

**Monika Prill**

**Wpływ indukowanej stresem oksydacyjnym aktywacji ścieżki  
sygnalizacyjnej białka p66Shc na mitochondrialne parametry  
bioenergetyczne i poziom reaktywnych form tlenu w ludzkich liniach raka  
sutka MDA-MB-231 oraz MCF-7**

Praca doktorska

wykonana w Pracowni Bioenergetyki i Błon Biologicznych oraz  
Pracowni Biologii Mitochondriów i Metabolizmu  
Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

**Promotor pracy doktorskiej:  
Prof. dr hab. Mariusz Roman Więckowski**

Warszawa, 2022





NARODOWE CENTRUM NAUKI

Badania opisane w niniejszej pracy zostały sfinansowane w ramach projektów badawczych:

Narodowego Centrum Nauki UMO-2016/21/N/NZ1/00278 Preludium (Monika Oparka  
(nazwisko panięskie), Monika Prill)

Narodowego Centrum Nauki UMO-2014/15/B/NZ1/00490 Opus (prof. dr hab. Mariusz  
Więckowski)



## **PODZIĘKOWANIA**

*Pragnę serdecznie podziękować:*

*Promotorowi niniejszej pracy doktorskiej prof. dr hab. Mariuszowi R. Więckowskiemu za umożliwienie mi brania aktywnego udziału w życiu naukowym (w postaci licznych wyjazdów konferencyjnych), za opiekę naukową oraz cenne wskazówki merytoryczne, jak również poświęcony czas i motywowanie do rozwijania wiedzy naukowej*

*Prof. dr hab. Jerzemu Duszyńskiemu za umożliwienie mi wykonania znacznej części niniejszej pracy doktorskiej w Pracowni Bioenergetyki i Błon Biologicznych oraz stworzenie niezwyklej „atmosfery” naukowej*

*Prof. dr hab. Joannie Szczepanowskiej za wszelką pomoc oraz okazaną życzliwość, nieocenione wsparcie oraz wspólne dyskusje „przy stole”*

*Dr Dominice Malińskiej za cenne uwagi merytoryczne i nieustanną chęć pomocy*

*Dr Bernadecie Michalskiej za bezcenne wsparcie i pomoc oraz nieocenioną przyjaźń*

*Prof. dr hab. Dominice Nowis  
Dr hab. Michałowi Dąbrowskiemu,  
Dr Jędrzejowi Szymańskiemu  
Dr Vilmie A. Sardão,  
Dr Agnieszce Karckucińskiej-Więckowskiej*

*Koleżankom i Kolegom z Pracowni Bioenergetyki i Błon Biologicznych  
Oraz Pracowni Biologii Mitochondriów i Metabolizmu  
za niesamowitą atmosferę pracy oraz wspólną realizację projektów*

*mojej Rodzinie  
a w szczególności rodzicom i siostram za wiarę we mnie oraz okazane wsparcie i pomoc,  
bez których nie mogłabym łączyć pracy naukowej z macierzyństwem*

*mojemu Najdroższemu Mężowi oraz Synkowi,  
którzy „przeszli” tę drogę wspólnie ze mną, „trzymając mnie mocno za rękę”,  
dzięki czemu cały czas czułam ich niesłabnące wsparcie,  
bezgraniczną miłość i wiarę w moje możliwości i  
za to, że po prostu są...*

*oraz Tobie mały Bohaterze...*



## WYKAZ PUBLIKACJI:

1. **PRILL M**<sup>1</sup>, KARKUCINSKA-WIECKOWSKA A, LEBIEDZINSKA-ARCISZEWSKA M, MORCIANO G, CHARZYNSKA A, DABROWSKI M, PRONICKI M, PINTON P, GRAJKOWSKA W, WIECKOWSKI M. R. 2021. Ras, TrkB, and ShcA Protein Expression Patterns in Pediatric Brain Tumors. *J Clin Med.*, 10 (10): 2219.
2. PATALAS-KRAWCZYK P, MALINSKA D, WALCZAK J, KRATZER G, **PRILL M**, MICHALSKA B, DRABIK K, TITZ B, EB-LEVADOUX Y, SCHNEIDER T, SZYMAŃSKI J, HOENG J, PEITSCH M. C, DUSZYŃSKI J, SZCZEPANOWSKA J, VAN DER TOORN M, MATHIS C, WIECKOWSKI M. R. 2021. Effects of plant alkaloids on mitochondrial bioenergetic parameters. *Food Chem Toxicol.*, 154: 112316.
3. WALCZAK J, MALIŃSKA D, DRABIK K, MICHALSKA B, **PRILL M**, JOHNE S, LUETTICH K, SZYMAŃSKI J, PEITSCH M. C, HOENG J, DUSZYŃSKI J, WIĘCKOWSKI M. R, VAN DER TOORN M, SZCZEPANOWSKA J. 2020. Mitochondrial Network and Biogenesis in Response to Short and Long-Term Exposure of Human BEAS-2B Cells to Aerosol Extracts from the Tobacco Heating System 2.2. *Cell Physiol Biochem.*, 54 (2): 230-251.
4. MALIŃSKA D, WIĘCKOWSKI M. R, MICHALSKA B, DRABIK K, **PRILL M**, PATALAS-KRAWCZYK P, WALCZAK J, SZYMAŃSKI J, MATHIS C, VAN DER TOORN M, LUETTICH K, HOENG J, PEITSCH M. C, DUSZYŃSKI J, SZCZEPANOWSKA J. 2019. Mitochondria as a possible target for nicotine action. *J Bioenerg Biomembr.*, 51(4):259-276.
5. MALINSKA D, SZYMAŃSKI J, PATALAS-KRAWCZYK P, MICHALSKA B, WOJTAŁA A, **PRILL M**, PARTYKA M, DRABIK K, WALCZAK J, SEWER A, JOHNE S, LUETTICH K, PEITSCH M. C, HOENG J, DUSZYŃSKI J, SZCZEPANOWSKA J, VAN DER TOORN M, WIECKOWSKI M. R. 2018. Assessment of mitochondrial function following short- and long-term exposure of human bronchial epithelial cells to total particulate matter from a candidate modified-risk tobacco product and reference cigarettes. *Food Chem Toxicol.*, 115: 1-12.
6. **OPARKA M**<sup>2</sup>, WALCZAK J\*, MALINSKA D, VAN OPPEN L. M. P. E, SZCZEPANOWSKA J, KOOPMAN W. J. H, WIECKOWSKI M. R. 2016. Quantifying ROS levels using CM-H2DCFDA and HyPer. *Methods*, 109: 3-11. \* równocenny wkład
7. LEBIEDZINSKA-ARCISZEWSKA M\*, **OPARKA M**\*, VEGA-NAREDO I , KARKUCINSKA-WIECKOWSKA A, PINTON P, DUSZYŃSKI J, WIECKOWSKI M. R. 2015. The interplay between p66Shc, reactive oxygen species and cancer cell metabolism. *Eur J Clin Invest.*, 45 (1): 25-31. \* równocenny wkład
8. WIECKOWSKI M. R, DEUS C. M, COUTO R, **OPARKA M**, LEBIEDZIŃSKA-ARCISZEWSKA M, DUSZYŃSKI J, OLIVEIRA P. J. 2015. Measuring p66Shc Signaling Pathway Activation and Mitochondrial Translocation in Cultured Cells. *Curr Protoc Toxicol.*, 66: 25.6.1-25.6.21.
9. MARCHI S, GIORGI C, **OPARKA M**, DUSZYŃSKI J, WIECKOWSKI M. R, PINTON P. 2014. Oncogenic and oncosuppressive signal transduction at mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes. *Mol Cell Oncol.*, 1 (2): e956469.

---

<sup>1</sup> Praca badawcza obejmująca tematykę pracy doktorskiej

<sup>2</sup> OPARKA – nazwisko panińskie





## STRESZCZENIE

Mitochondria pełnią szereg niezwykle istotnych funkcji w komórce takich jak synteza ATP czy produkcja reaktywnych form tlenu. Są one również zaangażowane w wiele kluczowych procesów komórkowych, w regulację poziomu wielu ważnych dla komórki metabolitów, czy też inicjacji procesu apoptozy. Nie dziwi zatem fakt, że mitochondria komórek nowotworowych wydają się być potencjalnym celem stosowanych terapii antynowotworowych. Istnieje szereg dowodów wskazujących na to, że zarówno w proces apoptozy jak i produkcji RFT zaangażowane jest białko adaptorowe p66Shc, które w porównaniu z innymi białkami rodziny ShcA (p46Shc i p52Shc) wykazuje unikalne właściwości prooksydacyjne. Biorąc pod uwagę fakt, że białko p66Shc może odgrywać podwójną rolę: negatywnego regulatora proliferacji i swoistego „czujnika stresu oksydacyjnego”, wydaje się ono być potencjalnym celem terapeutycznym w zakresie proliferacji i progresji nowotworów jak również w terapii antynowotworowej.

Niniejsza praca doktorska dotyczy kompleksowej oceny roli białka p66Shc w fizjologii mitochondriów komórek nowotworowych raka sutka oraz związanej z tym odpowiedzi komórek na traktowanie chemioterapeutykiem (doksorubicyną). Ponadto, wykorzystanie ludzkich linii nowotworowych raka sutka (MDA-MB-231 i MCF-7) jak również uzyskanych w wyniku modyfikacji genetycznych klonów wspomnianych linii różniących się poziomem białka p66Shc pozwoliło mi wyjaśnić, w jaki sposób białko p66Shc może wpływać na metabolizm mitochondriów komórek nowotworowych raka sutka.

Analiza porównawcza dwóch linii nowotworowych ze względnie różnym poziomem białka p66Shc oraz ich nienowotworowego odpowiednika (linii MCF-10) wykazała, że obie linie nowotworowe MDA-MB-231 oraz MCF-7 reprezentujące dwa różne podtypy nowotworu sutka oraz wykazujące odmienne stopnie metastatyczności: różnią się istotnie w kontekście większości zbadanych parametrów funkcjonalnych komórki. Ponadto, zmiana poziomu białka p66Shc (niezależnie w obrębie każdej z linii nowotworowych) spowodowała odmienny efekt w tych samych klonach odpowiednio linii: MDA-MB-231 oraz MCF-7 (z podwyższonym poziomem białka p66Shc, z podwyższonym poziomem zmutowanej w reszcie seryny 36 formy białka p66Shc oraz z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc). Klon z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc w przypadku obu badanych linii nowotworowych wykazuje najbardziej znaczące zmiany obserwowane głównie w badanych parametrach mitochondrialnych. Co ciekawe, w żadnej z badanych linii nowotworowych raka sutka nie zauważyłam korelacji pomiędzy podwyższonym poziomem p66Shc (zawierającym

niezmienioną Ser36 odpowiedzialną za właściwości prooksydacyjne białka p66Shc) a poziomem reaktywnych form tlenu. Wykazałam, że klon z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc linii MDA-MB-231 (która stanowi bardziej metastatyczny typ nowotworu sutka w porównaniu z linią MCF-7) charakteryzuje się najbardziej glikolitycznym fenotypem w porównaniu z innymi klonami linii MDA-MB-231. Co więcej, komórki tego samego klonu traktowane doksorubicyną (p66Shc KO) są znacznie bardziej podatne na działanie środka chemioterapeutycznego – doksorubicyny. Na koniec, w oparciu o wyniki analizy porównawczej przeprowadzonej z wykorzystaniem próbek guzów litych mózgu pacjentów pediatrycznych wykazałam, że badany w nich wzór ekspresji białek, takich jak Ras, ShcA (p66Shc, p52Shc, p46Shc) wydaje się być bardzo podobny. Wykazałam istnienie korelacji tylko pomiędzy stopniem metastatyczności a poziomem białek TrkB i p46Shc w badanych próbkach guzów wykazujących różny stopień złośliwości.

Podsumowując, zastosowanie dwóch różnych podtypów nowotworu sutka różniących się poziomem endogennego białka p66Shc potwierdziło wysoką zmienność „fenotypową” w obrębie tego samego typu nowotworu (rak sutka). Niemniej jednak, biorąc pod uwagę wpływ zmian poziomu p66Shc w obrębie tego samego podtypu raka sutka (klony MDA-MB-231) wykazałam, że białko p66Shc może w istotny sposób wpływać na mitochondrialne parametry bioenergetyczne komórek nowotworowych raka sutka. Co ważne, udowodniłam, że białko adaptorowe p66Shc w komórkach raka sutka może pełnić odmienną rolę niż w przypadku komórek nienowotworowych (np. fibroblastach).

## ABSTRACT

Mitochondria carry out a variety of important cellular functions including ATP synthesis as well as reactive oxygen species production. They are also implicated in many crucial cellular processes, in regulation of the levels of several substantial for the cell metabolites and e.g., in the initiation of the apoptosis process. Therefore, it is not surprising that mitochondria of tumor cells could be a potential target in chemotherapy. Substantial number of evidence indicate that both, apoptosis and reactive oxygen species production involve a small p66Shc adaptor protein, which demonstrates the unique prooxidative properties comparing to other ShcA family members (p46Shc and p52Shc). Taking into account the fact that p66Shc can play a dual role as a negative regulator of proliferation and as oxidative stress sensor, p66Shc seems to be a promising target concerning cancer proliferation, tumor progression and chemotherapeutic treatment.

My doctoral dissertation presents a comprehensive evaluation of the role of p66Shc protein in mitochondrial physiology of breast cancer cells. Moreover, describes response of these cells to chemotherapeutic treatment with the use of doxorubicin agent. Furthermore, the use of human breast cancer cell lines (MDA-MB-231 and MCF-7) and their genetically modified clones presenting different level of p66Shc protein allowed me to demonstrate how the p66Shc protein can affect the mitochondrial metabolism of human breast cancer cells.

The comparative analysis of two breast cancer cell lines characterized with relatively different level of p66Shc and their noncancerous equivalents (MCF-10) have revealed that both tumor cell lines: MDA-MB-231 and MCF-7 being two various subtypes of breast cancer and characterized with different metastasis abilities significantly differ in most of studied cellular parameters. Furthermore, changes in the level of p66Shc protein (in individual breast cancer cell lines) exert different effects in the same clones respectively: MDA-MB-231 and MCF-7 tumor cell lines (overexpressing p66Shc protein, overexpressing of Ser36-mutated p66Shc as well as knockout of p66Shc). Knocking out p66Shc in both breast cancer cell lines caused significant changes observed mostly in mitochondrial physiological parameters. Interesting, in both of examined breast cancer cell lines, I did not found positive correlation between overexpression of p66Shc (containing serine 36 residue responsible for the prooxidative properties of the p66Shc protein) and the level of reactive oxygen species. I have shown that clone of MDA-MB-231 (which is more metastatic type of breast cancer comparing to MCF-7 cell line) lacking p66Shc protein represents the most glycolytic phenotype

comparing to other clones of MDA-MB-231. Additionally, clones with knocked out p66Shc are significantly more vulnerable to the treatment with doxorubicin used as chemotherapeutic agent. Finally, based on the results of the comparative analysis of pediatric brain tumors, I have demonstrated that the expression pattern of proteins such as Ras, ShcA (p66Shc, p52Shc, p46Shc) in those tumors in children seem to be quite similar. I have demonstrated possible correlation only between the level of TrkB and p46Shc proteins and malignancy grades of investigated pediatric brain tumors.

Summarizing, the use of two different subtypes of breast cancer with different level of endogenous p66Shc protein confirmed the high "phenotypic" variability within the same tumor type (breast cancer). However, considering the impact of changes of the p66Shc level within the same subtype of breast cancer (clones of MDA-MB-231), I have demonstrated that p66Shc protein can influence mitochondrial bioenergetic parameters of breast cancer cells. What's important, I proved that p66Shc adaptor protein in human breast cancer cells may exert a different role than in comparison to noncancerous cells (e.g., fibroblasts).

# SPIS TREŚCI

<b>WYKAZ PUBLIKACJI:</b> .....	<b>7</b>
<b>STRESZCZENIE</b> .....	<b>9</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>11</b>
<b>WYKAZ SKRÓTÓW</b> .....	<b>17</b>
<b>1. WSTĘP</b> .....	<b>21</b>
<b>1.1. Ogólna charakterystyka mitochondriów i ich podstawowe funkcje</b> .....	<b>21</b>
<b>1.2. Znaczenie mitochondriów w biologii nowotworów</b> .....	<b>25</b>
1.2.1. Hipoksja w komórkach nowotworowych.....	26
1.2.2. Rola przeprogramowania metabolicznego w komórkach nowotworowych.....	28
1.2.3. Mutacje w mtDNA komórek nowotworowych .....	30
1.2.4. Wpływ stresu oksydacyjnego na komórki nowotworowe .....	31
1.2.5. Zaburzenia apoptozy w komórkach nowotworowych.....	32
<b>1.3. OXPHOS w komórkach nowotworowych</b> .....	<b>33</b>
<b>1.4. Związek pomiędzy mitochondriami, komórkami nowotworowymi, a białkiem adaptorowym p66Shc</b> .....	<b>35</b>
<b>1.5. Rodzina białek Shc</b> .....	<b>36</b>
1.5.1. Sygnalizacja komórkowa białek ShcA.....	39
<b>1.6. Rola i funkcje białka adaptorowego p66Shc w stanie fizjologicznym</b> .....	<b>42</b>
1.6.1. Białko p66Shc i jego rola w starzeniu się i regulacji długości życia .....	43
1.6.2. Prooksydacyjna funkcja białka p66Shc oraz jego rola w procesie apoptozy .....	44
1.6.3. Udział białka p66Shc w wybranych stanach chorobowych .....	46
<b>1.7. Rola białka p66Shc w nowotworach</b> .....	<b>49</b>
1.7.1. Białko p66Shc w nowotworach sutka .....	50
1.7.2. Białko p66Shc w nowotworach prostaty.....	51
1.7.3. Białko p66Shc w nowotworach jajnika.....	52
1.7.4. Białko p66Shc w nowotworach płuc.....	52
1.7.5. Białko p66Shc w nowotworach układu pokarmowego .....	53
1.7.6. Białko p66Shc i inne nowotwory .....	54
<b>1.8. Rola białka p66Shc w metabolizmie komórek nowotworowych</b> .....	<b>57</b>
<b>2. CEL PRACY</b> .....	<b>60</b>
<b>3. MATERIAŁ I METODY</b> .....	<b>61</b>
<b>3.1. Materiał biologiczny</b> .....	<b>61</b>
<b>3.2. Hodowla linii komórkowych</b> .....	<b>64</b>
3.2.1. Pasażowanie i bankowanie komórek.....	65

<b>3.3.</b>	<b>Uzyskanie modyfikowanych genetycznie wariantów linii MDA-MB-231 oraz MCF-7</b>	<b>67</b>
3.3.1	Podwyższenie poziomu białka p66Shc.....	67
3.3.2.	Edycja genomu - wyciszenie ekspresji genu kodującego białko p66Shc techniką edycji genu CRISPR-Cas9 .....	70
<b>3.4.</b>	<b>Ocena tempa proliferacji uzyskanych klonów linii MDA-MB-231 oraz MCF-7</b>	<b>73</b>
<b>3.5.</b>	<b>Traktowanie komórek chemioterapeutykiem – dokсорubicyną</b>	<b>74</b>
3.5.1	Ocena właściwości cytotoksycznych dokсорubicyny .....	74
<b>3.6.</b>	<b>Immunodetekcja białek przy użyciu techniki Western Blot</b>	<b>76</b>
3.6.1.	Przygotowanie lizatów komórkowych .....	76
3.6.2.	Pomiar stężenia białka w badanej próbce metodą Bradford .....	76
3.6.3.	Przygotowanie żeli poliakryloamidowych .....	77
3.6.4.	Elektroforeza SDS-PAGE, transfer na membranę oraz immunodetekcja .....	78
<b>3.7.</b>	<b>Oznaczenie poziomu fosforylacji białka p66Shc w reszcie Ser36 metodą immunoprecypitacji</b>	<b>80</b>
<b>3.8.</b>	<b>Immunochemiczna detekcja oksydacyjnych uszkodzeń białek (karbonylacja)</b>	<b>81</b>
<b>3.9.</b>	<b>Pomiar parametrów bioenergetycznych</b>	<b>81</b>
3.9.1.	Pomiar potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej (mt. $\Delta\Psi$ ) .....	81
3.9.2.	Pomiar zużycia tlenu z wykorzystaniem elektrody tlenowej Oxygraph-2k-OROBOROS .	82
3.9.3.	Analiza szybkości zużycia tlenu (OCR, ang. <i>Oxygen consumption rate</i> ) oraz szybkości zakwaszenia zewnątrzkomórkowego (ECAR, ang. <i>Extracellular acidification rate</i> ) z wykorzystaniem analizatora Seahorse XFe96 .....	83
<b>3.10.</b>	<b>Pomiar poziomu reaktywnych form tlenu</b>	<b>85</b>
3.10.1.	Pomiar poziomu mitochondrialnego anionorodnika ponadtlenkowego .....	85
3.10.2.	Pomiar poziomu cytozolowego anionorodnika ponadtlenkowego .....	85
3.10.3.	Pomiar względnych ilości reaktywnych form tlenu (głównie nadtlenu wodoru) .....	86
<b>3.11.</b>	<b>Oznaczenie ilości białka komórkowego z wykorzystaniem barwnika sulforodaminy B (SRB)</b>	<b>87</b>
<b>3.12.</b>	<b>Ocena całkowitej zdolności antyoksydacyjnej metodą ABTS</b>	<b>88</b>
<b>3.13.</b>	<b>Ocena poziomu śmierci komórkowej (apoptozy) przy użyciu aneksyny V i jodku propidyny</b>	<b>89</b>
<b>3.14.</b>	<b>Wizualizacja struktury sieci mitochondrialnej</b>	<b>90</b>
<b>3.15.</b>	<b>Analiza porównawcza spektrometrii mas</b>	<b>90</b>
<b>3.16.</b>	<b>Przygotowanie homogenatu z próbek guzów litych mózgu</b>	<b>91</b>
<b>3.17.</b>	<b>Analiza statystyczna</b>	<b>92</b>
<b>3.18.</b>	<b>Roztwory i odczynniki wykorzystane w doświadczeniach</b>	<b>92</b>
<b>4.</b>	<b>WYNIKI</b>	<b>96</b>

<b>4.1. Badania porównawcze ludzkich linii raka sutka i odpowiadającej im linii komórek kontrolnych w kontekście prooksydacyjnej ścieżki białka p66Shc, mitochondrialnych parametrów bioenergetycznych jak również poziomu RFT oraz statusu ochrony antyoksydacyjnej.....</b>	<b>96</b>
4.1.1. Charakterystyka poziomu poszczególnych izoform białek z rodziny ShcA .....	97
4.1.2. Sekwencjonowanie genu <i>SHC1</i> kodującego białko p66Shc .....	99
4.1.3. Prooksydacyjna ścieżka białka p66Shc .....	100
4.1.4. Poziom reaktywnych form tlenu oraz wybranych enzymów antyoksydacyjnych w linii kontrolnej MCF-10A i liniach nowotworowych: MDA-MB-231 i MCF-7 .....	102
4.1.5. Poziom wybranych podjednostek łańcucha oddechowego oraz potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej w linii kontrolnej MCF-10A oraz liniach nowotworowych: MDA-MB-231 i MCF-7 .....	105
<b>4.2. Analiza wybranych parametrów bioenergetycznych, parametrów związanych ze stresem oksydacyjnym oraz porównawcza analiza proteomiczna.....</b>	<b>107</b>
4.2.1. Modyfikacje genetyczne linii raka sutka: MDA-MB-231 oraz MCF-7 .....	108
4.2.2. Tempo proliferacji badanych klonów linii MDA-MB-231 oraz MCF-7 .....	110
4.2.3. Analiza prooksydacyjnej ścieżki białka p66Shc w poszczególnych klonach linii MDA-MB-231 oraz MCF-7.....	112
4.2.4. Poziom reaktywnych form tlenu oraz status ochrony antyoksydacyjnej .....	116
4.2.5. Analiza poziomu uszkodzeń oksydacyjnych w badanych klonach linii MDA-MB-231 oraz MCF-7 .....	121
4.2.6. Analiza podstawowych parametrów bioenergetycznych w badanych liniach nowotworowych: MDA-MB-231 oraz MCF-7 .....	123
4.2.7. Analiza profilu OXPHOS w komórkach poszczególnych klonów linii nowotworowych: MDA-MB-231 oraz MCF-7 .....	129
<b>4.3. Ocena wpływu zmiany poziomu białka p66Shc jak również mutacji w kluczowej reszcie seryny 36 na wrażliwość komórek raka sutka na traktowanie chemioterapeutyką – dokсорubicyną .....</b>	<b>137</b>
4.3.1. Dobór optymalnego stężenia dokсорubicyny – określenie krzywej przeżywalności ..	137
4.3.2. Analiza prooksydacyjnej ścieżki białka adaptorowego p66Shc.....	139
4.3.3. Morfologia sieci mitochondrialnej .....	142
4.3.4. Wpływ traktowania komórek dokсорubicyną na potencjał na wewnętrznej błonie mitochondrialnej oraz profil OXPHOS .....	146
4.3.5. Charakterystyka profilu energetycznego badanych klonów linii nowotworowej MDA-MB-231 obejmująca aktywność glikolityczną oraz oddychanie tlenowe .....	149
4.3.6. Wpływ dokсорubicyny na poziom reaktywnych form tlenu oraz ochrony antyoksydacyjnej w komórkach z odmiennym poziomem białka p66Shc.....	160
4.3.7. Wpływ traktowania dokсорubicyną na przeżywalność (apoptozę) komórek poszczególnych klonów linii MDA-MB-231 .....	166
<b>4.4. Rodzina białek ShcA – izoforma p66Shc jako potencjalny marker prognostyczny ...</b>	<b>169</b>

4.4.1.	Zależność między typem nowotworu mózgu a poziomem białek ShcA, Ras oraz TrkB	170
4.4.2.	Zależność między stopniem złośliwości nowotworu mózgu a poziomem białek ShcA, Ras oraz TrkB.....	172
<b>5.</b>	<b>DYSKUSJA .....</b>	<b>174</b>
<b>5.1.</b>	<b>Rola białka p66Shc w komórkach nowotworowych raka sutka oraz komórkach kontrolnych .....</b>	<b>175</b>
5.1.1	Prooksydacyjne właściwości białka p66Shc a poziom stresu oksydacyjnego.....	177
5.1.2.	Wpływ białka p66Shc na wybrane parametry funkcjonalne mitochondriów oraz poziom podjednostek OXPHOS w komórkach zdrowych i nowotworowych .....	181
<b>5.2.</b>	<b>Wpływ zmiany poziomu białka p66Shc na wybrane parametry funkcjonalne komórek klonów linii MDA-MB-231 oraz MCF-7 raka sutka .....</b>	<b>183</b>
5.2.1.	Wpływ zmiany poziomu białka p66Shc na poziom RFT i status ochrony antyoksydacyjnej komórek klonów linii MDA-MB-231 oraz MCF-7.....	185
5.2.2.	Wpływ zmiany poziomu białka p66Shc na parametry bioenergetyczne komórek klonów linii MDA-MB-231 oraz MCF-7 .....	188
<b>5.3.</b>	<b>Ocena odpowiedzi komórek klonów linii MDA-MB-231 różniących się poziomem białka p66Shc na traktowanie dokсорubicyną .....</b>	<b>192</b>
5.3.1.	Wpływ zmiany poziomu białka p66Shc na poziom RFT komórek klonów linii MDA-MB-231 traktowanych dokсорubicyną .....	193
5.3.2.	Wpływ traktowania komórek klonów linii MDA-MB-231 dokсорubicyną na poziom podjednostek kompleksów OXPHOS .....	196
5.3.3.	Ocena zmian parametrów bioenergetycznych w komórkach poszczególnych klonów linii MDA-MB-231 traktowanych dokсорubicyną .....	197
5.3.4.	Wpływ zmiany poziomu białka p66Shc oraz traktowania dokсорubicyną komórek klonów linii MDA-MB-231 na parametry apoptotyczne .....	201
<b>5.4.</b>	<b>Korelacja poziomu białek rodziny ShcA, Ras oraz TrkB z typem guzów litych mózgu oraz ich stopniem złośliwości .....</b>	<b>202</b>
<b>6.</b>	<b>PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....</b>	<b>206</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>209</b>



## WYKAZ SKRÓTÓW

Skrót	Kompletna nazwa
<b>2-DG</b>	2- deoksyglukoza
<b>7-AAD</b>	7-amino-aktynomycyna D, barwnik fluorescencyjny interkalujący do DNA
<b>AA</b>	Antymycyna A
<b>ABTS</b>	Kwas 2,2'-azyno-bis (3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy)
<b>Acetylo-CoA</b>	Acetylokoenzym A
<b>ALS</b>	Stwardnienie zanikowe boczne (ALS, ang. <i>Amyotrophic lateral sclerosis</i> )
<b>AMP</b>	Adenozyno-5'-monofosforan
<b>APS</b>	Nadsiarczan amonu (ang. <i>Ammonium sulphate</i> )
<b>ARF1, ARF6</b>	Czynnik 1 ADP-rybozylacji, czynnik 6 ADP-rybozylacji (ang. <i>ADP-ribosylation factor</i> )
<b>ATP</b>	Adenozyno-5'-trifosforan
<b>Aβ</b>	Amyloid beta
<b>BRAF</b>	Kinaza protoonkogenna (ang. <i>Type B rapid accelerated fibrosarcoma</i> )
<b>BSA</b>	Albumina surowicy bydłowej (ang. <i>Bovine serum albumin</i> )
<b>Cat</b>	Katalaza
<b>CaU</b>	Uniporter Ca <sup>2+</sup>
<b>CB</b>	Domena wiążąca cytochrom c
<b>CCCP</b>	Karbonylocyjanek 3-chlorofenylohydrazonu
<b>CH1</b>	Centralna domena CH1 (ang. <i>Collagen homology domain</i> )
<b>CH2</b>	Domena CH2 (ang. <i>Collagen homology domain 2</i> )
<b>CLL</b>	Przewlekła białaczka limfocytowa (ang. <i>Chronic lymphocytic leukemia</i> )
<b>CM-H<sub>2</sub>DCF-DA</b>	Dwuoctan 5 (i 6)-chlorometylo-2',7-dichlorodwuhydrofluoresceiny
<b>CoQ</b>	Koenzym Q10
<b>CRISPR-Cas9</b>	Zgrupowane, regularnie rozproszone, krótkie, powtarzające się sekwencje palindromiczne (ang. <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> ).
<b>cyt.O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Cytozolowy anionorodnik ponadtlenkowy
<b>DAMP</b>	Struktury molekularne związane z zagrożeniem (ang. <i>Danger/Damage associated molecular patterns</i> )
<b>DCF</b>	2', 7-dichlorofluorescyna
<b>DHE</b>	Dihydroetydyna
<b>DLD</b>	Dehydrogenaza dihydroliponianowa
<b>DMSO</b>	Dimetylosulfotlenek (ang. <i>Dimethyl Sulfoxide</i> )
<b>DNP</b>	Dinitrofenol
<b>DNPH</b>	2,4-dinitrofenylohydrazyna
<b>DNPH</b>	2,4-dinitrofenylohydrazyna
<b>DOX</b>	Doksorubicyna
<b>EAC</b>	Gruczołakorak przelyku (ang. <i>Esophageal adenocarcinoma</i> )
<b>ECAR</b>	Szybkość zakwaszenia zewnątrzkomórkowego (ang. <i>Extracellular acidification rate</i> )
<b>EDTA</b>	kwasy etylenodiaminotetraoctowy
<b>EGF</b>	Czynnik wzrostu naskórka (ang. <i>Epidermal growth factor</i> )

<b>EGFR</b>	Receptor czynnika wzrostu naskórka (ang. <i>Epidermal growth factor receptor</i> )
<b>ELISA</b>	Test immunoenzymatyczny (ang. <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
<b>ER</b>	Receptor dla estrogenu
<b>ERK</b>	Kinazy regulowane sygnałami pozakomórkowymi (ang. <i>Extracellular signal-regulated kinases</i> )
<b>ESCC</b>	Rak płaskonabłonkowy przełyku (ang. <i>Esophageal squamous cell carcinoma</i> )
<b>ETC</b>	Łańcuch transportu elektronów
<b>ETF</b>	Flawoproteina przenosząca elektrony
<b>FAD/FADH<sub>2</sub></b>	Dinukleotyd flawinoadeninowy
<b>FBS</b>	Bydłęca surowica płodowa (ang. <i>Fetal bovine serum</i> )
<b>FMN</b>	Mononukleotyd flawiny
<b>FMN</b>	Mononukleotyd flawiny
<b>FOXO</b>	Czynnik transkrypcyjny (ang. <i>Class O of forkhead box transcription factor</i> )
<b>GAP</b>	Białko aktywowane GTPazą (ang. <i>GTPase activating protein</i> )
<b>GAPDH</b>	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego
<b>Gly</b>	Glikoliza
<b>glycoPER</b>	Glikolityczna szybkość wypływu protonów (ang. <i>Glycolytic proton efflux rate</i> )
<b>GPI</b>	Izomeraza glukozy-6-fosforanowa
<b>GR, GSR</b>	Reduktaza glutationowa (ang. <i>Glutathione reductase</i> )
<b>Grb2</b>	Białko receptora czynnika wzrostu 2 (ang. <i>Growth factor receptor bound protein 2</i> )
<b>gRNA</b>	RNA redagujące (ang. <i>Guiding RNA</i> )
<b>GSS</b>	Syntaza glutationowa (ang. <i>Glutathione synthetase</i> )
<b>HER</b>	Receptor dla czynnika wzrostu
<b>HER2</b>	Receptor ludzkiego czynnika wzrostu
<b>HGF</b>	Czynnik wzrostu hepatocytów (ang. <i>Hepatocyte growth factor</i> )
<b>HIF1, HIF2</b>	Czynnik indukowany hipoksją 1, czynnik indukowany hipoksją 2
<b>HRP</b>	Peroksydaza chrzanowa (ang. <i>Horseradish peroxidase</i> )
<b>IDH1,2</b>	Dehydrogenaza izocytrynianowa
<b>IMM</b>	Wewnętrzna błona mitochondrialna
<b>IMS</b>	Mitochondrialna przestrzeń międzybłonowa (ang. <i>Mitochondrial intermembrane space</i> )
<b>IPCZD</b>	Instytut „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”
<b>JNK</b>	Kinazy aktywowane stresem (ang. <i>Stress-activated protein kinases</i> )
<b>LB</b>	Pożywka lizogenna (ang. <i>Lysogeny broth</i> )
<b>MAM</b>	Błony związane z mitochondriami (ang. <i>Mitochondria – associated membranes</i> )
<b>MAP, MAPK</b>	Kinazy aktywowane mitogenami (ang. <i>Mitogen – activated protein kinases</i> )
<b>MEF</b>	Fibroblasty pobrane z mysich embrionów (ang. <i>Mouse embryonic fibroblasts</i> )
<b>MOMP</b>	Mitochondrialna permeabilizacja błony zewnętrznej (ang. <i>Mitochondrial outer membrane permeabilization</i> )
<b>MPTP</b>	Mitochondrialny megakanał (ang. <i>Mitochondrial Permeability</i> )

	<i>Transition Pore</i> )
<b>mt. <math>\Delta\Psi</math></b>	Potencjał na wewnętrznej błonie mitochondrialnej
<b>mt.O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Mitochondrialny anionorodnik ponadtlenkowy
<b>mtDNA</b>	Mitochondrialny DNA
<b>mtHsp70</b>	Mitochondrialne białko szoku cieplnego
<b>mTOR</b>	Ssaczy cel rapamycyny (ang. <i>Mammalian target of rapamycin kinase</i> )
<b>NADH, NAD<sup>+</sup></b>	Dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NADH – forma zredukowana; NAD <sup>+</sup> – forma utleniona)
<b>NAFLD</b>	Niealkoholowa stłuszczeniowa choroby wątroby (ang. <i>Non-alcoholic fatty liver disease</i> )
<b>nDNA</b>	Jądrowy DNA
<b>NGF</b>	Czynnik wzrostu nerwu (ang. <i>Nerve growth factor</i> )
<b>OCR</b>	Szybkość zużycia tlenu (ang. <i>Oxygen consumption rate</i> )
<b>OMM</b>	Zewnętrzna błona mitochondrialna
<b>OUN</b>	Ośrodkowy układ nerwowy
<b>OXPHOS</b>	Fosforylacja oksydacyjna
<b>P/S</b>	Mieszanina antybiotyków: penicyliny i streptomycyny
<b>PARPi</b>	Inhibitor polimerazy poli (ADP-rybozy) (ang. <i>Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor</i> )
<b>PBS</b>	Buforowany roztwór soli fizjologicznej (ang. <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
<b>PC</b>	Karboksylaza pirogronianowa
<b>PCK2</b>	Karboksykinaza fosfoenolopirogronianowa
<b>PDGF</b>	Płytkopochodny czynnik wzrostu (ang. <i>Platelet-derived growth factor</i> )
<b>PEITC</b>	Izotiocyanian fenylu
<b>PER</b>	Szybkość wypływu protonów (ang. <i>Proton efflux rate</i> )
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PI</b>	Jodek propidyny
<b>PIN1</b>	Izomeraza prolylowa
<b>PP2A</b>	Białkowa fosfataza serynowo/treoninową typu 2
<b>PR</b>	Receptor dla progesteronu
<b>PRDX4</b>	Peroksyredoksyna - 4 (ang. <i>Peroxiredoxin - 4</i> )
<b>PTB</b>	N-końcowa domena wiążąca fosfotyrozynę (ang. <i>Phosphotyrosine-binding domain</i> ).
<b>Q</b>	Ubichinon
<b>QH<sub>2</sub></b>	Ubichinol
<b>Rac1</b>	Małe białko G z rodziny Rho (ang. <i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i> )
<b>RFT</b>	Reaktywne formy tlenu
<b>RhoA</b>	Białka należące do nadrodziny małych białek G
<b>RIPA</b>	Bufor lizujący (ang. <i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i> )
<b>Rot</b>	Rotenon
<b>RSV</b>	Resweratrol
<b>RTK</b>	Receptor kinaz tyrozynowych (ang. <i>Receptor tyrosine kinase</i> )
<b>SDH</b>	Dehydrogenaza bursztynianowa
<b>SDH</b>	Dehydrogenaza bursztynianowa
<b>Ser36</b>	Reszta seryny 36
<b>Ser660</b>	Reszta seryny 660

<b>SFN</b>	D, L-sulforafan (ang. <i>D, L-sulforaphane</i> )
<b>SH2</b>	Domena C-końcowa (ang. <i>Src-homology domain 2</i> )
<b>SOC</b>	Pożywka do mikrobiologicznej hodowli bakterii (ang. <i>Super optimal catabolite repression</i> )
<b>SOD1</b>	Dysmutaza nadtlenkowa 1
<b>SOD2</b>	Dysmutaza nadtlenkowa 2
<b>SOS1</b>	Wymieniacz nukleotydów GDP/GTP w białku Ras (ang. <i>Son of sevenless 1</i> )
<b>SRB</b>	Sulforodamina B
<b>TBS-T</b>	Roztwór soli fizjologicznej w buforze Tris z dodatkiem Tween-20 (ang. <i>Tris Buffered Saline Tween-20</i> )
<b>TCA</b>	Cykl kwasów trikarboksylowych (cykl Krebsa)
<b>TERC</b>	Składnik telomerazy RNA (ang. <i>Telomerase RNA component</i> )
<b>TERT</b>	Odwrotna transkryptaza telomerazy
<b>TIM</b>	Translokaza wewnętrznej błony mitochondrialnej
<b>TNBC</b>	Podtyp potrójnie ujemnego raka sutka (ang. <i>Triple negative breast cancer</i> )
<b>TOM</b>	Translokaza zewnętrznej błony mitochondrialnej
<b>t-PMET</b>	Transport elektronów przez błonę transplazmatyczną (ang. <i>Trans-plasma membrane electron-transport</i> )
<b>TRK</b>	Receptor o aktywności kinazy tyrozynowej (ang. <i>Tropomyosin-related kinase, tyrosine kinase receptor</i> )
<b>TSH</b>	Hormon tyreotropowy
<b>TXNDC11</b>	Białko zawierające domenę tioredoksyny 11 (ang. <i>Thioredoxin domain-containing protein 11</i> )
<b>TXNDC15</b>	Białko zawierające domenę tioredoksyny 15 (ang. <i>Thioredoxin domain-containing protein 15</i> )
<b>TXNDC16</b>	Białko zawierające domenę tioredoksyny 16 (ang. <i>Thioredoxin domain-containing protein 16</i> )
<b>TXNDC9</b>	Białko zawierające domenę tioredoksyny 9 (ang. <i>Thioredoxin domain-containing protein 9</i> )
<b>TXNIP</b>	Białko wiążące tioredoksynę-2 (ang. <i>Thioredoxin-interacting protein</i> )
<b>TXNL1</b>	Białko tioredoksynopodobne 1 (ang. <i>Thioredoxin-like protein 1</i> )
<b>TXNL4B</b>	Białko tioredoksynopodobne 4B (ang. <i>Thioredoxin-like protein 4B</i> )
<b>TXNRD1</b>	Reduktaza tioredoksyny 1 (ang. <i>Thioredoxin Reductase 1</i> )
<b>TXNRD1</b>	Reduktaza tioredoksynowa 1, cytoplazmatyczna (ang. <i>Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic</i> )
<b>VDAC</b>	Kanał anionowy regulowany zmianą potencjału (ang. <i>Voltage-Dependent Anion Channel</i> )
<b>VEGF</b>	Czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. <i>Vascular endothelial growth factor</i> )
<b>WHO</b>	Światowa Organizacja Zdrowia
<b>XTT</b>	Sól sodowa 2,3-bis [2-metoksy-4-nitro-5-sulfofenilo]-2H-tetrazolio-5-karboksyanilidu
<b>βPix</b>	ang. <i>Pak-interacting exchange factor</i>

# 1. WSTĘP

Niniejsza praca doktorska dotyczy kompleksowej oceny roli białka adaptorowego p66Shc w fizjologii mitochondriów komórek nowotworowych raka sutka jak również odpowiedzi komórek na traktowanie chemioterapeutykami – doksorubicyną (DOX). Wykorzystanie linii komórkowych raka sutka (MDA-MB-231 oraz MCF-7) oraz uzyskanych w wyniku modyfikacji genetycznych – klonów wspomnianych linii różniących się poziomem białka p66Shc, pozwoliło mi wyjaśnić w jaki sposób białko p66Shc może wpływać na metabolizm mitochondrialny komórek nowotworowych raka sutka. Co więcej, przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej badania pozwoliły mi na wskazanie klonu z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc jako tego, który charakteryzuje się największą ilością obserwowanych zmian w szeregu parametrów funkcjonalnych oraz bioenergetycznych komórki nowotworowej. W zaprezentowanych poniżej podrozdziałach zwróciłam uwagę na znaczenie mitochondriów w komórkach nowotworowych, dokonałam charakterystyki jak również opisałam funkcje jakie białko p66Shc może pełnić zarówno w komórkach normalnych (nienowotworowych) jak i nowotworowych. Ponadto, wskazałam na wspólne, potencjalne „czynniki”, które mogą łączyć mitochondria z białkiem p66Shc istotne w walce z komórkami nowotworowymi. Zaliczyć do nich można w szczególności, zaangażowanie zarówno mitochondriów jak i białka p66Shc w produkcję RFT czy proces apoptozy.

## 1.1. Ogólna charakterystyka mitochondriów i ich podstawowe funkcje

Zgodnie z obowiązującą teorią, mitochondria wyewoluowały z wolno żyjących bakterii, które pierwotnie weszły w symbiotyczny związek z komórkami eukariotycznymi w procesie zwanym endosymbiozą. Teoria ta została poparta odkryciem w latach 60. mitochondrialnego DNA (mtDNA) jak również obecnością niezależnego mitochondrialnego systemu translacji. mtDNA zachowuje typowe cechy bakteryjnego DNA i stanowi je kolistą, dwuniciową cząsteczkę składającą się u człowieka z 16 569 par zasad, nie zawierającą intronów, poza jednym istotnym regionem niekodującym, zwanym pętlą przemieszczania lub pętlą D (ang. *D – loop*) (CHINNERY & HUDSON 2013). W toku ewolucji większość genów mitochondrialnych została utracona bądź przeniesiona do DNA jądrowego (nDNA), finalnie prowadząc do tego, że mitochondria człowieka obecnie zawierają tylko 37 genów

kodujących: 13 białek mitochondrialnego łańcucha oddechowego, 2 rRNA (12S i 16S) oraz 22 tRNA (KOPINSKI I WSP. 2021). Ponadto w przeciwieństwie do DNA jądrowego, mtDNA występuje w komórce w wielu kopiach: 100 – 10 000 kopii proporcjonalnie do zapotrzebowania energetycznego danej tkanki. Dla przykładu komórki mięśni szkieletowych i hepatocyty (charakteryzujące się wysokim zapotrzebowaniem na energię) zawierają tysiące kopii mtDNA, zaś np. limfocyty krwi (niższe zapotrzebowanie na energię) zawierają tylko setki kopii mtDNA (WEERTS I WSP. 2019). Co więcej, zakłada się, że zawartość mtDNA specyficzna dla danego typu komórki jest dość stabilna w warunkach fizjologicznych, ale może podlegać zmianom w wyniku np. stresu oksydacyjnego. Interesującym może wydawać się fakt, że możliwość wykorzystania zmian w liczbie kopii mtDNA może posłużyć jako istotny biomarker wzbogacający już dostępne modele prognostyczne raka sutka. Spadek liczby kopii mtDNA jest często obserwowany w pierwotnych guzach raka sutka w porównaniu z prawidłowym nabłonkiem gruczołu sutkowego sąsiadującym z guzem (około 70% przypadków) (WEERTS I WSP. 2019; KOPINSKI I WSP. 2021). Mitochondrialne DNA zlokalizowane jest w macierzy mitochondrialnej w postaci tzw. nukleoidów. Macierz mitochondrialna oddzielona jest od cytozolu dwiema błonami mitochondrialnymi: zewnętrzną (OMM, ang. *Outer mitochondrial membrane*) – przepuszczalną oraz wewnętrzną (IMM, ang. *Inner mitochondrial membrane*) – wysoce nieprzepuszczalną. Pomędzy tymi błonami tworzy się przestrzeń międzybłonowa (IMS, ang. *Mitochondrial intermembrane space*). Macierz mitochondrialna oraz wewnętrzna błona mitochondrialna są miejscami występowania większości kluczowych (dla prawidłowego funkcjonowania mitochondriów) białek i enzymów m.in. tych biorących udział w cyklu kwasów trkarboksylowych (TCA) oraz fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS).

Mitochondria wykazują niezwykle dynamiczną morfologię. W komórce mogą one tworzyć połączoną ze sobą sieć, dynamicznie podlegającą nieustannej przebudowie poprzez częste procesy fuzji oraz fragmentacji mitochondriów. Liczba mitochondriów w komórce może różnić się w zależności od typu komórki i w różnych warunkach fizjologicznych może sięgać nawet tysiąca mitochondriów na komórkę (FOGG I WSP. 2011). Mitochondria są niezwykle istotnymi, wewnątrzkomórkowymi organellami występującymi niemalże u wszystkich eukariontów, zaangażowanymi w szeroką gamę procesów mających miejsce w żywych komórkach. Niemniej jednak, sztandarową funkcją mitochondriów jest wytwarzanie głównego nośnika energii – adenozy-5'-trifosforanu (ATP). Zainteresowanie mitochondriami znacząco wzrosło wraz z odkryciem ich związku z takimi stanami patologicznymi jak: przedwczesne starzenie się, choroby neurodegeneracyjne, dysfunkcje

nerwowo – mięśniowe, cukrzyca czy w końcu nowotwory (DESLER & RASMUSSEN 2014; PROTASONI & ZEVIANI 2021). Mitochondria wykazujące liczne dysfunkcje nie są w stanie dostarczać wymaganej ilości ATP komórkom w tkankach np. o wysokim zapotrzebowaniu na energię, co prowadzi do szerokiego spektrum fenotypów klinicznych.

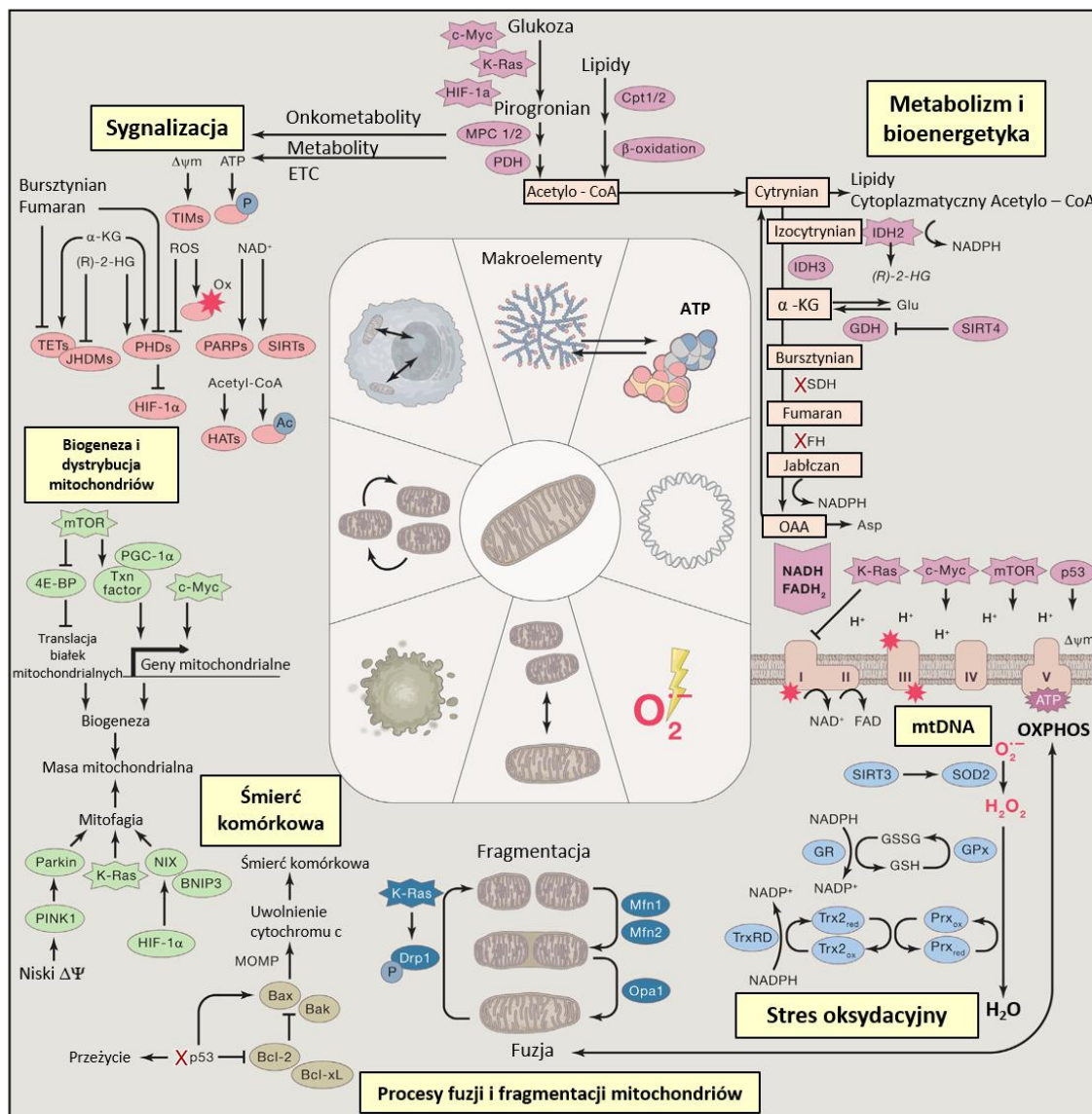
Zróznicowany charakter zaburzeń mitochondrialnych, wskazuje jednocześnie na szeroki zakres funkcji jakie mitochondria pełnią w komórkach. W organelach tych zachodzą niezwykle istotne reakcje podstawowych ścieżek metabolicznych takich jak: utlenianie kwasów tłuszczowych, cykl kwasów trikarboksylowych (cykl Krebsa, TCA), fosforylacja oksydacyjna, pierwsze etapy glukoneogenezy, ketogenezy, biosyntezy cząsteczek hemu czy formowanie klastrów Fe/S itp. (GRASSO I WSP. 2020; REICHERT & NEUPERT 2004, CHANDEL 2014). W wyniku przemian TCA mających miejsce w macierzy mitochondrialnej powstaje jedna cząsteczka ATP, dwie cząsteczki CO<sub>2</sub> oraz cząsteczki nośników elektronów: trzy cząsteczki dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADH), oraz jedna cząsteczka dinukleotydu flawinoadeninowego (FADH<sub>2</sub>). Ponadto, powstają prekursorzy do syntezy lipidów, węglowodanów, białek i nukleotydów. Wygenerowany przez zlokalizowany w wewnętrznej błonie mitochondrialnej łańcuch transportu elektronów (ETC), gradient elektrochemiczny jest niezbędny zarówno do produkcji ATP jak i aktywnego transportu wielu metabolitów oraz np. importu białek mitochondrialnych (KABACK 1980; NEUPERT & HERRMANN 2007; NUNNARI & SUOMALAINEN 2012; GRASSO I WSP. 2020). W wyniku całkowitego utleniania glukozy powstaje około 32 – 36 cząsteczek ATP generowanych przez ETC i wartość ta może różnić się pomiędzy różnymi komórkami (SEYFRIED I WSP. 2020). Za wspomniany wyżej import białek odpowiedzialne są głównie translokazy obecne w zewnętrznej oraz wewnętrznej błonie mitochondrialnej, które pośredniczą również w wewnątrzmitochondrialnym sortowaniu białek syntetyzowanych w cytozolu. Co więcej, mitochondria odpowiedzialne są za regulację niezwykle istotnych procesów komórkowych takich jak: proliferacja, adaptacja metaboliczna, produkcja reaktywnych form tlenu (RFT), utrzymanie homeostazy Ca<sup>2+</sup> czy śmierć komórki. Zwiększone zapotrzebowanie na ATP może być zaspokajane poprzez zwiększenie ilości mitochondriów bądź/lub aktywowanie łańcucha oddechowego. Do molekularnych komponentów komórkowych „wrażliwych” na stan energetyczny zalicza się np. czynniki transkrypcyjne, hormony, kofaktory, receptory jądrowe jak również kinazy wykrywające określone sygnały aktywności mitochondrialnej (np. stosunek dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego – NAD<sup>+</sup>/NADH, AMP/ATP, poziomy acetylokoenzymu A – acetylo-CoA) (NUNNARI & SUOMALAINEN 2012). Istnieje zatem możliwość, że zmieniony metabolizm komórkowy może być czynnikiem





## 1.2. Znaczenie mitochondriów w biologii nowotworów

Wbrew obiegu opinii, funkcjonalne mitochondria są czynnikiem niezbędnym dla funkcjonowania komórki nowotworowej. Niemniej jednak, mutacje w genach mitochondrialnych są dosyć powszechne w komórkach nowotworowych. Nie inaktywują one metabolizmu energetycznego mitochondriów, a raczej zmieniają ich stan bioenergetyczny i „biosyntetyczny”. Stanem biosyntetycznym mitochondriów określa się przekształcanie różnorodnych składników odżywczych dostępnych komórkom w podstawowe elementy budulcowe wymagane do wzrostu komórek (AHN & METALLO 2015). Tak więc, jest to nic innego jak funkcje biochemiczne mitochondriów w syntezie podstawowych składników komórkowych, w tym kwasów tłuszczowych, aminokwasów i nukleotydów. Opis typów nowotworów łącznie ze wskazaniem enzymów oraz konkretnych szlaków biosyntezy, w których obserwuje się zaburzenia bądź swoiste ich „rozregulowanie” zostało przedstawione w pracy AHN & METALLO (2015). Ciągłe postępy w badaniach naukowych zwróciły szczególną uwagę na złożoną sieć mechanizmów biologicznych i szlaków zaangażowanych w transformację onkogeną jak również utrzymanie fenotypu nowotworowego. Metabolizm mitochondriów komórek nowotworowych znacząco odbiega od tego obserwowanego w komórkach normalnych. Glikoliza tlenowa, akumulacja RFT, sygnały antyapoptotyczne i hipoksja to jedne z licznych cech charakterystycznych dla komórek nowotworowych (BADRINATH & YOO 2018). Jak wspomniano wcześniej, zaburzenia funkcjonowania enzymów spowodowane mutacjami zarówno w mtDNA, jak i nDNA prowadzą do akumulacji metabolitów pośrednich w komórkach nowotworowych. Wszystkie te cechy są ze sobą ściśle powiązane, co może przyspieszać proces nowotworzenia, czyli powstawania nowotworów. W ramach poszukiwania modulatorów metabolicznych udało się opracować szereg terapii ukierunkowanych na mitochondria komórek nowotworowych. Niemniej jednak, jest to dziedzina nauki, która wciąż dynamicznie rozwija się i dostarcza nowych informacji. Niestety nie ma prostego kanonu, który określałby konkretnie rolę mitochondriów w rozwoju komórek nowotworowych. Zamieszczona poniżej rycina (ryc. 2) w sposób ogólny podsumowuje funkcje mitochondriów, które w głównej mierze mogą przyczyniać się do onkogenezy (rozwoju nowotworów).



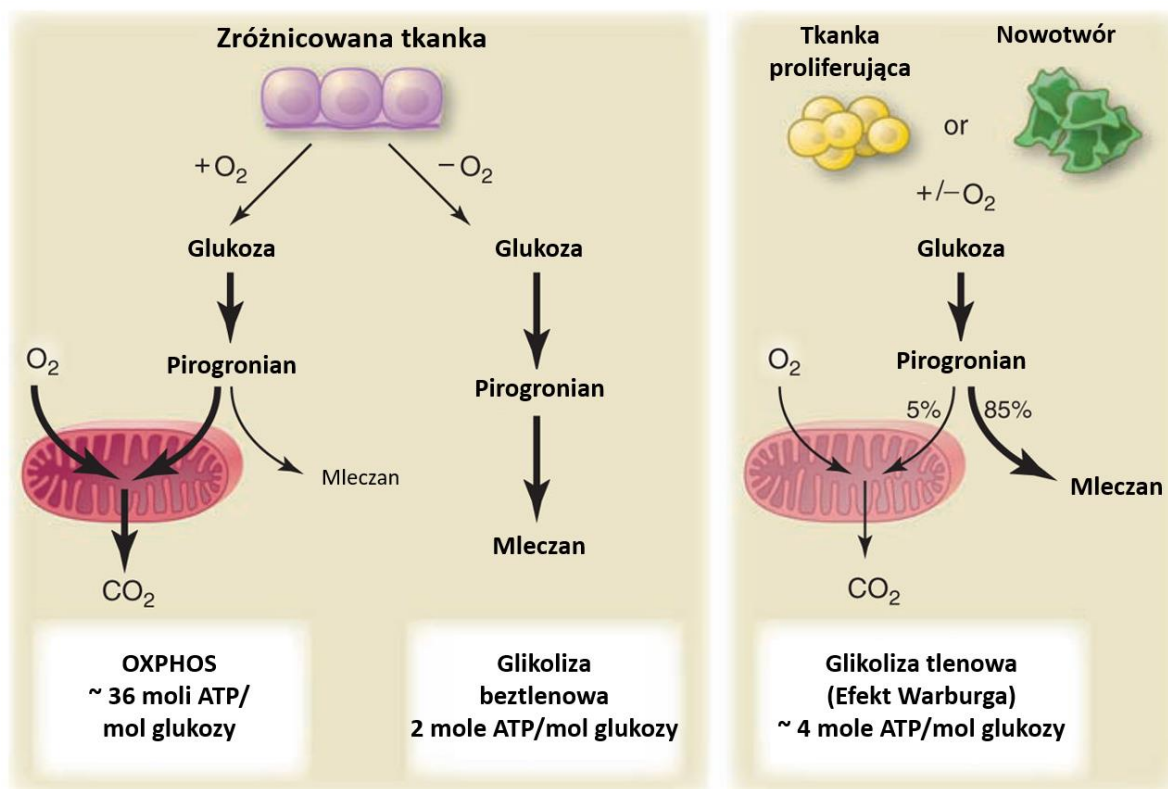
**Ryc. 2 Rola mitochondriów w rozwoju komórek nowotworowych (na podstawie VYAS I WSP. 2016).** Udział metabolizmu mitochondrialnego, bioenergetyki i biogenezy, mtDNA, regulacji stresu oksydacyjnego, procesów fuzji i fragmentacji mitochondriów, regulacji śmierci komórki jak również sygnalizacji mitochondrialnej w onkogenezie.

### 1.2.1. Hipoksja w komórkach nowotworowych

W normalnych komórkach nienowotworowych, produkcja ATP zachodzi głównie na drodze mitochondrialnej fosforylacji oksydacyjnej. Uzależnienie produkcji ATP (powstającego w wyniku OXPHOS), od tlenu wymaga stosunkowo efektywnej adaptacji komórek do warunków hipoksji. Niski poziom tlenu ( $O_2$ ) przyczynia się do niedotlenienia komórek. To, indukuje produkcję reaktywnych form tlenu przez mitochondrialny łańcuch oddechowy, a uwolnienie RFT do cytozolu aktywuje stres oksydacyjny i powiązaną z nim sygnalizację komórkową (BADRINATH & YOO 2018). W przypadku komórek nowotworowych

dochodzi do aktywacji czynnika indukowanego hipoksją 1 (HIF1) oraz proliferacji komórek nowotworowych. RFT generowane przez mitochondria stabilizują HIF1 oraz HIF2 poprzez hamowanie hydroksylazy prolylowej. Stan niedotlenienia komórek nowotworowych prowadzi do przesunięcia metabolizmu w kierunku glikolizy kosztem ograniczenia oddychania mitochondrialnego. Ponadto, w komórkach nowotworowych inaktywacja kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej prowadzi do przeprogramowania metabolicznego w kierunku glikolizy, zapobiegając w ten sposób apoptozie i autofagii, umożliwiając komórkom nowotworowym proliferację nawet w stanie ciężkiej hipoksji (BADRINATH & YOO 2018).

