [140], [141], [142]. Z tego względu komórki NK są wykorzystywane jako komórki terapeutyczne np. CAR-NK (ang. chimeric antigen receptor natural killer cells). Włączenie ekspresji chimerycznych receptorów antygenów na powierzchni komórek NK zapewnia możliwość wzmocnienia ich wrodzonego potencjału cytotoksycznego względem komórek nowotworowych [143]. W prowadzonych obecnie badaniach nad immunoterapią nowotworów wykorzystywana jest komercyjnie dostępna linia komórek NK-92, która została wyprowadzona z komórek NK mężczyzny rasy kaukaskiej chorującego na złośliwego chłoniaka nieziarniczego. Komórki linii NK-92 posiadają zarówno cechy komórek NK, czyli cytotoksyczność i zdolność wytwarzania cytokin, jak i cechy komórek nowotworowych, tj. nieograniczony potencjał replikacyjny. Linia NK-92 wykazuje fenotyp populacji CD56^{BRIGHT}CD16⁻KIR⁻ zależny od IL-2, ale charakteryzuje się wysoką cytotoksycznością wobec komórek nowotworowych charakterystyczną dla fenotypu CD56^{DIM}CD16⁺. W komórkach NK-92 nie dochodzi do ekspresji hamujących receptorów KIR przy zachowaniu wysokiej ekspresji receptorów aktywujacych. Linia NK-92 dostępna jest w zasobach banku komórkowego ATCC (ang. American Type Culture Collection) od 1998 roku. Obecnie jest również wykorzystywana w leczeniu pacjentów onkologicznych na całym świecie [144].

8. Szlaki interferonowe

Aktywacja p53 w prawidłowych lub nowotworowych komórkach poddanych stresowi prowadzi do wzrostu produkcji białek powierzchniowych (tj. MHC klasy I czy ligandów NK2D), co sprawia, że komórka staje się łatwiejszym celem dla komórek NK. Takimi białkami powierzchniowymi są ligandy dla aktywujących receptorów komórek NK oraz receptor liganda FAS. Z drugiej strony, komórki NK po kontakcie z komórkami nowotworowymi wydzielają interferon-γ. W pewnych fizjologicznych warunkach komórka nowotworowa lub prawidłowa może być poddana działaniu zarówno interferony-γ oraz innych cytokin z tej grupy czy działaniu czynników aktywujących białko p53 [71].

Interferony (IFN) to klasa cytokin, które są wytwarzane i wydzielane przez różne komórki w odpowiedzi na zakażenie patogenami. IFN zostały odkryte przez Alick'a Isaacs'a i Jean'a Lindenmann'a [145]. Wyróżnia się trzy typy IFN, które pełnią kluczową funkcję w reakcjach odpornościowych (ryc. 9.). Do IFN typu I zalicza się m.in. IFN- α czy IFN- β ; które wydzielane są przez komórki biorące udział w odporność wrodzonej (np. komórki dendrytyczne, makrofagi - choć uważa się, że wszystkie komórki są zdolne do produkcji tych cytokin). Do II typu IFN zalicza się IFN- γ , który jest wydzielany przez komórki NK, limfocyty T oraz najsilniej przez makrofagi. IFN typu III (znane także jako IFN- λ) wytwarzany są głównie przez komórki nabłonkowe [146].



Ryc. 9. Szlaki sygnałowe zależne od interferonów. Opis znajduje się w tekście poniżej. Opracowanie własne w programie BioRender na podstawie publikacji [147].

Wszystkie typy IFN są zdolne do aktywacji szlaku JAK/STAT (ang. *Janus kinases* (JAK); ang. *signal transducer and activator of transcription proteins* (STAT)), który jest jednym z kluczowych szlaków przekazywania sygnałów z receptorów cytokinowych w komórkach (ryc.9.). Receptory IFN są heterodimerami, które składają się z dwóch różnych podjednostek. IFN-α oraz IFN-β wiążą się do receptora zbudowanego z podjednostek IFNAR1 (ang. *Interferon Alpha And Beta Receptor Subunit 1*) i IFNAR2 (ang. *Interferon Alpha And Beta Receptor Subunit 2*). IFN-γ wiążę się z receptorem złożonym z podjednostek IFNGR1 (ang. *Interferon Gamma Receptor 1*) i IFNGR2 (ang. *Interferon Gamma Receptor 2*). Natomiast receptor IFN-λ składa się z podjednostek: IFNLR1 i IL-10Rβ. Po związaniu z receptorem obecnym w błonie komórkowej dochodzi do aktywacji kinazy tyrozynowej JAK, która fosforyluje białka STAT. Następnie białka STAT łączą się ze sobą tworząc homodimery lub heterodimery. W przypadku IFN-α, IFN-β oraz IFN-λ, powstały kompleks przyłącza się do białka IRF9 (tworząc tzw. czynnik transkrypcyjny ISGF-3 (ang. *interferon stimulated gene factor-3*)), a następnie do DNA. Powstały kompleks białek STAT transportowany jest do jądra komórkowego wiążąc się z DNA regulując transkrypcje genów stymulowanych przez interferon (ang. *IFN-stimulated genes*; ISG) [147].

Geny uczestniczące w szlaku interferon typu I zawierają sekwencję zwaną ISRE (ang. *interferon sensitive response element*), do której przyłącza się ISGF-3 stymulując ich ekspresję. Z kolei, geny uczestniczące w szlaku IFN-γ zawierają sekwencję zwaną GAS (ang. *gamma activated sequences*), do której przyłącza się homodimer ufosforylowanego białka STAT1. Częścią wspólną szlaku sygnalizacyjnego zależnego od interferonów typu I oraz IFN-γ jest białko STAT1. Podlega ono aktywującej fosforylacji aminokwasu tyrozyny 701 (Y701) zarówno w odpowiedzi na interferony typu I jak i interferonu-γ. W odpowiedzi na interferony typu I fosforylowany STAT1 tworzy heterotrimer ze STAT2 i IRF-9 wiążąc się z ISRE, natomiast w odpowiedzi na interferon-γ fosforylowany STAT1 tworzy homodimer i wiąże się z sekwencją GAS. Jak każdy szlak sygnałowy również szlak aktywowany przez interferony podlega negatywnej regulacji. W negatywną regulację szlaku JAK/STAT są zaangażowane białka z rodziny PIAS (ang. *Protein Inhibitor of Activated STAT*), rodziny CIS/SOCS (ang. *Cytokine-Inducible SH2-containing protein* (CIS); *Suppressor of Cytokine Signaling* (SOCS)) oraz białka PTP (ang. *Protein Tyrosine Phosphatase*) [147], [148].

II. Cele i teza badań

Aktualny stan wiedzy:

Gen TP53 kodujący białko p53 jest znany jako "strażnik genomu", a geny i białka zaangażowane w jego szlak uczestniczą w niemal każdym procesie komórkowym. Mimo, iż białko p53 jest badane od 40 lat i poczyniono nowe spostrzeżenie na temat mechanizmów regulacyjnych tego białka to wciąż nie poznaliśmy dokładnego obrazu jego funkcjonowania. Białko p53 uczestniczy w odpowiedzi przeciwnowotworowej, a gen TP53 jest jednym z najczęściej zmutowanych genów w chorobie nowotworowej [57], [71]. Mimo iż literatura naukowa sugeruje, że białko p53 może regulować odporność przeciwnowotworową to wspomniany obszar nie jest w pełni poznany. Dotychczasowe badania grupy Profesora Rusina (NIO-PIB Gliwice) wskazują, że mieszanina aktynomycyny D i nutliny-3a (AN) umożliwia aktywację białka p53 w liniach komórkowych wykazujących dziki status genu TP53. Konsekwencja tej stymulacji jest wzrost ekspresji wielu genów regulowanych przez p53, których zależności od tego białka dotąd nie poznano. Wiele z tych genów koduje białka odporności wrodzonej w tym białka, które reguluja aktywność komórek NK (natural killers) oraz aktywność szlaków sygnalizacyjnych prowadzących do ekspresji genów interferonów (IFN) jak i takich, które modulują odpowiedź komórki na działanie tych cytokin [10], [149]. Stąd prowadzenie badań w tym kierunku wydaje się konieczne i tym samym w ramach realizacji niniejszego projektu doktorskiego podjęto próbę lepszego zrozumienia roli białka p53 w odporności przeciwnowotworowej.

Teza pracy doktorskiej:

Przeciwnowotworowe białko p53 wpływa na działanie układu odpornościowego poprzez regulację aktywności genów i białek sprawiając, że komórki nowotworowe są efektywniej zwalczane przez komórki układu immunologicznego wykazujące działanie cytotoksyczne.

Cele pracy doktorskiej:

- 1. Sprawdzenie, czy geny aktywowane przez mieszaninę AN w co najmniej dwóch liniach komórkowych i kodujące białka układu odpornościowego są kontrolowane przez p53.
- Przetestowanie wpływu p53 na działanie wybranych sekwencji regulacji transkrypcji pochodzących z genów SLAMF7, KLRG2 oraz NCR3LG1.
- 3. Ocena wpływu wybranych chemioterapeutyków na ekspresję genu *SLAMF7*, kodującego białko aktywujące cytotoksyczne komórki NK.
- 4. Ocena wpływu mieszaniny AN i białka p53 na zdolność komórek NK do niszczenia komórek nowotworowych.
- 5. Poznanie wpływu białka p53 na ekspresję genów stymulowanych IFN-α lub IFN-γ.

III. Materiały i metody

1. Linie komórkowe

Materiał badawczy stanowiły ludzkie linie komórkowe charakteryzujące się odmiennym statusem genu *TP53* - opisany na podstawie informacji z bazy danych COSMIC (ang, *Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer*) [150]. Status ekspresji genu *TP53* oznaczono następująco: WT – dziki status *TP53* (ang. *wild type*); MUT – mutacja genu *TP53* (ang. *mutation*); DEL - delecja genu *TP53* (ang. *deletion*). Większość wykorzystanych linii pochodzi z banku ATCC (ang. *American Type Culture Collection*), natomiast linie UD-SCC-2 oraz UM-SCC-47 pochodzą z repozytorium Pani Profesor Theresy L. Whiteside z University of Pittsburgh Cancer Institute.

Numer kat. ATCC	Nazwa linii komórkowej	Tkanka/ narząd	Rodzaj nowotworu	Status TP53	Rodzaj mutacji genu <i>TP53</i>	Rodzaj hodowli
CCL-185	A549	płuco	niedrobnokomórkowy rak płuca	WT	-	adherentne
CRL-1848	NCI-H292	płuco	niedrobnokomórkowy rak płuca	WT	-	adherentne
HTB-177	NCI-H460	płuco	niedrobnokomórkowy rak płuca	WT	-	adherentne
CRL-5803	NCI-H1299	płuco	niedrobnokomórkowy rak płuca	DEL	del.	adherentne
CRL-5807	NCI-H358	płuco	niedrobnokomórkowy rak płuca	DEL	del.	adherentne
HTB-96	U-2 OS	kość	kostniakomięsak	WT	-	adherentne
HTB-85	Saos-2	kość	kostniakomięsak	DEL	del.	adherentne
CCL-243	K562	szpik kostny	przewlekła białaczka szpikowa	MUT	c. 406_407 insC	zawiesinowe
CCL-240	HL60	krew	ostra białaczka promielocytowa	DEL	del.	zawiesinowe
TIB-152	Jurkat	krew obwodowa	ostra białaczka z limfocytów T	MUT	c. 586 C>T	zawiesinowe
CRL-1739	AGS	żołądek	rak gruczołowy żołądka	WT	-	adherentne
CRL-1619	A375	skóra	czerniak złośliwy	WT	-	adherentne
CRL-2807	WM35	skóra	czerniak	WT	-	adherentne
CRL-2809	WM278	skóra	czerniak	WT	-	adherentne
CRL-2806	WM793	skóra	czerniak	WT	-	adherentne
HTB-43	FaDu	gardło	płaskonabłonkowy rak gardła dolnego	MUT	c. 743 G>T	adherentne
	UD-SCC-2	jama ustna	płaskonabłonkowy rak jamy ustnej	WT	-	adherentne

Tab. 1. Ludzkie nowotworowe linie komórkowe stanowiące materiał niniejszego projektu doktorskiego.

	UM-SCC-47	język	płaskonabłonkowy rak języka	WT	-	adherentne
--	-----------	-------	--------------------------------	----	---	------------

Tab. 2. Ludzkie linie komórkowe o właściwościach komórek prawidłowych wykorzystane w ramach projektu doktorskiego.

Numer kat. ATCC	Nazwa linii komórkowej	Tkanka/ narząd	Rodzaj komórek	Status TP53	Rodzaj mutacji genu <i>TP53</i>	Rodzaj hodowli
CRL-2407	NK-92	krew obwodowa	Naturalni zabójcy (ang. <i>Natural Killer)</i>	MUT	c. 976 G>T	zawiesinowe
CCL-156	RPMI 1788	krew obwodowa	Limfocyty B	WT	-	półzawiesinowe

Tab. 3. Prawidłowa linia ludzkich komórek wykorzystana w projekcie doktorskim.

Numer kat. (bank)	Nazwa linii komórkowej	Tkanka/ narząd	Rodzaj komórek	Status TP53	Rodzaj mutacji genu <i>TP53</i>	Rodzaj hodowli
CVCL_7467 (Coriell Cell Repositories, Camden)	GM07492	skóra	Prawidłowe fibroblasty	WT	-	adherentne

Wykorzystano także linie komórkowe, w których obniżono ekspresję genu *TP53* (A549, U-2 OS oraz NCI-H460) z wykorzystaniem metody CRISPR/Cas9 (ang. *Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats*); linie komórkowe uzyskane przez dr Barbarę Łasut-Szyszka (NIO-PIB, Gliwice). Za pomocą tej samej metody wyprowadzono linie A549 z obniżoną ekspresją genu *SLAMF7* (proces uzyskania linii z wyciszeniem ekspresji wybranych genów opisano w rozdziale III. 3.2).

1.1. Hodowla komórkowa w warunkach in vitro

Hodowle komórkowe prowadzono w warunkach *in vitro* w inkubatorze (Galaxy RS Biotech, Richmond Scientific) w standardowych warunkach: temperatura 37°C, z atmosferą 5% CO₂ oraz wilgotność 95%. Do hodowli ww. linii komórkowych stosowano komercyjnie dostępne pożywki hodowlane (Biowest lub Sigma) wraz z suplementami (EurX oraz Gibco) mającymi na celu wzbogacenie pożywki (wykaz pożywek hodowlanych wraz z suplementacją przedstawiono w tab. 4.). Wszystkie media hodowlane przygotowywano w sterylnych warunkach z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych zestawów filtracyjnych PES o wielkości porów 0,2 μm (Sarstedt) i przechowywano zgodnie z zaleceniami producenta.

Nazwa linii komórkowej	Rodzaj pożywki	Suplementacja pożywki
A549, U – 2 OS, NCI – H292	DMEM (ang. Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 1 g/1 L glukozy	 10% płodową surowicą cielęcą (ang. <i>Fetal</i> <i>Bovine Serum</i>, FBS) 1% mieszanina antybiotyków penicyliny- streptomycyny (Pen-Strep)
NCI – H460	RPMI 1640 (ang. <i>Roswell Park</i> <i>Memorial Institute</i>) 4,5 g/1 L glukozy	- 10% FBS - 1% Pen-Strep - 2 mM L-glutamina -1 mM pirogronianu sodu

 Tab. 4. Tabela przedstawia wykaz pożywek wraz z suplementacją stosowaną do hodowli komórek przedstawionych w tab. 1-3.

NCI – H1299, NCI-H358, K562, Jurkat, WM35, WM793B, UD-SCC2, UM-SCC47	RPMI 1640 1 g/1 L glukozy	- 10% FBS - 1% Pen-Strep
RPMI 1788, WM278	RPMI 1640 1 g/1 L glukozy	- 20% FBS -1% Pen-Strep
HL60	IMDM (ang. Iscove's Modified Dulbecco Medium) 1 g/1 L glukozy	- 20% FBS -1% Pen-Strep
AGS, Saos-2	McCoy's 1 g/1 L glukozy	- 10% FBS - 1% Pen-Strep
A375	DMEM 4,5 g/1 L glukozy	- 10% FBS - 1% Pen-Strep - 4,5 g/l glukozy
FaDu	MEM (ang. <i>Minimum Essential</i> <i>Medium</i>) 1 g/1 L glukozy	- 10% FBS - 1% Pen-Strep
GM07492	DMEM 1 g/1 L glukozy	- 15% FBS - 1% Pen-Strep
NK-92	RPMI 1640 1 g/1 L glukozy	-12,5% FBS -12,5% surowicy końskiej (ang. <i>Horse</i> <i>serum</i>) - 1% Pen-Strep - 2 mM L-glutamina -1 mM pirogronianu sodu - 1000 U interleukiny 2 (IL-2) (BioLike)

Hodowle komórek adherentnych utrzymywano w pojedynczej warstwie, w przeznaczonych dla tego rodzaju komórek butelkach hodowlanych o powierzchni 25 cm² lub 75 cm² (Sarstedt). Po osiągnięciu ok. 80% konfluencji warstwę komórek z dna naczynia odklejano z wykorzystaniem 0,05% Trypsyny/EDTA (Merck). Po usunięciu pożywki z butelki hodowlanej komórki przepłukiwano sterylnym buforem PBS. Następnie inkubowano je z trypsyną w 37°C do momentu oderwania się komórek od podłoża. Inaktywowano trypsynę 3-krotną objętością pożywki hodowlanej z 10% FBS. W celu usunięcia trypsyny uzyskaną zawiesinę komórkową wirowano przy 1200 obrotów na minutę (ang. *revolutions per minute*; rpm) przez 2 minuty w RT (ang. *room temperature*), a komórki zawieszano w świeżej porcji pożywki. Adherentne linie komórkowe utrzymywano w warunkach hodowlanych w konfluencji od 10 do 100%. Linie zawiesinowe zawieszano w pożywce, a ich liczbę określano w komorze Bürker'a. Komórki zawiesinowe wirowano w ww. warunkach i utrzymywano w gęstości ok. 50 000 komórek na 1 ml pożywki.

Komórki bankowano w przeznaczonej do tego pożywce, która zawierała 90% FBS oraz 10% dimetylosulfotlenku (DMSO; Merck) i przechowywano w oparach ciekłego azotu.

1.2. Przygotowanie chemioterapeutyków i stresorów

Na podstawie kart charakterystyk substancje rozpuszczano we właściwym rozpuszczalniku i przechowywano zgodnie z zaleceniami producenta (tab. 5). Wybór stężenia końcowego poniższych substancji został ustalony przez dr Małgorzatę Krześniak (NIO-PIB, Gliwice) na podstawie wartości IC50 (ang. *inhibitory concentration*) otrzymanych za pomocą testów sprawdzających aktywność metaboliczną. W przypadku interferonu-α1 i interferonu-γ stosowane dawki ustalono w ramach cyklu eksperymentów "odpowiedzi linii komórkowych na różne stężenia dawek". Końcowe stężenia przygotowywano bezpośrednio przed eksperymentem w pożywce hodowlanej.

			Q () • •	
Nazwa stresora	Firma	Rozpuszczalnik	Stężenie wyjściowe	Stężenie końcowe
Aktynomycyna D	Merck	DMSO	10 µM	5 nM
Nutlina-3a	Selleck Chemicals	DMSO	10 nM	5 μΜ
Kamptotecyna	Calbiochem-Merck	DMSO	10 mM	5 μΜ
Paklitaksel	Ebewe Pharma	Polioksyetylowany olej rycynowy (makrogologlicerolu rycynooleinian) i etanol.	7 mM	1-10 μM
Etopozyd	Ebewe Pharma	Alkohol benzylowy i etanol	34 mM	15 μΜ
Cis-platyna	Ebewe Pharma	0,9% roztworze NaCl	3,33 mM	10 µM
Interferon-α1 (IFN-α1)	Cell Signalling	PBS	75 μg/ml	1-2 ng/ml
Interferon-γ (IFN- γ)	Cell Signalling	Woda dejonizowana	100 µg/ml	1-2 ng/ml
Ligand FAS (FASLG)	ACROBiosystems	Woda dejonizowana	50 µg	25-50 ng

Tab. 5. Charakterystyka stresorów wykorzystanych w badaniach.

2. Skład wykorzystanych buforów oraz żeli do elektroforezy

Wszystkie odczynniki wykorzystywane do przygotowania buforów i żeli w niniejszej pracy doktorskiej są komercyjnie dostępne m.in. w ofercie firm: Merck, Roth Polska, Chempur i Bio-Rad. Przedstawione poniżej roztwory były przygotowywane z wykorzystaniem wody dejonizowanej, oczyszczonej przez filtry Mili-Q plus (Milipore). Przygotowane bufory były filtrowane przez komercyjnie dostępne sączki filtracyjne (Sarstedt).

BUFORY				
Nazwa buforu	Skład buforu			
Bufor TBE	• 89 mM Tris base			
	• 89 nM kwas borowy			
	• 2 mM kwas wersenowy (EDTA), pH= 8,0			
Woda traktowana DEPC (ang. DEPC-	• 1 L woda dejonizowana			
treated water)	• 0,1 % pirowęglan dietylu (DEPC)			
Bufor TBE do elektroforezy	• 89 mM Tris base			
oceniającej jakość RNA	• 89 nM kwas borowy			
	• 2 mM kwas wersenowy (EDTA), pH= 8,0			
	 ~ do 1L woda traktowana DEPC 			
Bufor obciążający stosowany do	• 4 M mocznik			
elektroforezy kwasów nukleinowych	• 50% roztwór sachorozy			
	• $0,05$ M kwas wersenowy (EDTA), pH= 7,0			
	• 0,1% błękit bromofenolowy			
PBS pH 7,4	• 134 mM chlorek sodu (NaCl)			
	• 2,7 nM chlorek potasu (KCl)			
	• 10 mM wodorotostoran sodu (Na ₂ HPO ₄)			
DDGT	• 2 mM diwodorofostoran sodu (KH ₂ PO ₄)			
PBS1	• Bufor PBS			
Pufor ID (ong Immunopresinitation	• 0,1% Tween 20			
Buffer) stosowany do lizy komórek	• 50 IIIM THS-ITCL PIT = 0.0 • 120 mM chlorak sodu (NaCl)			
<i>Duffer)</i> stosowany do nzy komorek	• 0.5% Nonidet P40 (NP40)			
	 Unbibitory proteoz; 			
	 Initiation protectal. 2.5 ng/µl leupentyna 			
	 250 mM PMSA 			
	 1 µg/µl apoliproteina 			
	 1 ng/µl pepstatyna A 			
	Inhibitory fosfataz			
3x bufor Laemmliego	• 450 mM Tris pH= 6,8			
	• 6% dodecylosiarczan sodu (SDS)			
	• 30% glicerol			
	 0,01% błękit bromofenolowy 			
	 Przed użyciem dodawano β-merkaptoetanol, który stanowił 			
	7,5% końcowej objętości			
Bufor do elektroforezy białek	• 250 mM Tris base			
	• 192 mM glicyna			
	• 0,1% dodecylosiarczan sodu (SDS)			
Bufor do elektrotransferu	• 25 mM Tris base			
	• 192 mM glicyna			
Dogtaván gonojony de hermel				
komórek	• 0,01% gencjany			
Determine Lunia Destari Desti (LD)	Woda dejonizowana			
rozywka Luria-Dertani Broth (LB)				

	Tab. 6. Skład	v buforów.	żeli oraz	pożvwki	do hodowl	i bakterii.
--	---------------	------------	-----------	---------	-----------	-------------

	 0,5% ekstrakt drożdżowy
	• 1% chlorek sodu (NaCl)
	• 2% Tris- HCl
Podłoże do hodowli bakteryjnej	• 1,5% agar
	 100 μg/ml amplicylina
	Pożywka LB
ŻELE DO	ROZDZIAŁU ELEKTROFORETYCZNEGO
Rodzaj żelu	Skład żelu
1-3% żel agarozowy	• 1-3% agarozy
	• TBE/TBE przygotowany z wodą traktowaną DEPC
	 0,8 μg bromek etydyny
8-13% żel akrylamidowy,	• 8-13% roztwór akrylamidu:bisakrylamidu (29:1)
rozdzielający	• 375 mM Tris pH = 8.8
	• 0,1% SDS
	• 0,1% APS
	• 0,1% TEMED (ang. <i>N</i> , <i>N</i> , <i>N</i> ', <i>N</i> ' tetramethylethylenediamine)
5% żel akrylamidowy, zagęszczający	• 5% roztwór akrylamidu:bisakrylamidu (29:1)
	• 130 mM Tris pH = 6.8
	• 0,1% SDS
	• 0,1% APS
	• 0,1% TEMED

3. Obniżenie ekspresji wybranych genów z wykorzystaniem mechanizmu CRISPR/Cas9

W wybranych liniach komórkowych (tj. A549 gen *SLAMF7*; NCI-H460 gen *TP53*) obniżono ekspresję genów za pomocą techniki CRISPR/Cas9, w tym celu użyto plazmidów *Double Nickase* (Santa Cruz Biotechnology; informacje o użytych plazmidach przedstawiono w tab. 7). CRISPR/Cas9 jest wszechstronnym narzędziem umożliwiającym m.in. edycję genomu w komórkach eukariotycznych. Nukleaza Cas9 jest kierowana na docelowe *loci* przez 20 pz sekwencję przewodnika RNA (gRNA, ang. *guide RNA*). Kiedy komplementarna sekwencja zlokalizuje miejsce wiązania dochodzi do dwuniciowego pęknięcia nici (DSB, ang. *Double-strand DNA Break*). W odpowiedzi na DSB aktywowany zostaje system naprawy DNA poprzez scalenie niehomologicznych końców DNA (NHEJ, ang. *non-homologous end joining*), co skutkuje przesunięciem ramki odczytu i finalnej syntezy dysfunkcyjnego białka [151].

Plazmidy *Double Nickase* (DN) z firmy Santa Cruz Biotechnology w swojej sekwencji zawierają gen oporności na puromycynę, który umożliwia selekcję komórek uległych transfekcji. Komórki te posiadają także wbudowany gen kodujący *Green Fluorescence Protein* (GFP; białko zielonej fluorescencji), który umożliwia m.in. ilościową ocenę komórek z wbudowanym plazmidem lub ich sortowanie. Aby wprowadzić konstrukty do linii komórkowych wykorzystano komercyjnie dostępne odczynniki FuGENE® 6 Transfection Reagent; w przypadku linii NCI-H460 zastosowano odczynnik ViaFectTM (oba odczynniki pochodzą z firmy Promega).

Nazwa plazmidu	Nazwa genu docelowego	Numer katalogowy	Produkt fimy
Control Double Nicase Plasmid	-	Sc-437281	
p53 Double Nicase Plasmid	<i>TP53</i>	Sc-416469	Santa Cruz Biotechnology
CS1 Double Nicase Plasmid	SLAMF7	Sc-401906	

Tab. 7. Spis plazmidów wykorzystanych do wyprowadzenia linii komórkowych z obniżoną ekspresją wybranych genów.

Pierwszym etapem było założenie hodowli wybranej linii komórkowej na 6-dołkowej płytce hodowlanej przeznaczonej do hodowli komórek adherentnych (Sarstedt). Następnego dnia przygotowano trzy mieszaniny, gdzie w 6-krotnej objętości odczynnika do transfekcji rozpuszczono odpowiedni plazmid *Double Nicase CRISPR* lub w przypadku kontroli negatywnej dodano wodę. Po upływie 24 godzin od transfekcji komórki obserwowano pod mikroskopem analizując sygnał fluorescencyjny. W celu selekcji komórek, które nie uległy transfekcji zastosowano puromycynę - przygotowano rozcieńczenie 9 μg/ml w świeżej porcji pożywki. Po 72 godzinach od dodania puromycyny komórki oporne na działanie antybiotyku zostały przeniesione do nowego naczynia hodowlanego. Skuteczność obniżenia ekspresji ww. genów sprawdzono techniką Western Blottingu (procedura opisana w rozdziale III. 5.3).

4. Ocena miejsca wiązania genu *TP53* z wykorzystaniem układu reporterowego lucyferazy w wybranych genach

Jednym z głównych celów niniejszego projektu doktorskiego było sprawdzenie czy wybrane geny (SLAMF7, KLRG2, NCR3LG1) kodujące białka uczestniczące we wrodzonej odpowiedzi układu odpornościowego znajduja się pod kontrola przeciwnowotworowego białka p53. W tym celu wybrano potencjalne miejsce wiązania białka p53 w sekwencjach analizowany genów na podstawie dostępnych danych z eksperymentów ChIP-Seq (ang. Chromatin immunoprecipitation sequencing; technika ta umożliwia ocenę interakcji badanego białka do regionu DNA) w bazie CHIP-Atlas [152], [153]. Do zweryfikowania miejsca wiazania białka p53 w sekwencji badanego genie wykorzystano testy reporterowe. W pierwszym etapie zaprojektowano startery zawierające sekwencje potencjalnego miejsca wiązania się białka p53, aby móc wyodrębnić dany fragment DNA, który wprowadzono do wektora (wektory wykorzystane w procesie transfekcji przedstawiono w tab. 8). Przy użyciu testów reporterowych sprawdzono, czy białko p53 reguluje ekspresje analizowanych genów. Aktywność białka reporterowego w populacji transfekowanych komórek jest w przybliżeniu proporcjonalna do poziomu mRNA, którego ilość jest determinowana przez aktywność testowanego odcinka regulującego ekspresję badanego genu. Powszechnie stosowanym genem reporterowym jest gen lucyferazy ze świetlika Photinus pyralis. Gen ten koduje enzym o masie czasteczkowej 61 kDa, który utlenia D-lucyferyne w obecności ATP, tlenu i jonów magnezu dając fluorescencyjny produkt, którego sygnał można zmierzyć ilościowo dzięki emisji światła (zjawisko bioluminescencji). W dalszych podrozdziałach opisano poszczególne etapy procesu.

Nazwa plazmidu	Opis	Źródło
pGL3-Basic	Wektor reporterowy z regionem kodujący lucyferazę świetlika (<i>Photinus pyralis</i>). Umożliwia wbudowanie wstawki.	Promega
pCI-neo	Wektor stanowiący kontrolę negatywną dla przeprowadzonych eksperymentów. Zawiera promotor ludzkiego wirusa cytomegalii (CMV).	Promega
pRL-TK	Kontrola wewnętrzna transfekcji, zawiera promotor genu <i>Rluc</i> (lucyferaza <i>Renilla reniformis</i>).	Promega
pC53-SN	Wektor ekspresyjny ludzkiego genu TP53 typu dzikiego.	Laboratorium Volgelstaina i K.W.
pC53-SCX3	Wektor ekspresyjny genu <i>TP53</i> z mutowanym kodonem 143, produkuje białko p53 pozbawione zdolności aktywacji transkrypcii.	University and Howard Hughes Medical Institute

Tab. 8. Plazmidy wykorzystane do przeprowadzonych testów lucyferazowych.

4.1. Izolacja DNA z hodowli komórkowej

Pierwszym etapem było założenie hodowli komórek linii A549 na płytce hodowlanej o powierzchni 21 cm², z której po upływie 48h izolowano DNA zgodnie z protokołem zestawu Genomic Mini (A&A Biotechnology). Komórki (1x10⁶) odwirowano i usunięto wcześniej dodany bufor PBS i zawieszono w buforze Tris. Do zawiesiny dodano roztwór lizujący, który zawiera proteinazę K (enzym trawiący białka). Preparaty inkubowano w 37°C przez 20 minut, a następnie w 70°C przez 5 minut. W kolejnym etapie próbki wirowano, a uzyskany nadsącz przeniesiono na wcześniej przygotowane złoża kolumn i ponownie wirowano. Złoże kolumn przemyto roztworem płuczącym i wirowano. Kolumny przeniesiono do nowych probówek, a złoża kolumn przemyto buforem płuczącym. Osuszone złoża kolumn przeniesiono do nowych probówek i nałożono uprzednio ogrzany (w temperaturze 70°C) bufor Tris. Próbki inkubowano przez 2 minuty w RT, a po zakończonej inkubacji wirowano. Po zakończeniu tego etapu kolumny usunięto z probówek i wykonano pomiar DNA.

Przyjmuje się, że dobrej jakości DNA ma następujące parametry: A260/280 >1,8 i A260/230 >1,8, do dalszych analiz wykorzystywano DNA o ww. parametrach [154]. Pomiar wykonano naNanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) w programie dedykowanym dla dsDNA. Preparaty DNA przechowywano w -20°C do dalszych analiz.

4.2. Analiza potencjalnego miejsca wiązania białka p53 w sekwencji wybranych genów z wykorzystaniem metody PCR

Pierwszym krokiem w konstrukcji wektorów służących do identyfikacji miejsc wiązania p53 w badanych genach jest amplifikacja matrycy DNA metodą PCR. Zaprojektowano pary starterów do sekwencji zawierającej miejsce wiązania p53 zidentyfikowane w oparciu o analizę wyników ChIP-Seq (przedstawione w tab. 9). W sekwencjach starterów zawarto sekwencje miejsc restrykcyjnych poprzedzone nukleotydami T, aby ułatwić enzymowi restrykcyjnemu wykonanie odpowiedniego cięcia produktu PCR (schemat plazmidu przedstawiono na ryc. 11).

Nazwa genu	Nazwa sterteru	Sekwencja 5'→3'	Długość produktu PCR [pz]	Produkt firmy
SLAMF7	Forward Sac	TTTT <mark>GAGCTC</mark> TCCTGGCTGGCTTATCACTG	627	
	Reverse Mlu	TTTT <mark>ACGCGT</mark> GCCTACTCAGGCAGTGTTGTAC	027	
KLRG2	Forward Sac	TTTT <mark>GAGCTC</mark> TGTGTCAAGGGCTATGGGAG	439	Genomed
KLK02	Reverse Mlu	TTTT <mark>ACGCGT</mark> GATATCTATGTCTCTATCTC	159	Genomed
NCR3LG1	Forward Sac	TTTT <mark>GAGCTC</mark> TCTGCACAACAGCCAGTACATC	764	
	Reverse Mlu	TTTT <mark>ACGCGT</mark> AGTCTCGTCAATGCACCACAATG	7.54	

Tab. 9. Sekwencje zaprojektowanych starterów wykorzystane w reakcji PCR. Kolorem zaznaczono miejsca restrykcyjne.

Przygotowano mieszaninę do reakcji PCR, której objętość końcowa wynosiła 50 µl. Matrycę reakcji stanowiło genomowe DNA (100 ng/ml). Dodatkowo zastosowano 2,5 U polimerazy Pfu Plus (EurX) i bufor Pfu zawierający 1,5 mM MgCl₂, natomiast w przypadku genu *KLRG2* zastosowano polimerazę PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara) i bufor (PrimeSTAR GXL Buffer). W przypadku każdej z mieszanin zastosowano 200 µM mieszaninę dNTPs (Thermo Fisher Scientific) oraz 0,5 µM każdego startera. Całość mieszaniny uzupełniono do końcowej objętości sterylną wodą dejonizowaną. Profil temperaturowy reakcji przedstawiono na rycinie poniżej (ryc.10.).



Ryc. 10. Schemat profilu temperaturowego przeprowadzonej reakcji PCR. Temperatura przyłączania starterów oraz czas wydłużania zależy od długości produktu. Wykonanie własne, za pomocą programu BioRender.

4.3. Ocena jakości produktu reakcji PCR i jego izolacja z żelu agarozowego

Po zakończonej reakcji PCR przeprowadzono ocenę jakości reakcji wykorzystując elektroforezę poziomą w żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny. Do preparatów DNA dodawano bufor obciążający, a analizę elektroforetyczną prowadzono w warunkach: napięcie 110 V przez 30 min. Po zakończonym rozdziale sprawdzono jakość produkt przy długości fali 365 nm z wykorzystaniem lampy UV i przy użyciu skalpela wycinano wybarwiony preparat, którego długość odpowiadała produktowi PCR (tab. 9). Preparaty oczyszczano przy pomocy zestawu Agarose-Out DNA Purification Kit (EurX). Przed rozpoczęciem procedury (zgodnie z zaleceniem producenta) aktywowano złoża kolumn poprzez nałożenie buforu A, natomiast do fragmentów żelu zawierających prawidłowy produkt reakcji PCR dodano bufor Orange A i trzykrotnie wymieszano przez inwersję. Mieszaniny inkubowano we wcześniej ogrzanym bloku cieplnym w temperaturze 55°C. Inkubację prowadzono, aż do całkowitego rozpuszczenia się agarozy. Zawiesiny nanoszono na aktywowane kolumny i wirowano przez 1 min z prędkością 12000 rpm. Złoża kolumn przemyto buforem płuczącym i ponownie wirowano w tych samych warunkach. Proces przemywania złóż kolumn powtórzono dwukrotnie. Kolumny przeniesiono do nowych probówek i dodano bufor elucyjny. Złoża kolumn inkubowano przez

2 min w RT, a następnie wirowano w ww. warunkach. Wykonano pomiar stężenia uzyskanych preparatów DNA na spektrofotometrze NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) zgodnie ze wcześniej opisaną metodą w rozdziale III 4.2. i przechowywano w -20°C.

4.4. Trawienie oczyszczonego produktu enzymami restrykcyjnymi

Enzymy restrykcyjne (nazywane także restryktazami) dokonują cięcia łańcucha polinukleotydowego w miejscu, gdzie występuje charakterystyczna dla danego enzymu palindromowa sekwencja DNA - miejsce restrykcyjne (ryc.11.).



Ryc. 11. Schemat wektora pGL-3 Basic z zaznaczonym miejscem rozpoznawanym przez enzymy restrykcyjne, uwzględnione w tab. 9. Wykonanie własne na podstawie ulotki producenta w programie BioRender. Oznaczenie skrótów na schemacie: *Ampr* – gen oporności na amplicylinę; f1 ori – sekwencja rozpoznawana przez enzymy replikacyjne.

Końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 50 μl (uzupełniona wodą) zawierała: bufor Tango (Thermo Fisher Scientific) przeznaczony dla wykorzystanych enzymów restrykcyjnych, oczyszczone DNA (lub w przypadku wektora, matrycę pGL3-Basic), enzymy restrykcyjne MluI i SacI. Miejsce rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne przedstawiono w tab. 10. Do mieszaniny reakcyjnej zawierającej plazmid pGL3-Basic (ryc. 11.) dodatkowo dodawano cielęcą, jelitową fosfatazę alkaiczną (ang. *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*; CIAP; Thermo Fisher Scientific), która katalizuje usuwanie grup fosforanowych na końcu 5' nici DNA, aby zapobiec samo-ligacji wektora.

Nazwa	Rozpoznawana sekwencja	Źródło
SacI	5' G A G C T \downarrow C 3'	Thermo Fisher Scientific
but	3' C ↑ T C G A G 5'	
MhuI	5' $A \downarrow C G C G T 3'$	Thermo Fisher Scientific
WIIUI	3' T G C G C ↑ A 5'	

Tab. 10. Enzymy restrykcyjne wraz z zaznaczonym miejscem cięcia.

Reakcje trawienia prowadzono przez 8h w temperaturze 37°C; po upływie 4h dodano dodatkową porcję buforu Tango i kontynuowano inkubację. Po zakończonej reakcji trawienia na podstawie analizy elektroforetycznej wybrano produkty do dalszych analiz (zgodnie z tab. 9). Uzyskane produkty reakcji trawienia zostały oczyszczane za pomocą ekstrakcji z żelu agarozowego zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale III. 4.3.

4.5. Reakcja ligacji

Ligacja to proces łączenia dwóch fragmentów kwasu nukleinowego za pośrednictwem enzymu. Do przeprowadzenia tej reakcji potrzebny jest kofaktor, zwykle w postaci ATP.

Celem przeprowadzenia reakcji ligacji przygotowano dwie niezależne mieszaniny reakcyjne dla kontroli ligacji (w celu sprawdzenia, czy nie dochodzi do procesu samo-ligacji wektora) oraz dla sekwencji badanego genu. Końcowa objętość obu mieszanin wynosiła 40 µl i składała się z: 0,5 mM ATP (ww. kofaktora reakcji), wektora pGL3-Basic, buforu dla ligazy T4 DNA (Thermo Fisher Scientific) oraz 5% glikolu polietylowego (PEG 4000, który stabilizuje tworzenie się kompleksu wektora i ligowanego fragmentu DNA). Mieszaniny przeznaczone do ligacji badanych genów zawierały sekwencję wstawki uzyskane w poprzednim etapie. Reakcję ligacji prowadzono przez ok. 20h w temperaturze 16°C.

Po zakończeniu reakcji inaktywowano enzymatyczne działanie ligazy, a uzyskane produkty poddano oczyszczaniu. Do produktów dodano 10 µl wody oraz 500 µl alkoholu butylowego a następnie uzyskane mieszaniny dokładnie wymieszano i wirowano w 12000 rpm przez 10 min w RT. Uzyskane osady najpierw przemyto 500 µl schłodzonego etanolu 96%, i dwukrotnie 70% etanolem. Po każdym przemyciu osad wirowano w warunkach: 12000 rpm przez 5 min w RT. Oczyszczone osady inkubowano przez ok. 30 min w RT, celem odparowania alkoholu. Po zakończonej inkubacji osady zawieszono w 12 µl sterylnej wody i rozpuszczano je przez ok. 1 h w RT kilkukrotnie mieszając w trakcie inkubacji. Zawieszone w wodzie produkty ligacji przechowywano w -20°C.

4.6. Transformacja bakterii

Transformacja bakterii to naturalnie występujący proces polegający na pobraniu ze środowiska obcego materiału genetycznego przez organizm gospodarza (komórki bakteryjnej) na skutek działania czynnika stresowego, który umożliwia wniknięcie do wnętrza komórki bakteryjnej.

Do transformacji bakteryjnej wykorzystano bakterie kompetentne ze szczepu DH5a *Escherichia coli* (Thermo Fisher Scientific). Do 100 µl rozmrożonych w 4°C bakterii kompetentnych dodano 5 µl produktu ligacji (tak samo postępowano w przypadku kontroli ligacji) i inkubowano przez 30 min na lodzie. Aby umożliwić wniknięcie plazmidu do wnętrza komórki wykorzystano "szok termiczny" (ang. *heat shock*). Probówki inkubowano przez 45 s w temperaturze 37°C, a następnie umieszczono je w lodzie na 2 minuty. Do transformowanych bakterii dodano 900 µl pożywki LB i przez godzinę wytrząsano w temperaturze 37°C. Namnożone bakterie wysiano na wcześniej przygotowane szalki Petri'ego ze stałym podłożem LB suplementowanym amplicyliną (100 µg/ml), a ich hodowlę prowadzono przez 12h.

Następnego dnia wybrano pojedyncze klony i dodano je do płynnej pożywki LB suplementowanej ampicyliną (100 µg/ml). Prowadzono całonocną hodowlę, a do dalszych etapów wybrano tylko zmętnione pożywki, które świadczą o namnożeniu hodowli bakteryjnej.

4.7. Izolacja plazmidowego DNA

Do izolacji plazmidowego DNA wykorzystano komercyjnie dostępny zestaw QlAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Postępowano zgodnie z protokołem przygotowanym przez producenta. Całonocne hodowle wirowano przez 7 min przy 5000 rpm w RT. Ostrożnie zlano powstały nadsącz, aby nie naruszyć powstałego podczas wirowania osadu, który zawieszono w 250 µl buforu P1. Do uzyskanej mieszaniny dodano 250 µl buforu P2 i kilkukrotnie delikatnie przemieszano zawiesinę przez inwersję. Do każdej mieszaniny dodano 350 µl buforu N3 i przemieszano przez inwersję, a następnie wirowano w 14000 rpm przez 10 min w RT. Uzyskany nadsącz przeniesiono do nowej probówki i ponownie wirowano ww. warunkach. Nadsącz naniesiono na wcześniej przygotowane złoża kolumn. Zawiesiny wirowano przez 1 min przy 14000 rpm w RT. Złoża kolumn przemyto poprzez dodanie 500 µl buforu PB i ponownie wirowano ww. warunkach. Ponownie przemyto kolumny dodając 800 µl buforu PE i wirowano w www. warunkach, każdorazowo zlewając uzyskany nadsącz. W nowych probówkach umieszczono kolumny; na złoża naniesiono po 50 µl buforu EB i inkubowano przez minutę w RT. Po zakończonej inkubacji probówki z kolumnami wirowano w ww. warunkach i wykonano pomiar DNA (proces pomiaru DNA opisano w rozdziale III.4.1.).

4.8. Trawienie sprawdzające

Aby upewnić się, że wybrane klony uległy prawidłowej transformacji przeprowadzono trawienie sprawdzające. Przygotowano mieszaninę składającą się z: 1 μg/μl plazmidowego DNA, buforu Tango, enzymów restrykcyjnych - SacI i MluI - a całość mieszaniny uzupełnioną sterylną wodą do objętości końcowej - 20 μl. Trawienie prowadzono przez 4h w temperaturze 37 °C, w połowie czasu inkubacji dodano nową porcję buforu Tango. Po zakończonej reakcji przeprowadzono analizę elektroforetyczną w 2% żelu agarozowym w celu sprawdzenia obecności wektora i wstawki (wektor (4818 pz) i wstawka (wielkość produktu przedstawiono w tab.9.).

4.9. Sekwencjonowanie uzyskanych wektorów z miejscem potencjalnego wiązania p53

Przeprowadzone sekwencjonowanie miało na celu potwierdzenia poprawności sekwencji wstawki wprowadzonej do wektora. Do sekwencjonowania wykorzystano komercyjnie dostępny zestaw BigDyeTM Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific) i parę starterów komplementarnych dla plazmidu pGL3-Basic (tab. 11.).

Nazwa starteru	Sekwencja 5' → 3'	Źródło
pGL3-SEQ1R	TCT TCC AGC GGA TAG AAT G	Genomed
pGL3-SEQ8F	TCA TTA CAT CTG TGT GTT GG	Genomed

Tab. 11. Sekwencja oligonukleotydów wykorzystana do sekwencjonowania.

Mieszanina reakcyjna składała się z: buforu dla Mixu BigDye[™], 1,6 pmola startera oraz 350-500 ng matrycy, którą stanowił plazmidowy DNA. Całość mieszaniny uzupełniono wodą do końcowej objętości 10 µl. Reakcje sekwencjonowania przeprowadzono w termocyklerze - denaturacja wstępna w temperaturze 96°C przez 3 s rozpoczynała 40-cyklową reakcję składająca się z denaturacji właściwej 96°C przez 10 s, przyłączania starterów w 52°C przez 5 s i wydłużania nici w 60°C przez 4 min. Uzyskane produkty przechowywano w 4°C.

Następnie produkty reakcji sekwencjonowania poddano wytrącaniu. Do probówek przeznaczonych do szybkiego wirowania (Eppendorf) dodano 1 µl 3 M octanu sodu o pH 4,8 oraz 25 µl 96% etanolu. Do roztworów dodano produkty sekwencjonowania, a następnie je zmieszano i inkubowano przez 20 minut na lodzie. Po zakończonej inkubacji mieszaniny wirowano z prędkością 14000 rpm przez 30 min w temperaturze 3°C. Usunięto powstały nadsącz i dodano 200 µl 70% etanolu i ponownie wirowano 14000 rpm przez 5 min w temperaturze 3°C. Po zakończonym wirowaniu usunięto powstały nadsącz, a osady wysuszono i przechowywano w -20°C.

