

Michał Wincenty Łuczak

**"BADANIE EKSPRESJI WYBRANYCH GENÓW KODUJĄCYCH BIAŁKA
UCZESTNICZĄCE W ODPOWIEDZI NA HIPOKSJĘ
W PŁASKONABŁONKOWYM RAKU SZYJKI MACICY"**

Praca doktorska

wykonana w Katedrze i Zakładzie Biochemii i Biologii Molekularnej

Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

pod kierunkiem Prof. dr. hab. Pawła P. Jagodzińskiego

Poznań 2012

Składam serdeczne podziękowanie mojemu Promotorowi

Prof. dr. hab. Pawłowi P. Jagodzińskiemu.

Koleżankom i Kolegom z Katedry i Zakładu Biochemii i Biologii Molekularnej
składam serdeczne podziękowania za wszystkie cenne wskazówki,
za dzielenie się swoją wiedzą i doświadczeniem naukowym.

NINIEJSZĄ PRACĘ DOKTORSKĄ DEDYKUJĘ MOJEJ ŻONIE

MAGDALENIE ROKICKIEJ

1. Wstęp	7
1.1. Rak szyjki macicy	7
1.2. Wirus brodawczaka ludzkiego – HPV	7
1.3. Ocena wymazów cytologicznych za pomocą systemu Papanicolaou oraz Bathesda	9
1.4. Klasyfikacja kliniczna raka szyjki macicy	13
1.5. Wpływ ciśnienia parcjalnego tlenu na proces kancerogenezy	15
1.6. Czynniki indukowane hipoksją – HIF	16
1.7. Normoksja	18
1.8. Hipoksja	20
1.9. Metylacja DNA	21
2. Cele pracy	24
3. Materiały i metody	25
3.1. Materiał kliniczny	25
3.2. Odczynniki	26
3.2.1. Izolacja oraz pomiar stężenia RNA, DNA i białka	26
3.2.2. Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelu agarozowym	26
3.2.3. Amplifikacja kwasów nukleinowych (odwrotna transkrypcja, Q-PCR, PCR)	27
3.2.4. Elektroforetyczny rozdział białek (western blot)	27
3.2.5. Deaminacja genomowego DNA oraz przygotowanie i transformacja komórek kompetentnych <i>E. coli</i> szczepu TOP10	28
3.2.6. Sprzęt jednorazowy oraz drobny sprzęt trwały	29
3.3. Bufory	30
3.3.1. bufor glicynowy 1× stężony	30
3.3.2. Bufor do transferu 1× stężony	30
3.3.3. Bufor TBS 1× stężony	30
3.3.4. Bufor TBST 1× stężony	30
3.3.5. Bufor TBST-M 1× stężony	30
3.3.6. Bufor blokujący TBST-B 1× stężony	31
3.3.7. Bufor do odmywania przeciwciał	31
3.3.8. Bufor Ponceau S	31
3.3.9. Bufor obciążający do rozdziału białek 3× stężony	31
3.3.10. Bufor Tbf1 do przygotowania komórek kompetentnych	32
3.3.11. Bufor Tbf2 do przygotowania komórek kompetentnych	32
3.3.12. Żel poliakrylamidowy zagęszczający do rozdziału białek	32
3.3.13. Żel poliakrylamidowy rozdzielający do rozdziału białek	33
3.4. Metody	33
3.4.1. Homogenizacja tkanek w ciekłym azocie	33
3.4.2. Izolacja całkowitego RNA z tkanek	33
3.4.3. Trawienie całkowitego genomowego DNA z wykorzystaniem DNazy I	34
3.4.4. Spektrofotometryczny pomiar stężenia RNA oraz elektroforeza RNA w żelu agarozowym	35
3.4.5. Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT-PCR)	35

3.4.6. Łańcuchowa reakcja polimerazy z czasie rzeczywistym (Q-PCR)	36
3.4.7. Izolacja białka z tkanek	40
3.4.8. Oznaczenie stężenia białka	40
3.4.9. Rozdział elektroforetyczny białek w żelu poliakrylamidowym	41
3.4.10. Odmywanie przeciwciał z błony PVDF	43
3.4.11. Izolacja genomowego DNA z tkanek oraz reakcja deaminacji DNA	44
3.4.12. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR) deaminowanego DNA	45
3.4.13. Elucja produktów PCR z żelu agarozowego	49
3.4.14. Ligacja produktów PCR z plazmidem pGEM-T Easy	49
3.4.15. Przygotowanie komórek kompetentnych <i>E. coli</i> szczep TOP10	52
3.4.16. Transformacja komórek kompetentnych <i>E. coli</i> szczep TOP10 plazmidem pGEM-T Easy	52
3.4.17. Przygotowanie płytek Petriego ze stałym podłożem LB-agar zawierającym ampicylinę, X-Gal i IPTG oraz selekcja klonów	53
3.4.18. Hodowla kolonii bakteryjnych zawierających prawidłowy insert oraz izolacja plazmidowego DNA	55
3.4.19. Amplifikacja regionu promotora genu <i>EGLN1</i>	55
3.4.20. Obliczenia statystyczne	57
4. Wyniki	58
4.1. Badanie poziomu transkryptów dla genów <i>EGLN1</i> , <i>HIF-1A</i> , <i>VHL</i> , <i>CXCR4</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>DNMT3B</i> i <i>DNMT1</i> oraz analiza ilości białek EGLN1 i HIF-1A	58
4.2. Analiza wzoru metylacji sekwencji promotorowych genów <i>EGLN1</i> , <i>HIF-1A</i> , <i>VHL</i> oraz <i>CXCR4</i>	63
4.3 Analiza korelacji Spearman'a pomiędzy czynnikiem HIF-1A a ekspresją genów posiadających sekwencję HRE w regionie promotorowym	64
4.4. Analiza sekwencji nukleotydowej promotora genu <i>EGLN1</i>	64
5. Dyskusja	66
6. Wnioski	73
7. Streszczenie	74
8. Summary	76
9. Wykaz skrótów	78
10. Piśmiennictwo	80
11. Załącznik 1	102

1. WSTĘP

1.1. Rak szyjki macicy

Pomimo postępujących prac nad skutecznością i powszechnością profilaktyki raka szyjki macicy na świecie w dalszym ciągu stanowi on istotny problem medyczny.

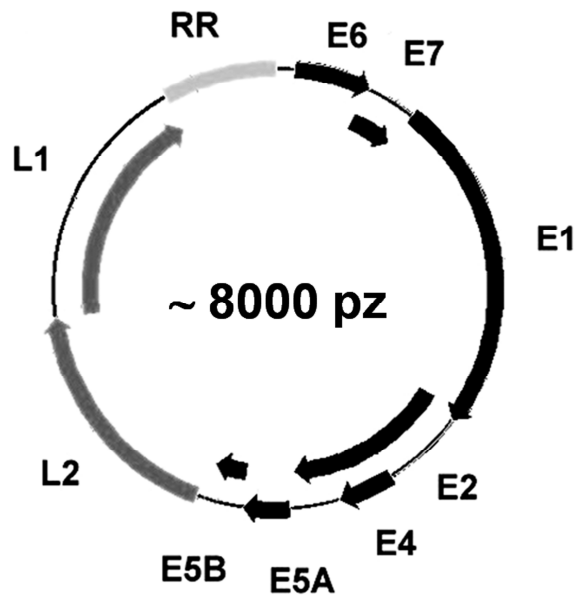
Rocznie notuje się około 500 000 zachorowań i 250 000 zgonów z powodu raka szyjki macicy [1]. Rak ten jest jednym z najczęściej występujących nowotworów narządów płciowych u kobiet w Polsce. Każdego roku notuje się około 4000 nowych przypadków z czego około 2000 kobiet umiera [2]. Wysoka zachorowalność na raka szyjki macicy w Polsce, porównywalna z zachorowalnością w krajach trzeciego świata ma swoje uzasadnienie. Na pierwszy plan wysuwa się rozpowszechnienie czynników ryzyka rozwoju raka szyjki macicy, które są stosunkowo dobrze poznane i opisane. Do czynników głównych zalicza się: zakażenie wirusem brodawczaka ludzkiego (*ang. – human papiloma virus*) HPV 16, 18, 31, 33, 45, wiek, palenie papierosów, immunosupresję, wczesne rozpoczęcie współżycia płciowego, duża liczba partnerów płciowych [3], wielokrotne porody [4], niski status socjoekonomiczny, CIN2 i CIN3 w wywiadzie. Do czynników sprzyjających możemy zaliczyć również: wieloletnie stosowanie hormonalnych leków antykoncepcyjnych, dietę ubogą w antyoksydanty, częste stany zapalne pochwy wywołane przez *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* oraz zakażenia wirusami HIV, CMV, EBV i HSV 2 [5].

1.2. Wirus brodawczaka ludzkiego – HPV

Wirusy brodawczaka ludzkiego należą do małych, nagich wirusów DNA, z kolistym genomem wielkości około 8000 par zasad (pz). Dotychczas poznano około 200 typów wirusa HPV zgrupowanych w 16 grup z czego około 30 typów odpowiada za infekcję narządów moczowo-płciowych [6,7]. Wirusy odpowiedzialne za infekcję narządów moczowo-płciowych dzielą się na 3 grupy:

- wirusy niskiego ryzyka (np. HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108),
- wirusy średniego ryzyka (np. HPV 26, 53, 66),
- wirusy wysokiego ryzyka (np. HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82).

W kolistym genomie wirusa można wyróżnić 3 regiony: region kodujący białka fazy wczesnej (E1-E7), region kodujący białka fazy późnej (L1 i L2) oraz region regulatorowy (RR) (Rycina 1) [8].



Rycina 1. Struktura kolistego genomu wirusa HPV. E1-E7 –białka fazy wczesnej, L1-L2 – białka fazy późnej, RR – region regulatorowy.

Białka fazy wczesnej aktywowane są jako pierwsze po wnikięciu wirusa do komórki gospodarza. Białko E1 bierze udział w replikacji wirusa oraz jest odpowiedzialne za podtrzymanie genomu wirusa w postaci episomu. Białko E2 jest kofaktorem replikacji wirusa oraz reguluje proces transkrypcji wirusowego DNA. Białko E4 wpływa na replikację i dojrzewanie wirusa natomiast białko E5 poprzez oddziaływanie z receptorami komórki gospodarza wpływa na adhezję i ruchliwość komórek oraz sygnalizację komórkową [9]. Głównymi białkami onkogennymi wirusa HPV są E6 i E7. Białka te odpowiadają za unieśmiertelnienie komórki gospodarza poprzez oddziaływanie z białkiem p53 oraz Rb1 [10,11]. W komórkach nabłonkowych ubikwityno–zależna degradacja białka p53 kontrolowana jest przez białko MDM–2. Natomiast w komórkach zainfekowanych wirusem HPV białko MDM–2 zastępowane jest przez kompleks białkowy nazwany E6–AP (*ang. cellular E6-associated protein*) [12]. Zastąpienie białka MDM–2 przez E6–AP skraca okres półtrwania białka p53 oraz znacząco zmniejsza jego ilość w komórkach zainfekowanych wirusem HPV [12]. Białko E6 stymuluje także aktywność telomerazy, co w połączeniu z inaktywacją białka p53 skutkuje unieśmiertelnieniem zainfekowanych komórek [13,14]. Natomiast białko E7 poprzez oddziaływanie z białkiem Rb-1 uwalnia czynnik transkrypcyjny E2F indukujący ekspresję genów zaangażowanych w proces proliferacji komórkowej [15,16]. W końcowym etapie cyklu życiowego wirusa ekspresji ulegają geny kodujące białka fazy późnej. Geny te kodują większe (L1) oraz mniejsze (L2) białko kapsydu [8].

Wirusy posiadają także zdolność regulacji ekspresji własnych genów poprzez zmiany w metylacji DNA zainfekowanej komórki. Białka wirusa w sposób pośredni i/lub bezpośredni zmieniają wzór metylacji sekwencji promotorowych genów komórki gospodarza. Białka kodowane przez te geny wpływają na proces apoptozy, cykl komórkowy, naprawę DNA, ścieżkę sygnalizacyjną WNT oraz inne procesy [17].

1.3. Ocena wymazów cytologicznych za pomocą systemu Papanicolau oraz Bethesda

Pierwsza skala oceny wymazów cytologicznych z szyjki macicy została zaproponowana w 1942 roku [18]. Wprowadzenie systemu Papanicolau do programu profilaktyki raka szyjki macicy na szeroką skalę spowodowało około 50% obniżenie zachorowalności i 70% umieralności na raka szyjki macicy. Podstawą tego systemu jest badanie cytologiczne rozmazów z części pochwowej szyjki macicy pozwalające ocenić czy złuszczone komórki są prawidłowe czy patologiczne. W rozmazach oprócz komórek nabłonkowych pochodzących z tarczy i kanału szyjki macicy, a niekiedy nawet z jamy macicy, występują też komórki nienabłonkowe (np. krwinki czerwone, limfocyty, komórki zapalne), komórki martwicze i resztki cytoplazmy stanowiące tło rozmazów. Ocena tła rozmazów ma znaczenie pomocnicze i umożliwia uściślenie rozpoznania cytologicznego. Obecność komórek nieprawidłowych (atypowych) na tzw. "czystym" tle może świadczyć o procesach przedinwazyjnych (wczesnych), natomiast tzw. "brudne" tło może być rezultatem bardziej zaawansowanego stadium. Ocenę wymazów cytologicznych zgodnie z systemem Papanicolau przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Charakterystyka wymazów cytologicznych w systemie Papanicolau [18].

SYSTEM PAPANICOLAU	
Grupa I	w rozmazie stwierdza się prawidłowe komórki powierzchniowych warstw nabłonka wielowarstwowego płaskiego tarczy szyjki macicy, komórki gruczołowe z kanału szyjki oraz pojedyncze komórki zapalne
Grupa II	w rozmazie obok komórek z grupy I występują liczne komórki zapalne, komórki nabłonkowe wykazujące zmiany zwyrodnieniowe oraz komórki pochodzące z procesów regeneracyjnych; w grupie tej nie stwierdza się komórek dysplastycznych czy nowotworowych
Grupa III	w rozmazie widać komórki z cechami dysplazji małego, średniego lub dużego stopnia
Grupa IV	w rozmazie występują komórki o cechach raka płaskonabłonkowego przedinwazyjnego
Grupa V	w rozmazie występują komórki nowotworowe odpowiadające rakowi płaskonabłonkowemu naciekającemu szyjki macicy lub innemu nowotworowi złośliwemu szyjki lub trzonu macicy

System Papanicolau pozwala na wykrycie w rozmazie komórek nowotworowych pochodzących z szyjki, a czasem i z jamy macicy już w bardzo wczesnym stadium. Jednakże wartość tej metody zależy od umiejętności oceny i interpretacji zmian morfologicznych oraz prawidłowej klasyfikacji zmian. Pomimo niewątpliwych korzyści jakie przyniosło zastosowanie systemu Papanicolau w profilaktyce cytologicznej raka szyjki macicy, obecnie uważa się go za niedoskonały ze względu na zbyt wysoki odsetek wyników fałszywie negatywnych, ocenianych na 20%. Pomimo niedoskonałości system ten wykorzystywany jest nadal w wielu ośrodkach.

W roku 1988 Narodowy Instytut Onkologii USA w Bethesda zaproponował wprowadzenie nowych zasad opisywania wyników cytologicznych [19]. Zasady te następnie modyfikowano w 1991 i 2001 roku [20]. System Bethesda eliminuje błędy metodyczne popełniane w trakcie pobierania materiału. W systemie tym wymaz kwalifikuje się pod względem jakości materiału jako nadający się lub nieodpowiedni do oceny oraz uwzględnia

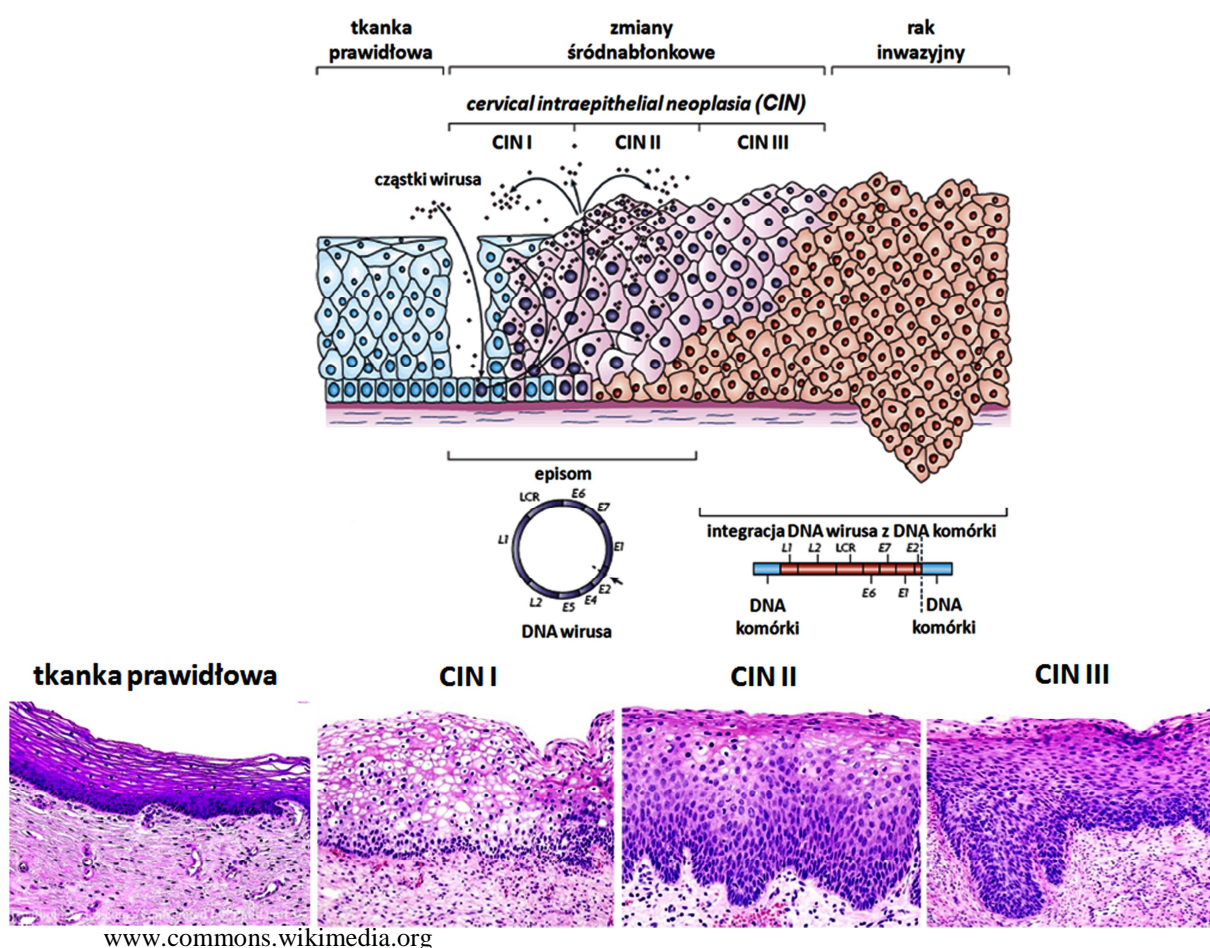
się obecność zakażenia wirusem HPV. Na podstawie wieloletnich badań i obserwacji odkryto silny związek między obecnością zakażenia wirusem HPV, a dysplazją niskiego stopnia. Stan ten określa się w systemie Bethesda jako zmianę śródnabłonkową niskiego stopnia – LSIL (*ang. low grade squamous intraepithelial lesion*). Wymaz cytologiczny opisany jako LSIL mówi o prawdopodobnym wpływie zakażenia wirusem HPV na morfologię komórek nabłonka wielowarstwowego płaskiego. Stan taki nie wymaga natychmiastowej weryfikacji patomorfologicznej. W przypadku obecności zmian na tarczy szyjki macicy wykonuje się badanie powierzchni tarczy za pomocą specjalnego mikroskopu (badanie kolposkopowe). Przy satysfakcjonującym obrazie kolposkopowym badanie cytologiczne powtarza się po 6 i 12 miesiącach. Po upływie 12 miesięcy wskazane jest także wykonanie oznaczenia obecności DNA wirusa HPV 16. Jeżeli obraz cytologiczny opisywany jako LSIL utrzymuje się powyżej 12 miesięcy oraz potwierdzono diagnostycznie obecność zakażenia typem onkogennym wirusa HPV 16 należy ponownie wykonać badanie kolposkopowe i ewentualną biopsję do weryfikacji patomorfologicznej. Należy również pamiętać, iż 80 % zakażeń HPV i 80% CIN I ulega samoistnej regresji w okresie 12-24 miesięcy [4].

Jeżeli obraz cytologiczny zostanie zakwalifikowany jako zmiana śródnabłonkowa dużego stopnia – HSIL (*ang. high grade squamous intraepithelial lesion*) wskazana jest natychmiastowa weryfikacja patomorfologiczna na podstawie pobranych, celowanych wycinków ze zmian na tarczy szyjki macicy. Obraz cytologiczny sygnalizujący cechy HSIL należy interpretować jako obecność zmian komórkowych wynikających z trwałego zakażenia typem onkogennym wirusa HPV utrzymującego się w latach poprzedzających aktualne badanie.

Stanem przedrakowym dla szyjki macicy jest dysplazja, którą określa się mianem wewnątrz nabłonkowej neoplazji szyjki macicy – CIN (*łac. cervical intraepithelial neoplasia*). Wyróżnia się trzy stopnie dysplazji szyjki macicy (Tabela 2, Rycina 1) mały (CIN I), średni (CIN II) i duży (CIN III) [21].

Tabela 2. Charakterystyka dysplazji szyjki macicy [21].

<i>cervical intraepithelial neoplasia – CIN</i>		
CIN I	CIN II	CIN III
– proliferacja niedojrzałych komórek ograniczona do dolnej 1/3 nabłonka	– proliferacja niedojrzałych komórek ograniczona do dolnych 2/3 nabłonka	– niedojrzałe komórki na całej wysokości nabłonka
– zachowana polarność komórek we wszystkich warstwach	– komórki warstw powierzchniowych wykazują cechy dojrzewania	– nabłonek pogrubiały
– nieliczne mitozy u podstawy nabłonka	– obecny polimorfizm jąder komórkowych	– całkowicie zaburzona architektura nabłonka
– niewielki polimorfizm jąder komórkowych		– liczne, często patologiczne mitozy
– możliwa obecność koliocytozy		– częsty silny polimorfizm jąder komórkowych



Rycina 1. Infekcja wirusem HPV oraz histologiczny obraz dysplazji szyjki macicy

Dysplazje małego stopnia bardzo często wynikają z obecności zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego, przy czym 80% dysplazji ulega samoistnej regresji w czasie kilku miesięcy. Autoregresja dysplazji małego stopnia związana jest z cyklem życiowym wirusa brodawczaka ludzkiego. W większości przypadków zakażenie wirusem HPV ulega samoistnej eliminacji bez leczenia, szczególnie u osób młodych z wysoce sprawnym układem immunologicznym. Zakażenie utrzymujące się przez 12 miesięcy i dłużej, wywołane typem onkogennym wirusa daje złe rokowanie dla pacjentki. U pacjentek z zakażeniem utrzymującym się powyżej 12 miesięcy występuje największe ryzyko progresji do dysplazji dużego stopnia, a w dalszej perspektywie inicjacji procesu nowotworzenia. Dysplazja szyjki macicy może utrzymywać się przez wiele lat, a rozwój raka szyjki macicy z dysplazji trwa przeciętnie od 3 do 10 lat [4]. Natomiast od zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego do rozwoju dojrzałego nowotworu może minąć około 15 lat [4].

1.4. Klasyfikacja kliniczna raka szyjki macicy

Zdecydowana większość wykrywanych co roku przypadków raka szyjki macicy w Polsce charakteryzuje się zaawansowanym stopniem klinicznym. Wczesne postaci raka szyjki macicy kwalifikowane do stopnia II A wg klasyfikacji Międzynarodowej Federacji Ginekologii i Położnictwa – FIGO (*ang. International Federation of Gynecology and Obstetrics*) (Tabela 3) stanowią tylko około 30% wszystkich rozpoznań. Według raportów National Cancer Institute wskaźnik przeżyć pięcioletnich pacjentek z rakiem szyjki macicy w I stopniu zaawansowania klinicznego mieści się w granicach 80% – 96%. Wartość wskaźnika przeżyć pięcioletnich obniża się dla kobiet z rakiem szyjki macicy w II, III i IV stopniu zaawansowania klinicznego i wynosi odpowiednio 65% – 69%; 40% – 43% i 15% – 20% [22].

Najczęstszym typem histologicznym raka szyjki macicy jest rak płaskonabłonkowy (*łac.: carcinoma planoepitheliale cervicis uteri*). Drugim co do częstości występowania jest gruczolakorak szyjki macicy (*łac. adenocarcinoma cervicis uteri*), występujący w kilku odmianach (*łac. adenocarcinoma mucinosum endocervicale; łac. adenocarcinoma endometrioides; łac. adenocarcinoma clarocellulare; łac. carcinoma adenosquamosum*) [23]. Niewielką część raków szyjki stanowią guzy o zróżnicowaniu neuroendokrynnym (rak drobnokomórkowy). Nowotwory złośliwe pochodzenia nienabłonkowego są bardzo rzadkie w szyjce. Spośród nich spotyka się przede wszystkim mięśniakomięsaka prążkowanokomórkowego zarodkowego (*łac. rhabdomyosarcoma embryonale; łac. sarcoma*

botryoides), guza mieszanego złośliwego (*łac. tumor mixtus malignus*) i chłoniaki złośliwe z komórek B.

Tabela 3. Klasyfikacja kliniczna stopnia zaawansowania raka szyjki macicy według FIGO (2009 r.).

Stopień zaawansowania	Opis
Stopień I	Nowotwór ściśle ograniczony do szyjki macicy
Stopień IA	Rak inwazyjny rozpoznawany wyłącznie mikroskopowo, głębokość naciekania ≤ 5 mm i średnica zmiany ≤ 7 mm
IA1	Głębokość naciekania podścieliska ≤ 3 mm i średnica zmiany ≤ 7 mm
IA2	Głębokość naciekania podścieliska > 3 mm i nie więcej niż 5 mm, średnica zmiany ≤ 7 mm
Stopień IB	Zmiany widoczne klinicznie ograniczone do szyjki macicy lub raki w stadium przedklinicznym ale większe od IA*
IB1	Klinicznie widoczna zmiana ≤ 4 cm
IB2	Klinicznie widoczna zmiana > 4 cm
Stopień II	Rak przechodzi poza szyjkę macicy, lecz nie dochodzi do ścian miednicy, nacieka pochwę, ale tylko górne 2/3 jej długości
Stopień IIA	Bez naciekania przymacicz
IIA1	Klinicznie widoczna zmiana ≤ 4 cm
IIA2	Klinicznie widoczna zmiana > 4 cm
Stopień IIB	Nacieki przymacicza, niedochodzące do kości miednicy (bez lub z naciekiem pochwy)
Stopień III	Rak dochodzi do ścian miednicy i/lub nacieki pochwy obejmujący jej dolną 1/3 długości i/lub powoduje wodonercze lub przypadki nieczynnej nerki**
IIIA	Nacieki pochwy obejmujący jej dolną 1/3 długości, nie dochodzi do ścian miednicy
IIIB	Rak dochodzi do ścian miednicy (bez lub z zajęciem ścian pochwy), i/lub obecność wodonercza lub nieczynnej nerki.
Stopień IV	Przejęcie raka poza teren miednicy mniejszej lub zajęcie (potwierdzone badaniem biopsyjnym) śluzówki pęcherza moczowego lub odbytnicy
IVA	Naciekanie narządów sąsiednich
IVB	Odległe przerzuty

* – wszystkie makroskopowo widoczne zmiany, nawet te szerzące się powierzchownie, są klasyfikowane jako IB. Zajęcie przestrzeni naczyniowej, żylniej lub limfatycznej, nie zmienia stopnia zaawansowania.

** – w badaniu przez odbytnicę nie stwierdza się wolnej przestrzeni między naciekiem a kością miednicy. Wszystkie przypadki wodonercza lub nieczynnej nerki, o ile nie jest znana inna niż nowotworowa przyczyna tego stanu.

1.5. Wpływ ciśnienia parcjalnego tlenu na proces kancerogenezy

Kancerogeneza jest złożonym procesem, w który zaangażowany jest szereg czynników zarówno genetycznych jak i epigenetycznych [24]. Umożliwiają one komórkom nowotworowym nabycie nowych cech, różniących je od komórek prawidłowych. Komórki rakowe stają się odporne na działanie inhibitorów wzrostu, proliferują przy braku egzogennych czynników wzrostu, zahamowany zostaje proces apoptozy, nabywają nieograniczony potencjał replikacyjny poprzez aktywację telomerazy, występuje w nich nieprawidłowa angiogeneza, cechuje je inwazyjność i zdolność do tworzenia przerzutów [25].