Zmieniony metabolizm glukozy w komórkach nowotworowych w porównaniu do komórek nienowotworowych po raz pierwszy zauważył słynny niemiecki fizjolog Otto Heinrich Warburg. W 1927 r. wykazał on, że komórki nowotworowe bardzo aktywnie metabolizują glukozę do mleczanu nawet w obecności tlenu. W późniejszym czasie postulował także, że w komórkach nowotworowych fosforylacja oksydacyjna jest nieodwracalnie uszkodzona przez co komórki nowotworowe muszą opierać się głównie na glikolizie nawet w obecności tlenu. (WARBURG I WSP. 1927). Na rycinie 3 schematycznie przedstawiono różnice w metabolizmie glukozy komórek nienowotworowych oraz komórek nowotworowych. W obecności tlenu komórki tkanek zróżnicowanych (nieproliferujących) w pierwszej kolejności metabolizują glukozę do pirogronianu w procesie glikolizy, a następnie całkowicie utleniają większość tego pirogronianu w mitochondriach do CO<sub>2</sub> i wody. Gdy dostępność tlenu jest ograniczona, komórki mogą wykorzystywać pirogronian (powstający w procesie glikolizy), wytwarzając mleczan (glikoliza beztlenowa). Z kolei, komórki nowotworowe oraz proliferujące przeprowadzają proces glikolizy tlenowej, w wyniku którego 85% glukozy przekształcana jest do mleczanu, pomimo obecności tlenu (VANDER HEIDEN I WSP. 2009). Trzeba jednak pamiętać, że glikoliza tlenowa jest mniej wydajna niż OXPHOS w wytwarzaniu ATP.



Ryc. 3 Schemat przedstawiający różnice pomiędzy fosforylacją oksydacyjną, glikolizą beztlenową oraz glikolizą tlenową (efekt Warburga) (na podstawie VANDER HEIDEN I WSP. 2009). Opis w tekście.

### 1.2.2. Rola przeprogramowania metabolicznego w komórkach nowotworowych

Odkrycia dokonane w XXI wieku pozwoliły na wyeliminowanie niektórych błędnych założeń dotyczących funkcji pełnionych przez mitochondria w komórkach nowotworowych. Obecnie uważa się, że chociaż uszkodzone mitochondria powodują w niektórych przypadkach efekt Warburga (upośledzona fosforylacja oksydacyjna prowadzi do aktywacji glikolizy tlenowej), wiele komórek nowotworowych wykazujących efekt Warburga charakteryzuje się w pełni sprawnym oddychaniem mitochondrialnym (VYAS I WSP. 2016; SCHEID I WSP. 2021). Pomimo, że ilość ATP wytwarzanego w procesie glikolizy jest znacznie mniejsza niż w OXPHOS, komórki nowotworowe w konsekwencji i tak preferują glikolizę, co w dalszym ciągu stanowi ciężki do wyjaśnienia fenomen komórek nowotworowych (CAIRNS I WSP. 2011). GUO (2021) w swej pracy powołuje się na dwie, aktualnie najpopularniejsze i powszechnie akceptowalne teorie wyjaśniające to zjawisko. Pierwsza z teorii wyjaśnia, iż półprodukty powstające podczas metabolizmu glikolitycznego wspomagają syntezę makrocząsteczek (m.in. nukleotydów, aminokwasów, lipidów,  $NADP^+$  itd.) niezwykle ważną z punktu widzenia komórek nowotworowych (LIBERTI & LOCASALE 2016). Druga z teorii zakłada, że chociaż wydajność wytwarzania ATP w procesie glikolizy jest około 18-krotnie

mniejsza, to szlak glikolityczny syntetyzuje ATP około 100-krotnie szybciej niż w OXPHOS. Dzięki temu glikoliza tlenowa jest w stanie bardzo szybko dostarczyć ATP, aby sprostać wymaganiom szybkiej proliferacji komórek nowotworowych (LIBERTI & LOCASALE 2016; MARTINEZ-OUTSCHOORN I WSP. 2017). Niemniej jednak, należy podkreślić, iż większość komórek nowotworowych wykorzystuje zarówno glikolizę jak i OXPHOS, choć niektóre typy nowotworów opierają się jedynie na podwyższonej fosforylacji oksydacyjnej. Poniższa tabela 1 przedstawia przykładowe typy metabolizmu reprezentowanego przez niektóre rodzaje nowotworów.

**Tabela 1** Przykłady metabolizmu energetycznego (glikoliza i/lub OXPHOS) w różnych typach komórek nowotworowych (na podstawie MORENO-SÁNCHEZ I WSP. 2007).

Pochodzenie tkanki	Typ nowotworu	Rodzaj dominującego metabolizmu
<b>Mózg</b>	Glioma C6, oligodendroglioma, meningioma, medulloblastoma	Glikoliza (Gly)
	Glioblastoma multiforme, astrocytoma C6	Gly oraz OXPHOS
	Transformed hamster brain	OXPHOS
<b>Kości</b>	Sarcoma	OXPHOS
<b>Jelito</b>	CT-26, LoVo colon adenocarcinoma	Gly
	Novikoff	Gly
<b>Wątroba</b>	Ehrlich Lettré, Ehrlich, Walker-256, Morris 3683 i Dunings LC18 hepatomas; ascites mouse cancer; sarcoma 27; MCF-7 carcinoma	Gly i OXPHOS
	Reuber H-35, Morris (7793, 7795, 7800, 5123)	OXPHOS
	Lung carcinoma	OXPHOS
<b>Gruczoł mlekowy</b>	Breast cancer	OXPHOS
	MCF-7	Gly i OXPHOS
<b>Skóra</b>	Melanoma	OXPHOS
<b>Szyjka macicy</b>	HeLa, ovarian and uterus carcinomas	OXPHOS

Przeprogramowanie metaboliczne obserwowane w komórkach nowotworowych może być również skutkiem mutacji w genach kodujących np. enzymy cyklu TCA, które sprzyjają transformacji nowotworowej. I tak, niektóre produkty pośrednie cyklu TCA jak fumaran, bursztynian, asparginian i D-2-hydroksygultaran wykazują istotne działanie „pronowotworowe” gdy akumulują się w komórkach ulegającym mutacjom i/lub modyfikacjom ekspresji białek związanych z onkogenezą (SULLIVAN I WSP. 2016). LUO I WSP.

(2020), wskazują również przykłady dysfunkcji enzymów mitochondrialnych mających istotne znaczenie dla rozwoju nowotworów. W głównej mierze dysfunkcje te spowodowane są mutacjami w genach kodujących te enzymy. I tak:

- mutacje w genie kodującym dehydrogenazę izocytrynianową mogą powodować zaburzone oddychanie mitochondrialne, akumulację D-2-hydroksygultaranu i prowadzić do zmian epigenetycznych;
- mutacje w genie kodującym dehydrogenazę bursztynianową prowadzą do akumulacji bursztynianu, stabilizacji HIF1 oraz hamowania dehydrogenazy pirogronianowej;
- mutacje w genie kodującym hydratazę fumaranową, które mogą prowadzić do akumulacji fumaranu czy stabilizacji HIF1 (WALLACE 2012; LUO I WSP. 2020).

Ponadto, BADRINATH & YOO (2018) wskazują również rolę heksokinazy (biorącej udział w procesie glikolizy) w onkogenezie, której podwyższony poziom (heksokinazy) obserwuje się w komórkach nowotworowych. Heksokinaza oddziałuje z zależnym od napięcia kanałem anionowym (VDAC) zewnętrznej błony mitochondrialnej i wykorzystuje wewnątrzmitochondrialny ATP do fosforylacji glukozy, promując w ten sposób wysokie tempo glikolizy.

### **1.2.3. Mutacje w mtDNA komórek nowotworowych**

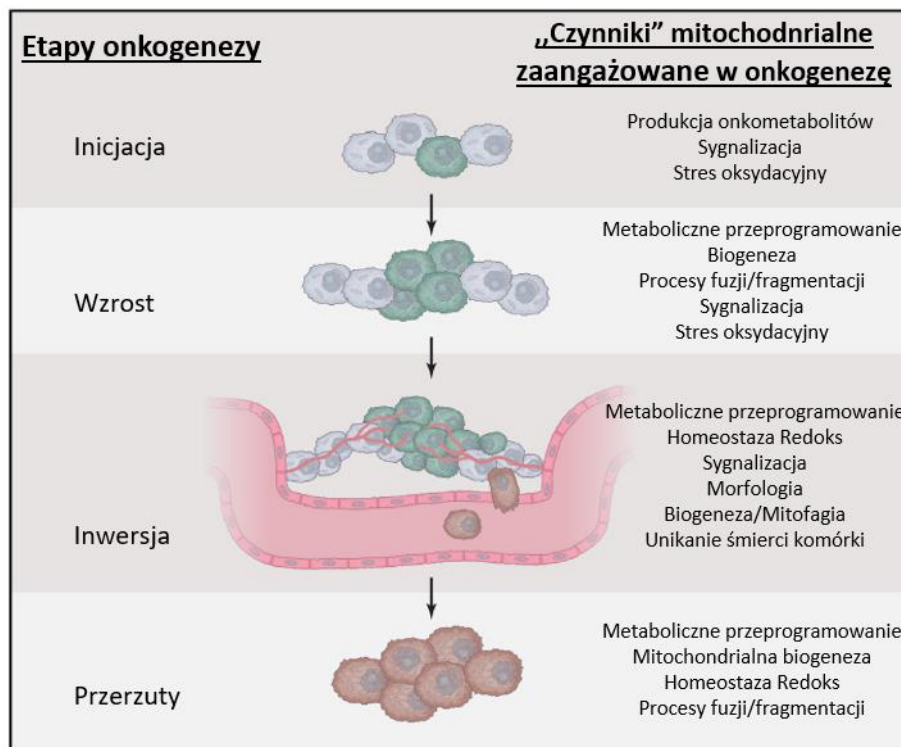
Mutacje w mtDNA oprócz tego, że mogą przyczyniać się do powstawania wielu schorzeń, zostały również stwierdzone w wielu ludzkich nowotworach. Są to najczęściej mutacje punktowe oraz takie skutkujące zmniejszeniem ilości kopii mtDNA (BADRINATH & YOO 2018; LUO I WSP. 2020). Bardzo często mutacje mtDNA powodują zaburzenia w prawidłowym funkcjonowaniu podjednostek mitochondrialnego łańcucha oddechowego (MODICA-NAPOLITANO I WSP. 2007; WALLACE 2012; GRASSO I WSP. 2020). Przykładem mogą być somatyczne mutacje mtDNA w podjednostkach kompleksu I, które powiązano z powstawaniem guzów u pacjentów z diagnozowanym łagodnym stadiem onkocytozy nerki (BADRINATH & YOO 2018). Generalnie, mutacje stwierdza się w całym genomie mitochondrialnym. Jednakże wykazano, że region pętli D (trójniciowy region niekodujący mtDNA) stanowi niejako „gorący punkt” dla mutacji w ludzkich nowotworach. Mutacje somatyczne w regionie pętli D zaobserwowano w nowotworach żołądka (ZHAO I WSP. 2005, WU I WSP. 2005), nowotworze wątrobowokomórkowym (TAMORI I WSP. 2004), nowotworze macicy (PEJOVIC I WSP. 2004), nowotworze jajnika (LIU I WSP. 2001), nowotworze sutka (TAN

I WSP. 2002), nowotworze jelita grubego (LIEVRE I WSP. 2005), czerniakach (TAKEUCHI I WSP. 2005) i wielu innych. Co ciekawe, na podstawie badań przeprowadzonych na niektórych typach nowotworów stwierdzono, że częstość występowania mutacji somatycznych w pętli D jest wyższa w nowotworach w późniejszym stadium aniżeli we wczesnych stadiach (MODICANAPOLITANO I WSP. 2007). Może to wskazywać na znaczącą niestabilność w pętli D regionu mtDNA, który może mieć kluczowe znaczenie w powstawaniu nowotworów. Ponadto, oprócz mutacji mtDNA w regionie pętli D zaobserwowano również mutacje punktowe, delecje, insercje czy duplikacje w innych częściach genomu mitochondrialnego. WALLACE (2012) w swej pracy podkreśla, że bardzo duży odsetek mutacji mtDNA w komórkach nowotworowych wyraźnie prowadzi do hamowania OXPHOS. Jest to wynikiem mutacji upośledzających OXPHOS, służących do transformacji nowotworowej jak również mutacji ułatwiających adaptację komórek nowotworowych do zmieniającego się środowiska bioenergetycznego.

#### **1.2.4. Wpływ stresu oksydacyjnego na komórki nowotworowe**

Stres oksydacyjny wywołany RFT okazuje się jednym z najważniejszych bodźców przyczyniających się do powstawania jak i progresji nowotworowej skutkującej zwiększoną złośliwością. Proces mitochondrialnej fosforylacji oksydacyjnej zużywa ponad 90% tlenu. Pomimo, iż większość tlenu jest całkowicie zredukowana do H<sub>2</sub>O przez oksydazę cytochromu c, 1-2% ulega niecałkowitej redukcji do rodników ponadtlenkowych co ma miejsce głównie w kompleksach I i III łańcucha oddechowego (LUO I WSP. 2020). „Nieszczelność” mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów przyczynia się do powstawania RFT, czyli m.in. ponadtlenków, wolnych rodników hydroksylowych oraz nadtlenu wodoru. W warunkach fizjologicznych wolne rodniki i ich pochodne występują w tkankach w niskich, ale mierzalnych stężeniach, które określa równowaga między tempem ich produkcji a tempem ich unieszkodliwiania przez systemy ochrony antyoksydacyjnej. W komórkach nowotworowych wytwarzane są większe ilości RFT, a ich podwyższony poziom może indukować utlenianie białek, lipidów czy DNA (BADRINATH & YOO 2018; LUO I WSP. 2020). Uważa się, że RFT wykazują działanie onkogenne poprzez ich zdolność do stymulowania proliferacji i przeżycia komórek nowotworowych, ich migracji jak również wywoływania uszkodzeń DNA, prowadzących do zmian genetycznych (STORZ 2005; GOGVADZE 2011). Ponadto, WALLACE (2012) podkreśla istotną rolę NADPH w produkcji RFT w komórkach nowotworowych. Jest on niezbędny do redukcji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i innych nadtlenków (wytwarzanych w mitochondriach) przez peroksydazy glutationowe z udziałem glutationu. Ponadto, NADPH

odgrywa również ważną rolę w regulacji funkcji białek poprzez redukcję ich reszt tiolowych (WALLACE 2012), zaś mitochondrialny  $H_2O_2$  reguluje potranskrypcyjną modyfikację białek, zmieniając w ten sposób aktywność białek docelowych (GRASSO I WSP. 2020). Biorąc pod uwagę, że mitochondrialne RFT są również niezwykle ważnymi cząsteczkami sygnalizacyjnymi oraz potencjalnymi mitogenami, w przypadku zahamowanej apoptozy, podwyższony poziom RFT może przyczynić się do transformacji nowotworowej (WALLACE 2012, GRASSO I WSP. 2020). MISSIROLI I WSP. (2020) wskazują, że RFT produkowane przez mitochondria mogą mieć wpływ na niemal wszystkie etapy onkogenezy. Począwszy od inicjacji nowotworowej, poprzez proliferację aż do przerzutów nowotworów, następuje akumulacja mutacji zarówno nDNA jak i mtDNA bezpośrednio wpływając na wiele procesów biologicznych takich jak: proliferacja komórek, odporność na apoptozę czy przeprogramowanie metaboliczne (ryc. 4).



Ryc. 4 Udział mitochondriów w różnych etapach onkogenezy (na podstawie VYAS I WSP. 2016).

### 1.2.5. Zaburzenia apoptozy w komórkach nowotworowych

Mitochondria są organellami bezpośrednio zaangażowanymi w inicjację śmierci komórki: apoptozę oraz nekrozę. Białka z rodziny Bcl-2 (ang. *B-cell lymphoma 2*) ściśle regulują apoptozę w komórkach, której zakłócenie może prowadzić do klonalnego rozrostu zmutowanych populacji komórek skutkując rozwojem nowotworu (BADRINATH & YOO 2018).



Nadekspresja białek antyapoptotycznych, takich jak Bcl-XL i Bcl-2, jest powiązana z inicjacją nowotworu, jego progresją jak również opornością na terapię. Działają one zatem jako swoiste wyzwalacze onkogenne lub onkosupresyjne uczestnicząc w progresji nowotworu. Przykładowo, białko antyapoptotyczne MCL-1 (ang. *Myeloid Cell Leukemia 1*) bardzo często wykazuje podwyższoną ekspresję w ludzkich nowotworach i może wiązać się z ze stopniem złośliwości nowotworów (BEROUKHIM I WSP. 2010). BADRINATH & YOO (2018) wskazują również na fakt, że cytochrom c, uwalniany z przestrzeni międzybłonowej podczas mitochondrialnej permeabilizacji błony zewnętrznej, jest degradowany przez ligazę E3 (ligaza ubikwitynowa, rozpoznająca białko przeznaczone do zniszczenia) w neuronach oraz komórkach nowotworu mózgu, co skutkuje zwiększoną przeżywalnością komórek nowotworowych.

### 1.3. OXPHOS w komórkach nowotworowych

Zlokalizowany w wewnętrznej błonie mitochondrialnej system fosforylacji oksydacyjnej – OXPHOS składa się z pięciu białkowych kompleksów wieloenzymatycznych zwanych: kompleksem I (dehydrogenaza NADH), kompleksem II (dehydrogenaza bursztynianowa), kompleksem III (kompleks bc<sub>1</sub>), kompleksem IV (oksydaza cytochromu c) oraz syntazy ATP określonej często jako kompleks V mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Białka uczestniczące w OXPHOS są kodowane zarówno przez mitochondrialne jak i jądrowe DNA, których mutacje są główną przyczyną powstawania defektów mitochondrialnego łańcucha oddechowego (CHANDRA & SINGH 2011). Dodatkowo, system OXPHOS obejmuje również dwa nośniki transportu elektronów, ubichinon (CoQ) oraz cytochrom c (POYTON & MCEWEN 1996).

Kompleks I łańcucha oddechowego jest największym i najbardziej skomplikowanym kompleksem składającym się z 45 różnych podjednostek, wśród których 14 wykazuje aktywność katalityczną. Siedem z nich jest kodowanych przez mtDNA, zaś pozostałe przez nDNA (SIGNES & FERNANDEZ-VIZARRA 2018). Kompleks I ma charakterystyczną strukturę przypominającą literę „L”. Składa się z mononukleotydu flawiny (FMN), klastrów żelazo-siarka (Fe-S) oraz ubichinonu (rozpuszczalnego w lipidach nośnika elektronów osadzonego w podwójnej warstwie lipidowej wewnętrznej błony mitochondrialnej) (LEONE I WSP. 2018). Dysfunkcje kompleksu I są najczęstszą przyczyną zaburzeń fosforylacji oksydacyjnej wykazujących duże zróżnicowanie objawów klinicznych (NOUWS I WSP. 2012). W celu sprawdzenia czy dysfunkcje kompleksu I (wywołane przez mutacje mtDNA), mogą być

związane z powstawaniem nowotworu, porównano ze sobą dwa rodzaje komórek: komórki L929dt (z mutacją mtDNA w podjednostce dehydrogenazy NADPH – ND2) oraz nienaruszone komórki mysich fibroblastów L929 (MARCO-BRUALLA I WSP. 2019). Autorzy wykazali, że komórki L929dt wykazywały m.in. defekty w tworzeniu superkompleksów mitochondrialnych, niższą zdolność do syntezy ATP na drodze fosforylacji oksydacyjnej. Co ważne, komórki L929dt wykazywały wyższy potencjał rakotwórczy i metastatyczny w modelach *in vivo* w porównaniu do komórek L929. Świadczy to, że mutacje w podjednostce ND2 kompleksu I mogą przyczyniać się do powstania wysoce złośliwego fenotypu nowotworowego. Dodatkowo, zmniejszoną aktywność kompleksu I obserwowano np. w gruczolakach kwasochłonnych nerki (MAYR I WSP. 2008) i gruczolakach tarczycy (ZIMMERMANN I WSP. 2009).

Kompleks II łańcucha oddechowego składa się z czterech podjednostek kodowanych wyłącznie przez nDNA, zawiera grupę hemu b oraz dwa miejsca wiązania CoQ. W jego skład wchodzi dinukleotyd flawinoadeninowy (FAD) oraz trzy klastry Fe-S. Kompleks ten stanowi również część cyklu TCA. Mutacje prowadzące do utraty funkcji w podjednostkach dehydrogenazy bursztynianowej (SDH) wywołują różne typy nowotworów. Stwierdzono, że dziedziczne mutacje w SDH sprzyjają rozwojowi dziedzicznego nowotworu chromochłonnego (ang. *Pheochromocytoma*) i przyzwojaka (ang. *Paraganglioma*). Ponadto zebrane w pracy przeglądowej LUO I WSP. (2020), dane wskazują również, na genetyczne i sporadyczne mutacje SDH występujące również w kilku innych nowotworach, m.in. jelita grubego, nerki, przewodu pokarmowego, przysadki i jajnika. Mutacje w genach kodujących kompleks II zmniejszają jego aktywność katalityczną oraz prowadzą do nieprawidłowej akumulacji bursztynianu w mitochondriach (LUO I WSP. 2020).

Kompleks III łańcucha oddechowego zwany także reduktazą cytochromu c, składa się z cytochromu c1 (zawierającego jedną grupę hemową), cytochromu b (zawierającego dwie różne grupy hemowe), białka Fe-S Rieske i dwóch miejsc wiążących CoQ. Z wyjątkiem cytochromu b, który jest kodowany przez mtDNA, wszystkie inne podjednostki są kodowane przez nDNA (SIGNES & FERNANDEZ-VIZARRA 2018; LUO I WSP. 2020). Mutacje cytochromu b diagnozowano w różnych nowotworach, takich jak nowotwór trzustki (KASSAUEI I WSP. 2006) czy nowotwór pęcherza moczowego (DASGUPTAI WSP. 2008). Podwyższoną aktywność kompleksu III w porównaniu do tej obserwowanej w warunkach fizjologicznych wykryto w nowotworze sutka (OWENS I WSP. 2011).

Kompleks IV łańcucha oddechowego składa się z 13 bądź 14 podjednostek i jest jedynym kompleksem OXPHOS zawierającym izoformy specyficzne tkankowo i regulowane

rozwojowo (SIGNES & FERNANDEZ-VIZARRA 2018). Składa się z cytochromu a i cytochromu a<sub>3</sub> zawierającego hem, a także z dwóch centrów metalicznych (CuA i CuB) (LUO I WSP. 2020). Trzy podjednostki katalityczne (COI, COII i COIII) są kodowane przez mtDNA, zaś pozostałe 10 podjednostek nDNA. W przypadku nowotworów zaobserwowano zmniejszoną aktywność kompleksu IV. Zauważono, że w nowotworach nerki ekspresja kompleksu IV była 5-krotnie niższa niż w zdrowych tkankach nerek (OWENS I WSP. 2011). Mutacje w podjednostkach kompleksu IV obserwuje się w różnych typach nowotworów takich jak nowotwór jelita grubego, glejak wielopostaciowy czy nowotwór przełyku (LUO I WSP. 2020).

Syntaza ATP łańcucha oddechowego składa się z domeny F<sub>0</sub> zawierającej kanał protonowy, zlokalizowanej w wewnętrznej błonie mitochondrialnej oraz katalitycznej domeny F<sub>1</sub> (która łączy się z F<sub>0</sub>) i znajduje się po stronie macierzy mitochondrialnej (LUO I WSP. 2020). Warto zauważyć, że tylko dwie z podjednostek F<sub>0</sub> są kodowane przez geny mtDNA: ATP6 i ATP8. Mutacje genów kodujących ATP6 i ATP8 zaobserwowano w różnych typach nowotworów, takich jak kostniakomięsak, nowotwór prostaty oraz nowotwór sutka (LUO I WSP. 2020).

#### **1.4. Związek pomiędzy mitochondriami, komórkami nowotworowymi, a białkiem adaptorowym p66Shc**

Badania prowadzone na mitochondriach pokazały ich istotne znaczenie w wielokrotnie wskazywanych w niniejszej pracy doktorskiej procesach związanych m.in. z regulacją przeżywalności i śmierci komórki, produkcji ATP, czy też produkcji reaktywnych form tlenu. Zwiększony poziom RFT w mitochondriach bardzo często wskazywany jest jako jeden z głównych czynników, inicjujących dysfunkcję mitochondriów oraz chorób związanych ze starzeniem się, co czyni RFT niezwykle istotnymi cząsteczkami sygnałowymi. Udział mitochondriów we wzroście komórek, produkcji RFT oraz apoptozie ma złożony charakter, gdyż może zależeć od warunków środowiskowych i kontekstu genetycznego. Obecność dysfunkcji mitochondriów stwierdzono w wielu chorobach, w tym zaburzeniach neurodegeneracyjnych i metabolicznych, a także nowotworach (NUNNARI & SUOMALAINEN 2012). Niezwykle interesującym z punktu widzenia mojej pracy doktorskiej jest fakt, że jednym z regulatorów produkcji RFT jak i procesu starzenia się i apoptozy jest białko adaptorowe p66Shc należące do rodziny białek ShcA. Funkcje białka p66Shc są aktywowane m.in. w wyniku stresu oksydacyjnego, przez co rośnie produkcja RFT w mitochondriach inicjując proces apoptozy w komórkach (GIORGIO I WSP. 2005; RAFFAELLO & RIZZUTO 2010).

Co ciekawe, wspomniane procesy (produkcji RFT oraz apoptozy) wydają się być niezwykle istotne dla komórek nowotworowych, a jednocześnie wykazują pewne zaburzenia. czyniąc nowotwory niezwykle trudne do leczenia. W warunkach fizjologicznych poziom RFT jest ściśle kontrolowany, jednak w komórkach nowotworowych wzmożona produkcja RFT indukuje kaskadę sygnalizacyjną, która pośredniczy w utrzymaniu fenotypu onkogenego. Podwójna rola RFT w komórkach nowotworowych jest szczególnie interesująca. RFT stymulują proliferację i wzrost komórek nowotworowych, natomiast modulacja poziomu RFT jest obiecującym czynnikiem indukującym starzenie i apoptozę podczas terapii antynowotworowej (NUNNARI & SUOMALAINEN 2012, COSTA I WSP. 2014). Nasza wiedza dotycząca udziału białka p66Shc w regulacji metabolizmu komórek nowotworowych nadal jest niepełna i zrozumienie wszystkich aspektów tej regulacji wymaga wielu dodatkowych badań. Jest to szczególnie ważne, gdyż molekularne mechanizmy udziału białka p66Shc w progresji guza nowotworowego, przerzutach czy przeprogramowaniu metabolicznym pozostają wciąż niejasne. Dotychczasowe badania pokazały jak niezwykle ważne dla fizjologii komórki jest białko p66Shc, z jednej strony będące negatywnym regulatorem proliferacji, a z drugiej będące kluczowym elementem systemu odpowiedzi komórki na stres oksydacyjny. Poznanie innych biologicznych właściwości/funkcji białka p66Shc oraz ścieżek sygnałowych, w których jest ono zaangażowane szczególnie w kontekście regulacji metabolizmu komórek nowotworowych, wydaje się być niezwykle istotne z punktu widzenia konstruowania potencjalnych terapii przeciwnowotworowych.

### 1.5. Rodzina białek Shc

Białka Shc należą do rodziny składającej się z czterech „podrodzin” określanych jako ShcA, ShcB, ShcC oraz ShcD z których najlepiej poznana i opisana jest ShcA (ROZAKIS-ADCOCK I WSP. 1992; NAKAMURA I WSP. 1998; AHMED & PRIGENT 2017). Podrodzina ShcA została zidentyfikowana w 1992 roku jako rodzina białek adaptorowych, sprzęgających aktywowany receptor czynnika wzrostu naskórka (EGF, ang. *Epidermal growth factor*) z białkiem Ras i kaskadą kinaz aktywowanych mitogenami (MAP, MAPK, ang. *Mitogen – activated protein kinases*) (BONFINI I WSP. 1996; RAVICHANDRAN 2001). Rodzina ShcA reprezentowana jest przez trzy różne białka kodowane przez ten sam gen. Locus genu *SHCA* mapuje się na chromosomie 1q21, zawierającym 13 eksonów, ulegającym translacji do trzech białek (izoform) o masie 46, 52 oraz 66 kDa, znanych odpowiednio jako białka p46Shc, p52Shc oraz p66Shc (PELLICCI I WSP. 1992; HUEBNER I WSP. 1994). Niezwykle istotnym (z

punktu widzenia zaplanowanych w niniejszej pracy doktorskiej celów) jest fakt, iż wszystkie izoformy powstają na drodze alternatywnego splicingu RNA, bądź alternatywnej inicjacji translacji (PELLICCI I WSP. 1992; MIGLIACCIO I WSP. 1997; RAVICHANDRAN 2001). Najdłuższa izoforma p66Shc składa się z 583 aminokwasów powstałych na matrycy eksonów 2-13 mRNA ShcA, podczas gdy pozostałe odpowiednio z 474 aminokwasów (p52Shc) oraz 429 (p46Shc) powstałych na matrycy eksonu 1, fragmentu eksonu 2 i eksonu 3 mRNA ShcA (WRIGHT I WSP. 2018; KUMAR 2019). Drugi z mechanizmów zaangażowany w powstawanie izoform ShcA zachodzi poprzez wykorzystanie alternatywnych kodonów startu translacji w ramce odczytu. Białko p66Shc powstaje w wyniku inicjacji translacji z trzech kodonów startu ATG, zaś izoformy p52Shc oraz p46Shc inicjacji translacji z dwóch kodonów startu ATG znajdujących się w ramce odczytu. Wszystkie białka zaliczane do rodziny ShcA pozbawione są aktywności katalitycznej i posiadają unikalną oraz wysoce konserwatywną organizację domen. Charakteryzują się one obecnością:

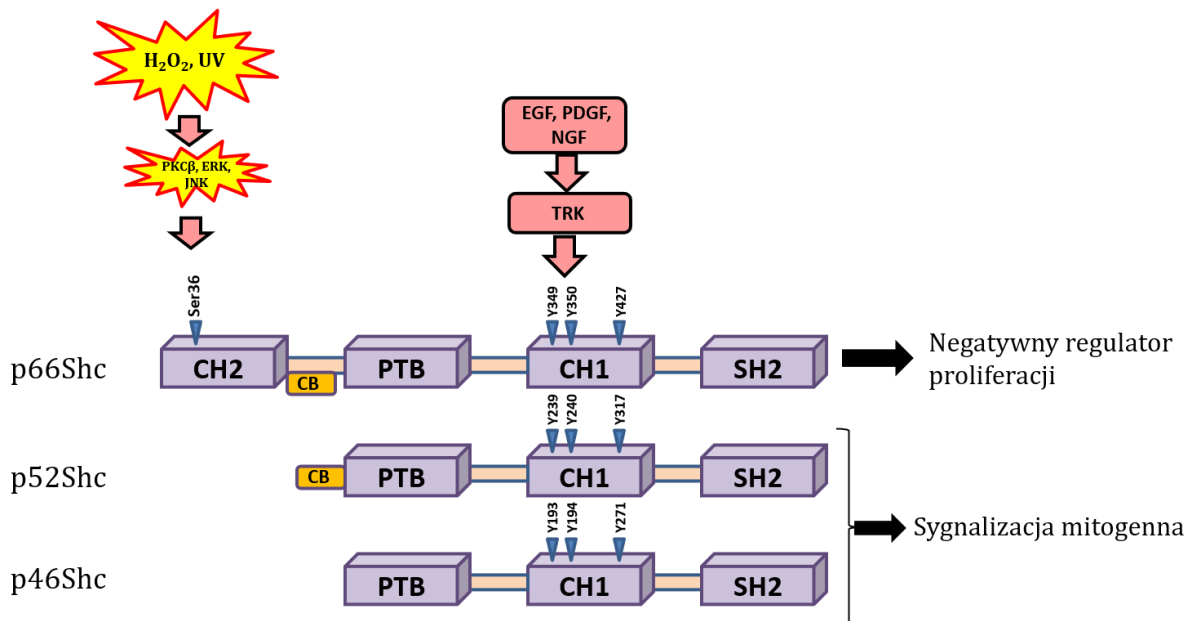
- C-końcowej domeny (SH2, ang. *Src-homology domain 2*) odpowiedzialnej za interakcję białko-lipidy,
- Centralnej domeny (CH1, ang. *Collagen homology domain*) oraz
- N-końcowej domeny wiążącej fosfotyrozynę (PTB, ang. *Phosphotyrosine-binding domain*).

Ponadto, izoformy p66Shc oraz p52Shc zawierają dodatkowo domenę wiążącą cytochrom c (CB). Niemniej jednak, kluczową różnicą w organizacji poszczególnych domen pomiędzy białkami p52Shc/p46Shc oraz p66Shc jest obecność na N-końcu białka unikatowej

- domeny CH2 (CH2, ang. *Collagen homology domain 2*) charakterystycznej wyłącznie dla białka p66Shc (ryc. 5).

Należy zwrócić uwagę, że w zależności od pełnionych funkcji poszczególnych izoform fosforylacji ulegają inne reszty tyrozynowe bądź serynowe obecne we wspomnianych wcześniej domenach. I tak, w przypadku białek p52Shc/p46Shc domena CH1 w odpowiedzi na aktywowane receptorowe kinazy tyrozynowe ulega fosforylacji w następujących resztach tyrozynowych: Y239, Y240 oraz Y317 prowadząc do odpowiedzi związanej z sygnalizacją mitogenną. W przypadku białka p66Shc fosforylacja tych samych reszt tyrozynowych wywiera dokładnie odwrotny efekt – białko p66Shc działa jako negatywny regulator proliferacji (MIGLIACCIO I WSP. 2006; NATALICCHIO I WSP. 2011). Co ciekawe, domena CH2 charakterystyczna wyłącznie dla białka p66Shc, zawiera unikatowe miejsce fosforylacji w

reszcie seryny 36 (Ser36), która jest kluczowa dla właściwości prooksydacyjnych białka p66Shc.



**Ryc. 5 Schemat organizacji domen poszczególnych izoform rodziny ShcA z miejscami ich fosforylacji.** PKC $\beta$  – kinaza białkowa C $\beta$ ; ERK – kinazy regulowane sygnałami pozakomórkowymi; JNK – kinazy aktywowane stresem; EGF – czynnik wzrostu naskórka; PDGF – płytkopochodny czynnik wzrostu; NGF – czynnik wzrostu nerwu; TRK – receptor o aktywności kinazy tyrozynowej; CB – domena wiążąca cytochrom c.

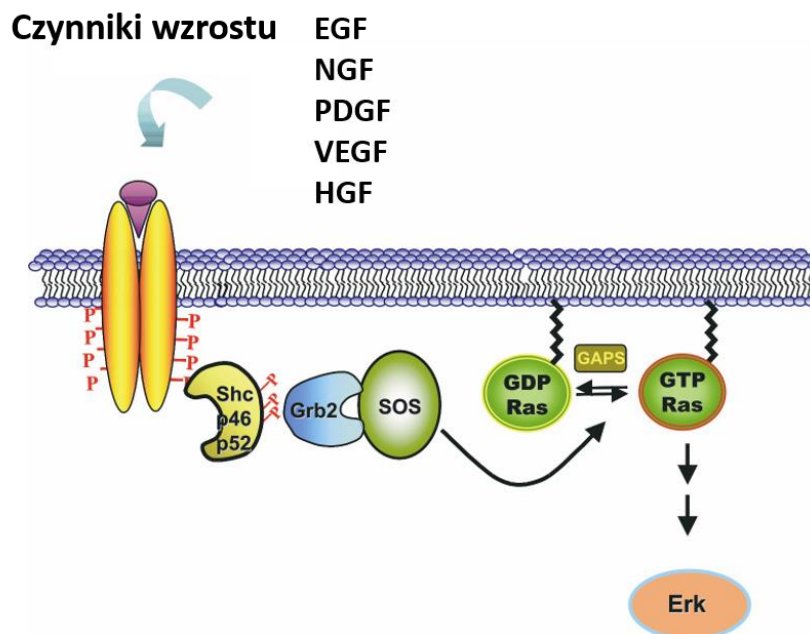
Izoformy rodziny ShcA wykazują zróżnicowany wzór ekspresji, podyktowany przez system kontroli potranskrypcyjnej i potranslacyjnej (KUMAR 2019). KIM I WSP. (2012) wskazują acetylację oraz metylację histonów jako dwie najważniejsze modyfikacje epigenetyczne odgrywające zasadniczą rolę w regulacji ekspresji genu *SHCA*. O ile białka p52Shc/p46Shc ulegają ekspresji w każdej komórce, o tyle białko p66Shc ulega ekspresji w większości komórek na różnym poziomie w zależności od rodzaju tkanki (BHAT I WSP. 2015). I tak, w linii komórek krwiotwórczych, prawidłowych limfocytach krwi obwodowej oraz mózgu jak również w komórkach niektórych nowotworów sutka brak jest ekspresji białka p66Shc, bądź występuje ona na bardzo niskim poziomie (PELICCI I WSP. 1992; STEVENSON & FRACKELTON 1998; PELLEGRINI I WSP. 2005). Co prawda, obecność białka p66Shc potwierdzono w limfocytach, mysich tymocytach i limfocytach T śledziony, które nabywają zdolności do jego ekspresji w odpowiedzi na bodźce apoptogenne (PACCINI I WSP. 2004). Białko p66Shc występuje specyficznie w sercu, nerkach, płucach, wątrobie i śledzionie (LEBIEDZIŃSKA I WSP. 2009). Wysoki poziom ekspresji białka p66Shc odnaleziono również w tkance tłuszczowej, gdzie białko to wydaje się kontrolować adipogenezę (BERNIAKOVICH I WSP. 2008; TOMILOV I WSP. 2011).

Liczne dane literaturowe wskazują, że białko p66Shc wykazuje różne lokalizacje wewnątrzkomórkowe. Jego obecność stwierdzono w cytoplazmie, mitochondriach i retikulum endoplazmatycznym. W błonie plazmatycznej białko p66Shc bierze udział w przekazywaniu sygnału, który pośredniczy w sygnalizacji receptorowej kinazy tyrozynowej (sygnalizacja Ras/MAPK), promuje aktywację białka Rac1 (małe białko G z rodziny Rho, ang. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) i wyzwała zależną od oksydazy NADPH produkcję RFT (LEBIEDZIŃSKA-ARCISZEWSKA I WSP. 2015). Oprócz tego, białko p66Shc wykryto również w błonach związanych z mitochondriami (MAMs, ang. *Mitochondria – associated membranes*) jak również błonach związanych z błoną plazmatyczną (PAM, ang. *Plasma associated membranes*) (LEBIEDZIŃSKA I WSP. 2009; WIĘCKOWSKI I WSP. 2009). W jądrze komórkowym p66Shc może hamować czynniki transkrypcyjne FOXO (ang. *Class O of forkhead box transcription factor*), a tym samym regulować ekspresję enzymów neutralizujących RFT (NEMOTO & FINKIEL 2002). Obecność białka p66Shc postulowano również w przestrzeni międzybłonowej, gdzie może oddziaływać z cytochromem c biorąc udział w produkcji RFT (GIORGIO I WSP. 2005).

### **1.5.1. Sygnalizacja komórkowa białek ShcA**

Sygnalizacja komórkowa jest niezwykle ważnym procesem, który przekształca określony bodziec w specyficzną odpowiedź biologiczną. Przekazywanie sygnału wspomaganie przez tzw. mediatory określane mianem białek adaptorowych, które poprzez interakcje białko – białko generują specyficzną odpowiedź komórkową. Rodzina białek ShcA jest jedną z najlepiej przebadanych rodzin białek adaptorowych, której mechanizm molekularny jest nam znany (MIR I WSP. 2020). Rodzina białek ShcA w odpowiedzi na różne sygnały zewnątrzkomórkowe indukowane przez cytokiny, czynniki wzrostu i integryny pośredniczy w różnych kaskadach sygnałowych zaangażowanych w regulację zarówno czynności fizjologicznych jak i chorobowych (WRIGHT I WSP. 2018). W 1997 roku grupa badawcza MIGLIACCIO I WSP. (1997) opisała przeciwstawne funkcje pełnione przez izoformy p52Shc/p46Shc oraz p66Shc. Z kolei, TERADA (2019) w swej pracy zwraca uwagę, że rozbieżność funkcji biologicznych pełnionych przez poszczególne izoformy w kontekście sygnalizacji mitogennej może wyjaśniać struktura genu *SHC1* zawierającego dwa oddzielne (regulowane) miejsca startu transkrypcji. Dodatkowo, koncepcję „różnorodności biologicznej” poszczególnych izoform rodziny ShcA wzmacniają dowody na różną regulację promotora w wyniku metylacji oraz deacetylacji histonów (VENTURA I WSP. 2002) jak i różną

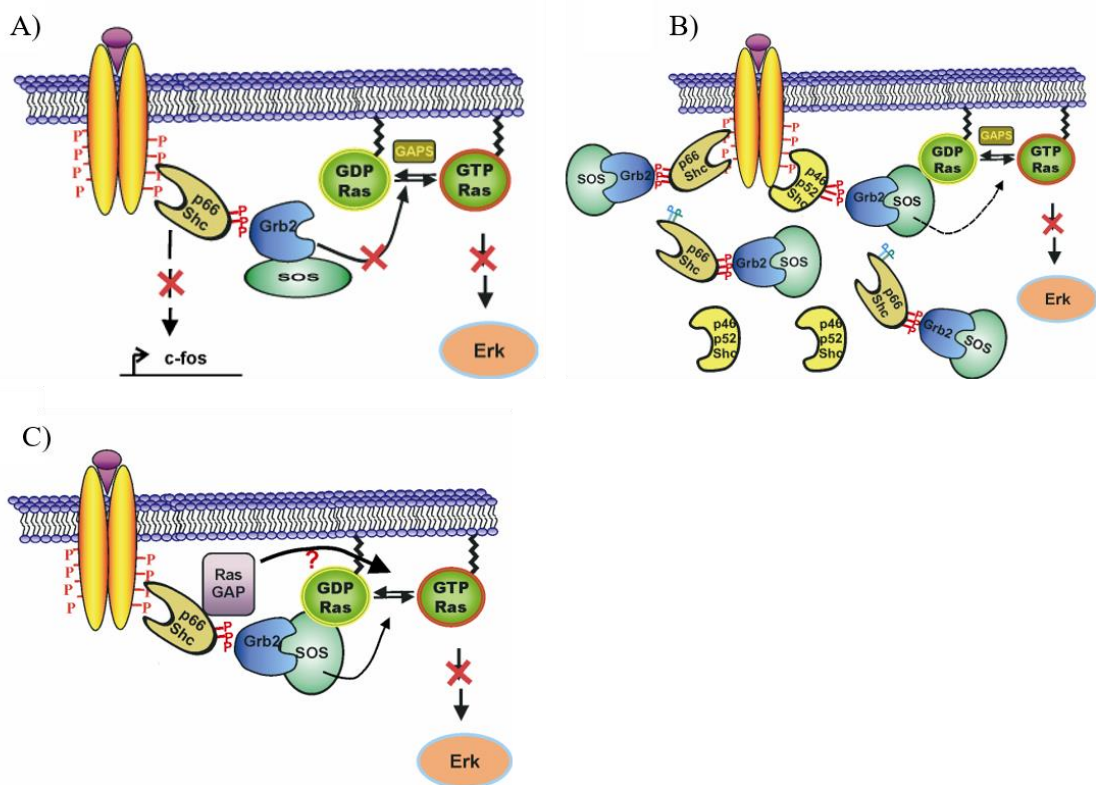
lokalizację wewnątrzkomórkową białek ShcA (VENTURA I WSP. 2004). Udział w sygnalizacji mitogennej przypisano głównie izoformom p52Shc oraz p46Shc, podczas gdy izoformę p66Shc oprócz pełnienia unikalnych funkcji m.in. w mitochondrialnej odpowiedzi na stres oksydacyjny zaczęto uważać za negatywny regulator proliferacji (MIGLIACCIO I WSP. 1999; PELLEGRINI & BALDARI 2009; NATALICCHIO I WSP. 2011). W związku z powyższym, mechanizm aktywacji receptora kinaz tyrozynowych (RTK ang. *Receptor tyrosine kinase*) w przypadku białek p52Shc oraz p46Shc wygląda nieco inaczej niż w przypadku p66Shc. Mianowicie, aktywacja RTK, w wyniku działania czynników wzrostu, skutkuje rekrutacją białek p52Shc/p46Shc, a następnie ich fosforylacją. Białka te wiążą się z ufosforylowanymi receptorami poprzez domenę PTB, bądź SH2, same ulegając fosforylacji w resztach tyrozynowych obecnych w domenie CH1 (Y239/240, Y317) (PELICCI I WSP. 1992; RAVICHANDRAN I WSP. 1993). Białko związane z receptorem czynnika wzrostu 2 (Grb2, ang. *Growth Factor Receptor bound Protein 2*) tworzy następnie kompleks z białkiem SOS1 (wymieniacz nukleotydów GDP/GTP w białku Ras, ang. *Son of sevenless 1*), zaś tak utworzony kompleks Grb2/SOS1 jest „rekrutowany” przez ufosforylowane już białka p52Shc/p46Shc i przyłączany do reszt fosfotyrozyny w wyniku bezpośredniego oddziaływania z domeną Grb2-SH2. W konsekwencji prowadzi to do aktywacji białka Ras, a tym samym propagacji sygnałów mitogennych skutkując aktywacją szlaku Ras/MAPK (PELICCI I WSP. 1992; MIGLIACCIO I WSP. 1997) (ryc. 6).



**Ryc. 6** Schematyczne przedstawienie aktywacji białek Ras przez izoformy p52Shc/p46Shc (na podstawie KLEINER 2005). EGF – czynnik wzrostu naskórka; NGF – czynnik wzrostu nerwu; PDGF – płytkopochodny czynnik wzrostu; VEGF – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego; HGF – czynnik wzrostu hepatocytów; Erk – kinazy regulowane sygnałami pozakomórkowymi.



Co ciekawe, w przypadku białka p66Shc pomimo fosforylacji reszt tyrozynowych w odpowiedzi na EGFR, szlak Ras/MAPK nie jest aktywowany (MIGLIACCIO I WSP. 1997; ARANY I WSP. 2008). Do tej pory mechanizm ten nie jest do końca poznany. Pierwsza z hipotez zakłada, iż białko p66Shc wiąże Grb2 w konformacji uniemożliwiającej aktywację białka Ras (MIGLIACCIO I WSP. 1997). Ponadto, MIGLIACCIO I WSP. (1997) wykazali, że ekspresja p66Shc hamuje indukowaną przez EGF aktywację promotora c-fos (komórkowy protoonkogen należący do genów wczesnej odpowiedzi komórkowej). Druga hipoteza oparta jest na zasadzie współzawodnictwa białka p66Shc z pozostałymi izoformami p52Shc/p46Shc o wiązanie z Grb2 (OKADA I WSP. 1997). Autorzy wykazali, że w tym wypadku dochodzi nie tylko do fosforylacji reszt tyrozynowych lecz również seryny/treoniny białka p66Shc w odpowiedzi na działania EGF co znacząco osłabia jego zdolność do łączenia się z EGFR ale nie z Grb2. Ostatnia z hipotez wskazuje, że białko p66Shc może wiązać się do kompleksu Ras/GAP (GAP, ang. *GTPase activating protein*) negatywnie wpływając na aktywację białka Ras (DUPONT & BLANCQ 1999) (ryc. 7).



**Ryc. 7** Możliwe mechanizmy działania białka p66Shc w sygnalizacji Ras/MAPK (na podstawie KLEINER 2005). Białko p66Shc wiąże się z Grb2 w konformacji uniemożliwiającej aktywację Ras (A); białko p66Shc rywalizuje z pozostałymi izoformami p52Shc oraz p46Shc o wiązanie z Grb2 (B); białko p66Shc wiąże się z kompleksem RasGAP w konsekwencji nie prowadząc do aktywacji Ras.

Podsumowując, białko p66Shc w stanie fizjologicznym (komórkach zdrowych) odmiennie niż białka p52Shc oraz p46Shc działa jako negatywny regulator proliferacji, hamując sygnalizację mitogenną. Jest to niezwykle obiecujące z punktu widzenia badań nad komórkami nowotworowymi, charakteryzującymi się bardzo często nieograniczonym wzrostem komórek.

## **1.6. Rola i funkcje białka adaptorowego p66Shc w stanie fizjologicznym**

Białko adaptorowe p66Shc stanowi najdłuższą z izoform zaliczanych do rodziny ShcA, ze względu na obecność dodatkowej domeny CH2 na N-końcu łańcucha aminokwasowego. Jak już opisano w rozdziale 1.5.1, klasycznie w odpowiedzi na stymulacje czynnikami wzrostowymi białko p66Shc jest fosforylowane w tych samych resztach tyrozynowych co pozostałe białka rodziny ShcA (p52Shc oraz p46Shc), wykazując jednak odmienną odpowiedź fizjologiczną. Niemniej jednak, najbardziej interesującym wydaje się fakt, że ze względu na obecność unikalnego wyłącznie dla białka p66Shc miejsca fosforylacji w reszcie Ser36, izoforma ta zaangażowana jest w znacznie szersze spektrum pełnionych w komórce funkcji w porównaniu z białkami p52Shc oraz p46Shc. Przede wszystkim, obecność Ser36 jest krytyczna w pełnieniu przez białko p66Shc funkcji prooksydacyjnych szczególnie istotnych z punktu widzenia mojej pracy doktorskiej. Warte podkreślenia jest to, że przez wiele lat izoforma ta była intensywnie badana głównie w kontekście roli negatywnego regulatora proliferacji (MIGLIACCIO I WSP. 1999; PELLEGRINI & BALDARI 2009; NATALICCHIO I WSP. 2011), odpowiedzi komórki na stres oksydacyjny (GIORGIO I WSP. 2005; PANI 2010; RAY I WSP. 2012) oraz starzeniu się i regulacji długości życia ssaków (MIGLIACCIO I WSP. 1999; PINTON & RIZZUTO 2008; LEBIEDZIŃSKA I WSP. 2009; ORSINI I WSP. 2004; KLOTZ I WSP. 2015) jak również apoptozy (GIORGIO I WSP. 2005; TRINEI 2002). Aktualnie uważa się, że białko p66Shc bierze udział także w wielu innych stanach patologicznych, m.in. w: cukrzycy (YANG I WSP. 2014; MIR I WSP. 2020), chorobach układu krążenia (MILLER I WSP. 2016; KUMAR 2019), stłuszczeniu wątroby (BERNIAKOVICH I WSP. 2008; TOMITA I WSP. 2012) jak również chorobach neurodegeneracyjnych (CONTI I WSP. 1997; PESARESI I WSP. 2011; MAJ I WSP. 2010). Co więcej, białko p66Shc jest zaangażowane również w procesy związane z chorobą nowotworową: proliferację komórek nowotworowych (VEERAMANI I WSP. 2008; MUNIYAN I WSP. 2015), progresję guza nowotworowego (LEE I WSP. 2004; VEERAMANI I WSP. 2008), metastazę (RAJENDRAN I WSP. 2010) czy przeprogramowanie metaboliczne (SOLIMAN I WSP. 2014). Wieloaspektowość właściwości białka p66Shc czyni go interesującym kandydatem do dalszych badań zarówno w kontekście różnych stanów fizjologicznych komórki jak i

wspomnianych stanów patologicznych. W niniejszym rozdziale opisana zostanie rola białka p66Shc w procesach stanu fizjologicznego komórki.

### **1.6.1. Białko p66Shc i jego rola w starzeniu się i regulacji długości życia**

W początkowym etapie rozwoju badań nad białkiem p66Shc, było ono intensywnie badane w kontekście jego roli w regulacji długości życia u ssaków, a tym samym w procesie starzenia się. MIGLIACCIO I WSP. (1999) zaproponowali, że izoforma p66Shc może kontrolować długość życia ssaków poprzez regulację odpowiedzi komórkowej na stres oksydacyjny. Przede wszystkim, należy podkreślić, że poszczególne funkcje pełnione przez białko p66Shc są wynikiem udziału izoformy p66Shc w ścieżce przekazywania sygnału aktywowanej w wyniku wewnątrzkomórkowego stresu oksydacyjnego i są ściśle od siebie zależne. Starzenie się to powszechnie zachowany proces charakteryzujący się postępującą utratą homeostazy tkanek oraz narządów, zwiększającą tym samym podatność na różne choroby. GUARENTE & KENYON (2000) sugerują, że w starzejących się modelach zwierzęcych zarówno bezkręgowców jak i kręgowców istnieje silna korelacja między długowiecznością a wzrostem odporności na stres oksydacyjny. Prace MIGLIACCIO I WSP. (1999) jak również PINTON & RIZZUTO (2008) jasno wskazują, że w odpowiedzi na stres oksydacyjny zwiększona ekspresja p66Shc znacząco przyczynia się do apoptozy komórek. Pozbawienie myszy białka p66Shc wydłużało jej długość życia o 30% w porównaniu z typem dzikim myszy. NEMOTO & FINKIEL (2002) zasugerowali, że czynnik transkrypcyjny typu forkhead (FKHR-L1), specyficznie indukujący geny dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy, może być odpowiedzialny za zwiększoną odporność komórek p66Shc na stres oksydacyjny. Wyższą aktywność katalazy zaobserwowano u myszy pozbawionych p66Shc, co również skutkowało przedłużeniem ich długości życia w porównaniu z myszami typu dzikiego (SCHRINER I WSP. 2005). Stwierdzono również, że inaktywacja białka p66Shc odgrywa kluczową rolę w różnych procesach związanych ze starzeniem się mózgow myszy. Mianowicie, mózgi myszy pozbawionych p66Shc charakteryzowały się opóźnionym starzeniem, wykazywały zmniejszone zmiany w równowadze redoks oraz lepszą dynamikę i biogenezę mitochondriów (PÉREZ I WSP. 2018). Rolę białka p66Shc w regulacji starzenia się stwierdzono również w przypadku hepatocytów. Wykazano, że stres oksydacyjny zwiększa produkcję mitochondrialnych RFT za pośrednictwem p66Shc a tym samym przyspiesza starzenie się wątroby (ZHANG I WSP. 2020). Autorzy ci sugerują, że białko p66Shc prawdopodobnie reguluje starzenie się hepatocytów poprzez szlak związany z białkami p53/p21. Całkiem

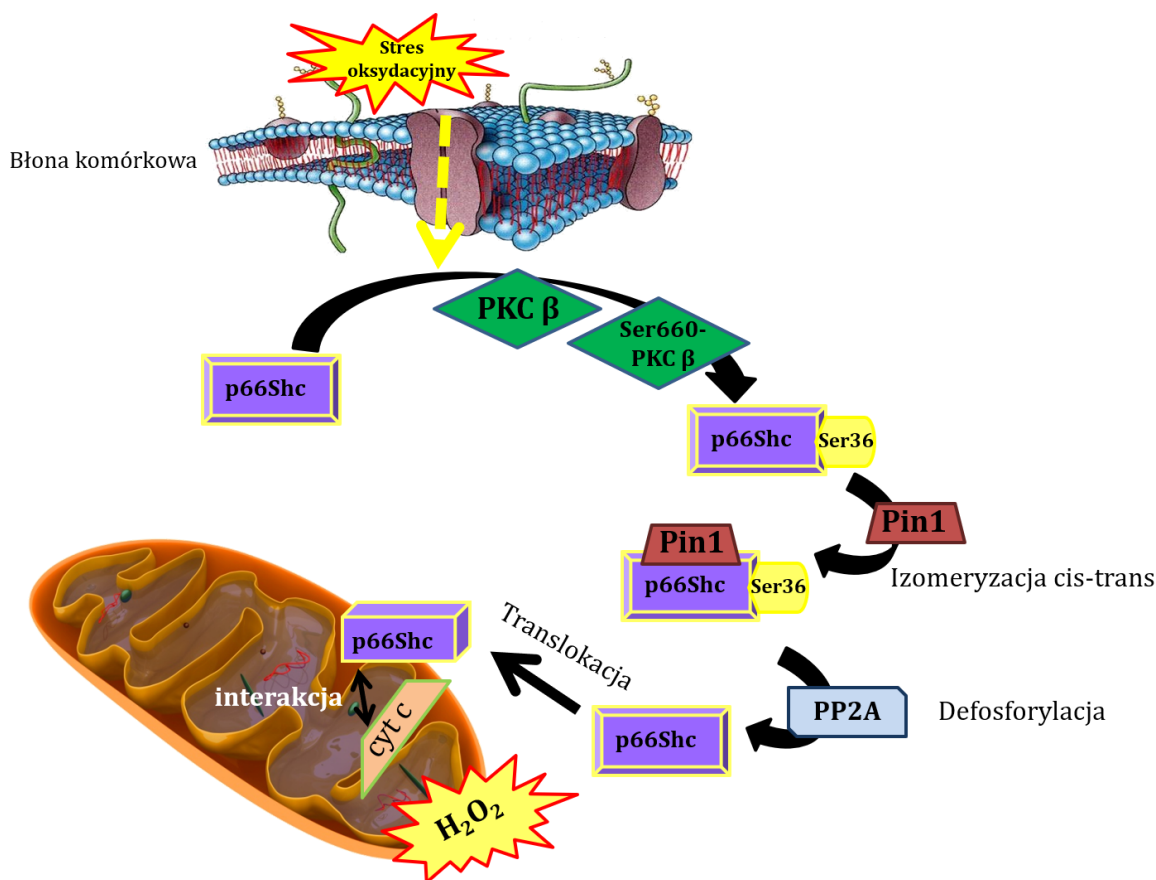
niedawno zbadano też wpływ delekcji genu p66Shc na długość życia u myszy z niedoborem TERC (składnik telomerazy RNA, ang. *Telomerase RNA component*). Z uwagi na to, że myszy TERC *-/-* mają krótkie telomery i skróconą długość życia, potwierdzono, że usunięcie białka p66Shc nie miało w tym wypadku wpływu na długość życia zwierząt (GIORGIO I WSP. 2016).

### **1.6.2. Prooksydacyjna funkcja białka p66Shc oraz jego rola w procesie apoptozy**

Biorąc pod uwagę dostępne dane literaturowe, które niejednokrotnie wskazują na mitochondria jako kluczowy regulator długowieczności, wiele grup badawczych skupiło swoje wysiłki nad identyfikacją mechanizmów odpowiedzialnych za szkodliwy wpływ produkcji RFT w mitochondriach na proces starzenia się. Przykładem efektora mitochondrialnego pośredniczącego w produkcji RFT, a tym samym zaangażowanego w odpowiedź komórki na stres oksydacyjny może być właśnie białko adaptorowe p66Shc. Zasadniczo, wewnątrzkomórkowy poziom RFT można zwiększyć za pomocą trzech głównych mechanizmów: zmniejszenia wychwytywania RFT, zwiększenia aktywności oksydaz błonowych bądź w wyniku „wycieku” elektronów z mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Potwierdzono, że białko p66Shc może podnosić wewnątrzkomórkowy poziom RFT w wyniku działania wszystkich trzech wspomnianych mechanizmów (TRINEI I WSP. 2009; WRIGHT I WSP. 2018). I tak, białko p66Shc może regulować aktywność oksydazy NADPH związanej z błoną plazmatyczną w celu wytworzenia RFT poprzez aktywację białka Rac1 za pośrednictwem Grb2 (GALIMOV 2010; TOMILOV I WSP. 2010; OSHIKAWA I WSP. 2012). Białko p66Shc może zmniejszać wychwytywanie RFT poprzez regulację ekspresji (jej zmniejszenie) enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej 2 (SOD2) oraz peroksydazy glutationowej w wyniku interakcji z białkiem  $\beta$ Pix (ang. *Pak-interacting exchange factor*) oraz FOXO3a. W warunkach fizjologicznych czynnik transkrypcyjny FOXO3a znajduje się w jądrze komórkowym prowadząc do transkrypcji enzymów antyoksydacyjnych. Natomiast w warunkach stresu oksydacyjnego białko p66Shc tworzy kompleks z białkiem  $\beta$ Pix, który jest zdolny do wiązania FOXO3a w cytozolu, osłabiając ekspresję genów kodujących enzymy antyoksydacyjne, a także promując proliferację (CHAHDI & SOROKIN 2008; GALIMOV 2010). Trzeci z mechanizmów obejmuje produkcję RFT, będącą konsekwencją funkcjonowania mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Pod wpływem zwiększonego stresu oksydacyjnego niewielka część cytozolowej frakcja p66Shc przemieszcza się do mitochondriów (ORSINI I WSP. 2004; GIORGIO I WSP. 2005; NEMOTO I

wsp. 2006). W wyniku interakcji z kompleksem importującym TOM/TIM oraz mitochondrialnym białkiem szoku cieplnego (mtHsp70) przedostaje się do przestrzeni międzybłonowej, gdzie może oddziaływać z cytochromem c i przyczyniać się do produkcji  $H_2O_2$ . Mechanizm zgodnie, z którym białko p66Shc wywiera swój prooksydacyjny efekt w warunkach fizjologicznych zwiększając wewnątrzkomórkowy poziom RFT jest wciąż przedmiotem badań. Translokacja białka p66Shc do mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej w odpowiedzi na stres oksydacyjny rozpoczyna się od aktywacji kinazy białkowej  $C\beta$  (PKC $\beta$ ). Należy podkreślić, że rodzina kinaz białkowych C składa się z 10 pokrewnych kinaz serynowo/treoninowych, z których niektóre z nich są kluczowymi regulatorami proliferacji, przeżywalności i śmierci komórki (REYLAND 2009). Wykazano, że PKC $\beta$  jest aktywowana podczas stresu oksydacyjnego i indukuje fosforylację białka p66shc w unikalnej reszce Ser36 (PINTON I WSP. 2007). Fosforylowane białko p66shc jest następnie rozpoznawane przez izomerazę prolylową (PIN1), która z kolei umożliwia jego izomeryzację cis-trans. Następnie, białko p66Shc jest defosforylowane przez białkową fosfatazę serynowo/treoninową typu 2 (PP2A) (ryc. 8). W takiej formie białko p66Shc przemieszcza się do przestrzeni międzybłonowej, gdzie jest zaangażowane (dzięki obecności unikalnej domeny CH2), w przenoszenie elektronów z cytochromu c na tlen cząsteczkowy, co prowadzi do powstania  $H_2O_2$  (LEBIEDZIŃSKA I WSP. 2009). Zwiększona produkcja  $H_2O_2$  w mitochondriach przyczynia się do wzrostu wewnątrzkomórkowego poziomu  $H_2O_2$ . To z kolei, aktywuje kinazę białkową  $C\beta$  (a tym samym fosforylację p66Shc w reszce Ser36) i ostatecznie prowadzi do aktywacji samoczynnie wyzwalającej się pętli produkcji RFT. GIORGIO I WSP. (2005) dowiedli, że  $H_2O_2$  wytwarzany przez p66Shc w mitochondriach indukuje otwarcie mitochondrialnego megakanalu. Dodatkowo, uwalnianie różnych czynników proapoptotycznych, w tym cytochromu c do cytozolu aktywuje kaskadę apoptotyczną prowadzącą do śmierci komórki (ORSINI I WSP. 2004; GIORGIO I WSP. 2005). Szereg badań wykazał, że komórki pozbawione białka p66Shc są odporne na apoptozę indukowaną różnymi czynnikami, w tym promieniowaniem ultrafioletowym, staurosporyną, jonoforem wapnia czy taksolem (MIGLIACCIO I WSP. 1999; PACINI I WSP. 2004; ORSINI I WSP. 2004). Warto zauważyć, że w warunkach *in vitro*, traktowanie komórek bodźcami proapoptotycznymi, takimi jak UVC lub  $H_2O_2$ , indukuje uwalnianie białka p66Shc, które może następnie swobodnie reagować z cytochromem c (ORSINI I WSP. 2004). Stosunkowo niedawno pojawiła się jeszcze inna teoria tłumacząca wpływ białka p66Shc na mitochondrialną produkcję RFT. Postuluje się, że w odpowiedzi komórki na stres oksydacyjny białko p66Shc nie przemieszcza się do mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej, a jedynie do frakcji błon MAM ściśle

oddziałującej z mitochondriami gdzie bierze udział w produkcji RFT (LEBIEDZIŃSKA I WSP. 2009).