Przed analizą sekwencjonowania do próbek dodano 20 µl wysoce dejonizowanego formamidu; mieszaniny inkubowano 20 min w RT. Po zakończonej inkubacji próbki poddano denaturacji mieszaniny inkubowano w 95°C przez 3 min, a następnie inkubowano je przez ok. 2 min na lodzie. Zdenaturowane matryce nakładano na płytkę 96-dołkową, po 12 µl mieszaniny reakcyjnej na dołek. Dzięki uprzejmości Zakładu Genetyki Klinicznej i Molekularnej (NIO-PIB; Gliwice) możliwe było przeprowadzenie analizy metodą Sangera w sekwenatorze 3500 xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Interpretację uzyskanych wyników przeprowadzono w darmowym programie FinchTV software (Geospiza Inc., Seattle, WA).

4.10. Ocena aktywności luminescencji w wybranych liniach komórkowych poddanych transfekcji

Ocenę aktywności bioluminescencji w wybranych liniach komórkowych przeprowadzono na dwa sposoby; w obu wykorzystano transfekcje poszczególnymi wektorami (w tab.8.). Głównym celem eksperymentu było sprawdzenie czy wybrany i sklonowany w plazmidzie reporterowym fragment DNA jest miejscem wiązania białka p53 w badanym genie. Dodatkowo sprawdzono, czy fragment DNA podlega regulacji przez białko p53. W eksperymentach wykorzystano dwa sposoby aktywacji białka p53: egzogenny – za pomocą plazmidów kodujących białko oraz endogenny – za pomocą mieszaniny aktynomycyny D oraz nutliny-3a (AN). W obu przypadkach hodowle prowadzono na płytce 24-dołkowej, a komórki wysiewano o konfluencji 25% na dołek.

Pierwszy sposób polegał na zwiększonej aktywacji egzogennego białka p53 z wykorzystaniem plazmidów, którymi transfekowano komórki linii U-2 OS. W tym celu, wykonano trzy mieszaniny z których każda zawierała: wektor pGL3-Basic z wbudowanym fragmentem testowanej sekwencji oraz wektor pRL-TK (0,01 µg; kontrola wewnętrzna). W zależności od próby dodawano: pCI-neo (kontrola negatywna), pC53-SN (wektor ekspresyjny *TP53*) lub pC53-CX3 (wektor ekspresyjny z mutacją *TP53* w kodonie 143) w stosunku 1:1 do wektora pGL3-Basic (czyli 0,1 µg : 0,1 µg). Aby umożliwić wniknięcie do komórek mieszaniny plazmidów do eksperymentu wykorzystywano komercyjnie dostępny odczynnik do transfekcji FuGENE® 6 Transfection Reagent (Promega). Przygotowywano go 3-krotnie stężonego względem transfekowanego DNA (na 0,6 µl FuGENE® 6 Transfection Reagent dodawano 0,2 µg DNA). Wcześniej rozpuszczony w medium odczynnik do transfekcji dodawano do mieszanin plazmidów i inkubowano przez 20 min w RT. Następnie do komórek rosnących w standardowej pożywce dodawano po 21 µl odpowiedniej mieszaniny. Po 24h od transfekcji wymieniano pożywkę na świeżą porcję (przedstawiona w tab. 4).

Drugi sposób polegał na endogennej aktywacji p53 poprzez mieszaninę AN. Dodatkowo, aby potwierdzić uzyskane wyniki oprócz linii komórkowej dzikiego typu U-2 OS wykorzystano, także linię U-2 OS CRISPR-Control oraz U-2 OS CRISPR-p53, z obniżoną ekspresją genu *TP53*. W tym eksperymencie przygotowywano mieszaninę plazmidu pGL3-Basic z wbudowanym testowanym fragmentem DNA (0,2 µg), plazmidu pRL-TK (0,01 µg) stanowiącym kontrolę wewnętrzną oraz ww. odczynnik do transfekcji 3-krotnie rozcieńczony względem transfekowanego DNA (na 0,6 µl FuGENE® 6 Transfection Reagent dodawano 0,2 µg DNA). Po 24h od transfekcji wymieniono pożywkę na zawierającą DMSO (stanowiący kontrolę dla eksperymentu) lub mieszaninę AN.

Po 48h od początku transfekcji usunięto pożywkę znad komórek i przepłukano komórki sterylnym roztworem PBS. Następnie usunięto PBS i dodano bufor PLB (bufor lizujący 5-krotnie rozcieńczony w wodzie destylowanej) i przez 20 min wytrząsano. Uzyskane w ten sposób lizaty przeniesiono do probówek i wirowano w 14000 rpm przez 10 min w 4°C.

Do testów lucyferazowych wykorzystano komercyjnie dostępny zestaw Promega-Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega), a pomiaru dokonano za pomocą luminometru (Lumat LB7507, Berthold Technologies) w przeznaczonych do pomiarów bioluminescencji probówkach. Do probówki pomiarowej dodano 60 µl odczynnika LARII, który umożliwia oznaczenie sygnału luminescencji lucyferazy świetlika (kodowanej przez plazmid pGL3-Basic) oraz 3 µl zebranego lizatu. Po wykonanym pomiarze do probówki z mieszaniną dodano 60 µl odczynnika Stop&Glo, który przerywa luminescencję lucyferazy świetlika i inicjuje reakcję lucyferazy *Renilla reniformis* (kodowanej przez plazmid pRL-TK). Aktywność tej lucyferazy stanowiła kontrolę wewnętrzną, do której odnoszono aktywność lucyferazy świetlika.

5. Immunodetekcja badanych białek - metoda Western Blotting

Technika Western Blotting umożliwia detekcję białek uzyskanych z różnego rodzaju materiału biologicznego. W tym celu stosuje się elektroforetyczny rozdział wcześniej zdenaturowanych białek. Rozdział elektroforetyczny przeprowadza się pionowo w żelach poliakrylamidowych, których procentowość dostosowuje się do masy cząsteczkowej badanego białka. Po zakończeniu rozdziału na podstawie masy białka przenosi się (ang. *blotting*) je na membranę, wykorzystując pole elektryczne, tzw. elektrotransfer. Membrany po elektrotransferze blokuje się w roztworze blokującym, aby zmniejszyć ryzyko fałszywie dodatnich wyników. W celu oceny badanych białek stosuje się przeciwciała, które rozpoznają określony antygen (epitop) badanego białka. Przeciwciało, które związało się z badanym białkiem (przeciwciało pierwszorzędowe) wykrywa się za pomocą innego przeciwciała (przeciwciało drugorzędowe), które jest sprzężone z enzymem (np. peroksydazą chrzanową (ang. horseradish peroxidase; HRP)) lub fluorochromem (obecnie rzadziej stosuje się przeciwciała sprzężone z izotopami). W ramach niniejszego projektu doktorskiego zastosowano przeciwciała drugorzędowe związane z enzymem, który reaguje z substratem chemicznym, co umożliwiło wytworzenie wykrywalnego sygnału świetlnego (chemiluminescencja). Możliwe jest wykorzystanie również technologii fluorescencyjnej do przeciwciał sprzężonych z fluorochromem. Sygnał wyzwalany w trakcie detekcji jest obserwowany za pomocą kamery lub błony światłoczułej.

5.1. Przygotowanie lizatów białkowych

Komórki z hodowli adherentnych zbierano dodając odpowiednią ilość trypsyny. Po zneutralizowaniu trypsyny pożywką zawiesinę komórkową wirowano w warunkach 1200 rpm przez 2 minuty. Następnie nadsącz usuwano, a osad komórkowy przemywano w 1 ml schłodzonego buforu PBS. Zawiesiny komórek przenoszono do nowych probówek i wirowano 2000 rpm przez 2 minuty w temperaturze 3°C. Po wirowaniu usuwano nadsącz i uzyskane osady komórkowe mrożono w -80°C.

Zamrożone osady komórkowe poddawano lizie w świeżo przygotowywanym buforze IP, a następnie zmieszano i inkubowano przez 15 min na lodzie. Po zakończonej inkubacji zawiesiny wirowano 14000 rpm przez 20 minut w temperaturze 3°C. Uzyskany nadsącz przenoszono do nowych probówek i oznaczano stężenie białek w próbce wykorzystując metodę Bradford (BioRad).

5.1.1. Przygotowanie lizatów białkowych z zagęszczonej pożywki

Sprawdzono także wydzielane białka do pożywki hodowlanej. W tym celu prowadzono eskpozycję na stresory przez 24h z wykorzystaniem standardowej pożywki hodowlanej. Następnie po tym czasie na kolejne 24h zmieniano pożywkę, która była pozbawiona FBS. Po upływie 24h zbierano pożywkę znad komórek i wirowano w 2000 rpm przez 2 min, aby odwirować ewentualne komórki. Następnie 4 ml uzyskanego nadsączu nanoszono na kolumny Vivaspin Turbo 4 (3,000 MWCO) aby zagęścić pożywkę hodowlaną. W tym celu, ponownie wirowano nadsącz (pożywkę) w kilku cyklach z prędkością 5000 rpm przez 30 min w temperaturze 20°C (liczba cykli była uwarunkowana od gęstości pożywki hodowlanej). Kiedy uzyskano zagęszczoną pożywkę w objętości niższej niż 400 µl, zakończono etap zagęszczania i przenoszono do nowych próbówek oceniając dokładną objętość uzyskanej pożywki. Następnie oceniono stężenie białka metodą Bradford (BioRad).

5.2. Oznaczanie stężenia białek metodą Bradford i denaturacja białek

Metoda Bradford to kolorymetryczne oznaczenie stężenia białka polegająca na odczycie absorbancji barwnika błękitu brylantowego Coomassie G-250 (ang. *Coomassie brillant blue G-250*). Kiedy barwnik zwiąże się z białkiem dochodzi do przesunięcia długości fali odpowiadającej maksimum absorpcji barwnika z 465 do 595 nm. Wartość absorbancji jest proporcjonalna do stężenia białka w próbce.

Oznaczanie stężenia białek było możliwe, dzięki komercyjnie dostępnemu odczynnikowi do metody Bradford (Bio-Rad). Na początku przygotowywano 5-krotnie rozcieńczony ww. odczynnik z wodą dejonizowaną. Stężenie białek wyznaczano dzięki krzywej kalibracyjnej, której wzorzec białka stanowiła albumina bydlęca (ang. *Bovine Serum Albumin*; BSA; Merck) o zakresie 0,1 - 20 µg/ml. Pomiaru dokonywano w 1 ml rozcieńczonego odczynnika Bradford i 2 µl badanej próbki (lub w przypadku krzywej wzorcowej, wzorca) w spektrofotometrze (BioPhotometer, Eppendorf) przy długości fali 595 nm.

Po wyznaczeniu stężeń próbki poddawano denaturacji białek - jest to nieodwracalny proces niszczenia struktury przestrzennej białka celem uzyskania postaci liniowej I-rzędu. Do próbek zawierających zdenaturowane białko dodawano połowę całkowitej objętości próbki 3x buforu Laemmliego zawierający β-merkaptoetanol (bufor redukujący) denaturujący mostki disiarczkowe. Uzyskaną mieszaninę poddawano denaturacji w temperaturze 95°C przez 5 min. Próbki chłodzono i przechowywano w -80°C.

5.3. Elektroforeza, elektrotransfer i inkubacja z przeciwciałami

W zależności od masy cząsteczkowej badanego białka dostosowywano procentową zawartość akrylamidu w żelu rozdzielającym.

Elektroforezę pionową prowadzono w obecności buforu do rozdziału elektroforetycznego białek. Na każdą ścieżkę nakładano 10-45 µg białek. Wykorzystano także marker wielkości (Thermo Fisher Scientific), którego zakres wynosi 250 – 10 kDa.

Po zakończonym rozdziale elektroforetycznym prowadzono mokry elektrotransfer podczas którego nastąpiło przenoszenie rozdzielonych białek na membranę PVDF (Thermo Fisher Scientific). W tym celu przygotowuje się tzw. "kanapkę", która składa się z bibuł Whatmana (Thermo Fisher Scientific), żelu, aktywowanej uprzednio w metanolu membrany PVDF (o porach 0,45 μm). Przygotowaną "kanapkę" umieszczano pomiędzy dwie elektrody zanurzone w buforze do elektrotransferu. Proces elektrotransferu prowadzono w warunkach: 4°C, przy stałym natężeniu prądu wynoszący 370 mA przez 2h.

Po zakończonym elektrotransferze białek membranę blokowano w 5% roztworze odtłuszczonego mleka rozpuszczonym w buforze PBST przez 1h na kołysce laboratoryjnej. Następnie przygotowywano rozcieńczenia przeciwciał I-rzędowych (zgodnie z tab. 12) i inkubowano membrany w przygotowanych roztworach przez całą noc w 4°C na kołysce laboratoryjnej.

Antygen	Pochodzące z organizmu:	Rozcieńczenie	Masa wykrywanego białka [kDa]	Numer katalogowy	Produkt firmy:
CASP1	Królika	1:3000	43	ab179515	Abcam
CASP3	Królika	1:1000	17,19	Asp175 (5A1E) 9664	Cell Signaling Technology
CASP8	Myszy	1:1000	18,43,57	1C12 9749	Cell Signaling Technology
CASP9	Królika	1:1000	35,37,47	9505	Cell Signaling Technology
FASR	Królika	1:1000	40-50	4233	Cell Signaling Technology
GAPDH	Królika	1:6000	36	G9545	Merck
HSC70	Myszy	1:3000	70	Sc-7298	Santa Cruz Biotechnology
IFIT1	Królika	1:3000	56	D2X9Z 14769	Cell Signaling Technology
IFIT3	Królika	1:3000	56	Ab95989	Abcam
IRF1	Królika	1:2000	55	8478	Cell Signaling Technology
IRF7	Królik	1:2000	55	22392-1-AP	Proteintech
MDA5 (IFIH1)	Królika	1:3000	135	5321	Cell Signaling Technology
MX1	Królika	1:3000	76	37849	Cell Signaling Technology

Tab. 12. Wykaz przeciwciał I-rzędowych wykorzystanych w niniejszej rozprawy doktorskiej. Wszystkie przeciwciała przygotowano w 5% roztworze odtłuszczonego mleka rozpuszczonego w buforze PBST.

NLRX1	Królika	1:2000	100	13829	Cell Signaling Technology
p21	Myszy	1:1000	21	F-5 Sc-6246	Santa Cruz Biotechnology
p53-pSer37	Królika	1:2000	53	9289	Cell Signaling Technology
p53-pSer15	Królika	1:1000	53	9284	Cell Signaling Technology
p53 (DO1)	Myszy	1:4000	53	DO-1 Sc-126	Santa Cruz Biotechnology
Phospho- STAT1 (Ser727)	Królika	1:5000	100	28979-1-AP	Proteintech
Phospho- STAT1 (Tyr701)	Królika	1:1000	84,91	7649	Cell Signaling Technology
PKR	Królika	1:3000	74	12297	Cell Signaling Technology
SLAMF7	Królika	1:3000	25-70	98611	Cell Signaling Technology
SOCS1	Myszy	1:1000	23	04-002	Sigma Aldrich
STAT1	Królika	1:6000	84	9172	Cell Signaling Technology

Po zakończonej inkubacji membrany przepłukiwano 5-krotnie (każde płukanie 10 min.) w buforze PBST. Następnie przygotowywano rozcieńczenia przeciwciał II-rzędowych sprzężonych z HRP (tab.13.), w których inkubowano membrany przez 1h w RT na kołysce laboratoryjnej. Po zakończonej inkubacji membrany przepłukano 5-krotnie buforem PBST.

Tab. 13.	Wykaz przeciwciał	II-rzędowych	wykorzystanych	w technice	Western	Blottingu,	odpowiednich	dla przed	ciwciał
I-rzędowy	ych. Przeciwciała II-	rzędowe rozcie	eńczano w 5% rozt	worze odtł	uszczoneg	go mleka ro	zpuszczonym v	v buforze	PBST.

Nazwa	Rozcieńczenie	Numer katalogowy	Produkt firmy:
Kozie przeciwciało IgG anty- królik sprzężone z peroksydazą chrzanową (Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP)	1:3000	31460	Thermo Fisher
Kozie przeciwciało IgG anty- królik sprzężone z peroksydazą chrzanową (Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP)	1:3000	31430	Scientific

W celu wizualizacji badanych białek stosowano komercyjnie dostępne zestawy do luminescencji SuperSignalTM West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate i SuperSignalTM West Femto PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific). Odczyt emitowanego światła był możliwy, dzięki systemowi do detekcji marki Syngene (G:BOX Chemi XT4 Gel and Blot Imager, Syngene) lub klisz fotograficznych (błona światłoczuła).

6. Proces izolacji całkowitego RNA

Proces izolacji RNA wykonywano dzięki komercyjnie dostępnemu zestawowi RNeasy Mini Kit (Qiagen). Po zakończonym eksperymencie komórki przygotowywano zgodnie z opisem przedstawionym w rozdziale III.5.1. Pelety komórkowe przechowywano w -80°C do izolacji całkowitego RNA. W tym celu poddano lizie w 350 µl buforu lizującym RLT (dołączonym do zestawu). Uzyskane lizaty nakładano na złoża kolumn QlAshredder (Qiagen) i wirowano przy 14000 rpm przez 2 min w RT (proces zmniejszania lepkości roztworu). Powstały przesącz przeniesiono na złoża kolumn gDNA eliminator i zwirowano przy 10000 rpm przez 30 s w RT (proces usuwania DNA). Po wirowaniu do uzyskanych przesączy dodawano 350 µl schłodzonego 70% etanolu. Powstałe zawiesiny nanoszono na złoża kolumn RNeasy Mini Spin Columns i wirowano w ww. warunkach, nadsącz usuwano z probówki. Na złoża kolumn nanoszono 700 µl buforu RW1 i wirowano w tych samych warunkach; powstały przesącz usuwano. Złoża kolumn dwukrotnie przepłukiwano 500 µl buforu RPE i wirowano. Po przemyciu złóż, kolumny przenoszono do nowych probówek i dwukrotnie wirowano przy 10000 rpm przez 1 min w RT (suszenie kolumn). Następnie na złoża kolumn nanoszono 50 µl wody wolnej od RNAz i inkubowano przez 5 min w RT. Po zakończonej inkubacji próbki wraz z kolumnami wirowano przy 10000 rpm przez 1 min i dwukrotnie eluowano powstałym przesączem (elucja RNA z kolumny). Po zakończonym procesie izolacji wykonano pomiar stężenia i jakości RNA. Uzyskane preparaty RNA przechowywano w -80°C.

6.1. Ocena ilościowa i jakościowa uzyskanego RNA

Pomiaru dokonywano na urządzeniu NanoDrop 1000 w programie dla kwasu rybonukleinowego przy parametrach: A260/280 i A230/260. Stężenie wyrażono w jednostkach ng/µl. Przyjmuje się, że dobrej jakości RNA ma parametry: A260/280>1,8 i A260/230>1,8; RNA o wysokiej jakości wykorzystywano do dalszych analiz [154]. Celem wizualizacji frakcji RNA (tj. 28S, 18S i 5S) przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w 1% żelu agarozowym w buforze zawierającym DEPC w obecności bromku etydyny, a środowisko jonowe zostało zapewnione dzięki buforowi TBE przygotowanemu w wodzie traktowanej DEPC. Rozdział elektroforetycznym przeprowadzono przy napięciu 110 V przez 30 min. Oceny jakości dokonano z użyciem systemu do analiz i dokumentacji żeli (Syngen).

7. Analiza ekspresji wybranych genów na poziomie mRNA (Real-Time PCR)

Technika real-time PCR (znana także, jako PCR w czasie rzeczywistym) jest jedną z odmian reakcji PCR. Umożliwia śledzenie procesu namnażania badanych fragmentów w czasie rzeczywistym, dzięki zjawisku fluorescencji, a wykładniczy wzrost krzywej pozwala na ilościowe określenie produktu.

7.1. Synteza cDNA

Aby uzyskać cDNA (komplementarne DNA) wykorzystano proces odwrotnej transkrypcji z wcześniej wyizolowanego RNA z komórek. Mieszaninę reakcyjną przygotowano w końcowej objętość 20 μl i zawierała: 1 μg całkowitego RNA (matryca reakcji), 4 U odwrotnej transkryptazy M-MLV (Invitrogen), 0,5 μM losowych heksamerów (ang. *random hexamer*; zastępujące startery w reakcji; Invitrogen), bufor B i 5 mM MgCl₂ (Applied Biosystem), a także 1 mM roztworu mieszaniny dNTPs i 1 U/μl inhibitorów RNAz (Applied Biosystem). Reakcje przeprowadzono w termocyklerze w warunkach reakcji: 10 min w 22°C, następnie 30 min w 42°C, inaktywacja odwrotnej transkryptazy w 99°C przez 5 min. Po zakończonej reakcji próbki rozcieńczano 4-krotnie i przechowywano w -20°C.

7.2. Real-time PCR (RT-qPCR)

Reakcje real-time PCR przeprowadzano z wykorzystaniem komercyjnie dostępnej mieszaniny RT PCR Mix SYBR (A&A Biotechnology) zgodnie z zaleceniem producenta. SYBR Green I jest znanym barwnikiem fluorescencyjnym, który specyficznie wiąże się do dsDNA, a wyzwalany sygnał jest wprost proporcionalny do ilości DNA w badanej próbie. Mieszanina reakcyjna przygotowywano na 10 µl końcowej objętości i zawierała: 0,1 U/µl polimerazę DNA Taq, 4 mM MgCl₂, uprzednio przygotowane cDNA oraz 2x stężony bufor reakcyjny zawierający SYBR Green. Do mieszaniny reakcyjnej dodatkowo dodawano wcześniej przygotowane cDNA i parę starterów o stężeniu 0,3 µM każdy. Wykorzystane startery przedstawione w tab. 14. zsyntetyzowane zostały w firmie Genomed. Temperature przyłączania starterów ustalono poprzez reakcje w gradiencie temperaturowym.

Nazwa genu	Nazwa sterteru	Sekwencja 5'→3'	Wielkość produktu (pz)	Temperatura przyłączania [°C]	
ACP5 (ang. Acid Phosphatase 5)	Forward	CTTTGTAGCCGTGGGTGACT	103	69	
	Reverse	CAGGATCTGCACAGTCCGAG	100		
ACTB	Forward	CAAATAAAGCCATGCCAATC	144	56	
(ang. Actin, Beta)	Reverse	GCAAGCAGGAGTATGACGAG			
APOL3	Forward	GGTGGTGATCCCAGTCACAG	153	68	
(ang. Apolipoprotein L3)	Reverse	TCCAATGTGGTGTCCAGCTC	100	00	
BEX2	Forward	GAGTCCAAAGAGGAACGAGCG	123	68	
(ang. Brain Expressed X- linked 2)	Reverse	ATTCAAAGGTAGGGCCAAGGG	123	50	

Tab. 14. Sekwencje starterów wykorzystanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej.

CASP1	Forward	TCGCTTTCTGCTCTTCCACA	110	69	
(ang. Caspase-1)	Reverse	TCCACATCACAGGAACAGGC	110	00	
CIBAR2	Forward	GTGACTTTGTAACTATTGAGATGGT	104	(0)	
BAR Domain Containing 2)	Reverse	CAGTAGATCCCTCTCCAGGTCA	104	69	
CRABP2	Forward	CCTGGTGAAATGGGAGAGTGA	110	60	
(ang. Cellular Retinoic Acid Binding Protein 2)	Reverse	TCA GTTCCCCATCGTTGGTC	110	09	
CTHRC1	Forward	AGTGGCTCACTTCGGCTAAA	121	61	
Helix Repeat Containing	Reverse	ATTTCAGGGCTTCCTTGGTCC	151	01	
DDX60	Forward	GCAACCCAGAGTCATGGACA	114	54	
(ang. DEAD-Box Helicase 60)	Reverse	ACAAGTCCAGCAAACCCCAT	114	54	
EOMES	Forward	CTGAAAGAGGGCTGTGCCTT	152	64	
(ang. Eomesodermin)	Reverse	TCCAAAAGCCGGGGGGTTAAG	152	04	
GAPDH	Forward	TTCCATGGCACCGTCAAGGC	172	(2)	
(ang. Grycerataenyae 5- Phosphate Dehydrogenase)	Reverse	TGCAAATGAGCCCCAGCCTTCT	1/5	03	
GAST	Forward	CGACTGTGTGTGTGTATGTGCTG	100	60	
(ang. Gastrin)	Reverse	TACCTAAGGGTGCATCTGGCT	100	09	
ICAM1	Forward	AACCTGCCTTTCCCCAGAAG	100	67	
(ang. Intercellular Adhesion Molecule 1)	Reverse	ACCGCTGAGTGTCATTGTGA	190	07	
ICOSLG	Forward	AAGCTTCTGTCCCTCATGCC	166	69	
(ang. Inducible T Cell Costimulator Ligand)	Reverse	TCTCACAAATGCCGACGTGA	100	0)	
IF16	Forward	AATGCGGGTAAGGATGCAGG	200	67	
(ang. Interferon Alpha Inducible Protein 6)	Reverse	CCATTCAGGATCGCAGACCA	200	07	
IFI16	Forward	GAGCAAGCCAGCACTAGTCA	119	56	
(ang. Interferon Alpha Inducible Protein 16)	Reverse	CGGAACCGCAGGATGTTGTA		20	
<i>IF127</i>	Forward	CTTCACTGCGGCGGGAATC	158	59	
(ang. Interferon Alpha Inducible Protein 27)	Reverse	CCAGGATGAACTTGGTCAATCC	100	0,	
IFI44	Forward	ACGAATTCTGCTGCTGGGTC	100	52	
(ang. Interferon Alpha Inducible Protein 44)	Reverse	CACCAAAGCCTGATGCGTTAC			
IFIT1 (ang. Interferon Induced	Forward	TGGCAGAAGCCCAGACTTAC	187	66	
Protein With Tetratricopeptide Repeats 1)	Reverse	TCAGGGTCCACTTCAAGCAC			
IFIT2	Forward	AGGAAGGGTGGACACGGTTA	178	66 5	
Protein With Tetratricopeptide Repeats 2)	Reverse	TGCCTCAGAGGGTCAATGGC	170	00,5	
IFIT3	Forward	GGGCAGACTCTCAGATGCTC	159	55	
Protein With Tetratricopeptide Repeats 3)	Reverse	TCAAAACACACCTTCGCCCT	1.57	55	
IFITM3	Forward	TAGGGACAGGAAGATGGTTGG	122	54	
(ang. Interferon Induced Transmembrane Protein 3)	Reverse	GGATGACGATGAGCAGAATGG		JT	
INKA1	Forward	ACAGCTATGGCAGGAAAGCG	121	69	
(ang. <i>inka Box Actin</i> <i>Regulator 1</i>)	Reverse	CATTGCAGATGATGGGCTGG			

IRF1	Forward	AAGGAAAGTGGGGTCCTTCG	124	67
(ang. Interferon Regulatory Factor 1)	Reverse	ATGTGGCAAGATCCACACGA	124	
IRF9	Forward	TCCTCCAGAGCCAGACTACT	87	53
(ang. Interferon Regulatory Factor 9)	Reverse	CAATCCAGGCTTTGCACCTG		55
KCNK6	Forward	GAGCACCCGTTAGTGTCCTT	142	61
Domain Channel Subfamily K Member 6)	Reverse	TCCAGAGCAACTAGGGGGAT	143	01
KLRG2	Forward	CTGAGGACGGCGAGGACAATC	197	67 5
(ang. Killer Cell Lectin Like Receptor G2)	Reverse	GGCTGCCCAAGCTCTCAACT	177	07,5
LACC1	Forward	AGAAGCCAGGATAGGTGTGGA	128	67
(ang. Laccase Domain Containing 1)	Reverse	CTGACTCAATGACCACTGCCT	120	07
MAFB	Forward	TCGACCTGCTCAAGTTCGAC	127	60
(ang. MAF BZIP Transcription Factor B)	Reverse	GAGCTACACGGAGTGCTGAG	127	09
NCR3LG1	Forward	GTCTCCGTCAACTCTTTACGC	100	
(ang. Natural Killer Cell Cytotoxicity Receptor 3 Ligand 1)	Reverse	CTTTCAGATCACCTTCGGTCG	188	67,5
NDRG4	Forward	GAGAAGGAGGAGAGAGCCCA	166	60
(ang. NDRG Family Member 4)	Reverse	ACCACACTGCTACTGATGGC	100	09
OAS1	Forward	CTTTGATGCCCTGGGTCAGT	170	50
(ang. 2'-5'-Oligoadenylate Synthetase 1)	Reverse	TGAGGCTCTTGAGCTTGGTG	170	30
OAS3	Forward	ACTACAACGCCAAGGACAAGA	71	61
(ang. 2'-5'-Oligoadenylate Synthetase 3)	Reverse	GATGATAGGCCTGGGCTTCTG	/1	04
OTUD1	Forward	TCCACATCATTCCAGACGGC	178	58
(ang. OTU Deubiquitinase 1)	Reverse	TGGGCAGCAGCGATGATAAA	170	50
PML	Forward	TGAACCGGGAAAGCAAGTTC	184	61
(ang. PML Nuclear Body Scaffold)	Reverse	AGGGCCCGGAAGAAGTTTG	104	01
PTAFR	Forward	GATCACCCTGCCACTTTGGA	117	67
(ang. Platelet Activating Factor Receptor)	Reverse	GCCACAGAGCAGTAGGTGTT	117	07
SLAMF7	Forward	GGAAGATCCAGCAAATACGG	183	67.5
(ang. SLAM Family Member 7)	Reverse	GTTTTCTTTGGGCCGAGAAT	105	07,5
SOCS1	Forward	CCCTTCTGTAGGATGGTAGCAC	95	67.5
(ang. Suppressor Of Cytokine Signaling 1)	Reverse	GAAGAGGAAGGTTCTGGC	,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	07,5
TAP2	Forward	TCGCACAGTGCTGGTGATTG	122	52
Binding Cassette Subfamily B Member)	Reverse	ACCAGGCGGGAATAGAGGT	152	55
TNFRSF14	Forward	GAACTGCTCCAGGACAGAGA	108	60
(ang. TNF Receptor Superfamily Member 14)	Reverse	CTGGAGGTGGCGTAAGCG	100	00
TRANKI	Forward	GACAGCCACAGTGGAGTACC	100	60
Repeat And Ankyrin Repeat Containing 1)	Reverse	AGTGCCACTTCGCCCAATAA	109	Uð
WARS1	Forward	ACAGCGACTGCATTGGGAAG	180	53
(ang. Tryptophanyl-tRNA Synthetase 1)	Reverse	GGGCTGGTTTAGGATAGCCG	107	

WFDC2 (ang. WAP Four-Disulfide Core Domain 2)	Forward	CCTGCCCCAGGTGAACATTA 102		69	
	Reverse	CATTGCGGCAGCATTTCATCT			
WFDC5 (ang. WAP Four-Disulfide Core Domain 5)	Forward	ATCCACCCTGGTTTCTCCT	153	64	
	Reverse	TGGAGGAAGCAGCATGTACG	100		
WNT4 (ang. Wnt Family Member 4)	Forward	ACGTGCGAGAAACTCAAGGG	125	68	
	Reverse	CGGAACTGGTACTGGCACTC	125	00	

Reakcję przeprowadzono w termocyklerze CFX Opus Real-Time PCR (BioRad) przy następującym profilu czasowo/temperaturowym: denaturacja wstępna 95°C przez 3 min; denaturacja właściwa 95°C przez 10 s; przyłączanie starterów 15 s, temperatura przyłączania starterów zawarta w tab. 14.; wydłużanie nici 72°C przez 15 s. Dodatkowym etapem była analiza topnienia produktu PCR w temperaturze 65-95°C, a zmiana temperatury wzrastała o 0,5°C co 5s. Liczba cykli reakcji wynosiła maksymalnie 35 cykli. Ekspresję badanych genów normalizowano względem genów referencyjnych *ACTB* lub *GAPDH*. Do analizy ekspresji badanych genów użyto metody komparatywnej 2^{-ΔΔCT}. Wyniki przedstawiono jako różnicę poziomu ekspresji badanego genu między próbami badanymi, a próbą referencyjną.

Badanie wpływu substancji aktywujących białko p53 na podatność komórek nowotworowych na cytotoksyczne działanie komórek NK-92 8.1. Testy MTS

Test MTS (oparty o barwnik: 3-(4,5-dimetylotiazol-2-il)-5-(3-karboksymetoksyfenyl)-2-(4sulfofenylo)-2H-tetrazolium) to metoda używana do oceny aktywności metabolicznej stosowana w analizach kultur komórkowych. Komórki żywe redukują żółty barwnik MTS do formy fioletowo-wiśniowej (formazanu) za pomocą dehydrogenaz uczestniczących w metabolizmie komórkowym. Formazan, jest rozpuszczalny w rozpuszczalnikach organicznych. Pomiar absorbancji formazanu wykonuje się spektrofotometrycznie przy długości fali 490-500 nm. Wyższa absorbancja jest zazwyczaj związana z większą aktywnością metaboliczną komórek (więcej żywych komórek), natomiast niższa świadczy o obecności czynników cytostatycznych i/lub cytotoksycznych, które wpływają na mniejszą zdolność komórek do redukcji MTS (co świadczy o mniejszej liczbie żywych komórek).

Do oceny wpływu substancji aktywujących p53 na cytotoksyczne działanie komórek NK-92 wykorzystano komercyjnie dostępny zestaw CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). Analizowano linie: A549, A549 CRISPR-Control oraz A549 CRISPR-p53; NCI-H460 oraz NCI-H1299 (status genu *TP53* w liniach nowotworowych przedstawiono w tab.1.). Schemat eksperymentu przedstawiono na ryc. 12. Pierwszym etapem eksperymentu było założenie hodowli komórek nowotworowych na płytkach hodowlanych o powierzchni 21 cm² i poddano je traktowaniu mieszaniną AN (lub pojedynczymi substancjami mieszaniny, tj. aktynomycyną D

oraz nutliną-3a), aby aktywować białko p53 w komórkach nowotworowych. W przypadku komórek kontrolnych poddano je działaniu DMSO. Po upływie 48h od traktowania komórki nowotworowe trypsynizowano i liczono w obecność błękitu trypanu (Merck). Komórki NK-92 hodowano w butelce hodowlanej w standardowych warunkach, a w dzień eksperymentu liczono w obecności błękitu trypanu. Niezależnie od rodzaju komórek pobierano odpowiednią liczbę i wirowano w warunkach 1200 rpm przez 2 min. Następnie komórki zawieszano w medium hodowlanym przeznaczonym dla komórek NK-92 (tab. 4.). Zakładano wspólną hodowlę komórek nowotworowych z komórkami NK-92 w stosunku ilościowym 1:1 na płytce 96-dołkwej. Główną kontrolą dla eksperymentu stanowiły komórki nowotworowe pozbawione kontaktu z komórkami NK-92, które przez 24h także hodowano w medium hodowlanym, wymieniając na pożywkę hodowlaną przeznaczoną dla danych komórek nowotworowych. Pomiar MTS wykonywano po upływie 48h, aby umożliwić regeneracje komórkom nowotworowym, które przeżyły kontakt z komórkami NK-92. W dzień pomiaru komórkom dodawano substrat MTS rozpuszczony w bezbarwnym medium. Pomiar wykonywano w spektrofotometrze przy długości fali 490-500 nm.



Ryc. 12. Graficzne przedstawienie testu MTS w ko-kulturach komórek nowotworowych z komórkami NK-92. Wykonanie własne w programie BioRender Na schemacie płytki 96- oraz 6-dołkowej przerywaną linią oznaczono miejsca, w których hodowano komórki nowotworowe, natomiast ciągła czerwona linia oznacza dołki, w których zakładano ko-kultury (do komórek nowotworowych dodawano komórki NK-92).

8.2. Medium kondycjonowane

8.2.1. Analiza aktywacji szlaku IFNγ we współhodowlach komórek nowotworowych z NK-92

Komórki NK wykazują silną cytotoksyczność względem komórek nowotworowych oraz zakażonym wirusem. Podczas swojej aktywacji komórki NK wydzielają szeroką gamę cytokin. Jedną z najsilniejszych cytokin efektorowych jest interferon-γ (IFN-γ). Jednym z celów projektu była ocena wpływu substancji wydzielanych przez komórki NK-92 na aktywację białek uczestniczących w szlaku IFN-γ [125]. Schemat eksperymentu przedstawiono na ryc. 13.



Ryc. 13. Graficzne przedstawienie eksperymentu analizy aktywacji szlaku IFN- γ w współhodowlach (ko-kulturach) komórek nowotworowych z komórkami NK-92. Opis schematu znajduje się w tekście poniżej. Wykonanie własne za pomocą programu BioRender.

Komórki nowotworowe wysiewano na płytki o powierzchni hodowlanej 21 cm² i poddawano je działaniu mieszaniny AN lub DMSO (w przypadku kontroli). Po 48h od traktowania komórki nowotworowe trypsynizowano i zliczono niewybarwione komórki w obecności błękitu trypanu. Określoną liczbę komórek zawieszono w pożywce RPMI 1640 nie zawierającej surowicy. Komórki NK-92 zebrano i postępowano analogicznie jak, w przypadku komórek nowotworowych. Komórki wysiewano i na płytce 6-dołkowej w końcowej objętości 2 ml w następujący sposób: komórki nowotworowe kontrolne; komórki nowotworowe kontrolne w stosunku ilościowym 1:1 z komórkami NK-92; komórki nowotworowe poddane wcześniej działaniu AN; komórki nowotworowe traktowane AN w stosunku 1:1 do komórek NK-92; komórki NK-92. Komórki hodowano przez 24h. Aby sprawdzić wpływ wydzielanych substancji przez komórki NK-92 uzyskano medium kondycjonowane. Komórki nowotworowe wysiano na drugą płytkę 6-dołkową

o konfluencji 100%. Po zakończonej współhodowli (ko-kulturze) zebrano medium znad komórek i wirowano w 1200 rpm przez 2 minuty. Uzyskany nadsącz dodano komórkom nowotworowym o konfluencji 100%, uprzednio usunięto wcześniejszą pożywkę. IFN-γ jest jedną z cytokin wydzielanych przez komórki NK, dlatego stanowił kontrolę eksperymentu. Komórki nowotworowe z medium kondycjonowanym inkubowano przez 6h, po zakończonej inkubacji komórki zebrano na lizat zgodnie z opisem z rozdziału III.5.1.

8.2.2. Analiza wpływu kondycjonowanej pożywki znad komórek NK-92 na indukcje apoptozy w komórkach nowotworowych

Ligand FAS (FASLG) odgrywają kluczową rolę w procesie apoptozy. Komórki linii NK-92 są znane z cytotoksycznych właściwości względem komórek nowotworowych poprzez wydzielanie różnych substancji m.in. cytokin tj. IFN-γ czy FAS/FASLG. Dlatego postanowiono ocenić wpływ wydzielanego ligandu FAS przez komórki linii NK-92 do pożywki hodowlanej o różnej konfluencji komórek oraz jakie niesie to za sobą konsekwencje.

Komórki nowotworowej linii A549 wysiano na płytki hodowlane o powierzchni 21 cm2, a pozytywną kontrolą eksperymentu stanowiły komórki eksponowane na mieszaninę AN z ligandem FAS. Natomiast komórki linii NK-92 wysiewano w liczbie 50 000 komórek na szalkę lub 200 000 komórek na szalkę. Po upływie 24h pobrano pożywkę znad komórek NK-92 i po odwirowaniu komórek NK-92, na szalki hodowlane zawierające komórki linii A549 dodano medium kondycjonowane. Komórki z medium kondycjonowanym inkubowano przez 4,5h, a następnie zbierano na lizaty zgodnie z opisem z rozdziału III.5.1.

9. Analiza statystyczna i opracowanie wyników

Otrzymane wyniki poszczególnych badań analizowano statystycznie w programie GraphPad (wersja 10.2.2.). Wyniki przedstawiono jako średnia z co najmniej trzech powtórzeń biologicznych, a każde z powtórzeń biologicznych wykonano trzy razy. Wyniki RT-qPCR, testów lucyferazowych oraz testów MTS najpierw poddano normalizacji w programie GraphPad, a następnie wykonano test statystyczny Shapiro-Wilka. Wartość p <0.05 uznano za istotną statystycznie (* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001). Graficzna prezentacja wyników oraz paneli poglądowych zostały wykonane w programie Adobe Photoshop ver. CC lub w pakiecie Microsoft Office i nie zostały poddane jakimkolwiek modyfikacjom graficznym. Ryciny poglądowe zostały wykonane w programie BioRender (https://biorender.com/).

IV. Wyniki

1. Przedstawienie modelu badawczego – synergistyczna aktywacja szlaku białka p53 indukowana przez aktynomycynę D i nutlinę-3a

Białko p53 kodowane przez gen *TP53* od lat jest uznawane za "strażnika genomu", uczestniczy pośrednio lub bezpośrednio w niemal każdym procesie komórkowym. Do aktywacji białka p53 dochodzi w odpowiedzi na czynniki naturalne tj. promieniowanie UV, stres oksydacyjny itd. Z drugiej strony, białko p53 może być aktywowane w wyniku działania egzogennych czynników, np. chemioterapeutyków i promieniowania jonizującego w ramach terapii przeciwnowotworowej. Aktywacja prawidłowej formy białka p53 w trakcie terapii przeciwnowotworowej może przyczynić się do zahamowania cyklu komórkowego i aktywacji apoptozy. W eksperymentalnej terapii przeciwnowotworowej stosuje się inhibitory MDM2, które hamują powstawanie kompleksu MDM2/p53, co prowadzi do aktywacji p53 ze wszystkimi tego konsekwencjami [113].

Grupa Profesora Rusina (NIO-PIB, Gliwice) do aktywacji białka p53 stosuje mieszaninę substancji przeciwnowotworowych – aktynomycynę D i nutlinę-3a (AN) – które działają synergistycznie w aktywacji białka p53 [117]. Dzięki stosowaniu mieszaniny AN możliwa była identyfikacja wielu genów związanych z odpornością wrodzoną czy związanych z chorobą Alzheimera [10], [118], [122]. Jako dodatkowy czynnik stosowano także kamptotecynę (CPT), która jest również silnym aktywatorem białka p53 [118].

Dzięki danym transkryptomicznym i proteomicznym uzyskanym przez grupę Profesora Rusina dowiedziono, że w linii komórkowej A549 pod wpływem działania kombinacji AN zwiększa się aktywacja wielu genów związanych z p53. Jako model badawczy we wcześniej wspomnianych badaniach zastosowano ludzką, nowotworową linię niedrobnokomórkowego raka płuca A549, która dotychczas nie była wykorzystywana do wysokoprzepustowego poszukiwania genów docelowych białka p53. Linia komórkowa A549 posiada dziki gen *TP53*. Dodatkowo, przeprowadzono badania tranksryptomiczne w innych liniach nowotworowych o dzikim statusie genu *TP53*, które eksponowano na mieszaninę AN: A375 (ludzka linia czerniaka złośliwego), NCI-H460 (ludzka linia niedrobnokomórkowego raka płuca) oraz U-2 OS (ludzka linia kostniakomięsaka) [122], [149].

Dlatego głównym modelem badawczym w niniejszym projekcie doktorskim jest linia A549 oraz zmodyfikowana linia A549 ze zredukowaną ekspresją genu *TP53* uzyskaną za pomocą metody CRISPR/Cas9 (ryc.14.). Zastosowano także linię kostniakomięsaka U-2 OS w wersji wyjściowej oraz ze zredukowaną ekspresją *TP53* (ryc.14.). W ramach projektu doktorskiego uzyskano także zmodyfikowaną linię NCI-H460 wykorzystując tę samą metodę CRISPR/Cas9 co w przypadku wspomnianych wyżej linii komórkowych (ryc.14.).



Ryc. 14. Ocena skuteczności wyciszenia ekspresji genu *TP53* w liniach: U-2 OS, A549 oraz NCI-H460; wykonana techniką Western Blottingu. Zredukowaną ekspresję genu *TP53* uzyskano metodą CRISPR/Cas9. Kontrolą wewnętrzną ekspreymentów są białka HSC70. Komórki CRISPR-Con (linia komórkowa, w której zastosowano procedurę kontrolną) oraz CRISPR-p53 (linia komórkowa ze zredukowaną ekspresją genu *TP53*), poddano działaniu DMSO (który jest rozpuszczalnikiem wszystkich substancji; stanowiący kontrolę), AN (mieszanina związków aktynomycyny D oraz nutliny-3a) oraz CPT (kamptotecyna). Zarówno mieszanina AN jak i CPT posiadają zdolność aktywacji białka p53 w komórkach o dzikim statusie genu *TP53*.

W liniach U-2 OS oraz A549 pomimo zastosowania techniki CRISPR/Cas9 obserwuje się sygnał pochodzący od całkowitej formy białka p53 (ryc.14.). Wynika to z tego, że zastosowana metoda generuje w części komórek mutację DNA powodującą delecję kilku aminokwasów w sekwencji białka. Aby się przekonać, w jakiej części komórek białko p53 jest rzeczywiście unieczynnione, zastosowano przeciwciało wykrywające fosforylację seryny 37 (p53-Ser37). Sekwencje użyte w metodzie CRISPR/Cas9 celują w część genu białka p53 kodującą obszar w pobliżu seryny 37. Forma białka p53 z fosforylowaną seryną 37 może być użyta jako marker aktywacji białka p53 w komórce. W przypadku badania fosforylacji Ser37-p53 nie obserwuje się sygnału w komórkach w których zastosowano procedurę CRISPR/Cas9 wycelowaną w gen *TP53* (CRISPR-p53) (ryc. 14). Oznacza to, że w przeważającej większości komórek obecna jest dysfunkcyjna forma białka p53.

2. Wybór genów potencjalnie regulowanych przez białko p53

Jednym z celów niniejszego projektu doktorskiego było sprawdzenie, czy p53 uczestniczy w aktywacji wybranych genów (tab. 15.). Ich selekcji dokonano w oparciu o dane transkryptomiczne pochodzące od wspomnianych wyżej komórek. Jednym z głównych kryteriów wyboru było występowanie aktywacji genu pod wpływem traktowania AN w co najmniej dwóch liniach komórkowych. Aktywacja ekspresji genu przez AN nie jest jeszcze dowodem na to, że gen ulega aktywacji za pośrednictwem p53. Silnej wskazówki dostarcza dopiero porównanie aktywacji wybranego genu w komórkach z prawidłowym oraz uszkodzonym białkiem p53.

Tab. 15. Geny wybrane do bardziej szczegółowej analizy ekspresji metodą RT-qPCR. Wyboru dokonano w oparciu o dane uzyskane za pomocą sekwencjonowania transkryptomu przedstawionych linii komórkowych eksponowanych na mieszaninę AN [155].