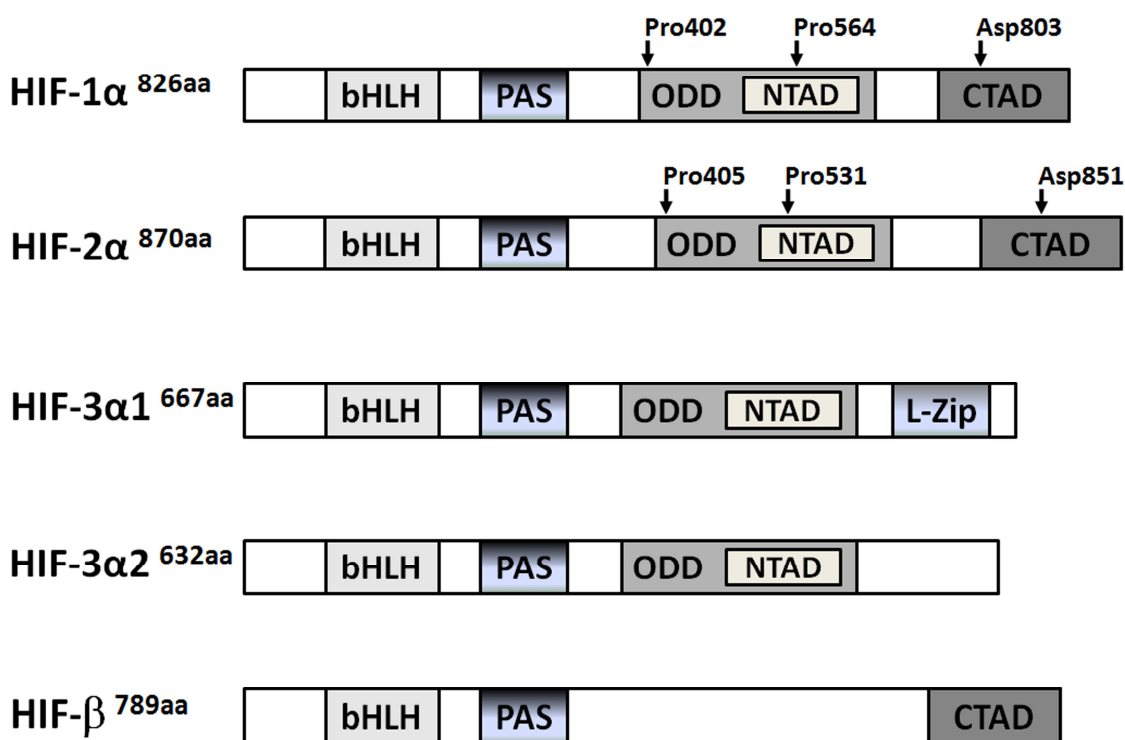
Istotnym czynnikiem w rozwoju ogniska nowotworowego, w tym raka szyjki macicy, jest hipoksja [26]. Hipoksją nazywamy niedobór tlenu w tkankach powstający w wyniku zmniejszonej dyfuzji tlenu z płuc (hipoksja hipoksemiczna) lub zaburzeniami transportu tlenu przez krew do tkanek (hipoksja ischemiczna). W tkance prawidłowej stężenie tlenu wynosi około 7% (53 mmHg), natomiast w tkance nowotworowej waha się w granicach od 7% do poniżej 1% [27]. Związane jest to z obecnością szybko dzielących się komórek nowotworowych, które cechuje słaby rozwój naczyń krwionośnych, co przy perfuzji tkanki przez tlen na głębokość 100-180 μ m [28] uniemożliwia to prawidłowe zaopatrzenie wszystkich komórek w dostateczną ilość tlenu oraz składników odżywczych [29-31].

Każdy organizm posiada zdolności adaptacyjne umożliwiające przystosowanie komórek i tkanek do niskiego ciśnienia parcjalnego tlenu. Kluczowym elementem związanym z adaptacją organizmu do niskiego stężenia tlenu jest czynnik indukowany hipoksją – HIF (*ang. Hypoxia Inducible Factor*). Niska ilość tlenu w tkance nowotworowej sprzyja stabilizacji białka HIF- α [31], które stymuluje komórki śródbłonna do migracji w okolice rozwijającego się nowotworu i tworzenia nowych naczyń krwionośnych. Naczynia te tworzone są w sposób chaotyczny uniemożliwiając prawidłowe zaopatrzenie komórek w tlen i składniki odżywcze [30,31] i jest przyczyną narastającej hipoksji. Podwyższoną ilość czynnika HIF obserwuje się w około 53% wszystkich nowotworów [32], wśród których można wymienić raka okrężnicy, żołądka, trzustki, płuc, jajnika, prostaty, nerek, czerniaka [32], macicy, piersi, głowy i szyi [33]. Wysoki poziom HIF w komórkach raka bezpośrednio wiąże się ze zwiększoną ich odpornością na radio- i chemioterapie [34] oraz ma wpływ na ich złośliwość i przerzutowość [28]. Ponieważ hipoksja jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych markerów związanych z rozwojem nowotworów należy brać ją pod uwagę przy prognozowaniu stanu pacjenta, a także jako potencjalny element związany z leczeniem [35,36]. Obecnie prowadzone są intensywne poszukiwania nowych związków mogących specyficznie blokować czynnik HIF w warunkach hipoksji. Związki te mogą być

potencjalnie wykorzystywane w skojarzonej terapii przeciwnowotworowej i wykorzystane do obniżenia potencjału proliferacyjnego komórek nowotworowych, zwiększając szanse pacjentów w walce z nowotworami.

1.6. Czynniki indukowane hipoksją – HIF

HIF jest heterodimerycznym czynnikiem transkrypcyjnym o strukturze helisa-skręt-helisa – bHLH (*ang. basic helix-loop-helix*), należącym do rodziny białek Per-ARNT-Sim (PAS) [37]. HIF składa się z jednej z 3 wrażliwych na stężenie tlenu podjednostek α (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α) oraz z wspólnej, ulegającej konstytutywnej ekspresji podjednostki β (HIF- β) (Rycina 2).



Rycina 2. Budowa i struktura HIF-1/2/3 α oraz HIF- β . Cechą wspólną dla wszystkich przedstawionych białek jest występowanie domeny bHLH oraz domeny PAS. Dodatkowo czynniki HIF- α posiada dwie domeny: ODD (*ang. oxygen-dependent degradation domain*) oraz N-terminalną domenę transaktywacyjną – NTAD (*ang. N-terminal transactivation domain*). C-terminalna domena transaktywacyjna – CTAD (*ang. C-terminal transactivation domain*) obecna jest w czynniku HIF-1/2 α i HIF- β . Strzałkami oznaczono pozycje aminokwasów (Pro i Asp) ulegających hydroksylacji.

Heterodimery HIF-1 α / β i HIF-2 α / β pełnią rolę aktywatorów transkrypcji dla genów indukowanych niskim stężeniem tlenu. Funkcja podjednostki HIF-3 α nie jest do końca poznana i jasna. Podjednostka ta ma kilka wariantów splicingowych, z których jedynie dwa mogą pełnić określone funkcje (Rycina 2). Przyjmuje się, iż jej krótki wariant splicingowy określany jako IPAS (*ang. inhibitory PAS protein*) pełni rolę represora transkrypcji [38,39]. Podczas gdy gen *HIF-1A* ulega ekspresji w większości tkanek, ekspresja *HIF-2A* ograniczona jest głównie do hepatocytów, kardiomiocytów, komórek glejowych, pneumocytów typu II i komórek śródbłonna [40]. Natomiast ekspresja genu *HIF-3A* ograniczona jest do oka i mózdzku [27]. Podjednostka β ulega konstytutywnej ekspresji w większości tkanek i znana jest także jako ARNT (*ang. aryl hydrocarbon nuclear translocator*) [41].

Jako kluczowy element regulujący homeostazę tlenową, białko HIF-1 α ułatwia komórce adaptację do warunków niskiego stężenia tlenu. Adaptacja ta związana jest z regulacją ekspresji genów zaangażowanych w komórkowy metabolizm energetyczny, transport glukozy, angiogenezę, erytropoezę, metabolizm żelaza, regulację pH, apoptozę, proliferację komórek oraz interakcje komórka–komórka i komórka–macierz komórkowa [41]. Dotychczas opisano około 70 genów regulowanych przez hetero-dimer białka HIF (Tabela 4).

Tabela 4. Niektóre geny aktywowane czynnikiem transkrypcyjnym HIF, posiadające element odpowiedzi na hipoksję w sekwencji promotora.

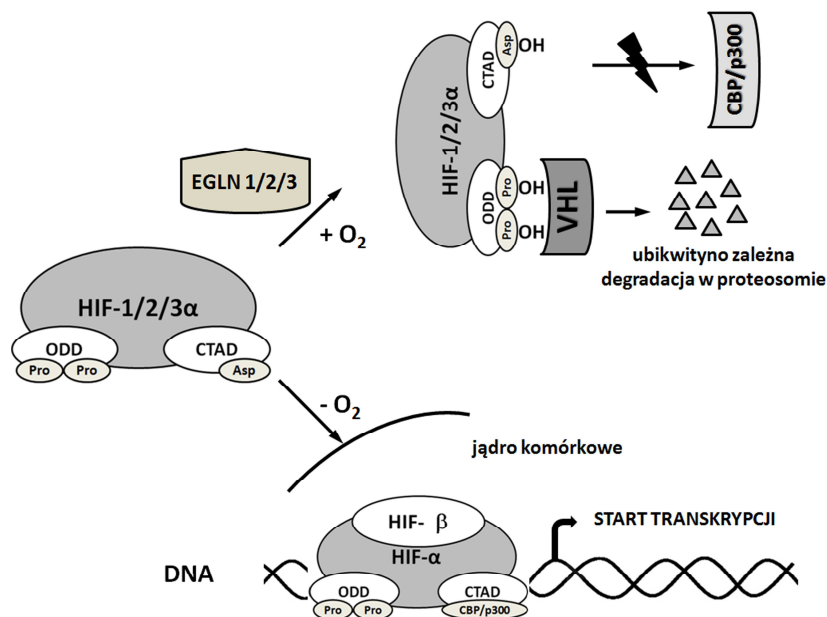
GENY AKTYWOWANE CZYNNIKIEM HIF							
metabolizm tlenowy		metabolizm komórkowy		wzrost komórki i apoptoza		inne szlaki metaboliczne	
NCBI	literatura	NCBI	literatura	NCBI	literatura	NCBI	literatura
EPO	42	ALDOA	42,57	IGFBP1	66	CITED2	82
FECH	43	GAPDH	58,59	TGFB3	67	ID2	83
ABCG2	44	PGK1	42,57	ENG	68	ETS1	84
TF	45	ENO1	42,57	CTGF	69	DEC1	85
TFRC	46,47	PFKFB3	60,61	TFF3	70	DEC2	85
CP	48	PFKFB4	62	NT5E	71	ITGB2	86
VEGF	49,50	CA9	63	CXCL12	72	HSP90B1	87
FLT1	51	GPX3	64	CXCR4	73	FURIN	88
LEP	52,53	MDR1	65	MET	74	MMP14	89
NOS3	54			TERT	75,76	EGLN1	90
EDN1	55			BNIP3	77	EGLN3	91
SERPINE1	56			PMAIP1	78		
				PPP5C	79		
				MCL1	80		
				NPM1	81		

Geny te posiadają w swoim promotorze jedną lub kilka, ułożonych tandemowo, sekwencji 5'-CGTG-3', zwanych elementami odpowiedzi na hipoksję – HRE (*ang. Hypoxia Respond Element*) [92]. HRE są niezbędne do aktywacji ekspresji genu przez białko HIF, przy czym nie wszystkie sekwencje HRE są funkcjonalne. Dotychczas nie udało się w pełni poznać i wyjaśnić dokładnego mechanizmu, umożliwiającego rozpoznanie czynnikowi HIF funkcjonalnego i niefunkcjonalnego miejsca HRE w obrębie promotora. Wiadomo, iż w promotorach niektórych genów, w odległości 8 nukleotydów od sekwencji HRE, zlokalizowana jest sekwencja pomocnicza dla HIF-1 – HAS (*ang. HIF-1 Ancillary Sequence*) [93]. Z drugiej strony sekwencja HAS nie jest obecna w promotorach wszystkich genów aktywowanych przez czynnik HIF-1, dlatego przypuszcza się, iż muszą istnieć dodatkowe czynniki transkrypcyjne, które wiążą się w sąsiedztwie sekwencji HRE. Dotychczas opisano interakcję z czynnikami ATF-1, CREB1 [94,95] czy AP-1 [96].

Istotny wpływ na prawidłowe rozpoznanie HRE mają również nukleotydy znajdujące się bezpośrednio w sąsiedztwie sekwencji 5'-CGTG-3'. Przypisując pozycję +1 dla nukleotydu C w sekwencji 5'-CGTG-3' kluczowe znaczenie mają pozycje -1, -2, -3, -5 oraz +5. Porównując sekwencje promotorowe 107 genów wykazano, iż nukleotyd A występuje 4,5 razy częściej w pozycji -1 i 1,8 razy częściej w pozycji -2, nukleotyd T występuje 4,2 razy częściej w pozycji -3 i 2 razy częściej w pozycji -5 natomiast nukleotyd C występuje 1,7 razy częściej w pozycji +5 [92]. Również metylacja DNA może być związana z brakiem funkcjonalności niektórych HRE ponieważ sekwencje HRE znajdują się często w obrębie wysp CpG, a metylacja cytozyny może uniemożliwić związanie się czynnika HIF do sekwencji HRE w promotorze [97].

1.7. Normoksja

W warunkach dostatecznej ilości tlenu w komórce (normoksji) białko HIF-1 α ulega hydroksylacji i tworzy kompleks z białkiem VHL, będącym częścią kompleksu E3 ligazy ubikwitynowej, co prowadzi do jego proteosomalnej degradacji [98], a także uniemożliwia związanie się aktywatorów transkrypcji CBP/p300 zapobiegając aktywacji genów indukowanych hipoksją (Rycina 3) [99,100].



Rycina 3. Destabilizacja białka HIF-1/2/3 α warunkach normoksji (+ O₂) oraz stabilizacja i transkrypcyjna aktywacja ekspresji genów w warunkach hipoksji (- O₂).

Podczas normoksji w białku HIF-1 α hydroksylacji ulegają reszty Pro⁴⁰² i Pro⁵⁶⁴ natomiast w białku HIF-2 α reszty Pro⁴⁰⁵ i Pro⁵³¹, zlokalizowane w zależnej od tlenu domenie degradacyjnej – ODD (Rycina 2) [41] oraz reszty asparaginianowe Asn⁸⁰³ (HIF-1 α) i Asn⁸⁵¹ (HIF-2 α) C terminalnej domeny transaktywacyjnej podjednostki α [99] (Rycina 2,3).

Za hydroksylację reszt prolinowych odpowiedzialne są hydroksylazy prolinowe (EGLN) [39,101], natomiast hydroksylację reszty asparaginianowej katalizuje hydroksylaza asparaginianowa (FIH) [99,100]. Do rodziny hydroksylaz prolinowych zaliczamy hydroksylazę prolinową 1, 2, 3 (EGLN1, EGLN2, EGLN3) [102,103], które ulegają ekspresji w większości organów. Zidentyfikowano także czwarte białko należące do rodziny hydroksylaz prolinowych PH-4 wpływające na funkcję białek HIF-1 α i HIF-2 α [104].

Każda EGLN może hydroksylować podjednostkę α białka HIF z podobną wydajnością, jednakże EGLN1 jest hydroksylazą kluczową [105]. Wykazano iż myszy pozbawione genu *EGLN1* wykazują liczne defekty rozwojowe prowadzące do śmierci np.: zaburzenia procesów angiogenezy i erytropoezy lub kardiomiopatię rozstrzeniową [106-109], natomiast brak genu *EGLN2* czy też *EGLN3* nie jest letalny [110,111]. Opisano także liczne mutacje w genie *EGLN1*, powodujące m.in. rodzinną erytrocytozę [112-114]. Dotychczas nie opisano żadnych mutacji w genach *EGLN2* i *EGLN3*.

Białka EGLN1 i EGLN2 odpowiedzialne są za hydroksylację Pro⁴⁰² i Pro⁵⁶⁴ ludzkiego HIF-1 α [102,103,115], natomiast białko EGLN3 odpowiedzialne jest za hydroksylację reszt Pro⁵⁶⁴, (*in-vitro* również Pro⁵⁶⁷) [115-120] głównie podczas reoksydacji [115].

Hydroksylacja reszt aminokwasowych z udziałem EGLN i FIH jest nieodwracalną modyfikacją kowalencyjną. Wymaga ona obecności O₂, Fe²⁺, 2-oksoglutaranu, białka substratowego i askorbinianu [121,122].

1.8. Hipoksja

Przestrzenne rozmieszczenie oraz ilość białka hydroksylaz prolinowych i czynnika indukowanego hipoksją uzależnione jest od stopnia rozwoju naczyń krwionośnych w tkance i związane z istnieniem gradientu stężenia tlenu [123], w kierunku od naczyń do najdalej położonych komórek. W miejscach niskiego ciśnienia parcjalnego tlenu aktywność katalityczna hydroksylaz jest hamowana [115,124,125]. Wiąże się to ze stabilizacją podjednostki α białka HIF, jej translokacją do jądra komórkowego, dimeryzacją z podjednostką β , związaniem czynników transkrypcyjnych CBP/p300 [41] (Rycina 3) oraz aktywacją ekspresji genów indukowanych hipoksją [92] (Tabela 4). W przypadku linii komórkowych podjednostka α ulega stabilizacji przy stężeniu tlenu poniżej 5% [126].

Podczas długotrwałej hipoksji, w celu degradacji nadmiaru białka HIF- α , dochodzi do nasilenia ekspresji hydroksylaz prolinowych *EGLN1* i *EGLN3* [127-131] posiadających w obrębie promotora sekwencje HRE [90-92]. Wynikiem tego procesu jest przywrócenie właściwej równowagi pomiędzy stabilizacją i degradacją białka HIF- α , chroniące tym samym komórkę przed wejściem w stan apoptozy.

Wzrost ilości białka HIF- α nie jest związany jedynie ze stanem hipoksji. Oddziaływanie podjednostki α z różnymi czynnikami [132], a także właściwości biochemiczne hydroksylaz prolinowych wpływają na jej stabilizację w warunkach normoksji. Białka EGLN mają niskie powinowactwo do tlenu z wartością K_M zbliżoną do ciśnienia parcjalnego tlenu w temperaturze pokojowej. Ciśnienie to jest znacznie wyższe od najwyższego ciśnienia parcjalnego tlenu w ludzkim organizmie [116], dlatego też hydroksylazy nie wykazują maksymalnej aktywności katalitycznej w tkankach. Po drugie enzymy te nie występują w komórce w dużym nadmiarze [133-135], co sprzyja stabilizacji białka HIF- α w warunkach dostatecznej ilości tlenu w organizmie.

1.9. Metylacja DNA

Metylacja DNA jest kluczowym elementem kontrolującym rozwój zarodkowy, inaktywację chromosomu X, imprinting genów, wpływa na tkankowo specyficzną ekspresję genów, a także bierze udział w rozwoju wielu nowotworów [136]. Modyfikacja ta w przeciwieństwie do zmian genetycznych, jest całkowicie odwracalna. Dla procesu transformacji nowotworowej istotne znaczenie ma hiper- jak i hipometylacja DNA. Hipermetylacja dotyczy najczęściej sekwencji zlokalizowanych w promotorze i pierwszym eksonie genów określanych jako supresory transformacji nowotworowej – TSG (*ang. Tumor Suppressor Gene*) i związana jest z wyłączeniem ekspresji określonego genu. Podstawową funkcją TSG jest kontrolowanie prawidłowego wzrostu komórki oraz uniemożliwienie komórkom uzyskania fenotypu nowotworowego [137,138]. Zaburzenia w ekspresji TSG związane np. z metylacją sekwencji promotorowej uniemożliwiają prawidłową kontrolę wzrostu komórki, a tym samym umożliwia komórce transformację nowotworową.

Z kolei hipometylacja dotyczy globalnie całego DNA komórki, w tym sekwencji regulatorowych, powodując aktywację transkrypcyjną protoonkogenów, retrotranspozonów, niestabilność genetyczną, co promuje metastazę komórek nowotworowych [139]. Aktywacja protoonkogenów do onkogenów powoduje zaburzenie w regulacji ekspresji wielu genów np. genów regulujących cykl komórkowy czy też cytoplazmatyczną transdukcję sygnału, prowadząc do transformacji nowotworowej [139,140].

Metylacja DNA związana jest z przyłączeniem grupy metylowej do pozycji 5' pierścienia pirymidynowego cytozyny w dinukleotydzie CG (CpG). Obecność 5-metylocytozyny (m^5C) po raz pierwszy zaobserwował Hotchkiss [141] w DNA wyższych *Eucarioty* w 1948 roku. Modyfikacje epigenetyczne związane z metylacją DNA definiuje się jako dziedziczne, odwracalne zmiany w ekspresji genów, które nie wynikają ze zmian w sekwencji DNA [140,142-145]. Zmiany te, pomimo iż są w pełni odwracalne, są niezwykle trwałe i w sposób znaczący wpływają na ekspresję genów [146]. Najczęściej występującym efektem metylacji DNA jest zablokowanie procesu transkrypcji, a tym samym obniżenie ekspresji określonego genu [147]. U ssaków m^5C zlokalizowana jest głównie w tzw. wyspach CpG, znajdujących się w sekwencji promotorowej i eksonie pierwszym wielu genów. Wyspami CpG nazywamy fragmenty DNA o długości od 500 do kilku tysięcy par zasad (kpz), w których dinukleotyd CpG stanowi 60-70% [143,147-149]. Ludzki genom zawiera około 29000 wysp CpG [150], a połowa znanych genów zawiera je w obrębie swojego promotora [140,151]. Całkowicie metylowane wyspy CpG występują jedynie w promotorach niektórych genów autosomalnych oraz w nieaktywnym, żeńskim chromosomie X [146].

Za metylację DNA odpowiada rodzina enzymów zwana metylotransferazami DNA. Dzielą się one na metylotransferazę podtrzymującą metylację DNA (DNMT1) jak i na metylotransferazy metylujące DNA *de novo* (DNMT3A i DNMT3B) [152]. W komórkach somatycznych metylotransferaza DNMT1 wykorzystuje do reakcji hemimetylowany DNA. Jest ona częścią kompleksu replikacyjnego [153] i odpowiada za nadanie prawidłowego wzoru metylacji nowo syntetyzowanej nici DNA (143,149,152,153). Natomiast metylotransferazy *de novo* wykazują zdolność dołączania grup metylowych do DNA niemetylowanego i odpowiadają za nadanie nowego wzoru metylacji, który jest utrwalany w czasie kolejnych podziałów przez metylotransferazę DNMT1 [136,152].

Metylacja DNA wpływa na zahamowanie procesu transkrypcji w dwojaki sposób. Po pierwsze metylacja może modyfikować miejsca wiązania dla czynników transkrypcyjnych. Jeżeli czynnik transkrypcyjny zlokalizowany jest w obrębie wyspy CpG, a w sekwencji DNA rozpoznawanej przez ten czynnik znajduje się dinukleotyd CG, to po przyłączeniu grupy metylowej czynnik ten nie będzie mógł prawidłowo rozpoznać miejsca wiązania na DNA. Przykładem czynników transkrypcyjnych wrażliwych na metylację mogą być AP-2, c-Myc/Myn, E2F i NFκB [136]. Po drugie metylowany DNA może być rozpoznany przez białka wiążące $m^5\text{CpG}$. Należą do nich białka wiążące $m^5\text{CpG}$ – MeCP (*ang. m⁵CpG binding protein*) oraz białka zawierające domenę wiążącą $m^5\text{CpG}$ – MBD (*ang. m⁵CpG binding domain proteins*) [154]. Wśród białek MeCP wyróżniamy MeCP1 oraz MeCP2, które wiążą się specyficznie z metylovanym DNA w obrębie całego genomu tworząc przestrzenną przeszkodę uniemożliwiającą związanie się czynników transkrypcyjnych z sekwencją promotorową genu. Białko MeCP1 wiąże się z DNA, w którym metylacji uległo co najmniej 10 kolejnych dinukleotydów CG, natomiast MeCP2 posiada zdolność do wiązania się z DNA w którym metylacji uległ co najmniej jeden dinukleotyd CG [154]. Do rodziny białek MBD zalicza się MBD1, MBD2, MBD3, MBD4 oraz Kaiso kompleks. Białka te posiadają odmienne funkcje. MBD1 wiąże się do symetrycznie metylovanym dinukleotydów CG blokując w ten sposób miejsca wiązania się dla czynników transkrypcyjnych w obrębie sekwencji promotorowej [155]. Białko MBD2 wiąże się z metylovanym DNA i posiada zdolność aktywnej demetylacji DNA zarówno w warunkach *in vivo* jak i *in vitro* [156]. MBD3 bezpośrednio oddziałuje z białkiem MBD2 oraz jest częścią kompleksu białkowego, którego funkcją są zmiany w strukturze chromatyny [157]. MBD4 posiada aktywność glikozylazy tyminy i uracylu przez co jest zaangażowany w proces naprawy DNA związany z deaminacją $m^5\text{C}$ do C [158,159].

Proces transformacji nowotworowej wiąże się nie tylko z metylacją DNA ale również obserwuje się proces hipometylacji dużych fragmentów DNA. Globalną hipometylację DNA obserwuje się w różnego typu nowotworach i wiąże się ona ze zwiększoną ekspresją protoonkogenów, czynników wzrostu czy genów, których produkty białkowe wpływają na proliferację, inwazyjność i metastazę komórek nowotworowych [140]. Hipometylacja może również dotyczyć sekwencji retrotranspozonowych zlokalizowanych w DNA, co prowadzi do niestabilności genetycznej wywołanej insercyjną mutagenezą i rekombinacją pomiędzy nieallelicznymi powtórzeniami. Przykładem sekwencji retrotranspozonowych są sekwencje określane jako LINEs (*ang. long interspersed nuclear elements*), które są silnie metylowane we wszystkich typach komórek u zwierząt i jest to mechanizm obronny komórek gospodarza przed aktywacją LINEs [160]. Hipometylacja LINEs powoduje ich transkrypcyjną aktywację, która powoduje destabilizację genetyczną prowadzącą do progresji nowotworu [160].

2. CELE PRACY

1. Porównanie ekspresji wybranych genów zaangażowanych w proces hipoksji pomiędzy tkanką nowotworową raka szyjki macicy a tkanką histopatologicznie niezmienną zwaną dalej tkanką kontrolną.
2. Próba określenia regulacji ekspresji kluczowych genów zaangażowanych w proces hipoksji.
3. Korelacja ekspresji genu *HIF-1A* z ekspresją genów zaangażowanych w proces hipoksji i progresję nowotworu.

3 MATERIAŁY I METODY

3.1. Materiał kliniczny

Tkanki do badań pozyskano od 30 pacjentek hospitalizowanych w Wielkopolskim Centrum Onkologii w Poznaniu na Oddziale Radioterapii i Onkologii Ginekologicznej. Badanie histopatologiczne potwierdziło występowanie płaskonabłonkowego raka szyjki macicy u wszystkich badanych pacjentek. Grupę kontrolną stanowił materiał pobrany od 30 pacjentek hospitalizowanych w Klinice Ginekologii Operacyjnej Katedry Ginekologii, Położnictwa i Onkologii Ginekologicznej przy ul. Polnej w Poznaniu, które przeszły operację usunięcia macicy z powodu mięśniaków macicy. W badaniu histopatologicznym materiału kontrolnego potwierdzono obecność prawidłowego nabłonka pokrywającego tarczę i kanał szyjki macicy. W analizowanych tkankach nie wykazano zmian zapalnych lub o charakterze dysplazji. Badania uzyskały akceptację Komisji Biotycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Charakterystyka kliniczna pacjentek została przedstawiona w Tabeli 5.

Tabela 5. Charakterystyka kliniczna pacjentek.