**Ryc. 8 Szlak sygnalizacyjny prooksydacyjnej ścieżki białka p66Shc.** PKCβ – kinaza białkowa Cβ; Ser660-PKCβ – ufosforylowana w reszcie Ser660 kinaza białkowa Cβ; Pin1 – izomeraza prolylowa; PP2A – białkowa fosfataza serynowo/treoninową typu 2; cyt. c – cytochrom c. Opis poszczególnych etapów w tekście.

Dodatkowo wykazano, że insulina aktywuje „właściwości” redoks białka p66Shc, przyczyniając się w ten sposób do produkcji RFT, które z kolei wpływają na sygnalizację insuliny, zmniejszając zużycie tlenu przez mitochondria i promuje tworzenie tkanki tłuszczowej (BERNIAKOVICH I WSP. 2008). Dane te sugerują, że szlak sygnałowy p66Shc może być głównym wyznacznikiem metabolizmu energetycznego ssaków. Wykazano, że zwierzęta pozbawione białka p66Shc miały zaburzoną termoregulację spowodowaną redukcją masy tłuszczowej zarówno białej, jak i brunatnej tkanki tłuszczowej (BERNIAKOVICH I WSP. 2008).

### 1.6.3. Udział białka p66Shc w wybranych stanach chorobowych

Związek białka p66Shc z odpowiedzią komórki na stres oksydacyjny skutkuje również jego zaangażowaniem w stosunkowo szerokie spektrum różnych dysfunkcji. Zaliczyć do nich możemy: choroby układu nerwowego, zaburzenia metaboliczne (niealkoholowe stłuszczenie

wątroby, otyłość, cukrzyca, choroby sercowo-naczyniowe, dysfunkcje śródbłonna naczyniowego itp.) jak również choroby nowotworowe, którym poświęcono osobny rozdział (rozdział 1.7).

➤ p66Shc w chorobach układu nerwowego

Rodzina białek ShcA może odgrywać niezwykle istotną rolę w różnych stadiach rozwoju mózgu, a profile ekspresji ShcA są ściśle regulowane w mózgu. CONTI I WSP. (1997) wykazali, iż wszelkie zaburzenia w ekspresji białka p66Shc na różnych etapach rozwoju mózgu mogą wywoływać choroby neurodegeneracyjne. Pokazano, że białko p66Shc może pełnić rolę w stwardnieniu zanikowym bocznym (ALS, ang. *Amyotrophic lateral sclerosis*), w którym za wczesne objawy choroby uważa się zwiększony stres oksydacyjny, uszkodzenia i dysfunkcje mitochondriów. PESARESI I WSP. (2011) skorelowali mutacje *SOD1* (stwierdzone już na wczesnym etapie choroby) z białkiem p66Shc w komórkach nerwowych. Pozbawienie komórek nerwowych (wykazujących mutację *SOD1*), białka p66Shc poprawia funkcję mitochondriów, spowalnia początek choroby (ALS) jak również poprawia sprawność motoryczną i przedłuża przeżycie u myszy transgeniczných (mysi model doświadczalny ALS) (PESARESI I WSP. 2011). Ponadto, potencjalny wpływ białka p66Shc zauważono również w chorobie Alzheimera. W ludzkich komórkach SH-SY5Y zwiększenie ekspresji genu kodującego białko p66Shc skutkowało zwiększeniem wydzielania amyloidu beta (A $\beta$ 1-42) w odpowiedzi na antybiotyk wywołujący stres oksydacyjny – anizomycynę (WANG I WSP. 2016). Z kolei badania *in vivo* przeprowadzone przez grupę DERUNGS I WSP. (2017) sugerują, że ablacja genetyczna p66Shc w linii myszy transgeniczných (stanowiących myszy model choroby Alzheimera) chroni przed indukowaną przez A $\beta$  dysfunkcją mitochondriów *in vivo*. Poprawa funkcji mitochondriów i obniżony poziom RFT towarzyszy zmniejszeniu deficytów funkcji poznawczych związanych z A $\beta$  obserwowanych w chorobie Alzheimera. MAJ I WSP. (2010) odkryli, że fosforylacja białka p66Shc w reszcie Ser36 może odgrywać potencjalną rolę w wystąpieniu choroby Parkinsona. Zwiększenie fosforylacji w reszcie Ser36 powoduje zmniejszenie poziomu regulatora morfologii mitochondriów (PINK1, ang. *PTEN-induced kinase 1*), co prowadzi do stresu oksydacyjnego i apoptozy fibroblastów.

W jednej ze swoich prac (PRILL I WSP. 2021) również podjęłam próbę określenia potencjalnej korelacji między typem nowotworu mózgu u dzieci, stopniem ich złośliwości a poziomem badanych białek Ras, TrkB oraz trzech izoform rodziny ShcA (p66Shc, p52Shc oraz p46Shc). Przeprowadzone przeze mnie badania pokazały, że spośród badanych białek ShcA jedynie białko p46Shc wykazywało podwyższony poziom w nowotworach z I stopniem złośliwości w porównaniu z pozostałymi (II, III oraz IV) (PRILL I WSP. 2021). W przypadku

białka p66Shc jego poziom wydaje się być podobny we wszystkich typach badanych nowotworów bez względu na ich stopień złośliwości.

➤ *p66Shc w chorobach metabolicznych*

Analiza ekspresji mRNA p66Shc u pacjentów z cukrzycą i osób zdrowych wykazała zdecydowanie wyższą ekspresję p66Shc w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej pacjentów z cukrzycą w porównaniu do osób zdrowych (FADINI I WSP. 2018). Podobnie, wykazano, że stopniowy wzrost ekspresji genu kodującego białko p66Shc sprzyjał rozwojowi cukrzycy i powodował wzrost liczby komórek apoptotycznych (ZHAO I WSP. 2018). XU I WSP. (2016) zaproponowali białko p66Shc, jak i jego ufosforylowaną w reszcie Ser36 formę jako nowe biomarkery wywołanej stresem oksydacyjnym nefropatii cukrzycowej. Stwierdzili oni bezpośrednią korelację między poziomem białka p66Shc oraz ufosforylowanej w reszcie Ser36 formy a stopniem uszkodzenia monocytów krwi obwodowej oraz tkankach z biopsji nerek u pacjentów z nefropatią cukrzycową.

W związku z tym, że białko p66Shc uważa się za jednego z regulatorów zwiększonej produkcji RFT czy indukcji apoptozy, podejrzewa się, że białko to może odgrywać także istotną rolę w rozwoju niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby (NAFLD, ang. *Non-alcoholic fatty liver disease*). W ludzkich i mysich modelach niealkoholowego stłuszczeniowego zapalenia wątroby (NASH), będącego jednym ze spektrum NAFLD, zwiększona ekspresja genu kodującego białko p66Shc i akumulacja RFT była bezpośrednio związana z progresją tej choroby (TOMITA I WSP. 2012).

Wielu badaczy wskazuje również na związek chorób sercowo – naczyniowych (indukowanych zaburzeniami stanu równowagi pomiędzy ilością powstających RFT a zdolnością ich usuwania) z białkiem adaptorowym p66Shc (LEE I WSP. 2012; KUMAR 2019). Potwierdzeniem takiego związku może być fakt, że myszy charakteryzujące się brakiem białka p66Shc wykazywały zmniejszone upośledzenie czynności serca, naczyń i nerek (VIKRAM I WSP. 2014). Należy również zwrócić uwagę, że regulowana przez p66shc produkcja RFT jest uważana za jeden z głównych czynników stymulujących wzrost tkanki tłuszczowej i gromadzenia tłuszczu w organizmie. Myszy pozbawione białka p66Shc charakteryzowały się znacznie mniejszą otyłością wywołaną dietą, akumulacją tłuszczu i wzrostem podstawowego metabolizmu jak również wrażliwością na insulinę (BERNIAKOVICH I WSP. 2008).



## 1.7. Rola białka p66Shc w nowotworach

Białko p66Shc jest zaangażowane również w rozwój, progresję oraz proces metastazy komórek nowotworowych. W zależności od intensywności powstawania uszkodzeń i wydajności systemu naprawczego mutacje, które kumulują się w komórkach, mogą wywołać ich śmierć (apoptozę) lub prowadzić do rozwoju nowotworu. Białko p66Shc odgrywa ważną rolę w eliminacji uszkodzonych komórek poprzez inicjację apoptozy indukowanej przez RFT. Jak już opisano, białko p66Shc może również odgrywać kluczową rolę w proliferacji komórek. Brak równowagi pomiędzy procesami proliferacji, a apoptozy może przyczynić się do rozwoju różnych chorób, m.in. chorób autoimmunologicznych czy też nowotworów (EVAN & VOUSDEN 2001). Wydaje się, że oprócz klasycznej roli białka p66Shc, przypisywany jest mu także udział w rozwoju i progresji nowotworów jak również w metastazie. Potwierdzeniem tego mogą być chociażby dane podsumowane w pracy przeglądowej LEBIEDZIŃSKA – ARCISZEWSKA I WSP. (2015).

Przykładem cząsteczek sygnałowych, które mają związek z białkiem p66Shc oprócz RFT, są także hormony steroidowe, którym coraz częściej przypisuje się rolę w regulacji procesów proliferacji (ALAM I WSP. 2009), jak i progresji komórek nowotworowych (ALFEREZ I WSP. 2018). Badania przeprowadzone przez HENDERSON & FEIGELSON (2000) wyraźnie wskazują, że zaburzenia w poziomach hormonów steroidowych są ważnym czynnikiem, który może przyczynić się do rozwoju określonych typów nowotworów. Mogą nimi być: nowotwory prostaty i jąder (androgeny, estrogeny), nowotwory sutka (estrogen, progesteron), nowotwory jajnika (hormon folikulotropowy, estrogen, androgen), nowotwory szyjki macicy (estrogen) jak również nowotwory tarczycy (hormon tyreotropowy, estrogen) (HENDERSON & FEIGELSON 2000). Z kolei badania grupy badawczej LEE I WSP. (2004) wskazują, że hormony płciowe mogą regulować ekspresję genu kodującego białko p66Shc. Ponadto, badania przeprowadzone przez inne grupy badawcze wskazują na pozytywną korelację między poziomem białka p66Shc, a szybkością proliferacji komórek steroidozależnych typów nowotworów: sutka (JACKSON I WSP. 2000; FRACKELTON I WSP. 2006), jajnika (MUNIYAN I WSP. 2014), prostaty (RAJENDRAN I WSP. 2010) oraz tarczycy (PARK I WSP. 2005). Warty podkreślenia jest to, że hormony steroidowe nie mają wpływu na inne białka z rodziny ShcA, p52Shc i p46Shc (JACKSON I WSP. 2000; VEERAMANI I WSP. 2005). VEERAMANI I WSP. (2008) w swej pracy podkreślają równoległą produkcję RFT w „stymulowanej przez p66Shc” proliferacji komórek nowotworowych. Poziom p66Shc jest istotnie wyższy w typach nowotworów zależnych od steroidów (RAJENDRAN I WSP. 2010). Dodatkowo, podwyższony

poziom białka p66Shc był skorelowany z wyższym poziomem receptora androgenowego (LEE I WSP. 2004). Niezwykle interesującym wydaje się fakt, że zmniejszona fosforylacja białka p66Shc w reszcie Ser36 koreluje z proliferacją stymulowaną przez androgeny w komórkach nowotworu prostaty (RAJENDRAN I WSP. 2010). Podwyższony poziom białka p66Shc w regulowanych przez androgeny komórkach raka prostaty odgrywa kluczową rolę w zwiększaniu tempa ich proliferacji. Tym samym przyczynia się do zwiększenia stopnia złośliwości tych komórek rakowych (RAJENDRAN I WSP. 2010). W przypadku nowotworów sutka wyższy poziom białka p66Shc korelował z większymi zdolnościami metastatycznymi nowotworów (JACKSON I WSP. 2000; VEERAMANI I WSP. 2008).

### **1.7.1. Białko p66Shc w nowotworach sutka**

Funkcję białka p66Shc w nowotworze sutka badano zarówno na modelach komórkowych jak i modelach *in vivo*. W liniach komórkowych MDA-MB-231 oraz MCF-7 zaobserwowano wzrost ekspresji p66Shc, który związany był ze wzrostem potencjału metastatycznego, jak również zwiększoną proliferacją komórek (URSINI-SIEGEL & MULLER 2008). Wykazano, że w odpowiedzi na stymulację czynnikami wzrostowymi (np. EGF), białko p66Shc wraz z Grb2 promują wzrost komórek nowotworowych raka sutka, jak również ich migrację. Dzieje się tak w wyniku interakcji p66Shc oraz Grb2 z małymi białkami wiążącymi nukleotydy guaninowe – ARF1 oraz ARF6 (czynnik rybozylacji ADP1) (HAINES I WSP. 2014). Te ostatnie są białkami, które działają jako kluczowe regulatory wzrostu komórek nowotworowych, których poziom jest istotnie podniesiony w większości wysoce „inwazyjnych” liniach komórkowych raka sutka. W przypadku linii komórkowej MCF-7 stwierdzono zarówno podwyższony poziom białka p66Shc jak i zwiększone tempo wzrostu komórek tej linii traktowanych estrogenami (LEE I WSP. 2004). LEWIS I WSP. (2020) wysunęli hipotezę, że białko p66Shc wspólnie z innymi genami kodującymi białka „sprzyjające” przerzutom wspiera kluczowe etapy kaskady metastazy komórek raka sutka. HUANG I WSP. (2019) wskazali na istnienie możliwych zależności pomiędzy białkiem p66Shc, a czynnikiem transkrypcyjnym STAT3 (przebieżnik sygnału i aktywator transkrypcji, ang. *Signal transducer and activator of transcription*). Mianowicie, w komórkach raka wątrobowokomórkowego pozbawionych białka p66Shc fosforylacja STAT3 w reszcie Ser727 była obniżona. Poziom białka p66Shc zmierzono również w próbkach pobranych od pacjentów. Stwierdzono podwyższony poziom p66Shc w próbkach pacjentów, u których potwierdzono przerzuty do węzłów chłonnych (JACKSON I WSP. 2000). Niezwykle ważna obserwacja została poczyniona

przez HUDSON I WSP. (2014). Pokazali oni, że białko p66Shc może brać udział w kluczowym procesie zwiększającym złośliwość raka sutka – tak zwanym przejściu epitelialno-mezenchymalnym (EMT, ang. *Epithelial-mesenchymal transition*), w wyniku którego komórka nabywa zdolność do migracji i inwazyjności. Podwyższony poziom p66Shc w pierwotnych nowotworach sutka (głównie guzy typu luminalnego) związany jest właśnie z przejściem epitelialno-mezenchymalnym w tych guzach (HUDSON I WSP. 2014). W świetle przedstawionych powyżej informacji, białko p66Shc identyfikuje się coraz częściej jako jeden z pierwszych prognostycznych biomarkerów do identyfikacji bardziej agresywnych guzów o właściwościach mezenchymalnych, niezależnie od podtypu molekularnego (DAVOL I WSP. 2003; HUDSON I WSP. 2014).

### **1.7.2. Białko p66Shc w nowotworach prostaty**

Dane przedstawione przez RAJENDRAN I WSP. (2010) wskazują, że poziom białka p66Shc jest korelowany również z tempem wzrostu komórek nowotworu prostaty. Potwierdzono zdecydowanie wyższy poziom tego białka w gruczolakorakach prostaty, aniżeli w sąsiadujących niezmiennych komórkach gruczołowych (DAVOL I WSP. 2003; LEE I WSP. 2004). Poziomy białka p66Shc były 4 -10-cio – krotnie wyższe w komórkach nowotworowych charakteryzujących się szybkim tempem wzrostu (linie komórkowe PC-3 oraz DU145), w porównaniu z wolno rosnącymi komórkami nowotworów prostaty (linia komórkowa LNCaP C-33) (VEERAMANI I WSP. 2008). Niemniej jednak, w tych ostatnich zarówno poziom p66Shc jak i tempo wzrostu komórek zwiększa się po ich traktowaniu androgenami lub EGF (LEE I WSP. 2004). Wydaje się więc, że podwyższony poziom białka p66Shc może odgrywać kluczową rolę w regulacji (zwiększeniu) proliferacji komórek raka prostaty, kontrolowanej przez androgeny i przyczynia się do zwiększenia stopnia złośliwości tych komórek. Ponadto komórki LNCaP C-81 i PC-3, które cechuje wysoki poziom p66Shc, wykazują odpowiednio wyższy potencjał przerzutowy niż komórki LNCaP C-33 (VEERAMANI I WSP. 2008). W stymulowanych androgenami komórkach nowotworu prostaty podwyższona ekspresja p66Shc koreluje także z podwyższonym poziomem RFT i zwiększoną proliferacją tych komórek. Z drugiej strony, traktowanie przeciwutleniaczami (np. selenem czy witaminą E) bądź pozbawienie komórek białka p66Shc spowodowało obniżenie tempa proliferacji komórek nowotworu prostaty. Sugeruje się że androgeny podwyższają poziom p66Shc, co prowadzi do wzrostu poziomu/produkcji RFT oraz potencjału przerzutowego komórek nowotworu prostaty (RAJENDRAN I WSP. 2010; VEERAMANI I WSP. 2012). Ostatnie badania wskazują również, że

produkcja RFT związana z białkiem p66Shc oraz aktywacja Rac1 wpływa zarówno na przeżywalność jak i tempo proliferacji komórek nowotworu prostaty najprawdopodobniej poprzez inaktywację specyficzną dla prostaty fosfatazy cPacP (ang. *Cellular prostatic acid phosphatase*) (MILLER I WSP. 2019).

### **1.7.3. Białko p66Shc w nowotworach jajnika**

Podobnie jak w przypadku nowotworów prostaty, również komórki nowotworu jajnika wykazują wyższy poziom białka p66Shc, aniżeli sąsiadujące z nimi komórki nienowotworowe (MUNIYAN I WSP. 2015). Komórki nowotworu jajnika, pod wpływem leczenia hormonami steroidowymi, charakteryzowały się wyższym tempem proliferacji oraz podniesionym poziomem białka p66Shc. KUMAR I WSP. (2011) zasugerowali, że podwyższony poziom białka p66Shc w odpowiedzi na działanie hormonów steroidowych był związany ze zmniejszoną jego ubikwitynacją. XIE & HUNG (1996) wykazali istnienie dodatniej korelacji pomiędzy poziomem białka p66Shc, a ErB-2 – markerem prognostycznym nowotworu jajnika. MUNIYAN I WSP. (2015) wykazali, że najwolniej rosnąca linia komórkowa nowotworu jajnika OVCAR-3 charakteryzuje się jednocześnie najniższym poziomem p66Shc (w porównaniu np. do szybko rosnącej linii SKOV-3). Z kolei podniesienie poziomu p66Shc (za pomocą przejściowej transfekcji wektorem cDNA p66Shc) w linii komórkowej OVCAR-3 skutkowało wzrostem tempa proliferacji tych komórek.

### **1.7.4. Białko p66Shc w nowotworach płuc**

Jednym z kluczowych czynników transkrypcyjnych odgrywających istotną rolę w wielu różnych komórkach układu odpornościowego, a obecnym także w nowotworach płuc jest czynnik transkrypcyjny Aiolos. Zaliczany jest on do rodziny białek wiążących DNA mogących wywierać istotne zmiany we wzorcach ekspresji genów, głównie poprzez rekrutację enzymów modyfikujących chromatynę. LI I WSP. (2014) dowiedli, że czynnik Aiolos, który w przypadku pacjentów z nowotworem płuc skorelowany jest ze zmniejszoną ich przeżywalnością, wykazuje dodatkowo odwrotną korelację z ekspresją genu kodującego białko p66Shc. Całkowicie odwrotnie niż miało to miejsce w przypadku wcześniej opisanych rodzajów nowotworów (np. prostaty, jajnika czy raka sutka), gdzie poziom białka p66Shc korelował ze stopniem złośliwości nowotworów. Wskazywać to może, że białka z rodziny ShcA mogą pełnić swe charakterystyczne funkcje w zależności od typu komórek

nowotworowych. Wyciszenie ekspresji genu kodującego białko p66Shc związane może być z nieprawidłową ekspresją czynnika transkrypcyjnego Aiolos. Wiąże się on z wieloma miejscami zlokalizowanymi w genie kodującym *SHCI*, powodując przebudowę chromatyny w konsekwencji prowadząc do wyciszenia genu p66Shc. Ekspresja czynnika transkrypcyjnego Aiolos w komórkach nabłonkowych linii A549 powoduje zmiany w genach związanych z różnicowaniem się komórek nabłonka. Prowadzi to w konsekwencji do tego, że komórki nowotworu płuc wykazujące ekspresję Aiolos uzyskują właściwości takie jak: utrata możliwości „zakotwiczenia”, znaczny wzrost możliwości do tworzenia przerzutów czy polaryzacja komórki (LI I WSP. 2014). Autorzy ci opisują mechanizm, dzięki któremu nowotwory nabłonkowe nabywają pewnych cech hematopoetycznych w celu uzyskania zdolności do przerzutów (w wyniku nieprawidłowej ekspresji kluczowego modyfikatora epigenetycznego wymaganego do rozwoju i funkcjonowania limfocytów). Tak więc, w przypadku nowotworów płuc, odwrotnie jak w przypadku wyżej opisanych rodzajów nowotworów, białko p66Shc wywołuje efekt antymetastatyczny. W stosunkowo dużej grupie komórek nabłonka płuc i linii komórkowych, poziom jak również ekspresja genu kodującego białko p66Shc sukcesywnie zmniejsza się, zaczynając od prawidłowego nabłonka oskrzeli przez nie drobnokomórkowy po drobnokomórkowy nowotwór płuc, co związane jest ze wzrostem potencjału przerzutowego (LI I WSP. 2014). W ludzkich, pierwotnych guzach nowotworów płuc niski poziom białka p66Shc wiąże się odpowiednio z gorszymi prognozami przeżycia pacjenta.

#### **1.7.5. Białko p66Shc w nowotworach układu pokarmowego**

W tkankach nowotworu okrężnicy komórki nowotworowe cechuje wyższy poziom białka p66Shc w porównaniu z sąsiadującymi komórkami nienowotworowymi (GROSSMAN I WSP. 2007). Ponadto, potwierdzono, że komórki linii nowotworu okrężnicy RKO pozbawione białka p66Shc wykazywały większą odporność na stres oksydacyjny indukowany ekspozycją na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bądź spowodowany brakiem surowicy. Jednocześnie w komórkach tych zaobserwowano zmniejszoną fragmentację mitochondriów oraz niższy poziom mitochondrialnych RFT, co potwierdziłoby rolę białka p66Shc w produkcji RFT (GALIMOV I WSP. 2012). Podobnie jest w przypadku nowotworów płaskonabłonkowego przełyku (ESCC) oraz gruczolakoraka przełyku (EAC) gdzie wyższy poziom białka p66Shc obserwowano w komórkach nowotworowych (BASHIR I WSP. 2010; RANIERI I WSP. 2010). Również w

przypadku nowotworów jelita grubego oraz żołądka, poziom p66Shc jest wyższy niż w przypadku ich nienowotworowych odpowiedników (GALIMOV I WSP. 2012; LIU I WSP. 2014).

#### **1.7.6. Białko p66Shc i inne nowotwory**

Swoiste mechanizmy regulacyjne, które kontrolują ekspresję genu kodującego białko p66Shc w czerniakach złośliwych zostały zbadane przez grupę badawczą KASUNO I WSP. (2007). Autorzy zidentyfikowali białko o aktywności hamującej czerniaka (MIA, ang. *Melanoma inhibitory activity*), jako nowego partnera wiążącego białko p66Shc i jednocześnie antagonistę jego fosforylacji w reszcie Ser36. Autorzy sugerują, iż białko MIA bierze udział w progresji i tworzeniu przerzutów komórek czerniaka, oraz że hamuje fosforylację p66Shc w reszcie Ser36 poprzez wiązanie się z domeną CH2 białka p66Shc.

Przewlekła białaczka limfocytarna (CLL), charakteryzująca się postępującą akumulacją monoklonalnych limfocytów B we krwi obwodowej, szpiku kostnym i obwodowych narządach limfatycznych, wydaje się być dobrym przykładem braku właściwej sygnalizacji apoptotycznej indukowanej przez RFT (CAPITANI I WSP. 2010). Co ciekawe, niższy poziom p66Shc obserwowany w komórkach B CLL nie jest wynikiem metylacji promotora białka p66Shc a np. defektem genu kodującego białko p66Shc (CAPITANI I WSP. 2010).

W tabeli 2 znajduje się krótkie podsumowanie najważniejszych informacji dotyczących wpływu jaki wywierają białka z rodziny ShcA w różnych typach nowotworów.

**Tabela 2.** Białka rodziny ShcA w różnych typach nowotworów (na podstawie LEBIEDZIŃSKA-ARCISZEWSKA I WSP. 2015)

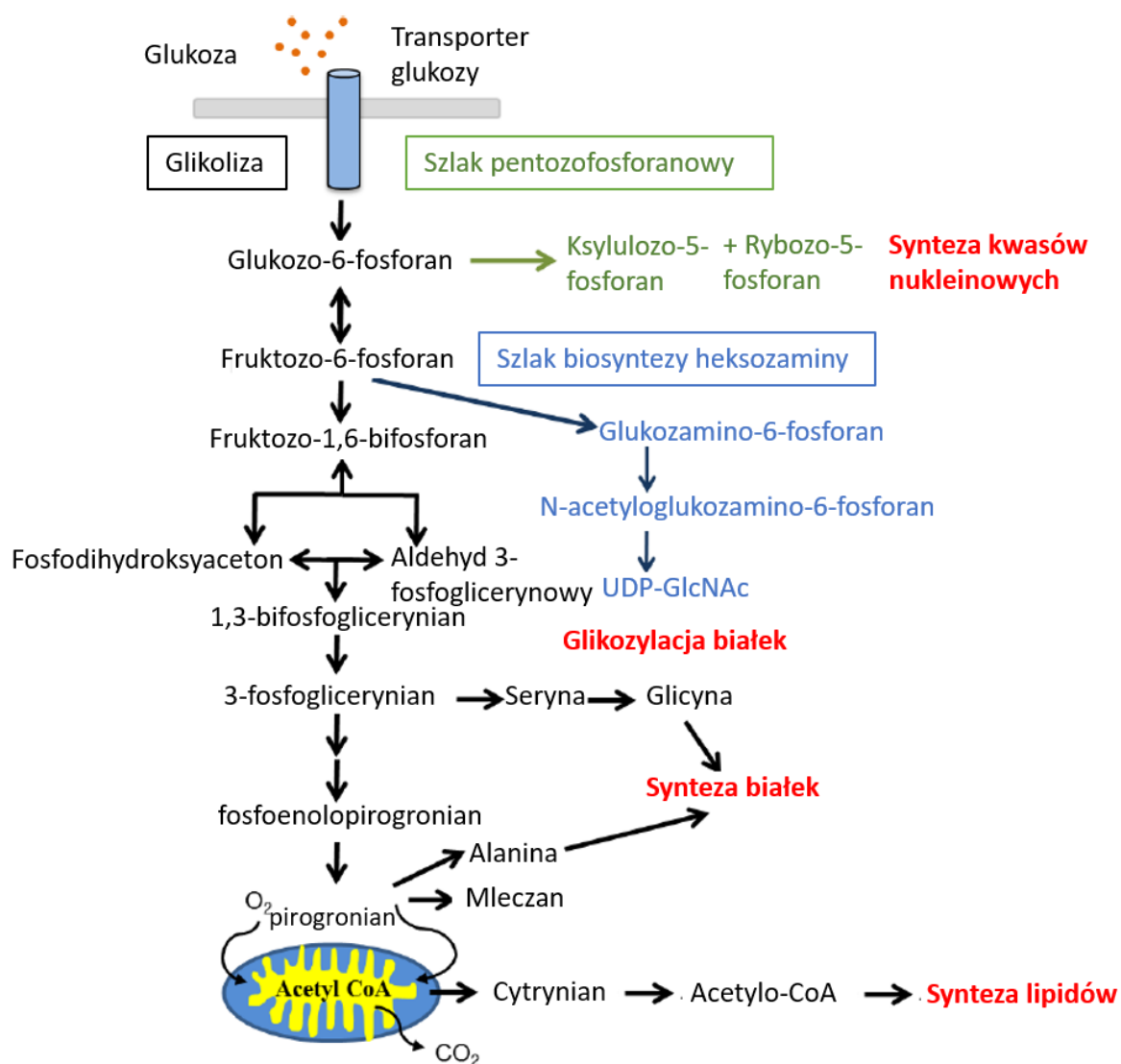
Typ nowotworu	RFT	Poziom p66Shc		Literatura
		Fosforylacja w Tyr	Fosforylacja w Ser36	
Nowotwór płuc	Brak danych	Obniżona ekspresja genu kodującego białko p66Shc w liniach komórek nowotworowych płuc (H1155, H82, Fx293, H1466, H1975)		DU I WSP. 2013 RAJENDRANI WSP. 2010
		Brak danych	Terapia taxolem indukuje fosforylację białka p66Shc w reszcie Ser36	
Nowotwór jelita	Podwyższony poziom endogennych RFT; obniżony poziom RFT w przypadku niskiego poziomu p66Shc	Nadekspresja białka p66Shc		GALIMOV I WSP. 2012 SZATROWSKI & NATHAN 1991
		Brak danych	Brak danych	
Czerniak	Obniżony poziom H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	MIA jako nowy partner wiążący białko p66Shc		KASUNO I WSP. 2007
		Brak danych	Białko MIA produkowane przez komórki melanomy hamuje fosforylację w Ser36co jednocześnie obniża poziom H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
Nowotwór sutka	Podwyższony poziom H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Podwyższona ekspresja białka p66Shc w metastatycznym typie nowotworu sutka		YUAN I WSP. 2013 SZATROWSKI & NATHAN 1991
		Linia nowotworowa MDA-MB-231 wykazuje silną fosforylację białek p46Shc oraz p52Shc	Brak danych	
Nowotwór jajnika	Podwyższony poziom H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> w komórkach nowotworu jajnika traktowanych estrogenami	Podwyższony poziom białka p66Shc w komórkach nowotworowych w porównaniu z komórkami nienowotworowymi		MUNIYAN I WSP. 2015 SZATROWSKI & NATHAN 1991
		Brak danych	Brak danych	
Nowotwór prostaty	Hormony steroidowe zwiększają poziom RFT	Podwyższony poziom białka p66Shc koreluje z tempem wzrostu komórek nowotworu prostaty		VEERAMANI I WSP. 2005 VEERAMANI I WSP. 2008 RAJENDRANI WSP. 2010
		Nie wykryto fosforylacji białka p66Shc w tyrozynach na różnych pasażach komórek LNCaP; Podwyższona	Proliferacja komórek nowotworu prostaty traktowanych androgenami koreluje z obniżoną fosforylacją	

		fosforylacja białka p52Shc w reszcie Y317	Ser36	LEE I WSP. 2004 VEERAMANI I WSP. 2012 SZATROWSKI & NATHAN 1991
<b>Nowotwór tarczycy</b>	Podwyższony poziom H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hormon tyreotropowy (TSH) powoduje podwyższenie ekspresji białka p66Shc zarówno w badaniach in vivo jak i in vitro		SZATROWSKI & NATHAN 1991
		Traktowanie TSH znacznie nasiliło fosforylację białka p66Shc w tyrozynach indukowaną przez IGF-I	Traktowanie TSH powoduje indukowaną insuliną fosforylację białka p66Shc w Ser36	PARK I WSP. 2005



## 1.8. Rola białka p66Shc w metabolizmie komórek nowotworowych

W przypadku komórek proliferujących, a zwłaszcza szybko dzielących się (jakimi są komórki nowotworowe) zapotrzebowanie „energetyczne” jest bardzo duże i związane przede wszystkim z podziałami komórek i utrzymaniem komórkowej homeostazy redoks. Badania przeprowadzone przez SOLIMAN I WSP. (2014), wskazują na istotną rolę białka p66Shc w przemianach metabolicznych mających miejsce w komórkach nowotworowych. Badania tej grupy sugerują, że białko p66Shc pośredniczy (na drodze sprzężenia zwrotnego) w hamowaniu nie tylko odpowiedzi na czynniki wzrostu, ale również metabolizmu glukozy w komórkach. Wyciszenie genu kodującego białko p66Shc w komórkach nowotworowych zwiększa wychwyty (pobieranie) glukozy oraz produkcję mleczanu. Ponadto, zwiększa również dostępność metabolitów i aminokwasów w biosyntezie kwasów tłuszczowych, szlaku heksozaminy, szlaku pentozofosforanowego przyczyniających się do powiększenia rozmiaru komórki (SOLIMAN I WSP. 2014). Obserwowane przez autorów przesunięcie metaboliczne zależy częściowo od szlaku związanego z ssaczym celem rapamycyny (mTOR, ang. *Mammalian target of rapamycin kinase*) oraz kinazy S6 (S6K) – głównego efektoru mTOR (UM I WSP. 2006; SOLIMAN I WSP. 2014). Przesunięcie metaboliczne w kierunku metabolizmu bardziej glikolitycznego, który często obserwuje się w komórkach o wysokiej proliferacji, zmniejsza produkcję RFT w mitochondriach. Obserwacja ta potwierdza fakt, że białko p66Shc działa jako inhibitor szlaku kinazy mTOR, hamując zależny od mTOR metabolizm anaboliczny (PANI 2010; SOLIMAN I WSP. 2014) (ryc. 9).



**Ryc. 9 Metabolizm komórek nowotworowych: efekt Warburga (na podstawie SOLIMAN 2014).** Szybko proliferujące komórki potrzebują energii niezbędnej do przeprowadzenia podziału komórki, zwiększenie biomasy komórkowej oraz utrzymania homeostazy redoks. Przeprogramowanie metabolizmu komórkowego w kierunku glikolizy dostarcza intermediatów niezbędnych do syntezy nukleotydów, białek i lipidów. Alternatywne wykorzystanie pirogronianu do produkcji mleczanu umożliwia proliferującym komórkom przekierowanie glikolitycznych produktów pośrednich do szlaków anabolicznych, takich jak: szlak pentozofosforanowy, szlak biosyntezy heksozaminy czy biosyntezy lipidów i białek.

Ponadto sugeruje się, że białko p66Shc przyczynia się do aktywacji mTOR/S6K w odpowiedzi na dostępność glukozy, aminokwasów i insuliny, co wskazuje, że p66Shc może być niejako czujnikiem „nadmiaru” składników odżywczych. W rzeczywistości p66Shc może działać jako łącznik między RFT i mTOR. Podniesienie poziomu białka p66Shc, jak również jego zwiększona fosforylacja w reszcie Ser36 aktywuje kinazę S6 (S6K) (PANI 2010). Wydaje się więc, że białko p66Shc może wpływać na bilans energetyczny w zależności od konkretnego kontekstu bioenergetycznego, w celu utrzymania prawidłowego poziomu ATP.

Dla przykładu, w ludzkich komórkach gruczolaka płuca A549 niedobór składników odżywczych indukuje ekspresję p66Shc, podczas gdy obniżenie poziomu p66Shc zmniejsza autofagię indukowaną niską zawartością składników odżywczych (ZHENG I WSP. 2013). Ogólnie rzecz biorąc, białko p66Shc hamuje metabolizm anaboliczny i wpływa na przeprogramowanie metabolizmu komórkowego w kierunku katabolizmu glukozy i oddychania oksydacyjnego w guzach nowotworowych (SOLIMAN I WSP. 2014). W komórkach charakteryzujących się wysokim tempem proliferacji, zwiększony stres oksydacyjny może przyczynić się do podwyższenia poziomu białka p66Shc (RAJENDRAN I WSP. 2010). Komórki nowotworowe wykazują najczęściej zmienione poziomy białek p53 oraz p66Shc. Są one białkami powiązаныmi nie tylko z procesem proliferacji komórek, lecz także wysokim potencjałem przerzutowym i gorszym rokowaniem dla pacjenta (VEERAMANI I WSP. 2008; PANI & GALEOTTI 2011). Dlatego też, podobnie jak w przypadku innych szlaków przekazywania sygnału zależnych od stanu redoks, białko p66Shc może odgrywać kluczową rolę w koordynowaniu procesu autofagii i apoptozy w zależności od stanu bioenergetycznego komórki. Należy zaznaczyć, że komórki nowotworowe, jak również komórki pluripotenne (macierzyste) często mają mitochondria o wysokim potencjale na wewnętrznej błonie mitochondrialnej, co może wynikać ze zmniejszonej produkcji ATP w mitochondriach w warunkach prawidłowego poziomu tlenu (normoksji). W wyniku tego w komórkach nowotworowych obniża się podatność na inicjację apoptozy poprzez niedopuszczenie do uprzepuszczenia wewnętrznej błony mitochondrialnej (ERTEL I WSP. 2006). Jednocześnie, białko p66Shc może pełnić potencjalną rolę w karcynogenezie i samoodnowie komórek macierzystych (SANSONE I WSP. 2007; BELTRAMI I WSP. 2013).

## 2. CEL PRACY

Celem niniejszej pracy było bliższe poznanie wpływu białka p66Shc na bioenergetykę mitochondriów, jak również na związaną z nią odpowiedź komórek raka sutka (w odpowiedzi na stres oksydacyjny) na traktowanie chemioterapeutykami – dokсорubicyną. Powyższy cel badawczy udało się zrealizować dzięki modyfikacjom genetycznym skutkującym zmianą poziomu białka p66Shc oraz zmianą statusu fosforylacji w reszcie Ser36 białka p66Shc – związanej z odpowiedzią komórki na stres oksydacyjny. W ramach realizacji głównego celu niniejszej pracy, wyszczególniono następujące zadania badawcze:

- Badania porównawcze ludzkich linii raka sutka i odpowiadającej im linii komórek kontrolnych w kontekście ścieżki sygnalizacyjnej białka p66Shc, mitochondrialnych parametrów bioenergetycznych jak również poziomu RFT oraz statusu ochrony antyoksydacyjnej.
- Zbadanie wpływu modyfikacji genetycznych skutkujących zmianą poziomu białka p66Shc jak również efektu mutacji w reszcie Ser36 na tempo proliferacji, ścieżkę sygnalizacyjną p66Shc, mitochondrialne parametry bioenergetyczne, poziom RFT jak również status ochrony antyoksydacyjnej oraz status oksydacyjnych uszkodzeń białek.
- Ocena wpływu zmiany poziomu białka p66Shc jak również mutacji w kluczowej reszcie seryny 36 na wrażliwość komórek raka sutka na traktowanie chemioterapeutykami – dokсорubicyną.
- Określenie potencjalnej korelacji między typem guzów nowotworowych mózgu u pacjentów pediatrycznych, stopniem złośliwości nowotworu a poziomem białek ShcA, Ras oraz TrkB.

### 3. MATERIAŁ I METODY

#### 3.1. Materiał biologiczny

Materiał biologiczny wykorzystany do realizacji postawionych celów badawczych niniejszej pracy stanowią ludzkie linie raka sutka (MDA-MB-231, MCF-7), odpowiadająca im linia kontrolna (MCF-10A), jak również wspomniane ludzkie linie raka sutka nazywane dalej „klonami”, w których dokonano edycji genomu, skutkującej zmianą poziomu białka p66Shc. Dobór ludzkich linii raka sutka oparto przede wszystkim na różnicy w poziomie białka p66Shc, co było niezwykle istotne w kontekście realizowanych zadań badawczych. W pracy zastosowano niejako dwa odrębne podejścia wykorzystania wspomnianych wyżej linii komórkowych:

- 1) wykorzystanie komercyjnie dostępnych ludzkich linii raka sutka (MDA-MB-231 oraz MCF-7) jak również odpowiadającej im linii kontrolnej MCF-10A, którą stanowi linia komórek epitelialnych gruczołu sutkowego – spontanicznie unieśmiertelniona. Charakterystyka powyższych linii komórkowych znajduje się w tabeli 3 poniżej.

**Tabela 3** Charakterystyka zastosowanych ludzkich linii komórkowych

Linia komórkowa	Opis	Zastosowanie	Firma/ nr katalogowy
<b>MCF-10A</b>	linia komórek epitelialnych gruczołu sutkowego - spontanicznie unieśmiertelniona	Linia kontrolna	ATCC, CRL-10317
<b>MDA-MB-231</b>	Linia raka sutka - (estrogenoniezależny gruczolakorak po raz pierwszy wyprowadzony w 1973 roku z komórek metastazy (wysięku opłucnowego) nabłonkowego gruczolakoraka gruczołu sutkowego 51-letniej kobiety rasy kaukaskiej; Linia komórkowa potrójnie receptorowo ujemnego raka sutka wykazująca brak receptora estrogeny (ER), progesteronu (PR) oraz czynnika wzrostu (HER) co czyni ją idealnym modelem dla chemioterapii.	Linia nowotworowa ze względnie wysokim poziomem białka p66Shc	ATCC, HTB-26
<b>MCF-7</b>	Linia raka sutka - estrogenozależny gruczolakorak wyprowadzony po raz pierwszy		

	w 1970 roku z komórek metastazy (wysięku opłucnowego) nabłonkowego gruczolakoraka gruczołu sutkowego 69-letniej kobiety rasy kaukaskiej; Linia komórkowa podwójnie receptorowo ujemnego raka sutka wykazująca brak receptora PR i HER oraz obecność receptora ER co czyni ją idealnym modelem dla hormonoterapii.	Linia nowotworowa ze względnie niskim poziomem białka p66Shc	ATCC, HTB-22
--	---	--	--------------

2) wykorzystanie ludzkich linii raka sutka MDA-MB-231 oraz MCF-7, w których dokonano edycji genomu skutkującej zmianą poziomu białka p66Shc. Opis i charakterystyka powyższych linii znajduje się w tabeli poniżej (tabela 4). Głównym założeniem przeprowadzonych zmian w genomie było uzyskanie względnie silniejszego efektu podwyższenia poziomu białka p66Shc (nadekspresja) w linii ze względnie niższym (wyjściowym) poziomem białka p66Shc (MCF-7) i odwrotnie – wyciszenie ekspresji genu kodującego białko p66Shc w linii ze względnie wyższym (wyjściowym) poziomem p66Shc (MDA-MB-231).

**Tabela 4** Opis i charakterystyka uzyskanych klonów linii MDA-MB-231 oraz MCF-7

Linia nowotworowa	Typ modyfikacji	Opis	Oznaczenie na figurach
MDA-MB-231	Wprowadzenie pustego wektora	Linia nowotworowa, kontrolna w stosunku do pozostałych linii z modyfikacjami genetycznymi	<b>K</b>
	Podwyższenie poziomu białka p66Shc	Linia nowotworowa z podwyższonym poziomem białka p66Shc uzyskana z zastosowaniem odpowiedniego plazmidu	↑ <b>p66Shc</b>
	Podwyższenie poziomu zmutowanej w reszcie Ser36 formy białka p66Shc	Linia nowotworowa z podwyższonym poziomem zmutowanej w reszcie Ser36 formy białka p66Shc uzyskana z zastosowaniem odpowiedniego plazmidu	↑ <b>mut-Ser36-p66Shc</b>
	wyciszenie ekspresji genu kodującego białko p66Shc	Linia nowotworowa z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc uzyskana techniką CRISPR-Cas9	<b>p66Shc KO</b>
	Wprowadzenie pustego wektora	Linia nowotworowa, kontrolna w stosunku do pozostałych linii z modyfikacjami genetycznymi	<b>K</b>

<b>MCF-7</b>	Nadekspresja białka p66Shc	Linia nowotworowa z podwyższonym poziomem białka p66Shc uzyskana z zastosowaniem odpowiedniego plazmidu	↑ <b>p66Shc</b>
	Nadekspresja zmutowanej w reszcie Ser36 formy białka p66Shc	Linia nowotworowa z podwyższonym poziomem zmutowanej w reszcie Ser36 formy białka p66Shc uzyskana z zastosowaniem odpowiedniego plazmidu	↑ <b>mut-Ser36-p66Shc</b>
	wyciszenie genu kodującego białko p66Shc	Linia nowotworowa z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc uzyskana techniką CRISPR-Cas9	<b>p66Shc KO</b>

Opis technik, za pomocą których uzyskane zostały modyfikacje genetyczne poszczególnych linii nowotworowych znajdują się w rozdziale 3.3.

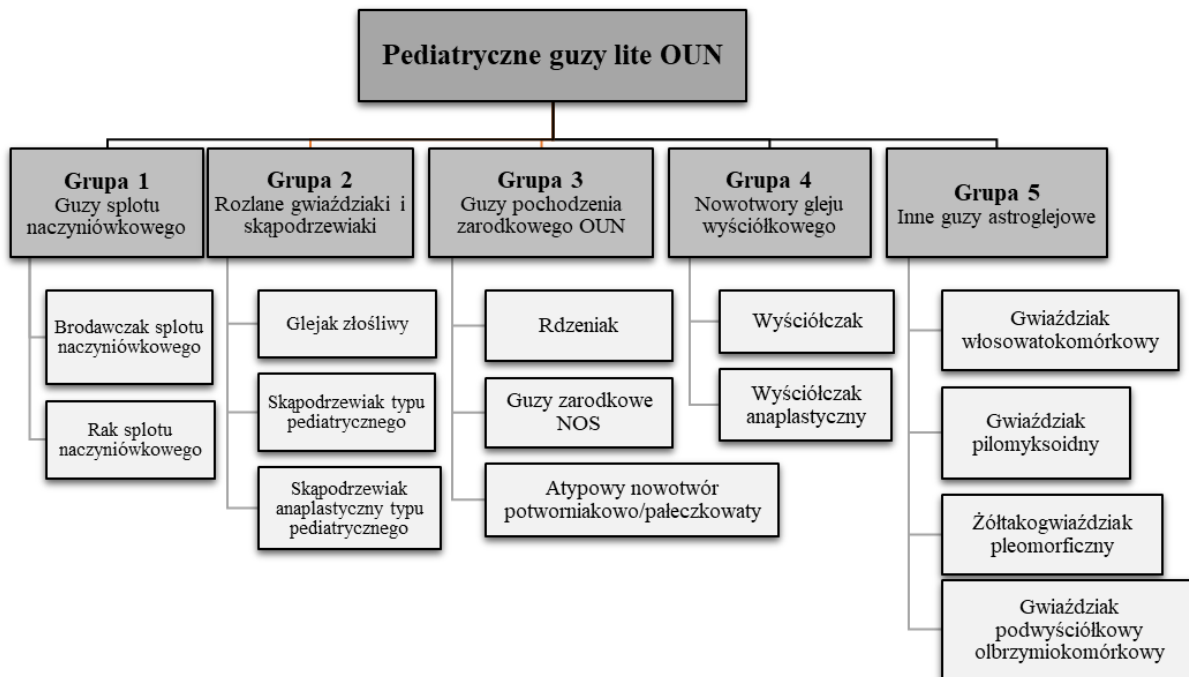
#### Próbki guzów nowotworowych mózgu pacjentów pediatrycznych

W celu realizacji ostatniego z postawionych celów badawczych jako materiał wykorzystano próbki guzów nowotworowych mózgow badanych w ramach współpracy z Instytutem „Pomnikiem – Centrum Zdrowia Dziecka” (IPCZD). Próbki guzów nowotworowych mózgu pobierano podczas biopsji wykonywanej w celach diagnostycznych u pacjentów pediatrycznych z podejrzeniem nowotworu mózgu w IPCZD zgodnie z obowiązującymi procedurami diagnostycznymi.

Wszelkie badania z wykorzystaniem materiału ludzkiego zostały przeprowadzone zgodnie z Helsińską Deklaracją Światowego Towarzystwa Medycznego. Analizowane tkanki pobierano z archiwum Zakładu Patologii Instytutu „Pomnika – Centrum Zdrowia Dziecka” (IPCZD) w Warszawie na podstawie zatwierdzonego protokołu przez Komisję Bioetyczną IPCZD (Zgoda nr 155/KBE/2014 z dnia 10.09.2014 roku).

Guzy nowotworowe mózgow sklasyfikowano zgodnie z klasyfikacją nowotworów ośrodkowego układu nerwowego (OUN) Światowej Organizacji Zdrowia, a dokładniej zaktualizowanej, czwartej edycji klasyfikacji guzów OUN z 2016 roku. Klasyfikacja opiera się na połączeniu cech histologicznych i molekularnych w celu zdefiniowania kilku jednostek nowotworowych szczególnie wśród glejaków oraz guzów zarodkowych (klasyfikacja czterostopniowa: I – IV) (LOUIS I WSP. 2016). Do przeprowadzonych doświadczeń wykorzystano łącznie czterdzieści dziewięć próbek guzów nowotworowych mózgu przynależnych do różnych typów nowotworów OUN, dodatkowo sklasyfikowanych wg

stopnia złośliwości. Podział poszczególnych typów wykorzystanych guzów przedstawiono na ryc. 10.



**Ryc. 10** Podział badanych grup guzów nowotworowych mózgu u pacjentów pediatrycznych. Poszczególne typy dodatkowo sklasyfikowano wg stopnia złośliwości (I – IV). Rycina ma pomóc w analizie danych i interpretacji wyników doświadczeń uzyskanych z wykorzystaniem wspomnianych próbek.

Pobrane próbki guzów nowotworowych mózgu pacjentów pediatrycznych poddawano następnie procedurze homogenizacji, po czym przygotowano z nich lizaty w celu oznaczenia poziomu białek z rodziny ShcA, TrkB oraz Ras. Procedurę zarówno homogenizacji jak i przygotowania lizatów opisano w rozdziale 3.16.

### 3.2. Hodowla linii komórkowych

Hodowlę wszystkich użytych w niniejszej pracy linii komórkowych prowadzono w warunkach jałowych w odpowiednich naczyniach hodowlanych (butelki hodowlane o pojemności 55 ml oraz szalki o średnicy 10 cm i 15 cm w zależności od przeprowadzonego doświadczenia). Pożywkę hodowlaną dla hodowanych komórek stanowiła kompletna pożywka, wzbogacona o inaktywowaną termicznie bydlęcą surowicę płodową (FBS) – 10% v/v, mieszaninę antybiotyków: penicyliny i streptomycyny (P/S) – 1% v/v oraz L-glutaminę – 5 mM (dodawaną tylko w przypadku linii kontrolnej MCF-10A). Hodowle komórek



prowadzono w warunkach standardowych w inkubatorze CO<sub>2</sub> przy 95% zawartości powietrza, 5% CO<sub>2</sub> oraz 100% wilgotności względnej w temperaturze 37°C.

**Tabela 5.** Media hodowlane zastosowane w poszczególnych liniach komórkowych

Pożywka hodowlana	Linia komórkowa	Dodatki do pożywki wzrostowej
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) - zawierające podwyższoną zawartość glukozy 4,5g/L oraz L-glutaminę; (Lonza)	MDA-MB-231	10% v/v FBS
	MCF-7	1% P/S
	Wszystkie klony MDA-MB-231 oraz MCF-7 wykazujące modyfikacje genetyczne	
Mammary Epithelial Cell Growth Medium (PromoCell)	MCF-10A	10% v/v FBS
		1% P/S
		5mM L-Glutamina
		Dołączony do pożywki suplement (PromoCell)

### 3.2.1. Pasażowanie i bankowanie komórek

W trakcie hodowli, pożywkę hodowlaną wymieniano na świeżą co drugi dzień, z kolei monowarstwę komórek pasażowano do nowego naczynia hodowlanego po osiągnięciu 80 – 90% konfluencji. W trakcie pasażu pożywkę hodowlaną usuwano, zaś monowarstwę komórek płukano buforem PBS, a następnie zalewano odpowiednią ilością 0,25% roztworu trypsyny (w zależności od naczynia hodowlanego: 10 – 20 ml). Komórki inkubowano z trypsyną odpowiednio w zależności od linii komórkowej: MDA-MB-231 – 1 minuta, MCF-7 – 3 minuty, MCF-10A – 8 minut w inkubatorze CO<sub>2</sub>, zaś cały proces trypsynizacji kontrolowano pod mikroskopem świetlnym (AE-2000, Motic). Proces trypsynizacji hamowano poprzez dodanie pożywki hodowlanej (zawierającej FBS) w ilości odpowiadającej użytemu naczyniu hodowlanemu (5 – 10 ml), po czym dokładnie wymieszaną zawiesinę zawierającą odklejone komórki umieszczano w probówce zbiorczej. Kolejno, zawiesinę wirowano przez 5 minut przy obrotach 200 x g, a po zakończonym wirowaniu usuwano supernatant, a osad komórek zawieszano w odpowiedniej ilości pożywki hodowlanej i wysiewano do nowego naczynia hodowlanego. Rodzaj zastosowanego naczynia hodowlanego jak również ilość, w jakiej komórki wysiewano zależała od linii komórkowej jak również charakteru planowanego doświadczenia.

**Tabela 6** Warunki hodowli poszczególnych linii komórkowych w przeprowadzonych eksperymentach

Doświadczenie	Linia komórkowa	Ilość wysianych komórek	Typ naczynia hodowlanego	Czas hodowli
<b>CRISPR-Cas9</b>	MDA-MB-231	300.000/dołek	Płytko	Inkubacja 48h
	MCF-7	700.000/dołek	6-dołkowa	
<b>Tempo proliferacji</b>	MDA-MB-231*	25.000/cm <sup>2</sup> (237 000/dołek)	Płytko	Inkubacja 72h
	MCF-7 <sup>#</sup>	35.000/ cm <sup>2</sup>	Płytko 24-dołkowa	
<b>Ocena cytotoksyczności</b>	MDA-MB-231*	9.000/dołek	Płytko 96-dołkowa	Inkubacja 72h
	MCF-10A	20 000/cm <sup>2</sup>		
<b>Pomiar potencjału mitochondrialnego mt. ΔΨ</b>	MDA-MB-231	42 000/cm <sup>2</sup>	Płytko 24-dołkowa	Inkubacja 48h
	MCF-7	80 000/cm <sup>2</sup>		
	MDA-MB-231*	42 000/cm <sup>2</sup>		
	MCF-7 <sup>#</sup>	80 000/cm <sup>2</sup>		
<b>Oddychanie komórkowe (OROBOROS)</b>	MDA-MB-231*	42 000/cm <sup>2</sup>	Szalko Ø10cm	Inkubacja 48h
	MCF-7 <sup>#</sup>	60 000/cm <sup>2</sup>		
<b>Analiza OCR i ECAR (Seahorse)</b>	MDA-MB-231*	9 000/dołek	Płytko 96-dołkowa	Inkubacja 72h
<b>Pomiar poziomu mitochondrialnego anionorodnika ponadtlenkowego</b>	MCF-10A	20 000/cm <sup>2</sup>	Płytko 24-dołkowa	Inkubacja 48h
	MDA-MB-231	35 000/cm <sup>2</sup>		
	MCF-7	50 000/ cm <sup>2</sup>		
	MDA-MB-231*	35 000/cm <sup>2</sup>		
	MCF-7 <sup>#</sup>	50 000/ cm <sup>2</sup>		
<b>Pomiar poziomu cytozolowego anionorodnika ponadtlenkowego</b>	MCF-10A	20 000/ cm <sup>2</sup>	Płytko 24-dołkowa	Inkubacja 48h
	MDA-MB-231	42 000/cm <sup>2</sup>		
	MCF-7	60 000/ cm <sup>2</sup>		
	MDA-MB-231*	42 000/cm <sup>2</sup>		
	MCF-7 <sup>#</sup>	60 000/ cm <sup>2</sup>		
<b>Pomiar względnych ilości reaktywnych form tlenu</b>	MCF-10A	20 000/ cm <sup>2</sup>	Płytko 24-dołkowa	Inkubacja 48h
	MDA-MB-231	42 000/cm <sup>2</sup>		
	MCF-7	60 000/ cm <sup>2</sup>		
	MDA-MB-231*	42 000/cm <sup>2</sup>		
	MCF-7 <sup>#</sup>	60 000/ cm <sup>2</sup>		
<b>Ocena cytotoksyczności (SRB)</b>			Płytko 96-dołkowa	Inkubacja 72h
	MDA-MB-231*	9.000/dołek		
<b>Ocena poziomu apoptozy</b>	MDA-MB-231*	25.000/cm <sup>2</sup>	Płytko 6-dołkowa	Inkubacja 72h
<b>Wizualizacja struktury sieci mitochondrialnej</b>		30 000/cm <sup>2</sup>	Płytko 24-dołkowa	Inkubacja 72h
	MDA-MB-231*			

\* 4 klony linii komórkowej MDA-MB-231 wykazujące modyfikacje genetyczne (klon kontrolny, z nadekspresją p66Shc, nadekspresją zmutowanej w Ser36 formy p66Shc mut-Ser36-p66Shc, z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc)

<sup>#</sup> 4 klony linii komórkowej MCF-7 wykazujące modyfikacje genetyczne ((klon kontrolny, nadekspresją p66Shc, z nadekspresją zmutowanej w Ser36 formy p66Shc mut-Ser36-p66Shc, z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc)

<sup>3</sup> Inkubacja 72h dla klonów linii MDA-MB-231 traktowanych chemioterapeutycznym DOX

W celu przechowywania żywych komórek (zabezpieczenia linii komórkowych), komórki bankowano w odpowiednich krioprobówkach. Komórki trypsynizowano i wirowano w sposób opisany powyżej. Następnie supernatant usuwano, zaś osad komórek zalewano wcześniej przygotowaną pożywką do mrożenia o następującym składzie: 50% pożywka hodowlana, 40% surowica bydlęca FBS, 10% DMSO (Dimetylosulfotlenek, ang. *Dimethyl Sulfoxide*). Tak przygotowaną zawiesinę komórek pipetowano w objętości 1,5 ml do krioprobówek i natychmiast umieszczano w specjalnym pudełku do mrożenia w zamrażarce niskotemperaturowej (ESCO Technologies, Inc, USA) w temp. -80°C. Następnego dnia komórki przenoszono do ciekłego azotu, bądź oparów ciekłego azotu.

### 3.3. Uzyskanie modyfikowanych genetycznie wariantów linii MDA-MB-231 oraz MCF-7

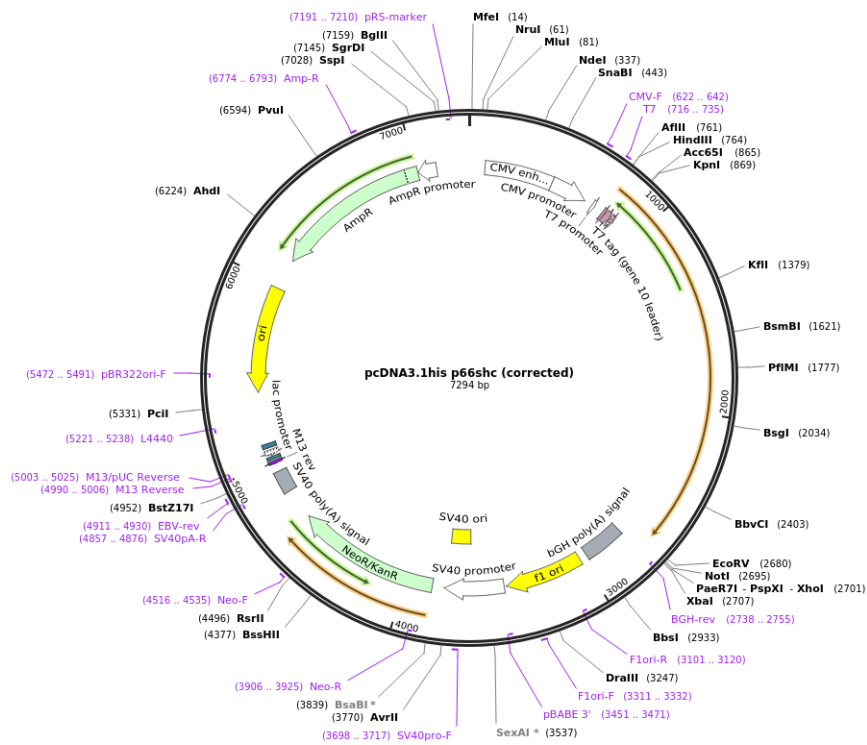
W celu realizacji postawionych celów niniejszej pracy, przeprowadzono manipulacje genetyczne badanych ludzkich linii raka sutka MDA-MB-231 oraz MCF-7 polegające na podwyższeniu poziomu białka p66Shc (nadekspresja) oraz wyciszeniu genu kodującego białko p66Shc metodą CRISPR-Cas9 (ang. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*).