Nazwa genu	Funkcja kodowanego białka	Krotność zmiany ekspresji pod wpływem mieszaniny AN względem kontroli w linii komórkowej:			
		A549	U-2 OS	A375	NCI- H460
ACP5	Bierze udział w defosforylacji białek w macierzy kości. Prawdopodobnie bierze udział w niektórych stanach patologicznych, tj. choroba Gaucher i Hodgkina oraz różnych typach białaczki. Uczestniczy także w regulacji prawidłowych funkcji makrofagów [156].	33	32	11	3
APOL3	Może wpływać na ruch lipidów w cytoplazmie czy umożliwić wiązanie lipidów do organelli. Uwrażliwia komórki nowotworowe na ferroptozę. Natomiast w mikrośrodowisku guzu nadekspresja APOL3 przyczynia się do zwiększonej liczby limfocytów T CD8+ poprzez zmniejszenie liczby makrofagów M2. Indukowane przez cytokinę IFN-γ [157], [158].	218	6	20	11
BEX2	Regulator apoptozy mitochondrialnej i cyklu komórkowego w fazie G1. Odgrywa szczególnie istotną rolę w nowotworze piersi, chroniąc komórki nowotworowe przed apoptozą mitochondrialną (za pośrednictwem białek z rodziny BCL2). Przyczynia się do zwiększonej proliferacji poprzez szlak NF-κB w komórkach glejaka wielopostaciowego. Prawdopodobnie bierze udział w odpowiedzi immunologicznej, jednak ten obszar wciąż stanowi obszar badań [159], [160], [161].	12	5	10	12
CIBAR2	CIBAR2 (znane także jako FAM92B) funkcję białka nie są w pełni znane. Prawdopodobnie odgrywa kluczową rolę w ciliogenezie (proces formowania i wzrostu rzęsek, czyli cienkich, włosowatych struktur na powierzchni komórek). Jest brany pod uwagę jako potencjalny gen ryzyka w chorobie Alzheimara [162], [163].	501	4	6	5
CRABP2	Transportuje kwas retinolowy (retinol, pochodna witaminy A) do jadra komórkowego [164].	19	1	14	8
CTHRC1	Może działać jako negatywny regulator depozycji macierzy kolagenowej. Dodatkowo może uczestniczyć w regulacji procesów komórkowych związanych z ruchem tj. migracją czy remodelowaniem tkanek. Może uczestniczyć w szlakach sygnałowych związanych z transformacją komórek (szczególnie procesach rozwoju, gojenia się ran czy nowotworzenia) [165].	26	14	1	29
EOMES	Uczestniczy w różnicowaniu trofoblastów oraz w gastrulacji, regulując mezodermy i endodermy. Odgrywa istotną rolę w rozwoju mózgu. Bierze także udział w różnicowaniu limfocytów T CD8+ podczas odpowiedzi immunologicznej, regulując ekspresje genów efektorów litycznych. EOMES jest czynnikiem transkrypcyjnym indukującym IFN-γ. Uczestniczy w transkrypcji, kontrolując ekspresję genów poprzez wiązanie się z konkretnym fragmentem DNA [166].	10	_	1	20
GAST	Pobudza błonę śluzową żołądka do produkcji i wydzielania kwasu solnego oraz trzustki do wydzielania enzymów trawiennych. Stymuluje skurcze mięśnie gładkie, zwiększając krążenie krwi oraz wydzielanie wody w żołądku i jelitach. Oprócz tego wykazuje potencjał mitogenny w stosunku do białek nabłonka żołądka i uczestniczy w szlaku NF-κB. Poprzez swoje działanie może pośredniczyć w reakcji zapalnej [167].	11	23	817	6
ICOSLG	Ligand dla receptorów powierzchniowych limfocytów T. Działa jako sygnał stymulujący w proliferacji limfocytów T oraz sekrecji cytokin tj. IFN-γ. Indukuje proliferację limfocytów B i ich różnicowanie w komórki plazmatyczne. Może odgrywać istotną rolę w wyciszaniu stanów zapalnych [168].	11	7	10	2
INKA I	Inhibitor kinazy białkowej serynowo-treoninowej PAK4 i poziomy histonu H4K16ac [169]. Kinaza PAK4 może chronić komórki przed	28	5	20	21

	apoptozą poprzez hamowanie kaspazy-8 [170]. Najnowsze doniesienia wskazują, że kaspaza-8 może wpływać na odpowiedź immunologiczną, wpływając na ekspresję cytokin zapalnych, uczestnicząc w pyroptozie [171].				
KCNK6	Uczestniczy w transporcie jonów potasu przez błonę komórkową, który sprzyja formowaniu inflamasomu [172].	13	4	4	19
KLRG2	Funkcję białka nie są w pełni znane. KLRG2 wykazuje funkcje związane z metylacją DNA u pacjentów ze schizofrenią. Inne badania wskazują jego regulatorową rolę w szlakach JAK/STAT oraz MAK-ERK1/2. Ponadto reguluje poziom białek p53 i p38 MAPK. Sugeruje się, że bierze udział w stanach zapalnych. [173], [174].	54	2	-	57
LACC1	Gen <i>LACC1</i> koduje enzym związany metabolizmem moczu. Pełni rolę regulatora odporności wrodzonej w makrofagach poprzez modyfikację nukleotydów purynowych, co wpływa na funkcję metaboliczną i stan bioenergetyczny makrofagów. Enzym uczestniczy również w reakcjach cytokin indukowanych przez receptory rozpoznawania wzorców (PRR; ang. <i>Pattern</i> <i>Recognition Receptor</i>) w makrofagach: łączy się z kompleksem sygnalizacyjnym NOD2, podczas eliminacji bakterii. Kontroluje prawidłowe ufałdowanie białek w siateczce śródplazmatycznej [175].	22	3	10	28
MAFB	Białko MAFB uczestniczy się w procesie identyfikacji i różnicowania makrofagów. Wykazano, że jest związane z miażdżycą czy otyłością. Jego rola w utrzymaniu homeostazy organizmu sugeruje, że może być obiecującym celem terapeutycznym w chorobach związanych z makrofagami [176].	186	-	18	5
NCR3LG1	NCR3LG1 (B7-H6) ligand dla receptora NKp30 szlaku aktywacyjnym komórek NK. Szczególnie ważny w rozpoznawaniu komórek linii białaczki K562 przez komórki NK. Funkcje białka NCR3LG1 nie są w pełni poznane [177], [178].	12	8	5	2
NDRG4	Przyczynia się do prawidłowego utrzymania poziomy BDNF (ang. Brain-Derived Neurotrophic Factor), co jest kluczowe w procesie uczenia się przestrzennego i odporności na śmierć komórek nerwowych wywołanych stresem niedokrwiennym. Może wpływać na fosforylację ERK1 i ERK2 (ang. Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2) przez czynniki wzrostu; oraz osłabiać fosforylacje ELK1 (ang. ETS Transcription Factor ELK1) zależną od mikrotubul. NDRG4 jest potencjalnym supresorem nowotworu i potencjalnym biomarkerem raka jelita grubego [179].	8	5	8	5
OTUDI	Kodowane białko jest enzymem deubikwitynujący (pełni rolę w usuwaniu ubikwityny z białek). Odgrywa istotną rolę w regulacji stabilności i translacji mRNA i jakości rybosomów poprzez deubikwitynację 40S białka rybosomalnego PRS10/eS10. Białko OTUD1 uczestniczy w odporności przeciwgrzybiczej hamując kanoniczną aktywację NF-κB, apoptozę czy nekroptozę. Bierze udział w szlaku IFN-α i w odpowiedzi przeciwwirusowej [180], [181].	5	4	5	6
PTAFR	PTAFR (znany jako PAFR) koduje receptor czynnika aktywującego płytki krwi, chemioatraktanta fosfolipidowego posiadającego silną aktywność zapalną, skurczową mięśni gładki i hipotensyjną. Zaangażowany w regulacje odpowiedzi immunologicznej poprzez aktywację komórek odpornościowych (tj. granulocyty, monocyty i limfocyty T). Może uczestniczyć w procesach zapalnych oraz uwalniać histaminę w reakcjach alergicznych. Może również uczestniczyć w procesie angiogenezy [182].	62	1	34	4
SLAMF7	Koduje receptor ELF z rodziny SLAM odgrywa istotną rolę w regulacji aktywacji i różnicowania komórek układu immunologicznego poprzez interakcje komórkowe. Kontrolowany jest przez adaptery SH2D1A/SAP i SH2D1B/EAT-2. Izomer 1 aktywuje komórki NK niezależnie od SH2D1A, regulując szlak ERK. Dodatnio wpływa na funkcję NK, zależne od fosforylowanego SH2D1B, zaangażowanych w szlak PLCG1,	24	9	141	-

	PLCG2 i PI3K. W przypadku braku SH2D1B może hamować funkcję komórek NK. Dodatkowo, działa hamująco w limfocytach T. Może uczestniczyć w adhezji limfocytów. W aktywowanych monocytach negatywnie reguluje produkcję cytokin prozapalnych [183], [184].				
TNFRSF14	TNFRS14 wydaje się być zaangażowane w rozwój zapalenia jelit. Może odgrywać kluczową rolę w obronie organizmy przed patogenami poprzez odpowiedź immunologiczną. Reguluje odpowiedź immunologiczną limfocytów T poprzez jednoczesną aktywację limfocytów zapalnych. Sugeruje się także, że może wpływać na mikrobiom w błonie śluzowej jelit sprzyjając homeostazie immunologicznej i zapobiegania penetracji patogenów [185], [186].	143	16	32	81
TRANKI	Białko TRANK1 jest wytwarzane przez komórki immunologiczne tj. neutrofile czy komórki NK. Prawdopodobnie jest regulowane przez szlak interferonu typu 1, który jest powiązany z mikrobiomem jelitowym [187], [188].	25	11	11	8
WFDC2	Związany z regulacją procesów immunologicznych i jest wykrywany w różnych tkankach, tj. jajniki, macica czy trzustka. Jednym z najbardziej znanych produktów jest białko HE4 (ang. <i>human epididymis protein 4</i>), które jest uważane za marker nowotworowy (zwłaszcza w raku jajnika) [189]. Białko WFDC2 wykazuje działanie antybakteryjne przeciwko <i>Staphylococcus</i> <i>aureus, Salmonella enterica</i> i <i>Pseudomonas aeruginosa</i> [190].	16	31	1	3
WFDC5	Funkcje tego białka są słabo poznane, jednak literatura naukowa sugeruje, że może brać udział w odpowiedzi przeciwbakteryjnej i stanie zapalnym [191].	1541	-	-	9
WNT4	Kodowane białko jest istotne zarówno dla onkogenezy, zwłaszcza kontroli proliferacji tkanki piersi i procesów rozwojowych (tj. determinacja płci). Reguluje proces różnicowania komórek dendrytycznych. Odgrywa kluczową rolę w sygnalizacji szlaku związanego z beta-kateniną [192], [193].	72	6	-	30
3. Analiza wybranych genów potencjalnie regulowanych przez białko p53

Pojęcie odpowiedzi immunologicznej odnosi się m.in. do funkcji polegającej na eliminacji komórek nowotworowych przez komórki układu immunologicznego [90].

W dotychczasowych badaniach potwierdzono, że aktywacji białka p53 pod wpływem mieszaniny aktynomycyny D i nutliny-3a (AN), towarzyszy zwiększenie ekspresji genów związanych z odpornością [10], [149]. Dlatego w niniejszym rozdziale skupiono się na roli prawidłowej formy białka p53 w regulacji ekspresji wybranych genów powiązanych z odpowiedzią immunologiczną (i nie tylko; dokładny opis funkcji białek kodowanych przez badane geny przedstawiono w tab. 15 w rozdziale IV.2) za pomocą techniki RT-qPCR w komórkach ze zredukowaną ekspresją genu *TP53* za pomocą techniki CRISPR/Cas9 (linie A549 oraz U-2 OS) (ryc.15-16). Badano również ekspresję wybranych genów w komórkach linii NCI-H460 (ryc.17.). Przedstawione różnice zmiany ekspresji opisano na osi OY jako "krotność" - oznacza porównanie ekspresji genu w komórkach traktowanych względem komórek rosnących w warunkach kontrolnych.

W przypadku linii A549 CRISPR-Control oraz A549 CRISPR-p53 i U-2 OS CRISPR-Control oraz U-2 OS CRISPR-p53 wykorzystano testy t-studenta dla wielu niepołączonych próbek. Porównanie znamienności statystycznej różnic ekspresji genów w linii NCI-H460 przeprowadzono za pomocą analizy wariancji (ANOVA) z poprawką Brown-Forsythe w celu oceny różnic między grupą kontrolą, a grupami traktowanymi. Obliczono wartość p, gdzie oznaczono istotność statystyczną - *p $\leq 0,05$, ** p $\leq 0,01$, **** p $\leq 0,001$, **** p $\leq 0,0001$. Gdzie: * - oznacza istotność statyczną w traktowaniu pomiędzy CRISPR-Control vs. CRISPR-p53. W przypadku linii NCI-H460 * - oznacza istotność statystyczną grupy kontrolnej vs. traktowania.



3.1. Analiza ekspresji genów w zmodyfikowanej linii niedrobnokomórkowego raka płuca A459 ze zredukowaną ekspresją genu *TP53*

Ryc. 15. Analiza ekspresji wybranych genów pod kątem wpływu prawidłowej formy białka p53 na ich aktywację w zmodyfikowanej linii A549 z obniżoną ekspresją genu *TP53*. Pomarańczowe słupki oznaczają linię A549 CRISPR-Control, natomiast granatowe A549 CRISPR-p53, w których zredukowano ekspresję genu *TP53*. Komórki rosły w warunkach kontrolnych (KON) lub eksponowano je na mieszaniną AN lub kamptotecynę (CPT) przez 30h. Analizę ekspresji genów normalizowano względem ekspresji genu referencyjnego *ACTB*.

Analiza RT-qPCR potwierdziła wyniki transkryptomiczne – ekspresja wszystkich analizowanych genów uległa zwiększeniu albo pod wpływem AN albo CPT. Krotności wzrostów wahały się od stosunkowo niewielkich do bardzo dużych. Ponadto można zauważyć, że ekspresja większości analizowanych genów w warunkach ekspozycji na badane substancje jest niższa w komórkach CRISPR-p53 niż w komórkach CRISPR-Con. Oznacza to, że białko p53 jest kluczowe do aktywacji genów albo na skutek ekspozycji na AN albo ekspozycji na CPT. Wyjątkami są geny *BEX2, EOMES, LACC1, OTUD1*, w przypadku których różnica ekspresji pomiędzy komórkami linii CRISPR-Con i CRISPR-p53 nie osiągnęła znamienności statystycznej, choć była z reguły niższa w tych drugich. Można zauważyć, że brak różnic w ekspresji genów między komórkami pozbawionymi prawidłowego p53 a komórkami kontrolnymi występuje częściej w warunkach traktowania CPT, co oznacza, że związek ten aktywuje ekspresję niektórych genów w sposób niezależny od p53.



3.2. Analiza ekspresji genów w zmodyfikowanej linii kostniakomięsaka U-2 OS ze zredukowaną ekspresją genu *TP53*

Ryc. 16. Analiza wpływu białka p53 na ekspresję wybranych genów w zmodyfikowanej nowotworowej linii komórkowej U-2 OS. Zielone słupki oznaczają linię U-2 OS CRISPR-Control, natomiast pomarańczowe U-2 OS CRISPR-p53, w których zredukowano ekspresję genu *TP53*. Komórki rosły w warunkach kontrolnych (KON) lub eksponowano je na mieszaniną AN lub kamptotecynę (CPT) przez 30h. Analizę ekspresji genów normalizowano względem ekspresji genu referencyjnego *GAPDH*.

W przypadku komórek U-2 OS CRISPR-Con obserwuje się silną aktywację genów ACP5, BEX2, CTHRC1, GAST, ICOSLG, KLRG2, NDRG4, SLAMF7, TRANK1 oraz WFDC2 pod wpływem mieszaniny AN, która aktywuje białko p53. W analogicznym traktowaniu w komórkach CRISPR-p53 obserwuje się słabszą aktywację wcześniej wspomnianych genów. Natomiast w komórkach CRISPR-Con w porównaniu z komórkami CRISPR-p53 pod wpływem CPT obserwuje się wyższą

krotność ekspresji genów: *BEX2, GAST* oraz *SLAMF7*. Ekspresja genu *APOL3* jest odmienna od pozostałych, ponieważ wzrasta jedynie w komórkach pozbawionych prawidłowego p53 traktowanych kamptotecyną. Gen *CIBAR2* ulega represji pod wpływem AN, jednak dzieję się to tylko w komórkach CRISPR-Con. W komórkach CRSIPR-p53 represja tego genu nie zachodzi. Tak więc, prawdopodobnie p53 działa jak represor ekspresji genu *CIBAR2* ale tylko w warunkach traktowania AN. Co ciekawe, w przypadku genu *SLAMF7* najsilniejszą ekspresję obserwuje się w komórkach CRISPR-Con po traktowaniu CPT.

3.3. Analiza ekspresji genów w linii niedrobnokomórkowego raka płuca NCI-H460 o dzikim statusie genu TP53

Celem kolejnej analizy było sprawdzenie, czy wybrane geny ulegają aktywacji pod wpływem AN lub CPT w innej linii nie drobnokomórkowego raka płuca – NCI-H460. Chciano potwierdzić wyniki z wcześniej wspomnianych analiz transkryptomicznych.



Ryc. 17. Analiza ekspresji wybranych genów linii NCI-H460 o dzikim statusie genu *TP53* pod wpływem mieszaniny AN oraz CPT. Na rycinie przedstawiono względne zmiany w ekspresji genów po traktowaniu komórek mieszaniną AN oraz CPT w porównaniu do kontroli. Analizę ekspresji genów normalizowano względem ekspresji genu referencyjnego *GAPDH*.

Geny ACP5, CIBAR2, NDRG4 oraz TRANK1 ulegają najsilniejszej ekspresji pod wpływem mieszaniny AN w porównaniu do CPT. Natomiast geny APOL3, BEX2, GAST, NCR3LG1 oraz PTAFR silniej aktywowane pod wpływem CPT, niż pod wpływem mieszaniny AN. W przypadku genów KLRG2, OTUD1 oraz SLAMF7 wzrost ekspresji pod wpływem AN i CPT jest podobny.

Wszystkie poddane analizie geny ulegają aktywacji pod wpływem AN, co potwierdzają dane transkryptomiczne.

4. Analiza potencjalnego miejsca wiązania białka p53 w sekwencjach wybranych genów związanych z odpornością wrodzoną – testy lucyferazowe

Osłabienie aktywacji genu w komórkach pozbawionych prawidłowego p53 wskazuje na regulacje genu ze strony tego białka. Jednak ta regulacja może być bezpośrednia lub pośrednia. Wykazano bowiem, że p53 aktywuje ekspresję czynników transkrypcyjnych i dopiero one bezpośrednio regulują niektóre geny [194]. Aby ocenić czy p53 bezpośrednio aktywuje badany gen należy sprawdzić potencjalny fragment sekwencji wybranego genu pod katem możliwości wiązania p53. Do badanego fragmentu genu, który będzie odpowiadał na wzmożoną aktywność p53 należy "podłączyć" gen reporterowy. Do takiej analizy, wybrano trzy geny: SLAMF7, KLRG2 oraz NCR3LG1. Kodują one białka uczestniczące we wrodzonej odpowiedzi układu odpornościowego i zgodnie z uzyskanymi wynikami ich aktywacja jest osłabiona w komórkach pozbawionych prawidłowego p53 (ryc. 14-17). Na podstawie bazy CHIP-Atlas, dzięki publicznym danym z pięciu eksperymentów typu ChIP-Seq wybrano potencjalne miejsca wiązania p53 w badanych genach [152], [153]. Następnie zweryfikowano wyselekcjonowane miejsca wiązania białka p53 w badanym genach przy pomocy testów reporterowych. Ocene aktywności genu reporterowego w wybranych liniach komórkowych przeprowadzono na dwa sposoby, a w trakcie eksperymentów weryfikowano przede wszystkim czy badany fragment DNA odpowiada zwiększoną aktywnością w teście reporterowym. Ocenie poddano działanie egzo- oraz endogennej formy białka p53, a obie formy aktywowano innymi sposobami. Do oceny skutków ekspresji egzogennej formy białka p53 użyto komórki linii U-2 OS, które transfekowano plazmidem zawierającym gen reporterowy pod transkrypcyjną kontrolą badanej sekwencji oraz "pusty" plazmid bez sekwencji genu TP53 (oznaczono na ryc. 18-20 jako WT-prom), plazmid ekspresyjny genu TP53 typu dzikiego (oznaczony na ryc. 18-20 jako WT-prom+p53) lub plazmid ekspresyjny zawierający zmutowaną sekwencję genu TP53 (oznaczony na ryc. 18-20 jako WT-prom+p53-Mut143). W przypadku analizy skutków aktywacji endogennej formy białka p53 również użyto linię U-2 OS oraz zmodyfikowaną linię U-2OS z obniżoną ekspresją genu TP53. Endogenna forme białka p53 aktywowano przez mieszanine AN. Komórki kontrolne traktowano pożywką z DMSO, który jest rozpuszczalnikiem obu związków.

Wyniki odnoszono do kontroli danego typu eksperymentu i przedstawiono jako wartość zmiany NFLA (ang. *normalised firefly luciferase activity*), oznaczającą krotność zmiany znormalizowanej aktywności lucyferazy. Analizę statystyczną wykonano w programie GraphPad wersji 10.2.2. dla Windows. Do analizy skutków aktywacji egzogennego białka p53 użyto wielokrotnego testu t-studenta dla niesparowanych próbek, natomiast do analizy aktywacji endogennego białka p53 zastosowano sparowany t-test lub modyfikację testu ANOVA – test Brown-Forsythe

z poprawką Welcha. Ocenę aktywności bioluminescencyjnej przeprowadzono w co najmniej 3 powtórzeniach biologicznych oraz technicznych.

4.1. Analiza potencjalnego miejsca wiązania białka p53 w sekwencji wzmacniającej genu *SLAMF7*



Ryc. 18. Analiza wybranej sekwencji wzmacniającej w genie *SLAMF7* jako potencjalnego miejsce wiązanie białka p53. (A) Aktywacja egzogennej formy białka p53 z wykorzystanie ww. plazmidów w linii komórkowej U-2 OS. (B) oraz (C) aktywacja endogennej formy białka p53 w komórkach U-2 OS (B) oraz modyfikowanej linii U-2 OS z obniżoną ekspresją genu *TP53* wraz z kontrolą (C). (D) Widok fragmentu genu *SLAMF7* wygenerowany z użyciem przeglądarki genomowej (IGV), gdzie czerwony prostokąt przedstawia badane miejsce w sekwencji genu *SLAMF7*. Aby wybrać badane miejsce wiązania p53 w sekwencji genu wykorzystano publiczne dane (opisane w granatowym prostokącie), gdzie: MCF IR+Nutlina-3– oznacza linię komórkową MCF7 traktowaną promieniowaniem jonizującym (IR) i nutliną-3a (identyfikator próbki: SRX2060922); SAOS2 p53 WT – linia komórkowa Saos-2 wykazującej nadekspresję białka p53 (identyfikator próbki: SRX1016980), SAOS0 EE/RR – linia komórkowa Saos-2 wykazującą ekspresję pary zmodyfikowanych cząsteczek p53 z silnym współdziałaniem wiązania monomerów p53 (identyfikator próbki: ERX181467) oraz TNFα - linia komórkowa SW480 poddana działaniu TNFα (identyfikator próbki: SRX4235879).

Analiza baz danych wykazała, że p53 wiąże się w znacznej odległości od promotora genu *SLAMF7*, co może wskazywać, że badane miejsce pełni funkcję *enhancera* (tzw. sekwencji wzmacniającej). Wybrane miejsce w sekwencji wzmacniającej w genie *SLAMF7* jest zdolne do aktywacji genu reporterowego w sposób zależny od ekspresji prawidłowego białka p53, zarówno egzo- jak i endogennej jego formy. Warto zaznaczyć, że białko egzogenne powoduje silniejszy wzrost ekspresji genu reporterowego.



4.2. Analiza potencjalnego miejsca wiązania białka p53 w sekwencji wzmacniającej genu *KLRG2*

Sklonowany fragment w sekwencji intronowej, który wybrano do badania miejsca wiązania p53

Ryc. 19. Analiza sklonowanego fragmentu w sekwencji intronowej w genie *KLRG2* do oceny potencjalnego miejsca wiązania białka p53. (A) Aktywacja egzogennej formy białka p53 z wykorzystaniem wspomnianych plazmidów w linii komórkowej U-2 OS oraz aktywacja endogennej formy białka p53 w komórkach U-2 OS (B) oraz zmodyfikowanej linii U-2 OS z obniżoną ekspresją genu *TP53* wraz z kontrolą (C). (D) Widok w przeglądarce genomej (IGV), gdzie czerwony prostokąt oznacza potencjalne miejsce wiązania białka p53 w sekwencji intronowej genu *KLRG2*. Opis wybranych próbek z bazy danych przedstawiono w opisie ryc. 18.

Następnie wykorzystano podobną metodologię do oceny odpowiedzi na p53 wybranego fragmentu genu *KLRG2*, który w dostępnych danych ChIP-Seq wykazywał wiązanie białka p53. Miejsce wiązania p53 zlokalizowane jest w intronie, co również sugeruje funkcję *enhancera*. Wyniki testów lucyferazowych wykazały, że wybrany fragment sekwencji intronowej genu *KLRG2* uzyskuje zdolność aktywacji genu reporterowego zarówno pod wpływem egzogennej jak i endogennej formy białka p53.

4.3. Analiza potencjalnego miejsca wiązania białka p53 w sekwencji wzmacniającej genu *NCR3LG1*



Ryc. 20. Analiza sklonowanego fragmentu sekwencji wzmacniającej genu *NCR3LG1* do oceny potencjalnego miejsca wiązania białka p53. (A) Aktywacja egzogennej formy białka p53 poprzez zastosowanie wcześniej wspomnianych plazmidów oraz (B) aktywacja endogennej formy białka p53 poprzez zastosowanie substancji AN w linii U-2 OS. Czerwonym prostokątem zaznaczono wybrane miejsce do analiz. Opis wybranych próbek z bazy danych przedstawiono w opisie ryc. 18.

Z zastosowaniem podobnej metodologii wykazano, że fragment genu *NCR3LG1*, który w analizie ChIP-Seq wykazuje wiązanie białka p53 posiada zdolność aktywacji genu reporterowego w odpowiedzi na działanie egzo- i endogennego białka p53. Jednak w przypadku tego fragmentu genu, aktywacja genu kodującego lucyferaze w odpowiedzi na działanie p53 jest wyraźnie słabsza w porównaniu z sekwencjami poprzednich genów.

Podsumowując ten etap badań można stwierdzić, iż uzyskane dane wskazują na to, że białko p53 pobudzone działaniem AN, silnie aktywuje ekspresję co najmniej dwóch genów: *SLAMF7* i *NCR3LG1*, które produkując białka na powierzchni komórek nowotworowych promują ich niszczenie przez komórki NK (ang. *natural killer cells*) [195], [196]. Rola białka kodowanego przez gen *KLRG2* jest niedostatecznie opisana w literaturze.

5. Wpływ białka p53 na aktywację białka SLAMF7

Jednym z genów, który ulegał silnej aktywacji w komórkach A549, U-2 OS i NCI-H460 eksponowanych na AN jest gen *SLAMF7*. Ponadto jego ekspresja była osłabiona w komórkach pozbawionych prawidłowego białka p53. Tak więc, w dalszej części pracy poświęcono więcej uwagi na zrozumienie mechanizmów aktywacji *SLAMF7*. Białko SLAMF7 (ang. *Signaling Lymphocytic Activation Molecule Family member 7*), znane także jako CS1/CRACC/CD319, występuje w różnych komórkach układu immunologicznego (tj. limfocytach T oraz B, komórkach dendrytycznych, komórkach NK czy monocytach). Ulega także nadekspresji w komórkach szpiczaka mnogiego, co obecnie jest wykorzystywane w terapii zhumanizowanym przeciwciałem skierowanym przeciw SLAMF7, o nazwie Elotuzumab (Empliciti®). W terapii szpiczaka mnogiego wykorzystywane są także komórki CAR-T [183].

Szczególnie ważną rolę białko SLAMF7 odgrywa w komórkach NK, ponieważ bierze udział w rozpoznawaniu i aktywacji odpowiedzi przeciwnowotworowej i/lub przeciwwirusowej. Co więcej, białko SLAMF7 wpływa na aktywację komórek NK i ich cytotoksyczne działanie. W komórkach NK białko SLAMF7 oddziałuje z receptorem CRACC (ang. *CD2-like receptor-activating cytotoxic cell*) na powierzchni komórek docelowych [197].

5.1. Rola białka p53 w synergistycznej aktywacji białka SLAMF7 pod wpływem mieszaniny aktynomycyny D i nutliny-3a

Na podstawie wyników RT-qPCR wykazano, że ekspresja genu *SLAMF7* może być aktywowana w sposób zależny od ekspresji genu *TP53*. Białko SLAMF7 odgrywa kluczową rolę w odpowiedzi komórek immunologicznych na obecność komórek nowotworowych w organizmie. Dlatego postanowiono sprawdzić jaki jest związek statusu genu *TP53* w różnych liniach komórkowych z akumulacją białka SLAMF7 ((ryc.22-23) oraz (ryc.29-32)).



Ryc. 21. Analiza poziomu białka SLAMF7 w linii niedrobnokomórkowego raka płuca A549. Komórki linii A549 przez 48 h eksponowano na DMSO (Kon) lub na mieszaninę AN celem aktywacji białka p53. Następnie przygotowano kondycjonowano medium hodowlane znad komórek, a z komórek wykonano lizaty białkowe. Kontrola wewnętrzna eksperymentu to białko HSC70.

W komórkach linii A549 pod wpływem mieszaniny AN obserwuje się akumulację glikolizowanej formy (~50 kDa) oraz formy natywnej (37 kDa) białka SLAMF7 (ryc.21.). Wraz z akumulację białka SLAMF7 obserwuje się wzrost produkcji białka p53. W przypadku medium kondycjonowanego znad komórek A549 eksponowanych na działanie mieszaniny AN obserwuje się formę sekrecyjną SLAMF7, która prawdopodobnie dostaje się do pożywki na skutek proteolitycznego odcięcia domeny zewnętrznej zawierającej grupy cukrowe.



Ryc. 22. Analiza akumulacji białka SLAMF7 w liniach A549 oraz U-2 OS o dzikim statusie genu *TP53*. Komórki obu linii komórkowych poddano 48h ekspozycji na substancje: CPT (kamptotecyna), Kon (DMSO), ActD (aktynomycyna D), mieszaninę AN (aktynomycynę D oraz nutlinę-3a) oraz Ntu3a (nutlinę-3a). Następnie komórki zebrano i przygotowano z nich lizaty białkowe. Analizę wykonano za pomocą techniki Western blotting, a kontrolą wewnętrzną eksperymentu jest białko HSC70.

W następnym doświadczeniu komórki A549 i U-2 OS eksponowano na różne substancje jak przedstawiono na ryc. 22. Następnie zbadano poziom białka SLAMF7 w komórkach kontrolnych oraz traktowanych. Akumulacja białka bardzo silnie wzrasta w obu liniach komórkowych pod wpływem CPT oraz mieszaniny AN, pod wpływem tych substancji jest również aktywowane białko p53. W linii A549 obserwuje się niewielki wzrost ilości pod wpływem ActD oraz Nut3a, natomiast w linii U-2 OS obserwuje się silniejszą produkcję pod wpływem pojedynczych składników mieszaniny.



Ryc. 23. Analiza akumulacji białka SLAMF7 w liniach niedrobnokomórkowego raka płuc o różnym statusie genu *TP53*. Linia NCI-H292 posiada dziki gen *TP53*, natomiast linia NCI-H1299 posiada delecję tego genu. Komórki te także poddano 48h traktowaniu, a po upływie tego czasu komórki zebrano i przygotowano z nich lizaty białkowe. Analizę także wykonano z wykorzystaniem techniki Western blottingu, a kontrolą wewnętrzną eksperymentu stanowiło białko HSC70.

W linii NCI-H1299 nie obserwuje się ani aktywacji białka p53 (w tej linii nowotworowej występuje delecja genu *TP53*), ani akumulacji białka SLAMF7. Natomiast w linii NCI-H292 obserwuje się silną aktywację białka p53 (ryc.23.), której towarzyszy silna akumulacja białka SLAMF7 pod wpływem zastosowanych substancji.

Aby przekonać się, czy białko p53 jest niezbędne również do aktywacji białka SLAMF7 w komórkach nowotworowych poddanych działaniu substancji wywołujących stres komórkowy, komórki U-2 OS oraz komórki A549 ze zredukowaną ekspresją genu *TP53* poddano działaniu substancji jak wskazano na ryc. 24.



Ryc. 24. Analiza akumulacji białka SLAMF7 w liniach komórkowych CRISPR-Con oraz CRISPR-p53. Kontrolę wewnętrzną stanowiło białko HSC70.

Uzyskane wyniki wykazują, że w obu liniach z niedoborem ekspresji genu *TP53* występuje osłabiona aktywacja SLAMF7.

5.2. Analiza roli innych chemioterapeutyków klinicznie stosowanych w kontekście indukcji białka SLAMF7

W poprzednim rozdziale przedstawiono obserwację akumulacji białka SLAMF7 pod wpływem mieszaniny AN oraz pod wpływem substancji: CPT, ActD lub Nut-3a (ryc.22-23.). Następnie postanowiono sprawdzić jak inne powszechnie stosowane chemioterapeutyki wpływają na sposób aktywacji białka SLAMF7 (ryc.25.).



Ryc. 25. Ocena akumulacji białka SLAMF7 pod wpływem różnych powszechnie stosowanych chemioterapeutyków. Komórki linii A549 traktowano przez 48h różnymi chemioterapeutykami: AN - mieszanina aktynomycyny D oraz nutliny-3a (stężenie kolejno: 5 nM oraz 5 µM); PTX – paklitaksel (stężenie 10 μM); Eto – etopozyd (stężenie: 15 μM); Cis-Pt – cis-platyna (stężenie 10 µM); CPT – kamptotecyna (stężenie 5 µM), a komórki kontrolne poddano traktowaniu DMSO, które jest rozpuszczalnikiem mieszaniny AN oraz CPT. Kontrolą wewnętrzną eksperymentu stanowi białko HSC70. Natomiast białko p21 stanowi kontrolę pozytywną, jako białko ulegające akumulacji zależnie od białka p53. W przypadku oceny aktywacji białka p53, zastosowano trzy przeciwciała oznaczone jako: p53 (wykazujące całkowita ilość białka p53); p53-Ser15 (wykrywające endogenną formę białka p53 z fosforylacją seryny 15); p53-Ser37 (wykrywające endogenną formę białka p53 z fosforylacją seryny 37).

Akumulacja całkowitej formy białka p53 jest obserwowana w komórkach eksponowanych na chemioterapeutyki, jednak najsilniejszy efekt obserwuje się w komórkach poddanych działaniu mieszaniny AN oraz CPT (ryc.25.). Wzrost ilości p53 z fosforylacją seryny 15 (jeden z markerów aktywacji p53) jest obserwowany w komórkach traktowanych każdym z zastosowanych chemioterapeutyków z wyjątkiem paklitakselu (PTX). Natomiast forma białka p53 z fosforylacją seryny 37 (p53-Ser37) ulega najsilniejszej akumulacji kolejno: pod wpływem mieszaniny AN, CPT oraz najsłabiej pod wpływem cis-platyny (Cis-Pt) i etopozydu (Eto). Wzrost poziomu białka p21, które stanowi pozytywną kontrolę aktywacji szlaku p53, jest największy pod wpływem mieszaniny AN oraz chemioterapeutyków: Eto, Cis-Pt oraz CPT. Prezentowane wyniki sugerują, że białko p53 aktywowane pod wpływem innych chemioterapeutyków jest w stanie doprowadzić do wzrostu ekspresji SLAMF7. W przypadku komórek eksponowanych na PTX nie obserwuje się ani wzrostu ilości fosforylowanego p53 ani wzrostu poziomu białka p21. Co wskazuje na to, że w zastosowanych warunkach traktowania PTX nie aktywuje szlaku p53, a mimo to następuje wzrost produkcji SLAMF7 (ryc25.). Ta obserwacji sugeruje, że PTX posiada zdolność aktywacji SLAMF7 w sposób niezależny od p53.

Ponieważ akumulacja białka SLAMF7 pod wpływem PTX pojawia się niezależnie od białka p53, a opis tego mechanizmu w literaturze jest niedostateczny, w dalszych częściach tego rozdziału skupiono się na bardziej szczegółowej charakterystyce tego zjawiska.

Jako jednym z pierwszych etapów, oceniono poziom ekspresji genu *SLAMF7* na poziomie mRNA za pomocą techniki RT-qPCR (ryc.26.). Przeprowadzono analizę wariancji (ANOVA) z poprawką Brown-Forsythe w celu oceny różnic między grupą kontrolną, a grupami traktowanymi. Gdzie:* - oznacza istotność statystyczną traktowań względem kontroli.



Ryc. 26. Analiza ekspresji genu *SLAMF7* w linii A549 o dzikim statusie genu *TP53*. Na rycinie przedstawiono względne zmiany w ekspresji genu *SLAMF7* po traktowaniu komórek mieszaniną AN oraz PTX w porównaniu do kontroli. Analizę ekspresji genów normalizowano względem ekspresji genu referencyjnego *ACTB*.

W przypadku ekspresji genu *SLAMF7* pod wpływem PTX obserwuje się ok. 70-krotny wzrost ekspresji względem kontroli (ryc.26.). Pod wpływem AN obserwuje się ok. 10-krotny wzrost ekspresji względem kontroli. Gen *SLAMF7* ulega silniejszej aktywacji na poziomie transkryptu w komórkach pod wpływem PTX, niż pod wpływem AN. Natomiast na poziomie białka (ryc. 21) obserwuje się odwrotną sytuację, czyli białko ulega silniejszej aktywacji pod wpływem mieszaniny AN, niż PTX.

Aby uzyskać model komórek z obniżoną ekspresją genu *SLAMF7* zastosowano metodę CRISPR/Cas9 analogicznie do modelu wyciszenia ekspresji genu *TP53* (ryc.27.). Komórki z kontrolnym plazmidem (CRISPR-Con) oraz komórki w których obniżono ekspresję genu *SLAMF7* (CRISPR-SLAMF7) hodowano w warunkach kontrolnych w obecności pożywki z samym rozpuszczalnikiem (DMSO) lub poddano je działaniu AN lub PTX przez 48h.



Ryc. 27. Analiza uzyskanej linii komórkowej A549 ze zredukowaną ekspresją genu *SLAMF7*. Potwierdzenie redukcji ekspresji genu *SLAMF7* za pomocą metody CRISPR/Cas9 wykonano techniką Western blottingu. Kontrolą wewnętrzną eksperymentu stanowi białko HSC70.

Na wysokości około 55 kDa obserwuje się glikozylowaną formę SLAMF7 w komórkach CRISPR-Con (linia komórkowa kontrolna) eksponowanych na mieszaninę AN oraz PTX. W przypadku linii CRISPR-SLAMF7 (linia komórkowa ze zredukowana ekspresja genu SLAMF7) pod wpływem mieszaniny AN obserwuje się szczątkową ilość formy glikozylowanej. Pomimo zmniejszenia akumulacji formy glikozylowanej, we wszystkich komórkach eksponowanych na chemioterapeutyki obserwuje się forme natywną na wysokości ok. 37 kDa. Występowanie formy natywnej obserwuje się także w komórkach eksponowanych na DMSO w komórkach CRISPR-SLAMF7.

Występowanie aktywacji białka SLAMF7 pod wpływem PTX postanowiono sprawdzić w innych liniach komórkowych nowotworowych oraz w komórkach o właściwościach komórek prawidłowych (ryc.28-32.). Komórki wywodzące się z układu krwiotwórczego eksponowano na substancję przez 6h oraz 24h ze względu na ich wysoką wrażliwość na badane substancje. Pozostałe typy komórek eksponowano na badaną substancję przez 24h lub/oraz 48h, co również było podyktowane przeżywalnością komórek w wybranych punktach czasowych. Ze względu na wyższą wrażliwość komórek nowotworowych zastosowano dawkę 1 µM PTX, natomiast w przypadku aktynomycyny D (ActD) 5nM, nultiny-3a (Nut3a) 5µM, w przypadku kamptotecyny (CPT) 5 µM.



Ryc. 28. Ocena akumulacji białka SLAMF7 w linii niedrobnokomórkowego raka płuca. Komórki eksponowano na wymienione na rycinie mieszaniny przez 24h i 48h. Kontrolą wewnętrzną eksperymentu jest białko HSC70.

W linii niedrobnokomórkowego raka płuca pozbawionej prawidłowej formy białka p53 nie obserwuje się akumulacji białka SLAMF7 zarówno pod wpływem mieszaniny AN oraz pozostałych stresorów: CPT, ActD, Nut3a oraz PTX.



* - status genu TP53: delecja; ** - status genu TP53: mutacja

Ryc.29. Ocena akumulacji białka SLAMF7 w liniach komórek białaczkowych pod wpływem stresorów. Komórki eksponowano na działanie substancji stresowych przez 6h i 24h. Kontrolą wewnętrzną eksperymentu jest białko HSC70.

W badanych liniach komórkowych nie obserwuje aktywacji białka p53.

W komórkach linii HL60 obserwuje się bardzo dużą akumulację SLAMF7 po 24 godzinach traktowania PTX lub CPT.

Obraz zmian poziomu białka SLAMF7 pod wpływem stresorów w pozostałych liniach komórkowych (K562, Jurkat) jest bardzo trudny do interpretacji. W kontrolnych komórkach K562 (DMSO) występują duże rozbieżności dotyczące ilości SLAMF7 w warunkach eksperymentu 6- i 24-godzinnego. W warunkach eksperymentu 24-godzinnego obserwuje się akumulację SLAMF7 pod wpływem AN i CPT i silną represję pod wpływem PTX. W komórkach K562 po 6-godzinnej ekspozycji na stresory akumulacja SLAMF7 nie zmienia się. W komórkach linii Jurkat obserwuje się aktywację białka SLAMF7 pod wpływem substancji CPT po upływie 24h.



Ryc. 30. Ocena aktywacji białka SLAMF7 pod wpływem stresorów w liniach komórkowych wywodzących się z układu krwionośnego o charakterze komórek prawidłowych. Komórki linii NK-92 eksponowano na wybrane stresory przez 24h, natomiast komórki linii RPMI 1788 poddano działaniu na stresory przez 6h i 24h. Kontrolą wewnętrzną eksperymentu jest białko HSC70.

* - status genu TP53: mutacja; **- status genu TP53: dziki typ

W linii komórkowej NK-92 posiadającej zmutowany gen *TP53* po upływie 24h traktowania PTX obserwuje się lekki spadek poziomu białka p53, natomiast nie obserwuje się zmian produkcji SLAMF7. W linii komórkowej RPMI 1788 obserwuje się aktywację białka p53 zarówno po 6 jak i 24 godzinach traktowania. W linii tej nie obserwuje się wyraźnych zmian ekspresji SLAMF7 pod wpływem badanych substancji.

Następnie do dalszych analizy wybrano linie komórkowe czerniaka zawierające prawidłowy gen *TP53*. Sposób traktowania wybranych linii komórek czerniaka zaprezentowano na ryc. 31. We wszystkich przedstawionych liniach komórkowych zauważa się aktywację białka p53 zwykle silniejszą pod wpływem AN lub CPT. W komórkach linii WM35 odnotowano aktywację białka p53 jedynie pod wpływem mieszany AN.



*-dziki status genu TP53

Ryc. 31. Ocena aktywacji białka SLAMF7 w ludzkich liniach czerniaka. Komórki linii WM278, WM793 oraz A375 eksponowano na stresory przez 24h oraz 48h, natomiast komórki linii WM35 przez 24h. Kontrolą wewnętrzną eksperymentu jest białko HSC70.

Na podstawie wyników przedstawionego eksperymentu w komórkach linii WM278 stwierdza się akumulację białka SLAMF7 pod wpływem CPT, która jest silniejsza po upływie 48h. W liniach komórkowych WM793 oraz WM35 obserwuje się produkcje białka SLAMF7 pod wpływem mieszaniny AN oraz CPT. W przypadku linii komórkowej WM793 zauważa się zwiększony poziom białka SLAMF7 po upływie 48h ekspozycji na AN i CPT. Także po upływie 48h w komórkach linii WM793 zauważa się akumulację białka SLAMF7 pod wpływem PTX.

Ponieważ linia A375 bardzo silnie reaguje na CPT, dlatego ten stresor został pominięty w niniejszym eksperymencie. Zauważa się akumulację białka SLAMF7 po 24h w komórkach eksponowanych na mieszaninę AN. Co więcej, poziom tego białka wzrasta po upływie 48h. Po upływie 48h obserwuję się także akumulację białka SLAMF7 pod wpływem PTX.



*- zmutowany status genu TP53; **- dziki status genu TP53

Ryc. 32. Ocena ilości białka SLAMF7 w liniach komórkowych wywodzących się z nowotworów regionu głowy i szyi. Komórki linii FaDu oraz UM-SCC-47 eksponowano na stresory przez 24h oraz 48h. Natomiast linia komórkowa UD-SCC-47 przez 24h. Kontrolą wewnętrzną eksperymentu jest białko HSC70.

Zbadano również akumulację białka SLAMF7 w trzech liniach komórkowych wywodzących się z nowotworów regionu głowy i szyi. Jedna z tych linii wykazuje zmutowany typ genu *TP53*, natomiast pozostałe dwie posiadają dziki typ genu *TP53*. W wyniku traktowania badanymi substancjami nie obserwuje się akumulacji białka SLAMF7 w liniach FaDu (dostrzega się niespecyficzny prążek na wysokości 70 kDa) oraz UD-SCC-2. W linii komórkowej UM-SCC-47 dostrzega się akumulację białka SLAMF7 pod wpływem CPT po 24 i 48 h traktowania oraz pod wpływem PTX po 24h traktowania.

6. Znaczenie białka p53 w cytotoksycznym mechanizmie komórek NK-92 w ko-kulturach z komórkami niedrobnokomórkowego raka płuca

Układ immunologiczny pełni kluczową rolę w obronie organizmu przed różnego rodzaju patogenami, ale także bierze udział w eliminacji komórek nowotworowych. Jednymi z głównych komórek efektorowych układu odpornościowego są komórki NK. Komórkowa linia NK-92, o cechach komórek NK, jest znana z silnej aktywności cytotoksycznej przeciwko komórkom nowotworowym i zainfekowanym wirusem [144]. W ostatnich latach pojawiło się wiele doniesień o roli białka p53 w odporności przeciwnowotworowej. Białko p53 kontroluje niektóre geny związane z funkcjonowaniem komórek NK, np. gen *TRAIL*; ale również ligandy ULBP1/2, które umożliwiają rozpoznawanie komórek nowotworowych przez komórki NK [71].