Charakterystyka	Pacjentki (n=30)	Kontrole (n=30)
Średnia wieku (lata) ± SD	52,6 ±11,7	48,2±6,8
Stopień zaawansowania		
II	1 (3,3%)	–
III	28 (93,4%)	–
IV	1 (3,3%)	–
Typ histologiczny		
G1	1(3,3%)	–
G2	18 (60,0%)	–
G3	11 (36,7%)	–

3.2. Odczynniki

3.2.1. Izolacja oraz pomiar stężenia RNA, DNA i białka

Odczynniki:

Woda dejonizowana	- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Niemcy
Tri Reagent	- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Niemcy
Bufor do izolacji białek RIPA	- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Niemcy
Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit	- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Niemcy
Eter dietylowy kwasu pirowęglowego	- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Niemcy
DNaza I rekombinowana	- Roche Diagnostics GmbH, Niemcy
Koktajl inhibitorów proteaz	- Roche Diagnostics GmbH, Niemcy
Chloroform	- Polskie Odczynniki Chemiczne
Alkohol izopropylowy	- Polskie Odczynniki Chemiczne
Alkohol etylowy	- Polskie Odczynniki Chemiczne
Zestaw do izolacji genomowego DNA	- BioBasic Inc., Kanada
Proteinaza K (20 mg/ml)	- BioBasic Inc., Kanada

Sprzęt:

Wirówka z chłodzeniem (Centrifuge 5804R)	- Eppendorf AG, Niemcy
Termoblok (Thermomixer Comfort)	- Eppendorf AG, Niemcy
Spektrofotometr (Bio Photometer)	- Eppendorf AG, Niemcy
Komora laminarna (BioAir Aura Mini)	- Euroclone, Włochy

3.2.2. Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelu agarozowym

Odczynniki:

Agaroza	- BioShop, Kanada
10×stężony koncentrat buforu TBE	- BioShop, Kanada
Bromek etydyny	- BioShop, Kanada
Marker wielkości DNA (GeneRuler 100bp)	- Fermentas, Litwa
Bufor obciążający 6×SB do DNA i RNA	- Fermentas, Litwa
Zestaw do izolacji DNA z żelu agarozowego	- Roche Diagnostics GmbH, Niemcy

Sprzęt:

Aparat do elektroforezy (multiSub Maxi)	- Biocom, Wielka Brytania
Zasilacz (Elite 300)	- Wealtec Inc., USA
System dokumentacji żeli (MiniBis Pro)	- DNR Bio-Imaging Systems, Izrael

3.2.3. Amplifikacja kwasów nukleinowych (odwrotna transkrypcja, PCR, Q-

PCR)

Odczynniki:

Woda dejonizowana	- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Niemcy
M-MLV odwrotna transkryptaza	- Invitrogen, USA
Zestaw IQ Sybr Green Supermix	- Bio-Rad Laboratories, USA
Zestaw Dream Taq DNA Polymerase	- Fermentas, Litwa
Zestaw FastStart Taq DNA Polymerase	- Roche Diagnostics GmbH, Niemcy
Oligonukleotydy	- IBB PAN, Polska
Mieszanina deoksynukleotydów	- Novazym, Polska

Sprzęt:

Wirówka (Centrifuge 5418)	- Eppendorf AG, Niemcy
Komora laminarna (BioAir Aura Mini)	- Euroclone, Włochy
Termocykler PTC-200	- MJ Research, USA
CFX96 Real-Time System	- Bio-Rad Laboratories, USA

3.2.4. Elektroforetyczny rozdział białek (western blot)

Odczynniki:

Tris zasadowy	- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Niemcy
Tris-HCL	- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Niemcy
Siarczan dodecyłu sodu	- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Niemcy
Nadsiarczan amonu	- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Niemcy
TEMED	- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Niemcy
Ponceau S	- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Niemcy
β -merkaptoetanol	- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Niemcy
Standard białkowy BSA 1mg/ml	- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Niemcy
Glicyna	- Polskie Odczynniki Chemiczne
Metanol	- Polskie Odczynniki Chemiczne
Tween (R) 20	- Polskie Odczynniki Chemiczne
Kwas octowy	- Polskie Odczynniki Chemiczne
Bromofenol	- Polskie Odczynniki Chemiczne
Marker masy białek (PageRuler)	- Fermentas, Litwa
SuperSignal West Femto Substrat	- Thermo Scientific, USA
40% akrylamid/bisakrylamid	- Bio-Rad Laboratories, USA

Membrana do transferu białek PVDF	- Roche Diagnostics GmbH, Niemcy
Bibuły do półsuchego transferu białek	- GE Healthcare, Wielka Brytania
<i>Sprzęt:</i>	
Termoblok (Thermomixer Comfort)	- Eppendorf AG, Niemcy
Wirówka (Centrifuge 5418)	- Eppendorf AG, Niemcy
Mieszadło orbitalne (Multi Bio RS-24)	- Biosan, Litwa
Zasilacz (Elite 300)	- Wealtec Inc., USA
Aparat do półsuchego transferu Yrdimes	- Wealtes Inc., USA
System do detekcji chemiluminescencji	- UVP, Wielka Brytania
Aparat do rozdziłu białek (Mini Protean)	- Bio-Rad Laboratories, Niemcy

3.2.5. Deaminacja genomowego DNA oraz przygotowanie i transformacja komórek kompetentnych *E. coli* szczepu TOP10

Odczynniki:

Zestaw do deaminacji genomowego DNA	- Zymo Research, USA
Zestaw do izolacji plazmidowego DNA	- Promega, USA
Izopropylotiogalaktozyd (IPTG)	- Promega, USA
X-Gal	- Promega, USA
pGEM-T Easy Vector System	- Promega, USA
Woda dejonizowana	- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Niemcy
Pożywka bakteryjna płynna LB Broth	- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Niemcy
Pożywka bakteryjna stała LB Agar	- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Niemcy
C ₂ H ₃ KO ₂	- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Niemcy
RbCl	- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Niemcy
CaCl ₂	- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Niemcy
MnCl ₂	- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Niemcy
Bufor MOPS	- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Niemcy
Ampicylina	- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Niemcy
NP-40	- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Niemcy
Glicerol	- Polskie Odczynniki Chemiczne
Komórki bakteryjne <i>E. coli</i> szczep TOP10	- Invitrogen, USA

Sprzęt:

Termoblok (Thermomixer Comfort)	- Eppendorf AG, Niemcy
Wirówka (Centrifuge 5418)	- Eppendorf AG, Niemcy
Spektrofotometr (Bio Photometer)	- Eppendorf AG, Niemcy
Mieszadło magnetyczne (MMS-3000)	- Biosan, Litwa
Aparat do pomiaru pH	- Hanna Instruments, USA
Komora do pracy z bakteriami	- Polon, Polska
Cieplarka do hodowli bakterii	- Laboratorni Pastroje, Czechy
Wytrząsarka do hodowli bakteryjnych	- Johanna Otto GmbH, Niemcy

3.2.6. Sprzęt jednorazowy oraz drobny sprzęt trwały

15 ml probówki polipropylenowe	- Becton-Dickinson Biosciences, USA
50 ml probówki polipropylenowe	- Becton-Dickinson Biosciences, USA
2,0 ml probówki do mrożenia w azocie	- Techno Plastic Products AG, Szwajcaria
1,5 ml probówki polietylenowe	- Axygen Scientific, USA
0,2 ml probówki do reakcji PCR	- Axygen Scientific, USA
10 µl końcówki do pipety	- Axygen Scientific, USA
200 µl końcówki do pipety	- Axygen Scientific, USA
1000 µl końcówki do pipety	- Axygen Scientific, USA
Płytki do reakcji Q-PCR	- Bio-Rad Laboratories, Niemcy
Płytki Petriego do hodowli bakteryjnych	- Nerbe plus GmbH, Niemcy
Plastikowe pipety Pasteura 3ml	- DHN, Polska
Kuweta do pomiaru spektrofotometrycznego	- Eppendorf AG, Niemcy
0,1-2,5 µl pipeta zmiennie objętościowa	- Eppendorf AG, Niemcy
0,5-10 µl pipeta zmiennie objętościowa	- Eppendorf AG, Niemcy
10-100 µl pipeta zmiennie objętościowa	- Eppendorf AG, Niemcy
100-1000 µl pipeta zmiennie objętościowa	- Eppendorf AG, Niemcy

3.3. Bufory

3.3.1. Bufor glicynowy 1× stężony

Odczynnik	Stężenie końcowe
Tris zasadowy	0,024 M
Glicyna	0,19 M
SDS	1%

3.3.2. Bufor do transferu 1× stężony

Odczynnik	Stężenie końcowe
Tris zasadowy	0,032 M
Glicyna	0,24 M
SDS	0,17%

3.3.3. Bufor TBS 1× stężony

Odczynnik	Stężenie końcowe
Tris zasadowy	0,01 M
NaCl	0,15 M

3.3.4. Bufor TBST 1× stężony

Odczynnik	Stężenie końcowe
Tris zasadowy	0,01 M
NaCl	0,15 M
Tween 20	0,1%

3.3.5. Bufor TBST-M 1× stężony

Odczynnik	Stężenie końcowe
Tris zasadowy	0,01 M
NaCl	0,15 M
Tween 20	0,1%
Mleko w proszku	1%

3.3.6. Bufor blokujący TBST-B 1× stężony

Odczynnik	Stężenie końcowe
Tris zasadowy	0,01 M
NaCl	0,15 M
Tween 20	0,1%
Mleko w proszku	5%

3.3.7. Bufor do odmywania przeciwciał

Odczynnik	Stężenie końcowe
Glicyna	0,2 M
SDS	0,1%
Tween 20	1%
Ustalić pH=2,2	

3.3.8. Bufor Ponceau S

Odczynnik	Stężenie końcowe
Ponceau S	1%
Kwas octowy	7%

3.3.9. Bufor obciążający do rozdzielania białek 3× stężony

Odczynnik	Stężenie końcowe
Tris kwasowy	0,24 M
SDS	6%
Glicerol	30%
Bromofenol	0,06%
β-merkaptoetanol	1,6%

3.3.10. Bufor Tbf1 do przygotowania komórek kompetentnych

Odczynnik	Stężenie końcowe
C ₂ H ₃ KO ₂	0,03 M
RbCl	0,1 M
CaCl ₂	0,01 M
MnCl ₂	0,05 M
Glicerol	15%

Ustalić pH=5,8; filtrować przez filtr 0,22 µm

3.3.11. Bufor Tbf2 do przygotowania komórek kompetentnych

Odczynnik	Stężenie końcowe
MOPS	0,01 M
RbCl	0,01 M
CaCl ₂	0,075 M
Glicerol	15%

Ustalić pH=6,5; filtrować przez filtr 0,22 µm

3.3.12. Żel poliakrylamidowy zagęszczający do rozdzielania białek

Odczynnik	Stężenie końcowe
Akrylamid/bisakrylamid	5%
Tris kwasowy 0,375 M; pH=6,8	0,1 M
SDS	0,1%
APS	0,05%
TEMED	0,15%

3.3.13. Żel poliakrylamidowy rozdzielający do rozdzielania białek

Odczynnik	Stężenie końcowe
Akrylamid/bisakrylamid	10%
Tris kwasowy 1 M; pH=8,8	0,25 M
SDS	0,1%
APS	0,05%
TEMED	0,15%

3.4. Metody

3.4.1. Homogenizacja tkanek w ciekłym azocie

Tkanki przechowywane w -80°C poddano homogenizacji w ciekłym azocie z wykorzystaniem moździerza porcelanowego. Przed homogenizacją moździerz wraz z trzpieniem schłodzone w ciekłym azocie. Do tak przygotowanego moździerza podano niewielką ilość ciekłego azotu oraz przeniesiono fragment tkanki. Tkanekę rozcierano do momentu uzyskania jednolitego homogenatu. Następnie roztartą tkankę przeniesiono do schłodzonej w ciekłym azocie 2,0 ml probówki do mrożenia w ciekłym azocie. Tak przygotowane próbki przechowywano do momentu użycia w temperaturze -80°C .

3.4.2. Izolacja całkowitego RNA z tkanek

Izolację całkowitego RNA prowadzono pod komorą z laminarnym przepływem powietrza. Do izolacji całkowitego RNA z tkanek wykorzystano odczynnikiem Tri Reagent. Izolację przeprowadzono wg metody Chomczyńskiego i Sacchi [161]. 20 mg homogenizowanej tkanki przeniesiono do 1,5 ml probówki polietylenowej schłodzonej w ciekłym azocie. Do próby podano 1 ml odczynnika Tri Reagent i mieszano z użyciem mieszadła typu vortex w celu dokładnego rozpuszczenia komórek zawartych w homogenacie. Po dokładnym wymieszaniu próbę inkubowano przez 3 minuty w temperaturze pokojowej. Następnie do próby dodano 0,2 ml chloroformu, wytrząsano energicznie przez 30 sekund i inkubowano przez 3 minuty w temperaturze pokojowej w celu wstępnego rozdzielania fazy wodnej i organicznej. Po tym czasie, probówki wirowano przez 15 minut, $12000\times g$ w temperaturze 4°C . Po wirowaniu górną fazę wodną (ok. 0,7 ml) zawierającą całkowity RNA przeniesiono do nowych 1,5 ml probówek polietylenowych. W celu wytrącenia całkowitego

RNA z roztworu do zebranej fazy wodnej dodano 0,7 ml izopropanolu schłodzonego do temperatury -25°C . Próby wymieszano przez odwracanie i inkubowano w temperaturze -80°C przez 30 minut. Następnie próbki wirowano przez 15 minut, $12000\times g$ w temperaturze 4°C w celu osadzenia wytrąconego całkowitego RNA. Po zakończeniu wirowania supernatant odrzucono a osad zawierający całkowity RNA płukano 1 ml 75% etanolu przygotowanego z użyciem autoklawowanej wody dejonizowanej zawierającej 0,1% roztwór DEPC. Całkowity RNA osadzono ponownie przez wirowanie przez 15 minut, $20000\times g$ w temperaturze -9°C . Po wirowaniu supernatant dokładnie odrzucono, a osad zawierający RNA suszono pod komorą laminarną na lodzie przez 10–15 minut. Do uzyskanego osadu podano 44 μl wody dejonizowanej i inkubowano go w termobloku w temperaturze 60°C przez 20 minut. Po rozpuszczeniu uzyskany całkowity RNA poddano działaniu DNazyI w celu usunięcia zanieczyszczenia genomowym DNA.

3.4.3. Trawienie całkowitego genomowego DNA z wykorzystaniem DNazyI

Izolowany całkowity RNA poddano działaniu DNazyI w celu usunięcia zanieczyszczeń genomowym DNA. Reakcję trawienia przygotowano pod komorą z laminarnym przepływem powietrza w 1,5 ml próbkach polietylenowych. Reakcję trawienia genomowego DNA przygotowano według schematu przedstawionego poniżej:

RNA całkowity	44 μl
10 \times stężony bufor do trawienia	5 μl
DNazaI rekombinowana [10 U/ μl]	1 μl
	<hr/>
	50 μl

Reakcję trawienia prowadzono w termobloku w temperaturze 37°C przez 30 minut. W celu inaktywacji enzymu do mieszaniny podano 1 ml odczynnika Tri Reagent. Następnie przeprowadzono ponownie izolację całkowitego RNA zgodnie z opisem z rozdziału 3.4.2. Ponowne zastosowanie odczynnika Tri Reagent umożliwia uzyskanie maksymalnie czystego całkowitego RNA. RNA izolowany po trawieniu DNazaI rozpuszczono w 15 μl wody dejonizowanej w temperaturze 60°C przez 20 minut. Ilość oraz jakość uzyskanego RNA zbadano z wykorzystaniem pomiaru spektrofotometrycznego oraz elektroforezy w żelu agarozowym. Wyizolowany całkowity RNA przechowywano w temperaturze -80°C .

3.4.4. Spektrofotometryczny pomiar stężenia RNA oraz elektroforeza RNA w żelu agarozowym

Ilość uzyskanego całkowitego RNA zmierzono spektrofotometrycznie wykorzystując pomiar przy długości fali światła $\lambda=260$ nm. Do pomiaru całkowitej ilości RNA wykorzystano spektrofotometr BioPhotometer oraz kuwety UVette. Próby do pomiaru przygotowano mieszając 2 μ l wyizolowanego całkowitego RNA z 98 μ l wody dejonizowanej. Próbę odniesienia stanowiła czysta woda dejonizowana.

Jakość uzyskanego całkowitego RNA sprawdzano z wykorzystaniem techniki elektroforezy w 1,0% żelu agarozowym w buforze $1\times$ TBE. W tym celu 1 μ g RNA wymieszano z buforem obciążającym i naniesiono na żel zawierający bromek etydydy. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przy napięciu 5 V/cm przez 45 minut. Pążki RNA uwidoczniono w świetle UV z wykorzystaniem systemu dokumentacji żeli MiniBis Pro.

3.4.5. Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT-PCR)

Reakcję odwrotnej transkrypcji przygotowano pod komorą z laminarnym przepływem powietrza. Do syntezy cDNA na matrycy całkowitego RNA wykorzystano komercyjny zestaw firmy Invitrogen. Reakcję odwrotnej transkrypcji podzielono na dwa etapy. Pierwszy etap ma na celu specyficzne związanie startera (oligonukleotyd poli-dT₍₂₃₎), który jest niezbędny do reakcji katalizowanej przez odwrotną transkryptazę (M-MLV). Odwrotna transkryptaza jest polimerazą DNA zależną od RNA, która do syntezy nici cDNA na matrycy mRNA wymaga obecności krótkiego startera umożliwiającego rozpoczęcie syntezy. Starter ten łączy się specyficznie z sekwencją polinukleotydową poli-(A) zlokalizowaną na końcu 3' transkryptów mRNA. W celu połączenia startera poli-dT₍₂₃₎ z sekwencją poli-(A) w mRNA próbkę zawierającą 1 μ g całkowitego RNA inkubuje się w obecności startera w temperaturze 65°C. Inkubacja ta powoduje zniesienie struktur wyższego rzędu w cząsteczce mRNA przez co sekwencja poli-(A) 3'-końca mRNA staje się dostępna dla startera poli-dT₍₂₃₎. Szybkie schłodzenie próbki do 4°C umożliwia trwałe, specyficzne związanie startera z sekwencją poli-(A). W drugim etapie do mRNA z związanym starterem podaje się enzym – odwrotną transkryptazę wraz z buforami umożliwiającymi jej optymalne działanie. Przygotowaną mieszaninę reakcyjną, o objętości końcowej 20 μ l, inkubuje się przez godzinę w 37°C w celu przepisania sekwencji mRNA na cDNA. Uzyskany w ten sposób cDNA wykorzystywany jest w łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym. Poniżej przedstawiono skład mieszaniny reakcyjnej wykorzystywanej w pierwszym (Mieszanina A) i drugim (Mieszanina

B) etapie reakcji odwrotnej transkrypcji oraz podano profile termiczne i czasowe dla przeprowadzonej reakcji.

Mieszanina A

Oligonukleotyd poli-dT ₍₂₃₎ [100 mM]	1 µl
dNTPs [2,5 mM]	4 µl
RNA [1 µg]	8,25 µl

Inkubacja 5 minut w 65°C, 3 minuty w 4°C

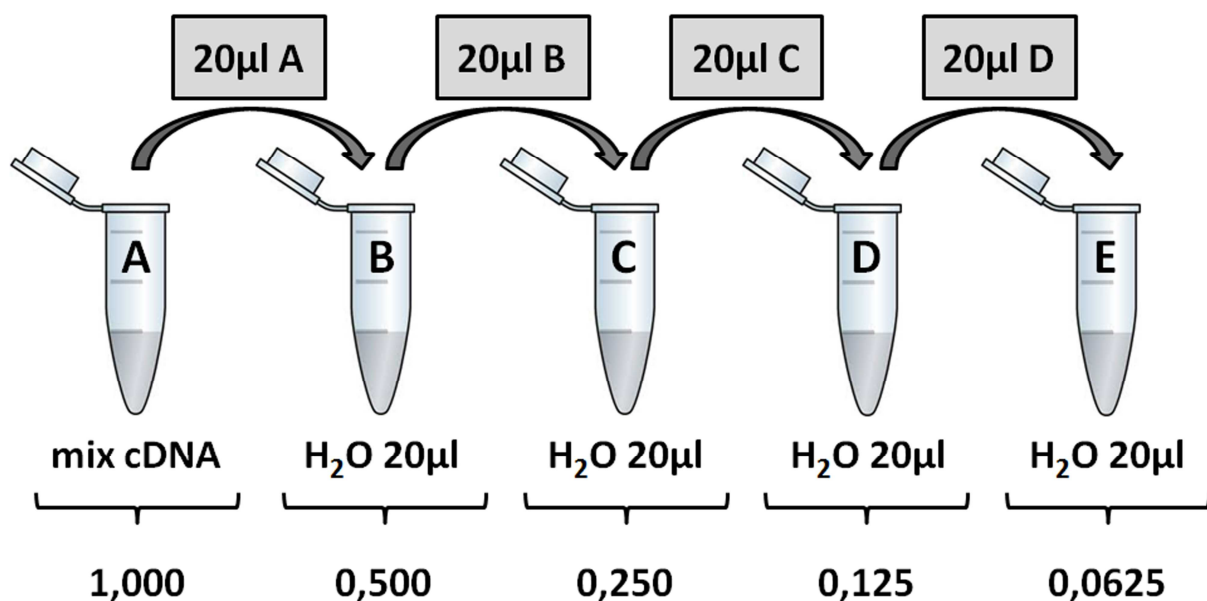
Mieszanina B

5× stężony bufor do odwrotnej transkrypcji	4 µl
DTT [0,1 M]	2 µl
RNaseOUT [40 U/µl] inhibitor RNaz	0,25 µl
M-MLV [200 U/µl] odwrotna transkryptaza	0,5 µl

Inkubacja 60 minut w 37°C, 15 minut w 75°C, schłodzenie do 4°C

3.4.6. Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (Q-PCR)

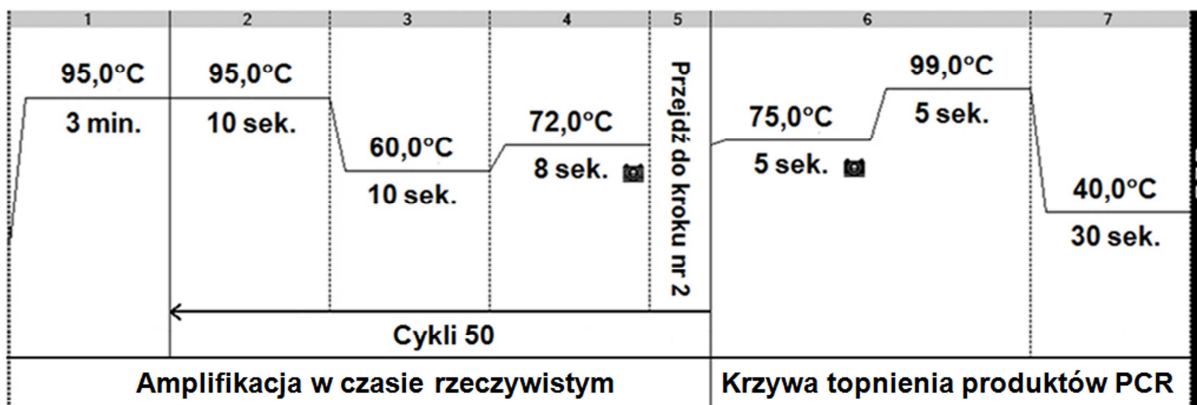
Reakcję Q-PCR przygotowano pod komorą z laminarnym przepływem powietrza. Wykorzystując reakcję Q-PCR określono względną ilość transkryptów badanych genów w tkankach nowotworowych i histopatologicznie niezmiennych w odniesieniu do krzywej standardowej. Matrycą do przeprowadzonej reakcji był cDNA uzyskany w reakcji odwrotnej transkrypcji. Pierwszym etapem, który należało wykonać przed rozpoczęciem właściwych pomiarów, było przygotowanie krzywej standardowej. Krzywe standardowe przygotowano niezależnie dla każdego analizowanego genu. Krzywa standardowa umożliwia precyzyjne oznaczenie wydajności przeprowadzonej reakcji. Wydajność ta liczona jest ze wzoru $E=10^{-1/\text{slope}}$, gdzie E oznacza wydajność amplifikacji, natomiast “slope” określa stopień nachylenia krzywej wzorcowej względem osi x. Uzyskanie maksymalnej wydajności prowadzonej reakcji jest niezwykle istotne, ponieważ prawidłowa interpretacja uzyskanych wyników możliwa jest jedynie przy uzyskaniu wydajności amplifikacji w przedziale 95%–105%. Do przygotowania krzywej standardowej, niezależnej dla każdego analizowanego genu, wykorzystano mieszaninę matryc cDNA. W tym celu wymieszano po 1 µl cDNA pochodzącego z każdej z tkanek nowotworowych jak i histopatologicznie niezmiennych. Następnie wykorzystując mieszaninę matryc cDNA przygotowano serię pięciu rozcieńczeń cDNA uzyskując końcowo rozcieńczenia 1,000; 0,500; 0,250; 0,125 i 0,0625. Sposób przygotowania rozcieńczeń cDNA obrazuje Rycina 4.



Rycina 4. Sposób przygotowania rozcieńczeń cDNA do krzywej standardowej.

Reakcję Q-PCR przeprowadzono z wykorzystaniem aparatu CFX96 Real-Time System firmy Bio-Rad oraz komercyjnego zestawu IQ Sybr Green Supermix (Bio-Rad), w którym barwnikiem fluorescencyjnym podlegającym detekcji jest Sybr Green. Sekwencje badanych genów (*EGLN1*, *HIF-1A*, *VHL*, *CXCR4*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *DNMT1*, *HMBS*) uzyskano w bazie danych Ensembl (www.ensembl.org). Startery były projektowane z użyciem programu Oligo 5.0. Sekwencję oligonukleotydów wykorzystanych w reakcji Q-PCR przedstawia Tabela 6. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil termiczny reakcji podano poniżej.

2× stężony IQ Sybr Green Supermix	5,0 µl
Starter forward [5 µM]	0,5 µl
Starter reverse [5 µM]	0,5 µl
Matryca cDNA	1,0 µl
H ₂ O dejonizowana	3,0 µl
	<hr/>
	10 µl



- 95,0°C przez 3 minuty
- 95,0°C przez 10 sekund
- 60,0°C przez 10 sekund
- 72,0°C przez 10 sekund + pojedynczy odczyt fluorescencji
- 75,0°C przez 5 sekund
- 99,0°C przez 5 sekund } ciągły odczyt fluorescencji
- 40,0°C przez 30 sekund

Detekcja produktów PCR z wykorzystaniem barwnika fluorescencyjnego Sybr Green jest najprostszą i najmniej kosztowną z metod. Jest to jednak metoda niespecyficzna i najbardziej podatna na błędy, ponieważ Sybr Green emituje światło o określonej długości po związaniu się z każdym dwuniciowym DNA. Niespecyficzność i błędy mogą wynikać wskutek wiązania się Sybr Green ze strukturą primer-dimer. Struktura ta powstaje w wyniku wiązania się częściowo do siebie komplementarnych sekwencji starterów. Niespecyficzny sygnał może także pochodzić z obecności innych niespecyficznych produktów reakcji PCR w mieszaninie. Aby wykluczyć obecność struktury primer-dimer oraz niespecyficznych produktów reakcji przeprowadzono analizę krzywej topnienia amplifikowanego fragmentu. Analiza krzywej topnienia polega na stopniowym podnoszeniu temperatury mieszaniny aż do momentu denaturacji DNA i pomiarze fluorescencji co 0,5°C. W momencie osiągnięcia temperatury topnienia produktu następuje bardzo gwałtowna denaturacja i ostry spadek fluorescencji. Na krzywej topnienia można to zaobserwować w postaci piku. Jeżeli

przeprowadzona reakcja Q-PCR jest wysoce specyficzna uzyskujemy tylko jeden specyficzny produkt, który daje nam jeden specyficzny pik na wykresie krzywej topnienia. Specyficzność uzyskanych produktów w reakcji Q-PCR była także sprawdzona z wykorzystaniem techniki elektroforezy w 2,5% żelu agarozowym w buforze 1× TBE. Po zakończonej reakcji Q-PCR całość mieszaniny (10 µl) wymieszano z buforem obciążającym i naniesiono na żel agarozowy zawierający bromek etydyny. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przy napięciu 5 V/cm przez 30 minut. Produkty Q-PCR uwidoczniono w świetle UV z wykorzystaniem systemu dokumentacji żeli MiniBis Pro.

Tabela 6. Sekwencje oligonukleotydów użytych w reakcji Q-PCR. Jako pozycję +1 przyjęto pierwszy nukleotyd egzonu pierwszego.

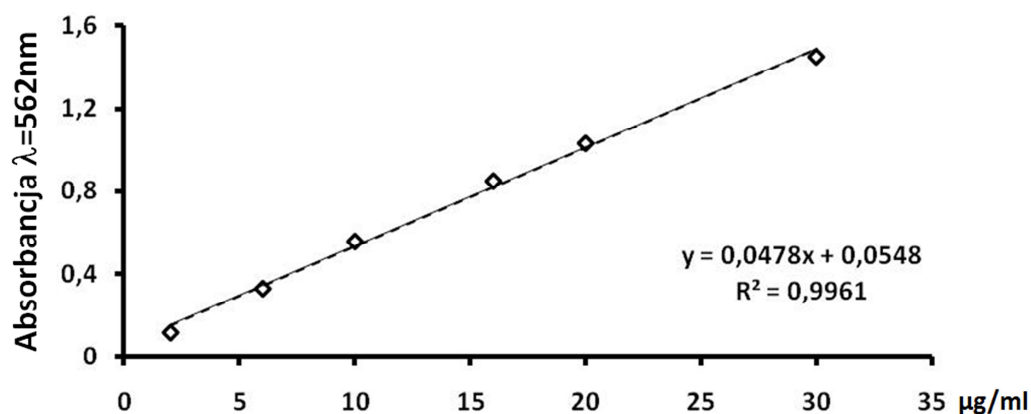
Gen	Sekwencje starterów (kierunek 5'-3')	Numer ENST	Pozycja	Produkt pz
<i>EGLN1</i>	TGCGAAACCATTTGGGCTGCT	00000366641	3952-3971	179
	GTCACACATCTTCCATCTCC		4111-4130	
<i>HIF-1A</i>	TTAGAACCAAATCCAGAGTCAC	00000337138	1716-1737	125
	TATTCACACTGGGACTATTAGGCT		1819-1840	
<i>VHL</i>	AACGGATGGGAGATTGAAGATT	00000256474	839-860	183
	CAATGCCTAGTGAAGTCAGTTA		1000-1021	
<i>CXCR4</i>	TTCTTAACTGGCATTGTGGG	00000241393	157-176	130
	GAAGCGTGATGACAAAGAGG		267-286	
<i>DNMT3A</i>	GGTGCTGTCTCTCTTTGATG	00000264709	2243-2262	178
	ATGCTTCTGTGTGACGCTG		2402-2420	
<i>DNMT3B</i>	GGAAGGAGTTTGGAATAGGG	00000328111	980-999	183
	CCAGTGCCACCAGTTTGTC		1144-1162	
<i>DNMT1</i>	GATGAGAAGAAGCACAGAAGT	00000359526	1128-1148	149
	TCTTTGGGGGTCGTTTTGCG		1257-1276	
<i>HMBS</i>	GCCAAGGACCAGGACATC	00000278715	833-850	160
	TCAGGTACAGTTGCCCATC		974-992	

3.4.7. Izolacja białka z tkanek

Białko izolowano z tkanki nowotworowej i histopatologicznie niezmięnionej. 20mg tkanki homogenizowanej w ciekłym azocie przeniesiono do 1,5 ml probówki polietylenowej zawierającej 50 μ l buforu RIPA zawierającego 10% roztwór inhibitorów proteaz. Tkanki inkubowano przez 1 godzinę w lodzie a następnie próby wirowano przez 10 minut, 10000 \times g w temperaturze 4°C w celu osadzenia resztek komórek nie ulegających lizie w buforze RIPA. Po wirowaniu lizat przeniesiono do nowej 1,5 ml probówki polietylenowej schłodzonej w lodzie. Do pomiaru stężenia białka użyto 5 μ l uzyskanego lisatu białkowego a pozostałą część zamrażano w -80°C do dalszego użycia.

3.4.8. Oznaczenie stężenia białka

Stężenie białka w uzyskanym lizacie oznaczono komercyjnym zestawem do oznaczania stężenia białek – Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (BCA). Metoda ta wykorzystuje zdolność tworzenia kompleksów przez jony Cu^{2+} z białkami w środowisku zasadowym. Jony Cu^{2+} ulegają redukcji do Cu^{1+} w obecności cysteiny, cystyny, tryptofanu, tyrozyny oraz wiązania peptydowego. W środowisku zasadowym kwas bicynchoninowy tworzy barwny kompleks z jonami Cu^{1+} , którego barwa jest proporcjonalna do stężenia białka w próbce badanej [162]. Przed pomiarem stężenia białek izolowanych buforem RIPA w pierwszej kolejności należało przygotować krzywą standardową. Do przygotowania krzywej użyto standardu białkowego, który stanowiła surowicza albumina wołowa (BSA) o stężeniu wyjściowym 1 mg/ml. W celu przygotowania krzywej standardowej do 1,5 ml probówek polietylenowych podano roztwór BSA, którego stężenie końcowe w poszczególnych punktach krzywej standardowej wynosiło 2, 6, 10, 26, 20, i 30 μ g/ml. Dodatkowo do każdej probówki podano 5 μ l buforu RIPA oraz 475 μ l roztworu roboczego BCA. Próbę odniesienia stanowiła mieszanina 20 μ l wody, 5 μ l buforu RIPA i 475 μ l roztworu roboczego BCA. Objętość końcowa próby użytej do pomiaru wynosiła 500 μ l. Tak przygotowane próby inkubowano w termobloku przez 15 minut w temperaturze 60°C. Następnie próby schłodzono do temperatury pokojowej i zmierzono absorbancję przy długości fali $\lambda=562\text{nm}$. Uzyskane dane posłużyły do przygotowania krzywej wzorcowej przedstawionej na Rycinie 5.



Rycina 5. Krzywa wzorcowa BSA

Przygotowana krzywa wzorcowa wykorzystana została do oznaczenia stężenia białek izolowanych z tkanek. W celu pomiaru stężenia białka w lizacie do 1,5 ml próbówki polietylenowej dodano 20 μl wody, 5 μl lizatu białkowego w buforze RIPA oraz 475 μl roztworu roboczego BCA. Przygotowanie próby odniesienia, inkubacja oraz pomiar prób badanych odbyły się identycznie jak przy wyznaczaniu krzywej standardowej. Do końcowego oznaczenia stężenia białka wykorzystano wzór matematyczny ($y=ax+b$) wyznaczony z krzywej standardowej. Po przekształceniu uzyskano wzór $x=(y-b)/a$, gdzie „x” oznacza stężenie białka w μg/ml, natomiast „y” oznacza absorbancję próby badanej. Wartości „a” oraz „b” zostały wyznaczone z krzywej standardowej. Aby określić stężenie białka w μg/μl skorzystano ze wzoru $[B]=(x \times D)/V$, gdzie „[B]” oznacza stężenie białka w μg/μl, „x” oznacza stężenie białka w μg/ml, „D” oznacza rozcieńczenie lizatu białkowego (100×), natomiast „V” oznacza objętość końcową próby użytej do pomiaru spektrofotometrycznego (500 μl).