#### 3.3.1 Podwyższenie poziomu białka p66Shc

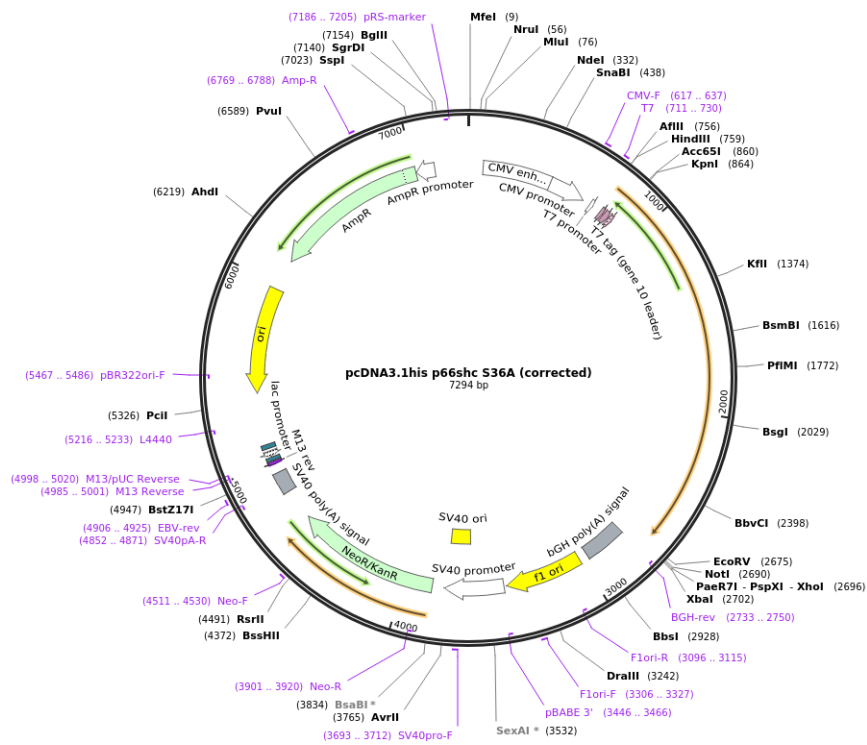
Podwyższenie poziomu białka p66Shc wykonane zostało w ramach współpracy z grupą Prof. Dominiki Nowis przez mgr Mateusza Sobczaka (Laboratorium Medycyny Doświadczalnej, Centrum Nowych Technologii, Uniwersytet Warszawski). W tym celu użyto plazmidów opisanych w poniższej tabeli.

**Tabela 7** Plazmidy użyte do przeprowadzenia podwyższenia poziomu białka p66Shc

Nazwa plazmidu	Opis	Producent, numer katalogowy
<b>pcDNA3.1His p66Shc</b> (określane w niniejszej pracy jako p66Shc-WT)	Wektor umożliwiający uzyskanie podwyższenia poziomu białka p66Shc	Addgene, #32574
<b>pcDNA3.1His p66Shc S36A</b> (określane w niniejszej pracy jako p66Shc-MUT)	Wektor umożliwiający uzyskanie podwyższenia poziomu zmutowanej w Ser36 formy białka p66Shc	Addgene, #32575



Ryc. 11 Schemat plazmidu pcDNA3.1His p66Shc



Ryc. 12 Schemat plazmidu pcDNA3.1His p66Shc S36A

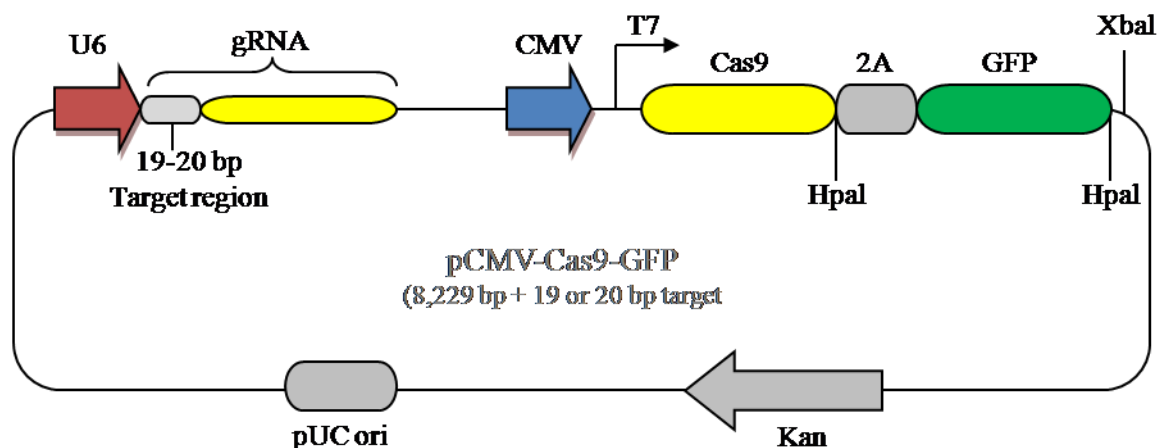
W celu transdukcji komórek docelowych linii MDA-MB-231 i MCF-7, plazmidy p66Shc-WT oraz p66Shc-MUT kodujące sekwencję cDNA sklonowano do wektora pLVX-IRES-puro (Clontech Laboratories, Inc, Mountain View, California, USA) w celu późniejszej ekspresji lentiwirusowej, a następnie zweryfikowano sekwencjonowaniem DNA. W celu namnożenia lentiwirusów, komórki linii HEK-293T w ilości  $2,6 \times 10^6$  wysiano na płytki hodowlane o średnicy 10 cm, a następnie hodowano w pożywce hodowlanej, standardowo wzbogaconej w 10% FBS oraz antybiotyki P/S. Po upływie 24h przeprowadzono transfekcję. Lentiwirusowe geny kodujące wprowadzono do komórek pakujących poprzez kotransfekcję fosforanem wapnia z 8,6  $\mu\text{g}$  odpowiednio wektora pLVX-p66Shc-WT-IRES-puro, pLVX-p66Shc-MUT-IRES-puro i pustego wektora pLVX-p66Shc-IRES-puro (pusty wektor, stanowiący kontrolę dla modyfikowanych genetycznie wariantów linii MDA-MB-231 oraz MCF-7 – tabela 4) jak również składników wektorów pakujących drugiej generacji, a mianowicie 8,6  $\mu\text{g}$  wektora pakującego psPAX2 oraz 5,5  $\mu\text{g}$  wektora otoczkowego pMD2.G. Wektory: psPAX2 oraz pMD2.G uzyskano dzięki uprzejmości profesor Didier Trono (École polytechnique fédérale de Lausanne, Switzerland). Wektory zawieszono w 450  $\mu\text{l}$  300 mM roztworu  $\text{CaCl}_2$ , a następnie dodawano kroplami do 450  $\mu\text{l}$  dwukrotnie stężonego buforu soli fizjologicznej HEPES (280 mM NaCl, 20 mM HEPES, 1,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 10 mM KCl, 12 mM D-glukoza [pH 7,2]) i zworteksowano. Przygotowany precypitat natychmiast dodawano do pożywki hodowlanej delikatnie mieszając, a następnie inkubowano 16 godzin, po czym wymieniano pożywkę na świeżą. Po upływie 24 godzin, wirowano 3 minuty przy obrotach 300 x g oraz filtrowano przy użyciu filtrów membranowych PES o rozmiarze porów 0,45  $\mu\text{m}$  (Filtropur S, Sarstedt). Następnie, supernatant zawierający lentiwirusy zagęszczano 10-krotnie poprzez wirowanie przy obrotach 3000 x g przez 16h w temp. 4°C i dodawano do komórek linii MDA-MB-231 bądź MCF-7 wraz z odczynnikiem zwiększającym wydajność transdukcji (Polybrene, Sigma-Aldrich) w ilości 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Miano wektorów wirusowych szacowano za pomocą testu immunoenzymatycznego (ELISA, ang. *Enzyme-linked immunosorbent assay*) – p24 HIV-1 core/capsid protein (Lenti-X p24 Rapid Titer Kit, Clontech) zgodnie z protokołem załączonym przez producenta. Wartość MOI (ang. *Multiplicity of Infection*) liczono poprzez podzielenie miana wektorów wirusowych przez liczbę transdukowanych komórek. Selekcję transdukowanych komórek przeprowadzano przy użyciu puromycyny (Sigma-Aldrich) w ilości 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , a następnie sprawdzano poziom ekspresji transgenów metodą Western Blot.

### 3.3.2. Edycja genomu - wyciszenie ekspresji genu kodującego białko p66Shc techniką edycji genu CRISPR-Cas9

Procedura techniki CRISPR-Cas9 mająca na celu uzyskanie klonów linii MDA-MB-231 oraz MCF-7 z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc została wykonana przeze mnie samodzielnie zgodnie z protokołem opisanym przez RAN I WSP. (2013). W celu przeprowadzenia edycji genu *SHC1* metodą CRISPR-Cas9 zaprojektowano trzy niezależne, docelowe sekwencje redagującego RNA (gRNA, ang. *Guiding RNA*) komplementarne do sekwencji DNA kodującej jedynie izoformę p66Shc umieszczone w wektorze U6gRNA-Cas9-2A-GFP (dalej określane jako plazmidy CRISPR) (tabela 8). Istotną kwestię stanowi fakt, iż projektowane sekwencje gRNA wykazują komplementarność wyłącznie do sekwencji DNA znajdujących się w regionie CH2, który jest unikatowy dla białka p66Shc (jego brak wykazują pozostałe izoformy białek SHC: p46Shc oraz p52Shc) tak, aby pozostałe białka kodowane przez gen *SHC1* pozostały niezmienione. Fakt ten jest na tyle istotny, gdyż wszystkie trzy izoformy białek ShcA kodowane są przez ten sam gen *SHC1*, zaś samo białko p66Shc powstaje jako produkt alternatywnego „splicingu”. Projektowanie pożądanych sekwencji oligonukleotydów przeprowadzono przy użyciu narzędzi informatycznych dostępnych pod wskazanym linkiem: <https://zlab.bio/guide-design-resources>, a następnie pożądane i zaprojektowane plazmidy CRISPR zakupiono w Sigma-Aldrich (sekwencje Custom) (ryc. 13). Procedura projektowania sekwencji oligonukleotydów odbyła się przy pomocy i dzięki uprzejmości dr Jędrzeja Szymańskiego (Pracownia Obrazowania Struktury i Funkcji Tkankowych, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN).

**Tabela 8** Plazmidy CRISPR-Cas9 użyte w celu edycji genomu polegającej na wyciszeniu ekspresji genu kodującego białko p66Shc

ID sekwencji	Gen	Sekwencja docelowa
HS0000119948-CRISPR 1	<i>SHC1</i>	TCCGGAGTGGATTGTA CTTGGG
HS0000119950-CRISPR 2	<i>SHC1</i>	GGCTGGCCAACCCGGCTGGGGG
HS0000119953-CRISPR 3	<i>SHC1</i>	TGGCTCCCCCTTAGACCCTGGG



**Ryc. 13 Schemat plazmidu U6gRNA-Cas9-2A-GFP, umożliwiającego edycję genomu komórek linii MDA-MB-231 oraz MCF-7. Przedstawione w tabeli 8 sekwencje docelowe na schemacie zostały zaznaczone na szaro w miejscu oznaczonym jako „19-20 bp Target region”.**

Proces edycji genu techniką CRISPR-Cas9 obejmował następujące etapy:

- Transformacja bakterii kompetentnych oraz namnożenie plazmidów

Namnożenia zakupionych plazmidów CRISPR dokonywano przy użyciu szczepu bakterii elektrokompetentnych *Escherichia coli* (One Shot™ TOP10 Electrocomp™ E. coli, ThermoFisher Scientific). W tym celu do sterylnych probówek typu eppendorf pobierano 49 µl bakterii One Shot TOP10 oraz 1 µl pożądanego DNA (20 ng), a następnie przenoszono do kuwety elektroporacyjnej i rozpoczynano proces elektroporacji z wykorzystaniem elektroporatora GenePulser Xcell Electroporation Systems (BioRad). Komórki bakterii poddawano krótkim impulsom elektrycznym o napięciu 2,5 KV. Następnie do kuwety dodawano 200 µl ogrzanej do 37°C pożywki SOC (pożywka do mikrobiologicznej hodowli bakterii, ang. *Super optimal catabolite repression*) (ABO, Polska), delikatnie mieszano i przenoszono całość do sterylnego eppendorfa, po czym inkubowano w termobloku przez 1 godzinę w temp. 37°C przy jednoczesnym wytrząsaniu 500 rpm. Po upływie godziny bakterie wysiewano przy pomocy szklanych kulek na wcześniej przygotowane, sterylne szalki (10 cm) z agarem (LB-Agar, BioShop) zawierającym antybiotyk kanamycynę (100µg/ml) i inkubowano w temp. 37°C przez całą noc. Następnego dnia przy użyciu sterylnych tipsów nakłuwano pojedyncze kolonie bakterii (odpowiednio z każdej wysianej szalki), po czym umieszczano tips w probówce zawierającej 2 ml pożywki lizogennej (LB, ang. *Lysogeny broth*) (Bioshop) oraz 2 µl antybiotyku kanamycyny (1:1000) i inkubowano w temp. 37°C delikatnie wytrząsając przez cały dzień. Po kilkugodzinnej inkubacji (pożywka w probówkach stawała się mętna, co świadczyło o namnożeniu bakterii),

zawartość probówki (2 ml) przenoszono do wcześniej przygotowanych, sterylnych szklanych kolb (150 ml) zawierających pożywkę LB oraz kanamycynę (1:1000) i ponownie inkubowano przez całą noc w temp. 37°C, wytrząsając 200 rpm. Kolejnego dnia odwirowano całą uzyskaną hodowlę bakterii (150 ml) przy obrotach 5000 rpm, 15 minut w temperaturze poniżej 20°C. Uzyskany w ten sposób osad z bakterii umieszczano w temperaturze -20°C lub natychmiast przystępowano do izolacji plazmidowego DNA z hodowli bakteryjnej przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu do izolacji (GenElute HP Endotoxin-Free Plasmid Maxiprep Kit, Sigma-Aldrich) zgodnie z protokołem załączonym przez producenta. Następnie, zmierzono stężenie DNA w zawiesinie wyizolowanych plazmidów z wykorzystaniem modułu kuwetowego spektrofotometru Hitachi U-2900, odczytując absorbancję przy długościach fali 260 nm oraz 280 nm. Pomiar stosunku wartości absorbancji 260 do 280 pozwolił na określenie czystości izolowanego DNA.

- Transfekcja komórek linii MDA-MB-231 oraz MCF-7

Komórki poszczególnych linii nowotworowych wysiewano na płytki 6-dołkowe w określonej gęstości odpowiadającej: 300.000 komórek/dołek linii MDA-MB-231 oraz 700.000 komórek/dołek linii MCF-7 (tabela 6). Kolejnego dnia przeprowadzano transfekcję z wykorzystaniem komercyjnie dostępnego zestawu jetPRIME® (Polyplus Transfection ®), zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta. W tym celu użyto 1,5 µg plazmidu U6gRNA-Cas9-2A-GFP (odpowiednio: CRISPR1, CRISPR2, CRISPR3), a następnie po upływie 4h zmieniano pożywkę na świeżą i inkubowano komórki kolejne 24h. Wydajność transfekcji sprawdzano pod mikroskopem fluorescencyjnym Leica AF7000.

- Sortowanie komórek cytometrem przepływowym

Po upływie 48h od wysiania danej linii komórkowej, komórki trypsynizowano, a następnie wirowano 5 minut przy obrotach 200 x g. Supernatant odrzucano, zaś osad zawieszano w 1 ml buforu PBS, po czym komórki liczone z wykorzystaniem automatycznego licznika komórek (TC20™ Automated Cell Counter, Bio-Rad). Zawiesinę komórek w ilości  $3 \times 10^6$  w objętości 1 ml przenoszono do probówek cytometrycznych (Polystyrene Round-Bottom Tube with Cell-Strainer Cap, FALCON) i sortowano na płytkę 96-dołkową z wykorzystaniem cytometru przepływowego BD FACSAria™ II (BD Bioscience) w gęstości 1 komórka/dołek. Podczas sortowania jako kontroli negatywnej użyto komórek nietransfekowanych. Proces sortowania komórek przeprowadzono dzięki uprzejmości i pomocy mgr.



Łukasza Bugajskiego (Pracownia Cytometrii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN).

- Hodowla klonów MDA-MB-231 oraz MCF-7

Wysortowane klony hodowano w inkubatorze CO<sub>2</sub> przy 95% zawartości powietrza, 5% CO<sub>2</sub> oraz 100% wilgotności względnej w temperaturze 37°C. Po upływie 10 dni zmieniano pożywkę hodowlaną na świeżą, a następnie skrupulatnie analizowano obecność klonów w poszczególnych dołkach płytki 96-dołkowej z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego, używając funkcji mikroskopu świetlnego. W przypadku obecności skupiska klonów w badanym dołku, prowadzono ich hodowle do momentu osiągnięcia przez nie konfluencji ok. 80 – 90%, po czym pasażowano je do większego naczynia hodowlanego – dołek płytki 24-dołkowej. Dalszą hodowlę prowadzono pasażując komórki (po osiągnięciu wspomnianej konfluencji) do coraz większych naczyń hodowlanych (dołek płytki 6-dołkowej, butelka T75), a następnie bankowano komórki i przechowywano w ciekłym azocie lub oparach ciekłego azotu oraz weryfikowano poziom ekspresji białka p66Shc metodą Western Blot, przygotowując próbkę w sposób opisany w rozdziale 3.6. (Immunodetekcja białek przy użyciu techniki Western Blot)

### **3.4. Ocena tempa proliferacji uzyskanych klonów linii MDA-MB-231 oraz MCF-7**

Tempo proliferacji badano dwiema metodami podyktowanymi przede wszystkim charakterystyką badanej linii nowotworowej. Tak więc, tempo proliferacji poszczególnych klonów linii MDA-MB-231 (linia nie wykazująca tendencji do tworzenia agregatów) zbadano przy użyciu cytometru przepływowego Guava Muse Cell Analyzer (Merck Millipore, USA), zaś klony linii MCF-7 (linia wykazująca tendencję do tworzenia agregatów) przy użyciu komór zliczeniowych Neubauera (VWR, Polska).

- Tempo proliferacji klonów linii MDA-MB-231

Komórki poszczególnych klonów wysiewano zgodnie z tabelą 6. Poszczególne klony wysiewano w 3 – krotnym powtórzeniu (po 3 dołki na dany klon linii MDA-MB-231). Po upływie 24h komórki odklejano przy użyciu trypsyny, inkubowano 1 minutę w inkubatorze w temp. 37°C, po czym zalewano pożywką hodowlaną. Następnie, 20 µl zawiesiny komórek dodawano do 380 µl odczynnika Muse<sup>TM</sup> Count&Viability Reagent (Merck Millipore), delikatnie wortexowano i inkubowano przez 2 minuty w

temp. pokojowej, po czym analizowano w Guava Muse Cell Analyzer. Procedurę powtarzano kolejno po 48h i 72h.

- Tempo proliferacji klonów linii MCF-7

Komórki poszczególnych klonów wysiewano zgodnie z tabelą 6. Poszczególne klony wysiewano w 4 – krotnym powtórzeniu (po 4 dołki na dany klon linii MCF-7). Po upływie 24h komórki odklejano przy użyciu trypsyny, inkubowano 3 minuty w inkubatorze w temp. 37°C, po czym zalewano pożywką hodowlaną. Zawiesinę komórek w ilości 10 µl nakładano na komorę zliczeniową, a następnie liczono komórki wizualnie używając mikroskopu świetlnego (AE-2000, Motic). Procedurę powtarzano kolejno po 48h i 72h.

### **3.5. Traktowanie komórek chemioterapeutycznym – dokсорubicyną**

Jako że linia MDA-MB-231 stanowi idealny model do traktowania chemioterapeutykami, na potrzeby realizacji ostatniego z celów niniejszej pracy, wykorzystano wyłącznie poszczególne klony linii MDA-MB-231, które traktowano chemioterapeutycznym – dokсорubicyną.

Dokсорubicyna jest chemioterapeutycznym z grupy antracyklin (grupa cytotoksycznych antybiotyków o szerokim zastosowaniu klinicznym), spowalniającym bądź hamującym wzrost komórek nowotworowych. Uważa się, że DOX wykazuje swe cytotoksyczne działanie za pomocą dwóch odmiennych mechanizmów działania: 1) interkalacji do DNA z jednoczesnym zakłóceniem naprawy DNA za pośrednictwem topoizomerazy II, który jest głównym mechanizmem działania bądź 2) generowania wolnych rodników, które w konsekwencji powodują uszkodzenia błon komórkowych, DNA i białek (THORN I WSP. 2012; WALLACE I WSP. 2020). Drugi z przedstawionych mechanizmów działania DOX odbywa się ściśle z udziałem mitochondriów, co w odniesieniu do głównych założeń niniejszej pracy stanowiło jedno z kluczowych kryteriów wyboru DOX jako chemioterapeutyka.

#### **3.5.1 Ocena właściwości cytotoksycznych dokсорubicyny**

W celu określenia pożądanego stężenia DOX skutkującego 10% spadkiem w proliferacji komórek badanych klonów linii MDA-MB-231, wykonano test cytotoksyczności przy użyciu metody wykorzystującej barwnik sulforodaminę B (SRB) (Sigma-Aldrich) opisaną w rozdziale 3.11 (bardziej szczegółowy opis metody). Wybór powyższego testu

pokierowany był niemożnością zastosowania zestawu zawierającego odczynnik XTT (sól sodowa 2,3-bis [2-metoksy-4-nitro-5-sulfofenilo]-2H-tetrazolio-5-karboksyanilidu), wynikającą ze zmian w poziomie podjednostek poszczególnych kompleksów łańcucha oddechowego w klonie MDA-MB-231 wykazującym wyciszenie ekspresji genu kodującego białko p66Shc. Jak wiadomo, test z wykorzystaniem odczynnika XTT oparty jest w głównej mierze na aktywności mitochondrialnych dehydrogenaz, co w konsekwencji wykluczyło jego zastosowanie.

Metoda wykorzystująca barwnik SRB znalazła szerokie zastosowanie w ocenie cytotoksyczności badanych chemioterapeutyków (VICHAI & KIRTIKARA 2006). Celem określenia finalnego stężenia DOX, komórki poszczególnych klonów linii MDA-MB-231 wysiewano na płytki 96-dołkowe w gęstości 9000 komórek/dołek (tabela 6). Kolejnego dnia komórki traktowano różnymi stężeniami DOX (Sigma-Aldrich), których wartości podane są w tabeli poniżej (tabela 9). Dokсорubicynę użytą do niniejszych celów zawieszono w roztworze DMSO (końcowe stężenie DMSO w pożywce hodowlanej <1%), otrzymując finalnie 25 mM roztwór wyjściowy.

**Tabela 9** Zastosowane stężenia dokсорubicyny

Substancja	Roztwór roboczy	Finalne stężenie w pożywce hodowlanej	Czas inkubacji
<b>Brak</b>	-	0	
<b>Dokсорubicyna (25 mM roztwór wyjściowy w DMSO)</b>	10 μM (w DMSO)	20 nM	48h
		50 nM	
		100 nM	
<b>Dokсорubicyna (25 mM roztwór wyjściowy w DMSO)</b>	100 μM (w DMSO)	200 nM	
		400 nM	
		800 nM	
		1000 nM	
		1500 nM	
<b>Dokсорubicyna (25 mM roztwór wyjściowy w DMSO)</b>	1 mM (w DMSO)	2000 nM	
		4000 nM	
		8000 nM	

Komórki następnie inkubowano z DOX przez okres 48h, po czym utrwalano i postępowano zgodnie z procedurą wykorzystującą metodę SRB (opis metody w rozdziale 3.11).

### **3.6. Immunodetekcja białek przy użyciu techniki Western Blot**

#### **3.6.1. Przygotowanie lizatów komórkowych**

W celu przygotowania próbki do rozdzielania w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących, komórki danej linii komórkowej trypsynizowano oraz wirowano tak jak opisano w rozdziale 3.2.1. Po zakończonym wirowaniu, supernatant usuwano, zaś osad komórek zawieszano w 5 ml buforu PBS w celu pozbycia się resztek pożywki hodowlanej. Zawiesinę komórek ponownie wirowano przez 5 minut przy obrotach 200 x g. Supernatant usuwano, zaś otrzymany osad komórek zawieszano w 1 ml schłodzonego (4°C) buforu PBS, przenoszono do nowych probówek i wirowano w temperaturze 4°C przez 5 minut przy obrotach 200 x g. Otrzymany w ten sposób osad komórek zawieszano w schłodzonym (4°C), zawierającym inhibitory proteaz i fosfataz buforze lizującym RIPA (ang. *Radioimmunoprecipitation assay buffer*), (skład podany w rozdziale 3.17) w stosunku 1:2 (osad : RIPA) i inkubowano na lodzie przez 30 minut, mieszając co 5 minut przy użyciu worteksu. Po skończonej inkubacji, lizat komórkowy wirowano przez 20 minut przy obrotach 14 000 x g. Supernatant zbierano i umieszczano w nowej probówce, pobierając niewielką ilość (5 µl) do oznaczenia stężenia białka metodą Bradford (metoda opisana w rozdziale 3.6.2), zaś zawierający DNA oraz niezlizowane fragmenty komórek osad – wyrzucano. Do pozostałej części supernatantu dodawano bufor Laemmli'ego w stosunku 1:3 (bufor obciążający : supernatant), a następnie ogrzewano przez 5 minut w temperaturze 95°C i przechowywano w temperaturze -20°C lub rozdzielano na żelu poliakryloamidowym. Należy zaznaczyć, iż próbki przeznaczone do detekcji kompleksów łańcucha oddechowego przy użyciu mieszaniny przeciwciał OXPHOS (MitoSciences) ogrzewano w temperaturze nie przekraczającej 40°C (wg zaleceń producenta).

#### **3.6.2. Pomiar stężenia białka w badanej próbce metodą Bradford**

Stężenie białka w próbkach przeznaczonych do badań proteomicznych oznaczano spektrofotometrycznie metodą Bradford (BRADFORD 1976). Pomiaru dokonywano w 1,5 ml kuwetach pomiarowych, do których dodawano 1,2 ml wody dejonizowanej, badaną próbkę w ilości nieprzekraczającej 10 µl oraz 300 µl odczynnika Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad). Całość dokładnie mieszano, a następnie dokonywano odczytu absorbancji przy długości fali 595 nm z wykorzystaniem modułu kuwetowego

spektrofotometru Hitachi U-2900. Oznaczenia stężenia białka w badanej próbce dokonywano na podstawie wcześniej wyznaczonej krzywej wzorcowej, sporządzonej z wykorzystaniem standardów stanowiących roztwór albuminy surowicy bydlęcej (BSA, Sigma-Aldrich) o znanych stężeniach odpowiednio 0, 1, 3, 5, 10, 15, 20  $\mu\text{l/ml}$ .

### 3.6.3. Przygotowanie żeli poliakryloamidowych

Rozdział białek w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących uzależniony był od masy cząsteczkowej białka, które rozdzielano. W związku z tym, rozdział białek prowadzono na rozdzielających żelach poliakryloamidowych o różnych gęstościach, odpowiednio 8%, 10% oraz 12% (procentowa zawartość akryloamidu). Niezależnie od masy cząsteczkowej rozdzielanego białka jak również procentowości żelu rozdzielającego – żel zagęszczający zawsze był 4%. Skład mieszaniny niezbędnej do przygotowania żeli rozdzielających o zdefiniowanej procentowości jak również żelu zagęszczającego przedstawiono w tabelach 10.

**Tabela 10** Skład mieszaniny żelu zagęszczającego

<b>Żel zagęszczający</b>	<b>4%</b>
<b>Akryloamid/bisakryloamid</b>	0,9 ml
<b>Roztwór do żelu zagęszczającego</b>	1,5 ml
<b>Woda</b>	3,5 ml
<b>TEMED</b>	10 $\mu\text{l}$
<b>10% APS</b>	50 $\mu\text{l}$

**Tabela 11** Skład mieszaniny żelu rozdzielającego

<b>Żel rozdzielający</b>	<b>8%</b>	<b>10%</b>	<b>12%</b>
<b>Akryloamid/bisakryloamid</b>	2,667 ml	3,333 ml	4 ml
<b>Roztwór do żelu rozdzielającego</b>	3,331 ml	3,331 ml	3,331 ml
<b>Woda</b>	4,002 ml	3,336 ml	2,669 ml
<b>TEMED</b>	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$
<b>10% APS</b>	30 $\mu\text{l}$	30 $\mu\text{l}$	30 $\mu\text{l}$

### 3.6.4. Elektroforeza SDS-PAGE, transfer na membranę oraz immunodetekcja

Badane próbki przygotowane w sposób opisany w rozdziale 3.6.1 nakładano w ilości 10 – 40 µg białka do studzienki żelu zagęszczającego. Oprócz badanej próby do jednej ze studzienek nakładano również 2 µl białkowego wzorca mas (Prestained Protein Ladder, ThermoFisher Scientific). Zarówno elektroforezę jak i transfer rozdzielanych białek wykonywano odpowiednio przy użyciu aparatu MINI-ProteanTetraCell (Bio-Rad) bądź w określonych przypadkach wykorzystywano zestaw gotowych żeli poliakrylamidowych o gradencji 4-12% (Bolt™ 4 to 12%, Bis-Tris, 1.0 mm, Mini Protein Gel, ThermoFisher Scientific), które rozdzielano w adekwatnym dla nich aparacie do rozdziału (Mini Gel Tank, ThermoFisher Scientific), a następnie transferowano (Mini Blot Module, ThermoFisher Scientific). Rozdział białek prowadzono w buforze do elektroforezy (skład w tabeli 15) odpowiednim do zastosowanego aparatu elektroforetycznego, stosując stałe natężenie prądu (20 mA/żel) przez czas około 2h, czyli do momentu przesunięcia się barwnika (błękitu bromofenolowego znajdującego się w buforze Laemmli'ego) do dolnej krawędzi żelu. Następnie, rozdzielone w żelu białka przenoszono na membranę nitrocelulozową (Nitrocellulose membranes, Bio-Rad) bądź PVDF (Immun-93 Blot PVDF Membrane, Bio-Rad), wykonując transfer przy stałym natężeniu prądu 300 mA przez 90 minut w temperaturze 4°C. Transfer białek prowadzono w buforze do transferu (skład w tabeli 15) stosując tym samym metodę transferu „mokrego”. Po zakończeniu transferu, membranę, z którą związały się białka, płukano w buforze TBS-T (skład w tabeli 15), a następnie blokowano miejsca niespecyficznego wiązania przeciwciał w roztworze do blokowania (Intercept™ Protein-Free Blocking Buffer TBS, Li-Cor Biosciences) przez okres 1h w temperaturze pokojowej. Bufor do blokowania rozcieńczano w stosunku 1 : 1 w TBS-T. Następnie, inkubowano membranę z odpowiednimi przeciwciałami pierwszorzędowymi, których stężenia zawarto w tabeli 12 (membrany inkubowano z przeciwciałami w buforze do blokowania w TBS-T, w temp. 4°C, przez całą noc). Po zakończonej inkubacji z przeciwciałami pierwszorzędowymi, membranę płukano trzykrotnie po 5 minut w buforze TBS-T, po czym inkubowano z odpowiednimi przeciwciałami drugorzędowymi znakowanymi barwnikami fluorescencyjnymi IRDye (Li-Cor Biosciences) zawieszonymi w buforze do blokowania przez 1h w temperaturze pokojowej. Zestawienie stosowanych przeciwciał drugorzędowych znajduje się w tabeli 12. Po upływie 1h, membranę ponownie płukano trzykrotnie po 5 minut w buforze TBS-T. Względny poziom wykrywanych na membranie białek uwidaczniano wykorzystując laserowy system detekcji i analizy obiektów

fluorescencyjnych w podczerwieni Odyssey Infrared Imaging System (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, USA).

Intensywność fluorescencji na membranach analizowano w programie Image Studio™ Software for the Odyssey® wersja 3.021, kompatybilnym z Oddysey Infrared Imaging System (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, USA).

Ilość badanego białka wyrażano w odniesieniu do dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH), jako białka referencyjnego.

**Tabela 12** Zestawienie użytych przeciwciał pierwszorzędowych

Przeciwciało I-rzędowe	Pochodzenie	Producent	Numer katalogowy	Gęstość żelu rozdzielającego	Stężenie przeciwciała
<b>SHC</b>	Mysz	BD Transduction Laboratories	610879	10%	1:1000
<b>SHC</b>	Królik	Abcam	ab15039	10% - 12%	1:1000
<b>p66Shc-Ser36</b>	Mysz	Calbiochem	KP20601	10%	1:1000
<b>PKCβII</b>	Królik	Santa Cruz Biotechnology	Sc-210	10%	1:1000
<b>PKCβII-Ser660</b>	Królik	Cell Signaling	#9371	10%	1:1000
<b>PIN1</b>	Królik	Merck Millipore	#07-091	10%	1:1000
<b>PP2A</b>	Mysz	Merck Millipore	#05-421	10%	1:1000
<b>OXPPOS</b>	Mysz	Abcam	Ab110413	12%	1:1000
<b>Katalaza</b>	Królik	Abcam	Ab15039/Ab52477	10%	1:1000
<b>SOD1</b>	Królik	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Sc-11407	12%	1:1000
<b>SOD2</b>	Królik	Cell Signaling	13141S	12%	1:1000
<b>Reduktaza Glutationowa</b>	Królik	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Sc-32886	10%	1:1000
<b>TOM20</b>	Królik	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Sc-11415	12%	1:1000
<b>GAPDH</b>	Mysz	Merck-Milipore	MAB-374	W zależności od badanego białka	1:20 000 - 1:40 000
<b>GAPDH</b>	Królik	Abcam	Ab128915	W zależności od badanego białka	1:20 000 - 1:40 000
<b>TrkB</b>	Mysz	Merck Millipore	Ab5372	4-15%	1:1000
<b>Ras</b>	Królik	Cell Signaling	# 3965	4-15%	1:1000

**Tabel 13** Zestawienie użytych przeciwciał drugorzędowych

Przeciwciało II-rzędowe	Producent	Numer katalogowy	Stężenie, warunki inkubacji
IRDye 680RD anty - królicze	Li-Cor, Biosciences	926-68073	1:10 000 inkubacja w buforze do blokowania w TBS-T, temperatura pokojowa, czas: 1h
IRDye 680RD anty - mysie		926-68072	
IRDye 800CW anty - królicze		926-32213	
IRDye 800CW anty - mysie		926-32212	

### 3.7. Oznaczenie poziomu fosforylacji białka p66Shc w reszcie Ser36 metodą immunoprecypitacji

Użyte w niniejszej pracy linie komórkowe wykazywały stosunkowo niski poziom fosforylowanego w reszcie Ser36 białka p66Shc. W związku, iż detekcja przy użyciu standardowej techniki Western Blot była niemożliwa, zastosowano technikę immunoprecypitacji białek przeciwciałem (monoklonalnym, skierowanym przeciwko ShcA) z użyciem kuleczek do immunoprecypitacji opłaszczonych białkiem A/G (Protein A/G PLUS-Agarose Immunoprecipitation Reagent, Santa Cruz Biotechnology), dzięki czemu uzyskano wyższą „czułość” detekcji poziomu fosforylowanego w Ser36 białka p66Shc. Procedura przygotowania lizatów komórkowych do momentu pomiaru stężenia białka metodą Bradford, przebiegała tak samo jak w przypadku standardowej techniki Western Blot (rozdział 3.6.1). Po zakończonym pomiarze stężenia białka, pobierano ilość próby zawierającą 500 µg białka i umieszczano w nowej probówce zbiorczej. Następnie, dodawano przeciwciała anty-SHC (BD Transduction Laboratories, Abcam) w ilości 5 µl na badaną próbkę i inkubowano przez 1h w temperaturze 4°C, przez cały czas delikatnie mieszając próby w wytrząsarce o ruchu obrotowym. W międzyczasie przygotowywano kuleczki do immunoprecypitacji zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta, a po zakończonej inkubacji dodano je w ilości 20 µl na próbę oraz inkubowano przez całą noc w temperaturze 4°C, delikatnie mieszając w wytrząsarce o ruchu obrotowym. Na drugi dzień, próby wirowano przez 10 minut przy obrotach 10 000 x g w temperaturze 4°C, a następnie z należytą ostrożnością (aby nie naruszyć osadu) usunięto supernatant, zaś osad zawierający kuleczki związane już z precypitowanymi białkami płukano w buforze RIPA i ponownie wirowano. Płukanie powtarzano trzykrotnie, za każdym razem wirując próby przez minutę przy obrotach 200 x g



w temperaturze 4°C. Po zakończonej procedurze płukania, osad zawieszano w 30 µl buforu Laemmli'ego i gotowano przez 5 minut w temperaturze 95°C. Tak przygotowane próbki rozdzielano na żelu poliakryloamidowym, przeprowadzając kolejne etapy techniki Western Blot bądź próbki zamrażano w -20°C.

### **3.8. Immunochemiczna detekcja oksydacyjnych uszkodzeń białek (karbonylacja)**

Karbonylacja białek, stanowiąca miarę oksydacyjnych uszkodzeń białek zwykle odnosi się do procesu tworzenia reaktywnych ketonów bądź aldehydów (grup karbonylowych) w resztach następujących aminokwasów: lizyny, argininy, proliny oraz treoniny. Poziom wspomnianych uszkodzeń oksydacyjnych badano metodą immunochemiczną bazując na technice Western Blot z wykorzystaniem komercyjnie dostępnego zestawu OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit (Millipore). Metoda wykorzystuje zdolność 2,4-dinitrofenylohydrazyny (DNPH) do reagowania z grupami karbonylowymi, w wyniku czego powstaje stabilny produkt dinitrofenol (DNP), który jest następnie wykrywany za pomocą skierowanych przeciwko niemu przeciwciał. Próbki przygotowywano zgodnie z załączoną do zestawu instrukcją producenta. Następnie, próbki zawierające 10 µg białka rozdzielano na 10% żelu poliakryloamidowym, transferowano na membranę nitrocelulozową oraz inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi załączonymi do zestawu OxyBlot™. Inkubację z przeciwciałami drugorzędowymi oraz wizualizację białek na membranie przeprowadzano zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.6.4., zaś poziom karbonylacji wyrażano w odniesieniu do białka referencyjnego – GAPDH.

### **3.9. Pomiar parametrów bioenergetycznych**

#### **3.9.1. Pomiar potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej (mt. $\Delta\Psi$ )**

Potencjał na wewnętrznej błonie mitochondrialnej w badanych liniach komórkowych badano wykorzystując sondę fluorescencyjną JC-1 (jodek 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylobenzimidazolokarbo - cyjaninowy, Invitrogen) w oparciu o metodę opracowaną przez COSSARIZZA I WSP. (1993). Zastosowana technika wykorzystuje zdolność sondy JC-1 (będącej barwnikiem kationowym) do akumulacji w mitochondriach w sposób zależny od potencjału mitochondrialnego, czego wyrazem jest przesunięcie widma fluorescencyjnego. Wysoki potencjał mt.  $\Delta\Psi$  skutkuje tworzeniem przez sondę JC-1 agregatów emitujących

fluorescencję o długości fali  $\lambda_{ex} = 535 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 580 \text{ nm}$  (czerwona fluorescencja). Z kolei, w wyniku spadku mt.  $\Delta\Psi$  (depolaryzacja wewnętrznej błony mitochondrialnej) sonda JC-1 ulega translokacji do cytoplazmy, przechodząc tym samym w formę monomeryczną, emitując fluorescencję o długości fali  $\lambda_{ex} = 485 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 530 \text{ nm}$  (zielona fluorescencja). Wspomniane przesunięcie widma fluorescencyjnego sondy JC-1 (zmiana postaci z formy zagregowanej na monomeryczną), czyni ją czułym markerem zmian potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej, z kolei pomiar stosunku intensywności fluorescencji agregatów do monomerów – wiarygodną oraz wygodną metodę oceny zmian wspomnianego potencjału w komórkach.

Komórki badanych linii komórkowych hodowano w sposób odpowiadający danemu typowi eksperymentu (ilość wysianych komórek, czas hodowli itp. podano w tabeli 6). W dniu pomiaru mt.  $\Delta\Psi$ , komórki płukano trzykrotnie buforem PBS (+Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) po uprzednim usunięciu pożywki hodowlanej, a następnie inkubowano w ciemności z sondą JC-1 przez 15 minut w 37°C. Należy zaznaczyć, iż sondę JC-1 przygotowywano w stężeniu 5  $\mu\text{M}$  w buforze PBS z jonami Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup>, zawierającym 5 mM glukozę. Po zakończonej inkubacji, znad monowarstwy komórek usuwano roztwór z sondą, a następnie płukano trzykrotnie buforem PBS (+Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>). Komórki zalewano 0,5 ml świeżego buforu PBS (+Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) i mierzono fluorescencję przy użyciu czytnika płytek wielodołkowych Infinite M200Pro (Tecan, Austria), przy odpowiedniej długości fali:  $\lambda_{ex} = 585 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$ . Zebrane wyniki zostały przeanalizowane i wyrażone jako stosunek intensywności fluorescencji czerwonej do zielonej.

### **3.9.2. Pomiar zużycia tlenu z wykorzystaniem elektrody tlenowej Oxygraph-2k-OROBOROS**

Szybkość zużycia tlenu przez mitochondria w badanych liniach mierzono przy użyciu oksygrafu (Oxygraph-2k, OROBOROS) prowadząc hodowlę komórkową zgodnie z informacjami zawartymi w tabeli (tabela 6). Po 48h inkubacji komórki trypsynizowano, wirowano, a następnie zawieszano w 250  $\mu\text{l}$  świeżej pożywki hodowlanej (bez dodatku FBS). Następnie komórki liczone przy użyciu komory zliczeniowej (Neubauer, VWR) pod mikroskopem świetlnym i umieszczano w komorze pomiarowej. Pomiar zużycia tlenu prowadzono w temp. 37°C. Po 7 minutach od dodania komórek do komory pomiarowej, dodawano inhibitora syntazy ATP – oligomycyny (1 $\mu\text{g}/1\text{ml}$ ), w celu zhamowania trzeciego stanu oddechowego, a następnie co 3 minuty dodawano odczynnik rozprzegającego – CCCP

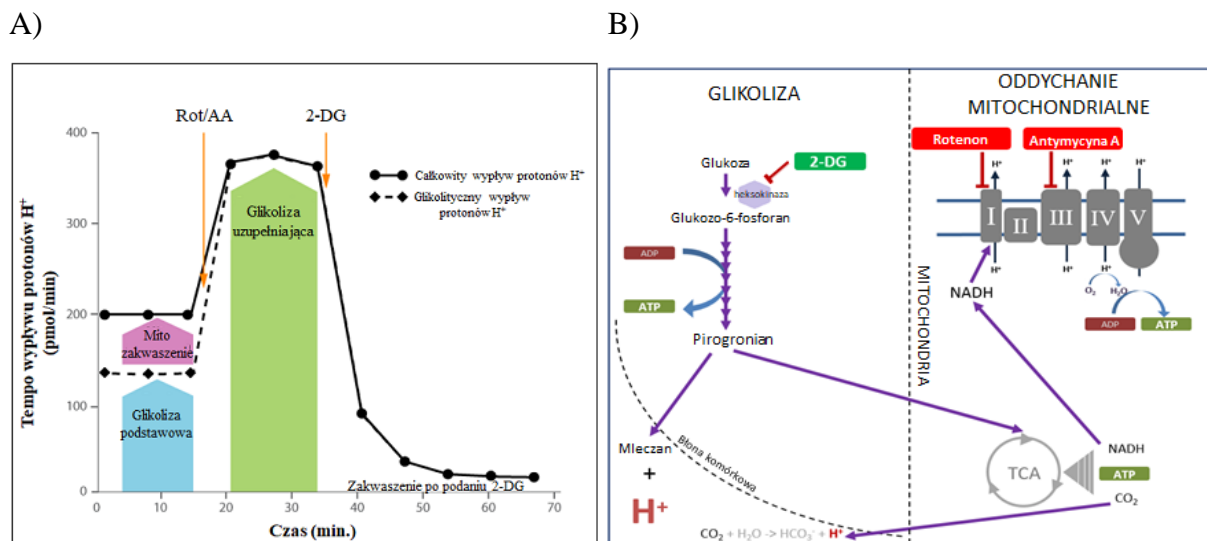
(Karbonylocyjanek 3-chlorofenylohydrazonu) (0,1 $\mu$ M), aż do osiągnięcia maksymalnego zużycia tlenu.

### **3.9.3. Analiza szybkości zużycia tlenu (OCR, ang. *Oxygen consumption rate*) oraz szybkości zakwaszenia zewnątrzkomórkowego (ECAR, ang. *Extracellular acidification rate*) z wykorzystaniem analizatora Seahorse XFe96**

Pomiary szybkości zużycia tlenu jak również zakwaszenia zewnątrzkomórkowego przeprowadzono w poszczególnych klonach linii nowotworowej MDA-MB-231 nietraktowanych oraz traktowanych chemioterapeutyką DOX, wykorzystując w tym celu analizator płynów zewnątrzkomórkowych Seahorse XFe96 (Agilent, Technologies, USA). Analizy wykonano przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu odczynników „Glycolytic Rate Assay Kit” (103344-100, Agilent Technologies) oraz specjalnie dedykowanych płytek 96-dołkowych (102601-100, Agilent Technologies). Doświadczenia wykonano w ramach współpracy, dzięki uprzejmości dr Vilmy A. Sardão (Mitochondria, Metabolism and Disease Group, Center for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra, Portugal), zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta. Niemniej jednak, analizę jak również interpretację uzyskanych wyników przeprowadzono samodzielnie.

Zastosowany zestaw „Glycolytic Rate Assay Kit” umożliwia pomiar glikolizy w badanych komórkach, poprzez bezpośredni pomiar w czasie rzeczywistym ECAR oraz OCR, będących kluczowymi wskaźnikami dwóch głównych ścieżek produkcji ATP w komórkach: glikolizy oraz fosforylacji oksydacyjnej. Podczas pomiaru dokonywanego przez analizator Seahorse określana jest tzw. glikolityczna szybkość wypływu  $H^+$  (glycoPER ang. *Glycolytic proton efflux rate*). Podczas glikolizy, rozpadowi cząsteczek glukozy do mleczanu towarzyszy wypompowywanie  $H^+$  do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, co jest wykrywane przez analizator Seahorse jako ECAR. Dodatkowo aktywność mitochondrialnego cyklu kwasów trikarboksylowych prowadzi do wytwarzania  $CO_2$ , który „uwadnia” oraz zakwasza przestrzeń zewnątrzkomórkową. Tak więc, podczas pomiaru hamuje się podstawowe oddychanie mitochondrialne (OCR) poprzez zastosowanie inhibitorów kompleksu I i III (rotenon/antymycyna A). W wyniku tego, możliwe jest określenie szybkości wypływu  $H^+$ , a następnie ich usunięcie z całkowitej wartości totalnego wypływu  $H^+$  (PER, ang. *Proton efflux rate*), w efekcie czego uzyskujemy wartość glycoPER. W celu potwierdzenia specyficzności działania szlaku w trakcie pomiaru dodaje się 2- deoksyglukozę (2-DG), która jest

inhibitorem glikolizy, w konsekwencji prowadząc do zatrzymania zakwaszenia glikolitycznego. Schemat doświadczenia przedstawiono na rycinie 14.



**Ryc. 14** Reprezentacyjny schemat przedstawiający profil pomiaru szybkości glikolizy (A) oraz zasadę działania testu (B)

#### Przebieg pomiaru:

Komórki klonów linii MDA-MB-231 wysiano na specjalnie dedykowane płytki 96-dołkowe Seahorse (szczegóły tabela 6). Następnego dnia, komórki traktowano DOX, zaś po upływie 48h przeprowadzano pomiar z wykorzystaniem analizator Seahorse XFe96. Ponadto, 18h przed planowanym pomiarem nawodniono sensor kartridża (specjalnie dedykowanej płytki 96-dołkowe Seahorse) poprzez inkubację w specjalnym buforze tzw. „Seahorse XF Calibrant” w inkubatorze pozbawionym dostępu CO<sub>2</sub>, w temp. 37°C przez całą noc. W dniu pomiaru, komórkom zmieniano pożywkę hodowlaną na specjalną pożywkę „Agilent Seahorse Glycolytic rate assay” i inkubowano przez 1h w inkubatorze (bez dostępu CO<sub>2</sub>) w 37°C. Po zakończonej inkubacji, komórkom ponownie zmieniano pożywkę na świeżą, zaś do sensorów kartridża dodawano po 3 ml odpowiednio:

- 1) pożywki hodowlanej zawierającej inhibitory kompleksów I i III – 0,5 μM rotenon/antymycyna A
- 2) pożywki hodowlanej zawierającej 50 mM 2- DG

Na koniec uruchamiano program „Seahorse XF Glycolytic Rate Assay Kit”.

### **3.10. Pomiar poziomu reaktywnych form tlenu**

#### **3.10.1. Pomiar poziomu mitochondrialnego anionorodnika ponadtlenkowego**

Pomiaru poziomu mitochondrialnego anionorodnika ponadtlenkowego ( $mt.O_2^{\cdot-}$ ), zlokalizowanego w macierzy mitochondrialnej, dokonywano przy użyciu specyficznej sondy fluorescencyjnej - MitoSox Red (Invitrogen) zgodnie z protokołem opisanym przez WOJTAŁA I WSP. (2014). Sonda MitoSox Red wykazuje specyficzność do  $mt.O_2^{\cdot-}$ , jako że została opracowana poprzez sprzężenie jonu trifenylfosfoniowego ( $TPP^+$ ) oraz kationu lipofilowego (wykorzystywanego do gromadzenia różnych cząsteczek w wysoce ujemnie naładowanej macierzy mitochondrialnej) do dihydroetydyny (DHE) – sondy fluorescencyjnej wykorzystywanej do pomiaru anionorodnika w cytozolu. Obecność pozytywnie naładowanego ładunku pochodzącego z grupy  $-TTP^+$ , umożliwia akumulację MitoSox Red w mitochondriach (w odróżnieniu do DHE wykorzystywanej do pomiaru cytozolowego anionorodnika), gdzie w wyniku utlenienia tworzy fluorescencyjny produkt – 2-hydroksymitoetydynę.

Czas hodowli, ilość wysianych komórek jak również zastosowane naczynie hodowlane podano w tabeli 6. Komórki, po odessaniu pożywki hodowlanej płukano trzykrotnie buforem PBS ( $+Ca^{2+}/Mg^{2+}$ ), po czym inkubowano przez 30 minut w temperaturze  $37^{\circ}C$  w buforze PBS ( $+Ca^{2+}/Mg^{2+}$ ) zawierającym  $5 \mu M$  MitoSox Red oraz  $5mM$  glukozę. Po zakończonej inkubacji, komórki płukano trzykrotnie buforem PBS ( $+Ca^{2+}/Mg^{2+}$ ) i kolejno zalewano  $0,5 ml$  świeżego buforu PBS ( $+Ca^{2+}/Mg^{2+}$ ), a następnie mierzono fluorescencję przy użyciu laserowego cytometru skaningowego – iCys (Compucyte Inc, Beckman Coulter, Brea, USA) wykorzystując lasery argonowe ( $\lambda_{ex} = 488nm$ ,  $\lambda_{em} = 530nm$ ). W celu wydzielenia obszarów obrazu odpowiadających sygnałowi z komórek, każdy z uzyskanych obrazów mikroskopowych podzielono na mniejsze „regiony” (tzw. obrysy fantomowe), w których określano ilościowo sygnał fluorescencyjny. Następnie, ustalano progową wartość fluorescencji, powyżej której fantomy były klasyfikowane jako właściwy sygnał, pozostałe fantomy klasyfikowano jako tło.

#### **3.10.2. Pomiar poziomu cytozolowego anionorodnika ponadtlenkowego**

Pomiaru poziomu cytozolowego anionorodnika ponadtlenkowego ( $cyt.O_2^{\cdot-}$ ) dokonywano przy użyciu sondy fluorescencyjnej – dihydroetydyny (DHE, Invitrogen)

zgodnie z przyjętym protokołem WOJTAŁA I WSP. (2014). DHE jest hydrofobowym, nienaładowanym związkiem, który po wnikięciu do komórki ulega utlenieniu, zyskując pozytywny ładunek, po czym jest akumulowany w komórkach poprzez interkalacje do nici DNA. Specyficzność sondy DHE do cytozolowego anionorodnika ponadtlenkowego polega na dwuetapowym mechanizmie utlenienia w wyniku czego powstaje 2-hydroksyetydyna, dająca również czerwoną fluorescencję, odczytywaną jednak przy nieco innej długości fali -  $\lambda_{ex} = 396 \text{ nm}$ . W cytoplazmie, nieutleniona sonda DHE wykazuje niebieską fluorescencję (BENOVI I WSP. 1998). Podobnie jak w przypadku  $mt.O_2^{\cdot-}$ , specyfikacja przygotowania komórek do pomiaru opisana jest w tabeli 6. Komórki płukano trzykrotnie buforem PBS ( $+Ca^{2+}/Mg^{2+}$ ), a następnie inkubowano w pożywce hodowlanej zawierającej  $0,5 \mu\text{M}$  sondę DHE przez okres 30 minut w temp.  $37^\circ\text{C}$ . Kolejno, komórki płukano trzykrotnie buforem PBS ( $+Ca^{2+}/Mg^{2+}$ ), po czym dodawano  $0,5 \text{ ml}$  świeżego buforu PBS ( $+Ca^{2+}/Mg^{2+}$ ) i mierzono fluorescencję wykorzystując czytnik płytek wielodołkowych Infinite M200Pro (Tecan, Austria).

### **3.10.3. Pomiar względnych ilości reaktywnych form tlenu (głównie nadtlenu wodoru)**

Pomiaru względnych ilości reaktywnych form tlenu dokonywano przy użyciu sondy fluorescencyjnej CM-H<sub>2</sub>DCF-DA (dwoocian 5 (i 6)-chlorometylo-2',7-dichlorodwuhydrofluoresceiny, Invitrogen) zgodnie z protokołem opisanym w OPARKA I WSP. (2016). Sonda H<sub>2</sub>DCF-DA przez długi czas uważana była jako specyficznie wykrywająca nadtlenek wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Niemniej jednak, zakres reaktywnych form tlenu wykrywanych przez wspomnianą sondę jest większy, dlatego w niniejszej pracy sonda H<sub>2</sub>DCF-DA stosowana jest do wykrywania względnych ilości RFT. H<sub>2</sub>DCF-DA łatwo przechodząc przez błonę komórkową, ulega hydrolizie w cytoplazmie przyjmując formę anionu karboksylanowego (H<sub>2</sub>DCF), który następnie ulega utlenieniu tworząc fluorescencyjny produkt - 2', 7-dichlorofluorescynę (DCF). Proces utleniania H<sub>2</sub>DCF-DA do DCF jest reakcją dwuetapową, w której w pierwszej kolejności dochodzi do utleniania głównie przez rodniki węglowe, rodniki hydroksylowe, dwutlenek azotu jak również rodniki tyłowe. Drugi etap utleniania sondy odbywa się z udziałem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (w obecności peroksydaz) oraz rodnika ponadtlenkowego co prowadzi finalnie do wzmocnienia sygnału fluorescencyjnego z sondy (GRISHAM 2013).

Specyfikację przygotowania komórek do pomiaru opisano w tabeli 6. Komórki płukano trzykrotnie buforem PBS ( $+Ca^{2+}/Mg^{2+}$ ), po czym inkubowano przez okres 30 minut

w temperaturze 37°C w buforze PBS (+Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) zawierającym 2 µM sondę CM-H<sub>2</sub>DCF-DA oraz 5 mM glukozę. Następnie, ponownie płukano komórki trzykrotnie buforem PBS (+Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) i zalewano 0,5 ml świeżego buforu PBS (+Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>). Fluorescencję mierzono wykorzystując czytnik płytek wielodołkowych Infinite M200Pro (Tecan, Austria).

### **3.11. Oznaczenie ilości białka komórkowego z wykorzystaniem barwnika sulforodaminy B (SRB)**

Metodę wykorzystującą barwnik sulforodaminę B używano po zakończonym pomiarze poziomu RFT w celu oznaczenia ilości białka komórkowego na płytkach wielodołkowych jak również do oceny cytotoksyczności chemioterapeutyka – DOX (rozdział 3.5). Metoda polega na zdolności SRB do elektrostatycznego wiązania się z białkowymi komponentami komórki, które następnie utrwala się przy użyciu 1% roztworu kwasu octowego w metanolu (SKEHAN I IN. 1990). SRB jest barwnikiem aminoksantenowym z dwiema grupami sulfonowymi, który wiąże się z zasadowymi resztami aminokwasowymi w umiarkowanie kwaśnym środowisku.

Po wykonaniu odpowiednich pomiarów poziomu RFT, komórki rosnące na płytkach 24-dołkowych (płytki 96-dołkowe w przypadku oceny cytotoksyczności DOX) utrwalało 1% roztworem kwasu octowego w metanolu, po czym umieszczano w -20°C na przynajmniej 24h. Następnie, metanol usuwano, a płytkę osuszano w temp. 37°C, po czym każdy dołek zalewano 250 µl 0,5% SRB (100 µl w przypadku oceny cytotoksyczności DOX) i inkubowano przez 1h w temp. 37°C. Po upływie godziny, roztwór SRB usuwano, zaś niezwiązanego z białkami komórkowymi SRB pozbywano się poprzez 5-krotne płukanie w 1% roztworze kwasu octowego w wodzie dejonizowanej. Płytkę osuszano w temp. 37°C, a następnie do utrwalonych i wybarwionych komórek dodawano po 1ml na dołek 10 mM buforu Tris-HCl o pH=10 (200 µl w przypadku oceny cytotoksyczności DOX) i inkubowano przez 15 minut w temp. 37°C, delikatnie wytrząsając w celu rozpuszczenia związanego z białkami barwnika. Następnie, z każdego dołka płytki 24-dołkowej przenoszono po 200 µl roztworu do dołka płytki 96-dołkowej i dokonywano odczytu absorbancji przy długości 540 nm z wykorzystaniem czytnika płytek wielodołkowych TECAN Sunrise Microplate Reader. W przypadku oceny cytotoksyczności po zakończonej 15 min. inkubacji, płytkę 96-dołkową umieszczano w czytniku i bezpośrednio dokonywano odczytu przy wspomnianej wyżej absorbancji.

### 3.12. Ocena całkowitej zdolności antyoksydacyjnej metodą ABTS

Oceny całkowitej zdolności antyoksydacyjnej dokonano w poszczególnych klonach linii nowotworowej MDA-MB-231 nietraktowanych oraz traktowanych chemioterapeutyką DOX techniką wykorzystującą kwas 2,2'-azyno-bis (3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy) (ABTS). Metoda opracowana przez MILLER I WSP. (1993) polega na określeniu zdolności redukujących kationorodnik (ABTS<sup>•+</sup>) przez przeciwutleniacze zawarte w badanej próbce. Kationorodnik jest uprzednio generowany w wyniku reakcji enzymatycznej z udziałem peroksydazy chrzanowej (HRP ang. *Horseradish peroxidase*) przyjmując niebieskozieloną barwę, która ulega zanikowi w wyniku redukcji przez przeciwutleniacze. Redukcja kationorodnika zależna jest od czasu trwania reakcji, aktywności oraz stężenia przeciwutleniacza.

W celu określenia ilości białka niezbędnej do oceny aktywności antyoksydacyjnej wykonano krzywą przedstawiającą użycie różnej ilości białka (10 µg, 20 µg, 40 µg, 50 µg, 80 µg, 100 µg, 120 µg, 150 µg, 200 µg, 300 µg, 500 µg). Na podstawie współczynnika regresji krzywej wybrano odpowiednie stężenie białka użyte w doświadczeniach (100 µg).

Przed przystąpieniem do pomiaru kinetycznego, przygotowano odpowiednie roztwory substancji podanych w poniższej tabeli.

**Tabela 14** Zastosowane w doświadczeniu roztwory/bufory

Nazwa roztworu/buforu	Stężenie wyjściowe	Stężenie finalne
Bufor fosforanowo-sodowy (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> oraz Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0,2 M	50 mM
ABTS	50 mM	2 mM
HRP	1 mM	0,25 µM
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 mM	40 µM

Poszczególne składniki połączono aby uzyskać kationorodnik ABTS<sup>•+</sup> uzyskując finalne stężenia substancji przedstawione w powyższej tabeli, a następnie przechowywano przez 3-4 h w temp. 4°C. Próbkę w ilości 10 µl (100 µg) nakładano do dołków płytki 96-dołkowej i dodawano 240 µl wcześniej przygotowanego roztworu kationorodnika ABTS<sup>•+</sup>. Próbę negatywną stanowiła próba zawierająca bufor RIPA, w którym zawieszano badane próbki. Każdą z prób nakładano w 3-krotnym powtórzeniu. Stopień redukcji kationorodnika mierzono poprzez pomiar kinetyczny absorbancji z wykorzystaniem czytnika płytek wielodołkowych



TECAN Infinite M Nano przy długości 730 nm przez 15 minut, dokonując pomiaru w następujących punktach czasowych: 0, 5, 10, 15 min. Wynik wyrażano w mg troloxu w przeliczeniu na ilość białka.

### **3.13. Ocena poziomu śmierci komórkowej (apoptozy) przy użyciu aneksyny V i jodku propidyny**

Poziom apoptozy komórek analizowano w poszczególnych klonach linii nowotworowej MDA-MB-231 nietraktowanych oraz traktowanych chemioterapeutyką DOX. W tym celu użyto komercyjnie dostępny zestaw do pomiaru apoptozy w komórkach - FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences) wykorzystując techniki cytometrii przepływowej.

Apoptoza stanowi naturalny, ściśle regulowany proces fizjologicznej śmierci komórki, któremu towarzyszą zróżnicowane mechanizmy biochemiczne zależne od poziomu ATP. Zmiany morfologiczne wykazywane przez komórki apoptotyczne obejmują: utratę asymetrii błony komórkowej, pęcznienie i kurczenie komórek, fragmentację jądra komórkowego i w końcu kondensację oraz fragmentację materiału genetycznego (ELMORE 2007). Wspomniana asymetria błony komórkowej jest charakterystyczna dla komórek prawidłowych i polega w skrócie na występowaniu cząsteczek fosfatydyloseryny wyłącznie na wewnętrznej powierzchni błony komórkowej, które w konsekwencji procesu apoptozy przedostają się na zewnętrzną jej stronę już w pierwszych etapach programowanej śmierci komórki. Fosfatydyloseryna jest specyficznie wiązana przez aneksynę V w obecności jonów wapnia, pozwalając jednocześnie na detekcję komórek wczesnoapoptotycznych. Ponadto, zastosowanie jodku propidyny (PI) – fluorescencyjnego barwnika interkalującego do kwasów nukleinowych umożliwia oznaczenie komórek z uprzepuszczelnioną błoną komórkową, a zarazem identyfikację komórek późnoapoptotycznych bądź martwych.