Eksponowanie na mieszaninę AN nowotworowych linii komórkowych może aktywować geny związane z odpornością wrodzoną [10]. Jednym z pierwszych elementów odporności przeciwnowotworowej jest wykrywanie komórek nowotworowych przez komórki NK. W związku z tym w niniejszym rozdziale zostaną przedstawione wyniki pokazujące wpływ mieszaniny AN (bądź pojedynczych substancji tj. aktynomycyny D oraz nutliny-3a) na uwrażliwienie komórek pochodzących z niedrobnokomórkowego raka płuca o różnym statusie genu *TP53*. Komórki te eksponowano przez 48h na ww. związki (komórki kontrolne były traktowane DMSO), a następnie przez 24h część z komórek nowotworowych miała kontakt z komórkami NK-92. Komórki nowotworowe, które nie miały kontaktu z komórkami NK-92 (na ryc. 33. oraz ryc. 34. oznaczono je jako "pożywka") wykorzystano jako punkt odniesienia do normalizacji, aby ocenić wpływ badanej substancji na cytotoksyczne działanie komórek NK-92. Jako wizualizację wyników testów oceny metabolicznej (wyznaczającą procent żywych komórek) przedstawiono wybarwione komórki, które pozostały przy życiu na płytkach 6- lub 12-dołkowych.

Do oceny znamienności statystycznej wykrytych różnic wykorzystano modyfikację testu ANOVA – test Brown-Forsythe z poprawką Welcha lub t-test z poprawką Welcha, lub też wielokrotny niezwiązany t-test. Analizę statystyczną wykonano w programie GraphPad wersji 10.2.2.



Ryc. 33. Ocena skutku ekspozycji komórek niedrobnokomórkowego raka płuca na działanie aktynomycyny D oraz nutliny-3a wobec cytotoksycznego działania komórek NK-92; wykonane za pomocą testu MTS (przedstawione na wykresie A-C) oraz testu klonogennego (prezentowane w postaci płytek D-E). Intensywność fioletowej barwy na płytkach jest powiązana z ilością komórek nowotworowych.

Na początku cyklu doświadczeń, podczas ko-inkubacji, zastosowano dwa liczbowe stosunki komórek nowotworowych do komórek NK-92 1:1 lub 1:5 (A549:NK-92). Na ryc. 33 A i ryc. 33 D. można zauważyć, że wraz ze wzrostem liczby komórek NK-92 spada liczba komórek nowotworowych, które pozostały przy życiu. Można dostrzec, że liczba komórek nowotworowych eksponowanych na mieszaninę AN po kontakcie z komórkami NK-92 jest niższa, niż komórek hodowanych jedynie w pożywce. Przy stosunku 1:1 (A549:NK-92) zaobserwowano żywotność komórek nowotworowych eksponowanych na AN na poziomie 20%. W przypadku komórek nowotworowych eksponowanych na mieszaninę AN, które zmieszano z 5-krotną liczbą komórek NK-92 obserwuje się aktywność metaboliczną na poziome 7%. Dlatego do dalszych eksperymentów wybrano stosunek komórek nowotworowych do komórek NK-92 wynoszący 1:1 (chciano uniknąć wysokiej śmiertelności komórek nowotworowych spowodowanej nadmiarem komórek NK).

W następnym eksperymencie komórki A549 eksponowano na aktynomycynę D, nutlinę-3a lub mieszaninę obu terapeutyków (AN), a następnie komórki nowotworowe inkubowano wspólnie z komórkami NK-92 (ryc. 33 B i ryc. 33 E). Żadna z substancji, ani aktynomycyna D ani nutlina-3a, działając osobno nie uwrażliwia komórek nowotworowych na cytotoksyczne działanie komórek NK-92 w takim samym stopniu jak mieszanina AN.

Aby potwierdzić rolę białka p53 w uwrażliwianiu komórek nowotworowych na cytotoksyczne działanie komórek NK-92 zastosowano zmodyfikowaną linię A549 CRISPR-p53 (ze zredukowaną ekspresją genu *TP53*) oraz linię A549 CRISPR-Con (ryc. 33 C i ryc. 33 F). Komórki A549 (CRISPR-Con i CRISPR-p53) eksponowano najpierw na działanie mieszaniny AN,

a następnie inkubowano je z komórkami NK-92. W takich warunkach komórki CRISPR-Con eksponowane na mieszaninę AN wykazywały względną żywotność 20% natomiast komórki pozbawione prawidłowej formy białka p53 wykazywały żywotność dwa razy większą 40%. Tak więc, "wyłączenie" prawidłowej formy p53 zmniejsza wrażliwość komórek nowotworowych na cytotoksyczne działanie komórek NK-92 w warunkach uprzedniego traktowania AN.

Aby lepiej scharakteryzować efekt uwrażliwienia, wybrano dwie inne linie niedrobnokomórkowego raka płuca NCI-H460 (dziki status genu *TP53*) oraz NCI-H1299 (pozbawione genu *TP53*).



Ryc. 34. Ocena poziomu cytotoksycznego działania komórek NK-92 na komórki nowotworowe o odmiennym statusie genu *TP53* traktowane aktynomycyną D i nutliną-3a. Test MTS (wykresy A-C) oraz test klonogenny (zdjęcia wybarwionych płytek D-E). Intensywność fioletowej barwy jest powiązana z ilością komórek nowotworowych.

Komórki linii NCI-H460 najpierw eksponowano na mieszaninę AN lub DMSO, a następnie inkubowano z komórkami NK-92. Żywotność komórek NCI-H460 wynosiła ok. 20% po eksponowaniu na mieszaninę AN i inkubacji z komórkami NK-92, w porównaniu do 80% do komórek eksponowanych na DMSO i inkubowanych z NK-92.

Eksperyment wykonano także na linii NCI-H1299. Komórki tej linii, które eksponowano najpierw na DMSO wykazują ok. 50% żywotność po kontakcie z komórkami NK-92. Natomiast, w komórkach NCI-H1299 eksponowanych najpierw na mieszaninę AN, a następnie na komórki NK-92 obserwuje się żywotność ok. 25%. Aby sprawdzić, czy zmniejszenie żywotności jest rezultatem wspólnego działania aktynomycyny D i nutliny-3a, czy też któryś z tych związków działa niezależnie wykonano doświadczenie z traktowaniem pojedynczymi substancjami. Okazało się, że ani aktynomycyna D, ani nutlina-3a działając oddzielnie nie uwrażliwiają komórek NCI-H1299 na cytotoksyczne działanie komórek NK-92. Efekt jest widoczny tylko przy zastosowaniu jednocześnie obu substancji.

Wyniki powyższych doświadczeń wskazują no to, że p53 może przyczyniać się do uwrażliwienia komórek nowotworowych na cytotoksyczne działanie komórek NK-92. Obserwuje się jednak

mechanizmy aktywacji efektu cytotoksycznego komórek NK-92, które zachodzą niezależnie od statusu genu *TP53*.

Aby lepiej zrozumieć mechanizm uwrażliwienia komórek NCI-H1299 eksponowanych na mieszaninę AN na cytotoksyczne działanie komórek NK-92, oceniono w komórkach akumulację wybranych białek, które mogą stymulować cytotoksyczne działanie komórek odpornościowych, w tym komórek NK-92. Poza linią NCI-H1299 wykorzystano inne nowotworowe linie komórkowe posiadające delecję genu *TP53* - linię NCI-H358 (niedrobnokomórkowego raka płuca) oraz Saos-2 (kostniakomięsaka). Komórki eksponowano przez 48h na wskazane substancje (ryc. 35.).



Ryc. 35. Analiza poziomu wybranych białek odporności wrodzonej w komórkach eksponowanych na zaznaczone stresory. Kontrolą wewnętrzną eksperymentu jest białko HSC70.

Aktywne białko IFIH1 inicjuje kaskadę sygnałową prowadzącą do produkcji interferonów i innych cytokin prozapalnych, co może stymulować cytotoksyczność komórek odpornościowych. Na podobnej zasadzie działają białka IFIT1 oraz IFIT3. Immunodetekcja badanych białek wykazała, że w komórkach NCI-H1299 mieszanina AN jest w stanie w sposób niezależny od p53 zwiększyć ilość białek IFIH1, IFIT1 oraz IFIT3. Tak więc, AN może stymulować ekspresję genów odporności wrodzonej w sposób niezależny od p53.

6.1. Analiza molekularnych skutków działania medium kondycjonowanego z hodowli komórek NK-92

Komórki NK wydzielają wiele cytokin. Jedną z najsilniej wydzielanych cytokin wytwarzanych m.in. przez komórki NK jest interferon-γ (IFN-γ), który jest kluczową cytokina prozapalna i immunoregulacyjna. Do funkcji IFN-γ należy m.in. odpowiedź immunologiczna polegająca na stymulacji aktywności komórek NK i zwiększona prezentacja obcych antygenów na powierzchni komórek poddanych ekspozycji na tą cytokinę. Linia komórkowa NK-92 wykazuje fenotyp CD56^{BRIGHT}CD16⁻KIR⁻, jednak pod względem cytotoksyczności wobec komórek nowotworowych wykazuje fenotyp CD56^{DIM}CD16⁺. Jedną z różnic pomiędzy tymi populacjami jest ilość wydzielanego IFN-γ. Ponadto, ilość IFN-γ wydzielanego przez komórki NK zwiększa się podczas ich kontaktu z komórkami docelowymi (nowotworowymi lub zakażonymi wirusem). Jedną z funkcji IFN-γ jest indukcja ekspresji cząsteczek MHC klasy I na komórkach docelowych, co zwiększa ich wrażliwość na cytotoksyczność ze strony limfocytów. Celem kolejnego doświadczenia było sprawdzenie, czy medium w którym rosły komórki NK-92, same lub w obecności komórek nowotworowych, jest w stanie wywołać efekty podobne do działania IFN-γ (ryc.36.).

A549



Ryc. 36. Analiza poziomu wybranych białek uczestniczących w szlaku IFN-γ w komórkach A549 eksponowanych na kondycjonowane medium. Medium kondycjonowane pozyskano z komórek nowotworowych (linii A549): kontrolnych, które traktowano DMSO (KON); komórek nowotworowych traktowanych mieszaniną AN (AN); komórek NK-92, które nie miały kontaktu z komórkami nowotworowymi (NK-92); z ko-kultury komórek NK-92 wraz z komórkami nowotworowymi kontrolnymi w stosunku 1:1 (KON 1:1 NK-92); z ko-kultury komórek NK-92 wraz z komórkami nowotworowymi eksponowanymi na mieszaninę AN (AN 1:1 NK-92). Komórki w ostatniej ścieżce eksponowano na IFN-y o stężeniu 1 ng/ml. Powyższymi mediami kondycjonowanymi traktowano komórki linii A549 przez 6h. Pozytywna kontrolą eksperymentu stanowiło medium z IFN-y, medium a kontrola negatywna kontrolne. Wewnętrzną kontrolą eksperymentu stanowi białko HSC70.

Warunki doświadczenia przedstawiono w opisie ryc.36. Celem powyższego eksperymentu było sprawdzenie czy kondycjonowana pożywka znad komórek NK-92 rosnących samodzielnie lub w obecności komórek nowotworowych (kontrolnych lub eksponowanych na AN) wpłynie na fosforylację białka STAT1 (indukowaną IFN-γ) i na aktywację tego szlaku (dlatego sprawdzono ilość białka IRF1 kodowanego przez gen stymulowany IFN-γ). Powyższy eksperyment wykazał, że komórki NK-92 wydzielają dużą ilość IFN-γ, o czym świadczy wzmożona produkcja IRF1 w komórkach docelowych oraz wzmożona fosforylacja białka STAT1. Jednak na podstawie niniejszego eksperymentu nie można stwierdzić dokładnej ilości wydzielanego IFN-γ oraz czy obserwowana

aktywacja jest zasługą jedynie IFN-γ. Co ciekawe, fosforylacja tyrozyny 701 białka STAT1 (Y701) jest najsilniejsza w komórkach eksponowanych na medium z ko-kultury (współhodowli) A549 AN 1:1 NK-92. Fosforylacja tego białka na skutek ekspozycji na medium kondycjonowane pozyskane znad ko-kultur A549 KON 1:1 NK-92 oraz z samych komórek NK-92 pozostaje na tym samym poziomie. Warto zaznaczyć, że poziom fosforylacji STAT1 (na tyrozynie 701) w ww. próbkach jest znacznie wyższy, niż w komórkach eksponowanych na medium zawierające jedynie cytokinę. W przypadku kaspazy-1 (CASP1) nie obserwuje się znaczących różnic, jedynie w komórkach eksponowanym na medium kondycjonowane z hodowli komórek NK-92 zaobserwowano wyższy poziom tego białka, niż w pozostałych (CASP1 jest również aktywowana przez IFN-γ).

W powyższym eksperymencie wykazano, że komórki NK-92 produkują czynnik o podobnym działaniu jak IFN-γ powodujący fosforylację STAT1 na Y701, której towarzyszy wzrost aktywacji białka IRF1. Komórki NK oraz cytotoksyczne limfocyty T indukują śmierć komórek docelowych na kilka sposobów. Jeden z nich polega na powierzchniowej ekspresji liganda dla receptora FAS obecnego na powierzchni komórek docelowych. Ligand FAS na powierzchni limfocytu wiąże się z receptorem FAS na powierzchni komórki docelowej, co uruchamia kaskadę kaspaz i apoptotyczną śmierć komórki.

Celem kolejnego eksperymentu było sprawdzenie, czy medium kondycjonowane z hodowli NK-92 ma zdolność uwrażliwienia komórek docelowych na pro-apoptotyczne działanie liganda receptora FAS. W tym celu komórki A549 traktowano w sposób przedstawiony na ryc.37. Komórki traktowano świeżą pożywką dla komórek NK-92, świeżą pożywką wraz z ligandem FAS, pożywką kondycjonowaną z hodowli 200 000 komórek NK-92 oraz pożywką kondycjonowaną z dodatkiem liganda FAS. Pozytywną kontrolę stanowiły komórki A549 traktowane wstępnie AN, a następnie eksponowane na ligand FAS (50 ng/ml), zgodnie z sugestiami zawartymi w pracy [198].



wpływu substancji 37. Analiza Ryc. obecnych w kondycjonowanej pożywce z hodowli komórek NK-92 na indukcję apoptozy w komórkach nowotworowych linii A549. Komórki linii A549 traktowano medium kondycjonowanym: z hodowli 50 000 komórek NK-92 oraz 200 000 komórek NK-92. Do części medium znad 200 000 komórek NK-92 dodano FASLG (ligand receptora FAS) w stężeniu 50 ng/ml. Pozostałe komórki linii A549 hodowano w standardowej pożywce hodowlanej lub zawierającej FASLG 50 ng/ml. stężeniu 0 Kontrolą pozytywną eksperymentu stanowiły komórki eksponowane na mieszaninę AN + FASLG, a kontrolą wewnętrzną eksperymentu jest białko HSC70.

W komórkach traktowanych medium kondycjonowanym z hodowli komórek NK-92 obserwuje się fosforylacje tyrozyny 701 białka STAT1, czemu towarzyszy także wzrost białka IRF1. W tych samych próbkach obserwuje się także silną akumulację kaspazy-1 (CASP1). Wskazuje to na działanie IFN- γ obecnego w pożywce kondycjonowanej. Akumulację kaspazy-1 obserwuje się również w komórkach traktowanych AN+FASLG, jednak poziom jest znacznie niższy od medium kondycjonowanego z hodowli komórek NK-92. Kaspaza-8 (CASP8) aktywuje zewnętrzny szlak apoptozy; obserwuje się jej aktywację poprzez proteolityczne cięcie i powstanie krótszych form w komórkach eksponowanych na kondycjonowane medium z hodowli 200 000 komórek oraz na FASLG. Słabą aktywację kaspazy-8 obserwuje się w komórkach traktowanych świeża pożywka zawierająca FASLG. Aktywacji CASP8 nie obserwuje się w komórkach traktowanych samą pożywką kondycjonowaną. Aktywacji kaspazie-8 towarzyszy wzrost poziomu aktywnej, efektorowej kaspazy-3 (CASP3), co można zaobserwować poprzez widoczne cięte formy. Najsilniejszą aktywację CASP3 obserwuje się w próbce traktowanej AN+FASLG (kontrola pozytywna). Tak więc, pożywka kondycjonowana z hodowli komórek NK-92 bardzo wyraźnie zwiększa wrażliwość komórek A549 na proapoptotyczne działanie liganda receptora FAS. Sugeruje to, że komórki NK-92 przyczyniają się do śmierci komórek nowotworowych nie tylko przez bezpośredni kontakt, ale również poprzez wydzielanie czynników do środowiska, które zwiększają wrażliwość komórek docelowych na proapoptotyczne działanie liganda FAS.

7. Analiza roli białka p53 w regulacji działania interferonów

Obecny stan wiedzy wskazuje, że białko p53 posiada właściwości wpływania na odporność przeciwnowotworową, np. poprzez regulacje ekspresji genów biorących udział w odporności przeciwnowotworowej tj. TRAIL, DR5, FAS, ULBP1/2 czy STING [71]. Badania przeprowadzone przez grupę Profesora Rusina wskazują, że komórki raka płuca pod wpływem mieszaniny aktynomycyny D oraz nutliny-3a aktywują za pośrednictwem p53 ekspresję genu STING, który promuje ekspresję interferonów (stąd skrót nazwy - ang. stymulator of interferon genes (stymulator genów interferonu (STING)) [10]. Tak wiec, aktywacja p53 może wpływać na produkcje tych cytokin. Interferony (IFN) są grupą cytokin wytwarzanych i wydzielanych przez różne typy komórek w odpowiedzi na zakażenia patogenami. Pełnią rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej oraz w zwalczaniu patogenów. Ich aktywność jest regulowana przez czynniki transkrypcyjne z rodziny STAT, które promuja ekspresję genów zależnych od interferonów. Szlaki sygnalizacyjne aktywowane przez IFN posiadają negatywne regulatory, utrzymujące pętle negatywnego sprzężenia zwrotnego. Jednym z nich jest białko SOCS1, które hamuje fosforylację i aktywację STAT1. Dotychczas potwierdzono, że gen kodujący białko SOCS1 jest regulowany przez białko p53, a silna aktywacja p53 jest związana z defosforylacją tyrozyny 701 białka STAT1 [10]. Białko STAT1 występuje jako para izoform STAT1α oraz STAT1β (ryc. 40 i .ryc.43.)



Ryc. 38. Ocena akumulacji białka SOCS1 (inhibitora fosforylacji białka STAT1) względem aktywacji białka p53 w nowotworowych linia komórkowych o różnym statusie genu *TP53*. Linie komórkowe A549, U-2 OS oraz NCI-H292 posiadają dziki gen *TP53*, natomiast linia NCI-H1299 jest pozbawiona ekspresji genu *TP53*. Poziom produkcji białka p53 potwierdza status genu *TP53* w wymienionych liniach komórkowych. Wszystkie komórki były eksponowane przez 48h na wymienione substancje. Kontrolę wewnętrzną we wszystkich liniach stanowiło białko HSC70.

Badania dotyczące regulacji SOCS1 przez p53 były wykonane w oparciu o jedną linię komórkową - A549. Celem realizowanym w ramach niniejszego projektu doktorskiego było zbadanie regulacji SOCS1 w innych liniach komórkowych (ryc. 38). Białko SOCS1 w liniach A549 oraz NCI-H292 ulega akumulacji pod wpływem AN i CPT. W linii nowotworowej U-2 OS białko SOCS1 ulega konstytutywnej aktywacji w komórkach rosnących w warunkach kontrolnych. Co zaskakujące, jego poziom spada pod wpływem ekspozycji na ActD, Nut3a oraz pod wpływem mieszaniny AN. Natomiast w linii nowotworowej NCI-H1299 białko SOCS1 również ulega konstytutywnej ekspresji, jednak jego poziom nie zmienia się pod wpływem zastosowanych traktowań z wyjątkiem CPT, które nieznacznie obniża jego poziom.

Tak więc w komórkach z dzikim p53, w których SOCS1 jest na niskim poziomie w warunkach braku stresu, traktowanie AN zwiększa jego aktywację, natomiast w komórkach wykazujących wzmożoną aktywację SOCS1 w warunkach kontrolnych, czynniki stresu redukują jego ilość (ryc.38.).

Celem kolejnego doświadczenia było sprawdzenie, czy p53 uczestniczy w obniżeniu poziomu SOCS1. Do tego celu wykorzystano klony komórek U-2 OS przygotowane metodą CRISPR/Cas9, w których nastąpiła całkowity utrata produkcji białka p53 (*knock-out clones*). Doświadczenie przeprowadzono z wykorzystaniem 4 klonów pozbawionych p53 i dwóch klonów kontrolnych (ryc. 39).

U-2 OS p53 knockout clones



Ryc. 39. Analiza produkcji białka SOCS1 w wyprowadzonych klonach z wyciszoną ekspresją (*knock-out*) genu *TP53* (na rycinie oznaczone jako p53-KO #22, p53-KO #23, p53-KO #11 oraz p53 #14). Klony kontrolne oznaczono jako Con#11 oraz Con#8. Komórki U-2 OS traktowano substancjami przez 48h. Kontrolę wewnętrzną eksperymentu stanowi białko HSC70.

Klony traktowano mieszaniną AN lub samą nutliną-3a. W klonach kontrolnych, podobnie jak w wyjściowych komórkach niemodyfikowanych, nastąpiła redukcja poziomu SOCS1 zarówno pod wpływem nutliny-3a jak i pod wpływem mieszaniny AN. Natomiast w klonach pozbawionych p53 mieszanina AN nadal posiada zdolność zmniejszania poziomu SOCS1, czego nie obserwuje się w przypadku nutliny-3a. Mieszanina AN zmniejsza poziom SOCS1 w sposób niezależny od p53, natomiast nutlina-3a niewątpliwie wpływa na redukcję poziomu SOCS1 za pośrednictwem p53. Zatem wpływ p53 na ekspresję genów zależnych od interferonów za pośrednictwem regulacji białka SOCS1 może być różny w zależności od typu komórek. Ponieważ SOCS1 regulując fosforylację STAT1 może wpływać zarówno na skutki działania interferonu typu I (np. interferonu- α) jak i interferonu typu II (interferon- γ). W kolejnych doświadczeniach sprawdzano jak aktywacja p53 przy pomocy mieszaniny AN wpływa na ekspresję genów aktywowanych interfonem- α 1 lub interferonem- γ .

8. Rola białka p53 w regulacji szlaku IFN-α1

8.1. Odpowiedź linii komórek A549 na różne stężenia IFN-α1 – wybór stężenia

Doświadczenia z interferonem-α rozpoczęto od wyznaczenia dawki, która będzie w stanie wywołać efekt molekularny w postaci fosforylacji czynnika transkrypcyjnego STAT1 przy jednoczesnej aktywacji genów będących pod kontrolą interferonu-α i kodujących białka MX1 i IRF7 (ryc.40.).



Ryc. 40. Ustalenie dawki interferonu-α1 na podstawie eksperymentu typu dawka-odpowiedź w komórkach nowotworowych linii A549. Komórki eksponowano przez 24h na różne stężenia IFN-α1. Kontrole wewnętrzną stanowiło białko HSC70. Kon – komórki kontrolne; poddane działaniu DMSO (rozpuszczalnik mieszaniny AN); AN – komórki poddane ekspozycji na mieszaninę aktynomycyny D oraz nutliny-3a. Na rycinie wskazano na czerwono wybrane stężenie IFN-α1. Czerwonymi strzałkami zaznaczono izoformy białka STAT1

Interferon-α1 (IFN-α1) aktywuje fosforylację tyrozyny 701 białka STAT1, już w dawce 0,5 ng/ml. W przypadku wyższych dawek (powyżej 5 ng/ml) interferonu, fosforylacja STAT1 nie ulega zmianie. Poziom białka MXI, kodowanego przez jeden z genów aktywowanych IFN-α1, wzrasta w komórkach eksponowanych na 0,5 ng/ml IFN-α1, a poziom białka w komórkach eksponowanych na wyższe dawki nie ulega zmianie. W przypadku białka IRF7 obserwuje się wzrost jego akumulacji, jednak nie obserwuje dużych zmian ilości pomiędzy dawkami IFN-α1. Ponieważ zastosowanie interferonu w stężeniu 1 ng/ml spowodowało wyraźny wzrost fosforylacji STAT1 oraz akumulacji MX1 oraz IRF7, dlatego do dalszych doświadczeń użyto takiego stężenia.



8.2. Rola białka p53 w regulacji fosforylacji STAT1 indukowanej IFN-α1

Ryc. 41. Ocena roli białka p53 w aktywacji białek uczestniczących w szlaku IFN-α1. Komórki linii A549 oraz U-2 OS (obie linie charakteryzują się dzikim genem *TP53*) oraz linie A549 CRISPR-Con i CRISPR-p53 traktowano przez 24h mieszaniną AN, bądź Nut-3a. DMSO to rozpuszczalnik substancji z mieszaniny AN. Następnie po 24h wymieniono pożywkę na pożywkę zawierającą IFN-α1 (1 ng/ml) w części komórek (zgodnie z ryciną). Kontrolą wewnętrzną eksperymentu stanowiło białko HSC70, bądź GAPDH (zgodnie z ryciną).

Celem kolejnego doświadczenia było sprawdzenie, czy status p53 wpływa na modulację fosforylacji STAT1 (ryc.41.). Komórki A549 lub U-2 OS wstępnie traktowano AN lub pozwolono im rosnąć w warunkach kontrolnych. Po 24 godzinach część komórek eksponowano na IFN-α1, a pozostałym komórkom pozwolono rosnąć w warunkach kontrolnych lub dalej eksponowano na AN zgodnie ze schematem przedstawionym na Ryc.41. Komórki A549 poddane ekspozycji IFN-α1 są zdolne do fosforylacji tyrozyny 701 białka STAT1 (ryc. 41A.). Fosforylacja białka STAT1 jest hamowana, kiedy wcześniej w komórkach nowotworowych aktywowano białko p53 za pomocą AN (o aktywacji białka p53 świadczy wzrost poziomu formy całkowitej oraz obecność fosforylacji seryny 37). Całkowity poziom białka STAT1 ulega nieznacznemu zwiększeniu w komórkach eksponowanych na IFN-α1. W przypadku linii U-2 OS obserwuje się słabą fosforylacje białka STAT1, natomiast całkowita forma białka STAT1 jest silniej produkowana w komórkach najpierw eksponowanych na mieszaninę AN. Białko SOCS1 ulega akumulacji w komórkach A549 traktowanych AN, natomiast w komórkach U-2 OS w podobnych warunkach poziom SOCS1 wyraźnie spada. W przeciwieństwie do komórek A549, w komórkach U-2 OS uprzednia aktywacja p53 nie wpływa na stan fosforylacji STAT1 indukowanej IFN-α1.

W kolejnym doświadczeniu sprawdzono, czy w komórkach A549 uprzednia aktywacja p53 samą nutliną-3a będzie również modulowała fosforylację STAT1. Wyniki przedstawione na ryc.41B wyraźnie wskazują, że wpływ nutliny-3a na fosforylację STAT1 jest mniejszy niż wpływ mieszaniny AN. Nutlina-3a nie aktywuje SOCS1 (w przeciwieństwie do mieszaniny AN). Aby przekonać się, czy wpływ AN na fosforylację STAT1 odbywa się za pośrednictwem p53, eksperyment wg schematu traktowania z ryc. 41A przeprowadzono z udziałem komórek ze zredukowaną ekspresją genu *TP53* oraz komórek kontrolnych (ryc.41.C). Niedobór p53 sprawia, że mieszanina AN nie jest w stanie wydajnie obniżać fosforylacji STAT1, co sugeruje, że p53 uczestniczy w tym procesie. Kiedy jednak dodatkowo zbadano poziom białek kodowanych przez geny aktywowane IFN-α1 (ryc.41. C. białka: MX1, IRF7), stwierdzono, iż mimo spadku fosforylacji STAT1 wygenerowanego mieszaniną AN, poziom ekspresji genów kodujących białka MX1 i IRF7 nie uległ zmianie.

Podsumowując, aktywna forma białka p53 generuje spadek fosforylacji STAT1, co jednak nie przekłada się na spadek ekspresji genów regulowanych przez ten czynnik transkrypcyjny.

8.3. Rola białka p53 w aktywacji genów regulowanych przez IFN-α1

Powyższe eksperymenty wykazały, że fosforylacja białka STAT1 nie zawsze wpływa na ekspresję genów regulowanych przez ten czynnik transkrypcyjny. Dlatego następnym celem było sprawdzenie aktywacji dodatkowych genów zależnych od IFN-α1 w warunkach uprzedniego traktowania mieszaniną AN oraz w zależności od status genu *TP53*. Do tej oceny wybrano zmodyfikowaną linię A549 CRISPR-p53 z obniżoną ekspresją genu *TP53* oraz linię kontrolną, CRISPR-Con. Komórki eksponowano na różne substancję według schematu przedstawionego na Ryc 41A, a następnie wyizolowano z nich RNA i przeprowadzono analizę ekspresji genów na pomocą metody RT-qPCR (ryc.42.).

Dane zostały przedstawione jako krotność ekspresji (opisane jako krotność) w komórkach traktowanych względem komórek kontrolnych. Do analizy statystycznej zastosowano niesparowany t-test z korektą Welcha uwzględniającą współczynnik FDR (*False Discovery Rate* = 5%). Istotność statystyczną została wyznaczona dla komórek z dzikim genem *TP53* traktowanych mieszaniną AN w porównaniu do AN IFN- α 1 oraz AN IFN- α 1 względem IFN- α 1 (oznaczono na czerwono). Wyznaczono także istotność statystyczną dla tego samego traktowania (oznaczono na niebiesko) między komórkami CRISPR-Con a CRISPR-p53. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu GraphPadPrism 10.2.2 dla systemu Windows.



Ryc. 42. Analiza metodą RT-qPCR poziomu ekspresji wybranych genów uczestniczących w szlaku IFN-α1 w zmodyfikowanej linii niedrobnokomórkowego raka płuc - A549 z obniżoną ekspresją genu *TP53* (granatowa kolumna) oraz w linii kontrolnej (czerwona kolumna). Wyniki normalizowano względem ekspresji genu referencyjnego *ACTB*.

Ekspresja genu *OAS1* jest obniżona w komórkach CRISPR-p53 eksponowanych na mieszaninę AN, co wskazuje na to, że pod wpływem tej mieszaniny gen *OAS1* ulega aktywacji w sposób zależny od p53. Jednak w przypadku traktowania IFN-α1 ekspresja genu *OAS1* nie ulega zmianie w zależności od statusu p53. Gen *IF127* utrzymuje się na tym samym poziomie w komórkach eksponowanych na cytokinę niezależnie od statusu p53. Jednak jest silnie aktywowany pod wpływem mieszaniny AN IFN-α1 (~800-krotnie) niezależnie od statusu p53 (nieco słabsza aktywacja w komórkach pozbawionych p53 nie jest znamienna statystycznie). Tak więc, ekspozycja komórek na mieszaninę AN oraz IFN-α1 w sposób synergistyczny aktywuje gen *IF127* niezależnie od p53. Ekspresja genu *IF1T3*

pod wpływem mieszaniny AN lub AN i IFN-α1 ulega ekspresji w sposób zależny od białka p53, jednak pod wpływem samej cytokiny obserwuje się aktywację niższą w komórkach kontrolnych względem komórek ze zredukowana ekspresja genu TP53. Natomiast aktywacja tego genu w komórkach pod wpływem AN i IFN-α1 jest addytywną wartością poszczególnych substancji mieszaniny, co obserwuje się zarówno w komórkach kontrolnych oraz z obniżoną ekspresją genu TP53. Tak więc, w warunkach ekspozycje na mieszanine AN białko p53 pozytywnie reguluje ekspresję genu IFIT3. Co ciekawe, gen pochodzący z tej samej rodziny – gen IFIT2 –wykazuje nieco inny wzór ekspresji – w jego przypadku aktywacji białka p53 wydaje się odgrywać negatywną rolę w regulacji ekspresji, jednak zaobserwowane różnice nie są znamienne statystycznie. W przypadku genu OAS3 można dostrzec, że wzór jego ekspresji jest inny, niż genu OAS1. Poziom ekspresji genu OAS3 w kontroli oraz pod wpływem mieszaniny AN utrzymuje się niemal na tym samym poziomie. Natomiast pod wpływem traktowania interferonem gen OAS3 ulega aktywacji niezależnie od statusu p53 i dodatkowego traktowania mieszanina AN. W przypadku genu DDX60, podobnie jak w przypadku genów OAS1 i IFIT3, mieszanina AN oraz IFNα1 współdziałają w jego aktywacji. Jednak w jego przypadku, ta aktywacja zachodzi niezależnie od statusu aktywacji p53.Białko p53 bardzo wyraźnie negatywnie reguluje ekspresję dwóch genów IFI44 oraz *IFITM3* – w warunkach traktowania AN i IFN- α 1 ekspresja wspomnianych genów jest wyraźnie wyższa w komórkach pozbawionych prawidłowego p53 (CRISPR-p53). Podobne zjawisko występuje w przypadku genu IFI6, jednak wartości poziomu ekspresji obarczone są zbyt dużym błędem i różnica nie jest znamienna statystycznie. Tak więc, ekspresja trzech genów jest mniej więcej zgodna z obserwacją dotyczącą wpływu p53 na fosforylację STAT1 – p53 aktywowany mieszaniną AN zmniejsza fosforylację STAT1 (ryc. 41.), w konsekwencji zmniejszając ekspresję genów IFITM3, IFI44 i prawdopodobnie również IFI6. Zatem, białko p53 może wpływać negatywnie na ekspresję niektórych genów regulowanych IFN- α 1 jednak, z drugiej strony ma zdolność pozytywnej regulacji innych genów aktywowanych tą cytokiną (np. IFIT3). Nie ma, więc uniwersalnej zasady dotyczącej wpływu p53 na ekspresję genów aktywowanych IFN-α1.

9. Rola białka p53 w regulacji szlaku IFN-y

9.1. Odpowiedź linii komórkowej A549 na różne dawki IFN-γ – wybór stężenia



Rvc. 43. Ustalenie dawki IFN- γ w komórkach nowotworowych linii A549 w doświadczeniu typu dawka-odpowiedź. Komórki eksponowano na przez 24h na badane substancje. Kontrole wewnętrzną stanowiło białko HSC70. Kon - komórki kontrolne; poddane działaniu DMSO (rozpuszczalnik mieszaniny AN); poddane AN komórki ekspozycji STAT1-phospho-Y701 na mieszaninę aktynomycyny D oraz nutliny-3a.

Interferon-γ (IFN-γ) wpływa na fosforylację tyrozyny 701 białka STAT1, czego nie obserwuje się w przypadku komórek traktowanych AN. IFN-γ już w stężeniu 0,5 ng/ml indukuje fosforylację białka STAT1 (obserwowane formy STAT1 α (91 kDa) oraz STAT1 β (84 kDa); zaznaczone na ryc. 43 czerwonymi strzałkami) oraz wzrost produkcji białka IRF1. Białko IRF1 jest kodowane przez gen wykorzystywany jako marker działania IFN- γ . Do dalszych eksperymentów wybrano stężenie 1 ng/ml IFN- γ (na ryc. 43. oznaczono czerwonym kółkiem), przy którym obserwuje się wzmożoną fosforylację białka STAT1 oraz syntezy IRF1. Stężenia 5 ng/ml oraz 10 ng/ml IFN- γ w komórkach linii A549 powodują utrzymanie fosforylacji białka STAT1 oraz syntezy IRF1 na stałym poziomie. Można zauważyć, że pod wpływem mieszaniny AN dochodzi do akumulacji białka IRF1 na podobnym poziomie, jak w przypadku komórek poddanych ekspozycji na IFN- γ o stężeniu 0,1 ng/ml. Białko p53 we wszystkich komórkach występuję na porównywalnym poziomie jednak, co zrozumiałe jego najsilniejszą akumulację obserwuje się pod wpływem mieszaniny AN.

9.2. Rola białka p53 w akumulacji białek kodowanych przez geny aktywowane przez IFN-γ



Ryc. 44. Analiza za pomocą techniki Western blottingu poziomu białek zaangażowanych w sygnalizację szlaku IFN-γ. Komórki linii A549 eksponowano na różne mieszaniny substancji, a ich wpływ oznaczono w różnych punktach czasowych (6h, 12h, 24h oraz 48h). Kontrolą wewnętrzną eksperymentu stanowiło białko HSC70.

Celem kolejnego doświadczenia było sprawdzenie jak aktywacja p53 i traktowanie IFN-y zmienia czasie fosforylacje STAT1 i ekspresję genów regulowanych przez IFN-γ i/lub p53. w Komórki A549 poddano działaniu AN, IFN-γ lub mieszaniną wszystkich tych substancji przez czas od 6 do 48 godzin jak pokazano na ryc. 44. Pod wpływem działania AN w komórkach jest aktywowane białko p53, którego akumulacja i fosforylacja seryny37 jest wprost proporcjonalna do czasu traktowania. Interesującą obserwacją jest obniżenie fosforylacji tyrozyny 701 białka STAT1 pod wpływem dłuższej ekspozycji na stresory (szczególnie pod wpływem mieszaniny AN i IFN- γ , obserwowane już w 24 godzinie ekspozycji), której towarzyszy również obniżanie poziomu białka SOCS1, które jest inhibitorem fosforylacji białek STAT. Skutkiem zahamowania fosforylacji białka STAT1 jest obniżenie poziomu białka IRF1. W przypadku kaspazy-1 (CASP1) obserwuje się wzrost poziomu białka już w 12h eksperymentu pod wpływem mieszaniny AN i IFN-γ. To białko jest również kodowane przez gen aktywowany przez IFN-γ. Dopiero po upływie 48h traktowania obserwuje się wzrost poziomu CASP1 pod wpływem samej mieszaniny AN. Podobną zależność obserwuje się w przypadku białka IFIT1, które podobnie jak IRF1 i CASP1, jest kodowane przez gen aktywowany IFN- γ . Natomiast po upływie 24h obserwuje się akumulacje IFIT1 w komórkach pod wpływem IFN- γ . Białko IFIT3 osiąga najwyższy poziom w 12 godzinie eksperymentu, a następnie jego poziom obniża się. W całym cyklu eksperymentu najwyższy poziom białka CASP1 obserwuje się pod wpływem mieszaniny AN i IFN-γ po 24h i 48h traktowania. Kinaza PKR, również kodowana przez gen aktywowany IFN-y, zwiększa swój poziom bardzo nieznacznie. Białko NLRX1 uczestniczące odporności podlega akumulacji w procesach wrodzonej tylko pod wpływem AN. Natomiast w przypadku białka NLRX1 już w 12 godzinie obserwuje się silniejszy sygnał pod wpływem AN, w następnych punktach czasowych produkcji NLRX1 jest wzmacnia pod wpływem AN, natomiast w komórkach traktowanych IFN-y obserwuje się ten sam poziom co w komórkach kontrolnych. Na podstawie ryc. 44. można zauważyć podział białek szlaku sygnalizacji IFN- γ na wczesne (tj. fosforylacja STAT1, SOCS1 czy IRF1) oraz późne (tj. CASP1 czy IFIT1). Wymienione białka zostały przeanalizowane na poziomie transkryptu (informacje opisano w następnych podrozdziałach). Na podstawie powyższych doświadczeń można stwierdzić, że aktywacja p53 może hamować fosforylację STAT1, a mimo to p53 i IFN- γ współdziałają w aktywacji niektórych genów takich jak *CASP1* i *IFIT1*.



Ryc. 45. Analiza wpływu ekspresji genu *TP53* na białka zaangażowane na szlak IFN-γ. W obu eksperymentach komórki kontrolne traktowano DMSO, który jest rozpuszczalnikiem związków aktynomycyny D oraz nutliny-3a. (A) Komórki traktowano substancjami przez 24h. Celem aktywacji białka p53 zastosowano mieszaninę AN, natomiast IFN-γ służył do aktywacji genów regulowanych przez tą cytokinę. Aby sprawdzić wpływ białka p53 na szlak IFN-γ zastosowano mieszaninę AN i IFN-γ. (B) Komórki zmodyfikowanej linii A549 traktowano przez 24h DMSO lub mieszaniną AN, a następnie wymieniono pożywkę poddając 6 godzinnej inkubacji z IFN-γ celem oceny aktywacji białka na wczesnym etapie traktowania cytokiną. Komórki poddano działaniu mieszaniną AN (aby aktywować białko p53), AN i IFN-γ (aby ocenić potencjalny wpływ białka p53 na białka, których geny są regulowane interferonem) oraz IFN-γ (aby ocenić wpływ działania samej cytokiny). Kontrolą wewnętrzną w obu eksperymentach jest białko HSC70.

W kolejnym doświadczeniu wykorzystano komórki z obniżoną ekspresję TP53 w celu sprawdzenia, czy białko p53 rzeczywiście moduluje fosforylację STAT1 inicjowaną IFN-γ. Do oceny aktywacji białka p53 ponownie zastosowano przeciwciało skierowane fosforylowana na serynę 37. W przypadku fosforylacji białka STAT1 (Y701) obserwuje się osłabioną aktywacje po upływie 24h pod wpływem mieszaniny AN IFN-γ. Efekt jest słabszy w komórkach o obniżonej ekspresji genu TP53 (ryc. 45.A). W innym układzie eksperymentalnym (ryc. 45.B) również zaobserwowano, że mieszanina AN obniża fosforylację STAT1 indukowaną IFN-γ, a efekt nie jest widoczny w komórkach z obniżoną ekspresją TP53. W obu eksperymentach dochodzi do fosforylacji tyrozyny 701 białka STAT1 pod wpływem IFN-γ. Co ciekawe, stan fosforylacji innego aminokwasu STAT1 - seryny 727 (S727) indukowanej działaniem IFN- γ nie zmienia się ani pod wpływem AN, ani w zależności od statusu p53. Białko SOCS1, które jest inhibitorem fosforylacji STAT1 jest silniej aktywowane pod wpływem mieszaniny AN po upływie 24h, ale tylko w komórkach z prawidłowym p53. Akumulacja SOCS1 po traktowaniu IFN-γ zachodzi niezależnie od p53. Natomiast w kolejnym doświadczeniu zaobserwowano, że akumulacja SOCS1 po 6 h traktowaniu IFN-γ jest wyższa niż po 30 h traktowania AN (ryc. 45.B). W komórkach eksponowanych na AN i IFN-γ mimo podobnej aktywacji SOCS1 występują różnice w fosforylacji STAT1 między komórkami o różnym statusie p53. Ta obserwacja sugeruje, że związek pomiędzy aktywnością p53, a ilością SOCS1 i stanem fosforylacji STAT1 może być bardziej złożony, niż początkowo zakładano. Jednak niewątpliwie oba eksperymenty łączy obserwacja, że AN oraz IFN-γ działają synergistycznie powodując silną akumulację białka CASP1 (niezależnie od fosforylacji STAT1) co jest zależne od p53, którego mutacja sprawia, że AN nie jest w stanie wpłynąć na aktywację CASP1.



Ryc. 46. Analiza wpływu statusu genu *TP53* w nowotworowych liniach niedrobnokomórkowego raka płuca na białka zaangażowane w szlak IFN-γ. Komórki linii NCI-H1299 posiadają delecję genu *TP53*, natomiast komórki A549 posiadają dziki gen *TP53*. Komórki traktowano przez 24h, a kontrolą wewnętrzną eksperymentu stanowiło białko HSC70.

Celem kolejnego doświadczenia było sprawdzenie, czy działanie aktynomycyny D, nutliny-3a lub ich kombinacji wpłynie na fosforylację STAT1 w innej linii komórkowej, pozbawionej p53 - NCI-H1299 (ryc. 46A). Dla porównania podobny eksperyment przeprowadzono na linii A549. Fosforylacja tyrozyny 701 białka STAT1 jest silnie aktywowana w komórkach eksponowanych na IFN-γ. Zaobserwowano, że każde z traktowań wyraźnie osłabia fosforylację STAT1 w komórkach NCI-H1299 eksponowanych na IFN- γ (ryc. 46.A). Natomiast w przypadku linii A549 obserwuje się wcześniej odnotowane całkowite zahamowanie fosforylacji STAT1 tylko w wyniku działania kombinacji AN (ryc. 46.B). W linii A549 zauważa się obniżony poziom białka IRF1, czego nie obserwuje się w linii NCI-H1299. Białko IFIH1 w obu liniach komórkowych występuje na porównywalnym poziomie w komórkach eksponowanych na cytokinę niezależnie od działania innych stresorów. Białko IFIT1 w linii NCI-H1299 jest produkowane przez komórki niezależnie od ekspozycji na stresor, jednak poziom tego białka jest wyższy w komórkach eksponowanych dodatkowo na IFN-γ. Natomiast w linii A549 wykrywa się białko IFIT1 jedynie w komórkach eksponowanych na ActD i IFN-y, AN i IFN-y oraz Nut3a i IFN-y. Poziom białka IFIT3 w komórkach linii NCI-H1299 jest wykrywany, jedynie w komórkach eksponowanych na IFN-y i utrzymuje się na podobnym poziomie. Natomiast w linii A549 białko IFIT3 uległa słabej aktywacji pod wpływem mieszanin: ActD i IFN-y oraz AN i IFN-γ.

Wynik tego doświadczenia wskazuje, że różne stresory mogą hamować fosforylację STAT1 indukowaną IFN-γ w sposób niezależny od p53. Jednak jak pokazuje przykład linii NCI-H1299
nawet obniżenie fosforylacji STAT1 nie wpływa na poziom białek aktywowanych IFN-γ (IRF1, IFIH1, IFIT1, IFIT3).



Ryc. 47. Ocena akumulacji wybranych białek szlaku IFN-γ pod wpływem aktywacji białka p53 i ekspozycji na cytokinę. Komórki poddano działaniu badanych stresorów przez 24h. Linia GM07492 ma dziki gen *TP53*. Kontrolą wewnętrzną eksperymentu jest białko HSC70.

Kolejne doświadczenie wykonano, aby przekonać się, czy p53 i IFN-γ współdziałają w aktywacji CASP1 w komórkach prawidłowych (nienowotworowych) (ryc.47.). W tych komórkach obserwuje się silną akumulację CASP1 pod wpływem AN i IFN-γ, natomiast w pozostałych komórkach CASP1 utrzymuje się na podobnym poziomie. Fosforylacja tyrozyny 701 białka STAT1 obserwowana jest na tym samym poziomie w komórkach eksponowanych AN i IFN-γ oraz IFN-γ. Zatem, obserwowana aktywacja fosforylacji STAT1 pod wpływem cytokiny nie jest modulowana przez p53. Poziom IRF1 jest niższy w komórkach eksponowanych na AN i IFN-γ, niż pod wpływem traktowania samym IFN-γ.

9.3. Analiza ekspresji wybranych genów uczestniczących w szlaku IFN-y

Aby lepiej zrozumieć molekularne podstawy efektu działania AN oraz IFN-γ w zależności od statusu p53 przeprowadzono analizę ekspresji genów w komórkach linii A549 z obniżoną ekspresją genu *TP53* (CRISPR-p53) oraz kontrolnych (CRISPR-Con). Podobnie jak w przypadku genów szlaku IFN-α1, analizę wykonano z wykorzystaniem metody RT-qPCR.