3.4.9. Rozdział elektroforetyczny białek w żelu poliakrylamidowym

Do 1,5 ml próbek polietylenowych podano po 30 μg białka (5-10 μl w zależności od stężenia), 10 μl buforu denaturującego i uzupełniano wodą do objętości końcowej 20 μl. Przygotowane próby inkubowano w termobloku w temperaturze 99°C przez 10 minut, następnie schłodzono w lodzie przez 3 minuty i wirowano przez 30 sekund. Dodatkową próbę stanowiło 5 μl markera masy białka. Tak przygotowane próby nałożono na 10% żel poliakrylamidowy zawierający SDS i poddano rozdzielni elektroforetycznej. Elektroforezę przeprowadzano w aparacie Mini Protean firmy Bio-Rad w 1× stężonym buforze glicynowym schłodzonym przez noc do temperatury 4°C. Podczas całej elektroforezy stosowano stabilizację napięciem: 80 V podczas zagęszczania białka w żelu zagęszczającym i

180 V przy rozdziale białek w żelu rozdzielającym. Rozdział prowadzono przez około 1,5 godziny do momentu „wyjścia” z żelu niebieskiego barwnika będącego składnikiem buforu denaturującego. Następnie białka zawarte w żelu poliakrylamidowym przeniesiono na aktywowaną czystym metanolem membranę z polifluorku winylidenu (PVDF) o wielkości porów 0,45 µm przy użyciu aparatu do półsuchego transferu Yrdimes firmy Wealtec. Elektrotransfer prowadzono w 1× stężonym buforze do transferu przez 1,5 godziny przy stabilizacji natężeniem 350 mA w temperaturze pokojowej. Po zakończonym elektrotransferze membranę PVDF barwiono przez 3 minuty w temperaturze pokojowej buforem Ponceau S w celu uwidocznienia poszczególnych frakcji białek i oceny wydajności elektrotransferu. Po wybarwieniu białek bufor zlano a membranę PVDF przemyto trzykrotnie wodą dejonizowaną. Tak przygotowaną membranę umieszczono w 50 ml probówce polipropylenowej do której podano 35 ml buforu 1×TBST-B. Probówkę z membraną umieszczono w mieszadło orbitalnym i inkubowano przez godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie bufor zlano a membranę przemywano buforem 1×TBST trzykrotnie (3×10 minut) w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu płukania membrany przygotowano rozcieńczenia przeciwciał I-rzędowych w buforze 1×TBST-M zgodnie z opisem przedstawionym w Tabeli 7.

Tabela 7. Przeciwciała użyte do detekcji białek w technice Western blot.

Charakterystyka przeciwciał			
Przeciwciało	Pochodzenie	Masa białka	
EGLN1 (H-40) I-rzędowe	rabbit polyclonal IgG (200 µg/ml)	46 kDa	
HIF-1A (H-206) I-rzędowe	rabbit polyclonal IgG (200 µg/ml)	120 kDa	
β-aktyna (I-19) I-rzędowe	goat polyclonal IgG-HRP (200 µg/ml)	43 kDa	
II-rzędowe	goat anty-rabbit IgG-HRP (400 µg/ml)	–	
Rozcieńczenia			
Białko badane	Ilość Ab I-rzędowego (rozcieńczenie)	Ilość Ab II-rzędowego (rozcieńczenie)	Ilość buforu 1×TBST-M
EGLN1	3,3 µl (1:3000)	2,0 µl (1:5000)	10 ml
HIF-1A	2,0 µl (1:5000)	2,0 µl (1:5000)	10 ml
β-aktyna	3,3 µl (1:3000)	–	10 ml

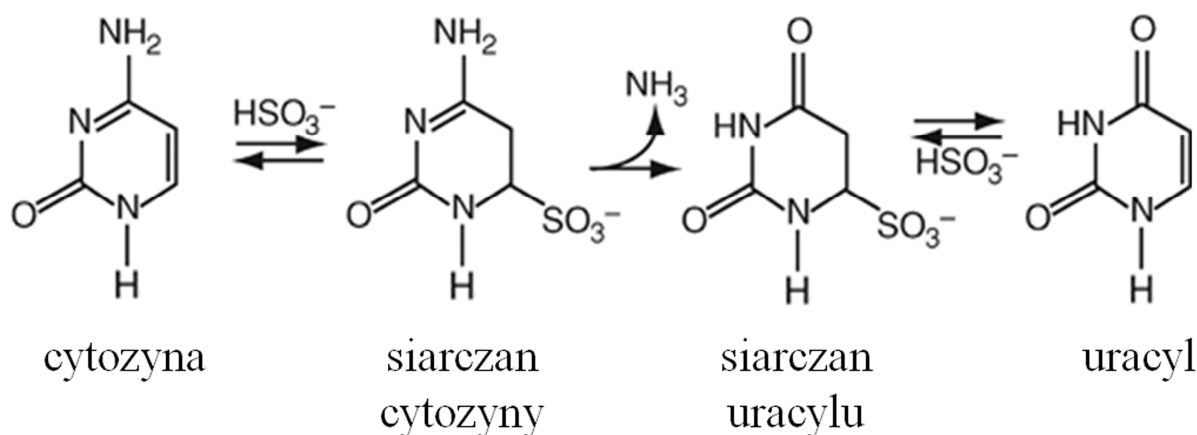
50 ml probówkę polipropylenową zawierającą membranę oraz odpowiednie rozcieńczenie przeciwciała I-rzędowego umieszczono w mieszadle orbitalnym i inkubowano przez 3 godziny w temperaturze pokojowej. Po upływie tego czasu bufor zlano a membranę przemywano buforem 1×TBST trzykrotnie (3×10 minut) w temperaturze pokojowej. Po ostatnim przemyciu membranę umieszczono w nowej 50 ml probówce polipropylenowej zawierającej przeciwciała II-rzędowe o odpowiednim stężeniu (Tabela 7) i inkubowano przez 1 godzinę na mieszadle orbitalnym. Przeciwciała II-rzędowe sprzężone było z peroksydazą chrzanową, która umożliwia detekcję sygnału po nałożeniu odpowiedniego substratu dla peroksydazy. Następnie membranę PVDF płukano dwukrotnie (2×10 minut) buforem 1×TBST oraz dwukrotnie (2×5 minut) buforem 1×TBS. Po płukaniach membranę osuszono na ręczniku papierowym i umieszczano na sztywnej folii. Na tak przygotowaną membranę podano 1 ml mieszaniny substratu dla peroksydazy chrzanowej oraz nałożono arkusz folii spożywczej. W celu detekcji sygnału całość umieszczono w aparacie do detekcji chemiluminescencji firmy UVP. Detekcję sygnału prowadzono w trybie analizy dynamicznej w czasie 20 minut z serią 10 zdjęć co 2 minuty każde. Do analizy gęstości optycznej (OD) uzyskanych wyników wykorzystano program Kodak MI SE.

3.4.10. Odmywanie przeciwciał z błony PVDF

Ze względu na zbliżoną masę cząsteczkową niektórych białek, po detekcji sygnału membrana PVDF była używana powtórnie w celu zidentyfikowania kolejnego białka. Przed rozpoczęciem analizy kolejnego białka należało odmyć przeciwciała związane z wcześniej analizowanym białkiem. Wszystkie płukania wykonano z wykorzystaniem mieszadła orbitalnego. W celu odmycia przeciwciał membranę ponownie aktywowano w czystym metanolu przez 1 minutę, a następnie płukano jeden raz w buforze 1×TBST przez 5 minut. W kolejnym etapie membrana była przemywana trzykrotnie (3×10 minut) kwaśnym buforem do odmywania przeciwciał, dwukrotnie (2×10 minut) buforem 1×TBS i jeden raz buforem 1×TBST przez 5 minut. Tak przygotowaną membranę inkubowano z buforem 1×TBST-B przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej a następnie przeprowadzono procedurę inkubacji z kolejnym przeciwciałem I i II-rzędowym jak opisano powyżej w punkcie 3.4.9.

3.4.11. Izolacja genomowego DNA z tkanek oraz reakcja deaminacji DNA

Genomowy DNA izolowano wykorzystując komercyjny zestaw do izolacji genomowego DNA firmy BioBasic. Izolację przeprowadzono na stole laboratoryjnym w temperaturze pokojowej zgodnie z opisem producenta zestawu w 1,5 ml probówkach polietylenowych. Do próbki zawierającej 300 μ l buforu lizującego i 20 μ l Proteinazy K (20 mg/ml) przeniesiono 20 mg tkanki homogenizowanej w ciekłym azocie. Próby inkubowano w termobloku w temperaturze 55°C przez 2 godziny, a następnie schłodzono do temperatury pokojowej, mieszano na mieszadle typu vortex i wirowano przez 5 minut, 12000×rpm. Następnie 300 μ l supernatantu przeniesiono do nowej próbki zawierającej taką samą objętość buforu AB, mieszano przez odwracanie, inkubowano przez 2 minuty i przeniesiono na kolumny wiążące genomowy DNA. Kolumny wirowano przez 2 minuty, 4000×rpm, a następnie DNA związany ze złożem na kolumnie dwukrotnie przemyto roztworem płuczającym. Po każdym przemywaniu próby wirowano 2 minuty, 10000×rpm a supernatant odrzucano. Po ostatnim płukaniu kolumny przeniesiono do nowych probówek, a na złożę podano 50 μ l buforu elucyjnego podgrzanego do 50°C. Próby inkubowano przez 2 minuty a następnie wirowano przez 1 minutę, 10000×rpm. Uzyskany w ten sposób supernatant zawierał całkowity genomowy DNA. Wykonując pomiar spektrofotometryczny określono stężenie izolowanego DNA w analogiczny sposób jak to opisano w punkcie 3.4.4. Uzyskany DNA rozdzielono także elektroforetycznie zgodnie z opisem z punktu 3.4.4 w celu określenia jego jakości. Otrzymany DNA poddano reakcji deaminacji, traktując go wodorosiarczanem (IV) sodu ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5/\text{NaHSO}_3$), który odpowiedzialny jest za konwersję cytozyny do uracylu. Mechanizm reakcji deaminacji przedstawiono na Rycinie 6.



Rycina 6. Mechanizm obrazujący reakcje deaminacji cytozyny do uracylu.

Do deaminacji genomowego DNA wykorzystano zestaw EZ DNA Methylation Kit firmy Zymo Research. Reakcję prowadzono w 1,5 ml probówkach polietylenowych zgodnie z opisem producenta. Do 1 µg genomowego DNA dodano 5 µl buforu denaturującego DNA i uzupełniono wodą dejonizowaną do objętości końcowej 50 µl. Próby inkubowano w termobloku przez 15 minut w temperaturze 37°C, a następnie do prób podano po 100 µl odczynnika deaminującego. Całość delikatnie mieszano przez odwracanie i inkubowano, chroniąc przed światłem, w termobloku przez 16 godzin w temperaturze 50°C. Po tym czasie próby przeniesiono do lodu na 10 minut, a następnie dodano do nich po 400 µl buforu wiążącego. Całość naniesiono na kolumnę wiążącą DNA i wirowano przez 30 sekund przy 10000×rpm. Po odrzuceniu supernatantu kolumny płukano 200 µl buforu przemywającego i ponownie wirowano przez 30 sekund przy 14000×rpm. Po odrzuceniu supernatantu na złoże kolumny podano 200 µl buforu odsiarczającego, inkubowano je przez 15 minut w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano przez 30 sekund przy 14000×rpm. Próby dodatkowo płukano dwukrotnie 200 µl buforu przemywającego i wirowano jak wyżej. Po ostatnim wirowaniu kolumny przeniesiono do nowych probówek, a na złoże podano po 20 µl buforu elucyjnego. Całość wirowano 1 minutę przy 14000×rpm uzyskując deaminowany DNA w supernatancie, który następnie wykorzystano do amplifikacji fragmentów promotorów genów badanych w klasycznej reakcji PCR.

3.4.12. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR) deaminowanego DNA

Reakcję PCR przygotowano pod komorą z laminarnym przepływem powietrza w 0,2 ml probówkach do reakcji PCR. Reakcję przeprowadzono z wykorzystaniem aparatu PTC-200 firmy MJ Research oraz komercyjnego zestawu FastStart Taq DNA Polymerase (Roche), w którym polimeraza do pełnej aktywności wymaga aktywacji termicznej. Sekwencje promotorów genów *EGLN1*, *HIF-1A*, *VHL* i *CXCR4* uzyskane z bazy danych www.ensembl.org poddano analizie komputerowej w celu określenia obecności wysp CpG w tym rejonie. Do oceny tej użyto dwóch niezależnych programów komputerowych: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/> oraz <http://bio.dfci.harvard.edu/Methylator/>. Analiza wykazała obecność wysp CpG w sekwencjach promotorowych wszystkich analizowanych genów (Rycina 7). Na podstawie uzyskanych wyników zaprojektowano startery z użyciem programu Oligo 5.0. Sekwencję oligonukleotydów wykorzystanych w

reakcji PCR przedstawia Tabela 8. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil termiczny reakcji podano poniżej.

10× stężony bufor do reakcji	1,5 µl
MgCl ₂ [25 mM]	2,4 µl
dNTPs [2,5 mM]	1,2 µl
Starter forward [10 µM]	0,6 µl
Starter reverse [10 µM]	0,6 µl
Matryca DNA deaminowany	1,0 µl
Polimeraza FastStart Taq [5 U/µl]	0,2 µl
H ₂ O dejonizowana	7,5 µl
	<hr/>
	15 µl

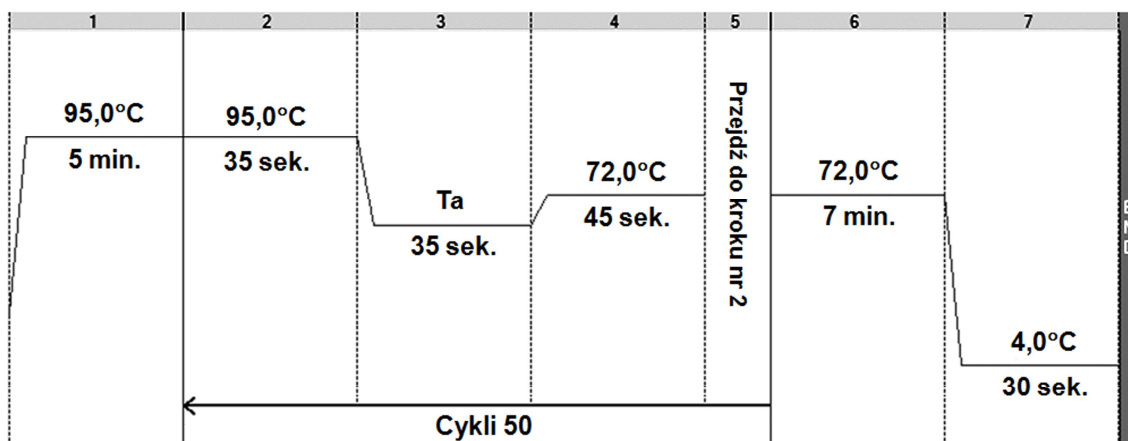
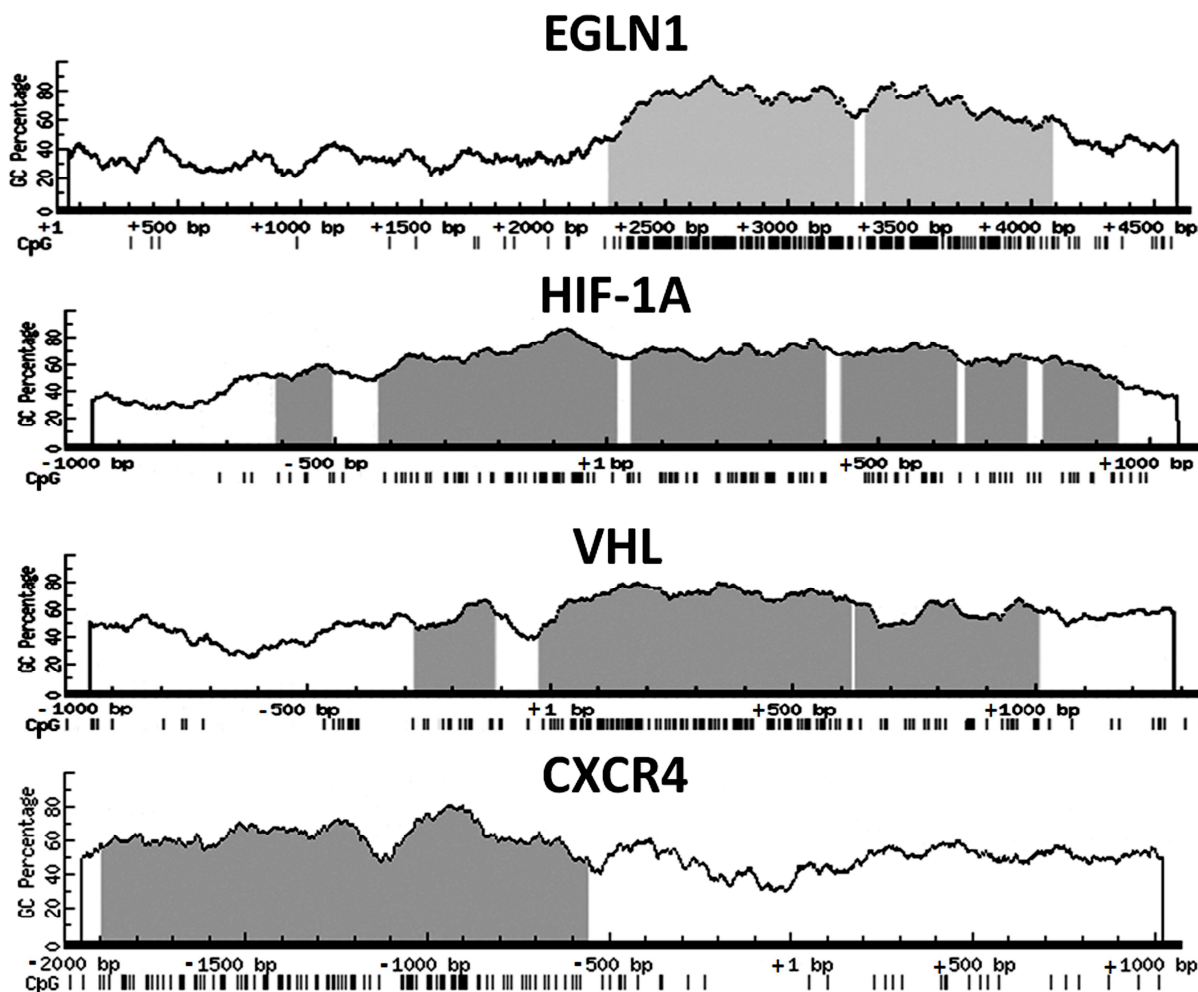


Tabela 8. Sekwencje oligonukleotydów użytych w reakcji PCR z deaminowanym DNA. Jako pozycję +1 przyjęto pierwszy nukleotyd egzonu pierwszego.

Gen	Sekwencje starterów (kierunek 5'-3')	Numer ENST	Pozycja	CpG	Ta	Produkt pz
<i>EGLN1</i> fr.1	TGGAGGAAGAGTAGTTATG	00000366641	2370 – 2388	74	60°C	526
	ATAACAACCTAAACTCAAAC		2876 – 2895			
<i>EGLN1</i> fr.2	GTTTGAGTTTAGGTTGTTATT	00000366641	2876 – 2896	58	60°C	504
	AATACTAATATAAACCCACTC		3359 – 3379			
<i>HIF-1A</i>	TGATGTATGTTGGGATTAGG	00000337138	-435 – -415	49	59°C	530
	AACCTCTCCTCAAATAACTTA		75 – 95			
<i>VHL</i>	AATTTTATAGTGGAAATATAGTA	00000256474	-37 – -15	93	56°C	701
	TACCTCAAAAAACCTCAATTC		644–664			
<i>CXCR4</i>	AAGATTGGTAGGTGTAAGTG	00000241393	-1198 – -1179	33	60°C	401
	TTTCATTTCTCACTCTCCC		-817 – -798			



Rycina 7. Analiza obecności wysp CpG w sekwencjach promotorowych genów *EGLN1*, *HIF-1A*, *VHL* oraz *CXCR4*. Miejsce występowania wysp CpG zaznaczono kolorem szarym.

Po zakończonej reakcji PCR całość mieszaniny (15 μ l) wymieszano z buforem obciążającym i naniesiono na żel agarozowy zawierający bromek etydyny. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przy napięciu 5 V/cm przez 40 minut. Produkty PCR uwidoczniono z wykorzystaniem lampy UV niskiej mocy, co zapobiega tworzeniu się dimerów tymidyny w łańcuchu DNA. Produkty PCR o właściwej długości wycięto z żelu za pomocą skalpela, a następnie kawałki wyciętego żelu umieszczono w 1,5 ml probówkach polietylenowych w celu elucji produktów PCR z agarozy.

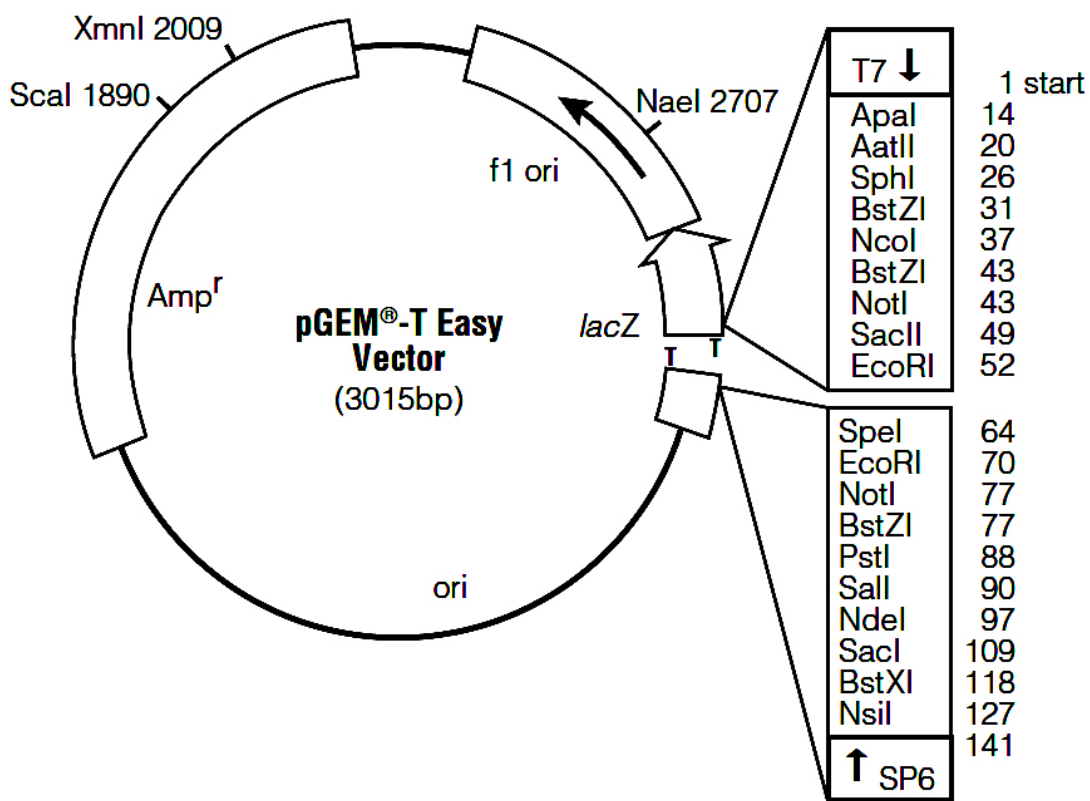
3.4.13. Elucja produktów PCR z żelu agarozowego

Produkty PCR rozdzielone elektroforetycznie na żelu agarozowym eluowano z żelu wykorzystując komercyjny zestaw do izolacji DNA z żeli agarozowych firmy Roche. Elucję przeprowadzono na stole laboratoryjnym zgodnie z opisem producenta zestawu w 1,5 ml probówkach polietylenowych. Do próbki zawierającej fragment żelu z produktem PCR podano 300 μ l buforu do rozpuszczania żelu oraz 10 μ l zawiesiny kuleczek krzemionkowych. Próby inkubowano w termobloku przez 10 minut w temperaturze 60°C w celu rozpuszczenia agarozy. Następnie próby wirowano przez 30 sekund przy 14000×rpm, supernatant odrzucono a do osadu kuleczek krzemionkowych dodano 500 μ l buforu wiążącego kwasy nukleinowe. Próby wirowano jak wyżej, supernatant odrzucono, a osad kuleczek przemyto dwukrotnie 500 μ l buforu przemywającego. Po ostatnim przemywaniu i wirowaniu usunięto dokładnie supernatant a kuleczki krzemionkowe suszono na stole w otwartych probówkach przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Następnie kuleczki zawieszono w 20 μ l wody dejonizowanej i inkubowano w termobloku przez 15 minut w temperaturze 60°C. Po inkubacji próby wirowano przez 1 minutę przy 14000×rpm a supernatant zawierający eluowany produkt PCR przeniesiono do nowej 1,5 ml próbki polietylenowej. Wykonując pomiar spektrofotometryczny określono stężenie izolowanego produktu PCR w analogiczny sposób jak to opisano w punkcie 3.4.4, a następnie wykorzystano go w reakcji ligacji z plazmidem pGEM-T Easy.

3.4.14. Ligacja produktów PCR z plazmidem pGEM-T Easy

Ligację produktów PCR z plazmidem przygotowano pod komorą z laminarnym przepływem powietrza w 0,2 ml probówkach do reakcji PCR. W reakcji tej wykorzystano komercyjny zestaw pGEM-T Easy Vector System firmy Promega. System ten wykorzystuje plazmid o długości 3015 pz, w którym miejsce wprowadzenia insertu znajduje się w obrębie genu *lacZ* kodującego podjednostkę α enzymu β -galaktozydazy (Rycina 8). Selekcję klonów zawierających właściwy insert przeprowadza się na podłożu zawierającym antybiotyk – ampicylinę oraz X-Gal. Bakterie, które pobrały „pusty” plazmid bez insertu mają zdolność rozkładu substratu (X-Gal) dodanego do podłoża, powodując tym samym niebieskie zabarwienie kolonii. Jeżeli bakterie pobiorą plazmid rekombinowany zawierający insert tracą zdolności rozkładu X-Gal tworząc kolonie zabarwione na biało. Wszystkie kolonie bakteryjne

zabarwione na biało mogą być wykorzystane do namnożenia plazmidu, jego izolacji i sekwencjonowania.



Rycina 8. Mapa plazmidu pGEM-T Easy (www.promega.com).

Plazmid pGEM-T Easy posiada wolny nukleotyd tymidynowy w miejscu wprowadzenia insertu (Rycina 8). Umożliwia to połączenie go na zasadzie komplementarności z wolnym nukleotydem adeninowym występującym na końcach produktów PCR (insert). Polimeraza DNA wykorzystywana w reakcji PCR dodaje na końcach amplifikowanego fragmentu kilka nukleotydów adeninowych, które wykorzystuje się do ligacji z miejscem wprowadzenia insertu w plazmidzie pGEM-T Easy. Aby uzyskać maksymalną wydajność ligacji plazmidu z insertem należało eksperymentalnie ustalić stosunek molowy insertu do plazmidu (wektora). Maksymalną wydajność reakcji uzyskano dla stosunku molowego wynoszącego 3:1 (insert:wektor). Aby określić ilość ng insertu, którego należy użyć do ligacji z 50 ng plazmidu stosowano wzór:

$$\frac{\text{ng wektora} \times \text{pz insertu}}{\text{pz wektora}} \times \text{stosunek molowy insert:wektor} = \text{ng insertu}$$

Zgodnie ze wzorem przedstawionym powyżej obliczono dla każdego genu ilość ng oczyszczonego produktu PCR (insertu) jaką należy użyć do ligacji z 50 ng wektora. Obliczenia przedstawia Tabela 9.

Tabela 9. Obliczenia ilości ng insertu, które należy użyć do ligacji z 50ng wektora.

EGLN1 fr.1	$= \frac{50 \text{ ng wektora} \times 526 \text{ pz insertu}}{3015 \text{ pz wektora}} \times \frac{3}{1} = 26 \text{ ng insertu}$
EGLN1 fr.2	$= \frac{50 \text{ ng wektora} \times 504 \text{ pz insertu}}{3015 \text{ pz wektora}} \times \frac{3}{1} = 25 \text{ ng insertu}$
HIF-1A	$= \frac{50 \text{ ng wektora} \times 530 \text{ pz insertu}}{3015 \text{ pz wektora}} \times \frac{3}{1} = 26 \text{ ng insertu}$
VHL	$= \frac{50 \text{ ng wektora} \times 701 \text{ pz insertu}}{3015 \text{ pz wektora}} \times \frac{3}{1} = 35 \text{ ng insertu}$
CXCR4	$= \frac{50 \text{ ng wektora} \times 401 \text{ pz insertu}}{3015 \text{ pz wektora}} \times \frac{3}{1} = 20 \text{ ng insertu}$

Oczyszczone produkty PCR, które przygotowano zgodnie z opisem przedstawionym w punkcie 3.4.13 rozcieńczono w ten sposób, aby w 1 µl uzyskać stężenie podane w Tabeli 9. Skład mieszaniny ligacyjnej podano poniżej.

	Mieszanina ligacyjna	Kontrola dodatnia	Kontrola negatywna
2× stężony bufor ligacyjny	5 µl	5 µl	5 µl
Plazmid pGEM-T Easy [50 ng/µl]	1 µl	1 µl	1 µl
Produkt PCR	1 µl	–	–
Kontrolny DNA [4 ng/µl]	–	2 µl	–
T4 DNA ligaza [3 U/µl]	1 µl	1 µl	1 µl
H ₂ O dejonizowana	2 µl	1 µl	3 µl
	10 µl	10 µl	10 µl

Reakcję ligacji prowadzono przez noc w 4°C. Następnie produkt ligacji użyto do transformacji komórek kompetentnych *Escherichia coli* szczep TOP10.