W celu określenia poziomu apoptozy komórek poszczególne klony linii MDA-MB-231 wysiewano w sposób określony w tabeli 6. Do pomiaru oceny apoptozy z prowadzonej hodowli pobierano 150 000 komórek, a następnie wirowano przy prędkości 200 x g. Supernatant usuwano, zaś osad komórek zalewano 100 µl buforu do aneksyny V rozcieńczonego uprzednio 10-krotnie w wodzie dejonizowanej. Kolejno, dodawano 4 µl roztworu aneksyny V sprzężonej z FITC oraz 4 µl roztworu jodku propidyny, po czym wortexowano. Tak przygotowane próbki inkubowano przez 15 minut w temp. pokojowej w ciemności, a następnie dodawano 150 µl buforu do aneksyny V. Pomiaru dokonywano przy

użyciu cytometru przepływowego LSRFortessa (Becton-Dickinson), analizując sygnał pochodzący z niebieskiego lasera o długości fali 488 nm z wykorzystaniem filtrów 530/30 (aneksyna V) oraz 575/26 (jodek propidyny). Wykorzystanie cytometru przepływowego było możliwe dzięki uprzejmości i pomocy Agaty Kominek (Pracownia Cytometrii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN).

### **3.14. Wizualizacja struktury sieci mitochondrialnej**

Wizualizację struktury sieci mitochondrialnej dokonano w komórkach klonów linii nowotworowej MDA-MB-231 nietraktowanych i traktowanych chemioterapeutyką DOX. W tym celu komórki wysiewano na odtłuszczone szklane szkiełka (umieszczone wcześniej w dołkach płytki 24-dołkowej) w gęstości podanej w tabeli 6. Po upływie 24h komórki traktowano DOX, zaś w liniach klonów nietraktowanych zmieniano pożywkę na świeżą. Po 72h od wysiania komórki inkubowano z 20 nM sondą Mito Red (Sigma-Aldrich) przez 30 minut w ciemności w temperaturze 37°C. Kolejno, komórki trzykrotnie przepłukiwano pożywką hodowlaną oraz utrwalano w roztworze 4% paraformaldehydu (PFA) o pH=7,2 przez 15 minut w ciemności w temperaturze pokojowej. Następnie, komórki płukano dwukrotnie w PBS przez 5 minut, po czym inkubowano przez 3 minuty z barwnikiem fluorescencyjnym Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) (rozcieńczenie 1:10 000) w celu uwidocznienia jąder komórkowych i ponownie płukano w PBS. Sporządzenie preparatów mikroskopowych odbywało się poprzez wyjęcie szklanego szkiełka z dołka płytki 24-dołkowej oraz jego zatopienie w kropli roztworu Glycergel Mounting Medium, Aqueous (Agilent Dako) na szkiełku podstawowym. Zdjęcia przygotowanych preparatów wykonywano przy pomocy mikroskopu konfokalnego z wirującym dyskiem Zeiss Spinning Disc (powiększenie 100x) z losowo wybranych pól. Analizę morfologii mitochondriów na podstawie uzyskanych zdjęć mikroskopowych wykonano w oparciu o program Image J (NIH, Bethesda, USA) z pomocą dr Bernadety Michalskiej.

### **3.15. Analiza porównawcza spektrometrii mas**

Analizie porównawczej spektrometrii mas poddano próbki pochodzące z badanych linii komórkowych: MCF-10A, MDA-MB-231 oraz MCF-7 jak również klonów linii MDA-MB-231 oraz MCF-7 uzyskanych w wyniku przeprowadzonych modyfikacji genetycznych.

Próbki przygotowano w formie osadu komórkowego. Analizę badanych prób wykonano w Thermo Fisher Center For Multiplexed Proteomics (Harvard Medical School) w Bostonie (USA). Analiza statystyczna jak również interpretacja otrzymanych wyników została przeprowadzona przez mnie samodzielnie z wykorzystaniem dedykowanych programów: Taverna Workbench 2.5 oraz Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>) we współpracy z pracownią kierowaną przez dr hab. Michała Dąbrowskiego (Pracownia Bioinformatyki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN).

### **3.16. Przygotowanie homogenatu z próbek guzów litych mózgu**

Próbki guzów litych ośrodkowego układu nerwowego pacjentów pediatrycznych przechowywane były w ciekłym azocie. Pozyskane fragmenty guzów cięto skalpelem i umieszczano w 50  $\mu$ l buforu do homogenizacji zawierającego koktajl inhibitorów proteaz oraz fosfataz (skład w tabeli 15). Następnie próbki łagodnie homogenizowano z wykorzystaniem schłodzonego wcześniej homogenizatora tkanek Potter Elvehjem (Life Science). Otrzymany w ten sposób homogenat zawieszano w schłodzonym ( $4^{\circ}\text{C}$ ), zawierającym inhibitory proteaz i fosfataz buforze lizującym do homogenizacji (skład podany w tabeli 15) w stosunku 1:2 (homogenat : bufor). Homogenaty inkubowano na lodzie przez 30 minut, mieszając co 5 minut przy użyciu wortexu, po czym wirowano przez 20 minut w temp.  $4^{\circ}\text{C}$  z prędkością  $14\ 000 \times g$  w celu pozbycia się nierozpuszczalnych tkanek i resztek komórkowych. Po odwirowaniu, supernatant zbierano do nowych próbek (umieszczając 5  $\mu$ l próbki w innej próbówce przeznaczonej do pomiaru stężenia białka), a następnie dokonywano pomiaru stężenia białka z wykorzystaniem metody Bradford. Homogenaty następnie denaturowano w redukującym buforze Laemmli'ego w stosunku 1:3 w  $95^{\circ}\text{C}$  przez 5 min. Tak przygotowane homogenaty przechowywano w temp.  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Czterdzieści dziewięć badanych próbek podzielono na mniejsze grupy, które były poddane rozdzielaniu elektroforetycznemu na odrębnych żelach. Każda z wydzielonych grup próbek zawierała fizycznie tę samą wewnętrzną próbkę kontrolną (próbka referencyjna, oznaczona „Ref”), co pozwoliło nam później połączyć i porównać wyniki z poszczególnych blotów.

### 3.17. Analiza statystyczna

Doświadczenia zaplanowane w ramach niniejszej pracy doktorskiej wykonano w 3 – 5 powtórzeniach biologicznych. Uzyskane wyniki przedstawiano w postaci średniej arytmetycznej z wszystkich powtórzeń uwzględniając odchylenie standardowe ( $\pm$ SD). W celu wskazania istotności statystycznej przeprowadzono w pierwszej kolejności testy określające zgodność z rozkładem normalnym (krzywej Gaussa) wykorzystując test Shapiro Wilk. Następnie, w zależności od uzyskanego wyniku, przeprowadzono test wariancji jednoczynnikowej ANOVA (zgodność z rozkładem normalnym) oraz testy post-hoc Tukeya dla porównań wielokrotnych bądź wykorzystywano test Kruskala – Wallisa (będący nieparametrycznym odpowiednikiem jednoczynnikowej ANOVA) w przypadku braku zgodności z rozkładem normalnym. Powyższe testy wykorzystano przy określeniu istotności statystycznej w rozdziałach 4.1 oraz 4.2. Do określenia istotności statystycznej wyników zamieszczonych w rozdziale 4.3 zastosowano test wariancji wieloczynnikowej ANOVA oraz testy post-hoc Tukeya. Ponadto, w przypadku wyników zaprezentowanych w rozdziale 4.4 zastosowano test wariancji jednoczynnikowej ANOVA, zaś w przypadku testów porównań wielokrotnych wykorzystano test-t z korektą Bonferroniego, jak również test nieparametryczny rang Wilcoxon. Za istotne statystycznie uznawano wyniki przy poziomie istotności  $p < 0,05$ . Wykorzystano następujące oznaczenia: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Istotność statystyczną obliczano z wykorzystaniem programu GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, San Diego, CA).

### 3.18. Roztwory i odczynniki wykorzystane w doświadczeniach

W tabeli 15 przedstawiono zestawienie roztworów i buforów jak również odczynników (tabela 16) użytych w niniejszej pracy doktorskiej.

**Tabela 15** Lista roztworów i buforów stosowanych w doświadczeniach

Nazwa	Skład roztworu/ buforu
<b>Bufor do lizy komórek i tkanek (RIPA)</b>	50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% triton X-100, 0,1% dodecylosiarczan sodu (SDS), 1% deoksycholalan sodu, mieszanina inhibitorów proteaz i fosfataz (dodawana w rozcieńczeniu 1: 100 bezpośrednio przed użyciem)
<b>Bufor lizujący do immunoprecypitacji</b>	50mM NaCl, 50mM Tris-HCl (pH 7,55), 0,1% Nonident P40, mieszanina inhibitorów proteaz i fosfataz (dodawana w rozcieńczeniu 1:100 bezpośrednio przed użyciem)

<b>Bufor lizujący do homogenizacji</b>	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 1% deoksycholan sodu, mieszanina inhibitorów proteaz i fosfataz w rozcieńczeniu 1:100
<b>Bufor obciążający 5x stężony</b>	62 mM Tris (pH 6,8), 3% SDS, 20% glicerol, 5% β-merkaptotanol, 0,06% bromofenol blue, woda miliQ
<b>Roztwór do żelu zagęszczającego</b>	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 8 mM EDTA, 4% SDS
<b>Roztwór do żelu rozdzielającego</b>	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 8 mM EDTA, 4% SDS
<b>Roztwór do rozdzielania elektroforetycznego</b>	25 mM Tris, 192 mM glicyna, 0,1% SDS
<b>Roztwór do transferu białka na membranę nitrocelulozową</b>	25 mM Tris, 192 mM glicyna, 20% SDS
<b>Bufor do blokowania miejsc niespecyficznego wiązania białek do membrany i zawieszania przeciwciał pierwszo- i drugorzędowych</b>	Odyssey Blocking Buffer w rozcieńczeniu 1:1 w buforze TBS-T
<b>Roztwór TBS-T</b>	0,01 M Tris-HCl (pH 7,5), 0,1 M NaCl, 0,01% Tween-20
<b>Roztwór 0,5% SRB</b>	1% kwas octowy, 0,5% SRB
<b>Bufor fosforanowo-sodowy</b>	0,2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
<b>Roztwór 10x PBS (do przygotowania 4% PFA)</b>	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 43 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O, 14 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O
<b>Pożywka Agilent Seahorse Glycolytic rate assay</b>	DMEM, 10 mM glukoza, 2 mM glutamina, 5 mM Hepes, 1 mM pirogronian pH 7,4
<b>Bufor do homogenizacji</b>	75 mM sacharoza, 225 mM mannitol, 5 mM Tris HCl, mieszanina inhibitorów proteaz (1,04 mM AEBSF, 0,8 M aprotyniny, 0,04 mM bestatyny, 0,14 mM E-64, 0,02 mM leupeptyny, 0,015 mM pepstatyny A) i fosfataz (1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> oraz 10 mM NaF) użytych w rozcieńczeniu 1:100

**Tabela 16** Lista odczynników użytych w pracy

<b>Nazwa odczynnika</b>	<b>Firma</b>
A/G (Protein A/G PLUS-Agarose Immunoprecipitation Reagent)	Santa Cruz Biotechnology
ABTS	Sigma-Aldrich
Agar (LB-agar)	BioShop
Akryloamid/bis-akryloamid (30% Acrylamide/Bis Solution 37.5:1)	BioRad
Albumina surowicy bydlęcej	Sigma-Aldrich
Alkohol etylowy	Chem-pur
Alkohol metylowy	Chem-pur, POCH Basic
Błękit bromofenolowy	BioRad
Buforowany roztwór soli fizjologicznej, PBS i buforowany roztwór soli fizjologicznej PBS z jonami wapnia i magnezu, PBS (+ Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> )	IITD, Wrocław
CCCP	Sigma-Aldrich
CM-H <sub>2</sub> DCF-DA	Invitrogen
Deoksycholan sodu	Sigma-Aldrich
DHE	Invitrogen

DMSO	Sigma-Aldrich
Dodecylosiarczan sodu	Sigma-Aldrich
Dokсорubicyna	Sigma-Aldrich
EDTA	Sigma-Aldrich
FBS	Gibco, Life Technologies
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences
GenElute HP Endotoxin-Free Plasmid Maxiprep Kit	Sigma-Aldrich
Glicerol	Sigma-Aldrich
Glicyna	BioRad
Glukoza	Sigma-Aldrich
Glycergel Mounting Medium, Aqueous	Agilent Dako
Guava® Instrument Cleaning Fluid (ICF)	Merck Millipore
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich
JC-1	Invitrogen
Kanamycyna	Sigma-Aldrich
KCl	Sigma-Aldrich
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich
Kwas octowy	POCH Basic
L-glutamina	Sigma-Aldrich
Marker masy cząsteczkowej (Prestained Protein Lader)	ThermoFisher Scientific, Life Technologies
Mieszanina inhibitorów fosfataz (Phosphatase Inhibitor Cocktail EDTA-free-100x)	Sigma-Aldrich
Mieszanina inhibitorów proteaz (Protease Inhibitor Cocktail EDTA-free-100x)	Sigma-Aldrich
MitoRed	Sigma-Aldrich
MitoSox Red	Invitrogen
Muse® System Check Kit	Merck Millipore
Muse™ Count&Viability Reagent	Merck Millipore
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich
NaCl	Sigma-Aldrich
Nadsiarczan amonu	BioRad
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich
Nonident-P40	Sigma-Aldrich
Odyssey Blocking Buffer	Li-Cor, Bioscience
Oligomycyna	Sigma-Aldrich
OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit	Merck Millipore
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich

Penicylina/Streptomycyna	Sigma-Aldrich
Peroksydaza chrzanowa	Sigma-Aldrich
Pożywka hodowlana DMEM	Lonza
Pożywka hodowlana Mammary Epithelial Cell Growth Medium	PromoCell
Pożywka LB	BioShop
Pożywka SOC	ABO
Sól tetrazolowa XTT	Sigma-Aldrich
Sulforodamina B	Sigma-Aldrich
TEMED	BioRad
Tris	BioRad
Triton X-100	BioRad
Trypsyna	Sigma-Aldrich
Tween-20	Sigma-Aldrich
$\beta$ -merkaptoetanol	BioRad
Seahorse XF Calibrant	Agilent Technologies
Seahorse cartridge	Agilent Technologies
Glycolytic Rate Assay Kit	Agilent Technologies
jetPRIME®	Polyplus Transfection®

## 4. WYNIKI

W niniejszej rozprawie doktorskiej uzyskane wyniki będą prezentowane w układzie odpowiadającym kolejności założonych celów badawczych opisanych w rozdziale 2.

### **4.1. Badania porównawcze ludzkich linii raka sutka i odpowiadającej im linii komórek kontrolnych w kontekście prooksydacyjnej ścieżki białka p66Shc, mitochondrialnych parametrów bioenergetycznych jak również poziomu RFT oraz statusu ochrony antyoksydacyjnej**

Dostępne dane literaturowe jasno wskazują, że białko adaptorowe p66Shc może mieć istotny wpływ nie tylko na odpowiedź komórki na stres oksydacyjny lecz również brać udział w takich procesach jak apoptoza, regulacja proliferacji czy migracja komórek. Co ciekawe, wszystkie wspomniane procesy są niezwykle istotne z punktu widzenia komórek nowotworowych. Mianowicie, wzmożona proliferacja, brak wrażliwości na czynniki wzrostowe czy „omijanie” zaprogramowanej śmierci komórki to jedne z licznych zmian, które odróżniają komórki nowotworowe od komórek niezmiennych. Wszystko to sprawia, że nowotwory są niezwykle trudne do leczenia. Dokładniejsze poznanie udziału białka p66Shc w metabolizmie komórek nowotworowych wymaga dodatkowych badań, szczególnie dlatego, że molekularne mechanizmy zaangażowane w procesy wzrostu nowotworów, ich przeprogramowaniu metabolicznym oraz przerzutach wydają się być wciąż nieznane. Biorąc pod uwagę wskazane powyżej aspekty, w pierwszym etapie mojej pracy skoncentrowałam się na zbadaniu różnic w metabolizmie komórek nowotworowych wynikających z różnego poziomu białka p66Shc. W tym celu porównałam dwie linie nowotworowe (MDA-MB-231 oraz MCF-7) jak również odpowiadającą im linię kontrolną (MCF-10A). Szczegółowy opis wykorzystanych linii komórkowych znajduje się w tabeli 3 w rozdziale 3. Należy podkreślić, iż dobór wybranych linii raka sutka pokierowany był głównie różnicami w poziomie białka p66Shc. Po pierwsze chciałam sprawdzić czy i jak dwie niezależne linie raka sutka z różnym poziomem białka p66Shc będą różnić się w kontekście prooksydacyjnej ścieżki p66Shc, mitochondrialnych parametrów bioenergetycznych jak również stresu oksydacyjnego oraz statusu ochrony antyoksydacyjnej. Dodatkowo, wybór linii komórkowych z różnym poziomem białka p66Shc był kluczowy w kontekście przeprowadzenia modyfikacji genetycznych linii MDA-MB-231 oraz MCF-7 mających na celu podwyższenie bądź



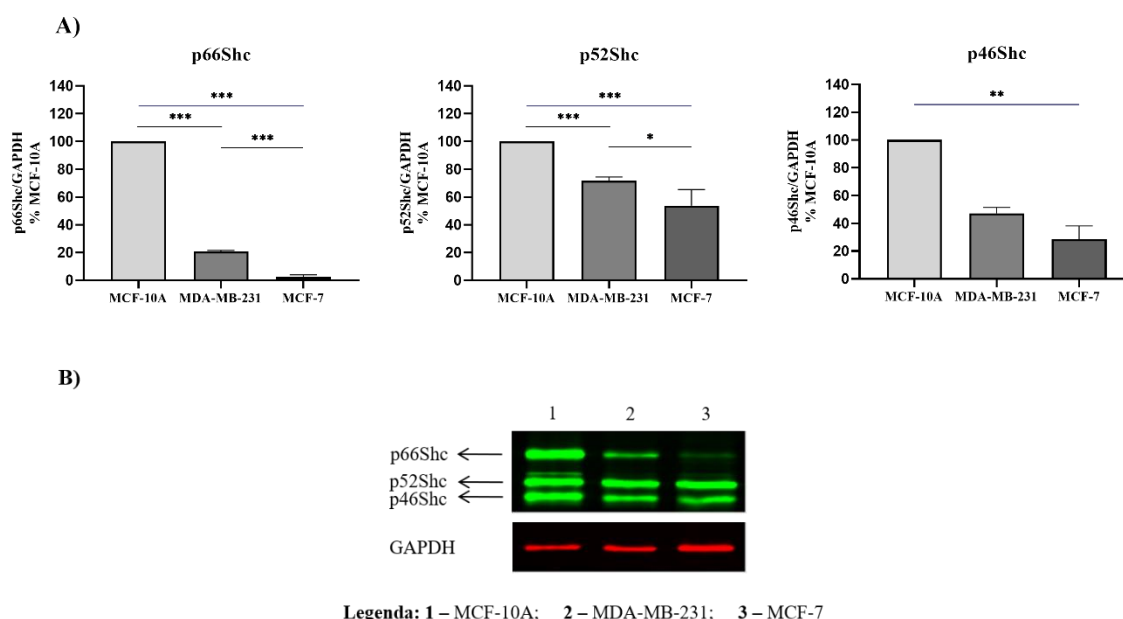
obniżenie poziomu białka p66Shc w tych komórkach (bardziej szczegółowy opis przeprowadzonych modyfikacji znajduje się w rozdziale 3.1 oraz 4.2.1 niniejszej pracy doktorskiej). Ponadto, chciałabym zwrócić uwagę, na zastosowane w niniejszej pracy doktorskiej (zwłaszcza w rozdziale 4.1) określenie linii nowotworowych, a mianowicie: „linia MDA-MB-231 ze względnie wyższym poziomem białka p66Shc” oraz „linia MCF-7 ze względnie niższym poziomem białka p66Shc”. Określenie „wyższy – niższy” wynika z porównania poziomu białka p66Shc pomiędzy wyłącznie liniami nowotworowymi MDA-MB-231 oraz MCF-7 (linia MDA-MB-231 wykazuje wyższy w stosunku do linii MCF-7 poziom białka p66Shc i odwrotnie).

W tej części swojej pracy doktorskiej, postanowiłam ocenić nie tylko poziom białka p66Shc ale również pozostałych izoform z rodziny ShcA (p46Shc i p52Shc) w komórkach nowotworowych i kontrolnych. Sprawdziłam również czy odmienny poziom białka p66Shc w badanych liniach nowotworowych (MDA-MB-231 oraz MCF-7) może być wynikiem mutacji w genie *SHC1*. Ponadto, w celu lepszego poznania funkcji p66Shc w komórkach nowotworowych wnikliwie przeanalizowałam i porównałam fosforylację białka p66Shc w reszcie Ser36 (unikatowej dla izoformy p66Shc). Zbadałam również prooksydacyjną ścieżkę białka p66Shc, mierząc poziom zaangażowanych w nią białek: kinazy białkowej C $\beta$  (biorącej udział w aktywacji prooksydacyjnych właściwości białka p66Shc), fosforylację tego białka w reszcie Ser660 (Ser660-PKC $\beta$ ), poziom białka PIN1 (odpowiedzialnego za izomeryzację) jak również PP2A (odpowiedzialnej za defosforylację białka p66Shc). Następnie, w badanych komórkach nowotworowych i komórkach kontrolnych zmierzyłam poziom RFT oraz status ochrony antyoksydacyjnej – poziom cytozolowej dysmutazy ponadtlenkowej (SOD1), mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej (SOD2), katalazy oraz reduktazy glutationowej (GR). Co więcej, w celu uzyskania szczegółowej charakterystyki porównawczej badanych linii komórkowych zmierzyłam także potencjał na wewnętrznej błonie mitochondrialnej (mt.  $\Delta\Psi$ ) oraz oznaczyłam poziom wybranych podjednostek OXPHOS.

#### **4.1.1. Charakterystyka poziomu poszczególnych izoform białek z rodziny ShcA**

Białko p66Shc należy do rodziny białek adaptorowych ShcA, do której zalicza się trzy izoformy: p66Shc, p52Shc oraz p46Shc, kodowane przez ten sam gen *SHC1*. Niemniej jednak, białko p66Shc znacząco odbiega od pozostałych izoform nie tylko pod względem budowy funkcjonalnej (co zostało dokładnie opisane we wstępie rozdziału 1 niniejszej pracy) lecz również pełnionych w komórce funkcji. Szereg danych literaturowych wskazuje, iż

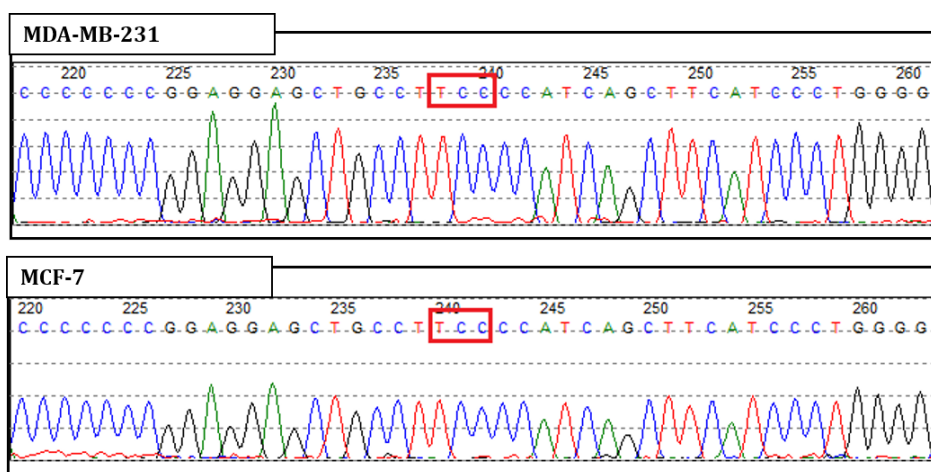
izoformy p52Shc oraz p46Shc są zaangażowane głównie w sygnalizację związaną ze szlakiem Ras/Erk (który jest odpowiedzialny za przekazywanie sygnałów proliferacyjnych), w wyniku fosforylacji określonych reszt tyrozyny (trzy główne reszty tyrozyny obecne w domenie CH1: Y239/240, Y317). Fosforylacja określonych reszt tyrozyny zależna jest od typu komórki i/lub rodzaju receptorów. Z kolei białko p66Shc, pełni dokładnie odwrotną funkcję – czyli negatywnego regulatora proliferacji (gdy jest fosforylowane w określonych resztach tyrozyny). Dodatkowo bierze również udział w odpowiedzi komórki na stres oksydacyjny czemu towarzyszy fosforylacja białka p66Shc w reszcie Ser36. Wspomniane procesy mają niezwykle istotne znaczenie w kontekście „funkcjonowania” komórek nowotworowych, dlatego też w pierwszej kolejności sprawdziłam poziom białek p66Shc, p52Shc oraz p46Shc w badanych liniach komórkowych. Uzyskane przeze mnie wyniki (ryc. 15A, B) wskazują, że poziom wszystkich izoform należących do rodziny białek ShcA w obu badanych liniach nowotworowych (MDA-MB-231 oraz MCF-7) jest obniżony w stosunku do linii kontrolnej (MCF-10A). Najniższy poziom badanych białek ShcA odnotowałam w linii MCF-7 (ryc. 15A). Największe różnice pomiędzy badanymi liniami komórkowymi zaobserwowałam w poziomie białka p66Shc (\*\*\*)  $p < 0,001$ ). Zarówno linia MDA-MB-231 (ze względnie wyższym poziomem p66Shc) jak i MCF-7 (ze względnie niższym poziomem p66Shc) różnią się istotnie od linii kontrolnej MCF-10A. Może to świadczyć o pewnej formie adaptacji komórek nowotworowych np. mającej na celu obniżenie poziomu białka p66Shc (będącego negatywnym regulatorem proliferacji), zwiększając ich potencjał proliferacyjny.



**Ryc. 15 Poziom poszczególnych izoform białek z rodziny ShcA.** Poziom poszczególnych białek wystandaryzowano w odniesieniu do białka referencyjnego GAPDH (A); przykładowy wynik analizy Western Blot (B) \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

#### 4.1.2. Sekwencjonowanie genu *SHC1* kodującego białko p66Shc

W celu weryfikacji czy obserwowane różnice w poziomie białka p66Shc pomiędzy badanymi liniami nowotworowymi nie są wynikiem występowania mutacji w genie kodującym białko p66Shc, postanowiłam sprawdzić sekwencję genu *SHC1*. Badania zostały przeprowadzone w ramach współpracy z Pracownią Genetyki Molekularnej Instytutu „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka” i wykonane przez panią dr n. med. Elżbietę Ciarę. Przeprowadzona analiza wskazuje, że w badanych eksonach nie ma zmian w sekwencji nukleotydowej. Wskazuje to na to, że różnice w poziomie p66Shc pomiędzy liniami MDA-MB-231 (ze względnie wyższym poziomem p66Shc) oraz MCF-7 (ze względnie niższym poziomem p66Shc) nie są związane z występowaniem mutacji w genie *SHC1*.



Ryc. 16 Chromatogram z sekwencjonowania genu *SHC1*

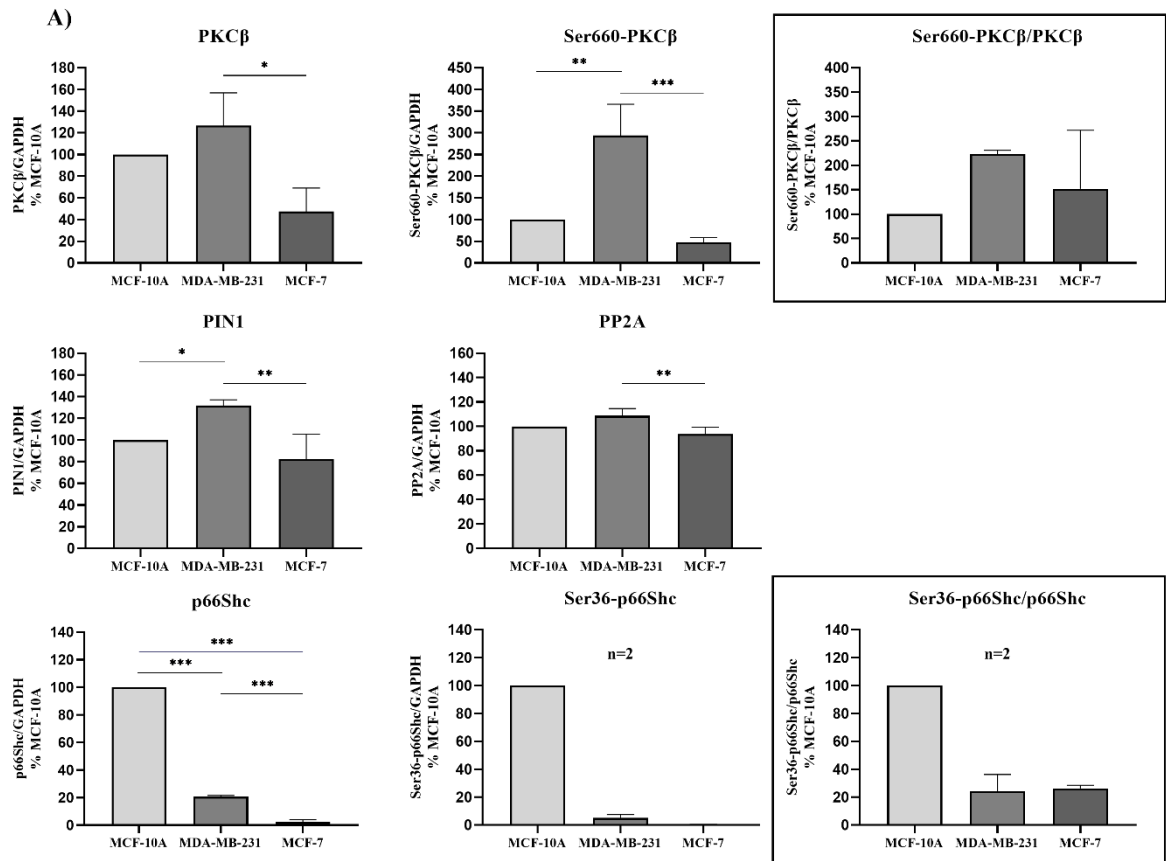
Ponadto, charakterystyczna wyłącznie dla białka p66Shc reszta Ser36 (odpowiedzialna za udział białka p66Shc w odpowiedzi komórki na stres oksydacyjny) także nie jest zmutowana (na ryc. 16 czerwoną ramką zaznaczono poprawną sekwencję nukleotydową). W tabeli poniżej znajdują się krótka notatka dotycząca sekwencjonowania poszczególnych eksonów genu *SHC1*.

Tabela 17 Informacja na temat zsekwencjonowanych eksonów genu *SHC1*

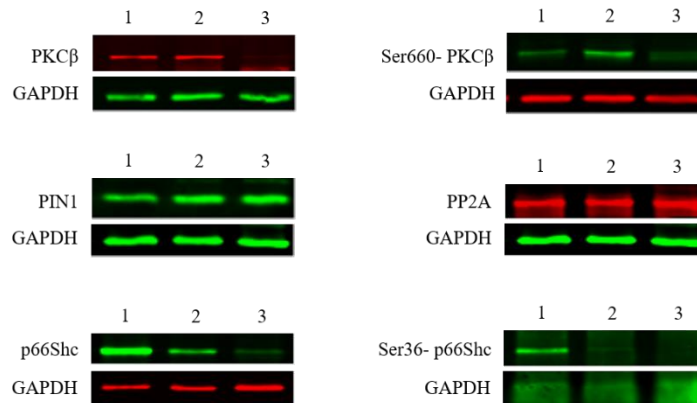
Gen	<i>SHC1</i> NM_183001.4	
	MDA-MB-231	MCF-7
<b>Ekson 1</b>	Sekwencja prawidłowa również w <b>reszcie Ser36</b>	Sekwencja prawidłowa również w <b>reszcie Ser36</b>
<b>Ekson 2 - 12</b>	Sekwencje prawidłowe	

#### 4.1.3. Prooksydacyjna ścieżka białka p66Shc

Oprócz przedstawionej powyżej analizy poziomu poszczególnych izoform ShcA, oznaczyłam także poziom białek zaangażowanych w prooksydacyjną ścieżkę białka p66Shc (PKC $\beta$ , Ser660- PKC $\beta$ , PIN1 oraz PP2A). Uzyskane wyniki wskazują na istotne różnice w poziomie analizowanych białek w badanych liniach raka sutka: MDA-MB-23, MCF-7 oraz MCF-10A (ryc. 17A). W przypadku kinazy białkowej C $\beta$  nie zaobserwowałam różnic pomiędzy liniami nowotworowymi a badaną linią kontrolną (MCF-10A). Różnice występują natomiast pomiędzy obiema liniami nowotworowymi, gdzie najwyższy poziom PKC $\beta$  obserwuje w linii MDA-MB-231 (ze względnie wyższym poziomem białka p66Shc), natomiast najniższy w linii MCF-7 (ze względnie niższym poziomem białka p66Shc). Podobnie jest w przypadku ufosforylowanej formy kinazy białkowej C $\beta$  (fosforylacja PKC $\beta$  w reszcie Ser660) odpowiedzialnej za aktywację właściwości prooksydacyjnych białka p66Shc. Tutaj również zauważyłam najwyższy poziom fosforylacji tego białka w linii MDA-MB-231, zaś najniższy w linii MCF-7. Dodatkowo linia MDA-MB-231 (ze względnie wyższym poziomem białka p66Shc) wykazuje najwyższy (istotny statystycznie) poziom fosforylacji kinazy białkowej C $\beta$  w porównaniu z linią kontrolną – MCF-10A. Dokładnie ta sama zależność dotyczy poziomu białka PIN1. Najwyższy poziom tego białka zaobserwowałam w komórkach linii MDA-MB-231 (ze względnie wyższym poziomem białka p66Shc), a najniższy w komórkach linii MCF-7 (ze względnie niższym poziomem białka p66Shc). W przypadku poziomu białka PP2A nie zaobserwowałam różnic pomiędzy liniami nowotworowymi a linią kontrolną. Podobnie do analizowanych powyżej białek (PKC $\beta$  oraz PIN1), najwyższy poziom białka PP2A zaobserwowałam w linii MDA-MB-231 zaś najniższy w komórkach MCF-7. Obserwowane zależności w poziomie białek zaangażowanych w prooksydacyjną ścieżkę białka p66Shc w badanych liniach nowotworowych wydają się tłumaczyć nieco wyższy poziom ufosforylowanej formy p66Shc (w reszcie Ser36 odpowiedzialnej za jego właściwości prooksydacyjne) w linii MDA-MB-231 (ze względnie wyższym poziomem białka p66Shc) w porównaniu z linią MCF-7 (ze względnie niższym poziomem białka p66Shc). Interesujące wydaje się natomiast to, że linia kontrolna MCF-10A wykazuje zdecydowanie najwyższy poziom fosforylacji białka p66Shc w reszcie Ser36. Należy jednak zwrócić uwagę, iż metoda immunoprecypitacji, mająca na celu detekcję fosforylacji w reszcie Ser36 została powtórzona tylko dwukrotnie. Niemniej jednak, stosunek ten w przypadku białka p66Shc (Ser36) wydaje się być na zbliżonym poziomie w obu badanych liniach.



**B)**



Legenda: 1 – MCF-10A; 2 – MDA-MB-231; 3 – MCF-7

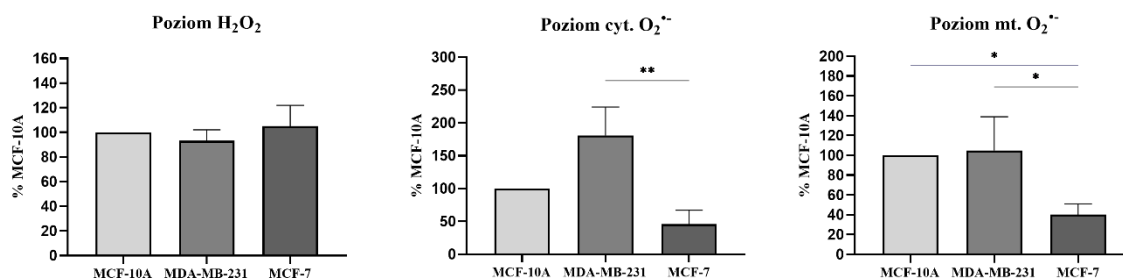
**Ryc. 17** Poziom białek biorących udział w kaskadzie prooksydacyjnej ścieżki p66Shc. Poziom poszczególnych białek wystandaryzowano w odniesieniu do białka referencyjnego GAPDH (A); przykładowy wynik analizy Western Blot (B) \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001

#### **4.1.4. Poziom reaktywnych form tlenu oraz wybranych enzymów antyoksydacyjnych w linii kontrolnej MCF-10A i liniach nowotworowych: MDA-MB-231 i MCF-7**

Od wielu lat białko adaptorowe p66Shc (poprzez obecność unikatowej dla tego białka reszty Ser36) jest intensywnie badane głównie w kontekście jego udziału w odpowiedzi komórki na stres oksydacyjny. W związku z tym, kolejnym celem mojej pracy była próba korelacji poziomu białka p66Shc jak również poziomu jego fosforylacji w reszcie Ser36 z poziomem reaktywnych form tlenu w komórkach nowotworowych. Postanowiłam sprawdzić czy komórki nowotworowe linii MDA-MB-231 o względnie wyższym poziomie białka p66Shc w porównaniu do linii MCF-7 będą również charakteryzowały się odpowiednio wyższym poziomem RFT. Dodatkowo, chciałam określić jaki będzie poziom reaktywnych form tlenu w komórkach linii kontrolnej (MCF-10A), które charakteryzuje zdecydowanie najwyższy poziom białka p66Shc w stosunku do obu badanych linii raka sutka: MDA-MB-231 oraz MCF-7. Oprócz potencjalnych różnic w poziomie RFT skupiłam się także na poziomie podstawowych enzymów antyoksydacyjnych. Dlatego też, na tym etapie pracy oznaczyłam względny poziom RFT (głównie w formie nadtlenu wodoru), poziom anionorodnika obecnego w macierzy mitochondrialnej oraz poziomu anionorodnika ponadtlenu zlokalizowanego w cytoplazmie.

Analiza względnego poziomu RFT (głównie w postaci  $H_2O_2$ ) nie wykazała znaczących różnic zarówno pomiędzy wybranymi liniami nowotworowymi: MDA-MB-231 oraz MCF-7 (różniącymi się poziomem białka p66Shc) jak również pomiędzy żadną z linii nowotworowych a linią kontrolną (MCF-10A) (ryc. 18). Co ciekawe, istotne statycznie różnice widoczne są z kolei w poziomie obu anionorodników ponadtlenu zarówno cytozolowego jak i mitochondrialnego. W przypadku anionorodnika ponadtlenu zlokalizowanego w cytoplazmie różnice występują pomiędzy obiema liniami nowotworowymi: MDA-MB-231 oraz MCF-7 (\*\*  $p < 0,01$ ), przy jednoczesnym braku różnic pomiędzy tymi liniami a linią kontrolną (MCF-10A). Linia MDA-MB-231 (ze względnie wyższym poziomem białka p66Shc) charakteryzuje się znacząco wyższym poziomem  $cyt.O_2^{\cdot-}$  w porównaniu do linii MCF-7 (ze względnie niższym poziomem białka p66Shc). Generalnie, linia MDA-MB-231 wykazuje najwyższy, zaś linia MCF-7 najniższy poziom cytozolowego anionorodnika ponadtlenu. Podobną zależność obserwuje się także w przypadku anionorodnika ponadtlenu zlokalizowanego w macierzy mitochondrialnej, którego poziom również znacząco różni się pomiędzy obiema liniami raka sutka (MDA-MB-231 oraz MCF-7) i zdecydowanie niższy jego poziom występuje w linii MCF-7 (\*  $p < 0,05$ ). Ponadto, w

przypadku tego anionorodnika obserwuje się także istotne obniżenie jego poziomu w linii MCF-7 (ze względnie niższym poziomem białka p66Shc) w stosunku do linii kontrolnej – MCF-10A (\*  $p < 0,05$ ).

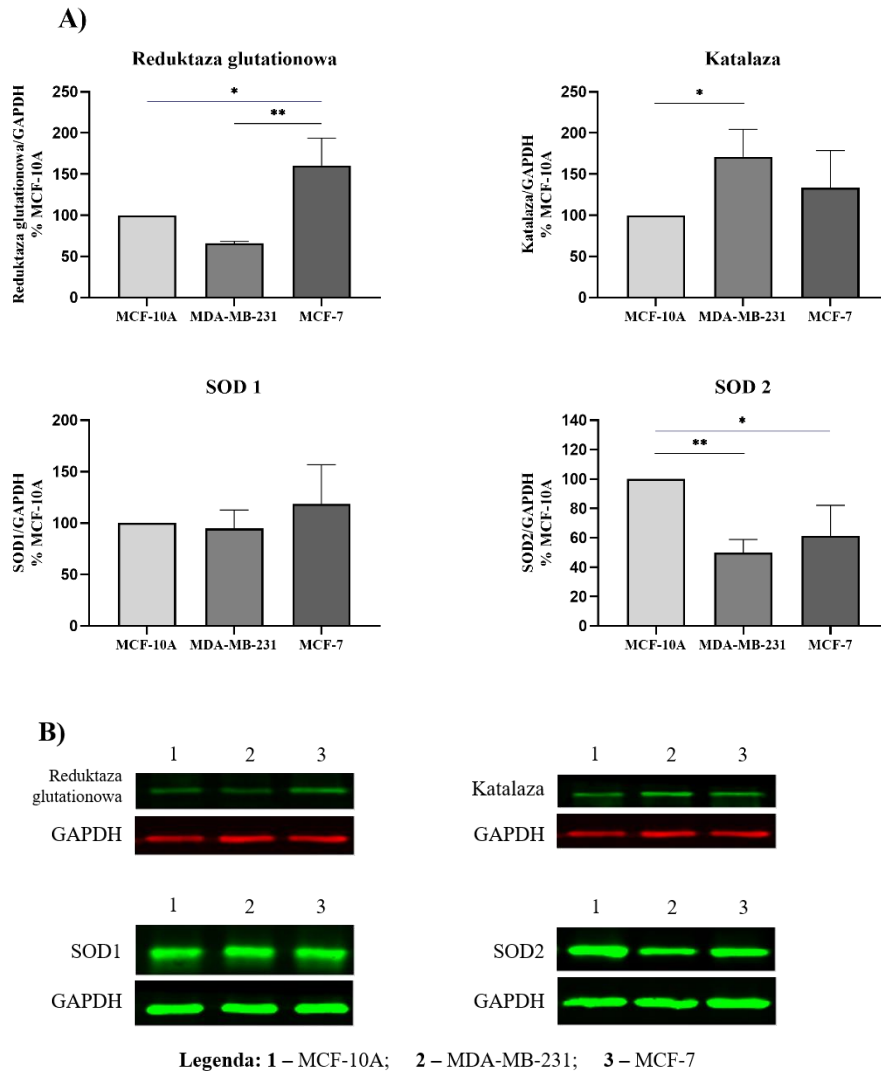


**Ryc. 18 Poziom reaktywnych form tlenu.** \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

W związku z tym, że poziom reaktywnych form tlenu zależy nie tylko od szybkości ich powstawania, ale także w dużej mierze od wydolności ochrony antyoksydacyjnej, postanowiłam także sprawdzić poziom wybranych enzymów antyoksydacyjnych odpowiedzialnych za unieszkodliwianie reaktywnych form tlenu takich jak: nadtlenek wodoru oraz anionorodników ponadtlenkowych zlokalizowanych odpowiednio w cytoplazmie oraz macierzy mitochondrialnej. Są nimi: reduktaza glutationowa (GR), katalaza, dysmutaza ponadtlenkowa 1 oraz 2 (SOD1, SOD2).

Analizując poziom reduktazy glutationowej zauważyłam znaczące różnice nie tylko pomiędzy dwiema liniami nowotworowymi (MDA-MB-231 oraz MCF-7) lecz również pomiędzy linią kontrolną MCF-10A a linią nowotworową MCF-7 (ryc. 19A). Linia MCF-7 wykazuje najwyższy poziom tego enzymu zarówno względem linii MDA-MB-231 (\*\*  $p < 0,01$ ) jak i linii MCF-10A (\*  $p < 0,05$ ). Najniższy poziom reduktazy glutationowej odnotowałam w linii nowotworowej MDA-MB-231. W przypadku katalazy (odpowiedzialnej w głównej mierze za rozkładanie nadtlenku wodoru) to zaobserwowane różnice dotyczą wyłącznie linii kontrolnej MCF-10A oraz nowotworowej MDA-MB-231. Ostatnia ze wspomnianych linii charakteryzuje się istotnie wyższym poziomem tego enzymu w stosunku do linii kontrolnej – MCF-10A (\*  $p < 0,05$ ). Wydaje się, że linia MCF-7 (ze względnie niższym poziomem białka p66Shc) również ma podwyższony poziom katalazy w stosunku do linii kontrolnej MCF-10A, jednak w tym przypadku można mówić jedynie o tendencji wzrostowej. Następnie, zbadalam poziom enzymów zaangażowanych w dysmutację anionorodników ponadtlenkowych. W przypadku enzymu SOD1 (odpowiedzialnego za unieszkodliwianie cyt. $O_2^{\bullet-}$ ) nie zauważyłam istotnych statystycznie różnic, ponieważ poziom

tego enzymu utrzymuje się na stosunkowo równym poziomie we wszystkich badanych liniach nowotworowych jak i linii kontrolnej. Różnice natomiast są widoczne w przypadku drugiej z dysmutaz ponadtlenkowych (odpowiedzialnej za unieszkodliwianie  $mt.O_2^{\cdot-}$ ), gdzie zauważyłam znacząco niższy poziom SOD2 w obu badanych liniach nowotworowych (MDA-MB-231 oraz MCF-7) w stosunku do linii kontrolnej MCF-10A. Nie zaobserwowałam natomiast różnic w poziomie SOD2 pomiędzy oboma liniami nowotworowymi: MDA-MB-231 oraz MCF-7.



**Ryc. 19 Poziom wybranych enzymów antyoksydacyjnych.** Poziom poszczególnych białek wystandaryzowano w odniesieniu do białka referencyjnego GAPDH (A); przykładowy wynik analizy Western Blot (B) \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

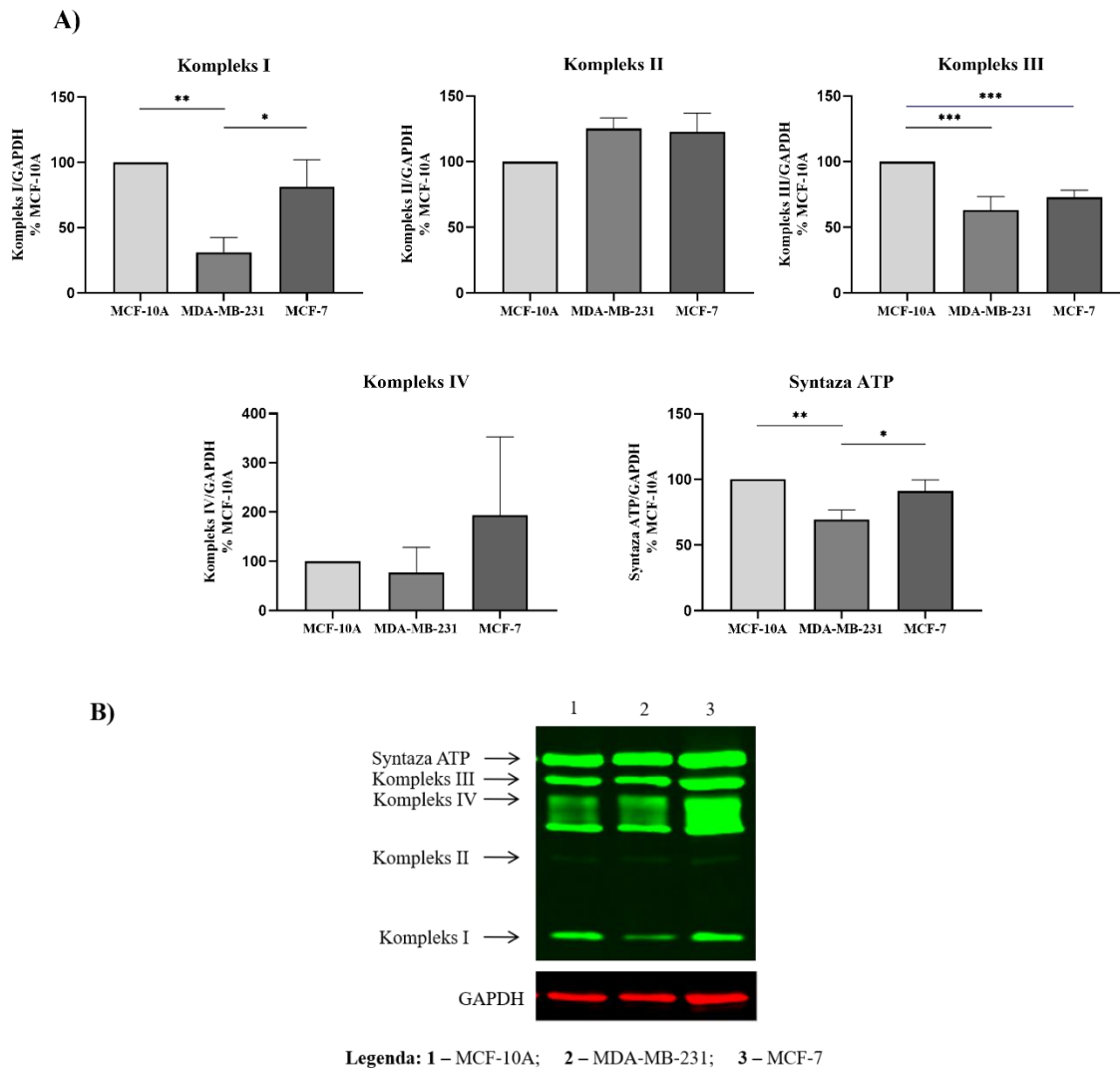


#### **4.1.5 Poziom wybranych podjednostek łańcucha oddechowego oraz potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej w linii kontrolnej MCF-10A oraz liniach nowotworowych: MDA-MB-231 i MCF-7**

Udział w szlaku przekazywania sygnału oraz w odpowiedzi komórki na stres oksydacyjny to nie jedyne funkcje jakie białko p66Shc może pełnić w komórce. Z badań przeprowadzonych przez NEMOTO & FINKIEL (2002) oraz SOLIMAN I WSP. (2014) wynika, że w niektórych typach nowotworów białko adaptorowe p66Shc może wpływać na metabolizm mitochondriów w celu utrzymania prawidłowego poziomu ATP. Zaintrygowana tym faktem, postanowiłam także określić różnice w badanych liniach komórkowych dotyczące profilu wybranych podjednostek łańcucha oddechowego oraz jeden z najczęściej oznaczanych parametrów bioenergetycznych jakim jest potencjał na wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Zdaję sobie sprawę, że potencjalne różnice wcale nie muszą być związane bezpośrednio z poziomem białka p66Shc, a mogą jedynie wynikać z różnic pomiędzy liniami komórkowymi. Jednakże, wstępne określenie tych parametrów umożliwiło mi scharakteryzowanie modelu komórkowego, który w kolejnych etapach swoich badań wykorzystałam do zaindukowania specyficznych zmian w poziomie białka p66Shc z wykorzystaniem technik biologii molekularnej (technika edycji genu CRISPR/Cas9 oraz transdukcji komórek wektorami lentiwirusowymi) w celu ustalenia korelacji pomiędzy poziomem p66Shc a metabolizmem komórek nowotworowych.

Analiza poziomu wybranych podjednostek kompleksów łańcucha oddechowego wykazała, że różnice pomiędzy linią MDA-MB-231 i MCF-7 obserwuje się w przypadku podjednostek kompleksu I oraz podjednostek syntazy ATP (ryc. 20A, B). Linia MDA-MB-231 (ze względnie wyższym poziomem białka p66Shc) charakteryzuje się istotnym statystycznie obniżonym poziomem podjednostek NDUFB8 (kompleks I) oraz ATP5A (syntaza ATP) w stosunku do linii MCF-7 (ze względnie niższym poziomem białka p66Shc). Nie zaobserwowałam natomiast różnic pomiędzy obiema liniami raka sutka w poziomie podjednostek: SDHB (kompleks II), UQCRC2 (kompleks III) oraz MTCO1 (kompleks IV) profilu OXPHOS. Niemniej jednak, poziom podjednostki MTCO1 (kompleks IV) wydaje się być wyższy w linii komórkowej MCF-7 w odniesieniu do linii MDA-MB-231, w tym jednak przypadku duże „odchylenia standardowe” wpływają na brak istotności statystycznej. Na podstawie uzyskanych wyników ciężko jest określić jednolity kierunek zmian w poziomie wybranych podjednostek OXPHOS pomiędzy linią kontrolną MCF-10A a badanymi liniami nowotworowymi. Przykładowo, linia MDA-MB-231 (ze względnie wyższym poziomem

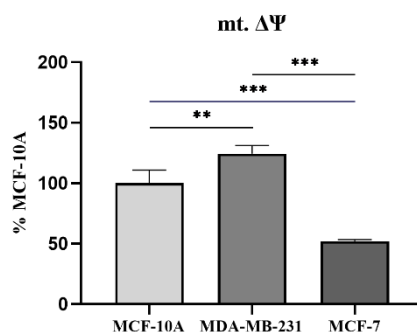
białka p66Shc) charakteryzuje się obniżonym poziomem podjednostki NDUFB8 kompleksu I, UQCRC2 kompleksu III oraz ATP5A syntazy ATP w odniesieniu do linii kontrolnej MCF-10A. Z kolei, w linii nowotworowej MCF-7 jedynie poziom podjednostki UQCRC2 kompleksu III jest niższy od wartości oznaczonej w linii kontrolnej MCF-10A.



**Ryc. 20 Poziom wybranych podjednostek kompleksów łańcucha oddechowego.** Poziom poszczególnych białek wystandaryzowano w odniesieniu do białka referencyjnego GAPDH (A); przykładowy wynik analizy Western Blot (B) \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

Następnie zmierzyłam potencjał na wewnętrznej błonie mitochondrialnej, którego pomiar wykazał istotne różnice pomiędzy wszystkimi badanymi liniami. Przeprowadzone pomiary potencjału z wykorzystaniem sondy JC-1 pokazały, że linia nowotworowa MDA-MB-231 charakteryzuje się najwyższym, natomiast linia MCF-7 najniższym potencjałem na wewnętrznej błonie mitochondrialnej (ryc. 21). W tym przypadku, linia MCF-7 (ze względnie niższym poziomem białka p66Shc) miała najniższy mt.  $\Delta\Psi$ . Niestety nie można mówić o

bezpośredniej zależności pomiędzy potencjałem a poziomem białka p66Shc, bowiem komórki kontrolne (wykazujące najwyższy poziom białka p66Shc) mają niższy potencjał w porównaniu z komórkami nowotworowymi MDA-MB-231 (które w stosunku do linii kontrolnej MCF-10A mają niższy poziom białka p66Shc).



Ryc. 21 Potencjał na wewnętrznej błonie mitochondrialnej; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

#### 4.2. Analiza wybranych parametrów bioenergetycznych, parametrów związanych ze stresem oksydacyjnym oraz porównawcza analiza proteomiczna

Wyniki przedstawione w rozdziale 4.1 (m.in. obserwowane różnice w poziomie poszczególnych białek zaangażowanych w prooksydacyjną ścieżkę p66Shc) w badanych liniach: MDA-MB-231 oraz MCF-7 niekoniecznie muszą być związane z różnym poziomem białka p66Shc. Z związku z tym, aby dowiedzieć się czy faktycznie zmiana poziomu białka p66Shc może mieć istotny wpływ na fizjologię komórki, w kolejnym etapie mojej pracy doktorskiej postanowiłam dokonać modyfikacji genetycznych w badanych liniach raka sutka: MDA-MB-231 oraz MCF-7. W ramach moich badań uzyskałam „klony” (warianty) wspomnianych linii różniące się poziomem białka p66Shc. Zostały one szczegółowo opisane w rozdziale 4.2.1.

Przez wiele lat białko p66Shc było intensywnie badane w kontekście jego roli jako negatywnego regulatora proliferacji (MIGLIACCIO I WSP. 1997, MIGLIACCIO I WSP. 1999). Jako że, komórki nowotworowe charakteryzuje intensywne tempo wzrostu, zasadnym wydawało się zbadanie w pierwszej kolejności jak zmiana poziomu białka p66Shc wpłynie na tempo proliferacji komórek MDA-MB-231 oraz MCF-7. Następnie, postanowiłam sprawdzić (analogicznie jak w rozdziale 4.3) jak taka modyfikacja będzie miała wpływ na prooksydacyjną ścieżkę sygnalizacyjną białka p66Shc jak również „profil oksydacyjny”, na który składają się: poziom RFT oraz status ochrony antyoksydacyjnej. Jak powszechnie

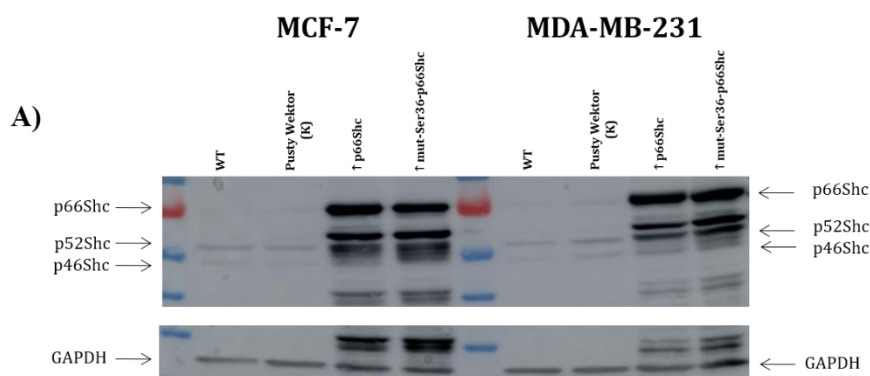
wiadomo, nadmierna produkcja RFT i/lub zaburzona ochrona antyoksydacyjna może przyczyniać się do powstania stresu oksydacyjnego, co z kolei może prowadzić do zaburzenia funkcjonowania komórki. W związku z tym, zdecydowałam się sprawdzić poziom uszkodzeń oksydacyjnych w komórkach badanych klonów obu linii raka sutka, wykorzystując komercyjnie dostępny zestaw OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit (Millipore) do oceny uszkodzeń oksydacyjnych białek. Dokonałam również oceny wybranych parametrów bioenergetycznych takich jak: potencjał na wewnętrznej błonie mitochondrialnej oraz szybkość zużycia tlenu z wykorzystaniem elektrody tlenowej Oxygraph-2k-OROBOROS. Technika Western Blot oznaczyłam także poziom wybranych podjednostek łańcucha oddechowego. Dodatkowo, aby poznać globalne zmiany w proteomie komórki w wyniku zmiany poziomu białka p66Shc zlecona została porównawcza analiza proteomiczna badanych klonów w Thermo Fisher Center For Multiplexed Proteomics (Harvard Medical School) w Bostonie (USA). W ramach pracy doktorskiej samodzielnie dokonałam analizy i interpretacji wyników uzyskanych z przeprowadzonej analizy proteomicznej. W swojej analizie skupiałam się głównie na poszczególnych podjednostkach mitochondrialnego łańcucha oddechowego oraz poziomie enzymów antyoksydacyjnych.

#### **4.2.1. Modyfikacje genetyczne linii raka sutka: MDA-MB-231 oraz MCF-7**

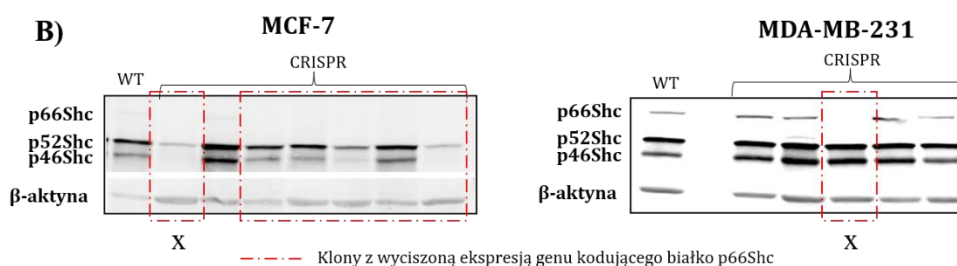
Jak już wcześniej wspomniałam, dobór badanych linii nowotworowych (MDA-MB-231 oraz MCF-7) był pokierowany kilkoma czynnikami. W swej pracy wykorzystałam dwie linie ludzkiego raka sutka: MDA-MB-231 (ze względnie wyższym poziomem białka p66Shc) oraz MCF-7 (ze względnie niższym poziomem białka p66Shc), w których dokonałam modyfikacji genetycznych polegających na zmianie poziomu białka p66Shc. Wykonane modyfikacje dotyczą podwyższenia jego poziomu (technika transdukcji komórek wektorami lentiwirusowymi) jak również obniżenia, czyli uzyskania wyciszenia genu kodującego białko p66Shc (techniką CRISPR-Cas9). Należy zaznaczyć, iż w linii MDA-MB-231 (ze względnie wyższym poziomem białka p66Shc) spodziewałam się uzyskać silniejszy efekt wyciszenia ekspresji genu kodującego białko p66Shc, zaś w linii MCF-7 (ze względnie niższym poziomem białka p66Shc) liczyłam na silniejszy efekt podwyższenia poziomu p66Shc. W wyniku przeprowadzonych modyfikacji genetycznych uzyskałam „klony” (warianty) linii MDA-MB-231 oraz MCF-7 ze zmienionym poziomem białka p66Shc. Dla każdej z badanych linii nowotworowych uzyskałam cztery niezależne klony (cztery klony linii MDA-MB-231 oraz cztery klony linii MCF-7), różniące się między sobą poziomem białka p66Shc.

Oznaczono je następująco: klon „**K**” stanowiący kontrolę – transfekowany pustym wektorem (niezmieniającym poziomu białka p66Shc), klon „**↑ p66Shc**” z podwyższonym poziomem białka p66Shc, klon „**↑ mut-Ser36-p66Shc**” z podwyższonym poziomem białka p66Shc zmutowanym w reszcie Ser36 oraz klon „**p66Shc KO**”, wykazujący „obniżenie” – wyciszenie ekspresji genu kodującego białko p66Shc (szczegółowa charakterystyka każdego z klonów znajduje się w tabeli 4).