Prezentowane wyniki zostały przedstawione jako krotność ekspresji względem komórek kontrolnych dla każdego eksperymentu – na wykresach opisano jako krotność. Do analizy statystycznej danych użyto t-testu z niesparowanego z korektą Welcha. Dodatkowo, zweryfikowano istotność statystyczną komórek linii CRISPR-Con traktowanych AN vs. AN IFN-γ oraz AN IFN-γ vs. IFN-γ. Wszystkie analizy zostały przeprowadzone w programie GraphPad Prism wersji 10.2.2. dla Windows.

Pierwszych etapem badań była analiza ekspresji wybranych genów w komórkach eksponowanych jedynie na IFN-γ. Ponieważ we wcześniejszym doświadczeniu największe różnice akumulacji białek obserwowano pomiędzy traktowaniami 6h oraz 48h (ryc. 44.) właśnie te dwa punkty czasowe wybrano do analiz RT-qPCR.



Ryc. 48. Analiza aktywacji wybranych genów uczestniczących szlaku IFN-γ w dwóch punktach czasowych 6h i 48h. Ekspresję badanych genów normalizowano względem ekspresji genu referencyjnego *GAPDH*.

Ekspresja wszystkich badanych genów jest wyższa po 6h niż po 48h ekspozycji na IFN-γ (ryc.48). W komórkach eksponowanych na IFN-γ wzrost ekspresji genów następuje stosunkowo szybko, co obserwowano w 6 godzinie traktowania, natomiast po 48 godzinach ekspresja osiąga wartość zbliżoną do kontrolnej.

Poziom ekspresji badanych genów jest najwyższy po upływie 6h. W tym punkcie czasowym najwyższą ekspresję wykazują geny *CASP1* (wzrost 20-krotny), *ICAM1* (50-krotny), *IFIT3* (25-krotny), *IRF1* (25-krotny) względem kontroli. Natomiast pozostałe geny wykazują niższą ekspresję względem kontroli tj. *IFI16* (4-krotną), *IFIT1* (5- krotną), *IRF9* (9-krotną), *PML* (3-krotną), *SOCS1* (5-krotną), *TAP2* (7-krotną), *WARS1* (6-krotną).

Ze względu na niski poziom aktywacji pod wpływem IFN- γ , gen *PML* nie został uwzględniony w dalszych analizach. Natomiast pozostałe geny analizowano pod wpływem działania mieszaniny AN, AN i IFN- γ oraz IFN- γ , w komórkach linii A549 które eksponowano przez 24h (ryc.49.). Na tym etapie pominięto gen *IFIT3* ze względu na wysoką ekspresję po upływie 6h oraz wysoki poziom białka w początkowych punktach czasowych (ryc. 44).



Ryc. 49. Analiza za pomocą metody RT-qPCR poziomu ekspresji wybranych genów uczestniczących w szlaku IFN-γ w linii A549 CRISPR-Control oraz CRISPR-p53, które eksponowano przez 24h na stresory zgodnie z osią OX. Istotność statystyczna oznaczona czerwoną ramką oznacza porównanie traktowań w obrębie danej linii komórkowej (tj. AN vs AN i IFN-γ lub AN i IFN-γ vs IFN-γ). Natomiast niebieską ramką oznaczono porównanie względem traktowania w różnych liniach komórkowych (tj. CRISRP-Con AN vs CRISPR-p53 AN lub CRISRP-Con AN+ IFN-γ vs CRISPR-p53 AN+ IFN-γ). Wyniki normalizowano względem ekspresji genu referencyjnego *ACTB*.

Założono, że poziom ekspresji genów będzie niższy, jeśli komórki będą traktowane zarówno cytokiną, jak i AN (ryc.49.). Efekt ten zniknie w komórkach pozbawionych prawidłowej funkcji p53. Założenia te przyjęto, w oparciu o poziom fosforylacji STAT1 w różnych warunkach (IFN- γ vs AN IFN- γ) oraz status p53 (ryc. 45). Taki wzór ekspresji zaobserwowano wyłącznie w przypadku genu *TAP2*. W przypadku innych genów ekspresja odbiegała od tego założenia. Ekspresja genów *IFI16* oraz *SOCS1* jest aktywowana wraz z białkiem p53. Jednak komórki eksponowane na samą cytokinę wykazują stały poziom ekspresji ww. genów niezależnie od statusu p53. We wcześniejszych eksperymentach obserwowano zależność białka SOCS1 od białka p53. Biorąc pod uwagę poziom białka (ryc. 44.) obserwowano także zależną od białka p53 akumulację kaspazy-1 (CASP1). W przypadku analizy ekspresji genów na poziomie mRNA w przypadku *CASP1* obserwuje się 100-krotną różnicę w komórkach eksponowanych na mieszaninę AN w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Bardzo silną ekspresję genu *CASP1* obserwuje się także pod wpływem mieszaniny AN i IFN- γ (około 150-krotną w komórkach linii CRISPR-p53, do prawie 400-krotnej w komórkach eksponowanych na AN. Pod wpływem cytokiny wzrost jego ekspresji jest wyraźnie wyższy i ulega osłabieniu pod

wpływem AN, jednak p53 nie moduluje tego obniżenia. Ekspresja genu *IRF9* jest głównie zależna od IFN-γ i nie ulega osłabienie pod wpływem AN. Gen *ICAM1* jest silnie aktywowany pod wpływem mieszaniny AN (7-krotnie) oraz AN IFN-γ (10-krotnie) względem kontroli w komórkach linii CRISPR-Con. Ulega silnej ekspresji pod wpływem samej cytokiny niezależnie od białka p53. Podobną obserwację można dostrzec w przypadku aktywacji genu *IFIT1*, pod wpływem mieszaniny AN dochodzi do aktywacji uwarunkowanej prawidłową formą białka p53. Ten cykl analiz wykazał, że niezależnie od statusu fosforylacji STAT1, IFN-γ i AN współdziałają w sposób zależny od p53 w aktywacji ekspresji kaspazy-1, co potwierdza obserwacje przeprowadzone w oparciu o analizę ekspresji białek (ryc. 44).

Na podstawie wcześniejszych eksperymentów zaobserwowano, że wszystkie testowane geny ulegają silnej ekspresji już po 6h traktowania IFN- γ (ryc. 48). Dlatego w kolejnym doświadczeniu zastosowano inny sposób ekspozycji. Najpierw potraktowano komórki AN przez 24 godziny w celu indukcji ekspresji genów zależnych od p53, a następnie dodatkowo przez 6 godzin eksponowano komórki na IFN- γ (ryc. 50.). Zastosowano również odpowiednie kontrole. Do analiz wybrano geny: *CASP1, ICAM1, IFI16, IFIT1, IFIT3* oraz *IRF1* a ich ekspresję sprawdzono również za pomocą metody RT-qPCR. Do tego doświadczenia podobnie jak poprzednio wybrano komórki linii A549 CRISPR-Control oraz CRISPR-p53.



Ryc. 50. Analiza ekspresji za pomocą metody RT-qPCR wybrano geny uczestniczące w szlaku IFN- γ . Komórki zmodyfikowanej linii A549 CRISPR-p53 oraz kontrolne CRISRP-Con eksponowano przez 24h na DMSO (stanowiące kontrolę) lub mieszaninę AN. Następnie do odpowiednich komórek dodano IFN- γ (zgodnie z opisem osi OX na wykresach), wszystkie komórki inkubowano przez dodatkowe 6h. Ekspresję normalizowano względem genu referencyjnego *GAPDH*.

W powyższym eksperymencie (ryc.50.) obserwuje się 500-krotny wzrost ekspresji genu CASP1 w komórkach eksponowanych na mieszaninę AN oraz 2000-krotny wzrost ekspresji pod wpływem mieszaniny AN i IFN-γ w porównaniu z kontrola. Obserwuje się niewielka aktywację tego genu pod wpływem samej cytokiny. Nie obserwuje się podobnego mechanizmu aktywacji CASP1 w komórkach pozbawionych prawidłowej funkcji p53. IFN-γ i mieszanina AN synergistycznie współdziałają w aktywacji genu CASP1. Efekt ten jest o wiele wyraźniejszy, niż w przypadku poprzednio opisanego sposobu traktowania komórek. Wzrost ekspresji genu ICAMI jest 150-krotnie wyższy w komórkach CRISPR-Con pod wpływem mieszanin AN IFN-y względem kontroli. Natomiast w komórkach CRISPR-p53 aktywacja tego genu jest 200-krotna względem analogicznej kontroli. W komórkach CRISRP-Con eksponowanych na cytokinę IFN-y obserwuje się 50-krotny wzrost ekspresji względem kontroli. W komórkach CRISPR-p53 traktowanych cytokiną ekspresję ICAMI odnotowano 30-krotną wyższą względem analogicznych komórek kontrolnych. Jednak obserwowane różnice pomiędzy komórkami z prawidłowym i zmutowanym p53 nie były znamienne statystycznie. Traktowanie mieszaniną AN oraz ekspozycja na IFN-γ współdziałają w aktywacji genu ICAM1, jednak to współdziałanie nie jest zależne od p53.

Gen *IF116* ulega aktywacji pod wpływem AN zarówno w obecności jak i przy braku cytokiny. Ekspresja genu IF116 wydaje się być związana z aktywacją p53. Jednak w przypadku tego genu nie obserwuje się silnego współdziałania pomiędzy AN a cytokiną – efekt addytywny. Podobnie słabe współdziałanie między AN, a IFN- γ obserwuje się w przypadku ekspresji *IRF1*. Natomiast efekt współdziałania obserwuje się w przypadku ekspresji genów *IF1T1* i *IF1T3*. Ekspresja tych genów przypomina ekspresję genu *CASP1* – aktywacja interferonem nie jest modulowana przez p53, ale p53 uczestniczy w aktywacji tych genów z IFN- γ w warunkach traktowania AN. Potwierdza to, że p53 i IFN- γ silnie współdziałają w aktywacji ekspresji niektórych genów, takich jak *CASP1, IF1T1, IF1T3*. Nie ma jednak jednego wspólnego wzoru ekspresji genów kontrolowanych przez p53 i IFN- γ .

10. Porównanie roli białka p53 w szlakach interferonów

W powyższych rozdziałach przedstawiono, w jaki sposób regulowana jest aktywacja wybranych białek i genów uczestniczących w szlakach interferonów. W trakcie prowadzonych eksperymentów powstała koncepcja porównania poziomu wybranych białek związanych z odpornością wrodzoną w różnych liniach komórkowych o dzikim statusie genu *TP53* pod wpływem mieszanin: AN, AN IFN-γ oraz AN IFN-α1. Komórki kontrolne eksponowano na DMSO, które jest rozpuszczalnikiem substancji AN, a kontrole pozytywne stanowiły same cytokiny: IFN-γ oraz IFN-α1 (ryc.51.).



Ryc. 51. Podsumowanie analizy poziomu i wybranych białek związanych ze szlakami interferonów. Wszystkie linie komórkowe posiadają dziki status genu *TP53*. Oznaczenia linii: niedrobnokomórkowy rak płuca –NCI-H460 oraz NCI-H292; kostniakomięsak – U-2 OS; rak gruczołowy żołądka – AGS; czerniak złośliwy – A375;. Wszystkie linie poddano ekspozycji na mieszaninę AN (stężenia: 5 nM aktynomycyny oraz 5 μM nutliny-3a), w przypadku stężenia interferonów wynosiło ono: 1 ng/ml (jednak linie AGS oraz A375 traktowano stężeniem 2 ng/ml). Komórki kontrolne (Kon) poddano działaniu DMSO. Czas ekspozycji substancji wynosił 24h, a kontrolą wewnętrzną w prezentowanych eksperymentach stanowiło białko HSC70.

We wszystkich komórkach obserwuje się wzrost aktywacji białka p53 pod wpływem mieszaniny AN. W komórkach NCI-H460, A375 oraz U-2 OS obserwuje się silną fosforylację Tyr701 białka STAT1 pod wpływem AN i IFN- α oraz IFN- α , w przypadku komórek eksponowanych na pozostałe substancje nie obserwuje się znaczących różnic. Interesujące zjawisko można zauważyć w przypadku linii AGS, ponieważ jest to jedyna linia z prezentowanych na ryc.51., w przypadku której fosforylacja tyrozyny 701 białka STAT1 jest aktywowana pod wpływem mieszaniny AN (obserwuje się najwyższy poziom w komórkach eksponowanych na mieszaniny AN i/lub cytokinami). W przypadku linii NCI-H292 obserwuje się wyższy poziom fosforylacji pod wpływem cytokin (szczególnie pod wpływem IFN- α), a w przypadku traktowania mieszaninami cytokin wraz z AN obserwuje się niższą fosforylacji.

Silną akumulację kaspazy-1 (CASP1) obserwuje się pod wpływem mieszaniny AN z cytokinami w linii A375. Aktywacje zależną od cytokin, także tych obecnych w mieszaninach AN, obserwuje się

w liniach NCI-H460, AGS oraz A375. W przypadku linii U-2 OS obserwuje się najwyższy poziom CASP1 pod wpływem traktowania AN i IFN-γ.

Akumulację białka IRF1 kodowanego przez gen aktywowany IFN-γ, obserwuje się w linii NCI-H460 eksponowanej na tą cytokinę. W przypadku innej linii niedrobnokomórkowego raka płuca NCI-H292 aktywacja IRF1 jest uwarunkowany obecnością interferonu (zarówno IFN-α jak i IFN-γ). Akumulację zależną od AN i IFN-γ oraz IFN-γ obserwuje się w linii A375. W przypadku linii U-2 OS obserwuje się stały poziom białka IRF1.

Białko IFIT1 ulega akumulacji pod wpływem cytokiny IFN-α we wszystkich badanych liniach, oprócz linii AGS. Ponieważ w linii gruczołowego raka żołądka obserwuje się spadek produkcji białka IFIT1 pod wpływem cytokiny.

Akumulację białka IFIH1 zależną od IFN-α oraz AN i IFN-α obserwuje się w liniach: NCI-H460, A375 oraz U-2 OS. W linii NCI-H292 również obserwuje się akumulację zależną od cytokiny IFN-α, jednak w przypadku komórek tej linii obserwuje się także niższą aktywację białka IFIH1. W przypadku linii AGS obserwuje się wysoki poziom białka IFIH1 w komórkach eksponowanych na AN i IFN-α oraz pod wpływem samych cytokin.

Przeprowadzone analizy wskazują, że reakcja komórek na aktywację białka p53 i ekspozycję na interferony jest komórkowo swoista. Nie we wszystkich komórkach IFN-γ i p53 współdziałają w aktywacji ekspresji genu *CASP1*. W panelu przedstawionym na ryc. 51 wspomniane dwa czynniki współdziałają w aktywacji tego genu jedynie w komórkach U-2 OS.

11. Wstępna charakterystyka współdziałania IFN-γ i aktywacji p53 w regulacji apoptozy indukowanej ligandem FAS.

Interferon- γ oraz ligand FAS (FASLG) są kluczowymi elementami w eliminacji komórek zainfekowanych wirusem lub komórek nowotworowych. IFN- γ jest produkowany przez limfocyty T i komórki NK w odpowiedzi na zakażenia patogenami. Z kolei FASLG jest białkiem błonowym obecnym na limfocytach, pobudzającym receptor śmierci zwany FAS, co prowadzi do aktywacji szlaku apoptozy komórek zainfekowanych, nowotworowych lub poddanych działaniu innych czynników stresu. Ocena współdziałania IFN- γ , p53 i FASLG może mieć istotne konsekwencje dla regulacji odpowiedzi immunologicznej oraz kontroli proliferacji komórkowej (ryc.52.). W tym podrozdziale skupiono się na analizie wpływu IFN- γ oraz mieszaniny AN na szlak apoptozy indukowany przez FASLG, aby sprawdzić konsekwencję współdziałania p53 i IFN- γ .



Ryc. 52. Analiza aktywacji szlaku apoptozy w komórkach linii A549. Komórki eksponowano przez 24h na działanie DMSO (kontrola), bądź mieszaniny AN oraz obecności lub nieobecności IFN- γ (2 ng/ml). Następnie do części komórek dodano ligand FAS (FASLG; 20 ng). Komórki eksponowano przez dodatkowe 4h. Kontrolą wewnętrzną eksperymentu stanowiło białko GAPDH.

Warunki doświadczenia szczegółowo przedstawiono w opisie ryc. 52. W skrócie – komórki wstępnie eksponowano przez 24h na mieszaninę AN lub samą pożywkę w obecności lub braku IFN-γ. Następnie wymieniono pożywkę i przez 4 godziny część komórek traktowano ligandem FAS zgodnie ze schematem traktowania, przedstawionym na ryc. 52. Następnie w lizatach komórkowych zbadano poziom kaspazy-8 (CASP8; aby sprawdzić aktywację receptora FAS), kaspazy-9 (CASP9; aby sprawdzić aktywację mitochondrialnego szlaku apoptotycznego) i aktywację kaspazy-3 (CASP3), w celu sprawdzenia działania kaspazy efektorowej. Zbadano również fosforylację STAT1 w celu monitorowania działania interferonu. Ekspozycja na ligand FAS bez uprzedniego traktowania mieszaniną AN nie spowodowała pojawienia się ciętej formy CASP8, CASP9 czy CASP3 (2 ścieżka żelu). Wstępna ekspozycja na IFN-γ, a następnie traktowanie FASLG doprowadziło do pojawienia się ciętej formy CASP8 (4 ścieżka). Tak więc, wstępna ekspozycja na cytokinę uwrażliwia komórki na proapoptotyczne działanie liganda FAS. Jeszcze silniejszy efekt wywiera wstępna ekspozycja

na AN – dochodzi do aktywacji CASP8 czemu towarzyszy również aktywacja CASP9 i CASP3. Jeśli komórki są wstępnie eksponowane na AN oraz IFN-γ, FASLG powoduje jeszcze wyraźniejszą aktywację CASP8 (pojawia się dodatkowy prążek na wysokości ok. 18 kDa) oraz wzrost poziomu aktywnej CASP3. IFN-γ uwrażliwia komórki na proapoptotyczne działanie FASLG, AN wywiera jeszcze wyraźniejszy wpływ, a oba te czynniki dodatkowo wzmacniają efekt, chodź nie widać synergii. Prezentowane wyniki sugerują, że IFN-γ i p53 współdziałają w zwiększaniu wrażliwości komórek na proapoptotyczne działanie liganda receptora FAS.

V. Dyskusja

Gen *TP53* jest jednym z najczęściej zmutowanych genów w komórkach nowotworowych wywodzących się z różnych tkanek. W ciągu 40 lat od odkrycia białka p53 przeanalizowano i poznano wiele mechanizmów regulacji genów i szlaków supresji nowotworu regulowanych przez to białko. Poznaliśmy skomplikowaną sieć szlaku białka p53, ale wciąż nie znamy pełnego obrazu. Wiemy, że p53 jest "strażnikiem genomu" i znamy jego główne funkcje. Mimo to, nadal odkrywamy nowe role, takie jak regulacja odpowiedzi immunologicznej [57], [71]. Liczne doniesienia wskazują, że białko p53 ma wpływ na procesy związane z odpowiedzią immunologiczną. Szczególnie interesująca jest rola białka p53 związana z odpornością przeciwnowotworową. W piśmiennictwie naukowym dostępnych jest stosunkowo niewiele prac dotyczących wpływu białka p53 na inicjację procesów związanych z odpornością. Badania w tym kierunku są konieczne i dlatego powstała koncepcja projektu doktorskiego, która rzuca nowe światło na rolę białka p53 w regulacji odpowiedzi immunologicznej.

W trakcie realizacji niniejszego projektu doktorskiego wykorzystano mieszaninę aktynomycyny D i nutliny-3a (AN) do aktywacji białka p53 w liniach komórkowych o dzikim statusie genu *TP53*. We wcześniejszych badaniach dowiedziono, że mieszanina AN poprzez aktywację białka p53 może stymulować geny i białka związane z odpornością wrodzoną [10], [155].

1. Identyfikacja nowych genów zależnych od białka p53 w komórkach eksponowanych na aktynomycynę D oraz nutlinę-3a

W pierwszym etapie badań przedstawiono główny model badawczy wykorzystany w niniejszym projekcie doktorskim. Potwierdzono uzyskanie redukcji ekspresji genu *TP53* w wybranych liniach (ryc. 14.). Pomimo obserwacji akumulacji całkowitej formy białka p53 o nieco mniejszej masie cząsteczkowej, co wskazuje na delecję aminokwasów wywołaną działaniem systemu CRISPR/Cas9, nie dostrzega się akumulacji białka p53 z fosforylowaną seryną 37, co wskazuje, że w większości komórek brak prawidłowego białka p53. Jak wskazują badania uzyskane przez zespół Liu i in. redukcja fosforylacji seryny 37 lub seryny 15 p53 ogranicza ekspresję genów związanych ze szlakiem białka p53 [199].

W kolejnym etapie badań, na podstawie analiz RNA-Seq, wybrano geny aktywowane przez mieszaninę AN do dalszych analiz [149]. Oceniono ekspresję wybranych genów aktywowanych mieszaniną AN w zmodyfikowanych liniach A549 oraz U-2 OS uzyskanych metodą CRISPR/Cas9. Część badanych genów wybrano także do analizy ekspresji w linii NCI-H460. Jako kontrolę pozytywną (znany, silny aktywator p53) zastosowano ekspozycję komórek na kamptotecynę (CPT).

		ACP5	APOL3	BEX2	CIBAR2	CRABP2	CTHRCI	EOMES	GAST	ICOSLG	INKAI	KCNK6	KLRG2	LACCI	MAFB	NCR3LG1	NDRG4	OTUDI	PTAFR	SLAMF7	TNFRSF14	TRANKI	WFDC2	WFDC5	WNT4
A549	CRISPR-Con																								
	CRISPR-p53																								
U-2 OS	CRISPR-Con					\boxtimes		\boxtimes			\boxtimes	\boxtimes		Х	\boxtimes						imes			\boxtimes	
	CRISPR-p53					\boxtimes		\boxtimes			\boxtimes	\boxtimes		\boxtimes	\boxtimes						\boxtimes			\boxtimes	
	NCI-H460					\times	\boxtimes	\mathbf{X}		\times	\boxtimes	\boxtimes		\times	\boxtimes						\times		\boxtimes	\boxtimes	\times

Ekspresja genu powyżej 1000-krotność Ekspresja genu większa bądź równa 100-krotności i mniejsza bądź równa 1000-krotności. Ekspresja genu większa bądź równa 10-krotności i mniejsza bądź równa 100-krotności. Ekspresja genu większa bądź równa 5-krotności i mniejsza bądź równa 10-krotności.

Nie badano aktywacji

Ryc. 53. Podsumowanie aktywacji wybranych genów pod wpływem mieszaniny AN w liniach niedrobnokomórkowego raka płuca NCI-H460 oraz liniach A549 CRISPR-Con i zmodyfikowanym wariancie z obniżoną ekspresją genu *TP53* CRISPR-p53; a także w liniach kostanikomięsaka U-2 OS CRISPR-Con oraz z redukcją genu *TP53* (CRISPR-p53). Krotność ekspresji badanych genów przedstawiono względem krotności kontroli

Na podstawie przeprowadzonych analiz można zauważyć, że większość wybranych genów ulega aktywacji pod wpływem działania mieszaniny AN, zarówno w linii A549 jak i U-2 OS oraz NCI-H460, jednak poziom aktywacji jest różny (ryc. 15-17.; ryc. 53.). Na podstawie przeprowadzonych analiz odkryto nowe geny związane z układem odpornościowym, które wykazują aktywację zależną od prawidłowej formy białka p53. Podkreśla to znaczenie regulatorowe białka p53 w odpowiedzi układu immunologicznego. Przebadano 24 geny, z czego aż 17 koduje białka związane z odpowiedzią układu immunologicznego (ryc. 54.). Szczegółowe funkcje białek kodowanych przez badane geny przedstawiono w tab. 15.

ACP5 jest wielofunkcyjnym białkiem, które bierze udział w regulacji poziom reaktywnych form tlenu poprzez aktywacje enzymów regulujących homeostazę komórkową, prawidłowym rozwoju kości, ale także w funkcjonowaniu makrofagów [156]. Na poziomie genu, ulega on aktywacji pod wpływem mieszaniny AN w badanych liniach komórkowych. Różnica ekspresji między komórkami prawidłowymi, a komórkami z dysfunkcją p53 jest bardzo wyraźna w warunkach ekspozycji na mieszaninę AN.

APOL3 pełni rolę w ścieżkach sygnałowych transportu lipidów, uczestniczy także w uwrażliwianiu komórek raka jelita na ferroptozę immunologiczną. W mikrośrodowisku guza nadekspresja APOL3 zmniejsza liczbę makrofagów M2, zwiększając liczbę limfocytów T CD8+ [157]. Białko APOL3 jest również indukowane przez cytokinę IFN-γ [158]. W liniach A549 oraz NCI-H460 pod wpływem mieszaniny AN gen *APOL3* jest silnie aktywowany.

Białko BEX2 jest regulatorem apoptozy mitochondrialnej, cyklu komórkowego w fazie G1 oraz przyczynia się do zwiększonej proliferacji ludzkich komórek glejaka wielopostaciowego poprzez szlak

NF-κB, szczególnie w linii U251 [159], [160]. Najnowsze doniesienia wskazują jego potencjał immunologiczny, jednak dokładna rola w odpowiedzi immunologicznej nie jest poznana [161]. Gen *BEX2* ulega silnej aktywacji pod wpływem mieszaniny AN we wszystkich badanych liniach komórkowych wykazujących prawidłową formę białka p53.

Białko CIBAR2, znane także jako FAM92B jest słabo poznane, może jednak ułatwić ciliogenezę [162]. Ostatnie doniesienia wskazują, że nadekspresja genu kodującego to białko może być markerem ryzyka w chorobie Alzheimara, jednak obecnie posiada status *"dark gene"*, ponieważ jego funkcje nie są w pełnie poznane [163]. Obserwuje się wzrost ekspresji genu *CIBAR2* w liniach A549 CRISPR-Con oraz NCI-H460 pod wpływem mieszaniny AN.

CRABP2 transportuje kwas reinodiowy do jądra komórkowego, odgrywa także ważną rolę biologiczną w nowotworach u ludzi [164]. Gen *CRABP2* wykazuje ok. 30-krotnie większą aktywność w komórkach linii A549 CRISPR-Con eksponowanych na mieszaninę AN względem kontroli; różnica jego aktywacji między komórkami CRISPR-Con i CRISPR-p53 w warunkach traktowania mieszaniną AN jest bardzo wyraźna.

CTHRC1 występuje w prawidłowych tkankach regulując metabolizm, uczestniczy także w angiogenezie. Doniesiono także, że nieprawidłowa forma białka CTHRC1 przyczynia się do procesu nowotworzenia w różnych lokalizacjach [165]. Gen *CTHRC1* wykazuje aktywację uwarunkowaną p53 tylko w komórkach A549. Jego aktywacja w komórkach U-2 OS jest stosunkowo słaba i nie wymaga aktywacji p53.

Eomesodermina (EOMES) jest czynnikiem transkrypcyjnym indukującym IFN-γ i cytotoksyczność oraz regulującym limfocyty T [166]. Obserwuje się ok.8-krotny wzrost ekspresji genu *EOMES* w komórkach A549 CRISPR-Con traktowanych mieszaniną AN względem kontroli; w porównaniu do analogicznych komórek CRISPR-p53 obserwuje się dwukrotnie niższą ekspresję badanego genu.

Gastryna kodowana przez gen *GAST* jest hormonem pobudzającym komórki nabłonka żołądkowego do produkcji kwasu solnego. Oprócz tego białko to może działać jako mitogen na komórki nabłonka żołądka oraz uczestniczy w szlaku NF-κB, biorąc udział w odpowiedzi prozapalnej [167]. Aktywacja tego genu uwarunkowana obecnością prawidłowej formy białka p53 jest niespodziewaną obserwacją i rzuca nowe światło na funkcjonowanie p53. Gen *GAST* ulega silnej aktywacji w komórkach wykazujących prawidłową formę białka p53 pod wpływem mieszaniny AN; jest to ok. 40-krotny wzrost ekspresji względem kontroli we wszystkich badanych liniach.

ICOSLG stymuluje proliferację limfocytów T oraz sekrecję cytokin, np. IFN- γ. Indukuje także proliferację limfocytów B i ich różnicowanie w komórki plazmatyczne [168]. Gen *ICOSLG* ulega ok. 10-krotnej aktywacji w komórkach CRISPR-Con linii A549 oraz U-2 OS pod wpływem mieszaniny AN. Jego ekspresja jest obniżona w komórkach pozbawionych prawidłowego p53.

Białko INKA1 jest białkiem regulatorowym, które wpływa na lokalizację jądrową białka PAK4 i poziomy histonu H4K16ac [169]. Kinaza PAK4 może być inhibitorem kaspazy-8 (CASP8), natomiast ostatnie doniesienia wskazują na rolę CASP8 w regulacji odpowiedzi immunologicznej [170], [171].

Gen *INKA1* ulega ok. 50-krotnej aktywacji w komórkach A549 CRISPR-Con pod wpływem mieszaniny AN względem kontroli; poziom ekspresji jest znacznie niższy w komórkach pozbawionych prawidłowego p53.

KCNK6 reguluje kanał potasowy, który między innymi sprzyja aktywacji inflamasomu – struktury biorącej udział w produkcji cytokin prozapalnych [172]. Wzrost poziomu ekspresji genu *KCNK6* w komórkach A549 CRISPR-Con pod wpływem AN jest bardzo duży.

Ostatnie badania pokazały, że białko KLRG2 jest powiązane z metylacją DNA w komórkach pacjentów ze schizofrenią, natomiast inne badanie wykazało, że może regulować aktywność szlaków JAK/STAT i MAPK-ERK1/2, a ponadto reguluje poziom białek p53 i p38 MAPK [173], [174]. Te doniesienia sugerują, że białko KLRG2 może być zaangażowane w szlaki interferonowe czy uczestniczyć stanach zapalnych, jednak aby potwierdzić tę hipotezę należy wykonać poszerzone analizy. Aktywacja genu *KLRG2* jest zależna od prawidłowej formy białka p53, ponieważ nieprawidłowy status *TP53* jest związany z obniżeniem ekspresji tego genu.

LACC1 ulega silnej ekspresji w makrofagach zapalnych, co więcej uczestniczy w eliminacji komórek bakteryjnych przez regulację poziomu reaktywnych form tlenu wytwarzanych przez mitochondria [175]. Białko LACC1 uczestniczy także w procesach przeciwbakteryjnych. Gen *LACC1* jest aktywowany w komórkach A549 CRISPR-Con pod wpływem mieszaniny AN dwukrotnie silniej, niż w komórkach A549 CRISPR-p53 eksponowanych na te same substancje.

Białko MAFB reguluje różnicowanie makrofagów i jest uznawane za potencjalny cel terapeutyczny w chorobach związanych z makrofagami [176]. Ekspresja genu *MAFB* jest 100-krotnie wyższa w komórkach CRISPR-Con pod wpływem mieszaniny AN względem kontroli, czego nie obserwuje się w komórkach pozbawionych prawidłowego p53.

Białko NCR3LG1 (B7-H6) jest ligandem dla receptora NKp30, którego obecność jest kluczowa do rozpoznania komórek linii białaczki K562 przez komórki NK [177], [178]. Gen *NCR3LG1* ulega aktywacji pod wpływem mieszaniny AN w sposób zależny od p53 w komórkach A549.

NDRG4 jest potencjalnym supresorem nowotworu i potencjalnym biomarkerem raka jelita grubego [179]. Gen *NDRG4* ulega silnej aktywacji w badanych liniach pod wpływem AN.

Białko OTUD1 uczestniczy w odporności przeciwgrzybiczej, a także hamuje kanoniczną aktywację NF-κB, apoptozę i nekroptozę, biorąc udział w szlaku IFN-α i w odpowiedzi przeciwwirusowej [180], [181]. Gen *OTUD1* ulega aktywacji w komórkach z prawidłową formą p53 pod wpływem mieszaniny AN.

PTAFR, znany także jako PAFR zaangażowany jest w reakcji prozapalne [182]. Gen *PTAFR* jest aktywowany pod wpływem mieszaniny AN w badanych liniach komórkowych, które wykazują prawidłową formę p53.

Białko SLAMF7 ulega silnej ekspresji na powierzchni komórek immunologicznych, reguluje cytotoksyczne funkcje oraz aktywację komórek NK [183]. Wykazuje także funkcje hamujące

makrofagów w stanie zapalnym [184]. *SLAMF7* na poziomie mRNA w komórkach eksponowanych na AN wykazuję silną aktywację.

TNFRSF14 reguluje odpowiedź immunologiczną limfocytów T poprzez aktywację zarówno limfocytów zapalnych, jak i reguluje odporność nabłonka [185], [186]. Gen *TNFRSF14* ulega aktywacji w komórkach linii A549 CRISPR-Con pod wpływem mieszaniny AN.

Białko TRANK1 jest wytwarzane przez komórki immunologiczne tj. neutrofile i komórki NK, gen *TRANK1* jest związany z sygnalizacją układu odpornościowego [187], [188]. Gen *TRANK1* jest aktywowany w komórkach eksponowanych na mieszaninę AN w komórkach o prawidłowej formie białka p53.

WFDC2 może odgrywać rolę we wrodzonej obronie immunologicznej w płucach i jamie ustnej [189]. W tym uczestniczy w odpowiedzi antybakteryjnej [190]. W badanych liniach CRISPR-Con gen *WFDC2* ulega silnej aktywacji.

Dokładna funkcja białka WFDC5 nie jest w pełni poznana, jednak doniesienia w literaturze naukowej sugerują, że może uczestniczyć w odpowiedzi przeciwbakteryjnej i w stanie zapalnym [191]. W przypadku tego genu obserwuje się bardzo dużą różnicę ekspresji pomiędzy komórkami z prawidłowym i nieprawidłowym p53.

Białko WNT4 pełni rolę regulacji różnicowania komórek dendrytycznych [192]. Odgrywa ważną rolę w regulacji szlaków sygnalizacyjnych związanych z beta-kateniną [193]. Mieszanina AN aktywując białko p53 uruchamia kaskadę aktywacyjną genów, do których zalicza się gen *WNT4*.





Ryc. 54. Podsumowanie funkcji białek kodujących zidentyfikowane geny, które ulegają ekspresji pod wpływem mieszaniny AN . Opracowanie własne w programie BioRender na podstawie publikacji:[156-193].

Do dalszego etapu badań wybrano trzy geny: *SLAMF7, KLRG2* oraz *NCR3LG1* celem określenia potencjalnego miejsca wiązania białka p53 zlokalizowanego w ich obrębie. Na podstawie wcześniej przedstawionych wyników zauważono, że wybrane geny ulegają silnemu wzrostowi ekspresji pod wpływem mieszaniny AN w wykorzystanych liniach komórkowych o dzikim statusie genu *TP53*. Sekwencje DNA do testowania potencjalnej odpowiedzi na p53 wybrano w oparciu o publicznie dostępne bazy danych z prac badających wiązanie p53 w obrębie genomu.

W przypadku badanego miejsca wiązania p53 w sekwencji genu *SLAMF7* obserwuje się silniejszy wpływ egzogennej formy białka p53 (ryc. 18.). Warto zaznaczyć, że endogenna forma białka p53 również aktywuje tą sekwencję, jednak różnica jest kilkukrotna (ryc. 18.). Niezależnie od różnic, sklonowana sekwencja *SLAMF7* kontroluje ekspresję genu reporterowego i jest aktywowana przez p53, jest to więc prawdopodobnie miejsce, z którego p53 kontroluje ekspresję *SLAMF7*.

Z kolei, analizowane miejsce wiązania w sekwencji genu *KLRG2* jest silniej aktywowane przez endogenne niż przez egzogenne p53 (ryc. 19.). W tym przypadku obserwowano kilkukrotną różnicę w poziomie aktywacji. Wybrany fragment sekwencji genu *NCR3LG1* jest aktywowany w podobnym stopniu przez endo- jak i egzogenne białko p53 (ryc. 20.).

Analizy opublikowane przez grupę Fischera i wsp. przedstawiają podsumowanie badań transkryptomicznych, które skupiają się na poszukiwaniu genów regulowanych przez białko p53 [200]. W tych analizach badane geny zidentyfikowano jako potencjalne cele białka p53 – gen SLAMF7 został zidentyfikowany w 15 z 57 badań; gen KLRG2 w 10 z 57 badań, natomiast gen NCR3LG1 wykazuje zależność od białka p53 w 15 badaniach. Na podstawie tych wyników można podejrzewać, że wspomniane geny są regulowane przez białko p53 w ściśle określonych warunkach, np. jedynie przez określone czynniki stresu lub tylko w niektórych liniach komórkowych. SLAMF7 jest białkiem badanym pod kątem udziału w reakcjach immunologicznych, a jego gen może być celem dla białka p53 [201]. Białka KLRG2 oraz NCR3LG1 jak wspomniano wcześniej wykazują potencjalną rolę w działaniu układu immunologicznego [173], [174], [177], [178]. Białko KLRG2 według badań grupy Ito i wsp. uczestniczy w szlaku p53 [174]. W tym badaniu zauważono, że wyciszenie ekspresji KLRG2 w komórkach raka żołądka zmniejsza ich nowotworowe cechy i powoduje wzrost aktywności p53 [19]. Sugeruje to, że KLRG2 ma właściwości onkogenne. Według prezebtowanych wyników KLRG2 jest zdecydowanie pod pozytywną kontrolą ze strony p53, co wykazały testy na dwóch liniach komórkowych (A549 i U-2 OS). Ponadto, badania transkryptomiczne wykazały bardzo niski poziom ekspresji KLRG2 w komórkach nowotworowych niepoddanych stresowi i silną aktywację pod wpływem AN. Co sugeruje, że gen KLRG2 może wykazywać także przeciwnowotworowe właściwości [149]. Prezentowane wyniki rzucają nowe światło na rolę białka p53 w regulacji odpowiedzi immunologicznej, ale także na nowe funkcje badanych białek w komórce.

2. Ścieżki aktywacji białka SLAMF7

Białko SLAMF7 (znane także jako CS1, CRACC czy CD319) odgrywa kluczową rolę w regulacji funkcji komórek odpornościowych, zwłaszcza komórek NK [183], [197]. Jako jedno z niewielu białek powierzchniowych występuje zarówno na komórkach NK, jak i na komórkach docelowych (np. niektórych komórkach nowotworowych tj. komórki szpiczaka mnogiego). Wiązanie się ze sobą cząsteczek SLAMF7 na komórkach NK i komórkach docelowych sprzyja aktywacji cytotoksycznej funkcji komórek NK, co doprowadza do elimanacji komórki docelowej. Odkrycie dużych skupisk białka SLAMF7 na powierzchni komórek szpiczaka mnogiego doprowadziło do opracowania zhumanizowanego przeciwciała skierowanego przeciw SLAMF7 o nazwie Elotuzumab (Empliciti®). Obecnie jest to jest skutecznie wykorzystywane w terapii szpiczaka mnogiego. SLAMF7 pośredniczy w regulacji komórek NK, działając aktywująco lub hamująco w zależności od ekspresji wewnątrzkomórkowych adapterów EAT-2 [202].

W poprzednim rozdziale przedstawiono dowody wskazujące, że gen *SLAMF7* jest pozytywnie regulowany przez p53 w co najmniej dwóch liniach komórkowych. Ponieważ prezentowane wyniki rzucają nowe światło na rolę białka p53 w regulacji białka SLAMF7, ciekawym zagadnieniem wydaje się szersze poznanie zachodzących mechanizmów.

W pierwszym etapie badań sprawdzono, w jaki sposób białko SLAMF7 ulega akumulacji w komórkach linii A549 oraz w ich kondycjonowanej pożywce (ryc. 21.). W komórkach eksponowanych na mieszaninę AN obserwuje się glikozylowaną formę (~50 kDa) oraz formę natywną (37 kDa) SLAMF7 (ryc. 21.). Obie te formy zostały także zaobserwowane niezależnie przez zespoły Choe i wsp. oraz Kikuchi i wsp., które opisują je jako formę glikozylowaną (~50 kDa) i nieglikozylowaną (37 kDa) [203], [204]. Natomiast w próbce medium kondycjonowanego prawdopodobnie obserwuje się jedynie formę glikozylowaną. Zespół Ishibashi. zaobserwował w surowicy pacjentów ze szpiczakiem mnogim rozpuszczalną formę białka SLAMF7 (sSLAMF7) W prowadzonych badaniach wykazano, że u pacjentów, w których wykryto obecność formy sSLAMF7 w surowicy skuteczność terapii Elotuzumabem była zmienjszona w porównaniu z pacjentami, u których tej formy nie obserwowano [205]. Badania prowadzone przez zespół Kikuchi również wskazują na negatywną rolę formy sSLAMF7 w terapii Elotuzumabem zarówno in vitro, jak i in vivo w badanych modelach szpiczaka mnogiego [204]. Badacze sugerują także, że rozpuszczalna forma SLAMF7 może wpływać na immunologiczne mechanizmy Elotuzumabu obejmujące cytotoksyczność komórkową zależną od przeciwciała (ADCC) z udziałem komórek NK oraz fagocytozą komórkową zależną od przeciwciał (ang. antibody-dependent cellular phagocytosis; ADCP) [206], [207], [208], [209], [210]. Oznacza to, że sSLAMF7 wiażac się z Elotozumabem neutralizuje cytotoksyczne działanie komórek NK w stosunku do komórek szpiczaka mnogiego. Sam Elotuzumab może pozytywnie wpływać na funkcję efektorową makrofagów zwiększając ADCP [204], [205]. Pośrednia aktywacja ADCP przez Elotuzumab może wyjaśnić występowanie fagocytozy niezależnej od CD47 w komórkach

nowotworowych, która związana jest z obecnością receptora SLAMF7 [211]. Badacze wskazują na to, że połączenie Elotuzumabu z lekami immunomodulującymi może być korzystną strategią terapeutyczną poprawiającą skuteczność leczenia pacjentów chorych na szpiczaka mnogiego [204].

Warto zaznaczyć, że cytowane źródła nie prezentują masy molekularnej sSLAMF7, jedynie przedstawiają analizy z cytometrii przepływowej. W prezentowanych wynikach nie ma pewności, czy obserwuje się tą samą sekrecyjną formę białka SLAMF7. Na podstawie prezentowanych badań na ryc. 21. oraz przez cytowane zespoły nie można jednoznacznie stwierdzić, że omawiana jest ta sama forma sekrecyjna białka SLAMF7 [203], [204], [205]. Cytometria przepływowa w przeciwieństwie do techniki Western blot nie umożliwia oceny masy molekularnej badanych białek. W prezentowanych badaniach obserwuje się tylko jedną formę sekrecyjną, co może być poszlaką, że sSLAMF7 występujący w surowicy osób ze szpiczakiem mnogim i forma SLAMF7 wykryta w pożywce to samo białko. Prezentowany model może być w przyszłości wykorzystany do badania mechanizmów tworzenia się formy sekrecyjnej. Jednak pozostaje zagadką, dlaczego sekrecyjna forma SLAMF7 pojawia się tylko u niektórych pacjentów ze szpiczakiem mnogim.

Mechanizm aktywacji genu *SLAMF7* zależny od białka p53 jest słabo poznany. Dlatego następnym etapem badań było sprawdzenie, jak białko SLAMF7 ulega akumulacji w innych liniach niedrobnokomórkowego raka płuca oraz w linii kostniakomięsaka U-2 OS. W przedstawionych wynikach (ryc. 22-23.) obserwuje się akumulację białka SLAMF7 w liniach niedrobnokomórkowego raka płuca o dziki statusie genu *TP53* – A549 oraz NCI-H292 pod wpływem kamptotecyny (CPT) oraz mieszaniny AN. Pod wpływem obu traktowań wzrasta poziom białka SLAMF7. Nie obserwuje się akumulacji białka SLAMF7 w linii NCI-H1299 prawdopodobnie dlatego, że linia ta jest pozbawiona genu *TP53* (ryc. 23). Oceniono także poziom białka SLAMF7 w liniach A549 oraz U-2 OS zmodyfikowanych metodą CRISRP/Cas9 ze zredukowaną ekspresją genu *TP53* (ryc. 24.). W tych liniach obserwuje się niski poziom białka SLAMF7. Przedstawione wyniki są zgodne z wynikami uzyskanymi przez Zhou i wsp.,którzy eksponowali komórki linii U-2 OS na różne chemioterapeutyki tj. nutlinę-3a, aktynomycynę D, etopozyd oraz doksorubicynę i odnotowali aktywację genu *SLAMF7*.

Aktywność komórek NK w stosunku do komórek nowotworowych po podaniu chemioterapeutyków może się zmieniać. Mechanizmy wykorzystywane w terapii pacjentów onkologicznych skupiają się na bezpośrednim zabijaniu komórek nowotworowych, jednak chemioterapeutyki podawane systemowo mogą powodować hamowanie cytotoksyczności komórek NK i wytwarzania przez nie cytokin. Na podstawie licznych badań można zauważyć różne odpowiedzi komórek nowotworowych u pacjentów onkologicznych przyjmujących chemioterapię cytotoksyczną, na co ma wpływ rodzaj i dawka stosowanego leku [212]. Ponieważ białko SLAMF7 odgrywa kluczową rolę w aktywacji cytotoksycznych właściwości komórek NK, chemioterapeutyki stosowane w standardowych terapiach

onkologicznych, poprzez modulację aktywacji SLAMF7 mogą uwrażliwić komórki nowotworowe na działanie komórek NK [183].

W literaturze naukowej brak jest opisu szlaków/są nieliczne doniesienia na temat szlaków aktywacji genu *SLAMF7* pod wpływem różnych chemioterapeutyków. Dlatego następnym celem projektu było sprawdzenie, w jaki sposób białko SLAMF7 ulega akumulacji pod wpływem powszechnie stosowanych chemioterapeutyków i czy obserwowane mechanizmy aktywują się zależnie od białka p53. Do tego etapu badań (ryc. 25.) wykorzystano jako dodatkowe stresory: paklitaksel (PTX), etopozyd (Eto) oraz cis-platynę (Cis-Pt). Paklitaksel działa na elementy cytoszkieletu komórek (konkretnie na mikrotubule). Przy wysokim stężeniu PTX zatrzymuje mitozę w fazie G2/M, a przy niskim stężeniu indukuje apoptozę w fazie G0 i G1/S poprzez aktywację kinazy Raf-1 lub p53/21, w zależności od stężenia [213]. Stosowanie etopozydu powoduje tworzenie dwuniciowych pęknięć nici DNA. W komórkach niedzielących się zaburza to transkrypcję genów [214]. Mechanizm działania cis-platyny polega na jej wiązaniu się do nici DNA w komórkach nowotworowych, co prowadzi do zablokowania podziału komórek i wywołania apoptozy [215].