3.4.15. Przygotowanie komórek kompetentnych *E. coli* szczep TOP10

Komórki kompetentne przygotowano pod komorą do pracy z bakteriami oraz wykorzystując wytrząsarkę do hodowli bakteryjnych. Do jałowej, szklanej kolby stożkowej o pojemności 200 ml podano 50 ml płynnej pożywki LB (35 g LB/litr wody dejonizowanej) bez ampicyliny, którą wcześniej sterylizowano przez 20 minut w 121°C przy ciśnieniu 1,5 atmosfery. Z zamrażarki niskotemperaturowej (-75°C) pobrano na lód probówkę zawierającą zawiesinę bakterii *E. coli* szczep TOP10 w 16% glicerolu. Następnie końcówkę jałowej, plastikowej pipety Pasteura zanurzono w zawieszynie bakteryjnej, którą przeniesiono do pożywki LB znajdującej się w kolbie stożkowej. Tak przygotowaną zaszczepkę bakteryjną inkubowano w wytrząsarce do hodowli bakteryjnych przy 180×rpm w temperaturze 37°C. W czasie inkubacji co 20 minut pobierano 1 ml zawiesiny bakterii w celu pomiaru gęstości optycznej. Hodowlę zakończono w momencie uzyskania gęstości optycznej w przedziale 0,4-0,5, po czym całość zawiesiny bakteryjnej przelano do schłodzonej w lodzie 50 ml probówki polipropylenowej. Po 10 minutowej inkubacji w lodzie próby wirowano przez 10 minut przy 4000×rpm w temperaturze 4°C, supernatant odrzucono a uzyskany osad bakteryjny zawieszono w 20 ml buforu Tbf1 schłodzonego do temperatury 4°C. Następnie zawiesinę inkubowano przez 5 minut w lodzie, wirowano jak opisano wyżej, odrzucono supernatant a osad bakterii zawieszono w 2 ml buforu Tbf2 o temperaturze 4°C. Po 10 minutowej inkubacji w lodzie zawiesinę bakterii porcjowano po 50 µl do jałowych 1,5 ml probówek polietylenowych i zamrożono w ciekłym azocie. Przygotowane bakterie kompetentne *E. coli* szczep TOP10 przechowywano w zamrażarce niskotemperaturowej w temperaturze -75°C do momentu transformacji plazmidem pGEM-T Easy.

3.4.16. Transformacja komórek kompetentnych *E. coli* szczep TOP10 plazmidem pGEM-T Easy

Transformację komórek kompetentnych przeprowadzono pod komorą do pracy z bakteriami z wykorzystaniem termobloku. Przygotowane komórki kompetentne w 1,5 ml probówkach polietylenowych przeniesiono z zamrażarki niskotemperaturowej do lodu. Probówki inkubowano w lodzie przez 15 minut, następnie do zawiesiny komórek kompetentnych podano 5 µl mieszaniny ligacyjnej przygotowanej zgodnie z opisem z punktu 3.4.14. Całość delikatnie mieszano i inkubowano w lodzie przez 30 minut po czym probówki umieszczono na 60 sekund w termobloku o temperaturze 42°C w celu wywołania szoku

termicznego. Dokładnie po 60 sekundach próbki ponownie umieszczono na 2 minuty w lodzie, a następnie do każdej próby dodano 200 μ l płynnej pożywki LB bez ampicyliny o temperaturze pokojowej. Zawiesinę komórek bakteryjnych inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 37°C przy 600 rpm. Po zakończeniu inkubacji całość zawiesiny przeniesiono na jałowe płytki Petriego zawierające stałe podłoże LB-agar z ampicyliną oraz X-Gal i IPTG w celu selekcji bakterii, które pobrały plazmid zawierający insert.

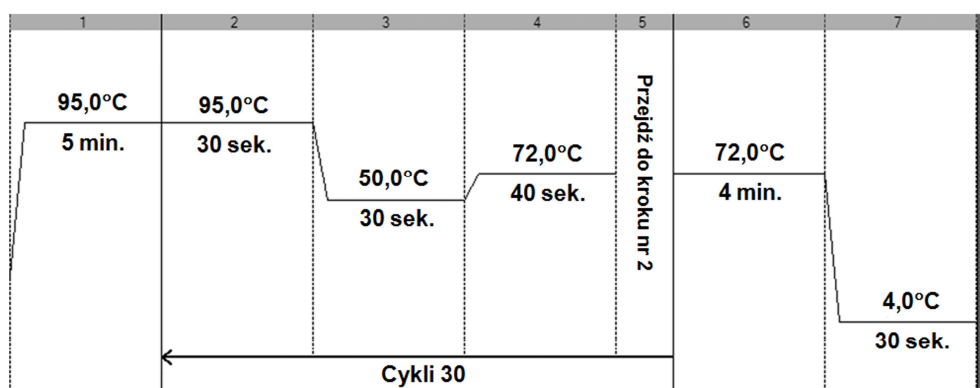
3.4.17. Przygotowanie płytek Petriego ze stałym podłożem LB-agar zawierającym ampicylinę, X-Gal i IPTG oraz selekcja klonów

W celu selekcji bakterii zawierających plazmid z insertem przygotowano pożywkę LB z dodatkiem agaru (LB-agar). Do 1000 ml wody dejonizowanej dodano 20 g pożywki LB-agar. Pożywkę sterylizowano przez 20 minut w 121°C przy ciśnieniu 1,5 atmosfery. Następnie do pożywki schłodzonej do temperatury 50°C dodano 1 ml ampicyliny o stężeniu 100 mg/ml. Tak przygotowaną pożywkę wylano na płytki Petriego (około 30-35 ml na płytkę) i pozostawiono pod komorą do pracy z bakteriami do całkowitego wystygnięcia. Po zestaleniu agaru na powierzchni każdej płytki rozprowadzono za pomocą jałowej ezy typu hokej mieszaninę substratów dla β -galaktozydazy składającą się z 100 μ l IPTG o stężeniu 100 μ M oraz 10 μ l X-Gal o stężeniu 50 mg/ml. Całość inkubowano przez 30 minut w cieplarni do hodowli bakteryjnych w celu wchłonięcia IPTG i X-Gal przez stałe podłoże LB-agar. Na przygotowane w ten sposób płytki Petriego podano 250 μ l zawiesiny komórek kompetentnych *E. coli* szczep TOP10 transformowanych plazmidem pGEM-T Easy zgodnie z opisem w punkcie 3.4.16. Zawiesinę rozprowadzono na powierzchni LB-agaru za pomocą jałowej ezy typu hokej i pozostawiono w cieplarni do hodowli bakteryjnych na 30 minut w celu wchłonięcia zawiesiny bakteryjnej przez LB-agar. Następnie płytki odwrócono o 180 stopni i inkubowano w cieplarni przez noc w temperaturze 37°C. Następnego dnia płytki wyjęto z cieplarki i oszacowano liczbę białych kolonii bakteryjnych zawierających plazmid pGEM-T Easy z insertem. Z każdej płytki wytypowano po 3 białe kolonie bakteryjne do szybkiej izolacji plazmidu w celu potwierdzenia obecności insertu reakcją PCR. Szybką izolację plazmidu przeprowadzono z wykorzystaniem 0,1% roztworu detergentu NP-40. Do 0,2 ml próbki do reakcji PCR podano 50 μ l 0,1% roztworu NP-40. Następnie końcówką jałowego tipsa przeniesiono fragment wyselekcjonowanej kolonii bakteryjnej do roztworu detergentu. Próbkę inkubowano w termocyklerze PCT-200 przez 10 minut w temperaturze

95°C, po czym przeniesiono ją do lodu na 5 minut. W celu osadzenia ścian komórek bakteryjnych próbki wirowano przez 3 minuty przy 12000×g w temperaturze pokojowej. Uzyskany supernatant zawierający plazmid użyto do reakcji PCR.

Reakcję PCR przygotowano pod komorą z laminarnym przepływem powietrza w 0,2 ml próbkach do reakcji PCR, z wykorzystaniem termocyklera PTC-200 oraz komercyjnego zestawu Dream Taq DNA Polymerase (Fermentas). W reakcji PCR wykorzystano startery M13F: 5' CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC 3' oraz M13R: 5' TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C 3'. Startery te były również wykorzystywane w reakcji sekwencjonowania plazmidu z insertem. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil termiczny reakcji podano poniżej.

10×stężony bufor do reakcji	1,3 µl
dNTPs [2,5 mM]	1,0 µl
Starter M13F [10 µM]	0,5 µl
Starter M13R [10 µM]	0,5 µl
Plazmid z insertem	2,5 µl
Polimeraza DreamTaq [5 U/µl]	0,2 µl
H ₂ O dejonizowana	7,0 µl
	13 µl



Na podstawie przeprowadzonej reakcji PCR i rozdziłu elektroforetycznego jej produktów wyselekcjonowano klony bakterii *E. coli* szczep TOP10, które zawierały plazmid pGEM-T Easy z insertem o odpowiedniej długości. Klony te zostały wykorzystane do namnożenia i izolacji plazmidów w celu przeprowadzenia reakcji sekwencjonowania.

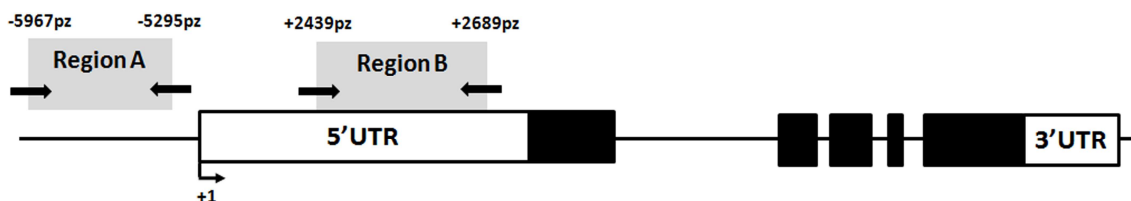
3.4.18. Hodowla kolonii bakteryjnych zawierających prawidłowy insert oraz izolacja plazmidowego DNA

Do 15 ml probówek polipropylenowych podano 3 ml jałowej, płynnej pożywki LB oraz 3 µl ampicyliny o stężeniu 100 mg/ml. Kontrolę negatywną stanowiła płynna pożywka LB bez dodatku antybiotyku, do której nie podano żadnej kolonii bakteryjnej. Do tak przygotowanych probówek przeniesiono jałowym tipsem wyselekcjonowane kolonie bakteryjne zawierające plazmid z insertem odpowiedniej długości. Hodowlę prowadzono przez noc z użyciem wytrząsarki do hodowli bakteryjnych przy 180×rpm w temperaturze 37°C. Następnego dnia z uzyskanej zawiesiny bakteryjnej izolowano plazmidowy DNA z wykorzystaniem komercyjnego zestawu do izolacji plazmidów PureYield Plasmid Miniprep System firmy Promega. Izolację plazmidu przeprowadzono na stole w 1,5 ml probówkach polietylenowych. Zawiesinę bakteryjną z całonocnej hodowli wirowano przez 10 minut przy maksymalnej prędkości. Supernatant zlano a osad bakterii zawieszono w 600 µl wody dejonizowanej. Zawiesinę przeniesiono do nowych 1,5 ml probówek polietylenowych, do których dodano 100 µl buforu lizującego. Zawiesinę bakteryjną mieszano przez sześciokrotne odwracanie probówki. Następnie do całości mieszaniny podano 350 µl roztworu neutralizującego, schłodzonego do 4°C, mieszano przez odwracanie i wirowano przy maksymalnej prędkości przez 3 minuty w temperaturze pokojowej. Uzyskany supernatant (ok. 900 µl) przeniesiono na kolumnę wiążącą plazmid. Kolumnę wirowano przez 15 sekund przy maksymalnej prędkości, przemyto 200 µl roztworu usuwającego endotoksynę, ponownie wirowano i przemyto 400 µl roztworu płuczącego. Po ostatnim przemyciu próby wirowano 30 sekund przy maksymalnej prędkości po czym kolumnę przeniesiono do nowej 1,5 ml probówki polietylenowej podając na środek złoża 30 µl buforu elucyjnego. Probówkę inkubowano 1 minutę w temperaturze pokojowej po czym wirowano przez 15 sekund przy maksymalnej prędkości. Uzyskany supernatant zawierał plazmid pGEM-T Easy z wklonowanym insertem. Plazmid ten został wykorzystany do reakcji sekwencjonowania przeprowadzonej w Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

3.4.19. Amplifikacja regionu promotora genu *EGLN1*

Region promotora genu *EGLN1* analizowano w celu określenia obecności miejsc wiązania się czynników transkrypcyjnych do DNA. Miejsca te lokalizowano wykorzystując do analizy dwa programy komputerowe: <http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/> oraz

<http://zlab.bu.edu/~mfrith/cister.shtml>. Analiza komputerowa wykazała obecność dwóch miejsc, do których mogą wiązać się czynniki transkrypcyjne (Rycina 9).



Rycina 9. Potencjalne miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych w promotorze genu *EGLN1*.

Pierwsze miejsce o długości 672 pz zlokalizowane było w odległości od -5967 pz do -5295 pz względem początku egzonu 1. Drugie miejsce o długości 250 pz zlokalizowane było w regionie 5'UTR genu *EGLN1* w pozycji od 2439 pz do 2689 pz. W celu analizy obecności potencjalnych mutacji w regionie wiązania się czynników transkrypcyjnych zaprojektowano startery (Tabela 10), które umożliwiły amplifikację tych regionów za pomocą reakcji PCR. Reakcję PCR przygotowano zgodnie z opisem przedstawionym w punkcie 3.4.12. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil termiczny reakcji podano poniżej.

10× stężony bufor do reakcji	1,3 µl
5× stężony bufor GC-RICH	2,6 µl
MgCl ₂ [25 mM]	0,8 µl
dNTPs [2,5 mM]	1,0 µl
Starter forward [10 µM]	0,5 µl
Starter reverse [10 µM]	0,5 µl
DNA genomowy	1,0 µl
Polimeraza FastStart Taq [5 U/µl]	0,2 µl
H ₂ O dejonizowana	5,1 µl
	<hr/>
	13 µl

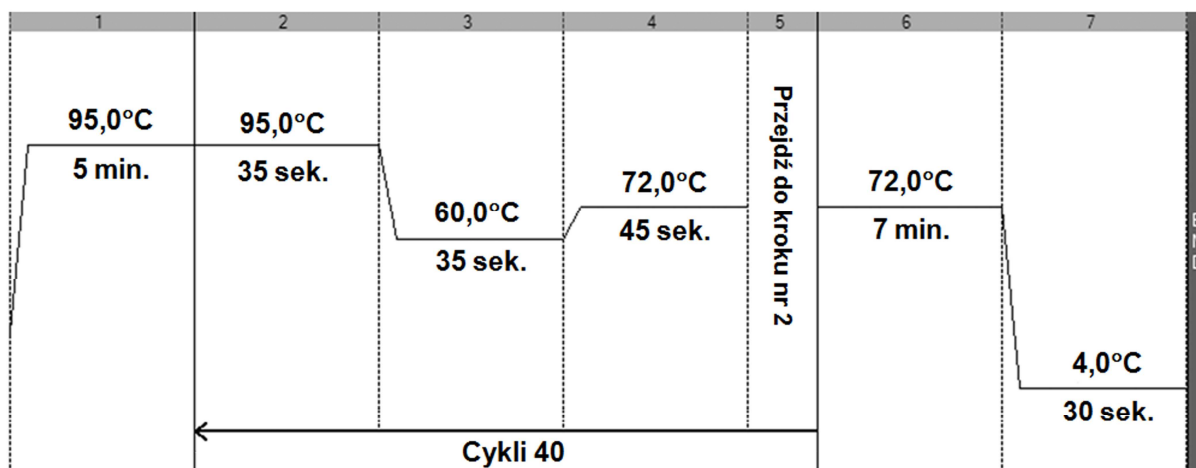


Tabela 10. Sekwencje oligonukleotydów wykorzystanych do amplifikacji sekwencji promotorowej genu *EGLN1* oraz w reakcji sekwencjonowania. Jako pozycję +1 przyjęto pierwszy nukleotyd egzonu pierwszego.

<i>EGLN1</i>	Sekwencje starterów (kierunek 5'-3')	Numer ENST	Pozycja	Produkt pz
Region A	GCATTTGGAGTGGCTGGCTG	00000366641	-6027 – -6008	755
	GGAAGGCAACCAGAGCGAGT		-5292 – -5273	
Region B	TAGAGGCTGTATGGTGTAAATGG	00000366641	2173 – 2194	755
	CGAGGGCTGAGAGAATAGGG		2908 – 2927	

Po zakończonej reakcji PCR 4 µl produktu reakcji wymieszano z 1 µl buforu do elektroforezy i naniesiono na 1% żel agarozowym z dodatkiem bromku etydyny w celu szacunkowej oceny specyficzności i wydajności reakcji PCR. Elektroforezę przeprowadzono zgodnie z warunkami opisanymi w punkcie 3.4.4. Pozostała część produktów reakcji PCR została wykorzystana do reakcji sekwencjonowania przeprowadzonej w Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

3.4.20. Obliczenia statystyczne

Obliczenia statystyczne wykonano w programie Statistica 5.1PL for Windows firmy Stat-Soft Inc. Wartości zmiennych pomiędzy grupami porównano stosując odpowiednie testy nieparametryczne, czyli test Manna-Whitney'a. W tabelach zostały podane mediana oraz wartości najmniejsza i największa. Do określenia zależności pomiędzy poszczególnymi zmiennymi zastosowano współczynnik korelacji liniowej „r” Pearsona po uprzedniej weryfikacji normalności rozkładu zmiennych przy użyciu testu Shapiro-Wilka. W przypadku zmiennych, których rozkład istotnie odbiegał od normalnego, stosowano transformację przez logarytmowanie w celu uzyskania rozkładów niewykazujących znacznych odstępstw od rozkładu normalnego. Jeżeli zmienne nie spełniały założeń testów parametrycznych, stosowano nieparametryczny współczynnik korelacji „R” Spearmana. Wszystkie wykazane różnice i wyznaczone współczynniki korelacji przyjęto za statystycznie istotne przy poziomie istotności $P \leq 0,05$.

4. WYNIKI

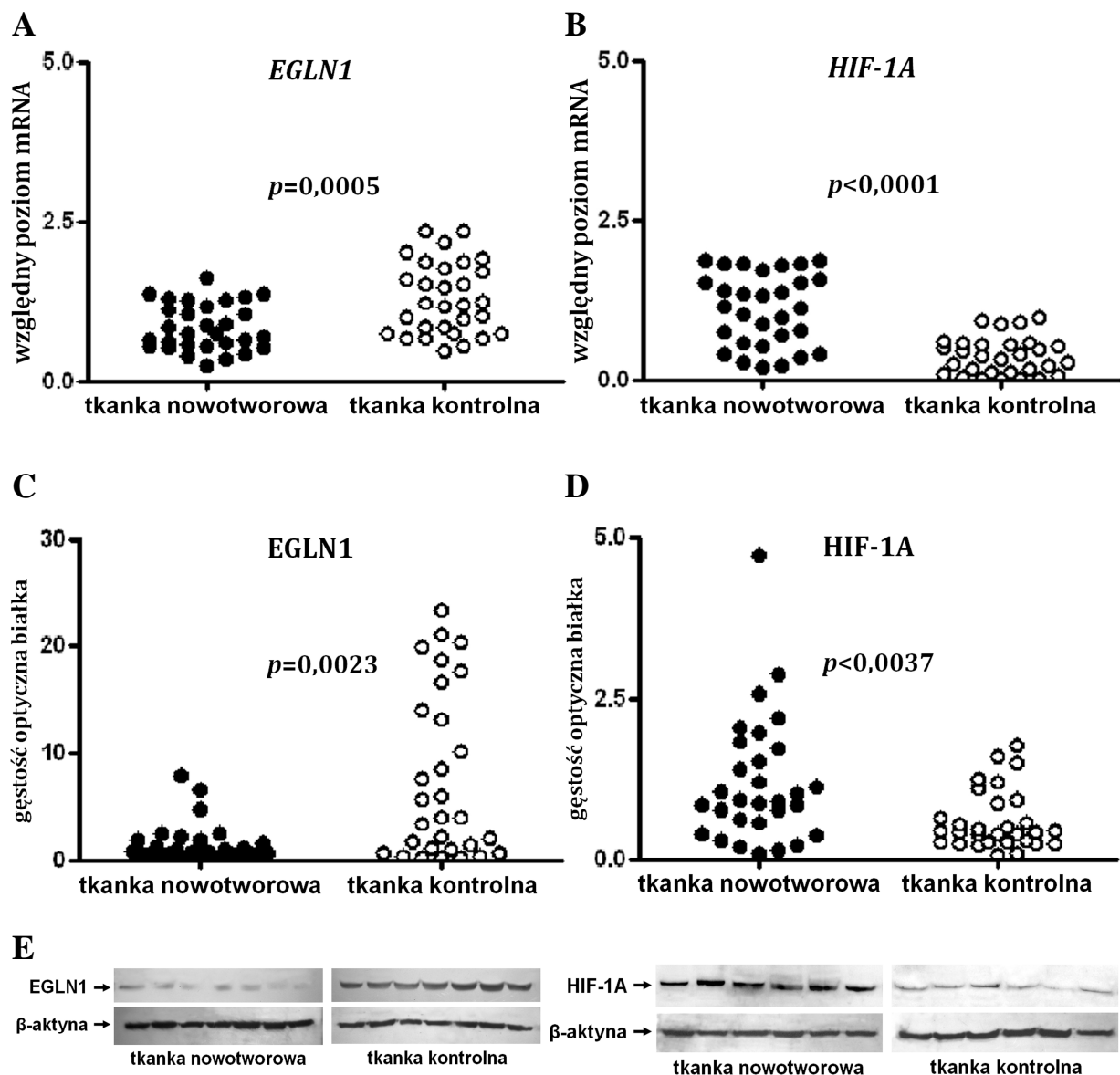
4.1. Badanie poziomu transkryptów dla genów *EGLN1*, *HIF-1A*, *VHL*, *CXCR4*, *DNMT3A*, *DNMT3B* i *DNMT1* oraz analiza ilości białek *EGLN1* i *HIF-1A*

Analizę poziomu transkryptów dla genów badanych przeprowadzono zgodnie z opisem w punkcie 3.4.6. Analizę ilości białka kodowanego przez geny *EGLN1* i *HIF-1A* przeprowadzono zgodnie z opisem w punkcie 3.4.9. Analizy wykazały istotną statystycznie różnicę w poziomie transkryptów i białek dla genów badanych pomiędzy tkanką nowotworowo zmienioną a kontrolną. Analizę poziomu transkryptów przedstawiono w Tabeli 10 i Rycinach 10-12. Analizę ilości białek przedstawiono w Tabeli 10 i na Rycinie 10.

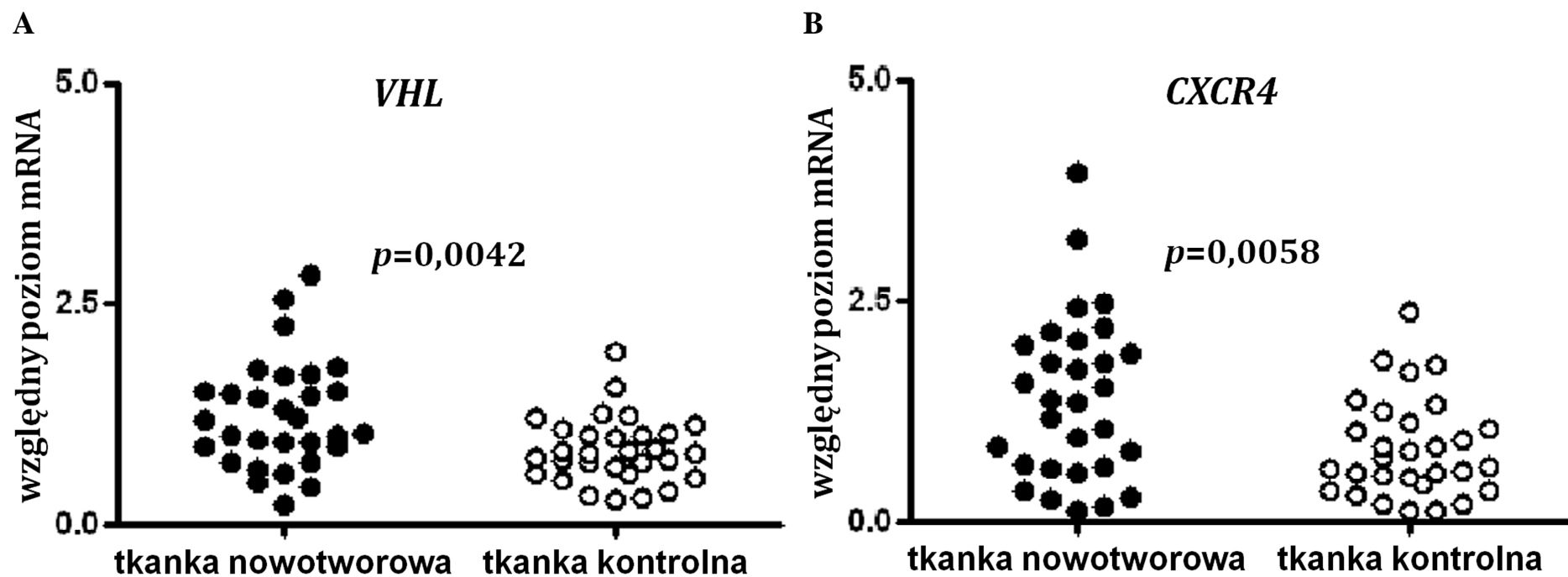
Tabela 10. Poziom transkryptów i białek genów badanych w tkankach nowotworowych i kontrolnych.

Gen	tkanka nowotworowa		tkanka kontrolna		p
	Mediana (zakres)	Średnia (\pm SD)	Mediana (zakres)	Średnia (\pm SD)	
<i>EGLN1</i>	0,75 (0,24-1,37) ^a	0,84 \pm 0,37 ^a	1,21 (0,48-2,35) ^a	1,29 \pm 0,56 ^a	0,0005 ^c
	0,83 (0,07-7,91) ^b	1,54 \pm 1,82 ^b	4,03 (0,29-23,41) ^b	7,55 \pm 7,78 ^b	0,0023 ^d
<i>HIF-1A</i>	1,12 (0,20-1,87) ^a	1,10 \pm 0,57 ^a	0,34 (0,01-0,97) ^a	0,37 \pm 0,29 ^a	0,0001 ^c
	0,91 (0,10-4,70) ^b	1,20 \pm 0,99 ^b	0,42 (0,07-1,78) ^b	0,60 \pm 0,46 ^b	0,0037 ^d
<i>VHL</i>	1,09 (0,21-2,55) ^a	1,22 \pm 0,61 ^a	0,80 (0,27-1,94) ^a	0,83 \pm 0,37 ^a	0,0042 ^c
<i>CXCR4</i>	1,35 (0,11-3,95) ^a	1,39 \pm 0,93 ^a	0,68 (0,13-2,35) ^a	0,82 \pm 0,56 ^a	0,0058 ^c
<i>DNMT3A</i>	0,87 (0,26-4,81) ^a	1,26 \pm 1,10 ^a	0,65 (0,01-2,26) ^a	0,76 \pm 0,57 ^a	0,0163 ^c
<i>DNMT3B</i>	0,80 (0,07-5,07) ^a	1,28 \pm 1,38 ^a	0,22 (0,07-1,45) ^a	0,29 \pm 0,28 ^a	0,0003 ^c
<i>DNMT1</i>	1,16 (0,46-3,97) ^a	1,48 \pm 0,94 ^a	0,56 (0,13-2,32) ^a	0,68 \pm 0,63 ^a	0,0001 ^c

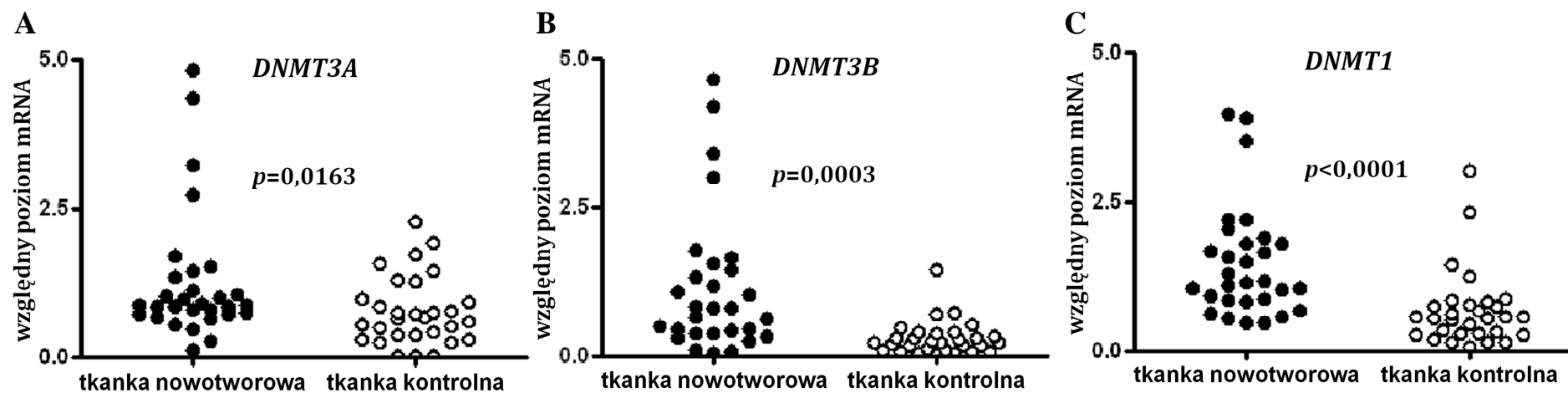
Poziom mRNA standaryzowano względem poziomu mRNA dla *HMBS* (deaminaza porfobilinogenu). ^a poziom transkryptów, ^b poziom białek, ^c obustronny test t-studenta dla zmiennych niepowiązanych, ^d Mann Whitney test



Rycina 10. Poziom transkryptów (A, B) i białek (C, D) kodowanych przez geny *EGLN1* (A, C) i *HIF-1A* (B, D) w tkance nowotworowej (n=30) i w tkance kontrolnej (n=30). Poziom transkryptów został przeliczony na 1 μ g RNA całkowitego i standaryzowany względem poziomu transkryptów *HMBS*. Uzyskane wartości poziomu transkryptów przedstawiono w postaci wartości względnych. Ilość białka standaryzowano względem ilości β -aktyny i przedstawiono jako względną gęstość optyczną. E – przykładowy wynik analizy Western Blot dla białek *EGLN1* i *HIF-1A*.



Rycina 11. Poziom transkryptów *VHL* (A) i *CXCR4* (B) w tkance nowotworowej (n=30) i w tkance kontrolnej (n=30). Poziom transkryptów został przeliczony na 1µg RNA całkowitego i standaryzowany względem poziomu transkryptów *HMBS*. Uzyskane wartości poziomu transkryptów przedstawiono w postaci wartości względnych.