W wyniku zastosowania techniki transfekcji lentiwirusami możliwe było uzyskanie klonów z podwyższonym poziomem białka p66Shc (oznaczone jako **↑ p66Shc** oraz **↑ mut-Ser36-p66Shc**) zarówno w linii MDA-MB-231 jak i MCF-7. Uzyskane klony zweryfikowałam techniką Western Blot, wykorzystując specyficzne przeciwciało wykrywające białka ShcA (wyniki przedstawiono na ryc. 22A). Ponadto, z wykorzystaniem techniki edytowania genomu CRISPR-Cas9 (dokładnie opisanej w rozdziale 3.3.2.), której procedura zakończona została sortowaniem z wykorzystaniem cytometru przepływowego uzyskałam linie komórkowe – klony linii MDA-MB-231 oraz MCF-7 z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (*p66Shc KO*). Otrzymane klony także weryfikowałam przy użyciu techniki Western Blot (co bardziej szczegółowo zostało opisane w rozdziale 3.3.2). Wśród wielu analizowanych po sortowaniu klonów tylko nieliczne klony charakteryzowały się całkowitym brakiem białka p66Shc (ryc. 22B). Spośród otrzymanych klonów linii MDA-MB-231 oraz MCF-7 do dalszych badań wybrałam po jednym dla każdej z linii ludzkiego raka sutka. Klony z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc wybrane do dalszych analiz oznaczono literką „X”.



Wild Type (WT) – linia pozbawiona jakichkolwiek modyfikacji



X – klon wzięty do dalszych badań i stosowany jako p66Shc KO

**Ryc. 22** Weryfikacja poziomu białka p66Shc w klonach linii MDA-MB-231 oraz MCF-7 uzyskanych w wyniku transfekcji lentiwirusami (A) oraz edytowania genomu metodą CRISPR/Cas9 (B) za pomocą techniki Western Blot

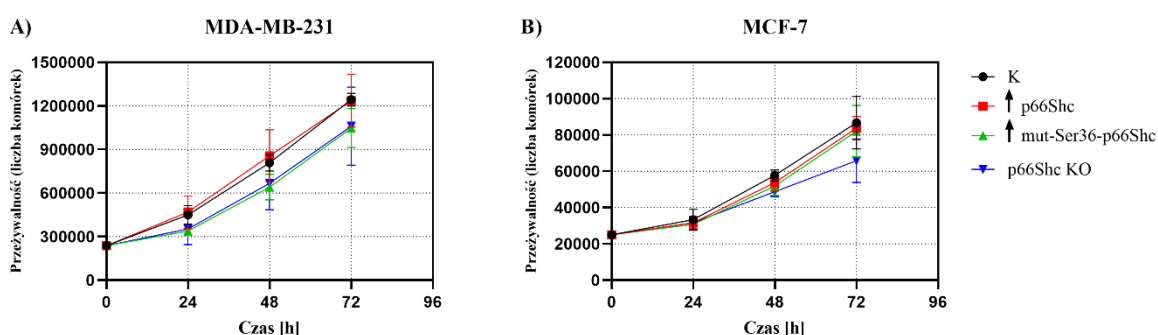
#### 4.2.2. Tempo proliferacji badanych klonów linii MDA-MB-231 oraz MCF-7

Prawidłowy wzrost komórek wymaga równowagi między aktywnością genów, które promują proliferację komórek, a tymi, które ją hamują. Co więcej, prawidłowy przebieg proliferacji wymaga także aktywności tych genów, które sygnalizują, kiedy uszkodzone (wadliwe) komórki powinny przejść proces apoptozy. Komórki przyjmują „status” komórek nowotworowych w wyniku nagromadzenia się mutacji właśnie w genach odpowiedzialnych za kontrolę procesu proliferacji. W związku z tym, jednym z wyzwań współczesnej nauki jest poszukiwanie oraz identyfikowanie tych mutacji, które odpowiadają za powstawanie poszczególnych rodzajów nowotworów. Należy podkreślić, iż różne rodzaje nowotworów wykazują różne „sygnatury mutacyjne”. Niemniej jednak dostępne dane literaturowe wskazują, że niektóre z tych genów mogą w komórkach nowotworowych mutować częściej niż pozostałe. Przykładem takiego genu jest gen kodujący białko Ras, a który jednocześnie może wykazywać zależność z badanym przeze mnie białkiem p66Shc. Mianowicie, badania przeprowadzone przez OKADA I WSP. (1997) jak również MIGLIACCIO I WSP. 1997 wskazują, że białko p66Shc po stymulacji czynnikami wzrostu jest fosforylowane w resztkach tyrozyny

dzięki czemu wiąże się z kompleksem Grb2 (szczegółowy opis roli i funkcjonowania białka p66Shc umieszczono w rozdziale 1.6) i nie jest w stanie aktywować szlaków Ras-MAPK-Fos. W wyniku tego, szlak sygnałowy Ras jest również hamowany, kiedy ekspresja genu kodującego białko p66Shc ulega podwyższeniu po stymulacji przez czynniki wzrostu bądź cytokiny (OKADA I WSP. 1997).

Biorąc pod uwagę powyższe dane, postanowiłam sprawdzić jak zmiana poziomu białka p66Shc może wpłynąć na proces proliferacji badanych klonów linii raka sutka MDA-MB-231 oraz MCF-7. Z uzyskanej krzywej proliferacji (ryc. 23A, B) wynika, że w przypadku linii MDA-MB-231 podwyższenie poziomu białka p66Shc ( $\uparrow$  p66Shc) nie wpływa na tempo proliferacji komórek. Z kolei klony, wykazujące podwyższony poziom zmutowanej formy białka p66Shc ( $\uparrow$  mut-Ser36-p66Shc) jak również ten z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (p66Shc KO) cechuje niższe, podobne tempo proliferacji komórek. Nieco inaczej jest w przypadku klonów linii MCF-7, gdzie można zaobserwować niezmiernie/zbliżone tempo proliferacji w trzech badanych klonach: kontrolnym (K), z podwyższonym poziomem białka p66Shc ( $\uparrow$  p66Shc) jak również w komórkach klonu z podwyższonym poziomem zmutowanej formy białka p66Shc ( $\uparrow$  mut-Ser36-p66Shc). Obniżone tempo wzrostu komórek linii MCF-7 zaobserwowałam tylko w przypadku komórek z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (p66Shc KO). Cechą wspólną jest fakt, że zarówno w przypadku linii MDA-MB-231 jak i MCF-7, komórki klonu p66Shc KO cechują się najniższym tempem proliferacji.

#### Krzywa przeżywalności



Ryc. 23 Krzywa przeżywalności poszczególnych klonów badanych linii raka sutka: MDA-MB-231 (A) oraz MCF-7 (B)

#### 4.2.3. Analiza prooksydacyjnej ścieżki białka p66Shc w poszczególnych klonach linii MDA-MB-231 oraz MCF-7

Kolejnym etapem mojej pracy doktorskiej było zbadanie jak zmiana poziomu białka p66Shc może wpłynąć na poziom poszczególnych białek biorących udział w prooksydacyjnej ścieżce białka p66Shc, a mianowicie: kinazy białkowej C $\beta$ , jej formy ufosforylowanej w reszcie Ser660, białka PIN1 odpowiedzialnego za izomeryzację białka p66Shc oraz białka PP2A odpowiedzialnego za jego defosforylację. W celu zachowania przejrzystości prezentowanych danych, w pierwszej kolejności dokonałam interpretacji wyników uzyskanych dla klonów linii raka sutka MDA-MB-231, a następnie MCF-7.

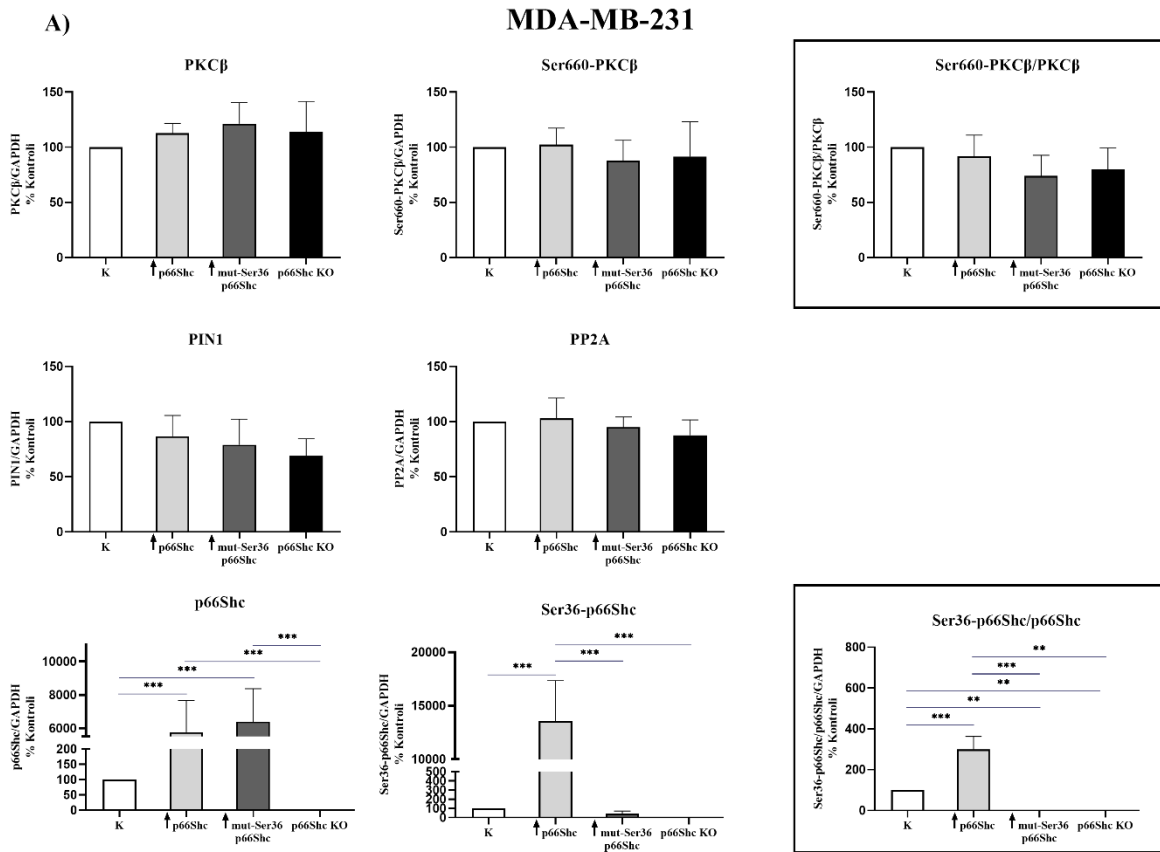
W wyniku przeprowadzonych modyfikacji genetycznych wykorzystujących odpowiednie techniki biologii molekularnej: technika edycji genomu CRISPR-Cas9 oraz transfekcji lentiwirusami uzyskałam komórki klonów z istotnie zmienionym poziomem białka p66Shc (znacząco podwyższonym bądź wyciszonym poziomem ekspresji genu kodującego białko p66Shc), co przedstawiono na rycinach 22A oraz 22B. Z uzyskanej analizy prooksydacyjnej ścieżki p66Shc wynika, iż w klonach linii MDA-MB-231 zmiana poziomu samego białka p66Shc nie wpłynęła w istotny sposób na poziom poszczególnych białek biorących udział w prooksydacyjnej ścieżce p66Shc (ryc. 24A, B). Z przeprowadzonej analizy można jedynie wnioskować o „tendencjach” wzrostowych bądź spadkowych i przedstawia się to w następujący sposób:

- kinaza PKC $\beta$  – najniższy jej poziom zauważyłam w komórkach kontrolnych, zaś najwyższy w komórkach z podwyższonym poziomem zmutowanej w reszcie Ser36 formy p66Shc ( $\uparrow$  mut-Ser36-p66Shc);
- Ser660-PKC $\beta$  – najniższy poziom ufosforylowanej formy kinazy białkowej C $\beta$  zaobserwowałam w klonach:  $\uparrow$  mut-Ser36-p66Shc oraz p66Shc KO. Komórki pozostałych klonów posiadają zbliżony poziom fosforylacji w reszcie Ser660;
- Ser660-PKC $\beta$ /PKC $\beta$  – w przypadku stosunku formy ufosforylowanej do całkowitej PKC $\beta$  zaobserwowałam pogłębienie zależności widocznej w poziomie Ser660-PKC $\beta$ ;
- PIN1 – w poziomie enzymu izomeryzującego białko p66Shc zanotowałam widoczną tendencję spadkową w przypadku klonów  $\uparrow$  mut-Ser36-p66Shc oraz p66Shc KO;
- PP2A – białko wykazuje bardzo zbliżony poziom w komórkach wszystkich badanych klonów linii MDA-MB-231;

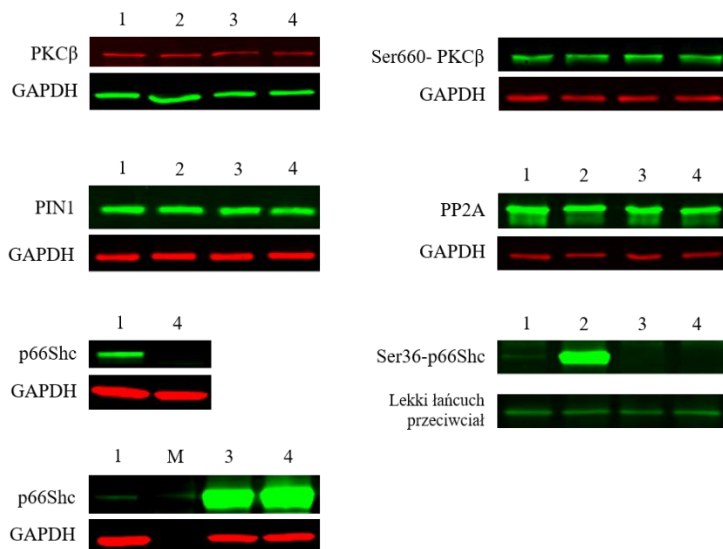


- Ser36-p66Shc – poziom ufosforylowanej w reszcie Ser36 formy białka p66Shc jest najwyższy w klonie z podwyższonym poziomem p66Shc ( $\uparrow$  p66Shc), a różnice pomiędzy tym klonem ( $\uparrow$  p66Shc) a pozostałymi wykazują najwyższy stopień istotności statycznej (\*\*\*) ( $p < 0,001$ );

- Ser36-p66Shc/p66Shc – odpowiednio stosunek formy ufosforylowanej (Ser36-p66Shc) do całkowitej białka p66Shc jest najwyższy również w klonie z podwyższonym poziomem p66Shc ( $\uparrow$  p66Shc). Istotne statystycznie różnice występują między kontrolą (K) a każdym z badanych klonów. Ponadto, można wskazać na znaczące różnice między klonem  $\uparrow$  p66Shc a klonem z podwyższonym poziomem zmutowanej w reszcie Ser36 formy p66Shc ( $\uparrow$  mut-Ser36-p66Shc) oraz klonem z wyciszoną ekspresją genu kodującego p66Shc (p66Shc KO).



B)



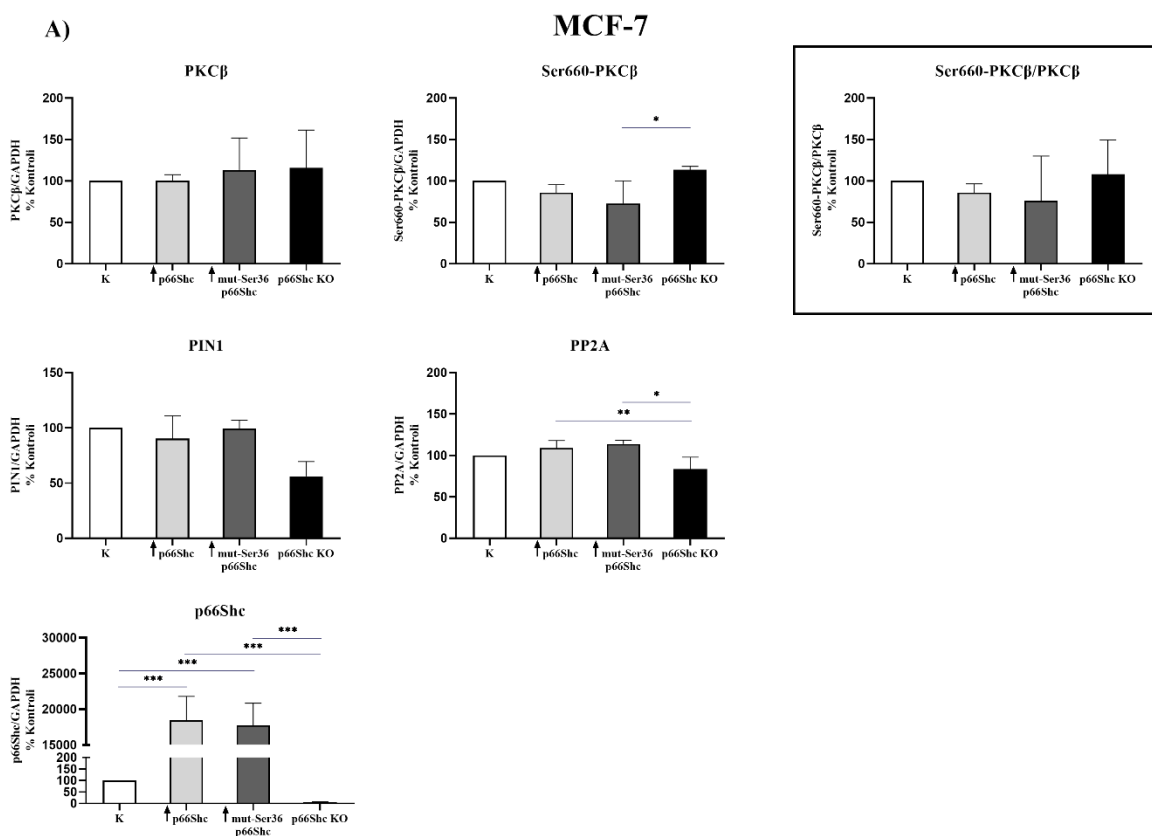
Legenda: 1 – K; 2 – ↑ p66Shc; 3 – ↑ mut-Ser36-p66Shc, 4 – p66Shc KO, M – Marker

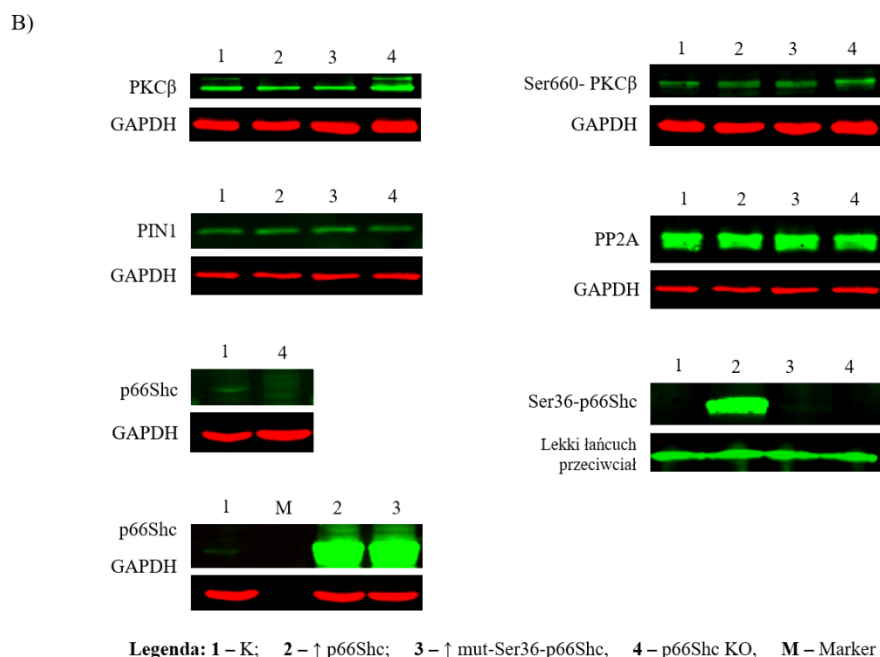
**Ryc. 24 Poziom białek zaangażowanych w prooksydacyjną ścieżkę p66Shc w klonach linii MDA-MB-231.** Poziom poszczególnych białek wystandaryzowano w odniesieniu do białka referencyjnego GAPDH (A); przykładowy wynik analizy Western Blot (B) \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001

Podobnie jak w przypadku linii MDA-MB-231 również w komórkach klonów linii MCF-7 przeprowadzone modyfikacje genetyczne wywołały istotne statystycznie zmiany w poziomie białka p66Shc (ryc. 25A). Analiza prooksydacyjnej ścieżki p66Shc w klonach linii MCF-7 wykazała pewne różnice w poziomie niektórych z analizowanych białek biorących w niej udział (ryc. 25A, B):

- Kinaza PKCβ – w przypadku kinazy białkowej Cβ nie zauważyłam znaczących różnic pomiędzy poszczególnymi klonami linii MCF-7;
- Ser660-PKCβ – w poziomie fosforylacji kinazy PKCβ w reszcie Ser660 zaobserwowałam różnice pomiędzy klonem z podwyższonym poziomem zmutowanej w reszcie Ser36 formy p66Shc (↑ mut-Ser36-p66Shc) a klonem z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (p66Shc KO). Komórki klonu p66Shc KO charakteryzują się najwyższym poziomem Ser660-PKCβ. Odwrotnie jest w przypadku komórek klonu ↑ mut-Ser-p66Shc, które cechuje najniższy poziom fosforylacji kinazy białkowej Cβ;
- Ser660-PKCβ/PKCβ – stosunek formy ufosforylowanej do formy całkowitej PKCβ prezentuje podobną zależność jak w przypadku poziomu Ser660-PKCβ. Niemniej jednak, można mówić tutaj jedynie o tendencjach z uwagi na dość wysokie odchylenia standardowe;

- PIN1 – obniżony poziom tego enzymu widoczny jest przede wszystkim w komórkach klonu p66Shc KO, przy jednocześnie zbliżonym jego poziomie w pozostałych klonach linii MCF-7;
- PP2A – największe różnice zauważyłam natomiast w poziomie białka PP2A, który odpowiada za defosforylację p66Shc. Dotyczą one klonu z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc, który cechuje się najniższym poziomem PP2A w stosunku do klonów z podwyższonym poziomem p66Shc :  $\uparrow$  p66Shc oraz  $\uparrow$  mut-Ser-p66Shc;
- Ser36-p66Shc – z uwagi na fakt, iż linia raka sutka MCF-7 już pierwotnie wykazuje „względnie niski” poziom białka p66Shc, oznaczenie poziomu p66Shc ufosforylowanego w reszcie Ser36 było możliwa jedynie w klonie  $\uparrow$  p66Shc. W pozostałych klonach określenie stopnia fosforylacji nie było możliwe, nawet po zastosowaniu techniki immunoprecypitacji. W związku z powyższym, na ryc. 25A brak jest wykresu prezentującego poziom Ser36-p66Shc oraz odpowiednio stosunku formy ufosforylowanej do całkowitego poziomu p66Shc. Niemniej jednak, na ryc. 25B załączono przykładowy wynik analizy Western Blot, potwierdzający ten fakt.





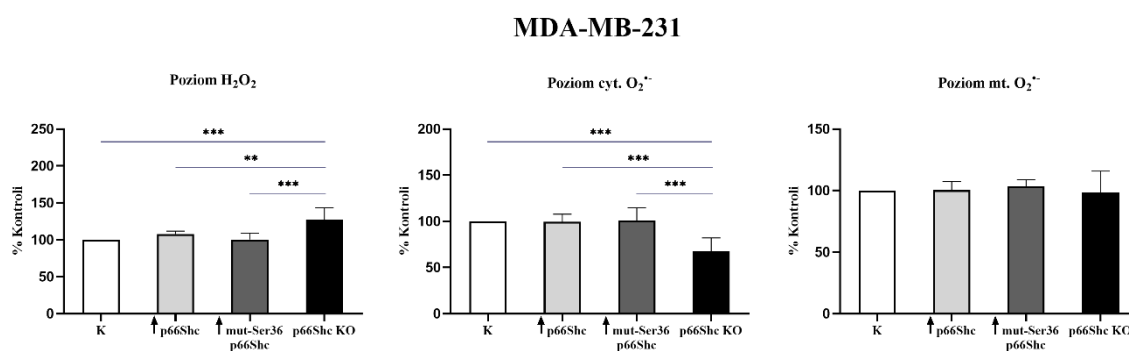
**Ryc. 25 Poziom białek zaangażowanych w prooksydacyjną ścieżkę p66Shc w klonach linii MCF-7.** Poziom poszczególnych białek wystandaryzowano w odniesieniu do białka referencyjnego GAPDH (A); przykładowy wynik analizy Western Blot (B) \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

#### 4.2.4. Poziom reaktywnych form tlenu oraz status ochrony antyoksydacyjnej

Jak już wielokrotnie sygnalizowałam w niniejszej pracy, białko adaptorowe p66Shc oprócz funkcji negatywnego regulatora proliferacji może być również zaangażowane w odpowiedź komórki na stres oksydacyjny. Ma to niezwykle istotne znaczenie z punktu widzenia komórek nowotworowych, w których homeostaza reaktywnych form tlenu wydaje się być zmieniona, prowadząc w konsekwencji do ich wzrostu. Zwiększony poziom RFT w komórkach nowotworowych może skutkować powstawaniem nowych mutacji (prowadząc do pogłębienia niestabilności genetycznej), aktywacją kolejnych onkogenów jak również wzmożonym tempem proliferacji komórek nowotworowych oraz zmienioną wrażliwością komórek na leki przeciwnowotworowe. Usuwanie nadmiaru szkodliwych dla komórki RFT umożliwia jej prawidłowe funkcjonowanie. W związku z tym, komórki wykształciły szereg mechanizmów obronnych, które mają za zadanie ochronę przed strukturalnym i funkcjonalnym zniszczeniem spowodowanym zbyt dużą ilością RFT. Jednym z takich mechanizmów jest enzymatyczny system ochrony antyoksydacyjnej, który w komórkach nowotworowych jest często bardzo zmieniony w zależności od typu nowotworu czy też stadium jego rozwoju. W związku z tym, zdecydowałam się na zbadanie poziomu RFT jak również poziomu wybranych enzymów antyoksydacyjnych w uzyskanych przeze mnie

klonach linii nowotworowych: MDA-MB-231 oraz MCF-7 charakteryzujących się odmiennym poziomem białka p66Shc.

Z przeprowadzonej analizy względnego poziomu RFT (głównie w postaci  $H_2O_2$ ) w poszczególnych klonach linii MDA-MB-231 wynika, że najwyższy poziom  $H_2O_2$  wykazują komórki z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (p66Shc KO) (ryc. 26). Pozostałe klony linii MDA-MB-231, cechuje natomiast zbliżony poziom  $H_2O_2$ . Oprócz względnego poziomu RFT wyrażonego głównie w poziomie  $H_2O_2$ , sprawdziłam również poziom anionorodników ponadtlenkowych: cytozolowego oraz mitochondrialnego. Co ciekawe, w przeciwieństwie do poziomu  $H_2O_2$ , klon p66Shc KO charakteryzuje się najniższym poziomem cyt. $O_2^{\cdot-}$ . Z kolei, poziom mt. $O_2^{\cdot-}$  utrzymuje się na zbliżonym poziomie we wszystkich badanych klonach linii MDA-MB-231 i nie wykazuje istotnych różnic (ryc. 26).

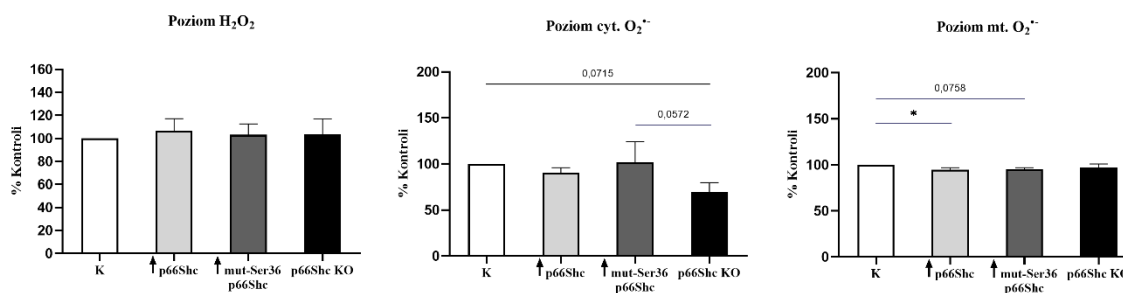


**Ryc. 26 Poziom reaktywnych form tlenu w klonach linii raka sutka MDA-MB-231**

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

Analiza względnego poziomu RFT (głównie w postaci  $H_2O_2$ ) w klonach linii MCF-7 nie wykazała istotnych różnic pomiędzy badanymi klonami (ryc. 27). Również poziom cyt. $O_2^{\cdot-}$  wydaje się być niezmienny, niemniej jednak zauważyć można niewielkie obniżenie w przypadku klonu z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc w stosunku do pozostałych klonów. Z kolei, poziom mt. $O_2^{\cdot-}$  wydaje się być obniżony w komórkach z podwyższonym poziomem białka p66Shc (\*  $p < 0,05$ ).

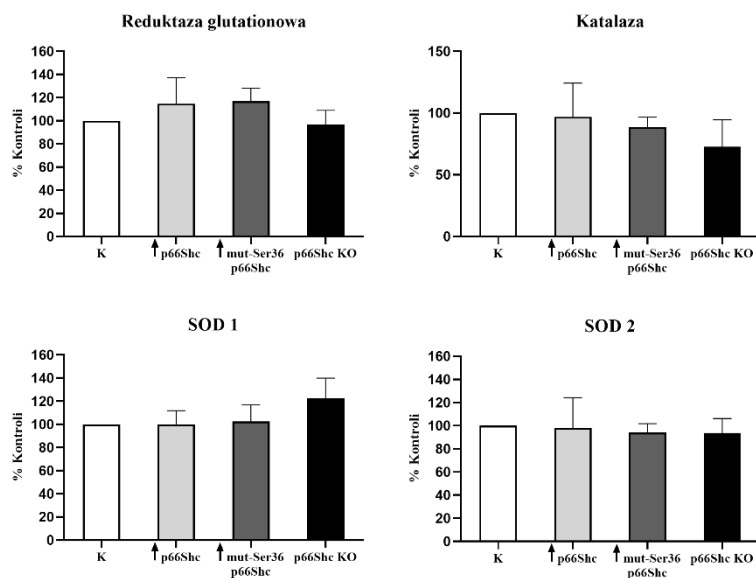
## MCF-7



**Ryc. 27 Poziom reaktywnych form tlenu w klonach linii raka sutka MCF-7;** \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

W kolejnym etapie, zbadalam czy poziom bialka p66Shc ma wplyw na enzymatyczny system ochrony antyoksydacyjnej stanujacy niejako „drugą linię” obrony przed toksycznym dzialaniem reaktywnych form tlenu. Z przeprowadzonej analizy wynika, iz w komorkach linii MDA-MB-231 brak jest istotnych statycznie roznic w poziomie wybranych enzymow antyoksydacyjnych: reduktazy glutationowej, katalazy jak rowniez obu dysmutaz ponadtlenkowych (cytozolowej i mitochondrialnej). Poziom reduktazy glutationowej wydaje sie byc nieznacznie wyzszy w klonach z podwyzszonym poziomem bialka p66Shc: ↑ p66Shc oraz ↑ mut-Ser36-p66Shc w stosunku do linii kontrolnej (ryc. 28). Poziom katalazy wydaje sie byc natomiast nieznacznie obnizony w klonie z wyciszona ekspresja genu kodujacego bialko p66Shc (p66Shc KO) gdzie jednoczesnie poziom SOD1 wydaje sie byc nieznacznie podwyzszony. Nalezy jednak pamietac, ze obserwowane zmiany nie sa istotne statycznie. Poziom dysmutazy ponadtlenkowej zlokalizowanej w macierzy mitochondrialnej jest taki sam we wszystkich badanych klonach linii MDA-MB-231.

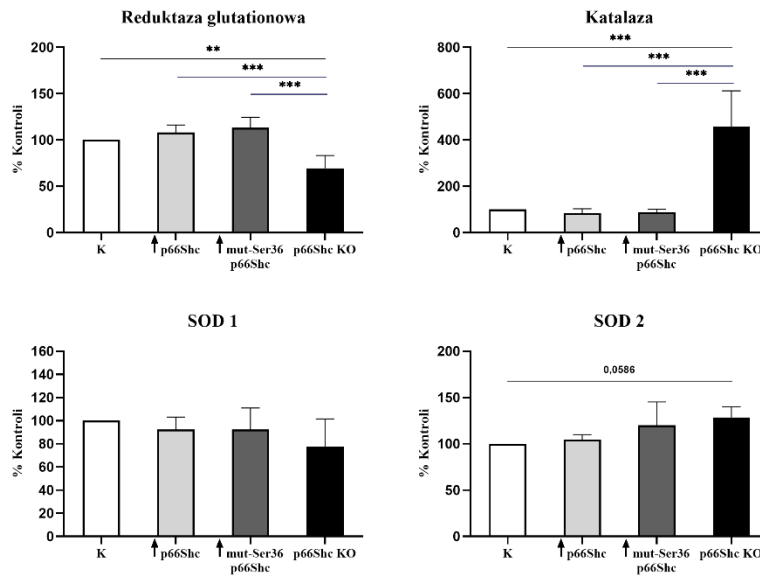
## MDA-MB-231



**Ryc. 28** Poziom wybranych enzymów antyoksydacyjnych w komórkach klonów linii MDA-MB-231 różniących się poziomem białka p66Shc; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

Analiza poziomu enzymów antyoksydacyjnych w klonach linii MCF-7 wykazała różnice w przypadku dwóch badanych enzymów: reduktazy glutationowej oraz katalazy. Klon z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (p66Shc KO) charakteryzuje się obniżonym poziomem reduktazy glutationowej w stosunku do wszystkich pozostałych klonów linii MCF-7 (ryc. 29). Odmianą sytuację obserwuje się w przypadku katalazy, której poziom jest z kolei najwyższy w klonie p66Shc KO (ryc. 29). Poziom dysmutaz ponadtlenkowych wydaje się być niezmienny. Jednakże można stwierdzić, że w klonie p66Shc KO poziom SOD1 jest najniższy ze wszystkich badanych klonów MCF-7. Z kolei poziom SOD2 w klonie p66Shc KO jest najwyższy w stosunku do pozostałych klonów linii MCF-7. Należy jednak zwrócić uwagę, że zarówno w przypadku SOD1 jak i SOD2 obserwuje się jedynie „tendencje” bez istotności statystycznej.

## MCF-7

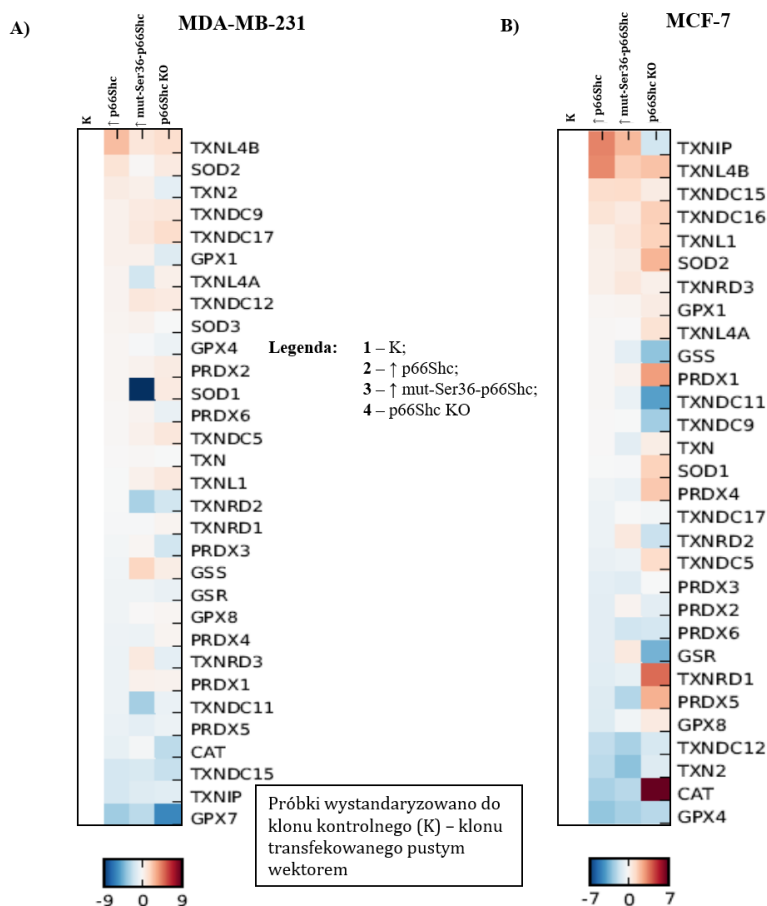


**Ryc. 29** Poziom wybranych enzymów antyoksydacyjnych w komórkach klonów linii MCF-7 różniących się poziomem białka p66Shc; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

Wykorzystanie techniki spektrometrii mas umożliwiło określenie poziomu zdecydowanie większej ilości enzymów antyoksydacyjnych w badanych klonach linii nowotworowych: MDA-MB-231 oraz MCF-7. Przeprowadzona analiza proteomiczna nie wykazała znaczących różnic w ogólnym poziomie wielu enzymów antyoksydacyjnych w przypadku klonów linii MDA-MB-231 (ryc. 30A). Niemniej jednak, analiza wykazała zdecydowanie obniżony poziom enzymu SOD1 w klonie z podwyższonym poziomem zmutowanej w reszcie Ser36 formy białka p66Shc (↑ mut-Ser36-p66Shc), co nie było widoczne kiedy poziom SOD1 został oznaczony z wykorzystaniem techniki Western Blot. Z nieco odmienną sytuacją mamy do czynienia w przypadku klonów linii MCF-7. Analiza proteomiczna potwierdziła wynik uzyskany techniką Western Blot dla poziomu katalazy w klonie p66Shc KO, gdzie zaobserwowano znaczne podwyższenie poziomu tego białka. Dodatkowo, klon ten charakteryzuje się największą ilością obserwowanych zmian w poziomie wielu enzymów antyoksydacyjnych (ryc. 30B) – obniżenie poziomu następujących enzymów: TXNIP (białko wiążące tioredoksynę-2), GSS (syntaza glutationowa), TXNDC11 (białko zawierające domenę tioredoksyny 11), TXNDC9 (białko zawierające domenę tioredoksyny 9) czy GSR (reduktaza glutationowa) (niebieskie kwadraty) jak również podwyższenia poziomu enzymów takich jak: TXNL4B (białko tioredoksynopodobne 4B), TXNDC15 (białko zawierające domenę tioredoksyny 15), TXNDC16 (białko zawierające



domenę tioredoksyny 16), TXNL1 (białko tioredoksynopodobne 1), SOD2, SOD1, PRDX4 (peroksyredoksyna 4) (czerwone kwadraty). W klonie p66Shc KO linii MCF-7 zaobserwowałam również znaczący wzrost reduktazy tioredoksyny 1 (TXNRD1). Z kolei w klonie z podwyższonym poziomem białka p66Shc (↑ p66Shc) linii MCF-7 zaobserwowałam widoczne podwyższenie dwóch z badanych enzymów antyoksydacyjnych (TXNIP oraz TXNL4B).

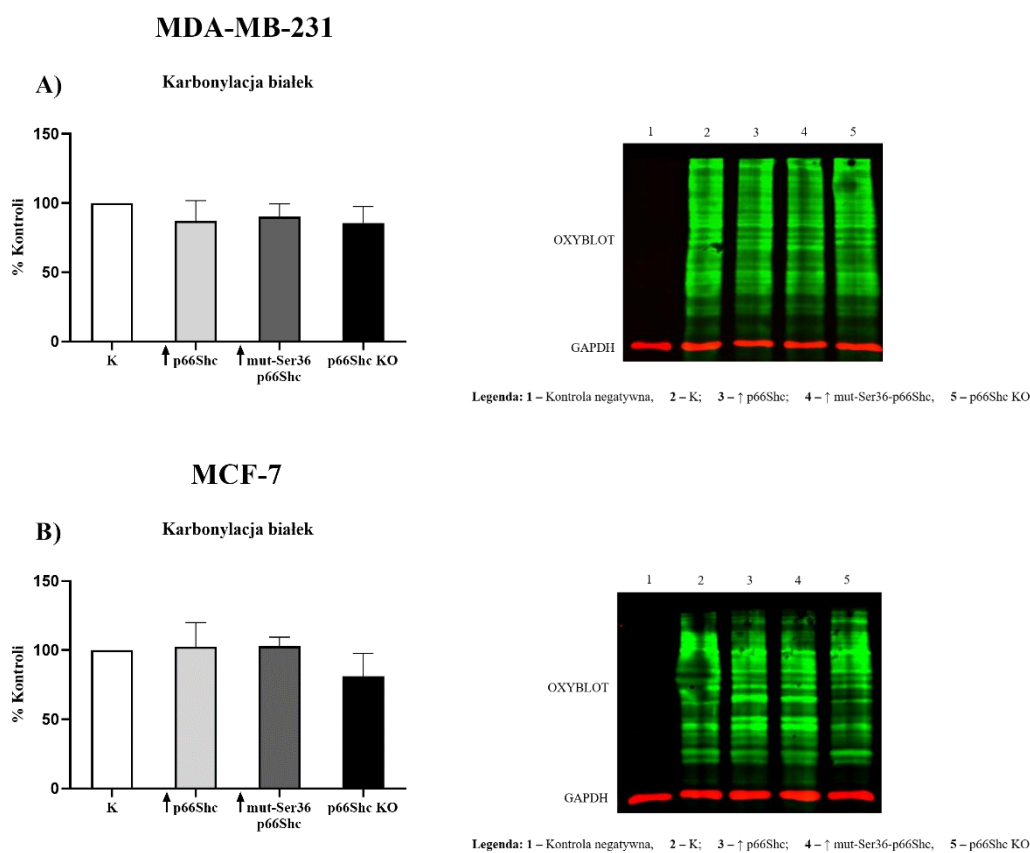


Ryc. 30 Poziom enzymów antyoksydacyjnych określony w klonach linii MDA-MB-231 (A) oraz MCF-7 (B) z wykorzystaniem analizy porównawczej spektrometrii mas.

#### 4.2.5. Analiza poziomu uszkodzeń oksydacyjnych w badanych klonach linii MDA-MB-231 oraz MCF-7

Powstawanie RFT towarzyszy wielu procesom biologicznym. O ile uwalniane w ilościach fizjologicznych odgrywają w głównej mierze funkcje mediatorów czy przekaźników, zapewniając komórce jej prawidłowe funkcjonowanie, o tyle ich nadmiarowa produkcja może prowadzić do poważnych konsekwencji dla komórki. Niemniej jednak, „kierunek” działania RFT w komórce zależy od ich stężenia oraz czasu działania. Długotrwały stres oksydacyjny może prowadzić do nieodwracalnych zmian skutkujących

uszkodzeniami komórki. Przykładem mogą być uszkodzenia oksydacyjne białek, które dotyczą w dużej mierze głównych łańcuchów polipeptydowych jak również łańcuchów bocznych reszt aminokwasowych. Biorąc pod uwagę podwyższony poziom RFT (głównie w linii MDA-MB-231) postanowiłam sprawdzić poziom uszkodzeń oksydacyjnych białek w badanych klonach zarówno linii MDA-MB-231 jak i MCF-7. Z przeprowadzonej analizy wynika, że w poszczególnych klonach linii MDA-MB-231 różniących się poziomem białka p66Shc nie widać istotnych zmian w poziomie karbonylacji białek (ryc. 31A), nawet w klonie p66Shc KO, gdzie zaobserwowałam różnice w poziomie nadtlenu wodoru oraz cytozolowego anionorodnika ponadtlenkowego. Można jedynie doszukiwać się nieznacznego obniżenia poziomu karbonylacji białek we wszystkich badanych klonach w porównaniu do klonu kontrolnego linii MDA-MB-231. W przypadku linii MCF-7 również nie zaobserwowałam znaczących różnic w poziomie oksydacyjnych uszkodzeń białek. Niemniej jednak, klon z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc charakteryzuje się najniższym poziomem uszkodzeń oksydacyjnych białek w porównaniu do innych klonów tej linii komórkowej (ryc. 31B).



**Ryc. 31** Poziom uszkodzeń oksydacyjnych białek w badanych klonach linii MDA-MB-231 (A) oraz MCF-7 (B). Poziom białka wystandaryzowano w odniesieniu do białka referencyjnego GAPDH; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

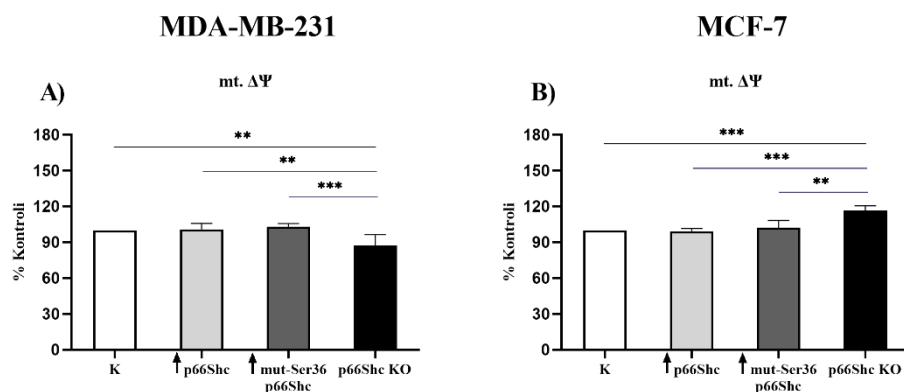
#### **4.2.6. Analiza podstawowych parametrów bioenergetycznych w badanych liniach nowotworowych: MDA-MB-231 oraz MCF-7**

Dostępna literatura wskazuje na potencjalną rolę białka p66Shc jako ważnego regulatora metabolizmu mitochondrialnego (NEMOTO & FINKIEL 2002; GIORGIO I WSP. 2005; SOLIMAN I WSP. 2014). W początkowym etapie badań nad białkiem adaptorowym p66Shc, wskazywano, że stanowi ono swoisty „enzym redoks” – działający jako oksydoreduktaza. Wykorzystując redukujące „odpowiedniki” mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów poprzez utlenianie cytochromu c, białko p66Shc przyczynia się do produkcji RFT (GIORGIO I WSP. 2005; NEMOTO & FINKIEL 2002). Niemniej jednak, praca SOLIMAN I WSP. (2014) dostarcza nowych danych wskazujących na udział białka p66Shc w przemianach metabolicznych komórek nowotworowych. Autorzy wskazują, iż białko p66Shc wywiera hamujący wpływ na metabolizm komórek nowotworowych poprzez „tłumienie” sygnalizacji czynnika wzrostu. Metaboliczne przesunięcie w kierunku stanu bardziej glikolitycznego, które bardzo często występuje w komórkach o wysokim tempie proliferacji (np. nowotworowych) – zmniejsza produkcję mitochondrialnych RFT i zapewnia metaboliczne produkty pośrednie podtrzymujące szlaki biosyntezy (SOLIMAN I WSP. 2014). Ogólnie rzecz biorąc, białko p66Shc ma hamujący wpływ na metabolizm anaboliczny i powoduje przeprogramowanie metabolizmu komórkowego w kierunku katabolizmu glukozy i oddychania oksydacyjnego w komórkach nowotworowych. W związku z tym, postanowiłam sprawdzić jak zmiana poziomu białka p66Shc (podwyższenie jego poziomu oraz wyciszenie) w badanych liniach nowotworowych (MDA-MB-231 oraz MCF-7) może wpłynąć na bioenergetykę mitochondriów. W tym celu, na początku zmierzyłam potencjał na wewnętrznej błonie mitochondrialnej oraz dokonałam analizy szybkości oddychania mitochondrialnego z wykorzystaniem elektrody tlenowej Oxygraph-2k-OROBOROS w klonach obu badanych linii nowotworowych.

- Potencjał na wewnętrznej błonie mitochondrialnej

Parametrem bioenergetycznym jaki postanowiłam zmierzyć był potencjał na wewnętrznej błonie mitochondrialnej. W przypadku klonów obu badanych linii: MDA-MB-231 oraz MCF-7 zaobserwowałam istotne statystycznie różnice, które w głównej mierze dotyczą klonu z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (p66Shc KO). W klonie p66Shc KO linii MDA-MB-231 zaobserwowałam najniższy potencjał na wewnętrznej błonie mitochondrialnej w stosunku do wszystkich pozostałych klonów linii MDA-MB-231 (klonu

kontrolnego,  $\uparrow$  p66Shc oraz  $\uparrow$  mut-Ser36-p66Shc) (ryc. 32A). Przeciwny wynik otrzymałam w przypadku linii MCF-7. Tu klon z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc charakteryzuje się najwyższym potencjałem w porównaniu do pozostałych klonów (ryc. 32B). Klony:  $\uparrow$  p66Shc oraz  $\uparrow$  mut-Ser36-p66Shc mają mt.  $\Delta\Psi$  zbliżony do linii kontrolnej zarówno w komórkach linii MDA-MB-231 jak MCF-7.



**Ryc. 32 Potencjał na wewnętrznej błonie mitochondrialnej w badanych klonach linii nowotworowej MDA-MB-231 (A) oraz MCF-7 (B).** \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

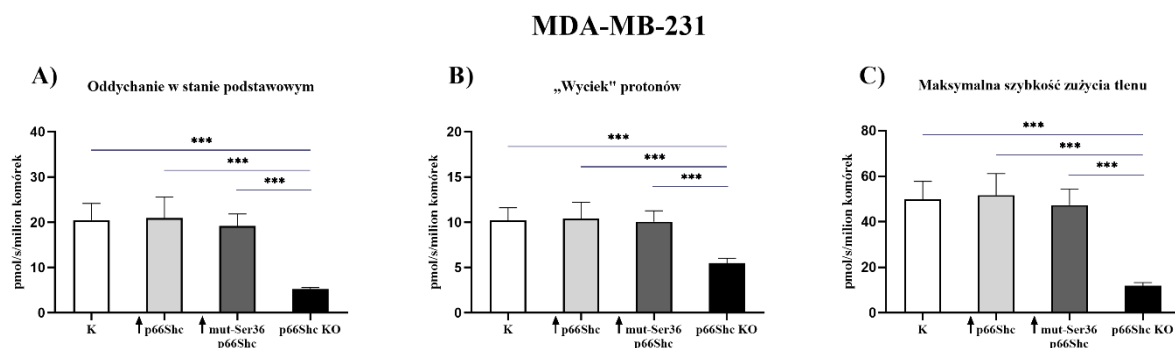
- Szybkość oddychania mitochondrialnego

W związku z tym, iż białko p66Shc może wpływać na metabolizm mitochondrialny, a także biorąc pod uwagę różnice w potencjale na wewnętrznej błonie mitochondrialnej w klonach obu linii nowotworowych, w kolejnym etapie postanowiłam dokonać oceny szybkości oddychania mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Zmiana poziomu białka p66Shc może w istotny sposób zmienić niektóre z parametrów mitochondrialnych. W tym celu, dokonałam pomiaru szybkości zużycia tlenu przez mitochondria, analizy szczelności wewnętrznej błony mitochondrialnej dla protonów oraz maksymalnej szybkości zużycia tlenu w poszczególnych klonach badanych linii nowotworowych (MDA-MB-231 oraz MCF-7) przy użyciu oksygrafu (Oxygraph-2k, OROBOROS).

Linia nowotworowa MDA-MB-231:

Jako pierwszy przeanalizowałam parametr określający szybkość zużycia tlenu przez komórki w stanie podstawowym (czyli w momencie kiedy komórki nie były niczym traktowane). Uzyskane wyniki pokazują bardzo znaczące obniżenie szybkości zużycia tlenu w komórkach klonu z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (p66Shc KO) (ryc. 33A). Komórki tego klonu charakteryzują się znaczącym spadkiem w stosunku do wszystkich pozostałych klonów linii MDA-MB-231 (K,  $\uparrow$  p66Shc,  $\uparrow$  mut-Ser36-p66Shc), które jednocześnie wykazują względem siebie stosunkowo wyrównany poziom szybkości zużycia

tlenu. Podobną sytuację obserwuje się w przypadku parametru określającego szczelność wewnętrznej błony mitochondrialnej dla protonów (tzw. „wycieku” protonów). Zmierzenie tego parametru możliwe było poprzez dodanie swoistego inhibitora syntazy ATP – oligomycyny, co powoduje zmniejszenie zużycia tlenu przez komórki. Dodanie oligomycyny spowodowało bardzo znaczące obniżenie parametru opisującego „wyciek” protonów w komórkach klonu p66Shc KO w stosunku do pozostałych (ryc. 33B). Można zauważyć, iż obniżone zużycie tlenu w stanie podstawowym w klonie p66Shc KO koreluje z podwyższoną „szczelnością” wewnętrznej błony mitochondrialnej dla protonów w tym samym klonie (o czym świadczy najniższy poziom „wycieku” protonów spośród badanych klonów linii MDA-MB-231 (ryc. 33A, B). Klony: K, ↑ p66Shc, ↑ mut-Ser36-p66Shc charakteryzują się dość wyrównanym poziomem tego parametru. Następnym etapem analizy było zmierzenie maksymalnej szybkości zużycia tlenu (określającej w skrócie maksymalną szybkość działania łańcucha oddechowego), poprzez stopniowe dodawanie substancji rozprzegającej oksydacyjną fosforylację – CCCP. Klon z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc charakteryzuje się najniższą maksymalną szybkością z którą mitochondria komórek mogą zużywać tlen (ryc. 33C). Co ciekawe, komórki pozostałych klonów linii MDA-MB-231 cechuje bardzo zbliżony poziom tego parametru.

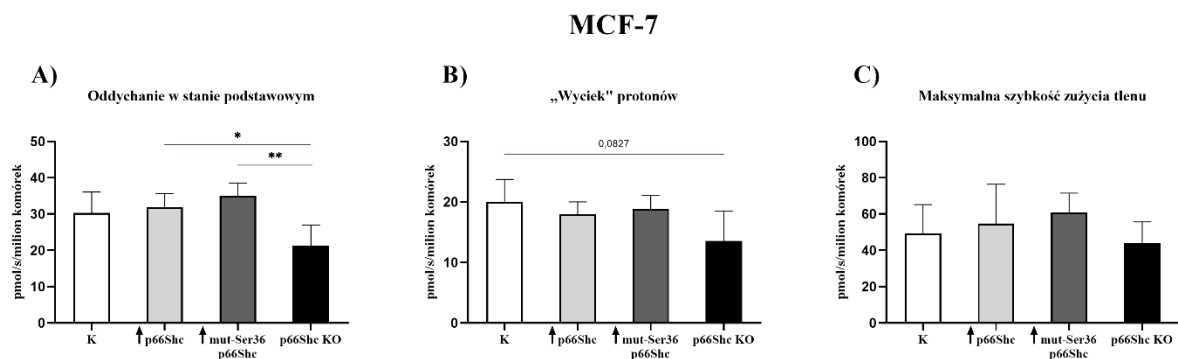


**Ryc. 33 Wybrane parametry funkcjonalne mitochondrialnego łańcucha oddechowego w klonach linii MDA-MB-231.** Szybkość zużycia tlenu w stanie podstawowym (A); Poziom „wycieku” protonów (B); Maksymalna szybkość zużycia tlenu (C). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

#### Linia nowotworowa MCF-7:

Podobnie jak w przypadku linii MDA-MB-231, analizę szybkości oddychania mitochondrialnego w komórkach klonów linii MCF-7 również rozpoczęłam od oceny szybkości zużycia tlenu przez komórki w stanie podstawowym. Najniższy poziom tego parametru zaobserwowałam w klonie z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (tak samo jak w przypadku tego samego klonu: p66Shc KO linii MDA-MB-231) (ryc. 34A).

Istotnie statystycznie różnice w poziomie oddychania w stanie podstawowym występują między klonem p66Shc KO a klonami z podwyższonym poziomem białka p66Shc:  $\uparrow$  p66Shc oraz  $\uparrow$  mut-Ser36-p66Shc. Podobnie, poziom parametru opisanego jako „wyciek” protonów wykazuje obniżenie również w klonie p66Shc KO w stosunku do komórek klonu kontrolnego (wynik jest bliski istotności statystycznej,  $p=0,0827$ ) (ryc. 34B). Jednocześnie, wynik ten świadczy o najwyższym poziomie szczelności wewnętrznej błony mitochondrialnej dla protonów w klonie p66Shc KO. Analiza parametru określającego maksymalną szybkość zużycia tlenu nie wykazała istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi klonami linii MCF-7 (ryc. 34C). Niemniej jednak, można mówić o niewielkich „tendencjach” w poziomie maksymalnej szybkości zużycia tlenu: spadkowej w przypadku klonu p66Shc KO oraz wzrostowej obserwowanej w klonie z podwyższonym poziomem zmutowanej w reszcie Ser36 formy białka p66Shc ( $\uparrow$  mut-Ser36-p66Shc).



**Ryc. 34 Wybrane parametry funkcjonalne mitochondrialnego łańcucha oddechowego w klonach linii MCF-7.** Szybkość zużycia tlenu w stanie podstawowym (A); Poziom „wycieku” protonów (B); Maksymalna szybkość zużycia tlenu (C). \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$

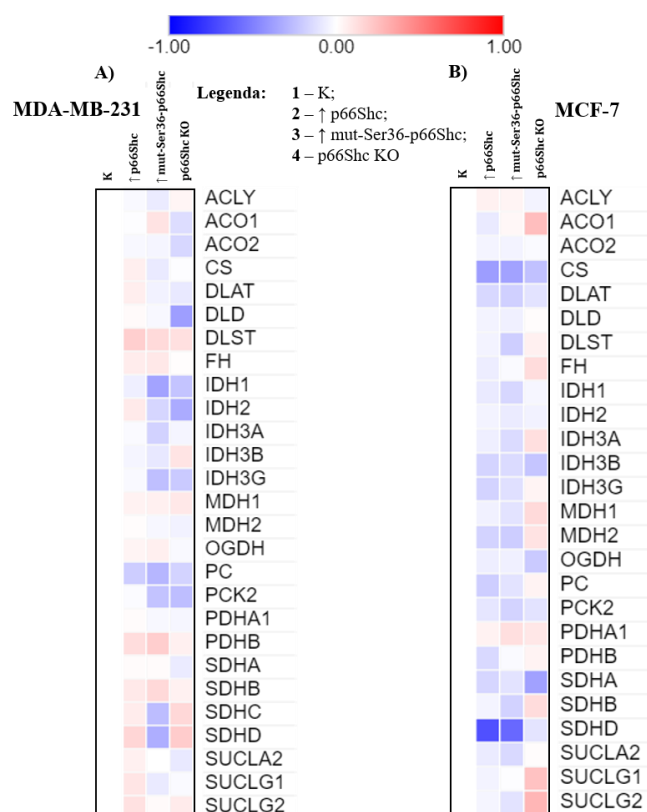
- Poziom enzymów biorących udział w cyklu Krebsa

Cykl kwasów trikarboksylowych może pełnić istotną rolę zarówno w procesach katabolicznych jak i anabolicznych. W związku z tym, że nowotwory należą do grupy chorób związanych ze zwiększonym „stresem” metabolicznym, bardzo często w komórkach nowotworowych dochodzi do przeprogramowania szlaków metabolicznych. Dlatego też, dodatkowo postanowiłam sprawdzić jak zmiana poziomu białka p66Shc w komórkach poszczególnych klonów linii MDA-MB-231 oraz MCF-7 może wpłynąć na poziom wybranych enzymów zaangażowanych w cykl Krebsa.

Analiza z wykorzystaniem porównawczej spektrometrii mas uwidoczniała różnice w poziomie poszczególnych enzymów cyklu Krebsa pomiędzy klonami zarówno linii MDA-MB-231 jak i MCF-7. W przypadku linii MDA-MB-231 klon z wyciszoną ekspresją genu

kodującego białko p66Shc oraz z podwyższonym poziomem zmutowanej w reszcie Ser36 formy białka p66Shc charakteryzują się obniżeniem poziomu znacznej liczby enzymów biorących udział w cyklu Krebsa (ryc. 35A). Do enzymów, których poziom jest najbardziej obniżony w klonie p66Shc KO zaliczyć można: dehydrogenazę dihydroliponianową (DLD), dehydrogenazy izocytrynianowe 1 i 2 (IDH1, IDH2), karboksylazę pirogronianową (PC) oraz karboksykinazę fosfoenolopirogronianową (PCK2). Warty uwagi jest fakt, że dehydrogenaza izocytrynianowa (której poziom jest obniżony) jest istotnym enzymem regulatorowym cyklu Krebsa. W klonie ↑ mut-Ser36-p66Shc najbardziej obniżone są poziomy enzymów: IDH1, IDH2 oraz poszczególne podjednostki IDH (IDH3A, IDH3B oraz IDH3G), PC, PCK2 jak również dehydrogenaz bursztynianowych (SDHC i SDHD). Klon ↑ p66Shc linii MDA-MB-231 charakteryzuje się z kolei podwyższonym poziomem tylko niektórych enzymów cyklu Krebsa.

W przypadku klonów linii MCF-7 zaobserwowałam nieco odmienny kierunek zmian. Mianowicie, klon p66Shc KO linii MCF-7 cechuje się podwyższeniem poziomu wielu analizowanych enzymów biorących udział w cyklu Krebsa, czyli odwrotnie niż miało to miejsce w klonie MDA-MB-231 pozbawionym białka p66Shc (ryc. 35B). Klony ↑ p66Shc oraz ↑ mut-Ser36-p66Shc charakteryzują się z kolei obniżeniem poziomów zdecydowanej większości przeanalizowanych enzymów cyklu Krebsa. Szczególnie obniżony poziom w przypadku obu klonów (↑ p66Shc oraz ↑ mut-Ser36-p66Shc) wykazuje podjednostka cytochromu b dehydrogenazy bursztynianowej (SDHD).