Na podstawie uzyskanych wyników (ryc. 25.) obserwuje się aktywację białka SLAMF7 pod wpływem wszystkich zastosowanych chemioterapeutyków działających na komórki linii A549. W komórkach eksponowanych na chemioterapeutyki obserwuje się aktywację endogennej formy białka p53 (scharakteryzowanej jako forma z fosforylacją seryny 15), jednak wyjątek stanowią komórki eksponowane na działanie paklitakselu (PTX). W omówionym eksperymencie obserwuje się akumulację białka SLAMF7 przy braku aktywacji p53. Obecny stan wiedzy nie tłumaczy obserwowanego zjawiska. Bardziej szczegółowe zbadanie tego mechanizmu może umożliwić powstanie nowej strategii terapeutycznej związanej z aktywacją wytwarzania białka SLAMF7 w skojarzeniu z Elotuzumabem. Akumulacja białka SLAMF7 pod wpływem paklitakselu wynika ze wzrostu transkrypcji genu, co pokazała analiza RT-qPCR (ryc. 26.). Paklitaksel aktywuje szlak NF-KB, który odpowiada za cytotoksyczne działanie komórek NK [216]. Badacze grupy Kubo przedstawili dowody, że działanie paklitakselu indukuje wytwarzanie perforyny w komórkach NK (perforyna znajduje się w ziarnach azurofilnych, uczestnicząc w odpowiedzi cytotoksycznej). Wopisanych badaniach PTX nie indukował sygnalizacji szlaku FAS [216]. Białko SLAMF7 uczestniczy w regulacji stanu zapalnego poprzez hamowanie ekspresji TNF i IL-12p70 [184]. Badania Wu i wsp. wykazały, że SLAMF7 posiada zdolność hamowania szlaku NF- κB poprzez interakcję z SHIP1 (ang. Src homology 2 (SH2) domain-containing inositol 5-phosphatase 1) oraz TRAF6 (ang. TNF receptor-associated factor 6) [217]. Z kolei inna grupa na podstawie sugeruje, że ukierunkowanie terapii na SLAMF7 może zmniejszać poziom stanu zapalnego, ponieważ białko SLAMF7 wykazuje kluczowe funkcje regulatorowe w sygnalizacji makrofagów. W badaniach Simmons i wsp. zauważyli silną ekspresję in vivo genu SLAMF7 w makrofagach pochodzących z tkanki dotkniętej stanem zapalnym (ang. superactivated macrophages). Według autorów IFN-γ jest głównym aktywatorem ekspresji SLAMF7 w badanych warunkach. Aktywacja SLAMF7 wywołała wydzielanie

cytokin prozapalnych (w tym TNF-α), co wzmocniło aktywację makrofagów i spowodowało zmniejszenie stanu zapalnego [218].Badania sugerują, że białko SLAMF7 ulega aktywacji w odpowiedzi na stan zapalny wywołany poprzez działanie PTX.

Następnym krokiem prowadzonych badań było uzyskanie linii A549 z obniżoną ekspresją genu *SLAMF7* (ryc. 27.). W uzyskanej linii obserwuje się brak aktywacji glikozylowanej formy, jednak w komórkach o obniżonej ekspresji *SLAMF7* pojawia się forma białka (obecna nawet w komórkach nietraktowanych) reagujące z przeciwciałem użytym do immunodetekcji. Brak pozytywnej kontroli wyciszenia genu spowodował, że zdecydowano się na zawieszenie doświadczeń z tymi komórkami. Należy jednak zaznaczyć, że glikozylowana forma białka uczestniczy w regulacji struktury, stabilności i funkcji białka SLAMF7. Zespół Wang. wskazuje, że zakłócenie glikozylacji SLAMF7 prowadzi do promowania fagocytozy przez makrofagi. Badacze sugerują także, że ekspresja receptora SLAMF7 na powierzchni komórek nowotworowych w guzie działa jako sygnał unikania fagocytozy "nie jedz mnie", [219]. Rodzi się zatem pytaniem, jak pozbawienie formy glikozylowanej działa na inne komórki immunologiczne. Jak wcześniej wspominano, przyczyną może być tu sSLAMF7 (prawdopodobnie sekrecja nadmiaru glikozylowanej formy), który hamuje cytotoksyczną aktywność komórek NK na korzyść ADCP makrofagów [204], [205], [211].

Ponieważ mechanizm aktywacji *SLAMF7* pod wpływem PTX oraz zależny od p53 mechanizm aktywacji przez inne czynniki stresu jest ciągle słabo zbadany postanowiono sprawdzić, w jaki sposób białko SLAMF7 ulega akumulacji w ludzkich liniach komórkowych: niedrobnokomórkowego raka płuca, w komórkach wywodzących się z układu krwiotwórczego (wykazujących cechy komórek prawidłowych oraz linii komórek białaczkowych), w czerniakach oraz w liniach komórkowych pochodzących z nowotworów regionu głowy i szyi.

W liniach NCI-H1299 (ryc. 28.) wykazano, że stosowanie mieszaniny AN, PTX czy CPT nie powoduje aktywacji p53 i zwiększenia poziomu białka SLAMF7. Możliwe, że badana linia nie posiada genu *SLAMF7* lub ma mutację w jego sekwencji, ponieważ nie obserwuje się wzbudzenia aktywacji pod wpływem chemioterapeutyków (nawet niezależnie od białka p53 pod wpływem PTX).

Białko SLAMF7 ulega aktywacji w komórkach przewlekłej białaczki limfocytowej oraz ostrej białaczki limfoblastycznej [195], [220]. Jeśli prawidłowa forma białka SLAMF7 ulega aktywacji w prawidłowych komórkach immunologicznych, to czy białko to nie powinno także ulegać aktywacji w komórkach linii białaczkowych? Modelem do takich obserwacji może być linia ostrej białaczki limfocytów T – Jurkat (ryc. 29.). Według bazy COSMIC komórki Jurkat mają mutację genu *SLAMF7* [150]. Jednak w projekcie zaobserwowano akumulację białka SLAMF7 po upływie 24h pod wpływem CPT. Natomiast w linii K562 (linia komórkowa przewlekłej białaczki limfocytowej), po 6 godzinach traktowania obserwuje się podobną akumulację SLAMF7 w komórkach kontrolnych i traktowanych (ryc. 29.). W linii HL60 (ostra białaczka promielocytowa) najwyższą akumulację białka SLAMF7 obserwuje się po upływie 24h traktowania paklitakselem lub kamptotecyną (ryc. 29.).

Ponieważ w linii HL-60 występuje delecja genu *TP53*, zaobserwowane zjawisko świadczy o tym, że w liniach białaczkowych można uzyskać niezależny od p53 wzrost akumulacji SLAMF7 po ekspozycji na paklitaksel lub kamptotecynę. Rodzi się pytanie czy obserwowana aktywacja białka SLAMF7 po upływie 24h w badanych liniach komórkowych nie jest efektem aktywacji szlaków związanych ze stanem zapalnym? Aby znaleźć odpowiedź na powyższe pytanie konieczne są dalsze analizy białek uczestniczących w szlakach prozapalnych.

Następnie sprawdzono, w jaki sposób białko SLAMF7 ulega akumulacji w liniach komórkowych z układu krwiotwórczego o charakterze komórek prawidłowych (ryc. 30.). Linia NK-92 posiada funkcje komórek NK, natomiast linia RPMI 1788 wykazuje właściwości limfocytów B. Białko SLAMF7 ulega aktywacji w badanych liniach, co potwierdzono w pracach innych zespołów [183]. W niniejszym projekcie nie zaobserwowano zmiany poziomu SLAMF7 w komórkach linii NK-92 i RPMI 1788 pod wpływem zastosowanych stresorów. Warto zaznaczyć, że obie linie komórkowe zarówno NK-92 oraz RPMI 1788 wg opisu ATCC posiadają w sobie materiał genetyczny EBV (ang. *Epstein-Barr Virus*), co może mieć wpływ na aktywację białka p53.

W przypadku linii komórkowych wywodzących się z czerniaka następuje wzrost poziomu białka SLAMF7 pod wpływem działania mieszaniny AN (ryc. 31.). W liniach komórkowych WM793, WM35 oraz A375 poziom tego białka rośnie po inkubacji z PTX oraz CPT. Jedynie w linii komórkowej WM278 obserwuje się akumulację SLAMF7 jedynie pod wpływem CPT.

W liniach wywodzących się z nowotworów regionu głowy i szyi jedynie linia UM-SCC-47 wykazuje wzrost poziomu białka SLAMF7, najsilniej po traktowaniu CPT (ryc. 32.). Linie UM-SCC-47 oraz UD-SCC-2 wykazują obecność genomu HPV, co może przyczyniać się do niestabilności genetycznej [221].



Ryc. 55. Podsumowanie aktywacji białka SLAMF7 w wybranych liniach komórkowych, w których sprawdzono wpływ ekspozycji: mieszaniny AN, PTX oraz CPT na akumulację białka SLAMF7.

Pojawia się pytanie czy wzrost poziomu SLAMF7 uwrażliwia badane linie nowotworowe na Elotuzumab. Na podstawie badań Assidiego uważa się, że nadekspresja SLAMF7 była pozytywnym czynnikiem prognostycznym w raku piersi. Wykazano, że pacjenci ze zwiększonym poziomem białka SLAMF7 w tkance guza piersi wykazują wyższy wskaźnik przeżycia i niższy wskaźnik nawrotów. Natomiast niski poziom SLAMF7 lub brak stanowią negatywny czynnik wpływający na gorsze wskaźniki przeżycia związanych zarówno z inwazją i przerzutowością [222].

Podsumowując, wzrost ekspresji genu SLAMF7 w komórkach nowotworowych może być spowodowany przez chemioterapeutyki, zarówno z udziałem p53, jak i bez niego. Może to prowadzić do nowych terapii celowanych, które uwrażliwiają komórki nowotworowe na działanie komórek NK. Wstępne traktowanie chemioterapeutykami może także zwiększyć wrażliwość komórek nowotworowych na Elotozumab. Zrozumienie tych mechanizmów wymaga dalszych badań.

3. Jaki jest wpływ białka p53 na cytotoksyczną odpowiedź komórek NK-92?

Komórki NK stanowią jedną z pierwszych linii obronnych w odpowiedzi przeciwnowotworowej i przeciw patogenom. Komercyjnie dostępna linia komórkowa NK-92 jest znana z silnej aktywności cytotoksycznej skierowanej przeciw komórkom zainfekowanym patogenami oraz komórkom nowotworowym [144]. Obecny stan wiedzy sugeruje, że białko p53 wpływa na odporność przeciwnowotworową i może wpływać na funkcjonowanie niektórych komórek immunologicznych tj. komórek NK [10], [71].

Aby sprawdzić wpływ białka p53 na cytotoksyczne działanie komórek NK-92 przeprowadzono ocenę aktywności metabolicznej komórek nowotworowych, które eksponowano na mieszaninę AN

lub pojedyncze substancje (ryc. 33. i ryc.34.). Następnie założono ko-kultury komórek nowotworowych z komórkami NK-92 i wykonano test MTS.

Na ryc. 33. przedstawiono pomiary, z których wynika, że żywotność komórek A549 traktowanych przez 48h mieszaniną AN a następnie inkubowanych z komórkami NK-92 zmniejsza się z ok. 75% (brak traktowania) do ok. 20% (z traktowaniem). Traktowanie mieszaniną AN uwrażliwia komórki nowotworowe na cytotoksyczne działanie komórek NK-92. Dotychczasowe badania przedstawione przez Belkahla i wsp. wskazują, że białko p53 indukuje ekspresję ligandów tj. MICA/B, ULBP1 oraz ICAM1 na powierzchni komórek nowotworowych, które uwrażliwiają ja na działanie komórek NK [223]. Jak wskazują badania Gutierrez-Guerrero i wsp. akumulacja SLAMF7 reguluje cytotoksyczną aktywację komórek NK [196]. Warto podkreślić, że komórki nowotworowe linii A549 CRISPR-p53 eksponowane na mieszaninę AN, również wykazują zwiększoną podatność na cytotoksyczne działanie komórek NK-92. Jednak jest ona na niższym poziomie, niż komórek z prawidłowym genem *TP53*.

Uwrażliwiający wpływ AN na podatność komórek nowotworowych na cytotoksyczne działanie komórek NK-92 wykazano również dla komórek linii NCI-H460, które posiadają dziki gen *TP53* (ryc. 34.). Zaskakującą obserwacją jest niska (wynosi 20%) aktywność metaboliczna komórek linii NCI-H1299 (delecja *TP53*) eksponowanych na mieszaninę AN oraz na komórki NK-92 (ryc. 34.). Sugeruje to, że AN może uwrażliwiać na działanie komórek NK-92 również niezależnie od statusu p53. W linii NCI-H1299 (w przeciwieństwie do linii A549) zastosowanie pojedynczych substancji aktynomycyny D i nutliny-3a nie powoduje efektu uwrażliwienia. Co sugeruje, że białko p53 pośredniczy w zwiększaniu wrażliwości komórek traktowanych samą aktynomycyną D lub nutliną-3a w komórkach z prawidłową formą genu *TP53*. Belkahla i wsp. donoszą, że p53 uwrażliwia komórki nowotworowe na cytotoksyczne działanie komórek NK pod wpływem dichlorooctanu (DCA) [223].

Obserwowany efekt cytotoksycznego działania komórek NK-92 na komórki linii NCI-H1299 może być spowodowany działaniem mieszaniny AN w sposób niezależny od p53. Dlatego postanowiono sprawdzić zmiany ekspresji genów odporności wrodzonej w nowotworowych liniach posiadających delecję genu *TP53* (ryc. 35.). Białko IFIH1 uczestniczy w odpowiedzi wrodzonej wywołanej infekcją wirusową [224]. Natomiast białko IFIT1 jest aktywowane w odpowiedzi na interferon typu I [225]. We wszystkich analizowanych liniach z delecją genu *TP53* pod wpływem mieszaniny AN obserwuje się wzrost ilości białka IFIT3. Aktywacja białka IFIT3 może być indukowana przez obecność różnych wirusów, co z kolei hamuje ich replikację, przy czym leżący u podstaw tego zjawiska mechanizm wskazuje na jego kluczową rolę we wrodzonej odporności przeciwwirusowej [226]. W badaniach Yang i wsp. przedstawiono, że gen *IFIT3* jest jednym z najbardziej aktywnych genów określonych jako "czynniki zapalne komórek NK", co może przyczyniać się do stymulacji komórek NK poprzez przypuszczalną aktywację interferonów [227].

Mieszanina AN może uwrażliwiać komórki niedrobnokomórkowego raka płuca na cytotoksyczne działanie komórek NK-92. Działanie to jest obserwowane zarówno w komórkach o dzikim *TP53* jak i w linii z delecją tego genu. Aktywacja genów odporności wrodzonej poprzez mieszaninę AN

w komórkach pozbawionych p53 wskazuje, że AN aktywuje niezależne od p53 mechanizmy zwiększające wrażliwość komórek nowotworowych na cytotoksyczne działanie komórek NK.



3.1. Substancje pochodzące z komórek linii NK-92 wykrywane w pożywce

Ryc. 56. Szlaki śmierci komórkowej modulowane przez komórki NK. Wykonanie własne w programie BioRender na podstawie publikacji [231].

Komórki NK odgrywają kluczową rolę w odpowiedzi immunologicznej wytwarzając szeroką gamę cytokin np. interferon-γ (IFN-γ), a także wykazując funkcje cytotoksyczne. Sugeruje się, że IFN-γ wytwarzany przez komórki NK bierze udział w różnych procesach immunologicznych, tj. różnicowanie pomocniczych limfocytów T [228]. W prezentowanych wynikach (ryc. 36.) pokazano, w jaki sposób medium kondycjonowane wpływa na aktywację wybranych białek uczestniczących w szlaku IFN-γ. Obserwuje się wzrost fosforylacji tyrozyny 701 białka STAT1 w komórkach A549 traktowanych pożywką z hodowli NK-92. Komórki NK wydzielają wiele cytokin (tj. IFN-γ), które posiadają zdolność aktywacji szlaku JAK/STAT [229]. Jednak w medium z ko-kultury komórek nowotworowych eksponowanych na mieszaninę AN z komórkami NK-92 obserwuje się najsilniejszą zdolność indukcji fosforylacji tyrozyny 701 białka STAT1. Podstawową rolą komórek NK jest eliminacja zakażonych i transformowanych komórek poprzez indukowanie śmierci komórkowej na drodze apoptozy, nekroptozy czy pyroptozy [230].

Szlaki pyroptozy i apoptozy są ze sobą powiązane poprzez bezpośrednie oddziaływanie między kaspazami prozapalnym (ludzkie kaspazy: CASP1, CASP4, CASP5; mysie kaspazy: CASP11,

CASP12) i apoptotycznymi (m.in. CASP3, CASP7, CASP8, CASP9). Komórki NK oprócz wydzielania cytokin posiadają na swojej powierzchni ligand receptora FAS [231]. Wspólne działanie interferonu-γ i liganda FAS może zwiększać wydajność niszczenia komórek docelowych. Pod wpływem medium kondycjonowanego z hodowli 200 000 komórek NK-92 suplementowanego FASLG (ryc. 37.), w komórkach docelowych A549 obserwuje się akumulację kaspazy-1, aktywnej kaspazy-8 (obserwowana cięta forma na wysokości 18 kDa) oraz aktywnej efektorowej kaspazy-3 (cięte formy obserwowane na wysokości 19 kDa i 17 kDa). W niniejszym projekcie wykazano, że dodanie FASLG może wywołać aktywację apoptozy w komórkach nowotworowych eksponowanych na medium komórek NK-92. Prezentowane wyniki są oryginalne ponieważ dotychczas w piśmiennictwie brak doniesień o wpływie kondycjonowanej pożywki z hodowli komórek NK-92 na bardzo silne uwrażliwienie komórek nowotworowych na pro-apoptotyczne działanie liganda FAS. Wynik ten powinien być przedmiotem kolejnych projektów badawczych.

4. Rola białka p53 w sygnalizacji szlaków interferonowych

Interferony (IFN) to klasa cytokin wytwarzanych i wydzielanych przez różne typy komórek w odpowiedzi na zakażenie patogenami. Dotychczas donoszono o roli białka p53 na sygnalizację szlaków IFN, co uzasadnia dalsze kroki w tym kierunku [10], [71]. Wyniki przedstawionych wyżej projektów wymagały rozszerzenia dlatego w niniejszym projekcie doktorskim zastosowano dwa typy interferonów – interferon typu I (IFN- α 1) oraz interferon typu II (IFN- γ). Przeprowadzono analizę wpływu białka p53 na ekspresję wybranych genów uczestniczących w szlakach IFN.

4.1. Wpływ białka p53 na mechanizm aktywacji inhibitora szlaku JAK/STAT – białka SOCS1

Białko SOCS1 jest inhibitorem szlaku JAK/STAT, który może być aktywowany w odpowiedzi na działanie IFN [147], [148]. Dotychczasowe badania wskazują, że gen *SOCS1* jest aktywowany w sposób zależny od białka p53 w linii niedrobnokomórkowego raka płuca A549 [10]. p53 poprzez regulację aktywności SOCS1, hamującej fosforylację białka STAT1, może modyfikować odpowiedź komórki na działanie cytokin, których sygnalizacja odbywa się za pomocą STAT1, a więc np. interferonów typu I i II. Ponieważ dotychczasowe badania tego zagadnienia odbywały się w oparciu o jedną linię komórkową, dlatego jednym z celów niniejszego projektu było sprawdzenie, jak p53 moduluje ekspresję SOCS1 w innych liniach komórkowych. Zaobserwowano, że białko SOCS1 (ryc. 38.) ulega akumulacji w liniach A549 oraz linii NCI-H1292 (linie niedrobnokomórkowego raka płuca; o dzikim statusie genu *TP53*). W przypadku linii NCI-H1299 (linia niedrobnokomórkowego raka płuca; posiadająca delecję genu *TP53*) SOCS1 nie ulega aktywacji na skutek ekspozycji na żaden z badanych związków (ryc. 38.). Linia U-2 OS (kostniakomięsak, o dziki statusie genu *TP53*) charakteryzuje się wysoką, konstytutywną aktywację SOCS1 (ryc. 38.). W transkryptomicznych danych uzyskanych przez grupę Profesora Rusina wysoka akumulacja białka SOCS1 jest tłumiona pod wpływem aktynomycyny D, nutliny-3a oraz

mieszaniny (AN) [10]. W klonach linii U-2 OS pozbawionych ekspresji genu *TP53* obserwuje się brak wpływu nutliny-3a na poziom białka SOCS1 (ryc. 39.). Można stwierdzić, że regulacja poziomu SOCS1 przez p53 jest bardzo skomplikowana. W komórkach z niskim poziomem SOCS1 (np. A549), aktywacja p53 znacząco zwiększa poziom SOCS1. Z kolei, w komórkach z wysokim, wyjściowym poziomem SOCS1 (np. U-2 OS), aktywacja p53 powoduje jego represję. Dane transkryptomiczne opublikowane przez Fischera i wsp. wskazują, że w niektórych komórkach p53 powoduje aktywację genu *SOCS1*, natomiast w innych komórkach powoduje jego represję [200]. Zatem białko p53 może działać jako regulator poziomu SOCS1 w komórce – jeśli komórka wykazuje dużą ilość transkryptu *SOCS1* aktywne białko p53 może ją zmniejszyć, natomiast jeśli jest on na niskim poziomie to może ją zwiększyć. Wyjaśnienie mechanizmu tego zjawiska wymaga dalszych badań.

Inni badacze zauważyli, że nutlina-3a w liniach komórkowych wywodzących się z białaczek jest w stanie spowodować wzrost poziomu SOCS1 [232]. Jednak dokładny mechanizm aktywacji SOCS1 przez nutlinę-3a jest niedostatecznie opisany w literaturze.

4.2. Rola białka p53 w szlaku IFN-α1

Pierwszym etapem oceny roli białka p53 w szlaku IFN-α1 było sprawdzenie, w jaki sposób białko p53 aktywowane przez mieszaninę AN osłabia fosforylację tyrozyny 701 białka STAT1 inicjowaną przez IFN-α1 (ryc. 41 A-C.). Przedstawione wyniki dowodzą, że białko p53 aktywowane przez mieszaninę AN wykazuje potencjał tłumiący fosforylację STAT1 w linii A549 (ryc. 41 A-C.). Jednak niższy poziom fosforylacji STAT1 nie powoduje osłabienia aktywacji białek uczestniczących w szlaku IFN-α1 – MX1 oraz IRF7 (ryc. 41 B-C.). Fosforylacja STAT1 w pozycji Tyr701 jest związana z aktywacją STAT1, jednak wyraźne hamowanie fosforylacji (aktywacji STAT1) nie przekłada się na spadek aktywności elementów jego szlaku (ryc. 41 A-C.). Konieczne jest poszerzenie wiedzy na temat mechanizmów szlaków interferonowych.

Aby przekonać się jak mieszanina AN oraz status p53 wpływa na ekspresję innych genów aktywowanych interferonem-α wykorzystano metodę RT-qPCR. Wybrano dodatkowo 9 genów.



Ryc. 57. Podsumowanie ekspresji badanych genów pod wpływem wybranych substancji w liniach A549 CRISPR-Con oraz CRISPR-p53 na podstawie ryc.42. Krotność ekspresji przedstawiono względem krotności kontroli.

Zaobserwowano osłabioną ekspresję trzech genów w wyniku aktywacji białka p53 indukowanej mieszaniną AN - *IFI6, IFI44, IFITM3* (ryc. 42.). Natomiast w przypadku 4 pozostałych *IFI27, DDX60, OAS1, IFIT3* zaobserwowano współdziałanie obu substancji (AN oraz IFN-α1) w aktywacji ich ekspresji. Tylko w przypadku *IFIT3* współdziałanie odbywa się w sposób zależny od p53.

W przypadku *IF127* obserwuje się najsilniejsze współdziałanie między AN oraz IFN- α 1 w aktywacji ekspresji, jednak odbywa się ono niezależnie od p53. Białko IFI27 ma znaczenie w mechanizmach uwrażliwiających komórki na sygnały proapoptotyczne [233]. Na podstawie wyników (ryc. 42.) można zauważyć, że białko p53 może negatywnie wpływać na ekspresję genów związanych ze szlakiem IFN- α 1, co może być skutkiem osłabienia fosforylacji STAT1. Traktowanie komórek niedrobnokomórkowego raka płuca mieszaniną AN i IFN- α 1 silnie aktywuje ekspresję niektórych genów związanych ze szlakiem IFN- α 1 bez zaangażowania białka p53. Mechanizm ten jest szczególnie widoczny w przypadku aktywacji *IF127* i wymaga dodatkowych analiz. Wykazano również, że aktywacja genu *OAS1* na skutek traktowania AN jest uzależniona od obecności prawidłowej formy białka p53. *OAS1* jest kolejnym zidentyfikowanym w tej pracy genem podlegającym aktywacji ze strony białka p53.

Rolę białka p53 w osłabianiu ekspresji genów uczestniczących w szlaku IFN-α1 zaobserwowała grupa Wang i wsp. [234]. Badacze wykazali obniżenie ekspresji genów kodujących białka transbłonowe indukowane przez interferon – IFITM1, IFITM2 oraz IFITM3. W prezentowanych doświadczeniach niniejszego projektu doktorskiego potwierdzono tłumienie ekspresji genu *IFITM3* przez białko p53 (ryc. 42). W swoich badaniach grupa Wang wykazała także, że aktywacja białka p53 i tłumienie aktywacji białek transbłonowych indukowanych przez interferon sprzyja zakażeniu komórek przez wirus grypy typu A [234]. Inne badania prowadzone przez Muñoz-Fontela i wsp. wykazały, że akumulacja p53 w mysich i ludzkich komórkach przyczyniała się do zmniejszenia replikacji rekombinowanego wirusa pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VSV) na wczesnym etapie infekcji [100]. Hamowanie replikacji wirusa było pośrednio związane ze wzmocnieniem sygnalizacji interferonowej zależnej od p53, a konkretnie indukcję niektórych genów stymulowanych przez interferon.

W przypadku prezentowanych wyników (ryc. 42.) opisano geny, które są pozytywnie regulowane zarówno przez p53 jak i przez IFN- α 1-. *IFIT3* i *OAS1*. Ekspresja obu tych genów jest osłabiona w komórkach pozbawionych prawidłowej formy białka p53 i eksponowanych na działanie mieszaniny AN. p53 może wzmacniać ekspresję niektórych genów aktywowanych przez IFN- α 1 (np. *OAS1, IFIT3*) i może hamować ekspresję innych genów aktywowanych przez tę cytokinę (np. *IFITM3, IFI44*). Ponadto, p53 nie uczestniczy w regulacji genów, które są aktywowane przez wspólne działanie IFN- α 1 i mieszaniny AN (np. gen *IFI27*). Oznacza to, że geny aktywowane przez IFN- α 1 podlegają zróżnicowanej regulacji ze strony białka p53 i nie obserwuje się jednego schematu aktywacji. Badania transkryptomiczne z wykorzystaniem zmodyfikowanych linii komórkowych oraz traktowania komórek AN i IFN- α 1 mogłyby doprowadzić do bardzo ciekawych wniosków dotyczących funkcjonowania tych dwóch istotnych szlaków sygnalizacyjnych.

4.3. Rola białka p53 w aktywacji szlaku IFN-γ

Przeanalizowano także rolę białka p53 w regulacji genów i białek uczestniczących w szlaku IFN-γ. Komórki poddano ekspozycji na stresory przez różny czas (ryc. 44.). Dokonana analiza wyników wykazała, że fosforylacja STAT1 po początkowym wzroście, maleje wraz z wydłużonym czasem eskpozycji na IFN-γ. Wraz ze zmniejszaniem poziomu fosforylacji STAT1 obserwuje się obniżoną akumulacje białek uczestniczacych w odpowiedzi na IFN- γ tj. IRF1 czy SOCS1. Literatura naukowa wskazuje, że zahamowanie fosforylacji STAT1 przyczynia się do zwiększonej podatności na infekcje wirusowe. Zarówno delecja genu STATI u myszy, jak i niedobór STATI u ludzi przyczyniają się do śmierci z powodu infekcji [235], [236]. Zaobserwowano, że po 24h traktowania IFN-γ i mieszaniną AN (ryc. 44.), czyli w momencie kiedy obserwuje się prawie całkowite zahamowanie fosforylacji STAT1, można dostrzec silną akumulację kaspazy-1 (CASP1). Obserwuje się silne współdziałanie AN i IFN-γ w aktywacji genu CASP1. Współdziałanie jest najsilniejsze, gdy poziom fosforylacji STAT1 jest już bardzo niski (48h). Współdziałanie mieszaniny AN oraz IFN-γ zależy prawdopodobnie pośrednio od stopnia fosforylacji STAT1. Aby lepiej zrozumieć zaobserwowane mechanizmy należałoby przeanalizować stopień aktywacji innych czynników transkrypcyjnych z rodziny STAT, np. STAT3 [235], [236]. Sugeruje się, że zniesieniu aktywacji białka STAT1 prawdopodobnie towarzyszy aktywacja współzawodniczącego szlaku STAT3, który aktywuje CASP1. Podobne obserwacje odnotowali Ho i Ivashkiv, aktywacja STAT3 w sygnalizacji IFN typu I w komórkach szpikowych hamowała zależną od STAT1 aktywację genów uczestniczących w stanie zapalnym [237]. Co więcej zauważa się, że STAT3 nie zmniejszał poziomu fosforylacji tyrozyny 701 STAT1, ale uniemożliwiał tworzenie homodimerów STAT1 wiążących się z DNA, w wyniku czego nie obserwowano indukcji mediatorów stanu zapalnego tj. CXCL9 i CXCL10 [237]. Badania Cuesta i wsp. wskazują, że aktywacja STAT3 może przyczyniać się do śmierci komórkowej wywołanej przez CASP1 [238]. Badania in vitro wskazuja, że aktywacja STAT1 może wywołać apoptoze poprzez indukcję CASP1 i liganda FAS, jednak dokładne mechanizmy wciąż nie są jasne [239], [240].

Na ryc. 45 oraz ryc. 46B. pokazano, że IFN-γ wywołuje fosforylację seryny 727 białka STAT1, która nie podlega osłabieniu na skutek ekspozycji na AN. Zatem fosforylacja obu aminokwasów inicjowana przez IFN-γ podlega różnym mechanizmom regulacji ze strony czynników aktywowanych mieszaniną AN (np. p53). Według badań Stephanou i wsp. aktywne białko STAT1 inicjuje apoptotyczną śmierć komórki poprzez indukcję liganda FAS i jego receptora. Do tego procesu niezbędna jest fosforylacja seryny 727, natomiast fosforylacje seryny 701 nie jest wymagana [240]. Badania zrealizowane przez Kovarik i wsp. wskazują także, że fosforylacja seryny 727 białka STAT1 jest indukowana przez IFN-γ za pośrednictwem kinazy MAPK (p38 MAPK) [241]. Niewyjaśniony pozostaje mechanizm obniżenia fosforylacji STAT1 pod wpływem stresorów aktywujących p53 w linii NCI-H1299, pozbawionej białka p53 (ryc. 46A). Może to sugerować, że w linii komórkowej NCI-H1299 występuje alternatywny mechanizm regulacji fosforylacji STAT1. Na ryc. 47. w prawidłowej linii fibroblastów obserwuje się

brak fosforylacji tyrozyny 701. Obserwowany mechanizm w nowotworowych liniach A549 (także CRISPR-Con oraz dzikim typie tej linii) może występować w linii prawidłowej. W linii GM07492 pod wpływem mieszaniny AN IFN-γ (podobnie jak w ww. liniach A549) wykazano silną aktywację CASP1.

Na podstawie wyników przedstawionych na ryc. 44 białka uczestniczące w szlaku IFN- γ można podzielić na białka wczesnej i późnej aktywacji. Potwierdzenie tych wyników pokazała grupa Sekreckiej [242]. Postanowiono sprawdzić, czy obserwuje się podobny mechanizm aktywacji na poziomie transkryptomu. Biorąc pod uwagę akumulację białek (ryc. 44), można stwierdzić, że geny *IRF1* i *SOCS1* należą do genów wczesnej aktywacji, a *CASP1, IFIT1* i *IFIT3* należą do genów późnej aktywacji. W cytowanych badaniach grupa Sekreckiej wykazała, że gen *IRF1* aktywuje ekspresję genu *CASP1* pod wpływem IFN- γ . Prezentowane wyniki dotyczące poziomów białek w komórkach traktowanych IFN- γ są zgodne z opublikowanymi danymi, które wskazują, że po rozpoczęciu traktowania IFN- γ najpierw następuje akumulacja białka IRF1, które jako czynnik transkrypcyjny aktywuje gen *CASP1*. W przypadku wszystkich testowanych genów poziom ekspresji zmienia się w dwóch wyznaczonych punktach czasowych (6h i 48h). Jednak najwyższy poziom ekspresji obserwuje się po 6h od początku ekspozycji na IFN- γ . Zatem za najwyższą akumulację białka CASP1 po 48h ekspozycji na cytokinę muszą dodatkowo odpowiadać mechanizmy postranskrypcyjne, np. duża stabilność białka CASP1, które pozostaje w komórce mimo zmniejszenia ilości mRNA.



Ekspresja genu powyżej 1000-krotność
Ekspresja genu większa bądź równa 100-krotności i mniejsza bądź równa 1000-krotności.
Ekspresja genu większa bądź równa 10-krotności i mniejsza bądź równa 100-krotności.
Ekspresja genu większa bądź równa 5-krotności i mniejsza bądź równa 10-krotności.
Ekspresja genu poniżej 5-krotności

Ryc. 58. Podsumowanie ekspresji badanych genów w komórkach eksponowanych kolejno przez 24h oraz 24+6h na wybrane substancje w liniach A549 CRISPR-Con oraz CRISPR-p53 na podstawie ryc.49. oraz ryc.50. Krotność ekspresji przedstawiono względem krotności kontroli.

Dodatkowo w przedstawionych wynikach (na ryc. 44., ryc. 49. oraz ryc. 50.) wykazano silne współdziałanie mechanizmów aktywowanych w komórkach pod wpływem mieszaniny AN IFN-γ na aktywację ekspresji genów: CASP1, IFIT1 oraz IFIT3 (wysoki poziom aktywacji widoczny jest też na poziomie białka). Synergistycznego działania substancji AN i IFN-γ nie obserwuje się w komórkach linii A549 CRISPR-p53. Białko p53 może współdziałać z IFN-γ, aby addytywnie lub synergistycznie stymulować ekspresję niektórych genów pomimo tłumienia fosforylacji tyrozyny 701 białka STAT1 zależnej od białka p53. Opisane współdziałanie jest najlepiej widoczne na ryc.45 B. gdzie zastosowano najpierw traktowanie mieszanina AN przez 24h (celem aktywacji szlaku białka p53), a następnie ekspozycją na cytokinę przez 6h. Wykazano zwiększoną ekspresję genów: CASP1, IFIT1 i IFIT3 oraz prawdopodobnie ICAM1. W przypadku ekspresji genu IF116 obserwuje się addytywny mechanizm aktywacji regulowany przez białko p53 oraz IFN-y [243], [244]. Jednak mechanizm ten nie jest obserwowany w regulacji ekspresji wszystkich genów aktywowanych pod wpływem IFN-γ i p53. Omówione wyniki dowodzą, że IFN-y i p53 mają wiele wspólnych genów docelowych. Ponadto, ich współdziałanie aktywuje geny kodujące białka uczestniczące w tych samych procesach biologicznych. Skutkiem czego obserwuje się np. prawidłową prezentację antygenów, uwrażliwienie komórek na apoptozę czy hamowanie cyklu komórkowego [240], [241], [245], [246], [247]. Sugeruje się także regulacyjną rolę białka p53 w procesach pyroptozy. W cyklu prezentowanych wyników obserwuje się zależną od p53 aktywację genów CASP1 i IFI16, które uczestniczą w indukcji pyroptozy[87], [243].

4.4. Porównanie roli białka p53 w szlakach interferonów

Na podstawie wcześniejszych wyników dotyczących roli białka p53 w szlakach interferonów, postanowiono sprawdzić, czy obserwacje są charakterystyczne dla konkretnej linii komórkowej lub danego typu nowotworu, czy może są na tyle uniwersalne, że występują w różnych nowotworach wywodzących się z odmiennych tkanek i są uwarunkowane wyłącznie funkcjonalną formą białka p53.



Ryc. 59. Podsumowanie aktywacji wybranych białek uczestniczących w szlakach interferonu w liniach komórkowych o dzikim statusie genu *TP53* na podstawie ryc. 51.

Fosforylacja tyrozyny 701 białka STAT1, świadczy o aktywacji białka STAT1 [248]. Powszechnie wiadomo, że białko STAT1 ulega aktywacji pod wpływem IFN [249]. Zaskakującą obserwacją jest fosforylacja Y701 białka STAT1 w linii AGS pod wpływem traktowania mieszaniną AN. W badaniach Abril i wsp. przedstawiono, że linia AGS pod wpływem działania interferonu wykazuje szczególnie niską aktywację białka STAT1 w porównaniu do linii HeLa [250]. W przypadku prezentowanych badań zauważa się silną aktywację fosforylacji STAT1 indukowaną przez mieszaniny zawierające AN. Stosowanie kombinacji obu chemioterapeutyków może aktywować białka zaangażowane w szlaki stanu zapalnego, co może tłumaczyć obserwację [10].

Kaspaza-1 (CASP1) jest białkiem prozapalnym aktywowanym poprzez montaż inflamasomu [251]. Badania Molla i wsp. pokazują, że niedobór CASP1 u myszy powoduje upośledzenie szlaku IFN-γ [251]. We wszystkich badanych liniach komórkowych pod wpływem mieszaniny AN i IFN-γ obserwuje się wzrost akumulacji CASP1. W niektórych liniach wzrost ilości tego białka następuje również po traktowaniu samym IFN-γ lub IFN-α. CASP1 jest zaangażowana w szlak IFN-γ. Obserwacja ta potwierdza wcześniejsze doniesienie grupy Profesora Rusina o akumulacji pod wpływem mieszaniny AN białek uczestniczących w stanie zapalnym [10].

Białko IRF1 zostało zidentyfikowane jako czynnik jądrowy, który jest indukowany m.in. w odpowiedzi na aktywację szlaku JAK/STAT [252]. Promotor genu *IRF1* zawiera pojedynczy element GAS (ang. *gamma interferon activation site*), ale nie posiada sekwencji ISRE (ang. *interferon-stimulated response element*) reagującej na czynnik ISGF3 [253]. Zatem IFN typu II indukuje silniejszą ekspresję genu *IRF1* niż IFN typu I lub typu II w większości typów komórek [254].

IFIT1 ulega aktywacji w odpowiedzi na interferon typu I [225]. Obserwuje się silną aktywację białka IFIT1 względem kontroli w komórkach eksponowanych na IFN-α lub AN IFN-α. Istnieje zestaw genów indukowanych przez białko STAT1 określanych jako geny sygnatury odporności na uszkodzenia DNA związane z interferonem (IRDS), w skład której wchodzi gen *IFIT1* [255].

IFIH1 odgrywa kluczową rolę we wrodzonej odpowiedzi immunologicznej wywołanej infekcją wirusową [224]. W infekcjach wirusowych białko IFIH1 jest kluczowym detektorem wirusowego RNA, aktywowanym przez interferony typu I. Co więcej, białko IFIH1 ulega akumulacji w odpowiedzi na aktywację STAT1 [256]. W prezentowanych wynikach wzrost ilości białka IFIH1 wykazano we wszystkich analizowanych komórkach w odpowiedzi na IFN-α. W komórkach A549 i NCI-H1299 poziom tego białka zwiększa się również pod wpływem IFN-γ (ryc. 46). Zatem to ważne białko o właściwościach antywirusowych jest pod kontrolą dwóch typów cytokin.

4.5. Wpływ IFN-γ na indukcję apoptozy

IFN-γ odgrywa kluczową rolę w aktywacji odporności komórkowej i koordynuje procesy odporności przeciwwirusowej i przeciwnowotworowej. IFN-y wraz z granzymem B i peroforyną inicjuje apoptozę w komórkach nowotworowych [257]. W niniejszym projekcie podjęto próbę sprawdzenia, w jaki sposób IFN-γ wpływa na szlak apoptozy. Inspiracją były wyniki przedstawione na ryc. 37. wskazująca, że pożywka znad komórek NK-92 jest w stanie uwrażliwić komórki nowotworowe na proapoptotyczne działanie FASLG. Na ryc. 52. pokazano, że w komórkach eksponowanych na AN FASLG IFN-y występuje cięta forma kaspazy-8 (szlak zewnętrzny) oraz cięte formy kaspazy-9 (CASP9 szlak wewnętrzny), co oznacza aktywację procesu apoptozy [80]. Kaspaza-3 (CASP3) jest kaspaza efektorowa, która odgrywa szczególna rolę w fazie wykonawczej procesu apoptozy [80]. Najwyższy poziom aktywnej kaspazy-3 obserwuje się w komórkach eksponowanych na mieszaninę AN FASLG IFN-γ. Oznacza to, że w komórkach poddanych działaniu AN FASLG IFN-γ występuje silna apoptoza, inicjowana aktywacją receptora FAS, której towarzyszy również aktywacja mitochondrialnego szlaku apoptozy. Wciaż niewiele wiadomo o roli IFN-γ w apoptozie, w której uczestniczy także FAS [258]. Badania przeprowadzone przez Rosner i wsp. wykazują rolę IFN-γ w transporcie receptora FAS na powierzchnię komórki w ciągu 24h, a proces ten wymagał aktywności szlaku JAK/STAT [259]. Prezentowane wyniki wskazują, że w komórkach eksponowanych na IFN-y, dodanie mieszaniny AN osłabię fosforylację tyrozyny 701 w STAT1, co jest zgodne z wcześniejszymi obserwacjami (np. Ryc. 45A). Najważniejsze wnioski z niniejszego eksperymentu są następujące: IFN-γ uwrażliwia komórki na aktywację kaspazy-8 inicjowaną przez ligand FAS, prawdopodobnie poprzez promowanie ekspresji liganda receptora FAS na powierzchni komórek (choć niewykluczone jest zaangażowanie innych mechanizmów) [107]. Ekspozycja komórek na AN (powodująca aktywację p53) jeszcze silniej uwrażliwia komórki na proapoptotyczne działanie liganda FAS [198]. Zaobserwowano także, że AN oraz IFN-γ również współdziałają w uwrażliwieniu na FASLG, jednak w zastosowanych warunkach wpływ AN wydaje się mieć dominujące znaczenie. Obecnością IFN-y w kondycjonowanej pożywce z komórek NK-92 można wytłumaczyć uwrażliwiający wpływ na proapoptotyczne działanie liganda FAS, jakie odnotowano w innym doświadczeniu (ryc. 37). Wyniki doświadczeń wykonanych w niniejszym projekcie jasno pokazują, że w części komórek nowotworowych IFN-y oraz p53 współdziałają w aktywacji wybranych genów, co może prowadzić do uwrażliwienia komórek nowotworowych na czynniki wywołujące śmierć apoptotyczną.

5. Podsumowanie

Podsumowując, białko p53 wcześniej aktywowane mieszaniną AN może regulować procesy związane z odpowiedzią immunologiczną, na przykład poprzez aktywację ekspresji genu *WFDC2*, *LACC1, WFDC5* kodujących białka o właściwościach przeciwbakteryjnych. Poprzez aktywację zależnych genów, białko p53 jest w stanie: regulować stan zapalny (*GAST, KCNK6, PTAFR, WFDC5, OTUD1, EOMES* czy *ICOSLG*), aktywować komórki związane z układem immunologicznym tj. neutrofile (*TRANK1*), makrofagi (*ACP5, LACC1, MAFB, APOL3, SLAMF7*) czy limfocyty wykazujące cytotoksyczną odpowiedź (w tym komórki NK) (*TRANK1, TNFRF14, NCR3LG1, SLAMF7, EOMES, ICOSLG*). Białko p53 wykazuje także funkcje regulacyjne w szlakach interferonowe poprzez geny: *OTUD1, KLRG2, APOL3, SLAMF7, EOMES* czy *ICOSLG*.

Białko p53 może regulować szlaki interferonowe także przez białko SOCS1, a także wykazuje wiele wspólnych genów docelowych związanych ze szlakiem IFN- α 1 (tj. *OAS1, IFIT3*) oraz IFN- γ (tj. *CASP1,IRF1, IFIT1*). Wykazano także, że białko p53 może regulować pyroptozę m.in. poprzez aktywację *CASP1* czy *IFI16*. Przedstawiono także możliwe współdziałanie białka p53, FASLG oraz IFN- γ w uwrażliwianiu komórek nowotworowych na apoptotyczną śmierć komórkową. Wykazano także, że mieszanina AN uwrażliwia komórki niedrobnokomórkowego raka płuca o różnym statusie genu *TP53* na cytotoksyczne działanie komórek NK-92.

Zlokalizowano sekwencję DNA z której białko p53 może oddziaływać na ekspresję genów: *SLAMF7, KLRG2* i *NCR3LG1*. Dodatkowo, przedstawiono mechanizm aktywacji białka SLAMF7 zależny od białka p53, aktywowanego pod wpływem mieszaniny AN. Przedstawiono masę molekularną sekrecyjnej formy białka SLAMF7 (sSLAMF7). Opisano także alternatywny szlak aktywacji białka SLAMF7 pod wpływem paklitakselu, którego aktywacja odbywa się nie zależnie od p53.



Ryc. 60. Graficzne podsumowanie uzyskanych wyników ramach niniejszego projektu doktorskiego. Wykonane własne w programie BioRender.