Rycina 12. Poziom transkryptów *DNMT3A* (A), *DNMT3B* (B) oraz *DNMT1* (C) w tkance nowotworowej (n=30) i w tkance kontrolnej (n=30). Poziom transkryptów został przeliczony na 1µg RNA całkowitego i standaryzowany względem poziomu transkryptów *HMBS*. Uzyskane wartości poziomu transkryptów przedstawiono w postaci wartości względnych.

4.2 Analiza wzoru metylacji sekwencji promotorowych genów *EGLN1*, *HIF-1A*, *VHL* oraz *CXCR4*

Genomowy DNA izolowany zgodnie z opisem z punktu 3.4.11 poddano reakcji deaminacji (3.4.11) i amplifikacji (3.4.12). Uzyskane produkty reakcji PCR po rozdziale elektroforetycznym, elucji z żelu (3.4.13) i klonowaniu (3.4.14) poddano sekwencjonowaniu w celu określenia wzoru metylacji sekwencji promotora analizowanych genów.

Analiza komputerowa (3.4.12) wykazała obecność wysp CpG w promotorach wszystkich analizowanych genów. Przeprowadzone reakcje sekwencjonowania wykazały brak metylacji sekwencji promotorowych wszystkich analizowanych genów zarówno w tkankach nowotworowych jak i kontrolnych. Świadczy to o tym, iż prawdopodobnie żaden z analizowanych genów nie podlega regulacji przez metylację DNA w raku szyjki macicy.

4.3. Analiza korelacji Spearmana pomiędzy czynnikiem HIF-1A a ekspresją genów posiadających sekwencję HRE w regionie promotorowym

Analiza korelacji Spearmana wykazała, iż HIF-1A może wpływać na ekspresję genów *VHL* oraz *CXCR4*. Wyniki analizy korelacji przedstawia Tabela 11.

Tabela 11. Wartości współczynnika korelacji Spearmana (R).

		VHL	CXCR4
HIF-1A	R	0,515	0,445
	<i>p</i>	0,00373	0,0141
	ilość	30	30

4.4. Analiza sekwencji nukleotydowej promotora genu *EGLN1*

Analiza sekwencji promotorowej genu *EGLN1* wykazała obecność dwóch miejsc, do których mogą wiązać się czynniki transkrypcyjne. Miejsca te zlokalizowane są w odległości –5967 pz do –5295 pz od początku egzonu 1 (Region A) oraz w regionie 5'UTR genu *EGLN1* w pozycji 2439 pz do 2689 pz (Region B). Reakcja sekwencjonowania potwierdziła obecność zmian w sekwencji nukleotydowej zarówno w Regionie A jak i Regionie B promotora genu *EGLN1*. Zmiany te występowały u 22 z 30 pacjentek z rakiem szyjki macicy, nie zaobserwowano ich w tkance kontrolnej. Zmiany w sekwencji nukleotydowej promotora genu *EGLN1* oraz ich wpływ na miejsca wiązania się czynników transkrypcyjnych przedstawia Tabela 12.

Tabela 12. Pozycja mutacji oraz jej wpływ na miejsca wiązania się czynników transkrypcyjnych w sekwencji promotorowej genu *EGLN1*.

Mutacje w tkankach nowotworowych pochodzących od 22 pacjentek						Utrata miejsc wiązania się czynników transkrypcyjnych w	
						Region A	Region B
P1	C2395>G	C2655>G	T2664>C	T2779>C			Sp1 [163], H4TF1 [164]
P2	C2436>G	ΔC2669	ΔC2678	ΔC2690	C2728>G		myosin-specific factor [165]
P4	insA2875						GCF [166], AP-2 [166]
P5	ΔG2428	ΔC2690					GCF [166]
P6	C2496>G	insT2669					AP-2 [167], ETF [168], H4TF1 [164]
P8	C-5830>A					Sp1 [169]	
P9	ΔC2429	insT2504	ΔC2669	ΔC2690			Sp1 [170]
P10	ΔC-5335					Sp1 [169]	
P11	A2641>G	ΔC2669	ΔGCCG2719				Sp1 [169]
P13	C2536>G	ΔC2690	ΔGGC2838	C2863>G			AP-2 [171], Sp1 [169]
P14	ΔT2552	C2559>G	G2809>A				UCE.2 [173]
P15	ΔA-5710	ΔA-5293				LSF [172]	
P16	ΔA2438	C2545>G					UCE.2 [173]
P17	C2755>G	C2757>G	C2800>A	G2854>A		GATA factor [174]	
P18	C2806>A	C2864>G					AP-2 [166]
P19	T-5820>A					Sp1 [169]	
P20	C2620>G	ΔC2690					AP-2 [166], Sp1 [175,176]
P21	ΔC-5558					NF-Y [177]	
P23	C-5357>A	G-5377>T				NF-Y [177]	
P24	ΔC2690	ΔC2699					Sp1 [169]
P25	ΔG-5407					NF-Y [177]	
P27	A-5758>G	ΔTC-5313				TFIID [178]	

“Δ” – delecja

“ins – insercja

P1–P27 – pacjentki u których występowały zmiany w sekwencji promotora genu *EGLN1*

5. DYSKUSJA

Rak szyjki macicy wykazuje kilka cech charakterystycznych, które wyróżniają go spośród innych nowotworów. Zdrowe komórki nabłonkowe szyjki macicy wykazują charakterystykę tkanki będącej w hipoksji [179-181], czego następstwem jest intensywny rozwój naczyń krwionośnych (waskularyzacja). Wzmocniona waskularyzacja obserwowana jest już we wczesnych etapach rozwoju raka szyjki macicy, podczas gdy w przypadku innych nowotworów jest ona charakterystyczna dla zaawansowanych stopni klinicznych [180,182]. Zjawisko hipoksji obserwuje się w większości nowotworów [32,183,184] i jest ona następstwem zróżnicowanego poziomu natlenienia różnych fragmentów tkanki nowotworowej. Adaptacja tkanki do stanu hipoksji jest procesem złożonym związanym z regulacją ekspresji wielu genów regulujących metabolizm w warunkach niskiej zawartości tlenu oraz genów umożliwiających rozwój nowych naczyń krwionośnych w formującej się tkance nowotworowej [185].

W warunkach hipoksji komórki wydzielają szereg cytokin i czynników wzrostu, które indukują proliferację, migrację i formowanie się naczyń krwionośnych przez komórki śródbłonna [186]. Odpowiedź na hipoksję regulowana jest przede wszystkim przez aktywność czynnika transkrypcyjnego HIF-1 [187], który wpływa na ekspresję około 70 genów [92]. Białko HIF-1 może być również stabilizowane przez inne czynniki niezależne od hipoksji [92]. Co więcej, wielu autorów wykazało, iż podwyższony poziom HIF-1A obserwowany w wielu nowotworach może być związany z bardziej agresywnym fenotypem nowotworu [188-191] a także może zwiększać odporność nowotworu na radioterapie i chemioterapie [192,193].

Szybka, ubikwityno zależna degradacja białka HIF-1A jest podstawowym mechanizmem regulującym jego poziom w warunkach normoksji. Spadające ciśnienie parcjalne tlenu wewnątrz tkanki odpowiada za obniżenie aktywności hydroksylaz prolinowych, w tym hydroksylazy EGLN1. Wynikiem narastającej hipoksji jest stopniowe obniżanie aktywności hydroksylazy EGLN1 [194], co przekłada się na stopniowy wzrost stabilizacji białka HIF-1A, ponieważ powinowactwo białka VHL do niehydroksylovanego HIF-1A jest niskie [103,116,195]. Hutchison i wsp. [196] and Haugland i wsp.[197] wykazali immunohistochemicznie statystyczną korelację pomiędzy wysokim poziomem HIF-1A a niskim pO_2 w grupie odpowiednio 72 i 42 pacjentek z rakiem szyjki macicy. Podobna korelacja została opisana w raku głowy i szyi [198].

Nadekspresja *HIF-1A* była wcześniej opisana w wielu innych guzach litych m. in. w raku żołądka [183], woreczka żółciowego [184], okrężnicy, piersi, płuc, skóry, jajników, trzustki, prostaty oraz w raku nerki [32]. Wysoki poziom białka HIF-1A był także opisywany w raku szyjki macicy ale tylko z wykorzystaniem metod immunohistochemicznych [181,199-205]. W zdrowych komórkach nabłonkowych szyjki macicy występują śladowe ilości białka HIF-1A [179-181]. Stabilizacja i wzrost ilości białka HIF-1A obserwowane są wraz z progresją raka szyjki macicy. Fujimoto i wsp. [199] opisał istotną statystycznie korelację pomiędzy poziomem mRNA dla HIF-1A a stopniem rozwoju raka szyjki macicy. Podobne wyniki zaprezentował No i wsp. [200] analizując poziom białka HIF-1A w skrawkach parafinowych technikami immunohistochemii. Ilość białka HIF-1A była wyższa w tkankach z śródbłonkową neoplazją oraz w raku inwazyjnym w porównaniu do tkanek kontrolnych [200].

W niniejszej pracy po raz pierwszy poddano analizie metylację sekwencji promotorowej oraz poziom transkryptu i białka HIF-1A w grupie pacjentek z rakiem szyjki macicy oraz w grupie kontrolnej. Pierwszy raz analizowano także wzór metylacji oraz poziom transkryptu dla genu *VHL*.

Wykazano, iż w tkance nowotworowej występuje istotny statystycznie, wyższy poziom transkryptów i białka dla HIF-1A oraz transkryptów dla genu *VHL* w porównaniu do tkanki kontrolnej. Po raz pierwszy wykazano także, iż sekwencje promotorowe obydwu genów nie są metylowane, co może sugerować brak regulacji ich ekspresji poprzez metylację DNA. Podwyższona ekspresja genu *VHL* w tkance nowotworowej jest sprzeczna z danymi prezentowanymi w dotychczasowej literaturze. W przypadku raka nerki [206], szpiczaka mnogiego [207], raka trzustki [208], przewlekłej białaczki limfatycznej [209] i płaskonabłonkowego raka sromu [210] autorzy prac obserwowali obniżenie poziomu transkryptów genu *VHL* w tkance nowotworowej w porównaniu do tkanki kontrolnej. Wzrost ekspresji genu *VHL* obserwowany w raku szyjki macicy prawdopodobnie może być skorelowany ze wzrostem ekspresji genu *HIF-1A*. Analiza statystyczna wykazała pozytywną, istotną statystycznie, korelację Spearmana pomiędzy transkryptami *HIF-1A* i *VHL*. Renbaum i wsp. [211] jako pierwszy wykazał, iż w regionie 3' UTR genu *VHL* znajduje się sekwencja HRE, z którą może wiązać się białko HIF-1. Z kolei Blagosklonny [212] wskazał na możliwość istnienia mechanizmu sprzężenia zwrotnego, w którym rosnący poziom białka HIF-1A aktywuje ekspresję genu *VHL*. Z kolei rosnący poziom ekspresji genu *VHL* wpływa na zmniejszenie ilości białka HIF-1A, co chroni komórkę przed wejściem w stan apoptozy.

Jednak bezpośrednich dowodów na indukcję ekspresji genu *VHL* przez białko HIF-1A dostarczyła praca Karhausen i wsp. [213]. Autor, wykorzystując linie komórkową raka szyjki macicy – HeLa, zidentyfikował funkcjonalne miejsce HRE w obrębie promotora genu *VHL* oraz wykazał bezpośrednie oddziaływanie czynnika transkrypcyjnego HIF-1 z tym miejscem. Co więcej autor wykazał istnienie mechanizmu sprzężenia zwrotnego, które powoduje samoregulację poziomu białka HIF-1A poprzez białko VHL [213]. Wyniki prezentowane w niniejszej pracy doktorskiej otrzymane z tkanek izolowanych od pacjentek potwierdzają wyniki uzyskane przez Blagosklonny'ego [212] oraz Karhausen i wsp. [213].

Funkcjonalna sekwencja HRE występuje także w sekwencji promotorowej hydroksylaz prolinowych. Pescador i wsp. [91] oraz Metzen i wsp. [90] jako pierwsi zidentyfikowali funkcjonalne HRE w sekwencji promotorowej genów hydroksylaz prolinowych *EGLN3* i *EGLN1*. Podobnie jak w przypadku genu *VHL* obecność sekwencji HRE w promotorze hydroksylaz prolinowych związana jest z mechanizmem negatywnego sprzężenia zwrotnego regulującego poziom białka HIF-1A w czasie hipoksji. Henze i wsp. [214] wykazał wzrost ilości białka *EGLN3* i *EGLN1* w czasie hipoksji w komórkach ludzkiego glejaka, co chroniło komórki przed śmiercią wywołaną hipoksją. Również Ginouves i wsp. [135] obserwował akumulację hydroksylaz prolinowych w czasie hipoksji. Obserwacje te prowadził na liniach komórkowych raka piersi, okrężnicy, pierwotnych kulturach ludzkich fibroblastów i keratynocytów, na modelu zwierzęcym a także w ludzkim włókniakomięśaku. Akumulacja hydroksylaz była tu także związana z mechanizmem negatywnego sprzężenia zwrotnego regulującego ilość białka HIF-1A w czasie hipoksji. Mechanizm ten był również opisywany w pracach Berra i wsp. [105], Appelhoff i wsp. [115], D'Angelo i wsp. [128], Aprelikova i wsp. [130], Marxsen i wsp. [131], Minamishima i wsp. [215] oraz Qutub i Popel [216].

Analiza poziomu transkryptów i białka *EGLN1* w tkance nowotworowej i kontrolnej wykazała istotnie statystycznie obniżenie jego ilości w raku szyjki macicy, pomimo braku metylacji sekwencji promotorowej genu. Brak tutaj również opisywanego przez innych autorów mechanizmu negatywnego sprzężenia zwrotnego limitującego poziom białka HIF-1A przez białko *EGLN1*. Obserwowane w niniejszej pracy doktorskiej obniżenie ekspresji genu *EGLN1* w tkance nowotworowej można wyjaśnić analizując jego rejon promotorowy. Zdecydowana większość genów posiadających w rejonie promotora sekwencję HRE posiada także sekwencję HAS. Sekwencja ta zlokalizowana jest 8-9 nukleotydów powyżej lub poniżej sekwencji HRE i jest niezbędna do pełnej aktywacji ekspresji genu przez czynnik

transkrypcyjny HIF-1 [217]. Sekwencje nukleotydów w bezpośrednim sąsiedztwie sekwencji HRE mogą także wpływać na aktywację transkrypcji genu [92]. Co więcej do pełnej aktywacji ekspresji niezbędna jest obecność niezależnych od hipoksji czynników transkrypcyjnych takich jak ATF-1/CREB-1, AP-1 czy HNF-4 [39]. Jeżeli w sekwencji promotorowej wystąpią mutacje w rejonie sekwencji HRE, HAS lub miejsc wiążących czynniki transkrypcyjne, można się spodziewać ich negatywnego wpływu na zależną od czynnika transkrypcyjnego HIF-1 ekspresję genu *EGLN1* [39].

Analiza sekwencji promotorowej genu *EGLN1* wykazała obecność licznych mutacji zlokalizowanych w miejscach wiązania się czynników transkrypcyjnych do promotora [194]. Mutacje te występowały tylko w tkance nowotworowej, nie obserwowano ich w tkance kontrolnej. Analiza komputerowa wykazała, iż obecność wykrytych mutacji może wiązać się z utratą miejsc wiązania się wielu czynników transkrypcyjnych w obrębie promotora genu *EGLN1*. Występowanie licznych mutacji w sekwencji promotorowej genu *EGLN1* może być bezpośrednią przyczyną obniżonej ekspresji tego genu w tkance nowotworowej w porównaniu z tkanką kontrolną [194]. W literaturze opisano również mutacje występujące w obrębie promotora genu *EGLN1*, u pacjentów z chorobą Vaqueza, u których występowały dodatkowo liczne guzy [218]. Wyniki prezentowane w niniejszej pracy doktorskiej oraz w pracach innych autorów mogą sugerować, iż nagromadzenie mutacji w promotorze genu *EGLN1* prowadzi do obniżenia jego ekspresji, co może wpływać na progresję choroby nowotworowej.

Negatywny wpływ na rozwój raka szyjki macicy ma także receptor CXCR4. Receptor ten wiąże hemokinę CXCL12 i aktywuje wewnątrzkomórkową ścieżkę sygnalizacyjną, która promuje proliferację i migrację komórek nowotworowych [73]. Gen *CXCR4* ulega ekspresji w licznych tkankach takich jak szpik kostny, limfocyty T, śledziona, grasica, węzły chłonne, przysadka mózgowa, nadnercza [219]. Ekspresja tego genu obserwowana jest także w licznych komórkach nowotworowych w tym w raku jajnika, piersi, płuc, prostaty, żołądka, okrężnicy, nerek, mózgu, tarczycy, wątroby, trzustki, przełyku, jamy ustnej, czerniaku, szyjce macicy i białaczce [219]. Analiza komputerowa wykazała, iż gen ten posiada liczne wyspy CpG zlokalizowane w sekwencji promotorowej. Może to sugerować potencjalną regulację epigenetyczną jego ekspresji. Wyniki dotyczące ekspresji genu *CXCR4* w tkance nowotworowej pozostają sprzeczne. Chick i Szyf [220] oraz Ateeq i wsp. [221] wykazali, iż użycie 5'-aza-2'-deoksycytosyny (5-aza-CdR) powoduje demetylację sekwencji promotorowej genu *CXCR4*, która prowadzi do indukcji jego ekspresji w liniach

komórkowych raka piersi MCF-7 i ZR-75-1. Z kolei Dejeux i wsp. [222] przeprowadzili analizę metylacji sekwencji promotorowej genu *CXCR4* na materiale klinicznym pochodzącym od 6 zdrowych kobiet oraz 163 pacjentek z zaawansowanym rakiem piersi. Analiza ta wykazała całkowity brak metylacji genu *CXCR4* zarówno w grupie kontrolnej jak i u pacjentek z zaawansowanym rakiem piersi. Przybylski i wsp. [223] oraz Sato i wsp. [224] analizowali wzór metylacji oraz ekspresję genu *CXCR4* w raku trzustki. Przybylski i wsp. [223] wykorzystując linie komórkową AsPC1 z nokautowanymi genami dla *DNMT1* oraz *DNMT3B* wykazał, iż obniżenie ekspresji metylotransferaz związane jest z demetylacją promotora genu *CXCR4* oraz wzrostem jego ilości na poziomie transkryptu i białka. Sato i wsp. [224] porównał wzór metylacji sekwencji promotorowej *CXCR4* w tkance nabłonkowej, pierwotnych gruczolakorakach trzustki oraz liniach komórkowych raka trzustki. Metylacja sekwencji promotorowej występowała tylko w tkance nowotworowej oraz w liniach komórkowych raka trzustki [224]. Metylacja sekwencji promotorowej była także opisana w linii komórkowej gruczolakoraka endometrium Ishikawa ER+ [225], w komórkach czerniaka [226] oraz w materiale pochodzącym od pacjentów z metaplastją szpikową [227]. Aktywność *CXCR4* była również analizowana w raku szyjki macicy jednakże tylko z wykorzystaniem technik immunohistochemii. Kodoma i wsp. [228] analizował poziom białka *CXCR4* w tkankach pochodzących od 174 pacjentek z rakiem szyjki macicy zakwalifikowanych do stopnia zaawansowania klinicznego IB-IIB. Autor sugeruje, iż podwyższona ilość białka *CXCR4* może być skorelowana z przerzutami do węzłów chłonnych, a sama ilość białka *CXCR4* może być wykorzystana jako marker świadczący o złym rokowaniu dla pacjentek z rakiem szyjki macicy. Podobne wyniki opublikował Zhang i wsp. [229]. Autor sugeruje, iż podwyższona ilość białka *CXCR4*, analizowana immunohistochemicznie w 35 tkankach pochodzących od pacjentek z płaskonabłonkowym rakiem szyjki macicy, może być związana z przerzutami komórek nowotworowych do węzłów chłonnych. Yang i wsp. [230] wykazał, iż wysoki poziom białka *CXCR4* związany jest z proliferacją i migracją komórek gruczolakoraka szyjki macicy. Dodatkowo komórki nowotworowe, w których występuje duża ilość białka *CXCR4* wykazują tendencję do tworzenia przerzutów do węzłów chłonnych [230]. Z kolei Rein i wsp. [231] wykorzystując selekcyjonowane komórki z pierwotnych nowotworów, komórki nienowotworowe jak i różne linie raka szyjki macicy wykazał aktywność promotora genu *CXCR4* tylko w pierwotnych liniach komórkowych oraz w liniach nowotworowych raka szyjki macicy, przy czym aktywność ta była bardzo niska [231].

Wyniki prezentowane w pracy doktorskiej wskazują na statystycznie istotny, wyższy poziom transkryptów genu *CXCR4* w pierwotnym zaawansowanym raku szyjki macicy w porównaniu do tkanki kontrolnej. Zwiększoną ekspresję genu *CXCR4* w raku szyjki macicy można wytłumaczyć analizując strukturę promotora tego genu. Staller i wsp. [73] wykazał iż HRE zlokalizowany w pozycji -1,3 kpb od miejsca startu transkrypcji jest kluczowy dla indukcji ekspresji genu *CXCR4* przez czynnik transkrypcyjny HIF-1. Co więcej miejsce to znajduje się w rejonie, w którym występują liczne wyspy CpG, co może świadczyć o potencjalnej epigenetycznej regulacji ekspresji tego genu. Jednakże wyniki analizy metylacji sekwencji promotorowej genu *CXCR4* prezentowane w niniejszej pracy wskazują na potencjalny brak epigenetycznej regulacji jego ekspresji w pierwotnym, zaawansowanym raku szyjki macicy. Analiza sekwencji promotorowej w tkance nowotworowej jak i kontrolnej wykluczyła obecność metylacji wysp CpG w analizowanym fragmencie promotora [232].

Jako pierwszy bezpośrednich dowodów na regulację ekspresji genu *CXCR4* przez białko HIF-1A dostarczył Tang i wsp. [233]. Wykorzystując transfekowaną linię komórkową raka szyjki macicy – SiHa, autor wykazał że nadekspresja czynnika HIF-1A powoduje nadekspresję *CXCR4*, co wpływa bezpośrednio na proliferację i migrację komórek raka szyjki macicy [233]. Wyniki prezentowane w pracy Łuczak i wsp. [232] również wskazują na istotną statystycznie wyższą ekspresję genu *CXCR4* w tkance nowotworowej w porównaniu do tkanki kontrolnej. Ekspresja ta może być bezpośrednio związana z wysokim poziomem białka HIF-1A w tkance nowotworowej [234], które może bezpośrednio wpływać na ekspresję genu *CXCR4*. Założenie to potwierdza analiza korelacji Spearmana pomiędzy HIF-1A oraz *CXCR4* [232], ponieważ pomiędzy obydwoma analizowanymi genami występuje pozytywna, istotna statystycznie korelacja. Dlatego też wyniki prezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej po raz pierwszy potwierdzają wyniki prezentowane przez Tang i wsp. [233].

DNMT3A należy do rodziny *de novo* metylotransferaz, i ulega zróżnicowanej ekspresji w czasie rozwoju embrionalnego [235-237]. Nie udało się dotychczas poznać wszystkich funkcji DNMT3A. Wiadomo, iż embriony mysie pozbawione genu *DNMT3A* rozwijają się prawidłowo, jednakże umierają wkrótce po urodzeniu [238]. Związek pomiędzy ekspresją genu *DNMT3A* a rozwojem procesu nowotworowego jest wciąż w dużej mierze nieznan. Deng i wsp. [239] wykorzystując siRNA-DNMT3A wykazał na modelu mysim, iż zahamowanie ekspresji genu *DNMT3A* powoduje zahamowanie wzrostu i przerzutów czerniaka. Podwyższona ekspresja genu *DNMT3A* w tkance nowotworowej w porównaniu do

tkanki kontrolnej opisana została w pierwotnym raku jelita grubego [240], raku płaskonabłonkowym jamy ustnej [241] oraz w retinoblastomie [242]. Wyniki prezentowane w niniejszej pracy doktorskiej potwierdzają nadekspresję genu *DNMT3A* w tkance pochodzącej z raka szyjki macicy w porównaniu do tkanki kontrolnej. Jako pierwszy dowodów świadczących o udziale metylotransferazy *DNMT3A* w metylacji DNA w czasie kancerogenezy dostarczył Zhao i wsp. [243]. Autor zaobserwował podwyższoną ekspresję genu *DNMT3A* w liniach komórkowych oraz w tkankach raka wątroby. Wyłączenie ekspresji genu *DNMT3A* w linii raka wątroby SMMC-7721 spowodowało wzrost ekspresji 153 genów, z których 91 posiadało wyspy CpG w rejonie promotora [243]. W grupie tej znalazło się aż 13 genów zaliczanych do kluczowych stresorów transformacji nowotworowej kontrolujących proliferację i cykl komórkowy [243]. Jednakże najnowszych danych dotyczących wpływu metylotransferaz, w tym różnych izoform genu *DNMT3A* na regulację epigenetyczną ekspresji wielu genów dostarcza praca Choi i wsp. [244].

Ekspresja genów metylotransferaz *DNMT1* [245] i *DNMT3B* [246] jest niezwykle istotna dla procesu kancerogenezy. Nadekspresja obydwu genów była wielokrotnie opisywana w licznych nowotworach [247]. W przypadku raka szyjki macicy opisano dotychczas, wykorzystując techniki immunohistochemii, jedynie ilość białka DNMT1. Sawada i wsp. [248] opisał ilość białka DNMT1 w zdrowych komórkach szyjki macicy, dysplazjach stopnia I, II oraz III, a także w płaskonabłonkowym raku szyjki macicy. Autor zaobserwował korelację pomiędzy wzrostem ilości białka DNMT1, a stopniem zaawansowania raka szyjki macicy z maksimum wzrostu w przypadku raka inwazyjnego. Autor zasugerował również, iż podwyższona ilość białka DNMT1 jest związana z bardzo wczesnymi etapami raka szyjki macicy, ponieważ ekspresja genu *DNMT1* może być stymulowana przez białka E6 i E7 wirusa HPV-16. Yeung i wsp. [249] opisał stymulację ekspresji genu *DNMT1* przez białko E6 wirusa HPV-16 w liniach komórkowych raka szyjki macicy, natomiast Burgers i wsp. [250] wykazał bezpośrednie oddziaływanie białka E7 wirusa HPV16 z białkiem DNMT1 na modelu *in vitro* [250]. Brak natomiast jakichkolwiek danych o ekspresji genu *DNMT3B* w raku szyjki macicy, zarówno na poziomie transkryptu jak i białka. Wyniki prezentowane w niniejszej pracy doktorskiej po raz pierwszy porównują ekspresję metylotransferazy *DNMT3B* na poziomie transkryptów w tkance nowotworowej i kontrolnej w raku szyjki macicy. Uzyskane wyniki badań wskazują, iż tkanka nowotworowa wykazuje istotnie statystycznie wyższą ekspresję *DNMT3B* a także *DNMT1* w porównaniu do tkanki kontrolnej.

6. WNIOSKI

1. W zaawansowanym, pierwotnym płaskonabłonkowym raku szyjki macicy zwiększona ilość transkryptów i białka HIF-1A w porównaniu do tkanki kontrolnej, może wpływać na obserwowany w tkance nowotworowej wzrost ilości transkryptów dla genów *VHL* i *CXCR4*. Nie wpływa natomiast na ilość transkryptów i białka EGLN1.

2. Wzrost ekspresji genu *VHL* towarzyszący wzrostowi ilości białka HIF-1A w komórce nowotworowej, może być czynnikiem uniemożliwiającym komórce nowotworowej wejście w stan apoptozy.

3. Obniżona ilość transkryptów i białka EGLN1 w tkance nowotworowej oraz brak opisywanego przez innych autorów mechanizmu sprzężenia zwrotnego pomiędzy HIF-1A a EGLN1 związany jest z występowaniem licznych mutacji w obrębie miejsc wiązania się czynników transkrypcyjnych w sekwencji promotorowej genu *EGLN1*.

4. Pomimo obecności „wysp” CpG w sekwencji promotorowej genów *EGLN1*, *HIF-1A*, *VHL* i *CXCR4* oraz obserwowanego wzrostu ilości transkryptów dla metylotransferaz DNA (DNMT3A, DNMT3B i DNMT1) w tkance nowotworowej, żaden z analizowanych genów (*EGLN1*, *HIF-1A*, *VHL* i *CXCR4*) nie jest regulowany poprzez metylację DNA.

7. STRESZCZENIE

Kancerogeneza jest złożonym procesem, w który zaangażowany jest szereg czynników zarówno genetycznych jak i epigenetycznych. Umożliwiają one komórkom nowotworowym nabycie nowych cech, przez co komórki rakowe stają się odporne na działanie inhibitorów wzrostu, nabywają nieograniczony potencjał replikacyjny oraz cechuje je inwazyjność i zdolność do tworzenia przerzutów.

Rak szyjki macicy wykazuje kilka cech charakterystycznych, które wyróżniają go spośród innych nowotworów. Zdrowe komórki nabłonkowe szyjki macicy wykazują charakterystykę tkanki będącej w hipoksji. Zjawisko hipoksji obserwuje się w większości nowotworów i jest ona następstwem niskiego poziomu natlenienia tkanki nowotworowej. Kluczowym elementem związanym z adaptacją organizmu do niskiego stężenia tlenu jest czynnik indukowany hipoksją – HIF. HIF jest heterodimerskim czynnikiem transkrypcyjnym składającym się z jednej z 3 wrażliwych na stężenie tlenu podjednostek α oraz z wspólnej, ulegającej konstytutywnej ekspresji podjednostki β . Czynnikiem ten reguluje ekspresję około 70 genów posiadających w swojej sekwencji promotorowej element odpowiedzi na hipoksję (HRE). Jednym z genów posiadających sekwencję HRE w obrębie promotora jest *CXCR4*. Gen ten, podobnie jak *EGLN1*, *HIF-1A* i *VHL* może być również regulowany poprzez metylację DNA ponieważ posiada w obrębie sekwencji promotorowej „wyspy” CpG. Za metylację DNA odpowiedzialne są metylotransferazy DNA, do których zaliczamy DNMT3A, DNMT3B i DNMT1.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było porównanie ekspresji wybranych genów zaangażowanych w proces hipoksji pomiędzy tkanką nowotworową raka szyjki macicy a tkanką kontrolną. Podjęto także próbę określenia regulacji ich ekspresji (genetyczna, epigenetyczna) oraz skorelowano ekspresję genu *HIF-1A* z ekspresją genów zaangażowanych w proces hipoksji i progresję nowotworu.