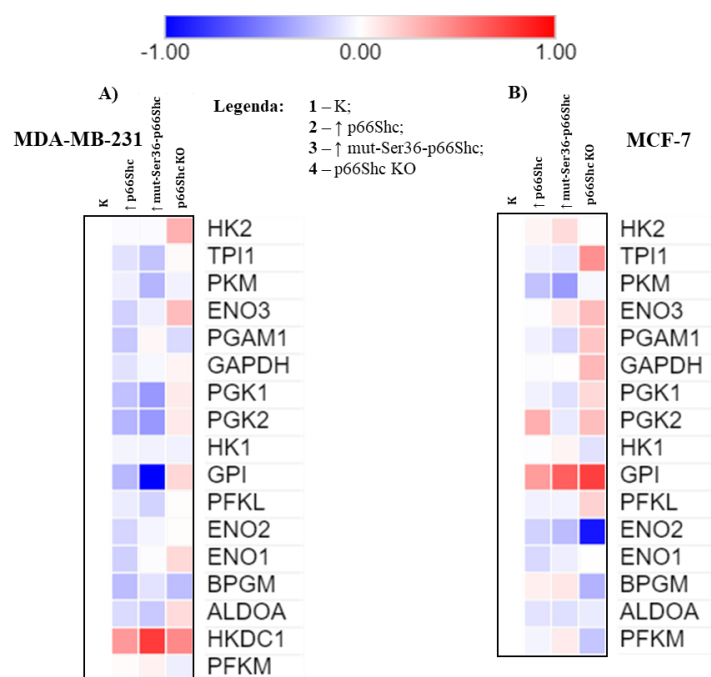


**Ryc. 35** Poziom wybranych enzymów biorących udział w cyklu Krebsa określony w klonach linii MDA-MB-231 (A) oraz MCF-7 (B) z wykorzystaniem analizy porównawczej spektrometrii mas.

- Poziom enzymów biorących udział w procesie glikolizy

W kolejnym etapie swojej pracy postanowiłam sprawdzić jak w poszczególnych klonach linii MDA-MB-231 oraz MCF-7 zmieni się poziom wybranych enzymów biorących udział w często preferowanym przez komórki nowotworowe procesie glikolizy. I tak, najbardziej widoczną zmianą jest podwyższenie poziomu zdecydowanej większości enzymów glikolitycznych w klonie z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc obu linii: MDA-MB-231 i MCF-7 (ryc. 36A, B). W przypadku klonów linii MDA-MB-231 z podwyższonym poziomem białka p66Shc (↑ p66Shc oraz ↑ mut-Ser36-p66Shc) zaobserwowałam dokładnie odwrotną zależność, a więc obniżenie poziomu większości analizowanych enzymów glikolitycznych. W klonach ↑ p66Shc oraz ↑ mut-Ser36-p66Shc linii MCF-7 obniżenie poszczególnych enzymów nie jest aż tak wyraźne jak ma to miejsce w przypadku tych samych klonów linii MDA-MB-231. Dodatkowo, w tym przypadku izomeraza glukozy-6-fosforanowa (GPI) wykazuje zdecydowanie podwyższony poziom zarówno w klonie ↑ p66Shc jak i ↑ mut-Ser36-p66Shc linii MCF-7.





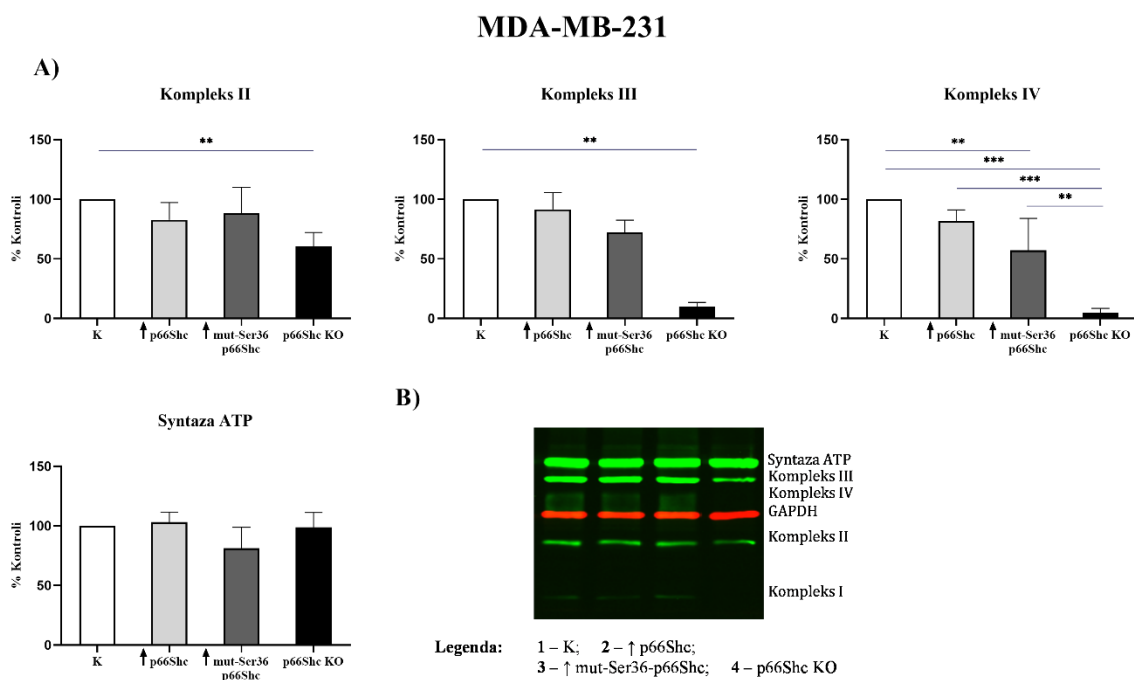
Ryc. 36 Poziom wybranych enzymów biorących udział w procesie glikolizy określony w klonach linii MDA-MB-231 (A) oraz MCF-7 (B) z wykorzystaniem analizy porównawczej spektrometrii mas.

#### 4.2.7. Analiza profilu OXPHOS w komórkach poszczególnych klonów linii nowotworowych: MDA-MB-231 oraz MCF-7

Metabolizm tlenowy zależy w głównej mierze od sprawności funkcjonowania mitochondrialnego łańcucha oddechowego. W związku z tym postanowiłam sprawdzić poziom określonych podjednostek wchodzących w skład poszczególnych kompleksów OXPHOS. Należy podkreślić, że zgodnie ze specyfikacją zastosowanych przeciwciał (opisanych w tabeli 12 rozdziału 3), podjednostki zostały tak dobrane, że ich poziom koreluje z poziomem całych kompleksów mitochondrialnego łańcucha oddechowego. W związku z tym, na rycinach oraz w opisie analizy przyjęto, że poziom poszczególnych podjednostek umownie oznaczać będzie poziom odpowiadającym im kompleksów (I – IV) oraz syntazy ATP. Wykorzystując technikę Western Blot napotkałam problemy związane z oznaczeniem poziomu podjednostki kompleksu I (bardzo niski jej poziom szczególnie w klonie p66Shc KO), które uniemożliwiły mi uzyskanie miarodajnych wyników, co w konsekwencji spowodowało ich brak w niniejszej analizie. Dopiero proteomiczna analiza porównawcza umożliwiła oznaczenie poziomu podjednostek kompleksu I.

### Linia nowotworowa MDA-MB-231:

Przeprowadzona analiza profilu OXPHOS również wykazała znaczące różnice w poziomie poszczególnych podjednostek kompleksów łańcucha oddechowego w klonach linii MDA-MB-231. Obserwowane różnice występują przede wszystkim pomiędzy klonem kontrolnym (K) a klonem z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (p66Shc KO), co widoczne jest w przypadku zarówno kompleksu II, III i IV (ryc. 37A). Najniższy poziom podjednostek (SDHB, UQCRC2 oraz MTCO1) odpowiednio kompleksów II, III i IV zaobserwowałam w klonie p66Shc KO. Wspomniane podjednostki wykazują istotne obniżenie względem kontroli (ryc. 37A). W klonie z podwyższonym poziomem zmutowanej w reszcie Ser36 formy białka p66Shc ( $\uparrow$  mut-Ser36-p66Shc) poziom podjednostek UQCRC2 oraz MTCO1 (kompleks III i IV) jest również obniżony w stosunku do linii kontrolnej. Nie zaobserwowałam różnic w poziomie podjednostki ATP5A (syntaza ATP) w klonach linii MDA-MB-231.



**Ryc. 37 Analiza profilu OXPHOS w klonach linii MDA-MB-231.** Poziom wybranych podjednostek mitochondrialnego łańcucha oddechowego (A) przykładowy wynik analizy Western Blot (B); poziom poszczególnych białek wystandaryzowano w odniesieniu do białka referencyjnego GAPDH; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

Wyniki uzyskane z wykorzystaniem techniki Western Blot zostały potwierdzone przez bardziej szczegółową i dokładniejszą technikę spektrometrii mas. Umożliwiło mi to przeanalizowanie zdecydowanie większej ilości badanych podjednostek wchodzących w skład poszczególnych kompleksów mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Prezentowane

wyniki zostały wystandaryzowane do klonu kontrolnego (K) (klon transfekowany pustym wektorem).

### **Kompleks I:**

Przeprowadzona, porównawcza analiza proteomiczna wykazała znacząco obniżony poziom większości analizowanych podjednostek kompleksu I w klonie z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc – p66Shc KO (ryc. 38A). Chciałabym zwrócić uwagę, że wśród analizowanych podjednostek znajdują się zarówno podjednostki strukturalne jak i podjednostki zaliczane do tzw. czynników składających. Niemniej jednak, w przypadku klonu p66Shc KO obniżony poziom obserwuje się wyłącznie w przypadku podjednostek strukturalnych kompleksu I (wszystkie podjednostki wykazujące obniżony poziom – oznaczono kolorem niebieskim). Natomiast, poziom podjednostek kompleksu I zaliczanych do czynników składających (NDUFAF2, NDUFAF4, NDUFAF6) w klonie p66Shc KO jest nieznacznie podwyższony (ryc. 38A). Ponadto, klony z podwyższonym poziomem białka p66Shc: ↑ p66Shc oraz ↑ mut-Ser36-p66Shc również cechuje wyższy poziom niektórych z podjednostek czynników składających kompleksu I (NDUFAF2, NDUFAF4, NDUFAF7). W klonie ↑ mut-Ser36-p66Shc można także wskazać na widocznie niższy poziom takich podjednostek strukturalnych kompleksu I jak: NDUFA11, NDUFV2, MT-ND2, NDUFS5, NDUFAB1.

### **Kompleks II**

Klon z podwyższonym poziomem białka p66Shc (↑ p66Shc) charakteryzuje się podniesionym poziomem wszystkich analizowanych podjednostek kompleksu II, z czego najwyższy poziom wykazuje podjednostka zaliczona do czynników składających – SDHAF1 (ryc. 38B). W klonie ↑ mut-Ser36-p66Shc jako jedynym zaobserwowałam obniżenie poziomu takich podjednostek strukturalnych jak: SDHD oraz SDHC. Pozostałe, podjednostki kompleksu II wykazują podwyższony poziom (przy czym poziom podjednostki SDHA wydaje się być najmniej zmieniony). Co ciekawe, klon p66Shc KO pozbawiony białka p66Shc charakteryzuje się podwyższonym poziomem wszystkich podjednostek strukturalnych (SDHD, SDHC oraz SDHB) za wyjątkiem podjednostki SDHA, której poziom jest obniżony. Z kolei podjednostki zaliczane do czynników składających (SDHAF1 i SDHAF2) wykazują najmniejsze zmiany w stosunku do klonu kontrolnego.

### **Kompleks III**

Podobnie jak w przypadku kompleksu I, największe zmiany w poziomie oznaczonych podjednostek kompleksu III zaobserwowałam w klonie p66Shc KO (ryc. 38C). Wszystkie podjednostki kompleksu III tego klonu charakteryzują się zdecydowanie obniżonym

poziomem z wyjątkiem dwóch podjednostek: UQCRH oraz LYRM7, które cechuje nieznacznie podwyższony poziom. Podjednostka LYRM7 zalicza się to czynników składających kompleksu III, zaś UQCRH do podjednostek strukturalnych. Najbardziej obniżony poziom w klonie p66Shc KO wykazują podjednostki: UQCRC2, UQCRC1, UQCRB, UQCRFS1 oraz UQCRQ (wszystkie są podjednostkami strukturalnymi). W klonie ↑ mut-Ser36-p66Shc dwie podjednostki kompleksu III: UQCRH oraz UQCC1 charakteryzują się ich obniżonym poziomem. W pozostałych podjednostkach tego kompleksu zmiany są nieznaczne. Klon ↑ p66Shc wyróżnia się najmniej widocznymi zmianami w poziomie analizowanych podjednostek kompleksu III.

#### **Kompleks IV**

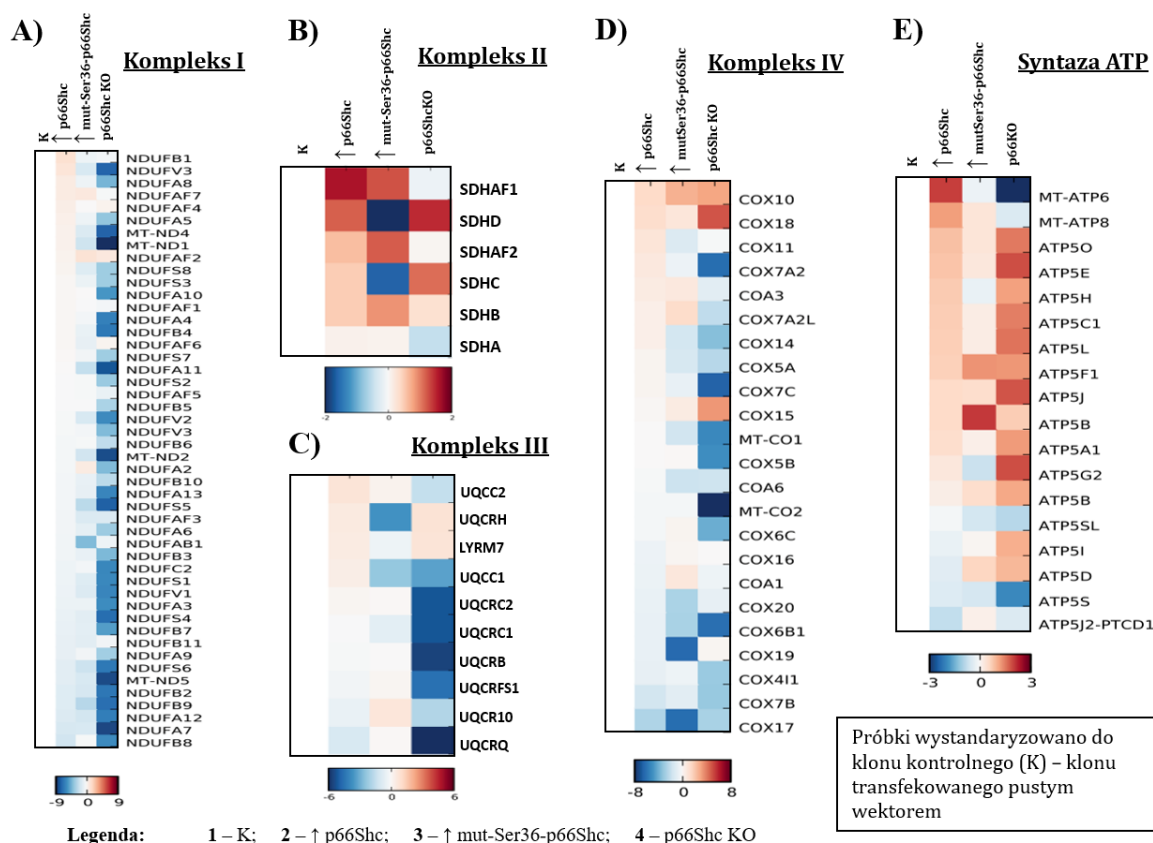
W kompleksie IV (podobnie jak w przypadku kompleksów: I oraz III) największe zmiany w obrębie przeanalizowanych podjednostek zaobserwowałam również w klonie z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (ryc. 38D). W klonie tym zdecydowana większość podjednostek kompleksu IV jest obniżona. Chciałam zaznaczyć, że najbardziej obniżony poziom zaobserwowałam w podjednostce MT-CO2 (podjednostka strukturalna). Natomiast, znaczące podwyższenie w klonie p66Shc KO zanotowałam wyłącznie w poziomie trzech oznaczonych podjednostek, zaliczanych do czynników składających: COX10, COX18 i COX15. Chciałabym również zwrócić uwagę, że klon ↑ mut-Ser36-p66Shc demonstruje obniżony poziom większości przeanalizowanych podjednostek. Najbardziej obniżony poziom zaobserwowałam w następujących podjednostkach: COX20, COX6B1, COX19 oraz COX17, z czego wiadomo, że COX20 oraz COX19 zaliczają się do czynników składających. W przypadku klonu ↑ p66Shc nie odnotowałam widocznych zmian w poziomie przeanalizowanych podjednostek kompleksu IV.

#### **Syntaza ATP**

Odmienne niż w pozostałych kompleksach mitochondrialnego łańcucha oddechowego, poziom większości podjednostek syntazy ATP w klonie z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc jest znacząco podwyższony. (ryc. 38E). Inaczej jest w przypadku poziomu podjednostki MT-ATP6 syntazy ATP (tworzącej kanał w wewnętrznej błonie mitochondrialnej), która demonstruje znacząco obniżony poziom w klonie p66Shc KO. Ponadto, nieznacznie obniżony poziom w tym klonie zaobserwowałam również w przypadku podjednostek: MT-ATP8, ATP5L, ATP5S oraz ATP5J2-PTCD1. W klonie ↑ mut-Ser36-p66Shc największe zmiany zaobserwowałam w poziomie podjednostek ATP5F1 i ATP5B, wykazujących istotne podwyższenie w stosunku do klonu kontrolnego przy zachowaniu pozostałych podjednostek syntazy ATP na stosunkowo mało zmienionym poziomie. Z kolei

w klonie z podwyższonym poziomem białka p66Shc ( $\uparrow$  p66Shc) największy wzrost zanotowałam w przypadku poziomu podjednostki MT-ATP6. W klonie tym, podwyższony poziom zauważyłam w większości oznaczonych podjednostek syntazy ATP. Wyjątek stanowią następujące podjednostki: ATP5SL, ATP5I, ATP5D, ATP5S, ATP5J2-PTCD1, w których zaobserwowałam nieznaczny spadek w ich poziomie.

### MDA-MB-231

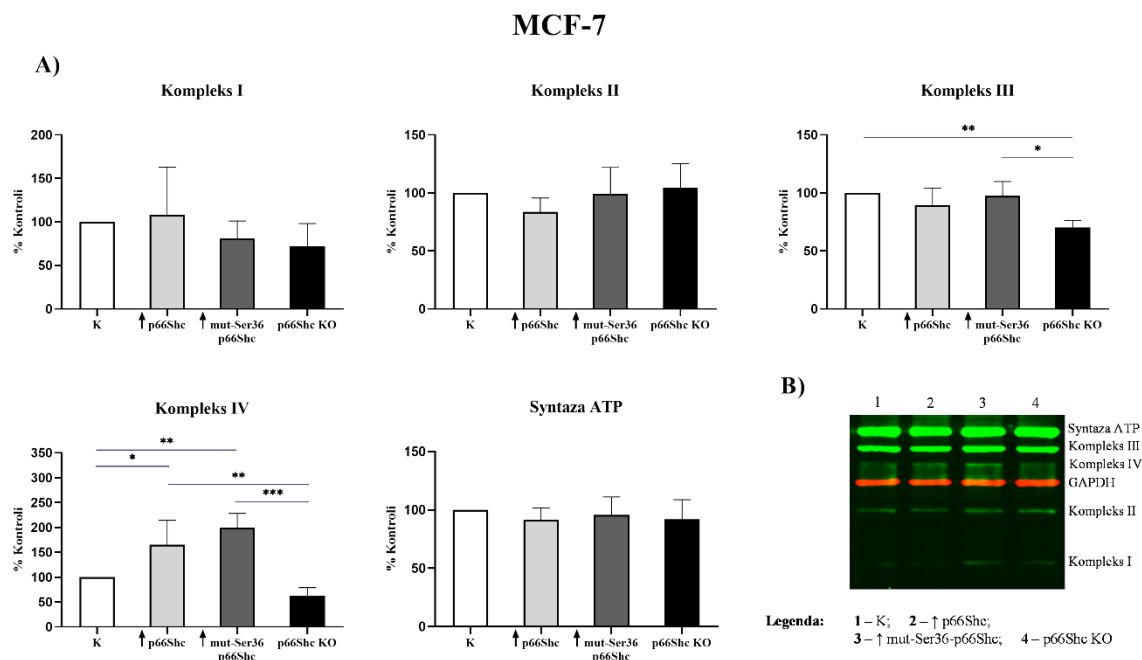


**Ryc. 38** Poziom podjednostek poszczególnych kompleksów łańcucha oddechowego w klonach linii MDA-MB-231. Kompleks I (A), kompleks II (B), kompleks III (C), kompleks IV (D) oraz syntaza ATP (E). Próbkę wystandaryzowano do klonu kontrolnego (K), transfekowanego pustym wektorem.

### Linia nowotworowa MCF-7:

Identyczna analiza została przeprowadzona dla klonów linii MCF-7. Wynika z niej, że poziomy wybranych podjednostek kompleksów I oraz II (NDUFB8 oraz SDHB) nie różnią się w poszczególnych klonach. W obu przypadkach można mówić o stosunkowo wyrównanym poziomie wchodzących w ich skład podjednostek (ryc. 39A, B). Z kolei, różnice zaobserwowałam w przypadku podjednostek wchodzących w skład kompleksów III i IV (UQCRC2 i MTCO1). Klon p66Shc KO charakteryzuje się najniższym poziomem podjednostek UQCRC2 (kompleksu III) oraz MTCO1 (kompleksu IV). Interesujący jest fakt, że oba klony z podwyższonym poziomem białka p66Shc ( $\uparrow$  p66Shc i  $\uparrow$  mut-Ser36-p66Shc)

charakteryzują się podwyższonym poziomem podjednostki MTCO1 kompleksu IV. Poziom podjednostki ATP5A syntazy ATP, we wszystkich badanych klonach linii MCF-7 jest podobny (ryc. 39A).



**Ryc. 39 Analiza profilu OXPHOS w klonach linii MCF-7.** Poziom wybranych podjednostek mitochondrialnego łańcucha oddechowego (A) przykładowy wynik analizy Western Blot (B); poziom poszczególnych białek wystandaryzowano w odniesieniu do białka referencyjnego GAPDH; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

Porównawcza analiza proteomiczna oznaczonych podjednostek mitochondrialnego łańcucha oddechowego uzyskanych z wykorzystaniem techniki spektrometrii mas została przeprowadzona również dla linii nowotworowej MCF-7. Przedstawia się ona następująco:

### Kompleks I

Wśród analizowanych podjednostek kompleksu I można wskazać na obniżenie poziomu większości przeanalizowanych podjednostek we wszystkich badanych klonach linii MCF-7 (ryc. 40A). W przypadku klonu p66Shc KO obniżony poziom zaobserwowałam praktycznie w większości oznaczonych podjednostek, za wyjątkiem pięciu: NDUFAF2, NDUFV3, NDUFS7, NDUFAF4 i NDUFAF6. Trzy z nich zaliczane są do czynników składających kompleksu I (NDUFAF2, NDUFAF4, NDUFAF6). Na szczególną uwagę zasługuje podjednostka NDUFAF2, której poziom jest znacząco podwyższony w klonie p66Shc KO. W klonach z podwyższonym poziomem białka p66Shc: ↑ p66Shc oraz ↑ mut-Ser36-p66Shc poziom zdecydowanej większości podjednostek jest obniżony. Tylko niewiele z przeanalizowanych podjednostek wykazuje podwyższenie co widać na ryc. 40A.

### **Kompleks II**

Zmiana poziomu białka p66Shc w klonach linii MCF-7 wywarła różny wpływ na poziom oznaczonych podjednostek poszczególnych kompleksów łańcucha oddechowego. Największe podwyższenie poziomu spośród analizowanych podjednostek kompleksu II zaobserwowałam w podjednostce zaliczanej do czynników składających – SDHAF2 w klonie ↑ p66Shc (ryc. 40B). Poziom wszystkich pozostałych podjednostek, będących podjednostkami strukturalnymi w tym klonie jest obniżony, a w szczególności podjednostka SDHD. Bardzo podobną zależność zaobserwowałam również w klonie ↑ mut-Ser36-p66Shc. Natomiast w przypadku klonu p66Shc KO widać podwyższenie poziomu podjednostki strukturalnej SDHB (co potwierdza wyniki uzyskane metodą Western Blot) przy jednoczesnym obniżeniu pozostałych badanych podjednostek tego kompleksu (ryc. 40B).

### **Kompleks III**

W poziomie podjednostek kompleksu III największe zmiany zauważyłam w klonach ↑ mut-Ser36-p66Shc oraz p66Shc KO. W obu klonach poziom większości badanych podjednostek jest obniżony. W klonie p66Shc KO podwyższenie poziomu wykazują nieliczne podjednostki kompleksu III. Podjednostką wykazującą najwyższy wzrost poziomu jest podjednostka strukturalna UQCR10 (ryc. 40C). Ponadto, poziom podjednostki zaliczanej do czynników składających – LYRM7 jest również nieznacznie podwyższony. W przypadku klonu ↑ mut-Ser36-p66Shc poziom czterech podjednostek jest podwyższony: UQCR10, UQCC1, MT-CYB oraz UQCRB. W klonie ↑ p66Shc obserwowane zmiany są najmniejsze.

### **Kompleks IV**

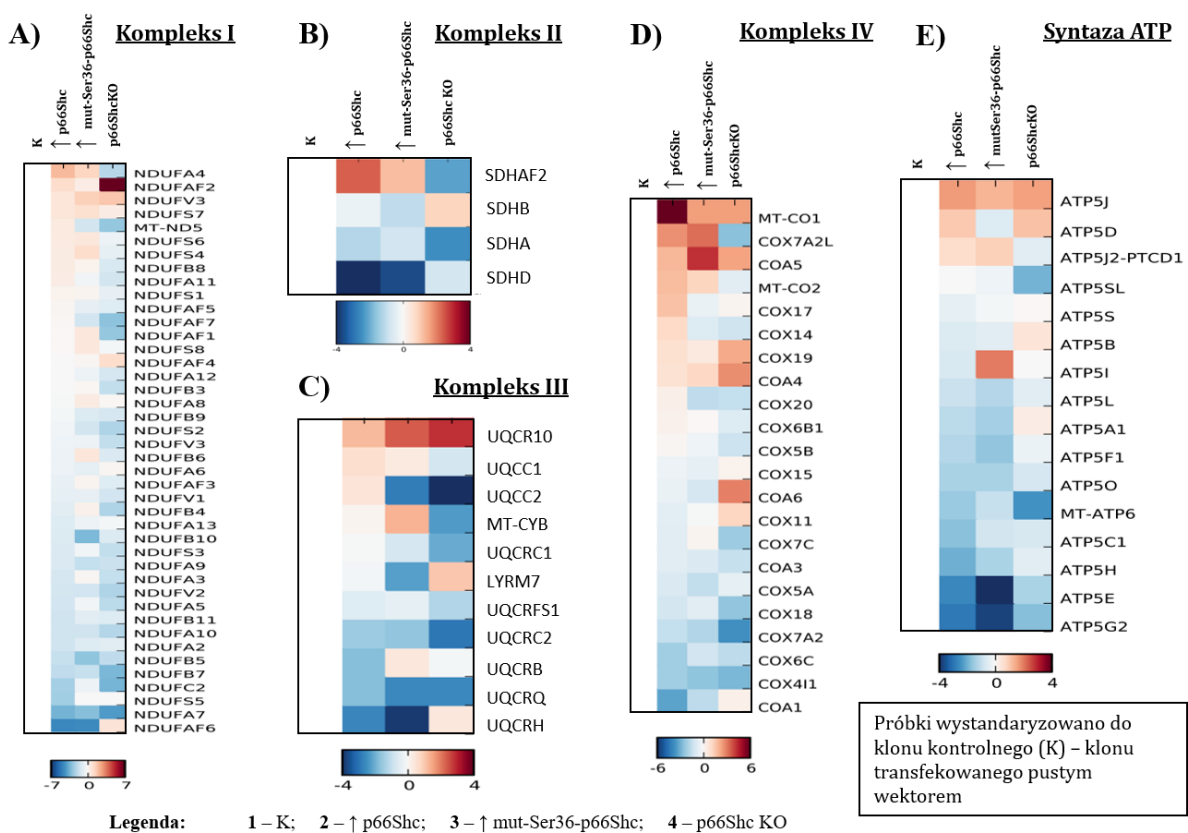
Klon z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc prezentuje podwyższony poziom oznaczonych podjednostek kompleksu IV w szczególności w podjednostkach zaliczanych do czynników składających COA5, COA4, COA6 oraz COX19 (ryc. 40D). Poziom pozostałych podjednostek w tym klonie jest obniżony. Wyniki uzyskane dla klonu ↑ mut-Ser36-p66Shc również pokazują obniżenie poziomu w większości podjednostkach kompleksu IV. Natomiast najwyższy wzrost poziomu zaobserwowałam jedynie w kilku podjednostkach tego kompleksu: MT-CO1, COX7A2L oraz COA5. W przypadku klonu ↑ p66Shc linii MCF-7 największą zmianę zanotowałam w podjednostce strukturalnej MT-CO1, której poziom jest najbardziej podwyższony.

### **Syntaza ATP**

W przypadku syntazy ATP zauważyłam, iż poziom zdecydowanej większości podjednostek tego kompleksu w klonie ↑ p66Shc jest obniżony (ryc. 40E). Jedynie trzy z nich cechują się wyższym poziomem w stosunku do klonu kontrolnego: ATP5J, ATP5D oraz

ATP5J2-PTCD1. Wszystkie z nich są podjednostkami strukturalnymi. Podobną zależność zaobserwowałam również w klonie  $\uparrow$  mut-Ser36-p66Shc, gdzie obniżony poziom dotyczy większości badanych podjednostek syntazy ATP. Niemniej jednak, poziom podjednostki ATP5I w tym klonie jest najbardziej podwyższony. Z kolei klon p66Shc KO demonstruje zdecydowanie niższy poziom w porównaniu do kontroli w dwóch przeanalizowanych podjednostkach: ATP5SL oraz MT-ATP6. Z czego jak już zostało wspomniane w przypadku linii MDA-MB-231, podjednostka MT-ATP6 stanowi białko tworzące kanał w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Znaczące podwyższenie podjednostek zauważyłam jedynie w podjednostkach ATP5J oraz ATP5D syntazy ATP.

### MCF-7



**Ryc. 40** Poziom podjednostek poszczególnych kompleksów łańcucha oddechowego w klonach linii MCF-7. Kompleks I (A), kompleks II (B), kompleks III (C), kompleks IV (D) oraz syntaza ATP (E). Próbkę wystandaryzowano do klonu kontrolnego (K), transfekowanego pustym wektorem.



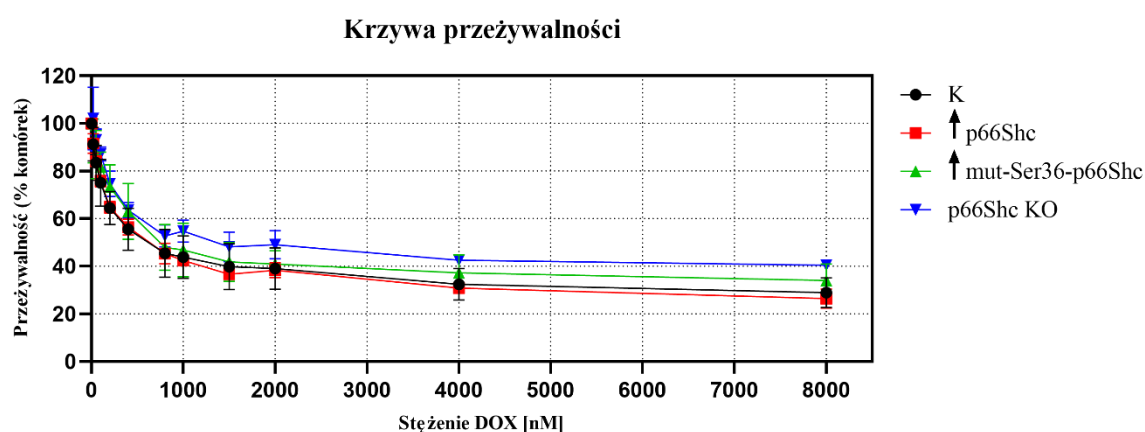
### **4.3. Ocena wpływu zmiany poziomu białka p66Shc jak również mutacji w kluczowej reszcie seryny 36 na wrażliwość komórek raka sutka na traktowanie chemioterapeutykiem – doksorubicyną**

Kolejnym etapem niniejszej pracy było określenie czy zmiana poziomu białka p66Shc może mieć wpływ na odpowiedź komórek raka sutka traktowanych chemioterapeutykiem doksorubicyną, który jest powszechnym i dość dobrze poznanym antybiotykiem przeciwnowotworowym z grupy antracyklin. Wybór doksorubicyny do moich badań był związany przede wszystkim z mechanizmem jej działania. Mianowicie, doksorubicyna wywiera swój wpływ na komórki nowotworowe poprzez interkalację DNA, a także poprzez zwiększenie produkcji RFT, co ma związek z aktywnością mitochondriów. W celu uzyskania odpowiedzi na postawiony sobie cel, w niniejszym rozdziale przedstawione zostały wyniki, uzyskane z wykorzystaniem wyłącznie klonów linii MDA-MB-231, w których dokonano zmiany poziomu białka p66Shc. Zasadność użycia wspomnianej linii polega na tym, iż stanowi ona idealny model dla zastosowania chemioterapii (charakterystyka linii w tabeli 3). W związku z tym, wszystkie przeprowadzone doświadczenia zostały wykonane przy użyciu klonów linii MDA-MB-231 nietraktowanych ((-) DOX) oraz traktowanych ((+) DOX) doksorubicyną. W ramach realizacji niniejszego celu na samym początku na podstawie krzywej przeżywalności wybrano odpowiednie stężenie doksorubicyny, a następnie dokonano oceny morfologii sieci mitochondrialnej, porównując komórki poszczególnych klonów odpowiednio traktowanych i nietraktowanych doksorubicyną. Sprawdzone czy traktowanie komórek zastosowanym chemioterapeutykiem wpłynęło na prooksydacyjną ścieżkę białka p66Shc oraz poziom RFT a co za tym idzie ochronę antyoksydacyjną jak również na wybrane parametry bioenergetyczne komórek klonów linii MDA-MB-231. Na koniec przeprowadzono analizę przeżywalności komórek wspomnianych klonów, czyli procesu apoptozy jako programowanej śmierci komórki.

#### **4.3.1. Dobór optymalnego stężenia doksorubicyny – określenie krzywej przeżywalności**

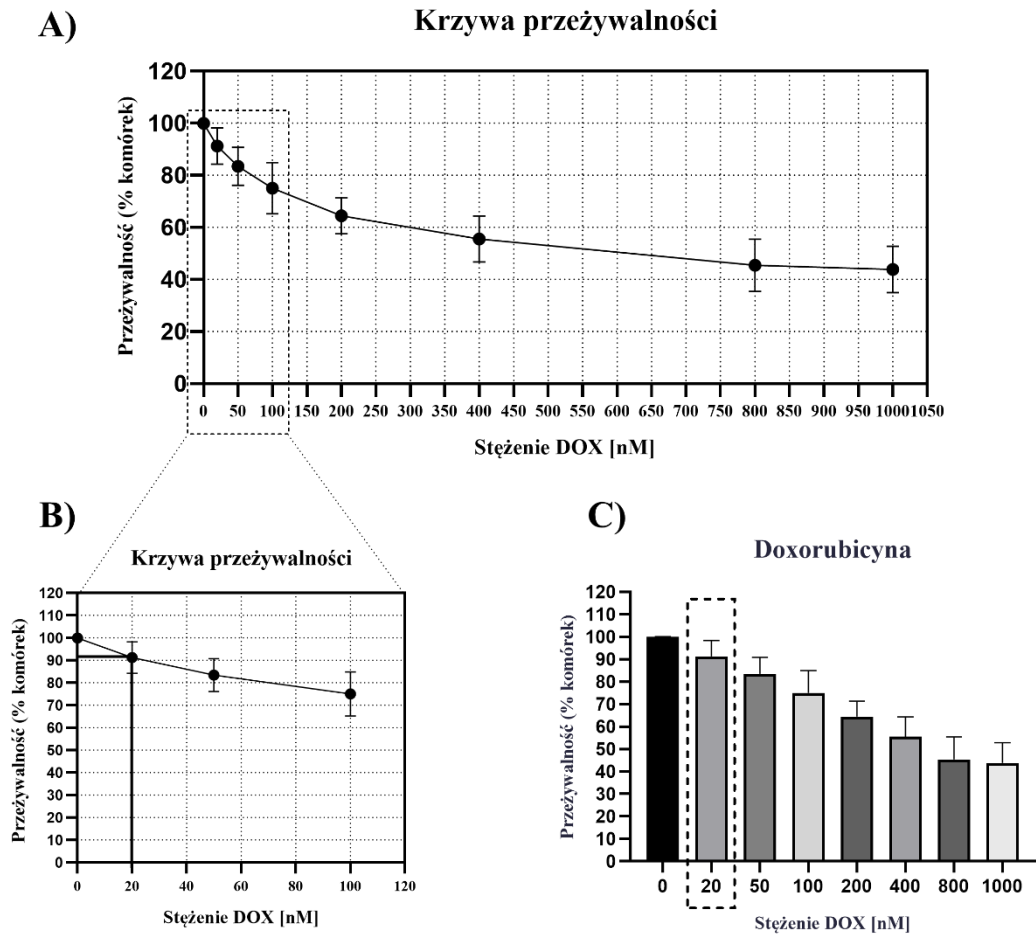
Podczas doboru odpowiedniego stężenia doksorubicyny, które było następnie stosowane we wszystkich doświadczeniach stanowiących podstawę wyników prezentowanych w rozdziale 4.3, kierowałam się zasadą doboru takiego stężenia doksorubicyny, które powoduje 10% spadek w przeżywalności traktowanych komórek. W tym celu wykonałam test cytotoksyczności wykorzystujący barwnik SRB (opis techniki

znajduje się w rozdziale 3.11, zaś przebiegu doświadczenia oceny cytotoksyczności DOX w rozdziale 3.5.1). Komórki poszczególnych klonów linii MDA-MB-231 były inkubowane z doksorubicyną przez okres 48h, z zastosowaniem następujących stężeń DOX: 0, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 1500, 2000, 4000, 8000 nM. Należy podkreślić, iż do traktowania komórek doksorubicyną wykorzystałam wszystkie badane klony linii MDA-MB-231. Zabieg ten miał na celu określenie ewentualnych różnic w odpowiedzi poszczególnych klonów na różne stężenia zastosowanego chemioterapeutyka. Niemniej jednak, wyboru optymalnego stężenia (skutkującego 10% spadkiem w przeżywalności komórek) dokonałam w oparciu o klon stanowiący kontrolę (K), którym jest linia MDA-MB-231 transfekowana pustym wektorem. Przeprowadzona analiza wykazała niewielkie odchylenia we wrażliwości (różne stężenia DOX) pomiędzy poszczególnymi klonami linii MDA-MB-231. Najbardziej widoczne różnice zauważalne są w przypadku zastosowanych, najwyższych stężeń doksorubicyny, gdzie linia MDA-MB-231 z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (p66Shc KO) wydaje się być najmniej wrażliwa na traktowanie doksorubicyną (ryc. 41).



**Ryc. 41** Krzywe przeżywalności poszczególnych klonów linii MDA-MB-231

Doboru pożądanego stężenia doksorubicyny dokonałam na podstawie krzywej przeżywalności dla linii kontrolnej (K), z której wynika, że około 10% spadek w przeżywalności komórek zauważalny jest przy 20 nM stężeniu doksorubicyny (ryc. 42A, B) (w celu łatwiejszej analizy na ryc. 42A nie zostały przedstawione punkty pomiarowe dla dużych stężeń DOX: 1500 – 8000 nM). Tak więc, biorąc pod uwagę przeprowadzone badania, dalsze doświadczenia wymienione we wstępie rozdziału 4.3 zostały przeprowadzone przy użyciu 20 nM stężenia doksorubicyny, które to jest jednocześnie najmniejszą zastosowaną dawką badanego chemioterapeutyka w niniejszej analizie (ryc. 42C).



**Ryc. 42 Przeżywalność komórek klonu kontrolnego (K) linii MDA-MB-231.** Krzywa przeżywalności komórek klonu K (A); Fragment krzywej przeżywalności z pożądanym stężeniem DOX (B); Wykres słupkowy przeżywalności komórek klonu K (C)

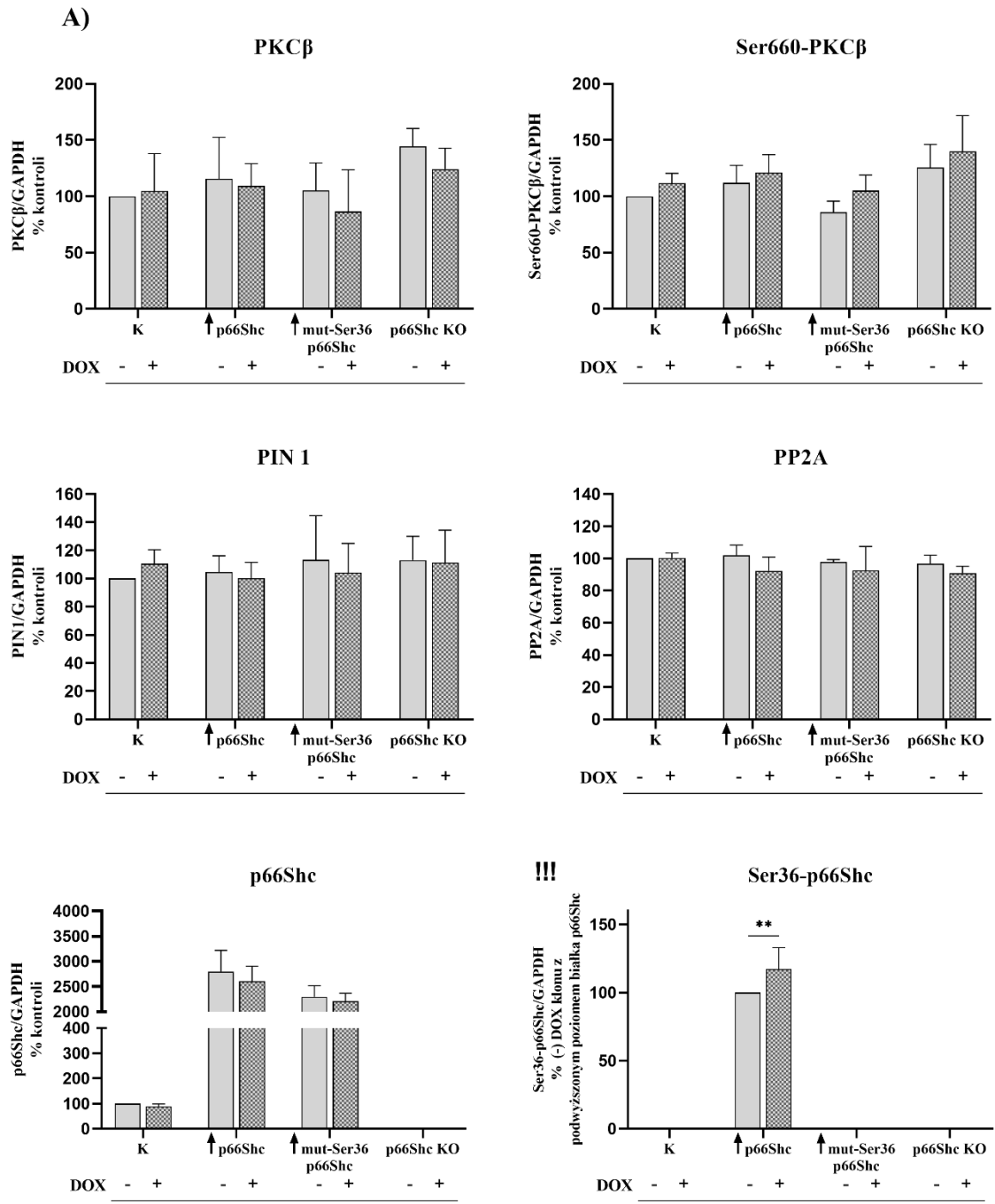
#### 4.3.2. Analiza prooksydacyjnej ścieżki białka adaptorowego p66Shc

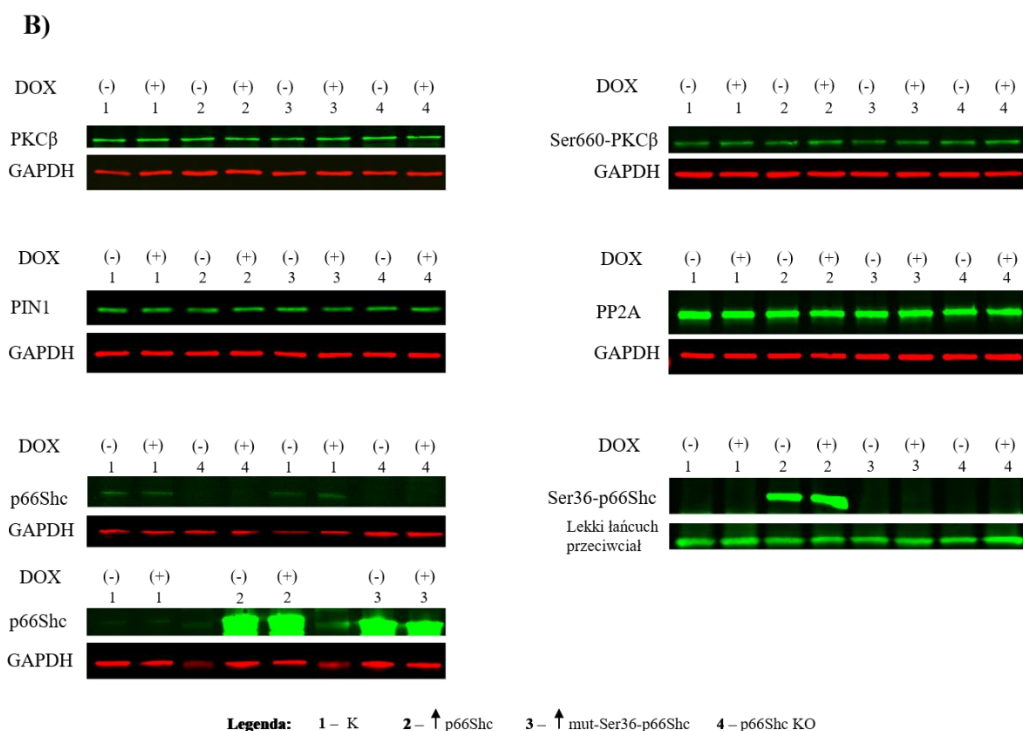
Mitochondria odgrywają zasadniczą i niezwykle zróżnicowaną rolę w fizjologii komórek eukariotycznych. Nie tylko są źródłem ATP lecz biorą także udział w licznych przemianach metabolicznych co z punktu widzenia komórek nowotworowych ma istotne znaczenie. Biorąc pod uwagę fakt, że mitochondria zaangażowane są również w takie procesy jak produkcja RFT oraz apoptoza, w których swoją rolę odgrywa również białko adaptorowe p66Shc, wydaje się być niezwykle interesujące zwłaszcza w kontekście komórek nowotworowych zbadanie prooksydacyjnego szlaku białka p66Shc. Ma to istotne znaczenie z punktu widzenia terapii antynowotworowych, które w głównej mierze oddziałują właśnie na wspomniane procesy: apoptozę oraz produkcję RFT. Uściślając, w niniejszym rozdziale przedstawiono w jaki sposób traktowanie poszczególnych klonów linii MDA-MB-231

(różniących się poziomem białka p66Shc) doksorubicyną może wpłynąć na status fosforylacji białka p66Shc w unikalnej reszcie Ser36 jak również na poziom wybranych białek zaangażowanych w prooksydacyjną ścieżkę białka p66Shc, czyli: PKC $\beta$  (kinazy białkowej fosforylującej białko p66Shc w reszcie Ser36), Ser660-PKC $\beta$  (ufosforylowanej formy kinazy białkowej C $\beta$ ), PIN1 (izomerazy odpowiedzialnej za izomeryzację ufosforylowanego białka p66Shc) oraz PP2A (fosfatazy, która powoduje defosforylację białka p66Shc). Na uwagę zasługuje fakt, iż w niniejszym rozdziale nie będzie poruszany wpływ zmian poziomu białka p66Shc na ścieżkę sygnalizacyjną, której poświęcony jest rozdział 4.2.

Stosując technikę Western Blot dokonałam oznaczenia poziomu wymienionych wyżej białek prooksydacyjnej ścieżki białka p66Shc, a otrzymane wyniki przedstawiono na rycinach 43A i 43B. Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że traktowanie doksorubicyną nie wpłynęło w znaczący sposób ani na poziom samego białka p66Shc jak również na poziom innych białek zaangażowanych w szlak prooksydacyjny p66Shc. Niemniej jednak, pomimo braku istotnych statystycznie różnic pomiędzy przebadanymi klonami linii MDA-MB-231 (traktowanymi i nietraktowanymi doksorubicyną) można zauważyć ogólną tendencję polegającą na obniżeniu poziomu większości z analizowanych białek: PKC $\beta$ , PIN1, PP2A jak również samego białka p66Shc we wszystkich klonach traktowanych doksorubicyną. Odwrotną tendencję, polegającą na podwyższonym poziomie w klonach traktowanych doksorubicyną, można zaobserwować w przypadku fosforylowanych form białek: PKC $\beta$  (fosforylacja Ser660) oraz p66Shc (fosforylacja Ser36 – różnice istotne statystycznie). W przypadku kinazy białkowej C $\beta$  jest to o tyle interesujące, że jej aktywacja (wskutek fosforylacji w reszcie Ser660) przyczynia się do aktywacji właściwości prooksydacyjnych białka p66Shc. Znajduje to swoje odzwierciedlenie w istotnych statystycznie zmianach w poziomie ufosforylowanego w unikatowej reszcie Ser36 białka p66Shc, odpowiedzialnej za jego udział w stresie oksydacyjnym. Ponadto, warto podkreślić, iż detekcja fosforylacji białka p66Shc w reszcie Ser36 możliwa była wyłącznie w klonie z podwyższonym poziomem białka p66Shc ( $\uparrow$  p66Shc) z zastosowaniem techniki immunoprecypitacji ze względu na zbyt niski poziom fosforylacji Ser36 w klonie kontrolnym (K). W związku z tym, że nie możliwe było odniesienie wyników uzyskanych w poszczególnych klonach do klonu kontrolnego (K), nietraktowanego doksorubicyną, wyniki przedstawiono w przeliczeniu na % tego samego klonu ((-) DOX) (na wykresie umieszczono oznaczenie „!!!!” sugerujące zmiany w przeliczeniach). Brak fosforylacji w reszcie Ser36 w klonie ze zmutowanym miejscem fosforylacji w Ser36 ( $\uparrow$ mut-Ser36-p66Shc) oraz klonie z wyłączoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (p66Shc KO) stanowi niejako kontrolę

negatywną i jest spowodowany odpowiednio: stosowną mutacją w reszcie Ser36 oraz wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc.





**Ryc. 43 Poziom wybranych białek uczestniczących w prooksydacyjnej ścieżce białka p66Shc.** Poziom poszczególnych białek wystandaryzowano w odniesieniu do białka referencyjnego GAPDH (A); przykładowy wynik analizy Western Blot (B) \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

### 4.3.3. Morfologia sieci mitochondrialnej

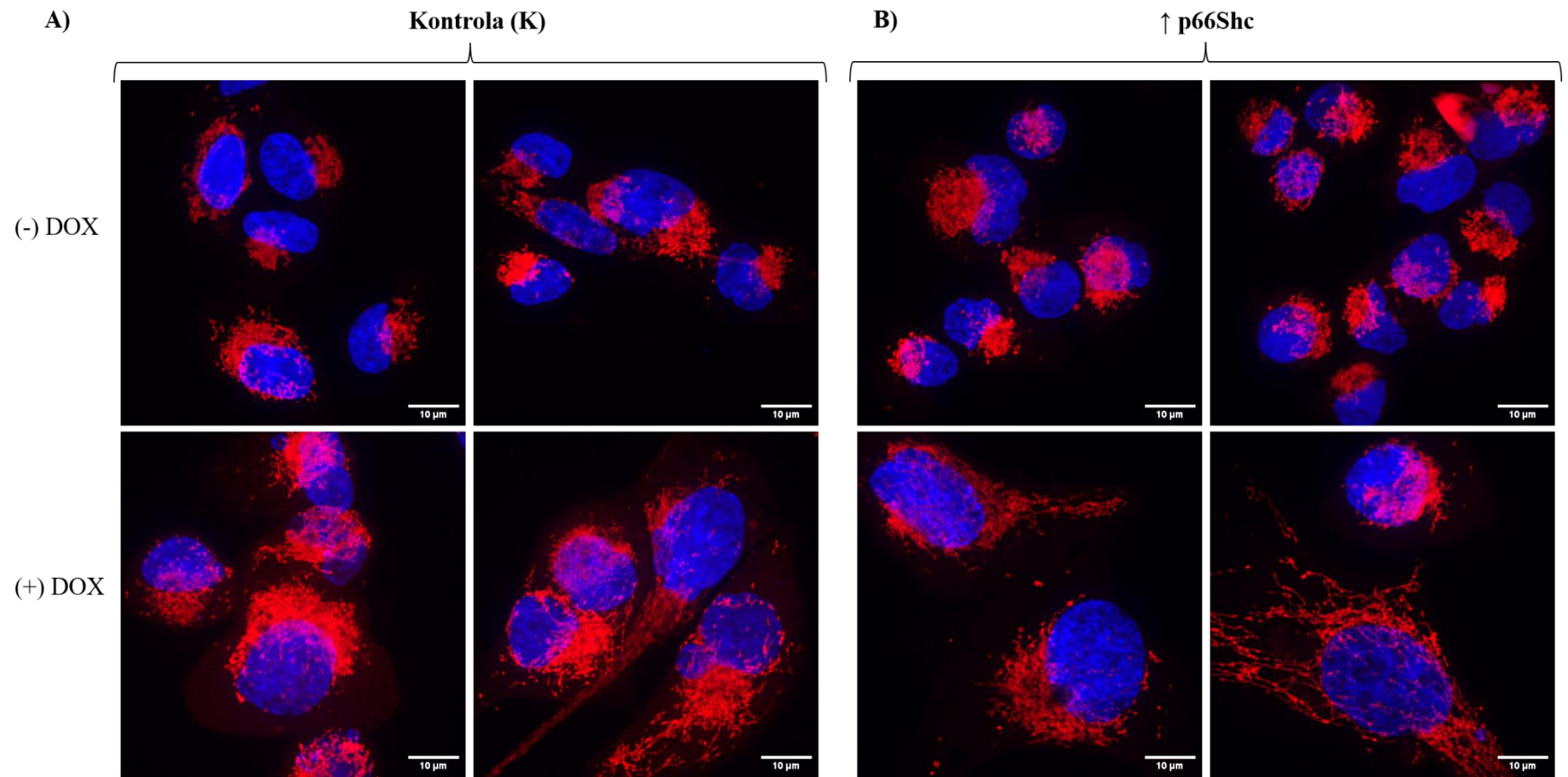
Charakterystyka zastosowanego chemioterapeutyka, która jednoznacznie wskazuje, że jednym z mechanizmów działania dokсорubicyny jest wpływ na mitochondria, skłoniła mnie do przeprowadzenia analizy sieci mitochondrialnej w komórkach poszczególnych klonów linii MDA-MB-231 w odpowiedzi na traktowanie dokсорubicyną. Miało to na celu sprawdzenie w jakim stopniu traktowanie dokсорubicyną może wpłynąć na morfologię sieci mitochondrialnej komórek różniących się poziomem białka p66Shc. Aby osiągnąć zamierzony cel, sieć mitochondrialną zwizualizowano w kolorze czerwonym przy użyciu specyficznej sondy fluorescencyjnej MitoRed, zaś jądra komórkowe w kolorze niebieskim dzięki użyciu barwnika fluorescencyjnego Hoechst 33342 (bardziej szczegółową charakterystykę zastosowanej metody opisano w rozdziale 3.14).

Traktowanie komórek nowotworowych raka sutka dokсорubicyną wywołało zmiany dotyczące zarówno kształtu jądra komórkowego jak i sieci mitochondrialnej.

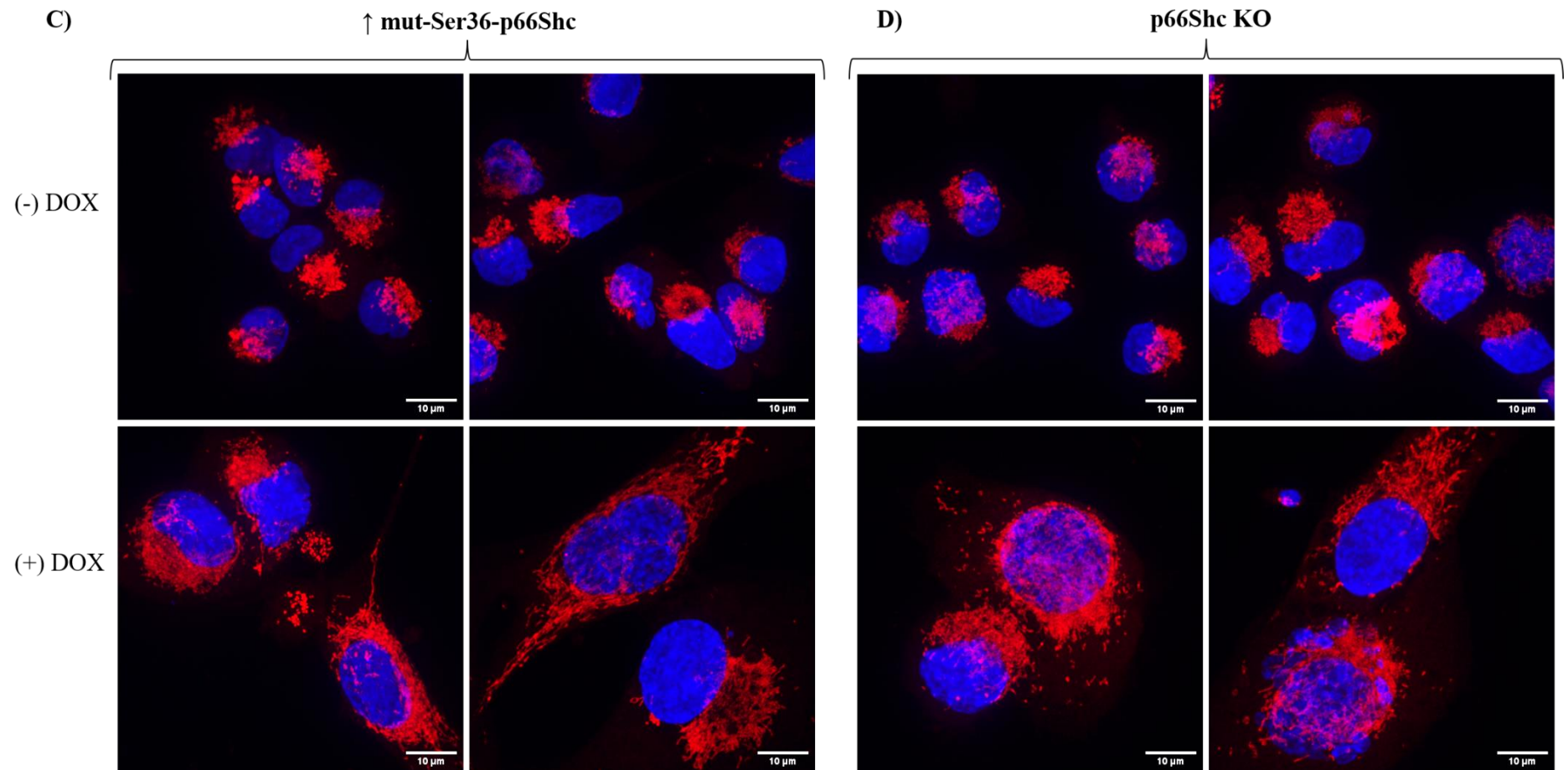
- Klon kontrolny (K) – komórki nowotworowe raka sutka klonu kontrolnego traktowane DOX charakteryzują się przede wszystkim powiększeniem jąder komórkowych. W komórkach nietraktowanych DOX jądra komórkowe przyjmują bardziej owalny

(wydłużony) kształt w porównaniu ze zdecydowanie bardziej kolistym kształtem obserwowanym w komórkach traktowanych DOX. Sieć mitochondrialna w komórkach nietraktowanych DOX nie jest tak bardzo „rozproszona” wokół jądra komórkowego, lokalizując się najczęściej w okolicach jednego z biegunów komórki (ryc. 44A). Wydaje się, że mitochondria w komórkach traktowanych DOX tworzą sieć bardziej rozległą oraz „rozciągniętą” wokół całego jądra komórkowego.

- Klon z podwyższonym poziomem białka p66Shc – podobnie jak w przypadku klonu kontrolnego również w klonie ↑ p66Shc jądra komórek nietraktowanych DOX są mniejsze aniżeli jądra komórkowe obserwowane w komórkach traktowanych DOX. Niemniej jednak, w przypadku komórek klonu ↑ p66Shc nietraktowanych DOX są one nieco bardziej koliste niż te obserwowane w klonie kontrolnym. Sieć mitochondrialna w komórkach traktowanych DOX jest bardziej rozproszona wokół całego jądra komórkowego (ryc. 44B).
- Klon z podwyższonym poziomem zmutowanej w Ser36 formy białka p66Shc – jądra komórkowe komórek nietraktowanych DOX są mniejsze w porównaniu z jądrami komórkowymi komórek traktowanych DOX. Sieć mitochondrialna komórek nietraktowanych DOX jest bardziej skupiona w jednym miejscu komórki w porównaniu ze zdecydowanie bardziej rozległą oraz rozproszoną wokół całego jądra komórkowego siecią mitochondrialną obserwowaną w komórkach tego klonu traktowanych DOX (ryc. 44C).
- Klon z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc – podobnie jak w pozostałych klonach, jądra komórkowe komórek klonu p66Shc KO nietraktowane DOX cechują się zdecydowanie mniejszymi rozmiarami w porównaniu z dużo większymi, kolistymi jądrami komórek traktowanych DOX. Sieć mitochondrialna komórek nietraktowanych DOX tworzy specyficzne skupienia w jednym miejscu komórki, podczas gdy w komórkach traktowanych DOX sieć ta jest równomiernie rozmieszczona po całej komórce. Ponadto, wydaje się, że komórki klonu p66Shc KO (-) DOX charakteryzują się nieznacznie mniej rozbudowaną siecią mitochondrialną w porównaniu do sieci obserwowanej w komórkach nietraktowanych DOX pozostałych klonów, co wymaga jednak przeprowadzenia dodatkowej analizy z wykorzystaniem narzędzi służących do pomiaru parametrów morfologicznych (ryc. 44D).