VI. Wnioski

Na podstawie wyników uzyskanych w ramach niniejszego projektu doktorskiego można stwierdzić, że:

- Zidentyfikowano 24 geny, których ekspresja jest zależna od obecności prawidłowej formy białka p53 aktywowanej pod wpływem mieszaniny AN. Z czego 17 z nich koduje białka związane z odpornością: tj.: ACP5, APOL3, EOMES, GAST, ICOSLG, KCNK6, KLRG2, LACC1, MAFB, NCR3LG1, OTUD1, PTAFR, SLAMF7, TRANK1, TNFRSF14, WFDC2, WFDC5. Natomiast białka pozostałych genów BEX2, CIBAR2, CRABP2, CTHRCH1, INKA1, NDRG4, WNT4 nie wykazują funkcji bezpośrednio związanych z układem immunologicznym.
- Wskazano miejsce wiązania białka p53 w wybranych genach: *SLAMF7, KLRG2* oraz *NCR3LG*. Testowane sekwencje są zlokalizowane poza promotorami genów pełnią więc prawdopodobnie funkcję *enhancerów*. W zastosowanych testach sekwencje były aktywowane zarówno przez egzo- jak i endogenne p53, przy czym aktywność sekwencji pochodzących z *SLAMF7* i *KLRG2* była znacznie większa niż sekwencji genu *NCR3LG1*.
- Białko SLAMF7 może być aktywowane pod wpływem mieszaniny AN, która aktywuje białko p53. Co więcej, wykryto w medium kondycjonowanym sekrecyjną formę białka SLAMF7 o masie molekularnej ~50 kDa, którą dotychczas identyfikowano jedynie u chorych ze szpiczakiem mnogim, którego komórki produkują zwiększoną ilość SLAMF7. Ponadto odkryto istnienie alternatywnego szlaku aktywacji genu *SLAMF7* pod wpływem paklitakselu, który nie angażuje białka p53. Przypuszczalnie AN lub paklitaksel mogą uwrażliwiać komórki guzów litych na działanie Elotozumabu, leczniczego przeciwciała promującego niszczenie komórek szpiczaka mnogiego poprzez wiązanie ze SLAMF7.
- Mieszanina AN uwrażliwia komórki niedrobnokomórkowego raka płuca na cytotoksyczne działanie komórek NK-92. Jednak efekt uwrażliwienia jest bardziej widoczny w komórkach, w których dochodzi do aktywacji prawidłowej formy białka p53.
- Współdziałanie IFN-γ i liganda FAS może przyczyniać się do aktywacji szlaków związanych z uwrażliwieniem komórek nowotworowych na komórki efektorowe.
- Białko p53 może kontrolować szlaki interferonowe poprzez regulację ekspresji genu SOCS1, przy czym kierunek regulacji jest komórkowo swoisty.
- Białko p53 nie ma wpływu lub reguluje negatywnie ekspresję genów stymulowanych interferonem-α.
- Białko p53 współdziała z interferonem-γ (synergistycznie lub addytywnie) w ekspresji niektórych genów będących pod kontrolą tej cytokiny, np. kluczowych z punktu widzenia odpowiedzi immunologicznej genów: CASP1, IFIT1, IRF1, IFIT3.

VII. Bibliografia

- H. Sung *i in.*, "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.", *CA Cancer J Clin.*, t. 71, nr 3, s. 209–249, maj 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [2] S. Mukherjee, Cesarz wszech chorób. Biografia raka. Wydawnictwo Czarne, 2013.
- [3] S. Jang, J. Gardner, i J. Ro, "Diagnostic approach and prognostic factors of cancers.", *Adv Anat Pathol.*, t. 18, nr 2, s. 165–72, mar. 2011, doi: 10.1097/PAP.0b013e31820cb39e.
- [4] M. Schultz, "Rudolf Virchow", *Emerg Infect Dis.*, t. 14, nr 9, s. 1480–1, wrz. 2008, doi: 10.3201/eid1409.086672.
- [5] C. Blackadar, "Historical review of the causes of cancer", World J Clin Oncol., t. 7, nr 1, s. 54–86, luty 2016, doi: 10.5306/wjco.v7.i1.54.
- [6] G. Brown, "Oncogenes, Proto-Oncogenes, and Lineage Restriction of Cancer Stem Cells", *Int J Mol Sci.*, t. 22, nr 18, s. 9667, wrz. 2021, doi: 10.3390/ijms22189667.
- [7] E. Kontomanolis *i in.*, "Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review.", *Anticancer Res.*, t. 40, nr 11, s. 6009–6015, lis. 2020, doi: 10.21873/anticanres.14622.
- [8] M. Shatz, D. Menendez, i M. Resnick, "The human TLR innate immune gene family is differentially influenced by DNA stress and p53 status in cancer cells", *Cancer Res.*, t. 72, nr 16, s. 3948–57, sie. 2012, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-4134.
- [9] M. Cortez *i in.*, "PDL1 Regulation by p53 via miR-34", *J Natl Cancer Inst.*, t. 108, nr 1, s. djv303, lis. 2015, doi: 10.1093/jnci/djv303.
- [10] M. Krześniak, A. Zajkowicz, A. Gdowicz-Kłosok, M. Głowala-Kosińska, B. Łasut-Szyszka, i M. Rusin, "Synergistic activation of p53 by actinomycin D and nutlin-3a is associated with the upregulation of crucial regulators and effectors of innate immunity.", *Cell Signal.*, t. 69, s. 109552, maj 2020, doi: 10.1016/j.cellsig.2020.109552.
- [11] L. Hernández Borrero i W. El-Deiry, "Tumor suppressor p53: Biology, signaling pathways, and therapeutic targeting", *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.*, t. 1876, nr 1, s. 188556, sie. 2021, doi: 10.1016/j.bbcan.2021.188556.
- [12] D. Hannahan i R. Weinber, "The hallmarks of cancer", Cell, t. 100, nr 1, s. 57–70, 01 2000, doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9.
- [13] D. Hannahan i R. Weinber, "Hallmarks of cancer: the next generation", *Cell*, t. 144, nr 5, s. 646–74, 03 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [14] D. Hannahan, "Hallmarks of Cancer: New Dimensions", *Cancer Discov*, t. 12, nr 1, s. 31–46, 2022, doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
- [15] G. Evan i K. Vousden, "Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer", *Nature.*, t. 411, nr 6835, s. 342– 8, maj 2001, doi: 10.1038/35077213.
- [16] R. Wong i L. Guillaud, "The role of epidermal growth factor and its receptors in mammalian CNS.", *Cytokine Growth Factor Rev.*, t. 15, nr 2–3, s. 147–56, kwi. 2004, doi: 10.1016/j.cytogfr.2004.01.004.
- [17] A. McClatchey i A. Yap, "Contact inhibition (of proliferation) redux", *Curr Opin Cell Biol.*, t. 24, nr 5, s. 685–94, paź. 2012, doi: 10.1016/j.ceb.2012.06.009.
- [18] J. Daksis, R. Lu, L. Facchini, W. Marhin, i L. Penn, "Myc induces cyclin D1 expression in the absence of de novo protein synthesis and links mitogen-stimulated signal transduction to the cell cycle.", Oncogene., t. 9, nr 12, s. 3635–45, grudz. 1994.
- [19] Y. Zhu, R. Yang, J. Law, M. Khan, K. Yip, i Sun Q, "Editorial: Hallmark of cancer: Resisting cell death.", *Front Oncol.*, t. 12, nr 1069947, lis. 2022, doi: 10.3389/fonc.2022.1069947.
- [20] S. Elmore, "Apoptosis: a review of programmed cell death.", *Toxicol Pathol*, t. 35, nr 4, s. 495–516, cze. 2007, doi: 10.1080/01926230701320337.
- [21] D. Suh, "Understanding angiogenesis and its clinical applications", Ann Clin Lab Sci., t. 30, nr 3, s. 227– 38, lip. 2000.

- [22] H. Saman, S. Raza, S. Uddin, i K. Rasul, "Inducing Angiogenesis, a Key Step in Cancer Vascularization, and Treatment Approaches", *Cancers (Basel)*, t. 12, nr 5, s. 1172, maj 2020, doi: 10.3390/cancers12051172.
- [23] J. Fares, M. Fares, H. Khachfe, H. Salhab, i Y. Fares, "Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited", *Signal Transduct Target Ther*, t. 5, nr 1, s. 28, mar. 2020, doi: 10.1038/s41392-020-0134-x.
- [24] M. Garcia, W. Nelson, i N. Chavez, "Cell-Cell Junctions Organize Structural and Signaling Networks", Cold Spring Harb Perspect Biol, t. 10, nr 4, s. a029181, kwi. 2018, doi: 10.1101/cshperspect.a029181.
- [25] R. Greenberg, "Telomeres, crisis and cancer", Curr Mol Med, t. 5, nr 2, s. 213–8, mar. 2005, doi: 10.2174/1566524053586590.
- [26] N. Pavlova i C. Thompson, "The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism", *Cell Metab.*, t. 23, nr 1, s. 27–47, sty. 2016, doi: 10.1016/j.cmet.2015.12.006.
- [27] O. Warburg, F. Wind, i E. Negelein, "The Metabolism of Tumors in the Body", J Gen Physiol., t. 8, nr 6, s. 519–530, mar. 1927, doi: 10.1085/jgp.8.6.519.
- [28] N. Pavlova, J. Zhu, i C. Thompson, "The hallmarks of cancer metabolism: Still emerging", *Cell Metab*, t. 34, nr 3, s. 355–377, mar. 2022, doi: 10.1016/j.cmet.2022.01.007.
- [29] A. Dutta, A. Ganguly, K. Chatterjee, S. Spada, i S. Mukherjee, "Targets of Immune Escape Mechanisms in Cancer: Basis for Development and Evolution of Cancer Immune Checkpoint Inhibitors", *Biology* (*Basel*), t. 12, nr 2, s. 218, sty. 2023, doi: 10.3390/biology12020218.
- [30] S. Tang, Q. Ning, L. Yang, Z. Mo, i S. Tang, "Mechanisms of immune escape in the cancer immune cycle", *Int Immunopharmacol*, t. 86, s. 106700, wrz. 2020, doi: 10.1016/j.intimp.2020.106700.
- [31] A. Starzer, M. Preusser, i A. Berghoff, "Immune escape mechanisms and therapeutic approaches in cancer: the cancer-immunity cycle", *Ther Adv Med Oncol*, t. 14, s. 17588359221096219, kwi. 2022, doi: 10.1177/17588359221096219.
- [32] S. Negrini, V. Gorgoulis, i T. Halazonetis, "Genomic instability--an evolving hallmark of cancer.", *Nat Rev Mol Cell Biol.*, t. 11, nr 3, s. 220–8, mar. 2010, doi: 10.1038/nrm2858.
- [33] A. Salmaninejad *i in.*, "Genomic Instability in Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Potentials.", *Curr Pharm Des.*, t. 27, nr 28, s. 3161–3169, 2021, doi: 10.2174/1381612827666210426100206.
- [34] D. Dorward, C. Lucas, A. Rossi, C. Haslett, i K. Dhaliwal, "Imaging inflammation: molecular strategies to visualize key components of the inflammatory cascade, from initiation to resolution.", *Pharm. Ther.*, t. 135, s. 182–199, 2012, doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.05.006.
- [35] S. Sun, "The non-canonical NF-kappaB pathway in immunity and inflammation.", *Nat. Rev. Immunol.*, t. 17, s. 545–558, 2017, doi: 10.1038/nri.2017.52.
- [36] H. Zhao *i in.*, "Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention.", *Si-gnal Transduct Target Ther.*, t. 6, nr 1, s. 263, lip. 2021, doi: 10.1038/s41392-021-00658-5.
- [37] C. Schmitt, B. Wang, i M. Demaria, "Senescence and cancer role and therapeutic opportunities.", *Nat Rev Clin Oncol*, t. 19, s. 619–636, 2022, doi: 10.1038/s41571-022-00668-4.
- [38] L. Wang, L. Lankhorst, i R. Bernards, "Exploiting senescence for the treatment of cancer", *Nat Rev Cancer*, t. 22, s. 340–355, 2022, doi: 10.1038/s41568-022-00450-9.
- [39] F. Wang, H. Du, B. Li, Z. Luo, i L. Zhu, "Unlocking phenotypic plasticity provides novel insights for immunity and personalized therapy in lung adenocarcinoma", *Front Genet.*, t. 13, s. 941567, wrz. 2022, doi: 10.3389/fgene.2022.941567.
- [40] G. Ogunrinola, J. Oyewale, O. Oshamika, i G. Olasehinde, "The Human Microbiome and Its Impacts on Health", *Int J Microbiol.*, t. 2020, s. 8045646, cze. 2020, doi: 10.1155/2020/8045646.
- [41] L. Zhao *i in.*, "Role of the gut microbiota in anticancer therapy: from molecular mechanisms to clinical applications.", *Signal Transduct Target Ther.*, t. 8, nr 1, s. 201, maj 2023, doi: 10.1038/s41392-023-01406-7.
- [42] Y. Chou, P. Ho, W. Chen, S. Wu, i M. Pan, "Lactobacillus fermentum V3 ameliorates colitis-associated tumorigenesis by modulating the gut microbiome.", *Am J Cancer Res.*, t. 10, nr 4, s. 1170–1181, kwi. 2020.
- [43] M. Lythgoe, B. Mullish, A. Frampton, i J. Krell, "Polymorphic microbes: a new emerging hallmark of cancer", *Trends Microbiol.*, t. 30, nr 12, s. 1131–1134, grudz. 2022, doi: 10.1016/j.tim.2022.08.004.
- [44] P. Costa *i in.*, "Epigenetic reprogramming in cancer: From diagnosis to treatment.", *Front Cell Dev Biol.*, t. 11, s. 1116805, luty 2023, doi: 10.3389/fcell.2023.1116805.
- [45] M. Saviana *i in.*, "Crosstalk between miRNAs and DNA Methylation in Cancer.", *Genes (Basel)*, t. 14, nr 5, s. 1075, maj 2023, doi: 10.3390/genes14051075.
- [46] M. Fabbri *i in.*, "MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, t. 104, nr 40, s. 15805–10, paź. 2007, doi: 10.1073/pnas.0707628104.
- [47] D. Linzer i A. Levine, "Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells", *Cell.*, t. 17, nr 1, s. 43–52, maj 1979, doi: 10.1016/0092-8674(79)90293-9.
- [48] D. Lane i L. Crawford, "T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells", *Nature.*, t. 278, nr 5701, s. 261–3, mar. 1979, doi: 10.1038/278261a0.
- [49] L. Parada, H. Land, R. Weinberg, D. Wolf, i V. Rotter, "Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation", *Nature.*, t. 312, nr 5995, s. 649–51, grudz. 1984, doi: 10.1038/312649a0.
- [50] D. Eliyahu, D. Michalovitz, i M. Oren, "Overproduction of p53 antigen makes established cells highly tumorigenic", *Nature.*, t. 316, nr 6024, s. 158–60, lip. 1985, doi: 10.1038/316158a0.
- [51] J. Nigro *i in.*, "Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types", *Nature.*, t. 342, nr 6250, s. 705–8, grudz. 1989, doi: 10.1038/342705a0.
- [52] J. Cunningham *i in.*, "Expression of p53 and 17p allelic loss in colorectal carcinoma.", *Cancer Res.*, t. 52, nr 7, s. 1974–80, kwi. 1992.
- [53] D. Eliyahu *i in.*, "Meth A fibrosarcoma cells express two transforming mutant p53 species", *Oncogene.*, t. 3, nr 3, s. 313–21, wrz. 1988.
- [54] P. Hinds, C. Finlay, i A. Levine, "Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation.", *J Virol.*, t. 63, nr 2, s. 739–46, luty 1989, doi: 10.1128/JVI.63.2.739-746.1989.
- [55] C. Olivero *i in.*, "p53 Activates the Long Noncoding RNA Pvt1b to Inhibit Myc and Suppress Tumorigenesis", *Mol Cell.*, t. 77, nr 4, s. 761-774.e8, luty 2020, doi: 10.1016/j.molcel.2019.12.014.
- [56] M. Patil i A. Bihari, "A comprehensive study of p53 protein", J Cell Biochem., t. 123, nr 12, s. 1891– 1937, grudz. 2022, doi: 10.1002/jcb.30331.
- [57] H. Wang, M. Guo, H. Wei, i Y. Chen, "Targeting p53 pathways: mechanisms, structures, and advances in therapy.", *Signal Transduct Target Ther.*, t. 8, nr 1, s. 92, mar. 2023, doi: 10.1038/s41392-023-01347-1.
- [58] E. Yonish-Rouach, C. Choisy, V. Deguin, C. Breugnot, i E. May, "The role of p53 as a transcription factor in the induction of apoptosis.", *Behring Inst Mitt.*, nr 97, s. 60–71, paź. 1996.
- [59] C. Wei *i in.*, "A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome.", *Cell.*, t. 124, nr 1, s. 207–19, sty. 2006, doi: 10.1016/j.cell.2005.10.043.
- [60] N. Lakin i S. Jackson, "Regulation of p53 in response to DNA damage.", Oncogene., t. 18, nr 53, s. 7644– 55, grudz. 1999, doi: 10.1038/sj.onc.1203015.
- [61] K. Bieging, S. Mello, i L. Attardi, "Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression.", Nat Rev Cancer., t. 14, nr 5, s. 359–70, maj 2014, doi: 10.1038/nrc3711.
- [62] U. Moll i O. Petrenko, "The MDM2-p53 interaction.", *Mol Cancer Res.*, t. 1, nr 14, s. 1001–8, grudz. 2003.
- [63] J. Marine, S. Francoz, M. Maetens, G. Wahl, F. Toledo, i D. Lozano, "Keeping p53 in check: essential and synergistic functions of Mdm2 and Mdm4.", *Cell Death Differ.*, t. 13, nr 6, s. 927–34, cze. 2006, doi: 10.1038/sj.cdd.4401912.
- [64] J. Kurse i W. Gu, "Modes of p53 regulation.", Cell., t. 137, nr 4, s. 609–22, maj 2009, doi: 10.1016/j.cell.2009.04.050.
- [65] H. Hou, D. Sun, i X. Zhang, "The role of MDM2 amplification and overexpression in therapeutic resistance of malignant tumors.", *Cancer Cell Int.*, t. 19, s. 216, sie. 2019, doi: 10.1186/s12935-019-0937-4.
- [66] M. Garland i P. Kirkpatrick, "Atomoxetine hydrochloride.", Nat Rev Drug Discov., t. 3, nr 5, s. 385–6, maj 2004, doi: 10.1038/nrd1387.
- [67] L. Vassilev, "Small-molecule antagonists of p53-MDM2 binding: research tools and potential therapeutics.", *Cell Cycle.*, t. 3, nr 4, s. 419–21, kwi. 2004.

- [68] M. Konopleva *i in.*, "MDM2 inhibition: an important step forward in cancer therapy.", *Leukemia.*, t. 34, nr 11, s. 2858–2874, lis. 2020, doi: 10.1038/s41375-020-0949-z.
- [69] M. Duffy, N. Synnott, S. O'Grady, i J. Crown, "Targeting p53 for the treatment of cancer.", Semin Cancer Biol., t. 79, s. 58–67, luty 2022, doi: 10.1016/j.semcancer.2020.07.005.
- [70] A. Alaseem, "Advancements in MDM2 inhibition: Clinical and pre-clinical investigations of combination therapeutic regimens.", *Saudi Pharm J.*, t. 31, nr 10, s. 101790, paź. 2023, doi: 10.1016/j.jsps.2023.101790.
- [71] L. Carlsen *i in.*, "The role of p53 in anti-tumor immunity and response to immunotherapy.", *Front Mol Biosci.*, t. 10, s. 1148389, sie. 2023, doi: 10.3389/fmolb.2023.1148389.
- [72] W. el-Deiry *i in.*, "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression", *Cell.*, t. 75, nr 4, s. 817–25, lis. 1993, doi: 10.1016/0092-8674(93)90500-p.
- [73] J. Harper, G. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, i S. Elledge, "The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases.", *Cell.*, t. 75, nr 4, s. 805–16, lis. 1993, doi: 10.1016/0092-8674(93)90499-g.
- [74] J. Martín-Caballero, J. Flores, P. García-Palencia, i M. Serrano, "Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)deficient mice", *Cancer Res.*, t. 61, nr 16, s. 6234–8, sie. 2001.
- [75] W. Taylor i G. Stark, "Regulation of the G2/M transition by p53", *Oncogene.*, t. 20, nr 15, s. 1803–15, kwi. 2001, doi: 10.1038/sj.onc.1204252.
- [76] X. Wang *i in.*, "GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint.", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, t. 96, nr 7, s. 3706–11, mar. 1999, doi: 10.1073/pnas.96.7.3706.
- [77] R. Ohki *i in.*, "Reprimo, a new candidate mediator of the p53-mediated cell cycle arrest at the G2 phase", *J Biol Chem.*, t. 275, nr 30, s. 22627–30, lip. 2000, doi: 10.1074/jbc.C000235200.
- [78] J. Chen, "The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression.", *Cold Spring Harb Perspect Med.*, t. 6, nr 3, s. a026104, maj 2016, doi: 10.1101/cshperspect.a026104.
- [79] E. Yonish-Rouach, D. Resnitzky, J. Lotem, L. Sachs, A. Kimchi, i M. Oren, "Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6.", *Nature.*, t. 352, nr 6333, s. 345– 7, lip. 1991, doi: 10.1038/352345a0.
- [80] B. Aubrey, G. Kelly, A. Janic, M. Herold, i A. Strasser, "How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression?", *Cell Death Differ.*, t. 25, nr 1, s. 104–113, sty. 2018, doi: 10.1038/cdd.2017.169.
- [81] H. Wei *i in.*, "Structural insight into the molecular mechanism of p53-mediated mitochondrial apoptosis.", *Nat Commun.*, t. 12, nr 1, s. 2280, kwi. 2021, doi: 10.1038/s41467-021-22655-6.
- [82] M. Mihara *i in.*, "p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria.", *Mol Cell.*, t. 11, nr 3, s. 577–90, mar. 2003, doi: 10.1016/s1097-2765(03)00050-9.
- [83] M. Müller *i in.*, "p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs.", t. 188, nr 11, s. 2033–45, grudz. 1998, doi: 10.1084/jem.188.11.2033.
- [84] E. Varfolomeev *i in.*, "Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally.", *Immunity.*, t. 9, nr 2, s. 267–76, sie. 1998, doi: 10.1016/s1074-7613(00)80609-3.
- [85] C. D'Souza i J. Heitman, "Dismantling the Cryptococcus coat.", *Trends Microbiol.*, t. 9, nr 3, s. 112–3, mar. 2001, doi: 10.1016/s0966-842x(00)01945-4.
- [86] J. Shi *i in.*, "Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death.", *Nature.*, t. 526, nr 7575, s. 660–5, paź. 2015, doi: 10.1038/nature15514.
- [87] P. Yu, X. Zhang, N. Liu, L. Tang, C. Peng, i X. Chen, "Pyroptosis: mechanisms and diseases.", Signal Transduct Target Ther., t. 6, nr 1, s. 128, mar. 2021, doi: 10.1038/s41392-021-00507-5.
- [88] S. Man, R. Karki, i T. Kanneganti, "Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases.", *Immunol Rev.*, t. 277, nr 1, s. 61–75, maj 2017, doi: 10.1111/imr.12534.
- [89] T. Zhang i in., "Transcription Factor p53 Suppresses Tumor Growth by Prompting Pyroptosis in Non-Small-Cell Lung Cancer.", Oxid Med Cell Longev., t. 2019, s. 8746895, paź. 2019, doi: 10.1155/2019/8746895.

- [90] Y. Yoshimoto, K. Kono, i Y. Suzuki, "ANTI-TUMOR IMMUNE RESPONSES INDUCED BY RA-DIOTHERAPY: A REVIEW.", *Fukushima J Med Sci.*, t. 61, nr 1, s. 13–22, 2015, doi: 10.5387/fms.2015-6.
- [91] J. Galon *i in.*, "Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome.", *Science.*, t. 313, nr 5795, s. 1960–4, wrz. 2006, doi: 10.1126/science.1129139.
- [92] M. Smyth, K. Takeda, Y. Hayakawa, J. Peschon, M. van den Brink, i H. Yagita, "Nature's TRAIL--on a path to cancer immunotherapy.", *Immunity.*, t. 18, nr 1, s. 1–6, sty. 2003, doi: 10.1016/s1074-7613(02)00502-2.
- [93] K. Kuribayashi *i in.*, "TNFSF10 (TRAIL), a p53 target gene that mediates p53-dependent cell death.", t. 7, nr 12, s. 2034–8, grudz. 2008, doi: 10.4161/cbt.7.12.7460.
- [94] G. Wu *i in.*, "KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene", *Nat Genet.*, t. 17, nr 2, s. 141–3, paź. 1993, doi: 10.1038/ng1097-141.
- [95] J. Pimentel, J. Zhou, i G. Wu, "TRAIL in Apoptosis and Immunosurveillance in Cancer.", *Cancers (Basel).*, t. 15, nr 10, s. 2752, maj 2023, doi: 10.3390/cancers15102752.
- [96] C. Falschlehner, U. Schaefer, i H. Walczak, "Following TRAIL's path in the immune system", *Immuno-logy.*, t. 127, nr 2, s. 145–54, cze. 2009, doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03058.x.
- [97] M. Ralff i W. El-Deiry, "TRAIL pathway targeting therapeutics.", *Expert Rev Precis Med Drug Dev.*, t. 3, nr 3, s. 197–204, maj 2018, doi: 10.1080/23808993.2018.
- [98] A. Sameer i S. Nissar, "Toll-Like Receptors (TLRs): Structure, Functions, Signaling, and Role of Their Polymorphisms in Colorectal Cancer Susceptibility.", *Biomed Res Int.*, t. 2021, s. 1157023, wrz. 2021, doi: 10.1155/2021/1157023.
- [99] T. Mori, Y. Anazawa, M. Iiizumi, S. Fukuda, Y. Nakamura, i H. Arakawa, "Identification of the interferon regulatory factor 5 gene (IRF-5) as a direct target for p53.", *Oncogene.*, t. 21, nr 18, s. 2914–8, kwi. 2002, doi: 10.1038/sj.onc.1205459.
- [100] C. Muñoz-Fontela *i in.*, "Transcriptional role of p53 in interferon-mediated antiviral immunity.", *J Exp Med.*, t. 205, nr 8, s. 1929–38, sie. 2008, doi: 10.1084/jem.20080383.
- [101] B. Barnes, M. Kellum, K. Pinder, J. Frisancho, i P. Pitha, "Interferon regulatory factor 5, a novel mediator of cell cycle arrest and cell death.", *Cancer Res.*, t. 63, nr 19, s. 6424–31, paź. 2003.
- [102] G. Hu, M. Mancl, i B. Barnes, "Signaling through IFN regulatory factor-5 sensitizes p53-deficient tumors to DNA damage-induced apoptosis and cell death.", *Cancer Res.*, t. 65, nr 16, s. 7403–12, sie. 2005, doi: 10.1158/0008-5472.
- [103] K. Honda i T. Taniguchi, "IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors.", *Nat Rev Immunol.*, t. 6, nr 9, s. 644–58, wrz. 2006, doi: 10.1038/nri1900.
- [104] H. Yanai *i in.*, "Role of IFN regulatory factor 5 transcription factor in antiviral immunity and tumor suppression.", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, t. 104, nr 9, s. 3402–7, luty 2007, doi: 10.1073/pnas.0611559104.
- [105] J. Nan, Y. Wang, J. Yang, i G. Stark, "IRF9 and unphosphorylated STAT2 cooperate with NF-κB to drive IL6 expression.", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, t. 115, nr 15, s. 3906–3911, kwi. 2018, doi: 10.1073/pnas.1714102115.
- [106] A. Yamada, R. Arakaki, M. Saito, Y. Kudo, i N. Ishimaru, "Dual Role of Fas/FasL-Mediated Signal in Peripheral", *Front Immunol.*, t. 8, s. 403, kwi. 2017, doi: 10.3389/fimmu.2017.
- [107] S. Textor, N. Fiegler, A. Arnold, A. Porgador, T. Hodmann, i A. Cerwenka, "Human NK cells are alerted to induction of p53 in cancer cells by upregulation of the NKG2D ligands ULBP1 and ULBP2.", *Cancer Res.*, t. 71, nr 18, s. 5998–6009, wrz. 2011, doi: 10.1158/0008-5472.
- [108] A. Decout, J. Katz, S. Venkatraman, i A. Ablasser, "The cGAS-STING pathway as a therapeutic target in inflammatory diseases.", *Nat Rev Immunol.*, t. 21, nr 9, s. 548–569, wrz. 2021, doi: 10.1038/s41577-021-00524-z.
- [109] H. Du, T. Xu, i M. Cui, "cGAS-STING signaling in cancer immunity and immunotherapy.", *Biomed Pharmacother.*, t. 133, s. 110972, sty. 2021, doi: 10.1016/j.biopha.2020.110972.
- [110] X. Ke, T. Hu, i M. Jiang, "cGAS-STING signaling pathway in gastrointestinal inflammatory disease and cancers.", *FASEB J.*, t. 36, nr 1, s. e22029, sty. 2022, doi: 10.1096/fj.202101199R.
- S. Baker *i in.*, "Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas.", *Science.*, t. 244, nr 4901, s. 217–21, kwi. 1989, doi: 10.1126/science.2649981.

- [112] E. Baugh, H. Ke, A. Levine, R. Bonneau, i C. Chan, "Why are there hotspot mutations in the TP53 gene in human cancers?", *Cell Death Differ*., t. 25, nr 1, s. 154–160, sty. 2018, doi: 10.1038/cdd.2017.180.
- [113] X. Chen *i in.*, "Mutant p53 in cancer: from molecular mechanism to therapeutic modulation.", *Cell Death Dis*, t. 13, nr 11, s. 974, lis. 2022, doi: 10.1038/s41419-022-05408-1.
- [114] P. Hainaut i G. Pfeifer, "Somatic TP53 Mutations in the Era of Genome Sequencing", *Cold Spring Harb Perspect Med.*, t. 6, nr 11, s. a026179, lis. 2016, doi: 10.1101/cshperspect.a026179.
- [115] F. Boeckler, A. Joerger, G. Jaggi, T. Rutherford, D. Veprintsev, i A. Fersht, "Targeted rescue of a destabilized mutant of p53 by an in silico screened drug", *Proc Natl Acad Sci U S A*, t. 105, nr 30, s. 10360–5, lip. 2008, doi: 10.1073/pnas.0805326105.
- [116] K. Ryan i K. Vousden, "Characterization of structural p53 mutants which show selective defects in apoptosis but not cell cycle arrest.", t. 18, nr 7, s. 3692–8, lip. 1998, doi: 10.1128/MCB.18.7.3692.
- [117] A. Zajkowicz, A. Gdowicz-Kłosok, M. Krześniak, D. Ścieglińska, i M. Rusin, "Actinomycin D and nutlin-3a synergistically promote phosphorylation of p53 on serine 46 in cancer cell lines of different origin.", *Cell Signal.*, t. 27, nr 9, s. 1677–87, wrz. 2015, doi: 10.1016/j.cellsig.2015.05.005.
- [118] A. Zajkowicz, A. Gdowicz-Kłosok, M. Krześniak, P. Janus, B. Łasut, i M. Rusin, "The Alzheimer's disease-associated TREM2 gene is regulated by p53 tumor suppressor protein.", *Neurosci Lett.*, t. 681, s. 62– 67, sie. 2018, doi: 10.1016/j.neulet.2018.05.037.
- [119] D. Lu *i in.*, "Actinomycin D inhibits cell proliferations and promotes apoptosis in osteosarcoma cells.", *Int J Clin Exp Med.*, t. 8, nr 2, s. 1904–11, luty 2015.
- [120] F. Mantovani *i in.*, "The prolyl isomerase Pin1 orchestrates p53 acetylation and dissociation from the apoptosis inhibitor iASPP.", *Nat Struct Mol Biol.*, t. 14, nr 10, s. 912–20, paź. 2007, doi: 10.1038/nsmb1306.
- [121] F. Li, T. Jiang, Q. Li, i X. Ling, "Camptothecin (CPT) and its derivatives are known to target topoisomerase I (Top1) as their mechanism of action: did we miss something in CPT analogue molecular targets for treating human disease such as cancer?", *Am J Cancer Res.*, t. 7, nr 12, s. 2350–2394, grudz. 2017.
- [122] B. Łasut-Szyszka *i in.*, "Transcriptome Analysis of Cells Exposed to Actinomycin D and Nutlin-3a Reveals New Candidate p53-Target Genes and Indicates That CHIR-98014 Is an Important Inhibitor of p53 Activity.", *Int J Mol Sci.*, t. 22, nr 20, s. 11072, paź. 2021, doi: 10.3390/ijms222011072.
- [123] Y. Liu i G. Zeng, "Cancer and innate immune system interactions: translational potentials for cancer immunotherapy.", *J Immunother.*, t. 35, nr 4, s. 299–308, maj 2012, doi: 10.1097/CJI.0b013e3182518e83.
- [124] Z. Jiang, H. Sun, J. Yu, W. Tian, i Y. Song, "Targeting CD47 for cancer immunotherapy.", J Hematol Oncol., t. 14, nr 1, s. 180, paź. 2021, doi: 10.1186/s13045-021-01197-w.
- [125] J. Gołąb, M. Jakóbisiak, W. Lasek, i T. Stokłosa, Immunologia, 7. wyd. PWN, 2017.
- [126] J. O'Donnell, M. Teng, i M. Smyth, "Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy.", *Nat Rev Clin Oncol.*, t. 16, nr 3, s. 151–167, mar. 2019, doi: 10.1038/s41571-018-0142-8.
- [127] W. Lasek, "Cancer immunoediting hypothesis: history, clinical implications and controversies.", *Cent Eur J Immunol.*, t. 47, nr 2, s. 168–174, cze. 2022, doi: 10.5114/ceji.2022.117376.
- [128] A. Cerwenka i L. Lanier, "Natural killer cell memory in infection, inflammation and cancer.", Nat Rev Immunol., t. 16, nr 2, s. 112–23, luty 2016, doi: 10.1038/nri.2015.9.
- [129] S. Wu, T. Fu, Y. Jiang, i Z. Shao, "Natural killer cells in cancer biology and therapy.", *Mol Cancer.*, t. 19, nr 1, s. 120, sie. 2020, doi: 10.1186/s12943-020-01238-x.
- [130] A. Freud, B. Mundy-Bosse, J. Yu, i M. Caligiuri, "The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity.", *Immunity.*, t. 47, nr 5, s. 820–833, lis. 2017, doi: 10.1016/j.immuni.2017.10.008.
- [131] F. Cichocki, B. Grzywacz, i J. Miller, "Human NK Cell Development: One Road or Many?", Front Immunol., t. 10, s. 2078, Ayg 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.02078.
- [132] G. Ran *i in.*, "Natural killer cell homing and trafficking in tissues and tumors: from biology to application.", *Signal Transduct Target Ther.*, t. 7, nr 1, s. 205, cze. 2022, doi: 10.1038/s41392-022-01058-z.
- [133] A. Horowitz, K. Stegmann, i E. Riley, "Activation of natural killer cells during microbial infections.", *Front Immunol.*, t. 2, s. 88, sty. 2012, doi: 10.3389/fimmu.2011.00088.
- [134] J. Myers i J. Miller, "Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy.", t. 18, nr 2, s. 85–100, luty 2021, doi: 10.1038/s41571-020-0426-7.

- [135] N. Liao, M. Bix, M. Zijlstra, R. Jaenisch, i D. Raulet, "MHC class I deficiency: susceptibility to natural killer (NK) cells and impaired NK activity.", *Science.*, t. 253, nr 5016, s. 199–202, lip. 1991, doi: 10.1126/science.1853205.
- [136] I. Voskoboinik, M. Smyth, i J. Trapani, "Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis.", *Nat Rev Immunol.*, t. 6, nr 12, s. 940–52, grudz. 2006, doi: 10.1038/nri1983.
- [137] H. Gonzalez, C. Hagerling, i Z. Werb, "Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression.", *Genes Dev.*, t. 32, nr 19–20, s. 1267–1284, paź. 2018, doi: 10.1101/gad.314617.118.
- [138] K. Alderson i P. Sondel, "Clinical cancer therapy by NK cells via antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity.", *J Biomed Biotechnol.*, t. 2011, s. 379123, 2011, doi: 10.1155/2011/379123.
- P. Gannon, A. Poisson, N. Delvoye, R. Lapointe, A. Mes-Masson, i F. Saad, "Characterization of the intraprostatic immune cell infiltration in androgen-deprived prostate cancer patients.", *J Immunol Methods.*, t. 348, nr 1–2, s. 9–7, sie. 2009, doi: 10.1016/j.jim.2009.06.004.
- [140] M. Ascierto *i in.*, "Molecular signatures mostly associated with NK cells are predictive of relapse free survival in breast cancer patients.", *J Transl Med.*, t. 11, s. 145, cze. 2013, doi: 10.1186/1479-5876-11-145.
- [141] J. Cursons *i in.*, "A Gene Signature Predicting Natural Killer Cell Infiltration and Improved Survival in Melanoma Patients.", *Cancer Immunol Res.*, t. 7, nr 7, s. 1162–1174, lip. 2019, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0500.
- [142] Y. Tang, M. Xie, K. Li, Z. Cai, i B. Hu, "Prognostic value of peripheral blood natural killer cells in colorectal cancer", *BMC Gastroenterol.*, t. 20, nr 1, s. 31, luty 2020, doi: 10.1186/s12876-020-1177-8.
- [143] J. Moscarelli, D. Zahavi, R. Maynard, i L. Weiner, "The Next Generation of Cellular Immunotherapy: Chimeric Antigen Receptor-Natural Killer Cells.", *Transplant Cell Ther.*, t. 28, nr 10, s. 650–656, paź. 2022, doi: 10.1016/j.jtct.2022.06.025.
- [144] H. Klingemann, "The NK-92 cell line-30 years later: its impact on natural killer cell research and treatment of cancer.", Cytotherapy., t. 25, nr 5, s. 451–457, maj 2023, doi: 10.1016/j.jcyt.2022.12.003.
- [145] A. ISAACS i J. LINDENMANN, "Virus interference. I. The interference", Proc R Soc Lond B Biol Sci., t. 147, nr 927, s. 258–67, wrz. 1957, doi: 10.1098/rspb.1957.0048.
- [146] H. Negishi, T. Taniguchi, i H. Yanai, "Interferon (IFN) Class of Cytokines and the IFN Regulatory Factor (IRF) Transcription Factor Family.", *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, t. 10, nr 11, s. a028423, lis. 2018, doi: 10.1101/cshperspect.a028423.
- [147] X. Hu, J. Li, M. Fu, X. Zhao, i W. Wang, "The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic.", Signal Transduct Target Ther., t. 6, nr 1, s. 402, lis. 2021, doi: 10.1038/s41392-021-00791-1.
- [148] H. Cheon, Y. Wang, S. Wightman, M. Jackson, i G. Stark, "How cancer cells make and respond to interferon-I.", *Trends Cancer.*, t. 9, nr 1, s. 83–92, sty. 2023, doi: 10.1016/j.trecan.2022.09.003.
- [149] B. Łasut-Szyszka *i in.*, "Transcriptomic and proteomic study of cancer cell lines exposed to actinomycin D and nutlin-3a reveals numerous, novel candidates for p53-regulated genes.", *Chem Biol Interact.*, t. 392, s. 110946, kwi. 2024, doi: 10.1016/j.cbi.2024.110946.
- [150] Z. Sondka *i in.*, "COSMIC: a curated database of somatic variants and clinical data for cancer.", *Nucleic Acids Res.*, t. 52, nr D1, s. D1210–D1217, sty. 2024, doi: 10.1093/nar/gkad986.
- [151] Y. Xu i Z. Li, "CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy.", *Comput Struct Biotechnol J.*, t. 18, s. 2401–2415, wrz. 2020, doi: 10.1016/j.csbj.2020.08.031.
- [152] S. Oki *i in.*, "ChIP-Atlas: a data-mining suite powered by full integration of public ChIP-seq data.", *EMBO Rep.*, t. 19, nr 12, s. e46255, 2018, doi: 10.15252/embr.201846255.
- [153] Z. Zou, T. Ohta, F. Miura, i S. Oki, "ChIP-Atlas 2021 update: a data-mining suite for exploring epigenomic landscapes by fully integrating ChIP-seq, ATAC-seq and Bisulfite-seq data.", *Nucleic Acids Res.*, t. 50, nr W1, s. W175–W182, 2022, doi: 10.1093/nar/gkac199.
- [154] R. Słomski, Analiza DNA. Teoria i praktyka, 1. wyd. 2011.
- [155] B. Łasut-Szyszka *i in.*, "Transcriptomic and proteomic study of cancer cell lines exposed to actinomycin D and nutlin-3a reveals numerous, novel candidates for p53-regulated genes.", *Chem Biol Interact.*, t. 392, s. 110946, kwi. 2024.

- [156] X. Ren, W. Shan, L. Wei, C. Gong, i D. Pei, "ACP5: Its Structure, Distribution, Regulation and Novel Functions.", *Anticancer Agents Med Chem.*, t. 18, nr 8, s. 1082–1090, 2018.
- [157] Y. Lv *i in.*, "Intratumor APOL3 delineates a distinctive immunogenic ferroptosis subset with prognosis prediction in colorectal cancer.", *Cancer Sci.*, t. 115, nr 1, s. 257–269, sty. 2024, doi: 10.1111/cas.16009.
- [158] R. Gaudet *i in.*, "A human apolipoprotein L with detergent-like activity kills intracellular pathogens.", *Science.*, t. 373, nr 6552, s. eabf8113, lip. 2021, doi: 10.1126/science.abf8113.
- [159] A. Naderi, J. Liu, i I. Bennett, "BEX2 regulates mitochondrial apoptosis and G1 cell cycle in breast cancer.", Int J Cancer., t. 126, nr 7, s. 1596–610, kwi. 2010, doi: 10.1002/ijc.24866.
- [160] Q. Meng *i in.*, "Bex2 controls proliferation of human glioblastoma cells through NF-κB signaling pathway.", *J Mol Neurosci.*, t. 53, nr 2, s. 262–70, cze. 2014, doi: 10.1007/s12031-013-0215-1.
- [161] Y. Zhou, W. Shi, D. Zhao, S. Xiao, K. Wang, i J. Wang, "Identification of Immune-Associated Genes in Diagnosing Aortic Valve Calcification With Metabolic Syndrome by Integrated Bioinformatics Analysis and Machine Learning.", *Front Immunol.*, t. 13, s. 937886, lip. 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.937886.
- [162] F. Li *i in.*, "BAR Domain-Containing FAM92 Proteins Interact with Chibby1 To Facilitate Ciliogenesis.", *Mol Cell Biol.*, t. 36, nr 21, s. 2668–2680, paź. 2016, doi: 10.1128/MCB.00160-16.
- [163] J. Binder *i in.*, "Machine learning prediction and tau-based screening identifies potential Alzheimer's disease genes relevant to immunity.", *Commun Biol.*, t. 5, nr 1, s. 125, luty 2022, doi: 10.1038/s42003-022-03068-7.
- [164] A. Gyöngyösi *i in.*, "DH10, RALDH2, and CRABP2 are required components of PPARγ-directed ATRA synthesis and signaling in human dendritic cells.", *J Lipid Res.*, t. 54, nr 9, s. 2458–74, wrz. 2013, doi: 10.1194/jlr.M038984.
- [165] Y. Liu, J. Du, J. Li, X. Tan, i Q. Zhang, "CTHRC1, a novel gene with multiple functions in physiology, disease and solid tumors (Review).", Oncol Lett., t. 25, nr 6, s. 266, maj 2023, doi: 10.3892/ol.2023.13852.
- [166] J. Geginat *i in.*, "Eomesodermin-expressing type 1 regulatory (EOMES+Tr1)-like T cells: Basic biology and role in immune-mediated diseases.", *Eur J Immunol.*, t. 53, nr 5, s. e2149775, maj 2023, doi: 10.1002/eji.202149775.
- [167] M. Ogasa *i in.*, "Gastrin activates nuclear factor kappaB (NFkappaB) through a protein kinase C dependent pathway involving NFkappaB inducing kinase, inhibitor kappaB (IkappaB) kinase, and tumour necrosis factor receptor associated factor 6 (TRAF6) in MKN-28 cells transfected with gastrin receptor.", *Gut.*, t. 52, nr 6, s. 8113–9, cze. 2003, doi: 10.1136/gut.52.6.813.
- [168] X. Qian, K. Agematsu, G. Freeman, Y. Tagawa, K. Sugane, i T. Hayashi, "The ICOS-ligand B7-H2, expressed on human type II alveolar epithelial cells, plays a role in the pulmonary host defense system.", *Eur J Immunol.*, t. 36, nr 4, s. 906–18, kwi. 2006, doi: 10.1002/eji.200535253.
- [169] K. Kaufmann *i in.*, "A stemness screen reveals C3orf54/INKA1 as a promoter of human leukemia stem cell latency.", *Blood.*, t. 133, nr 20, s. 2198–2211, maj 2019, doi: 0.1182/blood-2018-10-881441.
- [170] N. Gnesutta i A. Minden, "Death receptor-induced activation of initiator caspase 8 is antagonized by serine/threonine kinase PAK4.", *Mol Cell Biol.*, t. 23, nr 21, s. 7838–48, lis. 2003, doi: 10.1128/MCB.23.21.7838-7848.2003.
- [171] P. Orning i E. Lien, "Multiple roles of caspase-8 in cell death, inflammation, and innate immunity.", J Leukoc Biol., t. 109, nr 1, s. 121–141, sty. 2021, doi: 10.1002/JLB.3MR0420-305R.
- [172] A. Di *i in.*, "The TWIK2 Potassium Efflux Channel in Macrophages Mediates NLRP3 Inflammasome-Induced Inflammation.", *Immunity.*, t. 49, nr 1, s. 56-65.e4, Ju 2018, doi: 10.1016/j.immuni.2018.04.032.
- [173] P. Zhang, Y. Lu, K. Wang, H. AN, i Y. Tan, "Genome-wide DNA methylation analysis in schizophrenia with tardive dyskinesia: a preliminary study.", *Genes Genomics.*, t. 45, nr 10, s. 1317–1328, paź. 2023, doi: 10.1007/s13258-023-01414-5.
- [174] Y. Ito *i in.*, "Killer cell lectin-like receptor G2 facilitates aggressive phenotypes of gastric cancer cells via dual activation of the ERK1/2 and JAK/STAT pathways.", *Gastric Cancer.*, t. 27, nr 3, s. 506–518, maj 2024, doi: 10.1007/s10120-024-01480-y.
- [175] Y. Li, Z. Wu, L. Tang, i F. Ouyang, "LACC1: A critical involvement in macrophage immunometabolism.", *Cell Biol Int.*, t. 47, nr 9, s. 1488–1490, wrz. 2023, doi: 10.1002/cbin.12063.
- [176] M. Hamada, Y. Tsunakawa, H. Jeon, M. Yadav, i S. Takahashi, "Role of MafB in macrophages.", *Exp* Anim., t. 69, nr 1, s. 1–10, sty. 2020, doi: 10.1538/expanim.19-0076.