W celu realizacji wyżej opisanych założeń analizowano poziom transkryptów dla genów *EGLN1*, *HIF-1A*, *VHL*, *CXCR4*, *DNMT3A*, *DNMT3B* i *DNMT1* oraz ilość białka EGLN1 i HIF-1A w tkankach nowotworowych (n=30) i w grupie kontrolnej (n=30). Przeprowadzono także reakcję sekwencjonowania regionu promotorowego genu *EGLN1* oraz analizowano wzór metylacji DNA sekwencji promotorowej genów *EGLN1*, *HIF-1A*, *VHL* i *CXCR4*.

Analiza Real-time PCR i Western Blot wykazała istotny statystycznie niższy poziom transkryptów (p=0,0005) i białka (p=0,0023) EGLN1 w tkance nowotworowej w porównaniu

do tkanki kontrolnej. Zmniejszona ekspresja genu *EGLN1* związana była z występowaniem licznych mutacji, które prawdopodobnie uniemożliwiały wiązanie się czynników transkrypcyjnych w sekwencji promotorowej badanego genu.

Analiza poziomu transkryptów genów *HIF-1A*, *VHL*, *CXCR4*, *DNMT3A*, *DNMT3B* i *DNMT1* wykazała z kolei wzrost ich ilości w tkance nowotworowej w porównaniu do kontrolnej (odpowiednio $p < 0,0001$, $p = 0,0042$, $p = 0,0058$, $p = 0,0163$, $p = 0,0003$ and $p < 0,0001$). W tkance nowotworowej obserwowano także wyższy poziom białka HIF-1A w porównaniu do tkanki kontrolnej ($p = 0,0037$).

Pomimo występowania „wysp” CpG w sekwencji promotorowej genów *EGLN1*, *HIF-1A*, *VHL* i *CXCR4* analiza wzoru metylacji wykluczyła regulację ich ekspresji poprzez metylację DNA.

Korelacja ekspresji genu *HIF-1A* z ekspresją genów zaangażowanych w proces hipoksji i progresję nowotworu wykazała, iż może on wpływać na ekspresję *CXCR4* (korelacja Spearman'a $= 0,445$; $p = 0,0141$) u pacjentek z pierwotnym, zaawansowanym rakiem szyjki macicy.

Wykazano także występowanie mechanizmu sprzężenia zwrotnego, w którym HIF-1A może sam regulować poziom własnego białka poprzez wpływ na ekspresję genu *VHL* (korelacja Spearman'a $= 0,515$; $p = 0,003$). Rosnący poziom ekspresji *VHL* zmniejsza ilości białka HIF-1A co chroni komórkę przed wejściem w stan apoptozy.

8. SUMMARY

The development of cervical cancer is determined by genetic and epigenetic factors which result in the persistence of a malignant phenotype. Moreover cervical cancer exhibits some unique differences from other solid tumors. Normal cervical stratified epithelia has characteristics of hypoxic tissue. Low level of oxygen (hypoxia) induces HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) transcription factor, which is a heterodimer composed of constitutively expressed β subunit and a hypoxia-inducible α -subunit. HIF-1A targets the transcription of over 70 genes involved in many aspects of cancer biology. In well-oxygenated environments, the HIF-1A subunit is post-translationally hydroxylated by EGLN1. Further pVHL may bind to HIF-1A and target it for proteosomal degradation. Under hypoxic stress, proline hydroxylase (EGLN1) activity is diminished, and stabilized form of HIF-1A is involved in the activation of tissue response to hypoxia. One of the genes, which could be induced by HIF-1A is *CXCR4*. This gene as well as *EGLN1*, *HIF-1A* and *VHL* could be potentially epigenetically regulated by methylation of CpG dinucleotides located in the promoter region. DNA methylation is catalyzed by DNA methyltransferases (DNMT3A, DNMT3B and DNMT1).

I examined the *EGLN1*, *HIF-1A*, *VHL*, *CXCR4*, *DNMT3A*, *DNMT3B* and *DNMT1* transcript levels and EGLN1 as well as HIF-1A protein levels in cancerous tissue (n=30) and non-cancerous, normal uterine cervical tissue (n=30) from a Polish cohort. Moreover single point mutations of *EGLN1* and methylation status of *EGLN1*, *HIF-1A*, *VHL* and *CXCR4* promoter regions in cancerous and normal tissue samples have been analyzed.

Real-time PCR and Western Blot analysis showed significantly lower levels of *EGLN1* transcript (p=0.0005) and protein (p=0.0023) in cancerous tissues compared to corresponding normal uterine cervical tissue. Decreased *EGLN1* transcript and protein levels were associated with the presence of single point mutations in promoter region of this gene. Sequencing analysis showed an accumulation of mutations in promoter regions of *EGLN1* in advanced cervical cancer specimens. Moreover, computer analysis of these mutations revealed a loss of transcription factors binding sites.

In addition to that I observed significantly higher levels of *HIF-1A*, *VHL*, *CXCR4*, *DNMT3A*, *DNMT3B* and *DNMT1* transcript (p<0.0001, p=0.0042, p=0.0058, p=0.0163, p=0.0003 and p<0.0001 respectively) and HIF-1A protein (p=0.0037) levels in cancerous tissue compared to normal uterine cervical tissue. DNA methylation alternation between cancerous and control tissue were not observed in the *EGLN1*, *HIF-1A*, *VHL* and *CXCR4* promoter regions.

CXCR4 and *VHL* possess a functional hypoxia response element (HRE) within the promoter region. To best of my knowledge, this is the first report concerning induction of *CXCR4* gene expression by HIF-1A (Spearman correlation coefficient=0.445, p=0.0141) in patients with primary advanced uterine cervical carcinoma. These findings may also suggest that HIF-1A could promote its own degradation by the induction of *VHL* gene expression (Spearman correlation coefficient=0.515, p=0.003). This may imply the presence of negative feedback pathway during hypoxia to regulate the cell-specific oxygen threshold for HIF-1A activation.

9. WYKAZ SKRÓTÓW

- AP-1** – czynnik transkrypcyjny (ang. *activator protein 1*)
- AP-2** – czynnik transkrypcyjny AP-2 alfa(ang. *transcription factor AP-2 alpha*)
- ARNT** – białko jądrowe ARNT (ang. *aryl hydrocarbon nuclear translocator*)
- ATF-1** – czynnik transkrypcyjny (ang. *activating transcription factor 1*)
- BCA** – metoda pomiaru stężenia białek z zastosowaniem kwasu bis-cynchoninowego (ang. *bicinchoninic acid assay*)
- bHLH** – struktura helisa-skręt-helisa (ang. *basic helix-loop-helix*)
- CIN** – wewnątrz nabłonkowa neoplazja szyjki macicy (łac. *cervical intraepithelial neoplasia*)
- cMyc** – białko protoonkogenowe myc (ang. *myc proto-oncogene protein*)
- CMV** – cytomegalowirus (ang. *human herpesvirus*)
- CREB1** – czynnik transkrypcyjny (ang. *cAMP responsive element binding protein 1*)
- CXCR4** – receptor chemokiny 4 (ang. *chemokine (C-X-C motif) receptor 4*)
- CTAD** – C-terminalna domena transaktywacyjna (ang. *C-terminal transactivation domain*)
- DNMT** – DNA metylotransferaza (ang. *DNA (cytosine-5-)-methyltransferase*)
- EBV** – wirus Epsteina-Barr (ang. *Epstein-Barr virus*)
- EGLN** – hydroksylaza prolinowa dla HIF (ang. *HIF prolyl hydroxylase*)
- E2F** – czynnik transkrypcyjny (ang. *E2F transcription factor*)
- E6-AP** – białko związane z białkiem E6 (ang. *cellular E6-associated protein*)
- FIGO** – Międzynarodowa Federacja Ginekologii i Położnictwa (ang. *International Federation of Gynecology and Obstetrics*)
- HAS** – sekwencja pomocnicza dla HIF-1 (ang. *HIF-1 Ancillary Sequence*)
- HIF** – czynnik indukowany hipoksją (ang. *Hypoxia Inducible Factor*)
- HIV** – wirus niedoboru odporności (ang. *human immunodeficiency virus*)
- HMBS** – syntaza hydroksymetylenobilanowa (ang. *hydroxymethylbilane synthase*)
- HPV** – wirus brodawczaka ludzkiego (ang. *human papilloma virus*)
- HRE** – element odpowiedzi na hipoksję (ang. *Hypoxia Respond Element*)
- HSLI** – zmiana śródnabłonkowa dużego stopnia (ang. *high grade squamous intraepithelial lesion*)
- HSV2** – wirus opryszczki typu 2 (ang. *herpes simplex virus 2*)
- IPTG** – izopropylotiogalaktozyd
- kpz** – kilo par zasad

lacZ – podjednostka alfa enzymu β -galaktozydazy (ang. *beta-D-galactosidase*)

LINEs – długie rozproszone sekwencje jądrowe (ang. *long interspersed nuclear elements*)

LSIL – zmian śród nabłonkowa niskiego stopnia (ang. *low grade squamous intraepithelial lesion*)

MBD – białko zawierające domenę wiążącą m^5CpG (ang. *m^5CpG binding domain proteins*)

MeCP – białko wiążące metylowany dinukleotyd CG (ang. *m^5CpG binding protein*)

NF κ B – czynnik jądrowy κ B (ang. *nuclear factor κ B*)

NTAD – N-terminalna domena transaktywacyjna (ang. *N-terminal transactivation domain*)

ODD – zależna od tlenu domena degradacyjna (ang. *oxygen-dependent degradation domain*)

PH-4 – hydroksylaza prolinowa (ang. *prolyl 4-hydroxylase*)

PVDF – membrana z polifluorku winylidenu

pz – par zasad

TSG – gen supresorowy transformacji nowotworowej (ang. *Tumor Suppressor Gene*)

VHL – supresor transformacji nowotworowej VHL (ang. *von Hippel-Lindau tumor suppressor*)

X-Gal – 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopiranozyd

5-aza-CdR – 5'-aza-2'-deoksycytozyna

10. PIŚMIENICTWO

- [1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer*. 2001; 94:153-156.
- [2] Didkowska J, Wojciechowska U, Zatoński W. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2009 roku. Centrum Onkologii — Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Warszawa 2011, ISSN 0867-8251.
- [3] Marrazzo JM, Koutsky LA, Kiviat NB, Kuypers JM, Stine K. Papanicolaou test screening and prevalence of genital human papillomavirus among women who have sex with women. *Am J Public Health*. 2001; 91:947-952.
- [4] Bręborowicz G. Położnictwo i ginekologia, tom 2, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2007, wyd. 1, ISBN 83-200-3082-4, s. 819-832.
- [5] Schmauz R, Okong P, de Villiers EM, Dennin R, Brade L, Lwanga SK, Owor R. Multiple infections in cases of cervical cancer from a high-incidence area in tropical Africa. *Int J Cancer*. 1989; 43:805-809.
- [6] de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324:17-27.
- [7] Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol*. 2005; 32 Suppl 1:S1-S6.
- [8] Baker CC, Phelps WC, Lindgren V, Braun MJ, Gonda MA, Howley PM. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol*. 1987; 61:962-971.
- [9] Kivi N, Greco D, Auvinen P, Auvinen E. Genes involved in cell adhesion, cell motility and mitogenic signaling are altered due to HPV 16 E5 protein expression. *Oncogene*. 2008; 27:2532-2541.
- [10] Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J*. 1989; 8:3905-3910.
- [11] Riley RR, Duensing S, Brake T, Münger K, Lambert PF, Arbeit JM. Dissection of human papillomavirus E6 and E7 function in transgenic mouse models of cervical carcinogenesis. *Cancer Res*. 2003; 63:4862-4871.
- [12] Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*. 1993; 75:495-505.

- [13] Klingelhutz AJ, Foster SA, McDougall JK. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature*. 1996; 380:79-82.
- [14] Sprague DL, Phillips SL, Mitchell CJ, Berger KL, Lacey M, Turek LP, Klingelhutz AJ. Telomerase activation in cervical keratinocytes containing stably replicating human papillomavirus type 16 episomes. *Virology*. 2002; 301:247-254.
- [15] Huh KW, DeMasi J, Ogawa H, Nakatani Y, Howley PM, Münger K. Association of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein with the 600-kDa retinoblastoma protein-associated factor, p600. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102:11492-11497.
- [16] Huh K, Zhou X, Hayakawa H, Cho JY, Libermann TA, Jin J, Harper JW, Munger K. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Virol*. 2007; 81:9737-9747.
- [17] Łuczak MW, Jagodziński PP. Apicidin down-regulates human papillomavirus type 16 E6 and E7 transcripts and proteins in SiHa cervical cancer cells. *Cancer Lett*. 2008; 272:53-60.
- [18] Papanicolaou GN, Traut H. Diagnosis of Uterine Cancer by the Vaginal Smear. *Am J Med Sci*. 1943; 206:811.
- [19] Oren A, Fernandes J. The Bethesda system for the reporting of cervical/vaginal cytology. *J Am Osteopath Assoc*. 1991; 91:476-479.
- [20] Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T Jr, Young N. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*. 2002; 287:2114-2119.
- [21] Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell R. Robbins Basic Pathology (8th ed.). Saunders Elsevier, 2007, ISBN 978-1-4160-2973-1, s. 718–721.
- [22] Ries LAG, Harkins D, Krapcho M, Mariotto A, Miller BA, Feuer EJ, Clegg L, Eisner MP, Horner MJ, Howlander N, Hayat M, Hankey BF, Edwards BK (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2003, National Cancer Institute. Bethesda, MD, 2006.
- [23] Stachura J, Domagała W. Patologia znaczy słowo o chorobie. Tom II – Patologia narządowa. Kraków, Wydawnictwo PAU, 2005, ISBN 83-88857-91-6.
- [24] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100, 57–70.
- [25] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144:646-674.
- [26] Roskelley CD, Bissell MJ. The dominance of the microenvironment in breast and ovarian cancer. *Semin Cancer Biol*. 2002; 12:97-104.

- [27] Heddlestone JM, Li Z, Lathia JD, Bao S, Hjelmeland AB, Rich JN. Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. *Br J Cancer*. 2010; 102:789-795.
- [28] Powis G, Kirkpatrick L. Hypoxia inducible factor-1alpha as a cancer drug target. *Mol Cancer Ther*. 2004; 3:647-654.
- [29] Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature*. 2006; 441:437-443.
- [30] Bertout JA, Patel SA, Simon MC. The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8:967-975.
- [31] Denko NC. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8:705-713.
- [32] Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res*. 1999; 59:5830-5835.
- [33] Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev*. 2007; 26:225-239.
- [34] Bristow RG, Hill RP. Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8:180-192.
- [35] Lundgren K, Holm C, Landberg G. Hypoxia and breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Cell Mol Life Sci*. 2007; 64:3233-3247.
- [36] Le QT, Courter D. Clinical biomarkers for hypoxia targeting. *Cancer Metastasis Rev*. 2008; 27:351-362.
- [37] Haase VH. Hypoxia-inducible factors in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006; 291:F271-F281.
- [38] Semenza GL. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1999; 15:551-578.
- [39] Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J*. 2002; 16:1151-1162.
- [40] Wiesener MS, Jürgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Hörstrup JH, Warnecke C, Mandriota S, Bechmann I, Frei UA, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Bachmann S, Maxwell PH, Eckardt KU. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. *FASEB J*. 2003; 17:271-273.

- [41] Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004; 5:343-354.
- [42] Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 1994; 269:23757-23763.
- [43] Liu YL, Ang SO, Weigent DA, Prchal JT, Bloomer JR. Regulation of ferrochelatase gene expression by hypoxia. *Life Sci.* 2004; 75:2035-2043.
- [44] Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T, Bailey-Dell K, Zhou S, Mercer KE, Sarkadi B, Sorrentino BP, Schuetz JD. The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J Biol Chem.* 2004; 279:24218-24225.
- [45] Rolfs A, Kvietikova I, Gassmann M, Wenger RH. Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *J Biol Chem.* 1997; 272:20055-20062.
- [46] Tacchini L, Bianchi L, Bernelli-Zazzera A, Cairo G. Transferrin receptor induction by hypoxia. HIF-1-mediated transcriptional activation and cell-specific post-transcriptional regulation. *J Biol Chem.* 1999; 274:24142-24146.
- [47] Lok CN, Ponka P. Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene. *J Biol Chem.* 1999; 274:24147-24152.
- [48] Mukhopadhyay CK, Mazumder B, Fox PL. Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency. *J Biol Chem.* 2000; 275:21048-21054.
- [49] Liu Y, Cox SR, Morita T, Kourembanas S. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res.* 1995; 77:638-643.
- [50] Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol.* 1996; 16:4604-4613.
- [51] Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem.* 1997; 272:23659-23667.
- [52] Ambrosini G, Nath AK, Sierra-Honigsmann MR, Flores-Riveros J. Transcriptional activation of the human leptin gene in response to hypoxia. Involvement of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 2002; 277:34601-34609.

- [53] Grosfeld A, Andre J, Hauguel-De Mouzon S, Berra E, Pouyssegur J, Guerre-Millo M. Hypoxia-inducible factor 1 transactivates the human leptin gene promoter. *J Biol Chem.* 2002; 277:42953-42957.
- [54] Coulet F, Nadaud S, Agrapart M, Soubrier F. Identification of hypoxia-response element in the human endothelial nitric-oxide synthase gene promoter. *J Biol Chem.* 2003; 278:46230-46240.
- [55] Hu J, Discher DJ, Bishopric NH, Webster KA. Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 245:894-899.
- [56] Fink T, Kazlauskas A, Poellinger L, Ebbesen P, Zachar V. Identification of a tightly regulated hypoxia-response element in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-1. *Blood.* 2002; 99:2077-2083.
- [57] Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, Passantino R, Concordet JP, Maire P, Giallongo A. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 1996; 271:32529-32537.
- [58] Graven KK, Yu Q, Pan D, Roncarati JS, Farber HW. Identification of an oxygen responsive enhancer element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1447:208-218.
- [59] Lu S, Gu X, Hoestje S, Epner DE. Identification of an additional hypoxia responsive element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1574:152-156.
- [60] Obach M, Navarro-Sabaté A, Caro J, Kong X, Duran J, Gómez M, Perales JC, Ventura F, Rosa JL, Bartrons R. 6-Phosphofructo-2-kinase (pfkfb3) gene promoter contains hypoxia-inducible factor-1 binding sites necessary for transactivation in response to hypoxia. *J Biol Chem.* 2004; 279:53562-53570.
- [61] Fukasawa M, Tsuchiya T, Takayama E, Shinomiya N, Uyeda K, Sakakibara R, Seki S. Identification and characterization of the hypoxia-responsive element of the human placental 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene. *J Biochem.* 2004; 136:273-277.
- [62] Minchenko O, Opentanova I, Minchenko D, Ogura T, Esumi H. Hypoxia induces transcription of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 gene via hypoxia-inducible factor-1 α activation. *FEBS Lett.* 2004; 576:14-20.

- [63] Grabmaier K, A de Weijert MC, Verhaegh GW, Schalken JA, Oosterwijk E. Strict regulation of CAIX(G250/MN) by HIF-1alpha in clear cell renal cell carcinoma. *Oncogene*. 2004; 23:5624-5631.
- [64] Bierl C, Voetsch B, Jin RC, Handy DE, Loscalzo J. Determinants of human plasma glutathione peroxidase (GPx-3) expression. *J Biol Chem*. 2004; 279:26839-26845.
- [65] Comerford KM, Wallace TJ, Karhausen J, Louis NA, Montalto MC, Colgan SP. Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res*. 2002; 62:3387-3394.
- [66] Tazuke SI, Mazure NM, Sugawara J, Carland G, Faessen GH, Suen LF, Irwin JC, Powell DR, Giaccia AJ, Giudice LC. Hypoxia stimulates insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP-1) gene expression in HepG2 cells: a possible model for IGFBP-1 expression in fetal hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95:10188-10193.
- [67] Nishi H, Nakada T, Hokamura M, Osakabe Y, Itokazu O, Huang LE, Isaka K. Hypoxia-inducible factor-1 transactivates transforming growth factor-beta3 in trophoblast. *Endocrinology*. 2004; 145:4113-4118.
- [68] Sánchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Langa C, Bernabéu C. Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem*. 2002; 277:43799-43808.
- [69] Higgins DF, Biju MP, Akai Y, Wutz A, Johnson RS, Haase VH. Hypoxic induction of Ctgf is directly mediated by Hif-1. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004; 287:F1223-F1232.
- [70] Furuta GT, Turner JR, Taylor CT, Hershberg RM, Comerford K, Narravula S, Podolsky DK, Colgan SP. Hypoxia-inducible factor 1-dependent induction of intestinal trefoil factor protects barrier function during hypoxia. *J Exp Med*. 2001; 193:1027-1034.
- [71] Synnestvedt K, Furuta GT, Comerford KM, Louis N, Karhausen J, Eltzhig HK, Hansen KR, Thompson LF, Colgan SP. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J Clin Invest*. 2002; 110:993-1002.
- [72] Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med*. 2004; 10:858-864.
- [73] Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J, Moch H, Oakeley EJ, Krek W. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature*. 2003; 425:307-311.

- [74] Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, Mazzone M, Giordano S, Comoglio PM. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell*. 2003; 3:347-361.
- [75] Nishi H, Nakada T, Kyo S, Inoue M, Shay JW, Isaka K. Hypoxia-inducible factor 1 mediates upregulation of telomerase (hTERT). *Mol Cell Biol*. 2004; 24:6076-6083.
- [76] Yatabe N, Kyo S, Maida Y, Nishi H, Nakamura M, Kanaya T, Tanaka M, Isaka K, Ogawa S, Inoue M. HIF-1-mediated activation of telomerase in cervical cancer cells. *Oncogene*. 2004; 23:3708-3715.
- [77] Kothari S, Cizeau J, McMillan-Ward E, Israels SJ, Bailes M, Ens K, Kirshenbaum LA, Gibson SB. BNIP3 plays a role in hypoxic cell death in human epithelial cells that is inhibited by growth factors EGF and IGF. *Oncogene*. 2003; 22:4734-4744.
- [78] Kim JY, Ahn HJ, Ryu JH, Suk K, Park JH. BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1alpha. *J Exp Med*. 2004; 199:113-124.
- [79] Zhou G, Golden T, Aragon IV, Honkanen RE. Ser/Thr protein phosphatase 5 inactivates hypoxia-induced activation of an apoptosis signal-regulating kinase 1/MKK-4/JNK signaling cascade. *J Biol Chem*. 2004; 279:46595-46605.
- [80] Piret JP, Minet E, Cosse JP, Ninane N, Debaq C, Raes M, Michiels C. Hypoxia-inducible factor-1-dependent overexpression of myeloid cell factor-1 protects hypoxic cells against tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2005; 280:9336-9344.
- [81] Li J, Zhang X, Sejas DP, Bagby GC, Pang Q. Hypoxia-induced nucleophosmin protects cell death through inhibition of p53. *J Biol Chem*. 2004; 279:41275-41279.
- [82] Bhattacharya S, Michels CL, Leung MK, Arany ZP, Kung AL, Livingston DM. Functional role of p35srj, a novel p300/CBP binding protein, during transactivation by HIF-1. *Genes Dev*. 1999; 13:64-75.
- [83] Löfstedt T, Jögi A, Sigvardsson M, Gradin K, Poellinger L, Pålman S, Axelson H. Induction of ID2 expression by hypoxia-inducible factor-1: a role in dedifferentiation of hypoxic neuroblastoma cells. *J Biol Chem*. 2004; 279:39223-39231.
- [84] Oikawa M, Abe M, Kurosawa H, Hida W, Shirato K, Sato Y. Hypoxia induces transcription factor ETS-1 via the activity of hypoxia-inducible factor-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 289:39-43.
- [85] Miyazaki K, Kawamoto T, Tanimoto K, Nishiyama M, Honda H, Kato Y. Identification of functional hypoxia response elements in the promoter region of the DEC1 and DEC2 genes. *J Biol Chem*. 2002; 277:47014-47021.

- [86] Kong T, Eltzschig HK, Karhausen J, Colgan SP, Shelley CS. Leukocyte adhesion during hypoxia is mediated by HIF-1-dependent induction of beta2 integrin gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:10440-10445.
- [87] Paris S, Denis H, Delaive E, Dieu M, Dumont V, Ninane N, Raes M, Michiels C. Up-regulation of 94-kDa glucose-regulated protein by hypoxia-inducible factor-1 in human endothelial cells in response to hypoxia. *FEBS Lett*. 2005; 579:105-114.
- [88] McMahon S, Grondin F, McDonald PP, Richard DE, Dubois CM. Hypoxia-enhanced expression of the proprotein convertase furin is mediated by hypoxia-inducible factor-1: impact on the bioactivation of proproteins. *J Biol Chem*. 2005; 280:6561-6569.
- [89] Petrella BL, Lohi J, Brinckerhoff CE. Identification of membrane type-1 matrix metalloproteinase as a target of hypoxia-inducible factor-2 alpha in von Hippel-Lindau renal cell carcinoma. *Oncogene*. 2005; 24:1043-1052.
- [90] Metzen E, Stiehl DP, Doege K, Marxsen JH, Hellwig-Bürigel T, Jelkmann W. Regulation of the prolyl hydroxylase domain protein 2 (phd2/egln-1) gene: identification of a functional hypoxia-responsive element. *Biochem J*. 2005; 387:711-717.
- [91] Pescador N, Cuevas Y, Naranjo S, Alcaide M, Villar D, Landázuri MO, Del Peso L. Identification of a functional hypoxia-responsive element that regulates the expression of the egl nine homologue 3 (egln3/phd3) gene. *Biochem J*. 2005; 390:189-197.
- [92] Wenger RH, Stiehl DP, Camenisch G. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE*. 2005; 306:re12.
- [93] Zagórska A, Dulak J. HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochim Pol*. 2004; 51:563-585.
- [94] Ebert BL, Bunn HF. Regulation of transcription by hypoxia requires a multiprotein complex that includes hypoxia-inducible factor 1, an adjacent transcription factor, and p300/CREB binding protein. *Mol Cell Biol*. 1998; 18:4089-4096.
- [95] Firth JD, Ebert BL, Ratcliffe PJ. Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements. *J Biol Chem*. 1995; 270:21021-21027.
- [96] Damert A, Ikeda E, Risau W. Activator-protein-1 binding potentiates the hypoxia-inducible factor-1-mediated hypoxia-induced transcriptional activation of vascular-endothelial growth factor expression in C6 glioma cells. *Biochem J*. 1997; 327:419-423.
- [97] Wenger RH, Kvietikova I, Rolfs A, Camenisch G, Gassmann M. Oxygen-regulated erythropoietin gene expression is dependent on a CpG methylation-free hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding site. *Eur J Biochem*. 1998; 253:771-777.

- [98] Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999; 399:271-275.
- [99] Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev*. 2001; 15:2675-2686.
- [100] Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev*. 2002; 16:1466-1471.
- [101] Kaelin WG Jr, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell*. 2008; 30:393-402.
- [102] Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*. 2001; 107:43-54.
- [103] Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*. 2001; 294:1337-1340.
- [104] Oehme F, Ellinghaus P, Kolkhof P, Smith TJ, Ramakrishnan S, Hütter J, Schramm M, Flamme I. Overexpression of PH-4, a novel putative proline 4-hydroxylase, modulates activity of hypoxia-inducible transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 296:343-349.
- [105] Berra E, Benizri E, Ginouvès A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *EMBO J*. 2003; 22:4082-4090.
- [106] Takeda K, Ho VC, Takeda H, Duan LJ, Nagy A, Fong GH. Placental but not heart defects are associated with elevated hypoxia-inducible factor alpha levels in mice lacking prolyl hydroxylase domain protein 2. *Mol Cell Biol*. 2006; 26:8336-8346.
- [107] Takeda K, Cowan A, Fong GH. Essential role for prolyl hydroxylase domain protein 2 in oxygen homeostasis of the adult vascular system. *Circulation*. 2007; 116:774-781.
- [108] Takeda K, Aguila HL, Parikh NS, Li X, Lamothe K, Duan LJ, Takeda H, Lee FS, Fong GH. Regulation of adult erythropoiesis by prolyl hydroxylase domain proteins. *Blood*. 2008; 111:3229-3235.

- [109] Minamishima YA, Moslehi J, Bardeesy N, Cullen D, Bronson RT, Kaelin WG Jr. Somatic inactivation of the PHD2 prolyl hydroxylase causes polycythemia and congestive heart failure. *Blood*. 2008; 111:3236-3244.
- [110] Aragonés J, Schneider M, Van Geyte K, Fraisl P, Dresselaers T, Mazzone M, Dirx R, Zacchigna S, Lemieux H, Jeoung NH, Lambrechts D, Bishop T, Lafuste P, Diez-Juan A, Harten SK, Van Noten P, De Bock K, Willam C, Tjwa M, Grosfeld A, Navet R, Moons L, Vandendriessche T, Deroose C, Wijeyekoon B, Nuyts J, Jordan B, Silasi-Mansat R, Lupu F, Dewerchin M, Pugh C, Salmon P, Mortelmans L, Gallez B, Gorus F, Buyse J, Sluse F, Harris RA, Gnaiger E, Hespel P, Van Hecke P, Schuit F, Van Veldhoven P, Ratcliffe P, Baes M, Maxwell P, Carmeliet P. Deficiency or inhibition of oxygen sensor Phd1 induces hypoxia tolerance by reprogramming basal metabolism. *Nat Genet*. 2008; 40:170-180.
- [111] Bishop T, Gallagher D, Pascual A, Lygate CA, de Bono JP, Nicholls LG, Ortega-Saenz P, Oster H, Wijeyekoon B, Sutherland AI, Grosfeld A, Aragonés J, Schneider M, van Geyte K, Teixeira D, Diez-Juan A, Lopez-Barneo J, Channon KM, Maxwell PH, Pugh CW, Davies AM, Carmeliet P, Ratcliffe PJ. Abnormal sympathoadrenal development and systemic hypotension in PHD3^{-/-} mice. *Mol Cell Biol*. 2008; 28:3386-3400.
- [112] Percy MJ, Zhao Q, Flores A, Harrison C, Lappin TR, Maxwell PH, McMullin MF, Lee FS. A family with erythrocytosis establishes a role for prolyl hydroxylase domain protein 2 in oxygen homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103:654-659.
- [113] Percy MJ, Furlow PW, Beer PA, Lappin TR, McMullin MF, Lee FS. A novel erythrocytosis-associated PHD2 mutation suggests the location of a HIF binding groove. *Blood*. 2007; 110:2193-2196.
- [114] Ladroue C, Carcenac R, Leporrier M, Gad S, Le Hello C, Galateau-Salle F, Feunteun J, Pouysségur J, Richard S, Gardie B. PHD2 mutation and congenital erythrocytosis with paraganglioma. *N Engl J Med*. 2008; 359:2685-2692.
- [115] Appelhoff RJ, Tian YM, Raval RR, Turley H, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Gleadle JM. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem*. 2004; 279:38458-38465.
- [116] Hirsilä M, Koivunen P, Günzler V, Kivirikko KI, Myllyharju J. Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem*. 2003; 278:30772-30780.
- [117] Chan DA, Sutphin PD, Yen SE, Giaccia AJ. Coordinate regulation of the oxygen-dependent degradation domains of hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Mol Cell Biol*. 2005; 25:6415-6426.