- [177] C. Brandt *i in.*, "The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans.", *JExp Med.*, t. 206, nr 7, s. 1495–503, lip. 2009, doi: 10.1084/jem.20090681.
- [178] X. Zhuang, D. Veltri, i E. Long, "Genome-Wide CRISPR Screen Reveals Cancer Cell Resistance to NK Cells Induced by NK-Derived IFN-γ.", *Front Immunol.*, t. 10, s. 2879, grudz. 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.02879.
- [179] V. Melotte *i in.*, "N-Myc downstream-regulated gene 4 (NDRG4): a candidate tumor suppressor gene and potential biomarker for colorectal cancer.", *J Natl Cancer Inst.*, t. 101, nr 13, s. 916–27, lip. 2009, doi: 10.1093/jnci/djp131.
- [180] X. Chen *i in.*, "Correction: OTUD1 Regulates Antifungal Innate Immunity through Deubiquitination of CARD9.", *J Immunol.*, t. 208, nr 5, s. 1305–1306, mar. 2022, doi: 10.4049/jimmunol.2101063.
- [181] H. Takahashi *i in.*, "OTUD1 deubiquitinase regulates NF-κB- and KEAP1-mediated inflammatory responses and reactive oxygen species-associated cell death pathways.", *Cell Death Dis.*, t. 13, nr 8, s. 694, sie. 2022, doi: 10.4049/jimmunol.2101063.
- [182] M. Koga, B. Bizzarro, A. Sá-Nunes, F. Rios, i S. Jancar, "Boosting Adaptive Immunity: A New Role for PAFR Antagonists.", *Sci Rep.*, t. 6, s. 39146, grudz. 2016, doi: 10.1038/srep39146.
- [183] E. Chu, J. Wu, S. Kang, i Y. Kang, "SLAMF7 as a Promising Immunotherapeutic Target in Multiple Myeloma Treatments.", *Curr Oncol*, t. 30, nr 9, s. 7891–7903, sie. 2023, doi: 10.3390/curroncol30090573.
- [184] J. Kim, N. Horton, S. Mathew, i P. Mathew, "CS1 (SLAMF7) inhibits production of proinflammatory cytokines by activated monocytes.", t. 62, nr 8, s. 765–72, sie. 2013, doi: 10.1007/s00011-013-0632-1.
- [185] M. Steinberg, T. Cheung, i C. Ware, "The signaling networks of the herpesvirus entry mediator (TNFRSF14) in immune regulation.", *Immunol Rev.*, t. 244, nr 1, s. 169–87, lis. 2011, doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01064.x.
- [186] J. Shui i M. Kronenberg, "HVEM is a TNF Receptor with Multiple Regulatory Roles in the Mucosal Immune System.", *Immune Netw.*, t. 14, nr 2, s. 67–72, kwi. 2014, doi: 10.4110/in.2014.14.2.67.
- [187] P. Moore, T. Vo, i L. Carlock, "Identification and cloning of a brain autoantigen in neurobehavioral SLE.", *J Neuroimmunol.*, t. 82, nr 2, s. 116–25, mar. 1998, doi: 10.1016/s0165-5728(97)00157-4.
- [188] J. Lai *i in.*, "Impaired blood-brain barrier in the microbiota-gut-brain axis: Potential role of bipolar susceptibility gene TRANK1.", *J Cell Mol Med.*, t. 25, nr 14, s. 6463–6469, lip. 2021, doi: 10.1111/jcmm.16611.
- [189] L. Bingle *i in.*, "WFDC2 (HE4): a potential role in the innate immunity of the oral cavity and respiratory tract and the development of adenocarcinomas of the lung.", *Respir Res.*, t. 7, nr 1, s. 61, kwi. 2006, doi: 10.1186/1465-9921-7-61.
- [190] A. Watt, J. Sharp, C. Lefevre, i K. Nicholas, "WFDC2 is differentially expressed in the mammary gland of the tammar wallaby and provides immune protection to the mammary gland and the developing pouch young", *Dev Comp Immunol.*, t. 36, nr 3, s. 584–90, mar. 2012, doi: 10.1016/j.dci.2011.10.001.
- [191] A. Andrade *i in.*, "Lipopolysaccharide-induced epididymitis modifies the transcriptional profile of Wfdc genes in mice[†].", *Biol Reprod.*, t. 104, nr 1, s. 144–158, sty. 2021, doi: 10.1093/biolre/ioaa189.
- [192] L. Hung, J. Johnson, D. Christian, K. Herbine, C. Pastore, i D. Herbert, "Cell-Intrinsic Wnt4 Influences Conventional Dendritic Cell Fate Determination to Suppress Type 2 Immunity.", *J Immunol.*, t. 203, nr 2, s. 511–519, lip. 2019, doi: 10.4049/jimmunol.1900363.
- [193] Q. Zhang, Y. Pan, J. Ji, Y. Xu, Q. Zhang, i L. Qin, "Roles and action mechanisms of WNT4 in cell differentiation and human diseases: a review.", *Cell Death Discov.*, t. 7, nr 1, s. 287, paź. 2021, doi: 10.1038/s41420-021-00668-w.
- [194] K. Sullivan, M. Galbraith, Z. Andrysik, i J. Espinosa, "Mechanisms of transcriptional regulation by p53", *Cell Death Differ.*, t. 25, nr 1, s. 133–143, sty. 2018, doi: 10.1038/cdd.2017.174.
- [195] S. Powers *i in.*, "Differential Expression of LLT1, SLAM Receptors CS1 and 2B4 and NCR Receptors NKp46 and NKp30 in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL).", *Int J Mol Sci.*, t. 24, nr 4, s. 3860, luty 2023, doi: 10.3390/ijms24043860.
- [196] A. Gutierrez-Guerrero, I. Mancilla-Herrera, J. Maravillas-Montero, I. Martinez-Duncker, A. Veillette, i M. Cruz-Munoz, "SLAMF7 selectively favors degranulation to promote cytotoxicity in human NK cells.", *Eur J Immunol.*, t. 52, nr 1, s. 62–74, sty. 2022, doi: 10.1002/eji.202149406.

- [197] M. Cruz-Munoz, Z. Dong, X. Shi, S. Zhang, i A. Veillette, "Influence of CRACC, a SLAM family receptor coupled to the adaptor EAT-2, on natural killer cell function.", *Nat Immunol.*, t. 10, nr 3, s. 297–305, mar. 2009, doi: 10.1038/ni.1693.
- [198] B. Łasut-Szyszka, A. Gdowicz-Kłosok, M. Krześniak, M. Głowala-Kosińska, A. Będzińska, i M. Rusin, "Strong Activation of p53 by Actinomycin D and Nutlin-3a Overcomes Resistance of Cancer Cells to the Pro-apoptotic Activity of FAS Ligand.", *Preprints*, t. 2023101608, 2023, doi: 10.20944/preprints202310.1608.v1.
- [199] D. Li *i in.*, "Protein serine/threonine phosphatase-1 dephosphorylates p53 at Ser-15 and Ser-37 to modulate its transcriptional and apoptotic activities.", *Oncogene.*, t. 25, nr 21, s. 3006–22, maj 2006, doi: 10.1038/sj.onc.1209334.
- [200] M. Fischer, R. Schwarz, K. Riege, J. DeCaprio, i S. Hoffmann, "TargetGeneReg 2.0: a comprehensive web-atlas for p53, p63, and cell cycle-dependent gene regulation.", *NAR Cancer.*, t. 4, nr 1, s. zcac009, mar. 2022, doi: 10.1093/narcan/zcac009.
- [201] H. Zhou, X. Cui, H. Yuan, B. Zhang, C. Meng, i D. Zhao, "Effects of distinct drugs on gene transcription in an osteosarcoma cell line.", t. 14, nr 4, s. 4694–4700, paź. 2017, doi: 10.3892/ol.2017.6767.
- [202] H. Guo, M. Cruz-Munoz, N. Wu, M. Robbins, i A. Veillette, "Immune cell inhibition by SLAMF7 is mediated by a mechanism requiring src kinases, CD45, and SHIP-1 that is defective in multiple myeloma cells.", *Mol Cell Biol.*, t. 35, nr 1, s. 41–51, sty. 2015, doi: 10.1128/MCB.01107-14.
- [203] U. Choe, Q. Pham, Y. Kim, L. Yu, i T. Wang, "Identification and elucidation of cross talk between SLAM Family Member 7 (SLAMF7) and Toll-like receptor (TLR) pathways in monocytes and macrophages.", *Sci Rep.*, t. 13, nr 1, s. 11007, lip. 2023, doi: 10.1038/s41598-023-37040-0.
- [204] J. Kikuchi *i in.*, "Soluble SLAMF7 promotes the growth of myeloma cells via homophilic interaction with surface SLAMF7.", *Leukemia.*, t. 34, nr 1, s. 180–195, sty. 2020, doi: 10.1038/s41375-019-0525-6.
- [205] M. Ishibashi *i in.*, "Clinical impact of serum soluble SLAMF7 in multiple myeloma.", Oncotarget., t. 9, nr 78, s. 34784–34793, paź. 2018, doi: 10.18632/oncotarget.26196.
- [206] M. Taniwaki, M. Yoshida, Y. Matsumoto, K. Shimura, J. Kuroda, i H. Kaneko, "Elotuzumab for the Treatment of Relapsed or Refractory Multiple Myeloma, with Special Reference to its Modes of Action and SLAMF7 Signaling.", *Mediterr J Hematol Infect Dis.*, t. 10, nr 1, s. e2018014, luty 2018, doi: 10.4084/MJHID.2018.014.
- [207] Y. Tai *i in.*, "Anti-CS1 humanized monoclonal antibody HuLuc63 inhibits myeloma cell adhesion and induces antibody-dependent cellular cytotoxicity in the bone marrow milieu.", *Blood.*, t. 112, nr 4, s. 1329–37, sie. 2008, doi: 10.1182/blood-2007-08-107292.
- [208] S. Collins *i in.*, "Elotuzumab directly enhances NK cell cytotoxicity against myeloma via CS1 ligation: evidence for augmented NK cell function complementing ADCC.", *Cancer Immunol Immunother.*, t. 62, nr 12, s. 1841–9, grudz. 2013, doi: 10.1007/s00262-013-1493-8.
- [209] J. Chen *i in.*, "SLAMF7 is critical for phagocytosis of haematopoietic tumour cells via Mac-1 integrin.", *Nature.*, t. 544, nr 7651, s. 493–497, kwi. 2017, doi: 10.1038/nature22076.
- [210] A. Kurdi *i in.*, "Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis by Macrophages is a Novel Mechanism of Action of Elotuzumab.", *Mol Cancer Ther.*, t. 17, nr 7, s. 1454–1463, lip. 2018, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0998.
- [211] Y. He *i in.*, "Cancer cell-expressed SLAMF7 is not required for CD47-mediated phagocytosis.", *Nat Commun.*, t. 10, nr 1, s. 533, luty 2019, doi: 10.1038/s41467-018-08013-z.
- [212] A. Zingoni, C. Fionda, C. Borrelli, M. Cippitelli, A. Santoni, i A. Soriani, "Natural Killer Cell Response to Chemotherapy-Stressed Cancer Cells: Role in Tumor Immunosurveillance.", *Front Immunol.*, t. 8, s. 1194, wrz. 2017, doi: 10.3389/fimmu.2017.01194.
- [213] N. Kampan, M. Madondo, O. McNally, M. Quinn, i M. Plebanski, "Paclitaxel and Its Evolving Role in the Management of Ovarian Cancer.", *Biomed Res Int.*, t. 2015, s. 413076, 2015, doi: 10.1155/2015/413076.
- [214] A. Montecucco, F. Zanetta, i G. Biamonti, "Molecular mechanisms of etoposide.", EXCLI J., t. 14, s. 95– 108, sty. 2015, doi: 10.17179/excli2015-561.
- [215] S. Dasari i P. Tchounwou, "Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action.", Eur J Pharmacol., t. 740, s. 364–78, paź. 2014, doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025.

- [216] M. Kubo *i in.*, "Paclitaxel probably enhances cytotoxicity of natural killer cells against breast carcinoma cells by increasing perforin production.", *Cancer Immunol Immunother.*, t. 54, nr 5, s. 468–76, maj 2005, doi: 10.1007/s00262-004-0617-6.
- [217] Y. Wu *i in.*, "SLAMF7 regulates the inflammatory response in macrophages during polymicrobial sepsis.", *J Clin Invest.*, t. 133, nr 6, s. e150224, mar. 2023, doi: 10.1172/JCI150224.
- [218] D. Simmons *i in.*, "SLAMF7 engagement superactivates macrophages in acute and chronic inflammation.", *Sci Immunol.*, t. 7, nr 68, s. eabf2846, luty 2022, doi: 10.1126/sciimmunol.abf2846.
- [219] S. Wang *i in.*, "Deglycosylation of SLAMF7 in breast cancers enhances phagocytosis.", Am J Cancer Res., t. 12, nr 10, s. 4721–4736, paź. 2022.
- [220] L. von Wenserski *i in.*, "SLAMF receptors negatively regulate B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia via recruitment of prohibitin-2.", *Leukemia.*, t. 35, nr 4, s. 1073–1086, kwi. 2021, doi: 0.1038/s41375-020-01025-z.
- [221] K. Akagi *i in.*, "Genome-wide analysis of HPV integration in human cancers reveals recurrent, focal genomic instability.", *Genome Res.*, t. 24, nr 2, s. 185–99, luty 2014, doi: 10.1101/gr.164806.113.
- [222] M. Assidi, "Strong prognostic value of SLAMF7 protein expression in patients with lymph nodepositive breast cancer.", *Oncol Lett.*, t. 24, nr 6, s. 433, paź. 2022, doi: 10.3892/ol.2022.13553.
- [223] B. Belkahla *i in.*, "The metabolism of cells regulates their sensitivity to NK cells depending on p53 status.", *Sci Rep.*, t. 12, nr 1, s. 3234, luty 2022, doi: 10.1038/s41598-022-07281-6.
- [224] A. Bouças, S. Oliveira Fdos, L. Canani, i D. Crispim, "The role of interferon induced with helicase C domain 1 (IFIH1) in the development of type 1 diabetes mellitus.", *Arq Bras Endocrinol Metabol.*, t. 57, nr 9, s. 667–76, grudz. 2013, doi: 10.1590/s0004-27302013000900001.
- [225] S. John *i in.*, "IFIT1 Exerts Opposing Regulatory Effects on the Inflammatory and Interferon Gene Programs in LPS-Activated Human Macrophages.", *Cell Rep.*, t. 25, nr 1, s. 95-106.e6, paź. 2018, doi: 10.1016/j.celrep.2018.09.002.
- [226] W. Zhang *i in.*, "The emerging roles of IFIT3 in antiviral innate immunity and cellular biology.", *J Med Virol.*, t. 95, nr 1, s. e28259, sty. 2023, doi: 10.1002/jmv.28259.
- [227] C. Yang *i in.*, "Heterogeneity of human bone marrow and blood natural killer cells defined by single-cell transcriptome.", *Nat Commun.*, t. 20, nr 1, s. 3931, wrz. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-11947-7.
- [228] H. Arase, N. Arase, i T. Saito, "Interferon gamma production by natural killer (NK) cells and NK1.1+ T cells upon NKR-P1 cross-linking.", *J Exp Med.*, t. 183, nr 5, s. 2391–6, maj 1996, doi: 10.1084/jem.183.5.2391.
- [229] D. Gotthardt, J. Trifinopoulos, V. Exl, i E. Putz, "JAK/STAT Cytokine Signaling at the Crossroad of NK Cell Development and Maturation.", *Front Immunol.*, t. 10, s. 2590, lis. 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.02590.
- [230] M. Arias, E. Galvez, i J. Pardo, "All About (NK Cell-Mediated) Death in Two Acts and an Unexpected Encore: Initiation, Execution and Activation of Adaptive Immunity.", *Front Immunol.*, t. 13, s. 896228, maj 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.896228.
- [231] J. Belizário, J. Neyre, i M. Setúbal Destro Rodrigues, "When and how NK cell-induced programmed cell death benefits immunological protection against intracellular pathogen infection.", *Innate Immun.*, t. 24, nr 8, s. 452–465, lis. 2018, doi: 10.1177/1753425918800200.
- [232] V. Tisato, A. Norcio, C. Celeghini, D. Milani, A. Gonelli, i P. Secchiero, "Upregulation of SOCS-1 by Nutlin-3 in acute myeloid leukemia cells but not in primary normal cells.", *Clinics (Sao Paulo)*, t. 69, nr 1, s. 68–74, sty. 2014, doi: 10.6061/clinics/2014(01)10.
- [233] V. Cheriyath, D. Leaman, i E. Borden, "Emerging roles of FAM14 family members (G1P3/ISG 6-16 and ISG12/IFI27) in innate immunity and cancer.", *J Interferon Cytokine Res.*, t. 31, nr 1, s. 173–81, sty. 2011, doi: 10.1089/jir.2010.0105.
- [234] B. Wang, T. Lam, M. Soh, Z. Ye, J. Chen, i E. Ren, "Influenza A Virus Facilitates Its Infectivity by Activating p53 to Inhibit the Expression of Interferon-Induced Transmembrane Proteins.", *Front Immunol.*, t. 9, s. 1193, maj 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.01193.
- [235] M. Kaplan, "STAT signaling in inflammation", JAKSTAT., t. 2, nr 1, s. e24198, sty. 2013, doi: 10.4161/jkst.24198.
- [236] M. Tolomeo, A. Cavalli, i A. Cascio, "STAT1 and Its Crucial Role in the Control of Viral Infections", Int J Mol Sci., t. 23, nr 8, s. 4095, kwi. 2022, doi: 10.3390/ijms23084095.

- [237] H. Ho i L. Ivashkiv, "Role of STAT3 in type I interferon responses. Negative regulation of STAT1-dependent inflammatory gene activation.", *J Biol Chem.*, t. 281, nr 20, s. 14111–8, maj 2006, doi: 10.1074/jbc.M511797200.
- [238] N. Cuesta, Q. Nhu, E. Zudaire, S. Polumuri, F. Cuttitta, i S. Vogel, "IFN regulatory factor-2 regulates macrophage apoptosis through a STAT1/3- and caspase-1-dependent mechanism.", *J Immunol.*, t. 178, nr 6, s. 3602–11, mar. 2007, doi: 10.4049/jimmunol.178.6.3602.
- [239] Y. Chin, M. Kitagawa, K. Kuida, R. Flavell, i X. Fu, "Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis.", *Mol Cell Biol.*, t. 17, nr 9, s. 5328–37, wrz. 1997, doi: 10.1128/MCB.17.9.5328.
- [240] A. Stephanou *i in.*, "Induction of apoptosis and Fas receptor/Fas ligand expression by ischemia/reperfusion in cardiac myocytes requires serine 727 of the STAT-1 transcription factor but not tyrosine 701.", *J Biol Chem.*, t. 276, nr 30, s. 27340–7, lip. 2001, doi: 10.1074/jbc.M101177200.
- [241] P. Kovarik *i in.*, "Stress-induced phosphorylation of STAT1 at Ser727 requires p38 mitogen-activated protein kinase whereas IFN-gamma uses a different signaling pathway.", t. 96, nr 24, s. 13956–51, doi: 10.1073/pnas.96.24.13956.
- [242] A. Sekrecka *i in.*, "Time-dependent recruitment of GAF, ISGF3 and IRF1 complexes shapes IFNα and IFNγ-activated transcriptional responses and explains mechanistic and functional overlap.", *Cell Mol Life Sci.*, t. 80, nr 7, s. 187, cze. 2023, doi: 10.1007/s00018-023-04830-8.
- [243] L. Song, F. Alimirah, R. Panchanathan, H. Xin, i D. Choubey, "Expression of an IFN-inducible cellular senescence gene, IFI16, is up-regulated by p53.", *Mol Cancer Res.*, t. 6, nr 11, s. 1732–41, lis. 2008, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-08-0208.
- [244] J. Trapani *i in.*, "A novel gene constitutively expressed in human lymphoid cells is inducible with interferon-gamma in myeloid cells.", *Immunogenetics.*, t. 36, nr 6, s. 369–76, 1992, doi: 10.1007/BF00218044.
- [245] M. Martini *i in.*, "IFN-gamma-mediated upmodulation of MHC class I expression activates tumor-specific immune response in a mouse model of prostate cancer.", *Vaccine.*, t. 28, nr 20, s. 3548–57, kwi. 2010, doi: 10.1016/j.vaccine.2010.03.007.
- [246] M. Braun i T. Iwakuma, "Regulation of cytotoxic T-cell responses by p53 in cancer.", *Transl Cancer Res.*, t. 5, nr 6, s. 692–697, grudz. 2016, doi: 10.21037/tcr.2016.11.76.
- [247] B. Harvati, P. Seth, i A. Jetten, "The role of p27Kip1 in gamma interferon-mediated growth arrest of mammary epithelial cells and related defects in mammary carcinoma cells.", t. 14, nr 17, s. 2111–22, maj 1997, doi: 10.1038/sj.onc.1201055.
- [248] K. Mowen i M. David, "Regulation of STAT1 nuclear export by Jak1.", *Mol Cell Biol.*, t. 20, nr 19, s. 7273–81, paź. 2000, doi: 10.1128/MCB.20.19.7273-7281.2000.
- [249] I. Sadzak *i in.*, "Recruitment of Stat1 to chromatin is required for interferon-induced serine phosphorylation of Stat1 transactivation domain.", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, t. 105, nr 26, s. 8944–9, lip. 2008, doi: 10.1073/pnas.0801794105.
- [250] E. Abril *i in.*, "Unresponsiveness to interferon associated with STAT1 protein deficiency in a gastric adenocarcinoma cell line.", *Cancer Immunol Immunother.*, t. 47, nr 2, s. 113–20, paź. 1998, doi: 10.1007/s002620050511.
- [251] M. Molla, Y. Akalu, Z. Geto, B. Dagnew, B. Ayelign, i T. Shibabaw, "Role of Caspase-1 in the Pathogenesis of Inflammatory-Associated Chronic Noncommunicable Diseases.", *J Inflamm Res.*, t. 13, s. 749– 764, paź. 2020, doi: 10.2147/JIR.S277457.
- [252] H. Feng, Y. Zhang, J. Gui, S. Lemon, i D. Yamane, "Interferon regulatory factor 1 (IRF1) and anti-pathogen innate immune responses.", *PLoS Pathog.*, t. 17, nr 1, s. e1009220, sty. 2021, doi: 10.1371/journal.ppat.1009220.
- [253] C. Horvath, Z. Wen, i J. J. Darnell, "A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain.", *Genes Dev.*, t. 9, nr 8, s. 984–94, kwi. 1995, doi: 10.1101/gad.9.8.984.
- [254] A. Forero *i in.*, "Transcription Factor IRF1 Underlies the Distinct Immune Responses Elicited by Type I and Type III Interferons.", *Immunity.*, t. 51, nr 3, s. 451–464, wrz. 2019, doi: 10.1016/j.immuni.2019.07.007.

- [255] R. Weichselbaum *i in.*, "An interferon-related gene signature for DNA damage resistance is a predictive marker for chemotherapy and radiation for breast cancer.", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, t. 105, nr 47, s. 18490–5, lis. 2008, doi: 10.1073/pnas.0809242105.
- [256] I. Aparici-Herraiz *i in.*, "IRF1 Is Required for MDA5 (IFIH1) Induction by IFN-α, LPS, and poly(I:C) in Murine Macrophages.", *J Innate Immun.*, t. 15, nr 1, s. 297–316, 2023, doi: 10.1159/000527008.
- [257] D. Jorgovanovic, M. Song, L. Wang, i Y. Zhang, "Roles of IFN-γ in tumor progression and regression: a review", *Biomark Res.*, t. 8, s. 49, wrz. 2020, doi: 10.1186/s40364-020-00228-x.
- [258] X. Xu, X. Fu, J. Plate, i A. Chong, "IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression.", *Cancer Res.*, t. 58, nr 13, s. 2832–7, lip. 1998.
- [259] D. Rosner *i in.*, "Interferon-gamma induces Fas trafficking and sensitization to apoptosis in vascular smooth muscle cells via a PI3K- and Akt-dependent mechanism.", *Am J Pathol.*, t. 168, nr 6, s. 2054–63, cze. 2006, doi: 10.2353/ajpath.2006.050473.

VIII. Spis rycin i tabeli

Spis rycin:

Ryc. 1. Cechy komórki nowotworowej (Hallmarks of cancer). Opracowanie własne na podstawie publikacji [12], [13], [14] w BioRender
Ryc. 2. Kalendarium wybranych postępów w badaniach nad białkiem p53. Opracowanie własne na podstawie publikacji [57] w programie BioRender
Ryc. 3. Wybrane charakterystyczne cechy białka p53. Opis znajduje się w tekście. Wykonanie własne za pomocą BioRender na podstawie publikacji [57], [71]
Ryc. 4. Schemat działania mieszaniny AN, opis znajduje się w tekście poniżej. Wykonanie własne za pomocą programu BioRender, na podstawie: [117]
Ryc. 5. Mechanizm immunoredagowania nowotworu. Opis znajduje się w tekście powyżej. Wykonanie własne za pomoca program BioRender, na podstawie [125]
Ryc. 6. Subpopulacje komórek NK we krwi człowieka: mniej dojrzałe CD56 ^{BRIGHT} CD16 ^{+/-} oraz w pełni dojrzała CD56 ^{DIM} CD16 ⁺ . W nawiasach zaznaczono cząsteczki powierzchniowe o małej ekspresji i cytokiny wydzielane w mały ilościach. Opracowanie własne. Wykonane w programie BioRender na podstawie publikacji: [125], [130].
Ryc. 7. Dojrzewanie komórek NK. Opracowanie własne wykonane w programie BioRender, na podstawie źródeł: [132], [133]
Ryc. 8. Model aktywacji cytotoksycznych funkcji komórek NK w zależności od przewagi sygnałów z receptorów – hamujących lub aktywujących. (A) Kiedy dominuje ekspresja receptorów hamujących komórka docelowa zostaje oszczędzona, ponieważ nie dochodzi do aktywacji cytotoksycznych właściwości komórek NK. (B) Jednak kiedy komórka docelowa ulegnie infekcji, bądź transformacji - wówczas przeważają sygnały aktywujące - dochodzi do uwolnienia cytokin przez komórki NK i eliminacji komórki docelowej. (C) Natomiast, kiedy ligandy MHC klasy I receptorów ulegają obniżeniu, co często występuje w komórkach nowotworowych dochodzi do utraty sygnałów hamujących i komórki NK mogą wyeliminować komórkę docelową. Wykonanie własne w programie BioRender na podstawie publikacji: [134]
Ryc. 12. Graficzne przedstawienie testu MTS w ko-kulturach komórek nowotworowych z komórkami NK-92. Wykonanie własne w programie BioRender Na schemacie płytki 96- oraz 6-dołkowej przerywaną linią oznaczono miejsca, w których hodowano komórki nowotworowe, natomiast ciągła czerwona linia oznacza dołki, w których zakładano ko-kultury (do komórek nowotworowych dodawano komórki NK-92)
Ryc. 13. Graficzne przedstawienie eksperymentu analizy aktywacji szlaku IFN-γ w współhodowlach (ko- kulturach) komórek nowotworowych z komórkami NK-92. Opis schematu znajduje się w tekście poniżej. Wykonanie własne za pomocą programu BioRender
Kyc. 14. Ocena skuteczności wyciszenia ekspresji genu TP53 w liniach: U-2 OS, A549 oraz NCI-H460; wykonana techniką Western Blottingu. Zredukowaną ekspresję genu TP53 uzyskano metodą CRISPR/Cas9. Kontrolą wewnętrzną eksperymentów są białka HSC70. Komórki CRISPR-Con (linia komórkowa, w której zastosowano procedurę kontrolną) oraz CRISPR-p53 (linia komórkowa ze zredukowaną ekspresją genu TP53), poddano działaniu DMSO (który jest rozpuszczalnikiem wszystkich substancji; stanowiący kontrolę), AN (mieszanina związków aktynomycyny D oraz nutliny-3a) oraz CPT (kamptotecyna). Zarówno mieszanina AN jak i CPT posiadają zdolność aktywacji białka p53 w komórkach o dzikim statusie genu TP53

(KON) lub eksponowano je na mieszaniną AN lub kamptotecynę (CPT) przez 30h. Analizę ekspresji genów normalizowano względem ekspresji genu referencyjnego GAPDH......76 Ryc. 17. Analiza ekspresji wybranych genów linii NCI-H460 o dzikim statusie genu TP53 pod wpływem mieszaniny AN oraz CPT. Na rycinie przedstawiono względne zmiany w ekspresji genów po traktowaniu komórek mieszaniną AN oraz CPT w porównaniu do kontroli. Analizę ekspresji genów normalizowano względem ekspresji genu referencyjnego GAPDH......77 Ryc. 18. Analiza wybranej sekwencji wzmacniającej w genie SLAMF7 jako potencjalnego miejsce wiązanie białka p53. (A) Aktywacja egzogennej formy białka p53 z wykorzystanie ww. plazmidów w linii komórkowej U-2 OS. (B) oraz (C) aktywacja endogennej formy białka p53 w komórkach U-2 OS (B) oraz modyfikowanej linii U-2 OS z obniżoną ekspresją genu TP53 wraz z kontrolą (C). (D) Widok fragmentu genu SLAMF7 wygenerowany z użyciem przeglądarki genomowej (IGV), gdzie czerwony prostokąt przedstawia badane miejsce w sekwencji genu SLAMF7. Aby wybrać badane miejsce wiązania p53 w sekwencji genu wykorzystano publiczne dane (opisane w granatowym prostokącie), gdzie: MCF IR+Nutlina-3- oznacza linię komórkową MCF7 traktowaną promieniowaniem jonizującym (IR) i nutliną-3a (identyfikator próbki: SRX2924018); MCF7 Nutlina-3a - linia komórkowa MCF-7 traktowana nutliną-3a (identyfikator próbki: SRX2060922); SAOS2 p53 WT - linia komórkowa Saos-2 wykazującej nadekspresję białka p53 (identyfikator próbki: SRX016980), SAOS0 EE/RR linia komórkowa Saos-2 wykazującą ekspresję pary zmodyfikowanych cząsteczek p53 z silnym współdziałaniem wiązania monomerów p53 (identyfikator próbki: ERX181467) oraz TNFα - linia komórkowa SW480 poddana działaniu TNFα (identyfikator próbki: SRX4235879)......79 Ryc. 19. Analiza sklonowanego fragmentu w sekwencji intronowej w genie KLRG2 do oceny potencjalnego miejsca wiązania białka p53. (A) Aktywacja egzogennej formy białka p53 z wykorzystaniem wspomnianych plazmidów w linii komórkowej U-2 OS oraz aktywacja endogennej formy białka p53 w komórkach U-2 OS (B) oraz zmodyfikowanej linii U-2 OS z obniżoną ekspresją genu TP53 wraz z kontrolą (C). (D) Widok w przeglądarce genomej (IGV), gdzie czerwony prostokąt oznacza potencjalne miejsce wiązania białka p53 w sekwencji Rvc. 20. Analiza sklonowanego fragmentu sekwencji wzmacniajacej genu NCR3LG1 do oceny potencjalnego miejsca wiązania białka p53. (A) Aktywacja egzogennej formy białka p53 poprzez zastosowanie wcześniej wspomnianych plazmidów oraz (B) aktywacja endogennej formy białka p53 poprzez zastosowanie substancji AN w linii U-2 OS. Czerwonym prostokatem zaznaczono wybrane miejsce do analiz. Opis wybranych próbek z bazy Ryc. 21. Analiza poziomu białka SLAMF7 w linii niedrobnokomórkowego raka płuca A549. Komórki linii A549 przez 48 h eksponowano na DMSO (Kon) lub na mieszaninę AN celem aktywacji białka p53. Następnie przygotowano kondycjonowano medium hodowlane znad komórek, a z komórek wykonano lizaty białkowe. Kontrola wewnętrzna eksperymentu to białko HSC70......82 Ryc. 22. Analiza akumulacji białka SLAMF7 w liniach A549 oraz U-2 OS o dzikim statusie genu TP53. Komórki obu linii komórkowych poddano 48h ekspozycji na substancje: CPT (kamptotecyna), Kon (DMSO), ActD (aktynomycyna D), mieszaninę AN (aktynomycynę D oraz nutlinę-3a) oraz Ntu3a (nutlinę-3a). Następnie komórki zebrano i przygotowano z nich lizaty białkowe. Analize wykonano za pomocą techniki Western blotting, a kontrolą Ryc. 23. Analiza akumulacji białka SLAMF7 w liniach niedrobnokomórkowego raka płuc o różnym statusie genu TP53. Linia NCI-H292 posiada dziki gen TP53, natomiast linia NCI-H1299 posiada delecję tego genu. Komórki te także poddano 48h traktowaniu, a po upływie tego czasu komórki zebrano i przygotowano z nich lizaty białkowe. Analizę także wykonano z wykorzystaniem techniki Western blottingu, a kontrolą wewnętrzną eksperymentu stanowiło białko HSC70......83 Ryc. 24. Analiza akumulacji białka SLAMF7 w liniach komórkowych CRISPR-Con oraz CRISPR-p53. Ryc. 25. Ocena akumulacji białka SLAMF7 pod wpływem różnych powszechnie stosowanych chemioterapeutyków. Komórki linii A549 traktowano przez 48h różnymi chemioterapeutykami: AN - mieszanina aktynomycyny D oraz nutliny-3a (stężenie kolejno: 5 nM oraz 5 μM); PTX – paklitaksel (stężenie 10 μM); Eto – etopozyd (stężenie: 15 μM); Cis-Pt - cis-platyna (stężenie 10 μM); CPT - kamptotecyna (stężenie 5 μM), a komórki kontrolne poddano traktowaniu DMSO, które jest rozpuszczalnikiem mieszaniny AN oraz CPT. Kontrolą wewnętrzną eksperymentu stanowi białko HSC70. Natomiast białko p21 stanowi kontrolę pozytywną, jako białko ulegające akumulacji zależnie od białka p53. W przypadku oceny aktywacji białka p53, zastosowano trzy przeciwciała oznaczone jako: p53 (wykazujące całkowitą ilość białka p53); p53-Ser15 (wykrywające endogenną formę białka p53 z fosforylacją servny 15); p53-Ser37 (wykrywające endogenną formę białka p53 z

Ryc. 30. Ocena aktywacji białka SLAMF7 pod wpływem stresorów w liniach komórkowych wywodzących się z układu krwionośnego o charakterze komórek prawidłowych. Komórki linii NK-92 eksponowano na wybrane stresory przez 24h, natomiast komórki linii RPMI 1788 poddano działaniu na stresory przez 6h i 24h. Kontrolą

Ryc. 36. Analiza poziomu wybranych białek uczestniczących w szlaku IFN-γ w komórkach A549 eksponowanych na kondycjonowane medium. Medium kondycjonowane pozyskano z komórek nowotworowych (linii A549): kontrolnych, które traktowano DMSO (KON); komórek nowotworowych traktowanych mieszaniną AN (AN); komórek NK-92, które nie miały kontaktu z komórkami nowotworowymi (NK-92); z ko-kultury komórek NK-92 wraz z komórkami nowotworowymi kontrolnymi w stosunku 1:1 (KON 1:1 NK-92); z ko-kultury komórek NK-92 wraz z komórkami nowotworowymi eksponowanymi na mieszaninę AN (AN 1:1 NK-92). Komórki w ostatniej ścieżce eksponowano na IFN-y o stężeniu 1 ng/ml. Powyższymi mediami kondycjonowanymi traktowano komórki linii A549 przez 6h. Pozytywną kontrolą eksperymentu stanowiło medium z IFN-γ, a kontrolą negatywną Ryc. 37. Analiza wpływu substancji obecnych w kondycjonowanej pożywce z hodowli komórek NK-92 na indukcję apoptozy w komórkach nowotworowych linii A549. Komórki linii A549 traktowano medium kondycjonowanym: z hodowli 50 000 komórek NK-92 oraz 200 000 komórek NK-92. Do części medium znad 200 000 komórek NK-92 dodano FASLG (ligand receptora FAS) w stężeniu 50 ng/ml. Pozostałe komórki linii A549 hodowano w standardowej pożywce hodowlanej lub zawierającej FASLG o stężeniu 50 ng/ml. Kontrolą pozytywną eksperymentu stanowiły komórki eksponowane na mieszaninę AN + FASLG, a kontrolą Ryc. 38. Ocena akumulacji białka SOCS1 (inhibitora fosforylacji białka STAT1) względem aktywacji białka p53 w nowotworowych linia komórkowych o różnym statusie genu TP53. Linie komórkowe A549, U-2 OS oraz NCI-H292 posiadają dziki gen TP53, natomiast linia NCI-H1299 jest pozbawiona ekspresji genu TP53. Poziom produkcji białka p53 potwierdza status genu TP53 w wymienionych liniach komórkowych. Wszystkie komórki były eksponowane przez 48h na wymienione substancje. Kontrolę wewnętrzną we wszystkich liniach stanowiło

Ryc. 40. Ustalenie dawki interferonu-αl na podstawie eksperymentu typu dawka-odpowiedź w komórkach nowotworowych linii A549. Komórki eksponowano przez 24h na różne stężenia IFN-α1. Kontrole wewnętrzną stanowiło białko HSC70. Kon – komórki kontrolne; poddane działaniu DMSO (rozpuszczalnik mieszaniny AN); AN – komórki poddane ekspozycji na mieszaninę aktynomycyny D oraz nutliny-3a. Na rycinie wskazano na czerwono wybrane stężenie IFN-α1. Czerwonymi strzałkami zaznaczono izoformy białka STAT1100 Ryc. 41. Ocena roli białka p53 w aktywacji białek uczestniczących w szlaku IFN-α1. Komórki linii A549 oraz U-2 OS (obie linie charakteryzuja się dzikim genem TP53) oraz linie A549 CRISPR-Con i CRISPR-p53 traktowano przez 24h mieszaniną AN, bądź Nut-3a. DMSO to rozpuszczalnik substancji z mieszaniny AN. Następnie po 24h wymieniono pożywkę na pożywkę zawierającą IFN-α1 (1 ng/ml) w części komórek (zgodnie z ryciną). Kontrolą wewnętrzną eksperymentu stanowiło białko HSC70, bądź GAPDH (zgodnie z ryciną)......101 Ryc. 42. Analiza metodą RT-qPCR poziomu ekspresji wybranych genów uczestniczących w szlaku IFN-α1 w zmodyfikowanej linii niedrobnokomórkowego raka płuc - A549 z obniżoną ekspresją genu TP53 (granatowa kolumna) oraz w linii kontrolnej (czerwona kolumna). Wyniki normalizowano względem ekspresji genu Ryc. 43. Ustalenie dawki IFN-y w komórkach nowotworowych linii A549 w doświadczeniu typu dawkaodpowiedź. Komórki eksponowano na przez 24h na badane substancje. Kontrole wewnętrzną stanowiło białko HSC70. Kon – komórki kontrolne; poddane działaniu DMSO (rozpuszczalnik mieszaniny AN); AN – komórki poddane ekspozycji na mieszaninę aktynomycyny D oraz nutliny-3a.....105 **Ryc.** 44. Analiza za pomocą techniki Western blottingu poziomu białek zaangażowanych w sygnalizację szlaku IFN-γ. Komórki linii A549 eksponowano na różne mieszaniny substancji, a ich wpływ oznaczono w różnych punktach czasowych (6h, 12h, 24h oraz 48h). Kontrolą wewnętrzną eksperymentu stanowiło białko HSC70. .106 Ryc. 45. Analiza wpływu ekspresji genu TP53 na białka zaangażowane na szlak IFN-γ. W obu eksperymentach komórki kontrolne traktowano DMSO, który jest rozpuszczalnikiem związków aktynomycyny D oraz nutliny-3a. (A) Komórki traktowano substancjami przez 24h. Celem aktywacji białka p53 zastosowano mieszaninę AN, natomiast IFN-γ służył do aktywacji genów regulowanych przez tą cytokinę. Aby sprawdzić wpływ białka p53 na szlak IFN-γ zastosowano mieszanine AN i IFN-γ. (B) Komórki zmodyfikowanej linii A549 traktowano przez 24h DMSO lub mieszaniną AN, a następnie wymieniono pożywkę poddając 6 godzinnej inkubacji z IFN-γ celem oceny aktywacji białek na wczesnym etapie traktowania cytokiną. Komórki poddano działaniu mieszaniną AN (aby aktywować białko p53), AN i IFN-γ (aby ocenić potencjalny wpływ białka p53 na białka, których geny są regulowane interferonem) oraz IFN-γ (aby ocenić wpływ działania samej cytokiny). Kontrolą wewnętrzną w obu Ryc. 46. Analiza wpływu statusu genu TP53 w nowotworowych liniach niedrobnokomórkowego raka płuca na białka zaangażowane w szlak IFN-γ. Komórki linii NCI-H1299 posiadają delecję genu TP53, natomiast komórki A549 posiadają dziki gen TP53. Komórki traktowano przez 24h, a kontrolą wewnętrzną eksperymentu stanowiło **Ryc. 47.** Ocena akumulacji wybranych białek szlaku IFN-γ pod wpływem aktywacji białka p53 i ekspozycji na cytokinę. Komórki poddano działaniu badanych stresorów przez 24h. Linia GM07492 ma dziki gen TP53. Kontrolą wewnętrzną eksperymentu jest białko HSC70.....109 **Ryc.** 48. Analiza aktywacji wybranych genów uczestniczących szlaku IFN- γ w dwóch punktach czasowych 6h i 48h. Ekspresję badanych genów normalizowano względem ekspresji genu referencyjnego GAPDH......110 Ryc. 49. Analiza za pomocą metody RT-qPCR poziomu ekspresji wybranych genów uczestniczących w szlaku IFN-γ w linii A549 CRISPR-Control oraz CRISPR-p53, które eksponowano przez 24h na stresory zgodnie z osią OX. Istotność statystyczna oznaczona czerwoną ramką oznacza porównanie traktowań w obrębie danej linii komórkowej (tj. AN vs AN i IFN-γ lub AN i IFN-γ vs IFN-γ). Natomiast niebieską ramką oznaczono porównanie względem traktowania w różnych liniach komórkowych (tj. CRISRP-Con AN vs CRISPR-p53 AN lub CRISRP-Con AN+ IFN-γ vs CRISPR-p53 AN+ IFN-γ). Wyniki normalizowano względem ekspresji genu referencyjnego ACTB......111 Ryc. 50. Analiza ekspresji za pomocą metody RT-qPCR wybrano geny uczestniczące w szlaku IFN-γ. Komórki zmodyfikowanej linii A549 CRISPR-p53 oraz kontrolne CRISRP-Con eksponowano przez 24h na DMSO (stanowiące kontrolę) lub mieszaninę AN. Następnie do odpowiednich komórek dodano IFN-y (zgodnie z opisem osi OX na wykresach), wszystkie komórki inkubowano przez dodatkowe 6h. Ekspresję normalizowano względem genu referencyjnego GAPDH......112 Ryc. 51. Podsumowanie analizy poziomu i wybranych białek związanych ze szlakami interferonów. Wszystkie linie komórkowe posiadają dziki status genu TP53. Oznaczenia linii: niedrobnokomórkowy rak płuca -NCI-H460 oraz NCI-H292; kostniakomiesak - U-2 OS; rak gruczołowy żoładka - AGS; czerniak złośliwy - A375;. Wszystkie linie poddano ekspozycji na mieszaninę AN (stężenia: 5 nM aktynomycyny oraz 5 µM nutliny-3a), w przypadku stężenia interferonów wynosiło ono: 1 ng/ml (jednak linie AGS oraz A375 traktowano stężeniem 2

ng/ml). Komórki kontrolne (Kon) poddano działaniu DMSO. Czas ekspozycji substancji wynosił 24h, a kontrolą wewnętrzną w prezentowanych eksperymentach stanowiło białko HSC70.114 Ryc. 52. Analiza aktywacji szlaku apoptozy w komórkach linii A549. Komórki eksponowano przez 24h na działanie DMSO (kontrola), bądź mieszaniny AN oraz obecności lub nieobecności IFN-γ (2 ng/ml). Następnie do części komórek dodano ligand FAS (FASLG; 20 ng). Komórki eksponowano przez dodatkowe 4h. Kontrolą wewnętrzną eksperymentu stanowiło białko GAPDH.....116 Ryc. 53. Podsumowanie aktywacji wybranych genów pod wpływem mieszaniny AN w liniach niedrobnokomórkowego raka płuca NCI-H460 oraz liniach A549 CRISPR-Con i zmodyfikowanym wariancie z obniżona ekspresją genu TP53 CRISPR-p53; a także w liniach kostanikomiesaka U-2 OS CRISPR-Con oraz z redukcją genu TP53 (CRISPR-p53). Krotność ekspresji badanych genów przedstawiono względem krotności Ryc. 54. Podsumowanie funkcji białek kodujących zidentyfikowane geny, które ulegają ekspresji pod wpływem mieszaniny AN. Opracowanie własne w programie BioRender na podstawie publikacji:[156-193].122 Ryc. 55. Podsumowanie aktywacji białka SLAMF7 w wybranych liniach komórkowych, w których sprawdzono wpływ ekspozycji: mieszaniny AN, PTX oraz CPT na akumulację białka SLAMF7.129 Ryc. 56. Szlaki śmierci komórkowej modulowane przez komórki NK. Wykonanie własne w programie BioRender Ryc. 57. Podsumowanie ekspresji badanych genów pod wpływem wybranych substancji w liniach A549 CRISPR-Con oraz CRISPR-p53 na podstawie ryc.42. Krotność ekspresji przedstawiono względem krotności kontroli..133 **Ryc.** 58. Podsumowanie ekspresji badanych genów w komórkach eksponowanych kolejno przez 24h oraz 24+6h na wybrane substancje w liniach A549 CRISPR-Con oraz CRISPR-p53 na podstawie ryc.49. oraz ryc.50. Krotność Ryc. 59. Podsumowanie aktywacji wybranych białek uczestniczących w szlakach interferonu w liniach komórkowych o dzikim statusie genu TP53 na podstawie ryc. 51.137 Ryc. 60. Graficzne podsumowanie uzyskanych wyników ramach niniejszego projektu doktorskiego. Wykonane

Spis tabel:

Tab. 1. Ludzkie nowotworowe linie komórkowe stanowiące materiał niniejszego projektu doktorskiego41
Tab. 2. Ludzkie linie komórkowe o właściwościach komórek prawidłowych wykorzystane w ramach projektu
doktorskiego
Tab. 3. Prawidłowa linia ludzkich komórek wykorzystana w projekcie doktorskim
Tab. 4. Tabela przedstawia wykaz pożywek wraz z suplementacją stosowaną do hodowli komórek
przedstawionych w tab. 1-3
Tab. 5. Charakterystyka stresorów wykorzystanych w badaniach
Tab. 6. Składy buforów, żeli oraz pożywki do hodowli bakterii
Tab. 7. Spis plazmidów wykorzystanych do wyprowadzenia linii komórkowych z obniżoną ekspresją wybranych
genów
Tab. 8. Plazmidy wykorzystane do przeprowadzonych testów lucyferazowych48
Tab. 9. Sekwencje zaprojektowanych starterów wykorzystane w reakcji PCR. Kolorem zaznaczono miejsca
restrykcyjne
Tab. 10. Enzymy restrykcyjne wraz z zaznaczonym miejscem cięcia. 51
Tab. 11. Sekwencja oligonukleotydów wykorzystana do sekwencjonowania. 54
Tab. 12. Wykaz przeciwciał I-rzędowych wykorzystanych w niniejszej rozprawy doktorskiej. Wszystkie
przeciwciała przygotowano w 5% roztworze odtłuszczonego mleka rozpuszczonego w buforze PBST58
Tab. 13. Wykaz przeciwciał II-rzędowych wykorzystanych w technice Western Blottingu, odpowiednich dla
przeciwciał I-rzędowych. Przeciwciała II-rzędowe rozcieńczano w 5% roztworze odtłuszczonego mleka
rozpuszczonym w buforze PBST
Tab. 14. Sekwencje starterów wykorzystanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej. 61
Tab. 15. Geny wybrane do bardziej szczegółowej analizy ekspresji metodą RT-qPCR. Wyboru dokonano w oparciu
o dane uzyskane w laboratorium za pomocą sekwencjonowania transkryptomu przedstawionych lini
komórkowych eksponowanych na mieszaninę AN [155]70