- [118] Landázuri MO, Vara-Vega A, Vitón M, Cuevas Y, del Peso L. Analysis of HIF-prolyl hydroxylases binding to substrates. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 351:313-320.
- [119] Fedulova N, Hanrieder J, Bergquist J, Emrén LO. Expression and purification of catalytically active human PHD3 in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 2007; 54:1-10.
- [120] Flashman E, Bagg EA, Chowdhury R, Mecinović J, Loenarz C, McDonough MA, Hewitson KS, Schofield CJ. Kinetic rationale for selectivity toward N- and C-terminal oxygen-dependent degradation domain substrates mediated by a loop region of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylases. *J Biol Chem.* 2008; 283:3808-3815.
- [121] Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG Jr. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science.* 2001; 292:464-468.
- [122] Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim Av, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science.* 2001; 292:468-472.
- [123] Hofer T, Desbaillets I, Höpfl G, Gassmann M, Wenger RH. Dissecting hypoxia-dependent and hypoxia-independent steps in the HIF-1 α activation cascade: implications for HIF-1 α gene therapy. *FASEB J.* 2001; 15:2715-2717.
- [124] Lieb ME, Menzies K, Moschella MC, Ni R, Taubman MB. Mammalian EGLN genes have distinct patterns of mRNA expression and regulation. *Biochem Cell Biol.* 2002;80(4):421-6.
- [125] Willam C, Nicholls LG, Ratcliffe PJ, Pugh CW, Maxwell PH. The prolyl hydroxylase enzymes that act as oxygen sensors regulating destruction of hypoxia-inducible factor α . *Adv Enzyme Regul.* 2004;44:75-92.
- [126] Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol.* 1996; 271:C1172-C1180.
- [127] del Peso L, Castellanos MC, Temes E, Martin-Puig S, Cuevas Y, Olmos G, Landazuri MO. The von Hippel Lindau/hypoxia-inducible factor (HIF) pathway regulates the transcription of the HIF-proline hydroxylase genes in response to low oxygen. *J Biol Chem.* 2003; 278:48690-48695.
- [128] D'Angelo G, Duplan E, Boyer N, Vigne P, Frelin C. Hypoxia up-regulates prolyl hydroxylase activity: a feedback mechanism that limits HIF-1 responses during reoxygenation. *J Biol Chem.* 2003; 278:38183-38187.

- [129] Cioffi CL, Liu XQ, Kosinski PA, Garay M, Bowen BR. Differential regulation of HIF-1 alpha prolyl-4-hydroxylase genes by hypoxia in human cardiovascular cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 303:947-953.
- [130] Aprelikova O, Chandramouli GV, Wood M, Vasselli JR, Riss J, Maranchie JK, Linehan WM, Barrett JC. Regulation of HIF prolyl hydroxylases by hypoxia-inducible factors. *J Cell Biochem.* 2004; 92:491-501. Erratum In *J Cell Biochem.* 2004; 93:639.
- [131] Marxsen JH, Stengel P, Doege K, Heikkinen P, Jokilehto T, Wagner T, Jelkmann W, Jaakkola P, Metzner E. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) promotes its degradation by induction of HIF-alpha-prolyl-4-hydroxylases. *Biochem J.* 2004; 381:761-767.
- [132] Łuczak MW, Drzewiecka H, Jagodziński PP. Czynniki indukowane hipoksją – HIF. *Nowiny Lekarskie* 2009; 78:237–248.
- [133] Stiehl DP, Wirthner R, Köditz J, Spielmann P, Camenisch G, Wenger RH. Increased prolyl 4-hydroxylase domain proteins compensate for decreased oxygen levels. Evidence for an autoregulatory oxygen-sensing system. *J Biol Chem.* 2006; 281:23482-23491.
- [134] Khanna S, Roy S, Maurer M, Ratan RR, Sen CK. Oxygen-sensitive reset of hypoxia-inducible factor transactivation response: prolyl hydroxylases tune the biological normoxic set point. *Free Radic Biol Med.* 2006; 40:2147-2154.
- [135] Ginouvès A, Ilc K, Macías N, Pouyssegur J, Berra E. PHDs overactivation during chronic hypoxia "desensitizes" HIFalpha and protects cells from necrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105:4745-4750.
- [136] Łuczak MW, Jagodziński PP. The role of DNA methylation in cancer development. *Folia Histochem Cytobiol.* 2006; 44:143-154.
- [137] Motoyama N, Naka K. DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability. *Curr Opin Genet Dev.* 2004; 14:11-16.
- [138] Paige AJ. Redefining tumour suppressor genes: exceptions to the two-hit hypothesis. *Cell Mol Life Sci.* 2003; 60:2147-2163.
- [139] Sadikovic B, Al-Romaih K, Squire JA, Zielenska M. Cause and consequences of genetic and epigenetic alterations in human cancer. *Curr Genomics.* 2008; 9:394-408.
- [140] Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol.* 2004; 22:4632-4642.
- [141] Hotchkiss RD. The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *J Biol Chem.* 1948; 175:315-332.

- [142] Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet.* 2001; 10:687-692.
- [143] Momparler RL. Cancer epigenetics. *Oncogene.* 2003; 22:6479-6483.
- [144] Turek-Plewa J, Jagodzinski PP. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett.* 2005; 10:631-647.
- [145] Yoo CB, Jones PA. DNA methyltransferase inhibitors in cancer therapy. *Am Assoc Cancer Res Educ Book.* 2005:333-337.
- [146] Santos F, and Dean W. Epigenetic reprogramming during early development in mammals. *Reproduction.* 2004; 127: 643-651.
- [147] Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet.* 2000; 16:168-174.
- [148] Cottrell SE. Molecular diagnostic applications of DNA methylation technology. *Clin Biochem.* 2004; 37:595-604.
- [149] Robertson KD, Jones PA. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis.* 2000; 21:461-467.
- [150] Clark SJ, Melki J. DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party? *Oncogene.* 2002; 21:5380-5387.
- [151] Attwood JT, Yung RL, Richardson BC. DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell Mol Life Sci.* 2002; 59:241-257.
- [152] Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet.* 2000; 9:2395-2402.
- [153] Szyf M, Pakneshan P, Rabbani SA. DNA methylation and breast cancer. *Biochem Pharmacol.* 2004; 68:1187-1197.
- [154] Hendrich B, Bird A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol.* 1998; 18:6538-6547.
- [155] Fujita N, Shimotake N, Ohki I, Chiba T, Saya H, Shirakawa M, Nakao M. Mechanism of transcriptional regulation by methyl-CpG binding protein MBD1. *Mol Cell Biol.* 2000; 20:5107-5118.
- [156] Ng HH, Zhang Y, Hendrich B, Johnson CA, Turner BM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D, Bird A. MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet.* 1999; 23:58-61.

- [157] Ballestar E, Paz MF, Valle L, Wei S, Fraga MF, Espada J, Cigudosa JC, Huang TH, Esteller M. Methyl-CpG binding proteins identify novel sites of epigenetic inactivation in human cancer. *EMBO J.* 2003; 22:6335-6345.
- [158] Fujita N, Watanabe S, Ichimura T, Tsuruzoe S, Shinkai Y, Tachibana M, Chiba T, Nakao M. Methyl-CpG binding domain 1 (MBD1) interacts with the Suv39h1-HP1 heterochromatic complex for DNA methylation-based transcriptional repression. *J Biol Chem.* 2003; 278:24132-24138.
- [159] Hendrich B, Hardeland U, Ng HH, Jiricny J, Bird A. The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature.* 1999; 401:301-304.
- [160] Kitkumthorn N, Mutirangura A. Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation in cancer: biology and clinical applications. *Clin Epigenet.* 2011; 2:315–330.
- [161] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987; 162:156-159.
- [162] Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem.* 1988; 175:231-237.
- [163] Ishii S, Kadonaga JT, Tjian R, Brady JN, Merlino GT, Pastan I. Binding of the Sp1 transcription factor by the human Harvey ras1 proto-oncogene promoter. *Science.* 1986; 232:1410-1413.
- [164] Dailey L, Roberts SB, Heintz N. Purification of the human histone H4 gene-specific transcription factors H4TF-1 and H4TF-2. *Genes Dev.* 1988; 2:1700-1712.
- [165] Walsh K, Schimmel P. Two nuclear factors compete for the skeletal muscle actin promoter. *J Biol Chem.* 1987; 262:9429-9432.
- [166] Faisst S, Meyer S. Compilation of vertebrate-encoded transcription factors. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20:3-26.
- [167] Imagawa M, Chiu R, Karin M. Transcription factor AP-2 mediates induction by two different signal-transduction pathways: protein kinase C and cAMP. *Cell.* 1987; 51:251-260.
- [168] Kageyama R, Merlino GT, Pastan I. A transcription factor active on the epidermal growth factor receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988; 85:5016-5020.
- [169] Gidoni D, Dynan WS, Tjian R. Multiple specific contacts between a mammalian transcription factor and its cognate promoters. *Nature.* 1984; 312:409-413.
- [170] McKnight SL, Kingsbury R. Transcriptional control signals of a eukaryotic protein-coding gene. *Science.* 1982; 217:316-324.

- [171] Hockel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res.* 1996; 56:4509-4515.
- [172] Frith MC, Hansen U, Weng Z. Detection of cis-element clusters in higher eukaryotic DNA. *Bioinformatics.* 2001; 17:878-889.
- [173] Bell SP, Learned RM, Jantzen HM, Tjian R. Functional cooperativity between transcription factors UBF1 and SL1 mediates human ribosomal RNA synthesis. *Science.* 1988; 241:1192-1197.
- [174] Watt P, Lamb P, Squire L, Proudfoot N. A factor binding GATAAG confers tissue specificity on the promoter of the human zeta-globin gene. *Nucleic Acids Res.* 1990; 18:1339-1350.
- [175] Jones KA, Tjian R. Sp1 binds to promoter sequences and activates herpes simplex virus 'immediate-early' gene transcription in vitro. *Nature.* 1985; 317:179-182.
- [176] Greene JM, Larin Z, Taylor IC, Prentice H, Gwinn KA, Kingston RE. Multiple basal elements of a human hsp70 promoter function differently in human and rodent cell lines. *Mol Cell Biol.* 1987; 7:3646-3655.
- [177] Mantovani R. The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene.* 1999; 239:15-27.
- [178] Bucher P. Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. *J Mol Biol.* 1990; 212:563-578.
- [179] Lee WY, Huang SC, Hsu KF, Tzeng CC, Shen WL. Roles for hypoxia-regulated genes during cervical carcinogenesis: somatic evolution during the hypoxia-glycolysis-acidosis sequence. *Gynecol Oncol.* 2008; 108:377-384.
- [180] Mazibrada J, Rittà M, Mondini M, De Andrea M, Azzimonti B, Borgogna C, Ciotti M, Orlando A, Surico N, Chiusa L, Landolfo S, Gariglio M. Interaction between inflammation and angiogenesis during different stages of cervical carcinogenesis. *Gynecol Oncol.* 2008; 108:112-120.
- [181] Mayer A, Wree A, Höckel M, Leo C, Pilch H, Vaupel P. Lack of correlation between expression of HIF-1alpha protein and oxygenation status in identical tissue areas of squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Cancer Res.* 2004; 64:5876-5881.
- [182] Smith-McCune KK, Weidner N. Demonstration and characterization of the angiogenic properties of cervical dysplasia. *Cancer Res.* 1994; 54:800-804.

- [183] Nam SY, Ko YS, Jung J, Yoon J, Kim YH, Choi YJ, Park JW, Chang MS, Kim WH, Lee BL. A hypoxia-dependent upregulation of hypoxia-inducible factor-1 by nuclear factor- κ B promotes gastric tumour growth and angiogenesis. *Br J Cancer*. 2011; 10:166-174.
- [184] Batmunkh E, Shimada M, Morine Y, Imura S, Kanemura H, Arakawa Y, Hanaoka J, Kanamoto M, Sugimoto K, Nishi M. Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1alpha) in patients with the gallbladder carcinoma. *Int J Clin Oncol*. 2010; 15:59-64.
- [185] Coulon C, Georgiadou M, Roncal C, De Bock K, Langenberg T, Carmeliet P. From vessel sprouting to normalization: role of the prolyl hydroxylase domain protein/hypoxia-inducible factor oxygen-sensing machinery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010; 30:2331-2361.
- [186] Brat DJ, Kaur B, Van Meir EG. Genetic modulation of hypoxia induced gene expression and angiogenesis: relevance to brain tumors. *Front Biosci*. 2003; 8:d100-d116.
- [187] Bárdos JI, Ashcroft M. Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1755:107-120.
- [188] Dales JP, Beaufils N, Silvy M, Picard C, Pauly V, Pradel V, Formisano-Tréziny C, Bonnier P, Giusiano S, Charpin C, Gabert J. Hypoxia inducible factor 1alpha gene (HIF-1alpha) splice variants: potential prognostic biomarkers in breast cancer. *J BMC Med*. 2010; 8:44.
- [189] Henze AT, Acker T. Feedback regulators of hypoxia-inducible factors and their role in cancer biology. *Cell Cycle*. 2010; 14:2749-2763.
- [190] Rasheed S, Harris AL, Tekkis PP, Turley H, Silver A, McDonald PJ, Talbot IC, Glynne-Jones R, Northover JM, Guenther T. Hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha are expressed in most rectal cancers but only hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with prognosis. *Br J Cancer*. 2009; 100:1666-1673. Erratum in: *Br J Cancer*. 2009; 101:742.
- [191] Vaupel P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist*. 2005; 9 Suppl 5:10-17.
- [192] Brökers N, Le-Huu S, Vogel S, Hagos Y, Katschinski DM, Kleinschmidt M. Increased chemoresistance induced by inhibition of HIF-prolyl-hydroxylase domain enzymes. *Cancer Sci*. 2010; 101:129-136.
- [193] DeClerck K, Elble RC. The role of hypoxia and acidosis in promoting metastasis and resistance to chemotherapy. *Front Biosci*. 2010; 15: 213-225.
- [194] Roszak A, Kędzia W, Malkowska-Walczak B, Pawlik P, Kędzia H, Łuczak M, Lianeri M, Jagodziński PP. Reduced expression of PHD2 prolyl hydroxylase gene in primary advanced uterine cervical carcinoma. *Biomed Pharmacother*. 2011; 65:298-302.

- [195] Tuckerman JR, Zhao Y, Hewitson KS, Tian YM, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Mole DR. Determination and comparison of specific activity of the HIF-prolyl hydroxylases. *FEBS Lett.* 2004; 576:145-150.
- [196] Hutchison GJ, Valentine HR, Loncaster JA, Davidson SE, Hunter RD, Roberts SA, Harris AL, Stratford IJ, Price PM, West CM. Hypoxia-inducible factor 1alpha expression as an intrinsic marker of hypoxia: correlation with tumor oxygen, pimonidazole measurements, and outcome in locally advanced carcinoma of the cervix. *Clin Cancer Res.* 2004; 24:8405-8412.
- [197] Haugland HK, Vukovic V, Pintilie M, Fyles AW, Milosevic M, Hill RP, Hedley DW. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in cervical carcinomas: correlation with tumor oxygenation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2002; 53:854-861.
- [198] Bache M, Reddemann R, Said HM, Holzhausen HJ, Taubert H, Becker A, Kuhnt T, Hänsen G, Dunst J, Vordermark D. Immunohistochemical detection of osteopontin in advanced head-and-neck cancer: prognostic role and correlation with oxygen electrode measurements, hypoxia-inducible-factor-1alpha-related markers, and hemoglobin levels. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006; 66: 1481-1487.
- [199] Fujimoto J, Alam SM, Jahan I, Sato E, Toyoki H, Hong BL, Sakaguchi H, Tamaya T. Plausible linkage of hypoxia inducible factor-1alpha in uterine cervical cancer. *Cancer Sci.* 2006; 97:861-867.
- [200] No JH, Jo H, Kim SH, Park IA, Kang D, Han SS, Kim JW, Park NH, Kang SB, Song YS. Expression of vascular endothelial growth factor and hypoxia inducible factor-1alpha in cervical neoplasia. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1171:105-110.
- [201] Niibe Y, Watanabe J, Tsunoda S, Arai M, Arai T, Kawaguchi M, Matsuo K, Jobo T, Ono S, Numata A, Unno N, Hayakawa K. Concomitant expression of HER2 and HIF-1alpha is a predictor of poor prognosis in uterine cervical carcinoma treated with concurrent chemoradiotherapy: prospective analysis (KGROG0501). *Eur J Gynaecol Oncol.* 2010; 31:491-496.
- [202] Dellas K, Bache M, Pigorsch SU, Taubert H, Kappler M, Holzapfel D, Zorn E, Holzhausen HJ, Haensgen G. Prognostic impact of HIF-1alpha expression in patients with definitive radiotherapy for cervical cancer. *Strahlenther Onkol.* 2008; 184:169-174.
- [203] Ishikawa H, Sakurai H, Hasegawa M, Mitsuhashi N, Takahashi M, Masuda N, Nakajima M, Kitamoto Y, Saitoh J, Nakano T. Expression of hypoxic-inducible factor 1alpha predicts metastasis-free survival after radiation therapy alone in stage IIIB cervical squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004; 60:513-521.

- [204] Burri P, Djonov V, Aebersold DM, Lindel K, Studer U, Altermatt HJ, Mazzucchelli L, Greiner RH, Gruber G. Significant correlation of hypoxia-inducible factor-1alpha with treatment outcome in cervical cancer treated with radical radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003; 56:494-501.
- [205] Vukovic V, Haugland HK, Nicklee T, Morrison AJ, Hedley DW. Hypoxia-inducible factor-1alpha is an intrinsic marker for hypoxia in cervical cancer xenografts. *Cancer Res.* 2001; 61:7394-7398.
- [206] Razorenova OV, Finger EC, Colavitti R, Chernikova SB, Boiko AD, Chan CK, Krieg A, Bedogni B, LaGory E, Weissman IL, Broome-Powell M, Giaccia AJ. VHL loss in renal cell carcinoma leads to up-regulation of CUB domain-containing protein 1 to stimulate PKC{delta}-driven migration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108:1931-1936.
- [207] Hatzimichael E, Dranitsaris G, Dasoula A, Benetatos L, Stebbing J, Crook T, Bourantas KL. Von Hippel-Lindau methylation status in patients with multiple myeloma: a potential predictive factor for the development of bone disease. *Clin Lymphoma Myeloma.* 2009; 9:239-242.
- [208] Schmitt AM, Schmid S, Rudolph T, Anlauf M, Prinz C, Klöppel G, Moch H, Heitz PU, Komminoth P, Perren A. VHL inactivation is an important pathway for the development of malignant sporadic pancreatic endocrine tumors. *Endocr Relat Cancer.* 2009; 16:1219-1227.
- [209] Ghosh AK, Shanafelt TD, Cimmino A, Taccioli C, Volinia S, Liu CG, Calin GA, Croce CM, Chan DA, Giaccia AJ, Secretò C, Wellik LE, Lee YK, Mukhopadhyay D, Kay NE. Aberrant regulation of pVHL levels by microRNA promotes the HIF/VEGF axis in CLL B cells. *Blood.* 2009; 113:5568-74.
- [210] Stephen JK, Chen KM, Raitanen M, Grénman S, Worsham MJ. DNA hypermethylation profiles in squamous cell carcinoma of the vulva. *Int J Gynecol Pathol.* 2009; 28:63-75.
- [211] Renbaum P, Duh FM, Latif F, Zbar B, Lerman MI, Kuzmin I. Isolation and characterization of the full-length 3' untranslated region of the human von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Hum Genet.* 1996; 98:666-671.
- [212] Blagosklonny MV. Do VHL and HIF-1 mirror p53 and Mdm-2? Degradation-transactivation loops of oncoproteins and tumor suppressors. *Oncogene.* 2001; 20:395-398.
- [213] Karhausen J, Kong T, Narravula S, Colgan SP. Induction of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene by late hypoxia limits HIF-1 expression. *J Cell Biochem.* 2005; 95:1264-1275.

- [214] Henze AT, Riedel J, Diem T, Wenner J, Flamme I, Pouyseggur J, Plate KH, Acker T. Prolyl hydroxylases 2 and 3 act in gliomas as protective negative feedback regulators of hypoxia-inducible factors. *Cancer Res.* 2010; 70:357-366.
- [215] Minamishima YA, Moslehi J, Padera RF, Bronson RT, Liao R, Kaelin WG Jr. A feedback loop involving the Phd3 prolyl hydroxylase tunes the mammalian hypoxic response in vivo. *Mol Cell Biol.* 2009; 29:5729-5741.
- [216] Qutub AA, Popel AS. Three autocrine feedback loops determine HIF1 alpha expression in chronic hypoxia. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1773:1511-1525.
- [217] Kimura H, Weisz A, Ogura T, Hitomi Y, Kurashima Y, Hashimoto K, D'Acquisto F, Makuuchi M, Esumi H. Identification of hypoxia-inducible factor 1 ancillary sequence and its function in vascular endothelial growth factor gene induction by hypoxia and nitric oxide. *J Biol Chem.* 2001; 276:2292-2298.
- [218] Ladroue C, Carcenac R, Leporrier M, Gad S, Le Hello C, Galateau-Salle F, Feunteun J, Pouysségur J, Richard S, Gardie B. PHD2 mutation and congenital erythrocytosis with paraganglioma. *N Engl J Med.* 2008; 359:2685-2692.
- [219] Furusato B, Mohamed A, Uhlén M, Rhim JS. CXCR4 and cancer. *Pathol Int.* 2010; 60:497-505.
- [220] Chik F, Szyf M. Effects of specific DNMT gene depletion on cancer cell transformation and breast cancer cell invasion; toward selective DNMT inhibitors. *Carcinogenesis.* 2011; 32:224-232.
- [221] Ateeq B, Unterberger A, Szyf M, Rabbani SA. Pharmacological inhibition of DNA methylation induces proinvasive and prometastatic genes in vitro and in vivo. *Neoplasia.* 2008; 10:266-278.
- [222] Dejeux E, Rønneberg JA, Solvang H, Bukholm I, Geisler S, Aas T, Gut IG, Børresen-Dale AL, Lønning PE, Kristensen VN, Tost J. DNA methylation profiling in doxorubicin treated primary locally advanced breast tumours identifies novel genes associated with survival and treatment response. *Mol Cancer.* 2010; 9:68.
- [223] Przybylski M, Kozłowska A, Pietkiewicz PP, Lutkowska A, Lianeri M, Jagodzinski PP. Increased CXCR4 expression in AsPC1 pancreatic carcinoma cells with RNA interference-mediated knockdown of DNMT1 and DNMT3B. *Biomed Pharmacother.* 2010; 64:254-258.
- [224] Sato N, Matsubayashi H, Fukushima N, Goggins M. The chemokine receptor CXCR4 is regulated by DNA methylation in pancreatic cancer. *Cancer Biol Ther.* 2005; 4:70-76.

- [225] Kubarek Ł, Jagodziński PP. Epigenetic up-regulation of CXCR4 and CXCL12 expression by 17 beta-estradiol and tamoxifen is associated with formation of DNA methyltransferase 3B4 splice variant in Ishikawa endometrial adenocarcinoma cells. *FEBS Lett.* 2007; 581:1441-1448.
- [226] Mori T, Kim J, Yamano T, Takeuchi H, Huang S, Umetani N, Koyanagi K, Hoon DS. Epigenetic up-regulation of C-C chemokine receptor 7 and C-X-C chemokine receptor 4 expression in melanoma cells. *Cancer Res.* 2005; 65:1800-1807.
- [227] Bogani C, Ponziani V, Guglielmelli P, Desterke C, Rosti V, Bosi A, Le Bousse-Kerdilès MC, Barosi G, Vannucchi AM; Myeloproliferative Disorders Research Consortium. Hypermethylation of CXCR4 promoter in CD34+ cells from patients with primary myelofibrosis. *Stem Cells.* 2008; 26:1920-1930.
- [228] Kodama J, Hasengaowa, Kusumoto T, Seki N, Matsuo T, Ojima Y, Nakamura K, Hongo A, Hiramatsu Y. Association of CXCR4 and CCR7 chemokine receptor expression and lymph node metastasis in human cervical cancer. *Ann Oncol.* 2007; 18:70-76.
- [229] Zhang JP, Lu WG, Ye F, Chen HZ, Zhou CY, Xie X. Study on CXCR4/SDF-1alpha axis in lymph node metastasis of cervical squamous cell carcinoma. *Int J Gynecol Cancer.* 2007; 17:478-483.
- [230] Yang YC, Lee ZY, Wu CC, Chen TC, Chang CL, Chen CP. CXCR4 expression is associated with pelvic lymph node metastasis in cervical adenocarcinoma. *Int J Gynecol Cancer.* 2007; 17:676-686.
- [231] Rein DT, Breidenbach M, Nettelbeck DM, Kawakami Y, Siegal GP, Huh WK, Wang M, Hemminki A, Bauerschmitz GJ, Yamamoto M, Adachi Y, Takayama K, Dall P, Curiel DT. Evaluation of tissue-specific promoters in carcinomas of the cervix uteri. *J Gene Med.* 2004; 11:1281-1289.
- [232] Łuczak MW, Roszak A, Pawlik P, Kędzia H, Kędzia W, Malkowska-Walczak B, Lianeri M, Jagodziński PP. Transcriptional analysis of CXCR4, DNMT3A, DNMT3B and DNMT1 gene expression in primary advanced uterine cervical carcinoma. *Int J Oncol.* 2011; 40: 860-866.
- [233] Tang B, Qu Y, Zhao F, Mao M, Tang J, Li X, Ferriero D, Mu D. In vitro effects of hypoxia-inducible factor 1alpha on the biological characteristics of the SiHa uterine cervix cancer cell line. *Int J Gynecol Cancer.* 2009; 19:898-904.
- [234] Łuczak MW, Roszak A, Pawlik P, Kędzia H, Lianeri M, Jagodziński PP. Increased expression of HIF-1A and its implication in the hypoxia pathway in primary advanced uterine cervical carcinoma. *Oncol Rep.* 2011; 26:1259-1264.

- [235] La Salle S, Trasler JM. Dynamic expression of DNMT3a and DNMT3b isoforms during male germ cell development in the mouse. *Dev Biol.* 2006; 296:71-82.
- [236] Chen T, Ueda Y, Xie S, Li E. A novel Dnmt3a isoform produced from an alternative promoter localizes to euchromatin and its expression correlates with active de novo methylation. *J Biol Chem.* 2002; 277:38746-38754.
- [237] Weisenberger DJ, Velicescu M, Preciado-Lopez MA, Gonzales FA, Tsai YC, Liang G, Jones PA. Identification and characterization of alternatively spliced variants of DNA methyltransferase 3a in mammalian cells. *Gene.* 2002; 298:91-99.
- [238] Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.* 1999; 99:247-257.
- [239] Deng T, Kuang Y, Wang L, Li J, Wang Z, Fei J. An essential role for DNA methyltransferase 3a in melanoma tumorigenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 387:611-616.
- [240] Ng EK, Tsang WP, Ng SS, Jin HC, Yu J, Li JJ, Röcken C, Ebert MP, Kwok TT, Sung JJ. MicroRNA-143 targets DNA methyltransferases 3A in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2009; 101:699-706.
- [241] Daniel FI, Rivero ER, Modolo F, Lopes TG, Salum FG. Immunohistochemical expression of DNA methyltransferases 1, 3a and 3b in oral leukoplakias and squamous cell carcinomas. *Arch Oral Biol.* 2010; 55:1024-1030.
- [242] Qu Y, Mu G, Wu Y, Dai X, Zhou F, Xu X, Wang Y, Wei F. Overexpression of DNA methyltransferases 1, 3a, and 3b significantly correlates with retinoblastoma tumorigenesis. *Am J Clin Pathol.* 2010; 134:826-834.
- [243] Zhao Z, Wu Q, Cheng J, Qiu X, Zhang J, Fan H. Depletion of DNMT3A suppressed cell proliferation and restored PTEN in hepatocellular carcinoma cell. *J Biomed Biotechnol.* 2010; 2010:737535.
- [244] Choi SH, Heo K, Byun HM, An W, Lu W, Yang AS. Identification of preferential target sites for human DNA methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39:104-118.
- [245] Robert MF, Morin S, Beaulieu N, Gauthier F, Chute IC, Barsalou A, MacLeod AR. DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nat Genet.* 2003; 33:61-65.
- [246] Beaulieu N, Morin S, Chute IC, Robert MF, Nguyen H, MacLeod AR. An essential role for DNA methyltransferase DNMT3B in cancer cell survival. *J Biol Chem.* 2002; 277:28176-28181.

- [247] Miremadi A, Oestergaard MZ, Pharoah PD, Caldas C. Cancer genetics of epigenetic genes. *Hum Mol Genet.* 2007; 16:R28-R49.
- [248] Sawada M, Kanai Y, Arai E, Ushijima S, Ojima H, Hirohashi S. Increased expression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein in uterine cervix squamous cell carcinoma and its precursor lesion. *Cancer Lett.* 2007; 251:211-219.
- [249] Au Yeung CL, Tsang WP, Tsang TY, Co NN, Yau PL, Kwok TT. HPV-16 E6 upregulation of DNMT1 through repression of tumor suppressor p53. *Oncol Rep.* 2010; 24:1599-1604.
- [250] Burgers WA, Blanchon L, Pradhan S, de Launoit Y, Kouzarides T, Fuks F. Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases. *Oncogene.* 2007; 26:1650-1655.

11. ZAŁĄCZNIK 1

Spis publikacji, w których opublikowano wyniki prezentowane w pracy doktorskiej.

1. Roszak A, Kędzia W, Malkowska-Walczak B, Pawlik P, Kędzia H, **Łuczak M**, Lianeri M, Jagodziński PP. Reduced expression of PHD2 prolyl hydroxylase gene in primary advanced uterine cervical carcinoma. *Biomed Pharmacother.* 2011; 65:298-302.
2. **Łuczak MW**, Roszak A, Pawlik P, Kędzia H, Lianeri M, Jagodziński PP. Increased expression of HIF-1A and its implication in the hypoxia pathway in primary advanced uterine cervical carcinoma. *Oncol Rep.* 2011; 26:1259-1264.
3. **Łuczak MW**, Roszak A, Pawlik P, Kędzia H, Kędzia W, Malkowska-Walczak B, Lianeri M, Jagodziński PP. Transcriptional analysis of CXCR4, DNMT3A, DNMT3B and DNMT1 gene expression in primary advanced uterine cervical carcinoma. *Int J Oncol.* 2012; 40: 860-866.