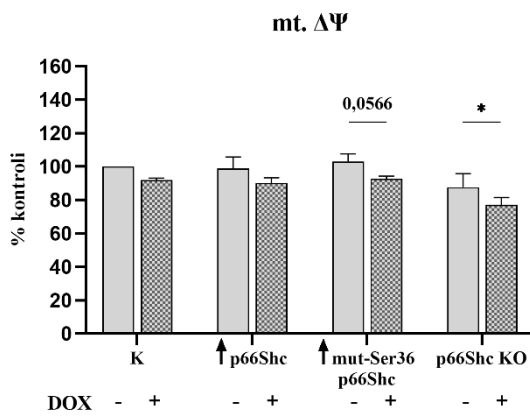


**Ryc. 44** Morfologia sieci mitochondrialnej komórek poszczególnych klonów linii MDA-MB-231 traktowanych oraz nietraktowanych dokсорubicyną. Klon kontrolny (A), klon z podwyższonym poziomem białka p66Shc (B), klon z podwyższonym poziomem zmutowanej w reszcie Ser36 formy białka p66Shc (C) oraz klon z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (D); na niebiesko wybarwiono jądra komórkowe (DAPI) oraz czerwono sieć mitochondrialną (MitoRed).

#### 4.3.4. Wpływ traktowania komórek doksorubicyną na potencjał na wewnętrznej błonie mitochondrialnej oraz profil OXPHOS

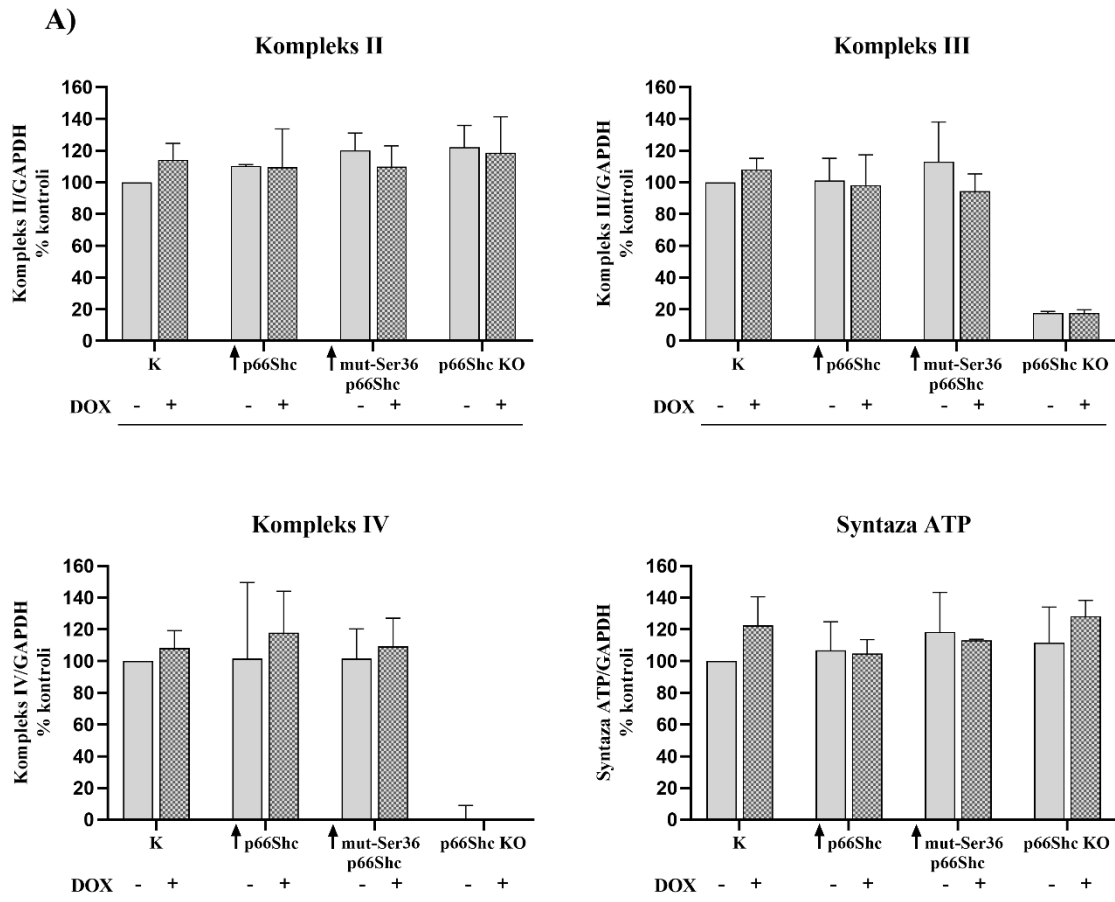
Jako że, dostępne dane literaturowe jasno wskazują na działanie białka p66Shc jako enzymu redoks, który może pośredniczyć w głównej czyli mitochondrialnej ścieżce produkcji RFT (będącej efektem funkcjonowania mitochondrialnego łańcucha oddechowego) sprawdziłam podstawowe parametry bioenergetyczne w poszczególnych klonach linii MDA-MB-231 w odpowiedzi na traktowanie doksorubicyną. Przeanalizowałam jak odpowiedź komórek klonów (różniących się poziomem białka p66Shc) na traktowanie chemioterapeutykiem może wpłynąć na profil OXPHOS, czyli poziom poszczególnych podjednostek kompleksów łańcucha oddechowego oraz potencjał na wewnętrznej błonie mitochondrialnej (mt.  $\Delta\Psi$ ). Analiza wpływu zmiany poziomu białka p66Shc na oba wspomniane parametry została przedstawiona już w rozdziale 4.2, w związku z czym wynikające z niej różnice w niniejszym rozdziale nie będą poruszane a główna uwaga zostanie poświęcona efektowi doksorubicyny.

Potencjał na wewnętrznej błonie mitochondrialnej stanowi niejako odzwierciedlenie stanu funkcjonalnego mitochondriów i może korelować ze stanem nie tylko procesu różnicowania komórek, procesem nowotworzenia lecz również ze stopniem ich złośliwości. Wykonana przeze mnie analiza potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej wykazała znaczący wpływ traktowania doksorubicyny głównie w klonie z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (ryc. 45), gdzie traktowanie komórek chemioterapeutykiem spowodowało istotne obniżenie potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Nieco podobną tendencję można zaobserwować również w przypadku pozostałych klonów linii MDA-MB-231 traktowanych doksorubicyną.

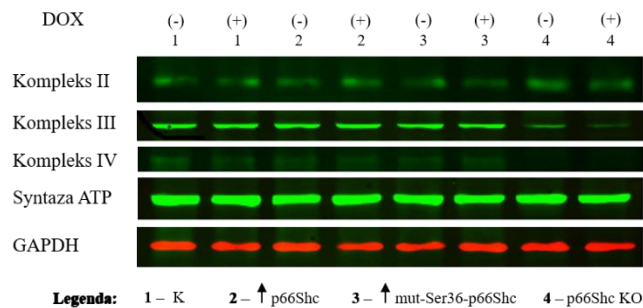


Ryc. 45 Potencjał na wewnętrznej błonie mitochondrialnej; \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001

Potencjał na wewnętrznej błonie mitochondrialnej jest niejako wynikiem funkcjonowania całego łańcucha oddechowego znajdującego się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. W związku z tym, jego stan jest uzależniony m.in. od poziomu i wydajności poszczególnych kompleksów łańcucha oddechowego. Dlatego też, w pierwszej kolejności, wykorzystując technikę Western Blot sprawdziłam poziom wybranych podjednostek kompleksów łańcucha oddechowego (NDUFB8 – kompleks I, SDHB – kompleks II, UQCRC2 – kompleks III, MTCO1 – kompleks IV) jak również syntazy ATP (ATP5A). Na rycinach oraz w opisie analizy przyjęto, że poziom wyżej wspomnianych podjednostek umownie oznaczać będzie poziom odpowiadającym im kompleksów oraz syntazy ATP. Należy podkreślić iż trudności jakie napotkałam podczas oznaczenia poziomu podjednostki kompleksu I (bardzo niski jej poziom) uniemożliwiły mi uzyskanie miarodajnych wyników, co w konsekwencji spowodowało ich brak w niniejszej analizie. Dlatego też wyniki przedstawione na rycinie 46 przedstawiają analizę wyłącznie poziomu podjednostek kompleksów II – IV oraz syntazy ATP. O ile traktowanie doksorubicyną spowodowało obniżenie potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej głównie w klonie z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (p66Shc KO), tak w przypadku poziomu podjednostek poszczególnych kompleksów łańcucha oddechowego nie zauważyłam istotnych statystycznie różnic w odpowiedzi komórek różniących się poziomem białka p66Shc na traktowanie doksorubicyną (ryc. 46A, B). W przypadku klonu kontrolnego (K) we wszystkich kompleksach łańcucha oddechowego oraz syntazy ATP zaobserwowałam jedynie tendencję do podwyższenia poziomu podjednostek kompleksów po traktowaniu doksorubicyną. Przeciwnie, jeśli chodzi o klon z podwyższonym poziomem białka ze zmutowaną formą reszty Ser36, gdzie po traktowaniu doksorubicyną występuje tendencja spadkowa (kompleksy: II, III oraz syntaza ATP). Wydaje się, że najmniej podatnymi na zmiany w wyniku traktowania chemioterapeutykiem są klony: z podwyższonym poziomem białka p66Shc ( $\uparrow$  p66Shc) oraz klon z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (p66Shc KO).



**B)**



**Ryc. 46** Poziom wybranych podjednostek kompleksów łańcucha oddechowego (kompleksy I – IV) oraz syntazy ATP. Poziom podjednostek kompleksów wystandaryzowano w odniesieniu do białka referencyjnego GAPDH (A); przykładowy wynik analizy Western Blot (B)

#### 4.3.5. Charakterystyka profilu energetycznego badanych klonów linii nowotworowej MDA-MB-231 obejmująca aktywność glikolityczną oraz oddychanie tlenowe

W kolejnym etapie swojej pracy postanowiłam sprawdzić jak zmiana poziomu białka p66Shc może wpłynąć na profil energetyczny m.in. aktywność glikolityczną oraz oddychanie tlenowe poszczególnych klonów linii MDA-MB-231. Co więcej, pomimo niewielkich różnic zaobserwowanych w wartościach potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej oraz w poziomie podjednostek łańcucha oddechowego badanych klonów linii MDA-MB-231 traktowanych dokсорubicyną, chciałam sprawdzić czy zmiana poziomu białka p66Shc jak również towarzyszące jej zmiany w metabolizmie komórki będą miały wpływ na odpowiedź komórki na traktowanie dokсорubicyną. Należy podkreślić, iż w niniejszym rozdziale do pomiaru parametrów bioenergetycznych wykorzystano analizator płynów zewnątrzkomórkowych Seahorse XFe96 (odmiennie niż miało to miejsce w rozdziale 4.2.6). Celowość niniejszego zabiegu polegała na przeprowadzeniu szerszego panelu doświadczalnego, uwzględniającego nie tylko pomiar oddychania komórkowego (jak miało to miejsce w przypadku pomiarów przy użyciu Oxygraph-2k-OROBOROS) lecz również pomiaru parametrów glikolitycznych, które mierzono w czasie rzeczywistym. Do głównych zalet pomiarów z wykorzystaniem analizatora Seahorse XFe96 zaliczyć można konieczność użycia zdecydowanie mniejszej liczby komórek jak również jednoczesny pomiar wszystkich badanych klonów traktowanych i nietraktowanych dokсорubicyną na jednej płytce.

W niniejszym rozdziale zmierzone zostały „wskaźniki” niejako dwóch głównych szlaków wytwarzania ATP przez komórkę: glikolizy oraz fosforylacji oksydacyjnej, które mierzone były w czasie rzeczywistym i zostały wyrażone jako szybkość zakwaszenia zewnątrzkomórkowego (ECAR) oraz szybkość zużycia tlenu (OCR). Na podstawie pomiarów ECAR i OCR możliwe było określenie szybkości wypływu protonów  $H^+$  (PER ang. *Proton efflux rate*) rozumianej jako liczbę protonów eksportowanych przez komórki do pożywki testowej w czasie, wyrażonej w jednostkach – pmol/min (tzw. zakwaszenie zewnątrzkomórkowe), jak również szybkość wypływu protonów  $H^+$  pochodzących wyłącznie z glikolizy tzw. glycoPER. W kontekście zastosowanego zestawu pomiarowego „Glycolytic Rate Assay Kit”, termin *glikoliza* rozumiany jest jako proces przekształcania glukozy w mleczan.

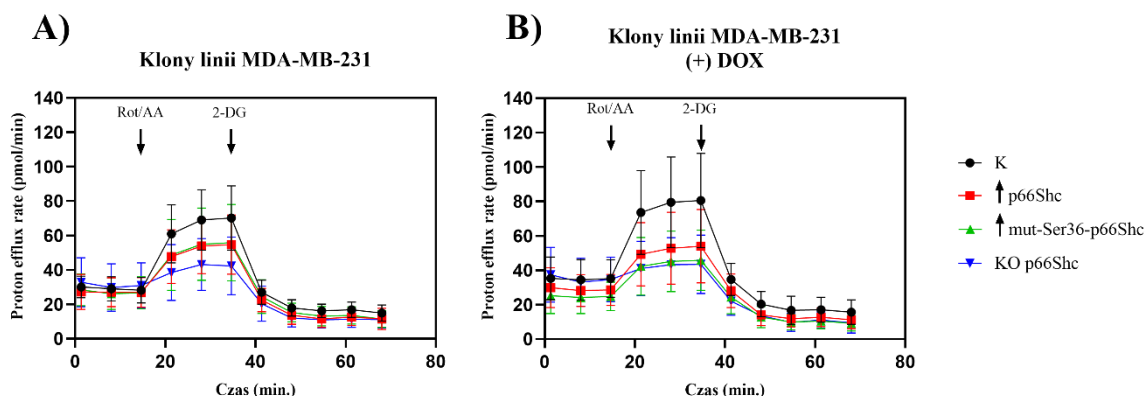
Pomiary zostały wykonane na analizatorze płynów zewnątrzkomórkowych Seahorse XFe96 w ramach współpracy, przez dr Vilmę A. Sardão (CNC - Center for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra). Wyniki zostały znormalizowane przy użyciu techniki

SRB, zaś analiza wyników oraz ich interpretacja została przeprowadzona bezpośrednio przeze mnie. Chciałam również zwrócić uwagę na to, iż w związku z trudnościami, jakie napotkałam podczas bezpośredniego tłumaczenia na język polski pojęć naukowych związanych z przeprowadzonymi doświadczeniami (głównie części dotyczącej glikolizy), wszystkie wyniki uzyskane z wykorzystaniem analizatora Seahorse XFe96 zostaną przedstawione na rycinach z zastosowaniem pojęć w języku angielskim. Niniejszy zabieg ma na celu zachowanie jasności w ich zrozumieniu oraz przejrzystości analizowanych wyników. Ponadto, podczas analizy aktywności glikolitycznej oraz oddychania tlenowego wyniki zostały opisane w taki sposób, że najpierw przedstawiłam analizę danego parametru w poszczególnych klonach linii MDA-MB-231, a następnie analizę wpływu traktowania doksorubicyną na ten parametr w badanych klonach linii MDA-MB-231.

- **Aktywność glikolityczna**

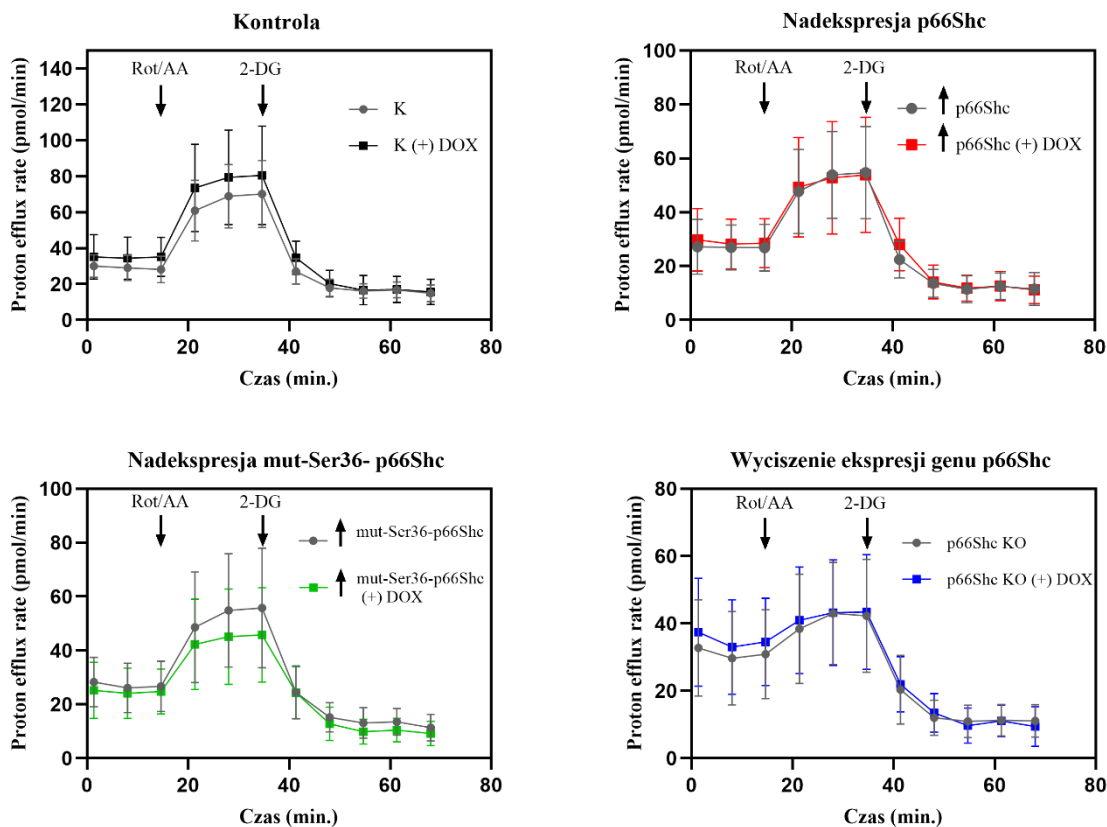
Pomiary ECAR oraz OCR umożliwiły określenie całkowitej szybkości wypływu protonów (PER), a zobrazowanie profilu przebiegu doświadczenia (przebiegu krzywych), przedstawiłam na ryc. 14. Na podstawie przebiegu krzywych możliwe jest określenie potencjalnych różnic w poszczególnych parametrach glikolitycznych badanych klonów linii MDA-MB-231 jak również różnic wynikających z traktowania doksorubicyną. Wszystkie parametry bioenergetyczne uzyskane przy użyciu analizatora Seahorse XFe96 zostały wyliczone na podstawie danych uzyskanych z przebiegu krzywych odpowiednio: ECAR, OCR oraz PER. Dokładniejszy opis przebiegu całego doświadczenia został umieszczony przy opisie analizy poszczególnych parametrów bioenergetycznych (takich jak: *basal glycolysis*, *basal PER*, itd.). W skrócie, analiza przy użyciu zestawu „Glycolytic Rate Assay Kit” polegała w pierwszej kolejności na zmierzeniu parametrów bioenergetycznych w tzw. stanie podstawowym, kolejno dodaniu inhibitorów mitochondrialnych: rotenonu oraz antymycyny A (i zmierzeniu odpowiednich parametrów bioenergetycznych), a następnie dodaniu analogu glukozy (2-DG) w ostatnim etapie analizy. W celu jasnej prezentacji i lepszego zrozumienia uzyskanych wyników, poniżej zostały zamieszczone schematy przebiegu krzywych zakwaszenia zewnątrzkomórkowego PER. Rycina 47A przedstawia jak zmiana poziomu białka p66Shc wpłynęła na przebieg PER oraz w jaki sposób poszczególne klony linii MDA-MB-231 z odmiennym poziomem białka p66Shc reagują na traktowanie doksorubicyną (ryc. 47B). Można zauważyć, że w przypadku klonów traktowanych doksorubicyną (ryc. 47B),

klon kontrolny (K) nieco bardziej „odstaje” od pozostałych niż ma to miejsce w przypadku klonów nietraktowanych doksorubicyną (ryc. 47A).



**Ryc. 47** Profil zakwaszenia zewnątrzkomórkowego PER dla poszczególnych klonów linii MDA-MB-231 nietraktowanych (A) oraz traktowanych DOX (B)

Ponadto, aby lepiej zobrazować różnice pomiędzy poszczególnymi klonami w przebiegu krzywych PER, rycina 48 ilustruje zmiany jakie można zaobserwować w konsekwencji traktowania doksorubicyną. W przypadku kontroli zauważyłam wzrost w ogólnym przebiegu *PER* po traktowaniu doksorubicyną. W przypadku klonów z podwyższonym poziomem białka p66Shc (↑ p66Shc) jak również klonu z wyciszonym genem kodującym białko p66Shc (p66Shc KO), nie zaobserwowałam zmian w przebiegu *PER*, bądź zauważyłam spadek w przypadku podwyższenia poziomu zmutowanej w reszcie Ser36 formy białka p66Shc (↑ mut-Ser36-p66Shc).

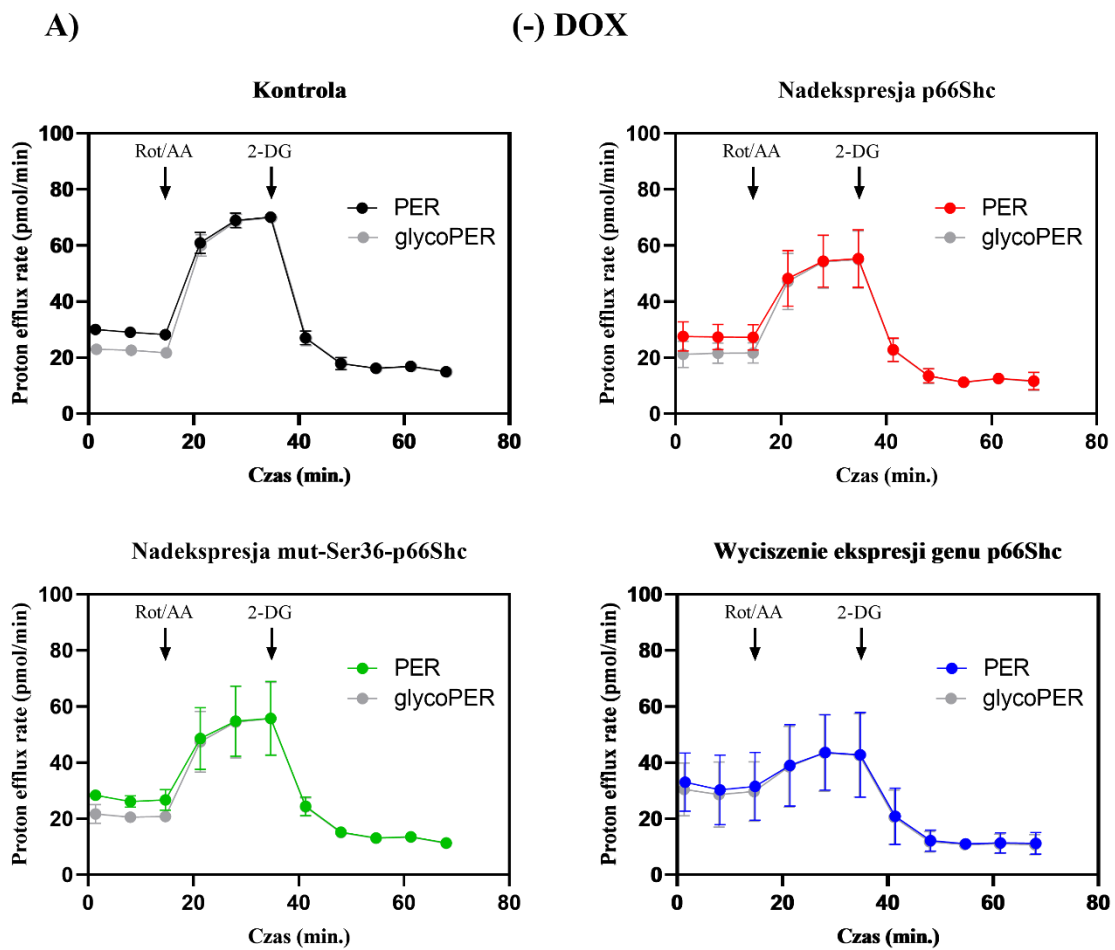


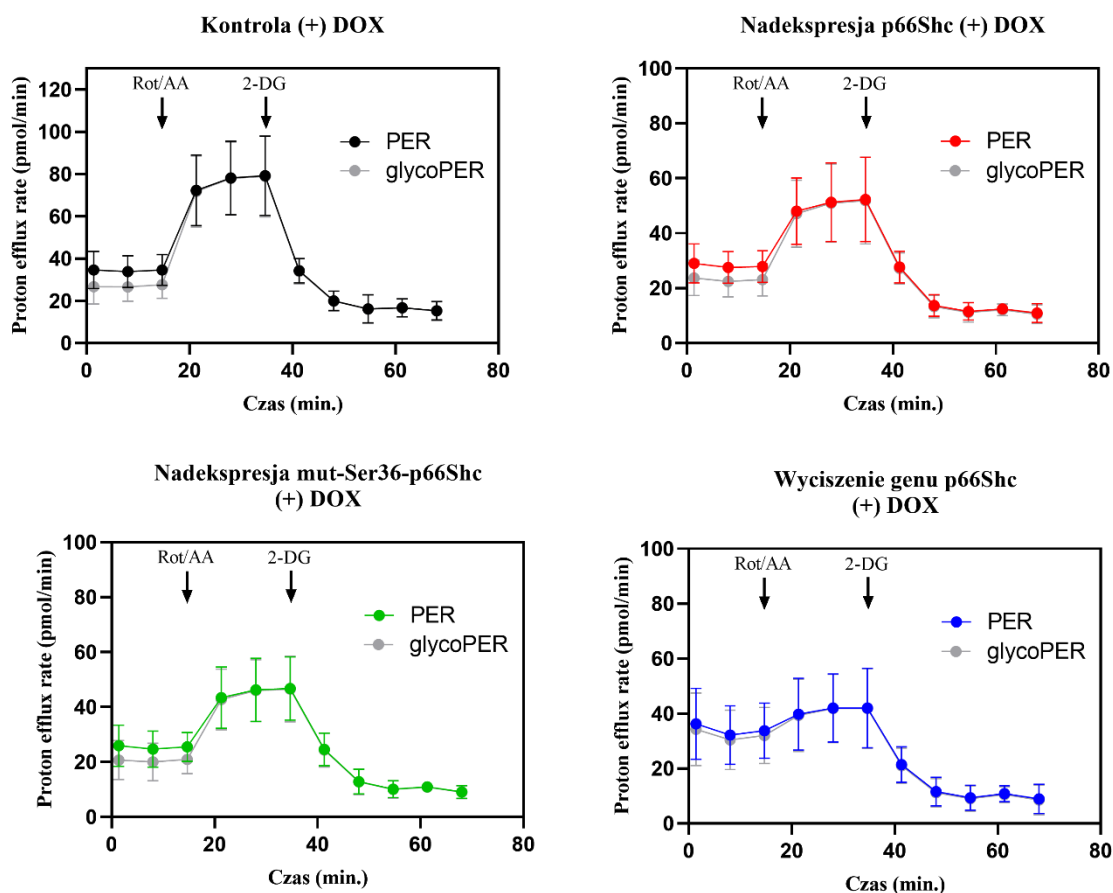
**Ryc. 48** Porównanie profilu przebiegu krzywych zakwaszenia zewnątrzkomórkowego PER pomiędzy liniami nietraktowanymi i traktowanymi doksorubicyną

Większość komórek (zwłaszcza komórki nowotworowe) wykazuje zdolności adaptacyjne, polegające na „przełączaniu się” między dwoma szlakami: glikolizą oraz fosforylacją oksydacyjną. W skrócie, glukoza w komórce jest przekształcana do pirogronianu, a następnie do mleczanu (w cytoplazmie) bądź  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$  (w mitochondriach), co ostatecznie skutkuje wpływem  $\text{H}^+$  do środowiska zewnątrzkomórkowego. Oznacza to, że również mitochondria (przyczyniając się po części do mierzonego zakwaszenia zewnątrzkomórkowego) mają swoją składową na wartość całkowitego PER. Odejmując „udział” mitochondriów w całkowitym zakwaszeniu, otrzymuje się wartość *glycoPER*, która obejmuje tylko i wyłącznie proces glikolizy (parametr *glycoPER* jest ściśle skorelowany z tempem zewnątrzkomórkowej produkcji mleczanu). Pomiar ten umożliwi zatem ocenę (w czasie rzeczywistym) zmian szybkości glikolizy. Rycina 49A, przedstawia przebieg krzywych PER oraz *glycoPER* w klonach linii MDA-MB-231, różniących się poziomem białka p66Shc, obrazujący „udział” glikolizy w procesach wytwarzania ATP w badanych klonach jak również w klonach traktowanych doksorubicyną (ryc. 49B). Z przebiegu krzywych można wnioskować, iż w klonach linii MDA-MB-231 znaczący udział w PER ma glikoliza (ryc.



49A). Co więcej, w przypadku klonu z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (p66Shc KO) parametr *glycoPER* jest niemalże identyczny z przebiegiem *całkowitego PER*, co świadczy o mniejszym udziale fosforylacji oksydacyjnej w procesie produkcji ATP w tych komórkach (co znajdowało także potwierdzenie w poziomie podjednostek profilu OXPHOS). Wyniki uzyskane z traktowania dokсорubicyną poszczególnych klonów nie zmieniły w znaczący sposób przebiegu krzywych (ryc. 49B). Można jedynie wskazać na niewielkie podwyższenie w ogólnym przebiegu *PER* i *glycoPER* w przypadku klonów: z podwyższonym poziomem białka p66Shc ( $\uparrow$  p66Shc) oraz z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (p66Shc KO).

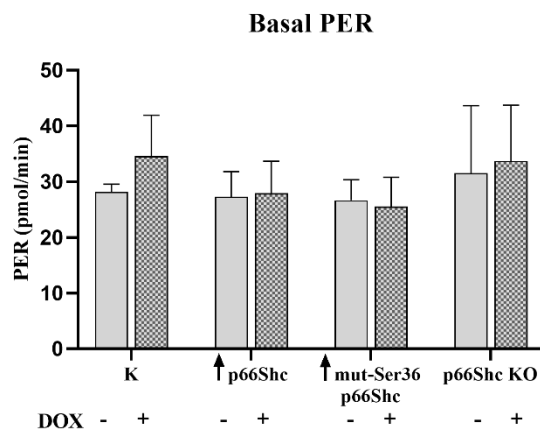


**B)****(+) DOX**

**Ryc. 49** Profile zakwaszenia zewnątrzkomórkowego PER oraz glycoPER w badanych klonach linii MDA-MB-231 nietraktowanych (A) oraz traktowanych DOX (B)

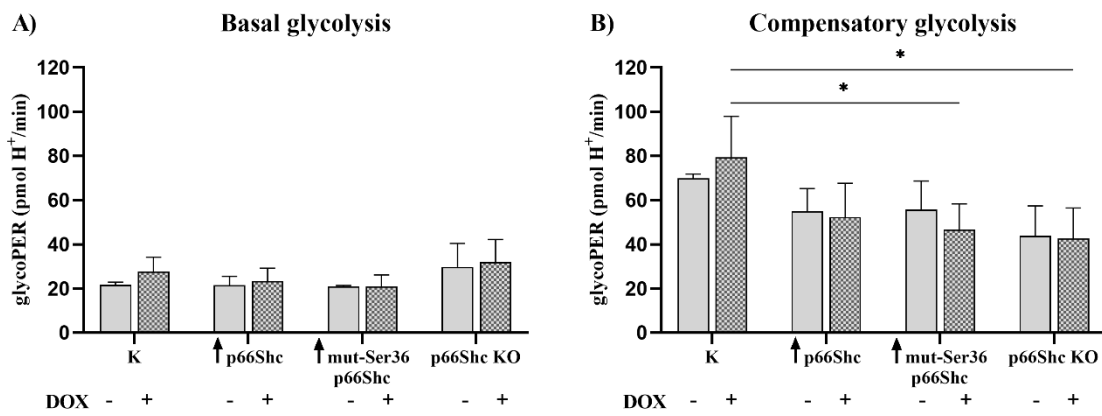
Analiza przy użyciu zestawu „Glycolytic Rate Assay Kit” została rozpoczęta poprzez inkubację komórek z pożywką hodowlaną załączoną do zestawu pomiarowego, zawierającą niezbędne substraty w postaci: glukozy, glutaminy, pirogronianu jak również buforu HEPES. Na tym etapie pomiarów możliwe było określenie podstawowego poziomu takich parametrów bioenergetycznych jak: „*basal glycolysis*”, „*basal PER*”, „*basal ECAR*” oraz „*basal mitochondrial respiration*”<sup>4</sup> (wykresy dotyczące oddychania mitochondrialnego zostaną przedstawione w odnośniku „oddychanie tlenowe”). Nie zaobserwowałam istotnych różnic w poziomie parametru „*basal PER*”, niemniej jednak można zauważyć tendencję do nieco wyższego poziomu tego parametru w klonie z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (p66Shc KO) zarówno nietraktowanego jak i traktowanego doksorubicyną (ryc. 50).

<sup>4</sup> Zachowanie pojęć naukowych w języku angielskim, ze względu na trudności w ich tłumaczeniu



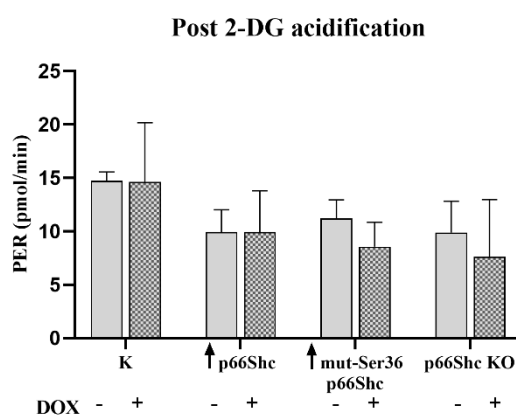
**Ryc. 50** Podstawowy poziom parametru bioenergetycznego „*basal PER*” mierzonego w pierwszym etapie analizy

Następnie, aby wymusić w komórkach mechanizmy kompensacyjne, prowadzące do zwiększenia tempa glikolizy, mające na celu pokrycie zapotrzebowania energetycznego komórek – dodane zostały inhibitory łańcucha oddechowego: rotenon i antymycyna A, hamujące odpowiednio kompleks I i III łańcucha oddechowego. Dzięki zahamowaniu oddychania tlenowego (OCR), możliwe jest policzenie nie tylko wartości parametru „*glycoPER*”, ale również określenie parametru tzw. „*compensatory glycolysis*”, czyli szybkości glikolizy po zahamowaniu mitochondrialnego łańcucha oddechowego (ryc. 51). W celu łatwiejszej interpretacji, parametr „*compensatory glycolysis*” przedstawiłam wspólnie z parametrem „*basal glycolysis*”. I tak, podobnie jak w przypadku poprzednich parametrów, nie stwierdziłam różnicy pomiędzy klonami linii MDA-MB-231 różniącymi się poziomem białka p66Shc w parametrach: „*basal glycolysis*” oraz „*compensatory glycolysis*” (zmiana poziomu p66Shc nie wpłynęła na wspomniane parametry). Dopiero traktowanie komórek doksorubicyną spowodowało pojawienie się znaczących różnic w parametrze „*compensatory glycolysis*”, występujących pomiędzy kontrolą (K - (+) DOX) a następującymi klonami: z podwyższonym poziomem zmutowanej w reszcie Ser36 formy białka p66Shc (↑ mut-Ser36-p66Shc) oraz z wyciszoną ekspresją genu kodującego p66Shc (p66Shc KO) również traktowanymi chemioterapeutykiem (ryc. 51B). Parametr „*basal glycolysis*” nie wykazuje różnic zarówno w kontekście wpływu (zmiany) poziomu białka p66Shc na badany parametr ani w kontekście wpływu traktowania doksorubicyną (ryc. 51A).



**Ryc. 51** Podstawowa aktywność glikolityczna w przypadku braku syntezy ATP w mitochondriach  
 \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

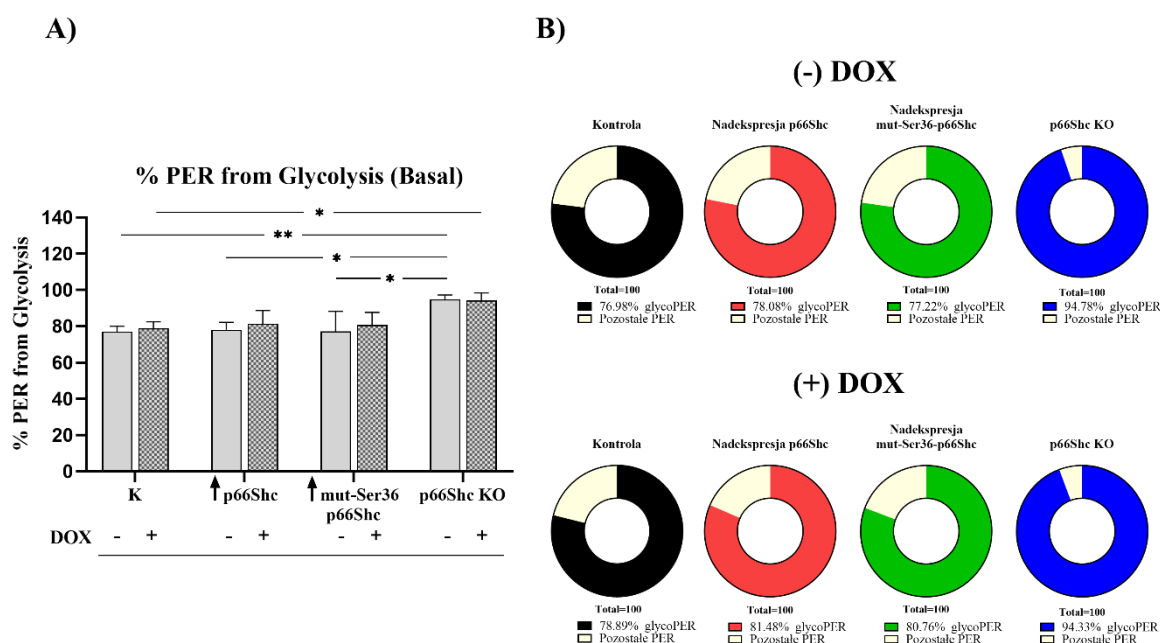
Dodanie analogu glukozy (2-DG) w ostatnim etapie analizy, miało na celu potwierdzenie specyficzności pomiaru szlaku glikolitycznego. Obniżenie wartości parametru *PER* w wyniku dodania 2-DG potwierdza, że mierzony przed dodaniem wspomnianego analogu parametr *PER* pochodzi głównie z glikolizy. Parametr „*post 2-DG acidification*” określa zakwaszenie zewnątrzkomórkowe, które nie jest związane ani ze szlakiem glikolizy ani fosforylacji oksydacyjnej. Nie zaobserwowałam istotnych różnic w niniejszym parametrze zarówno w kontekście różnic wynikających ze zmiany poziomu białka p66Shc jak i w odpowiedzi badanych klonów na traktowanie doksorubicyną (ryc. 52).



**Ryc. 52** Zakwaszenie zewnątrzkomórkowe niezwiązane z glikolizą oraz fosforylacją oksydacyjną

Podsumowując, na rycinach 53A oraz 53B przedstawiłam procentowy udział zakwaszenia zewnątrzkomórkowego (*PER*) pochodzącego z glikolizy, który uwidacznia najbardziej istotne różnice pomiędzy badanymi klonami w kontekście zmian poziomu białka p66Shc. Klon z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (p66Shc KO) wykazuje

najwyższy odsetek parametru „% PER from glycolysis” w stosunku do wszystkich badanych klonów linii MDA-MB-231 (ryc. 53A, B). Największa różnica (\*\* p<0,01) obserwowana jest pomiędzy wspomnianym klonem (p66Shc KO) a kontrolą (K). Niemniej jednak, zaobserwowałam istotne różnice pomiędzy klonem z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc a odpowiednio klonami: z podwyższonym poziomem białka p66Shc (↑ p66Shc) oraz z podwyższonym poziomem zmutowanej w reszcie Ser36 formy białka p66Shc (↑ mut-Ser36-p66Shc) (\* p<0,05). Interesującym wydaje się fakt, iż w kwestii odpowiedzi komórek (wykazujących odmienny poziom p66Shc) na traktowanie doksorubicyną, obserwowane różnice (\* p<0,05) dotyczą również komórek klonu z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (p66Shc KO) w stosunku do komórek kontrolnych również traktowanych chemioterapeutyką (K – (+) DOX) (ryc. 53A).

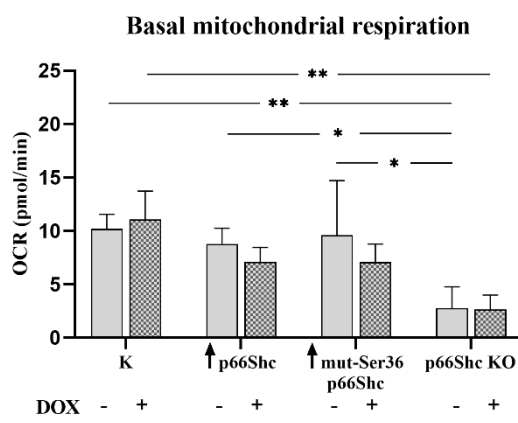


Ryc. 53 Udział procentowy „PER from glycolysis” klonów traktowanych i nietraktowanych DOX w formie wykresu słupkowego (A) oraz kołowego (B); \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001

- **Oddychanie tlenowe**

Kolejnym krokiem w moich badaniach było oznaczenie „oddychania komórkowego w stanie podstawowym” (tzw. *basal mitochondrial respiration*) związanego z oksydacyjną fosforylacją przebiegającą w mitochondriach. Miało to na celu uzyskanie odpowiedzi na pytanie, który z głównych szlaków pozyskiwania ATP jest charakterystyczny dla różniących się poziomem białka p66Shc, badanych klonów linii MDA-MB-231. Dodatkowo, chciałam zbadać, czy traktowanie doksorubicyną zmieni profil metaboliczny badanych klonów linii

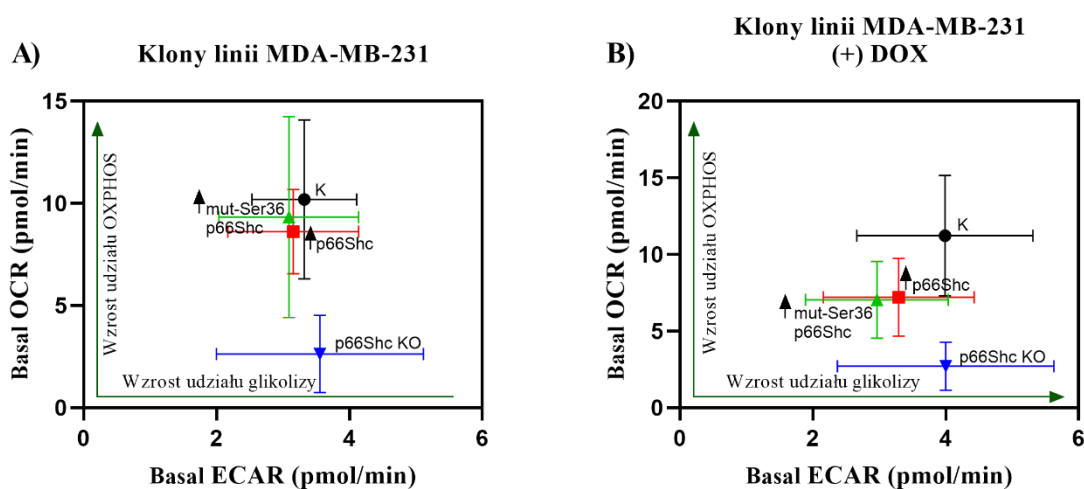
MDA-MB-231. Z przeprowadzonych przeze mnie pomiarów wynika, że najbardziej istotnie statystycznie obniżenie szybkości zużycia tlenu w stanie podstawowym zaobserwować można pomiędzy komórkami kontrolnymi (K), a komórkami klonu z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (p66Shc KO) (ryc. 54). Co więcej, zużycie tlenu w stanie podstawowym w przypadku komórek wspomnianego klonu (p66Shc KO) znacząco różni się także w stosunku do wszystkich pozostałych klonów linii MDA-MB-231: z podwyższonym poziomem białka p66Shc ( $\uparrow$  p66Shc) oraz podwyższonym poziomem zmutowanej w reszcie Ser36 formy białka p66Shc ( $\uparrow$  mut-Ser36-p66Shc). Co więcej, pomiary z wykorzystaniem analizatora Seahorse potwierdziły moje wcześniejsze wyniki uzyskane z wykorzystaniem elektrody tlenowej (Oroboros). Należy bowiem podkreślić, iż dokładniejsza analiza oddychania komórkowego komórek klonów różniących się poziomem białka p66Shc została przedstawiona w rozdziale 4.2.6. Co ciekawe, w kontekście odpowiedzi komórek poszczególnych klonów (z odmiennym poziomem białka p66Shc) na traktowanie doksorubicyną, jedyna istotna różnica w badanym parametrze występuje pomiędzy komórkami kontrolnymi (K) i (ponownie) klonem z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (p66Shc KO) w obu przypadkach traktowanych chemioterapeutyką (ryc. 54). Nie zauważyłam zmian w zużyciu tlenu w stanie podstawowym w obrębie żadnego z badanych klonów na poziomie traktowane – nietraktowane doksorubicyną.

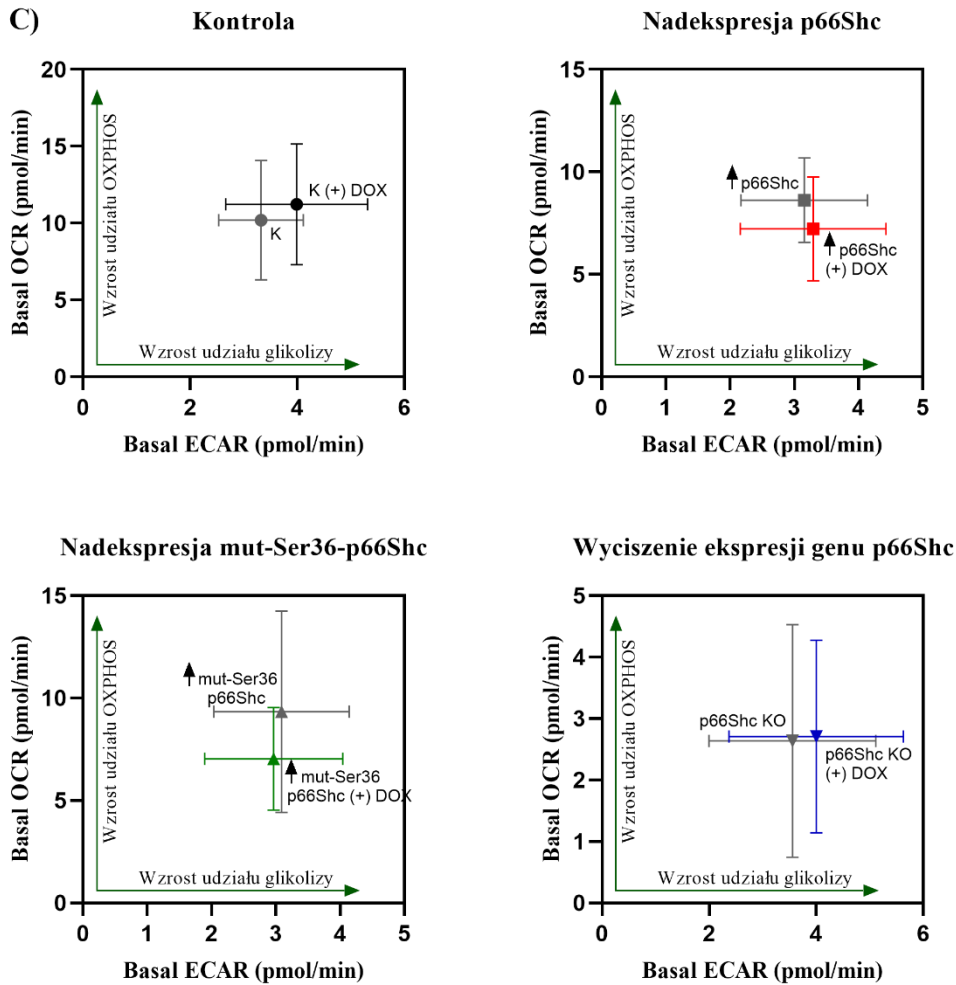


**Ryc. 54** Szybkość zużycia tlenu w komórkach w stanie podstawowym; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

Wykorzystując dane uzyskane z pomiaru takich parametrów jak: „*basal ECAR*” i „*basal OCR*”, postanowiłam określić fenotyp metaboliczny badanych klonów linii MDA-MB-231, w celu przypisania im charakterystycznej „sygnatury” metabolicznej. Spośród badanych klonów najbardziej „odrębnym” (wyróżniającym się) jest klon z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (p66Shc KO), który zdecydowanie wykazuje

fenotyp bardziej glikolityczny (ryc. 55A). Interesującym wydaje się fakt, że traktowanie dokсорubicyną spowodowało obniżenie oddychania komórkowego w klonach: z podwyższonym poziomem p66Shc ( $\uparrow$  p66Shc) oraz z podwyższonym poziomem zmutowanej w reszcie Ser36 formy białka p66Shc ( $\uparrow$  mut-Ser36-p66Shc), przy jednocześnie niezmiennym poziomie glikolizy (ryc. 55B, C). Jednakże, w przypadku klonów kontrolnego (K) oraz z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (p66Shc KO) zaobserwowałam sytuację odwrotną, mianowicie traktowanie chemioterapeutykiem poskutkowało przesunięciem fenotypu w kierunku bardziej glikolitycznego (ryc. 55B, C).





**Ryc. 55 Fenotyp metaboliczny klonów linii MDA-MB-231 nietraktowanych (A) i traktowanych DOX (B) oraz pojedynczych klonów (-/+ DOX) (C)**

#### **4.3.6. Wpływ doksorubicyny na poziom reaktywnych form tlenu oraz ochrony antyoksydacyjnej w komórkach z odmiennym poziomem białka p66Shc**

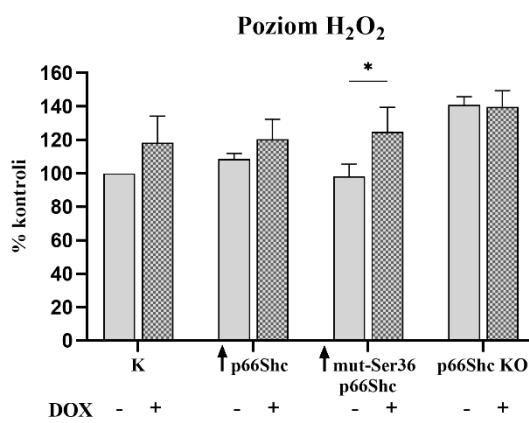
Wiadomo, że białko p66Shc może wpływać na zmianę metabolizmu komórek nowotworowych, o czym można dowiedzieć się m.in. z pracy zaprezentowanej przez SOLIMAN I WSP. (2014), a co również pokazuje przedstawiona powyżej analiza wybranych parametrów bioenergetycznych. Niemniej jednak, niejednokrotnie podkreślano udział białka p66Shc w procesie stresu oksydacyjnego, dlatego też kolejnym etapem niniejszej rozprawy doktorskiej było sprawdzenie jaka jest odpowiedź komórek poszczególnych klonów linii nowotworowej MDA-MB-231 na traktowanie doksorubicyną w kontekście poziomu RFT jak również statusu ochrony antyoksydacyjnej. Jest to o tyle interesujące, ponieważ doksorubicyna manifestuje swoje działanie za pośrednictwem mitochondriów właśnie



poprzez m.in. zwiększoną produkcję RFT. W związku z tym sprawdziłam poziom wybranych RFT takich jak: poziom cytozolowego jak i mitochondrialnego anionorodnika ponadtlenkowego oraz względną ilość reaktywnych form tlenu głównie w postaci nadtlenu wodoru z zastosowaniem specyficznych sond fluorescencyjnych w odpowiedzi na traktowanie chemioterapeutyką (DOX). Należy zaznaczyć, że w niniejszym rozdziale analizowana będzie wyłącznie odpowiedź komórek poszczególnych klonów linii MDA-MB-231 na traktowanie doksorubicyną z pominięciem wpływu zmiany poziomu białka p66Shc na analizowane parametry. Został on bowiem szczegółowo przeanalizowany w rozdziale 4.2.4, gdzie przedstawiono wpływ zmiany poziomu białka p66Shc na wszystkie poniżej pokazane parametry zarówno w klonach linii nowotworowych MDA-MB-231 jak i MCF-7.

- Analiza poziomu reaktywnych form tlenu

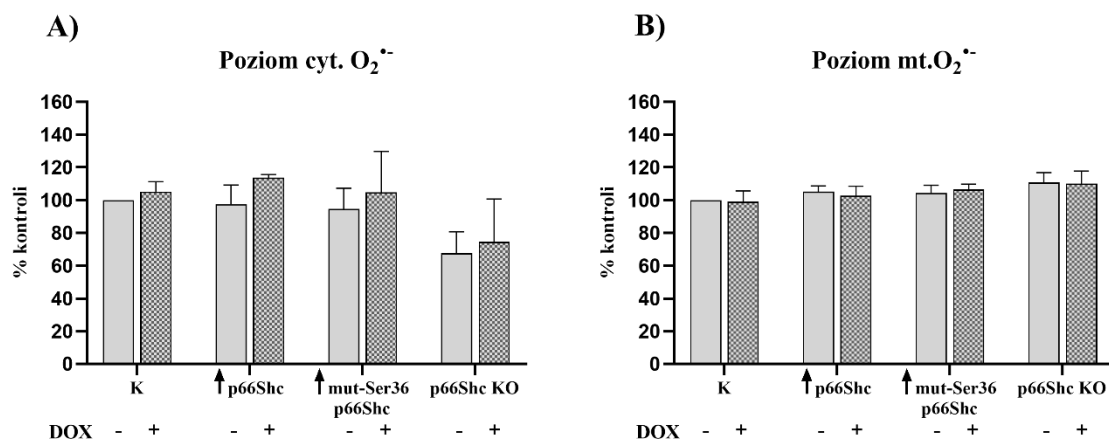
Analiza poziomu nadtlenu wodoru pokazała, że największą wrażliwość na traktowanie komórek doksorubicyną wykazuje klon z podwyższonym poziomem zmutowanej w reszcie Ser36 formy białka p66Shc ( $\uparrow$  mut-Ser36-p66Shc). Przekłada się to na istotny statystycznie (\*  $p < 0,05$ ) wzrost poziomu RFT w postaci  $H_2O_2$  w wyniku traktowania komórek wspomnianego klonu ( $\uparrow$  mut-Ser36-p66Shc) doksorubicyną (ryc. 56) względem tego samego klonu nietraktowanego chemioterapeutyką. Jednakże, podobną tendencję zaobserwowałam w klonach: kontrolnym (K) oraz z podwyższonym poziomem białka p66Shc ( $\uparrow$  p66Shc), gdzie traktowanie doksorubicyną również zwiększyło poziom  $H_2O_2$ .



**Ryc. 56 Poziom nadtlenu wodoru w badanych klonach linii MDA-MB-231; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$**

Dodatkowo sprawdziłam również poziom obu anionorodników ponadtlenkowych: cytozolowego oraz mitochondrialnego. Niemniej jednak, w poziomie obu anionorodników nie

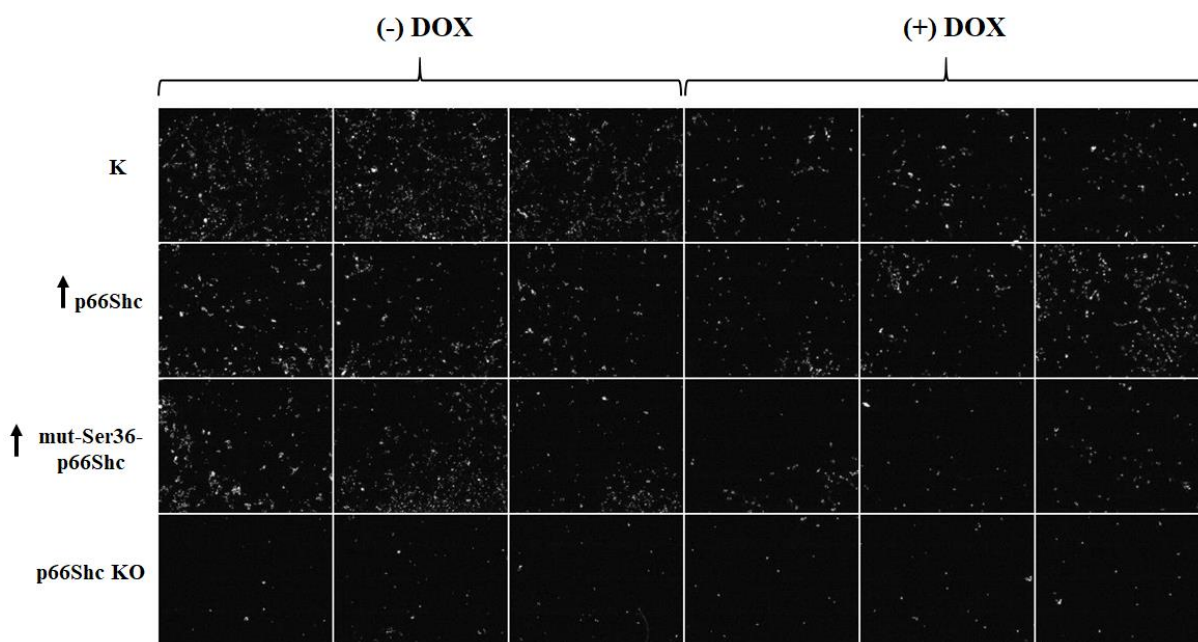
zauważyłam większych różnic w wyniku traktowania komórek badanych klonów doksorubicyną (ryc. 57A, B). Można mówić jedynie o tendencji wzrostowej wyłącznie poziomu cytozolowego anionorodnika ponadtlenkowego w komórkach wszystkich klonów traktowanych doksorubicyną (ryc. 57B).



**Ryc. 57 Poziom reaktywnych form tlenu: cytozolowego anionorodnika ponadtlenkowego (A) oraz mitochondrialnego anionorodnika ponadtlenkowego (B)**

Odnosząc się do wyników uzyskanych dla mitochondrialnego anionorodnika ponadtlenkowego niezwykle istotną kwestią stanowią trudności jakie napotkałam podczas jego pomiaru. Mianowicie należy zwrócić uwagę, iż uzyskane wyniki może charakteryzować bliżej nieokreślony (wysoki) stopień błędów. Jest to spowodowane w dużym stopniu odklejaniem się komórek (zwłaszcza komórek ze zmienionym poziomem białka p66Shc traktowanych doksorubicyną) od powierzchni dna płytki 24-dołkowej w wyniku inkubacji z sondą fluorescencyjną MitoSox Red. Spowodowało to w większości wykonanych powtórzeń, znaczący spadek ilości adherentnych komórek możliwych do zobrazowania w laserowym cytometrze skaningowym. Próby pokrycia płytek poly-D-lizyną (stosowanej do powlekania powierzchni, ułatwiającej komórkom ich przyleganie) nie przyniosły oczekiwanego rezultatu, co w konsekwencji znacząco obniżyło jakość uzyskanych wyników, obarczonych błędem związanym z wysoką selekcją komórek (odklejanie się zdecydowanej większości komórek, a co za tym idzie obrazowanie komórek najbardziej „odpornych” na ten proces). Problem najbardziej widoczny jest w klonie z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (p66Shc KO), gdzie udało się zobrazować wyłącznie pojedyncze komórki. Stąd może wynikać niezwykle wyrównany poziom mitochondrialnego anionorodnika ponadtlenkowego we wszystkich badanych klonach linii MDA-MB-231 traktowanych i nietraktowanych doksorubicyną.

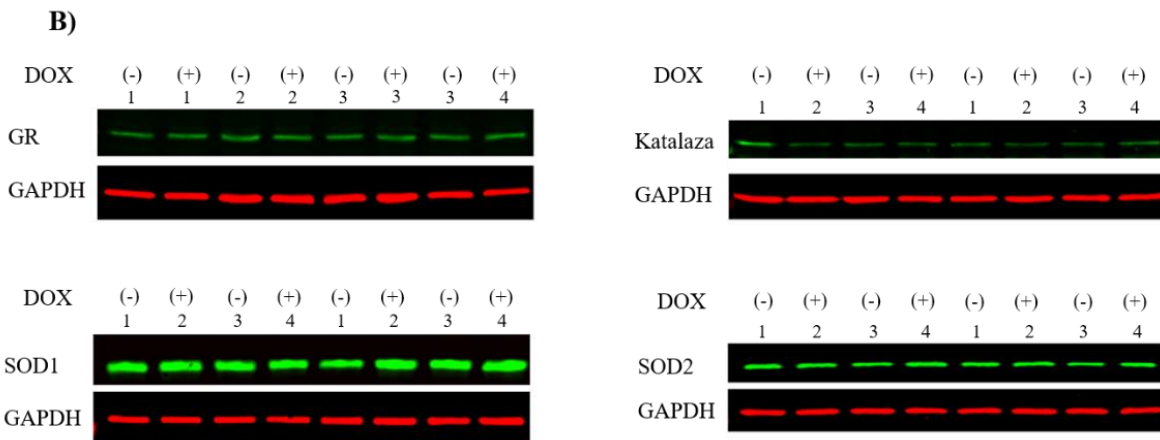
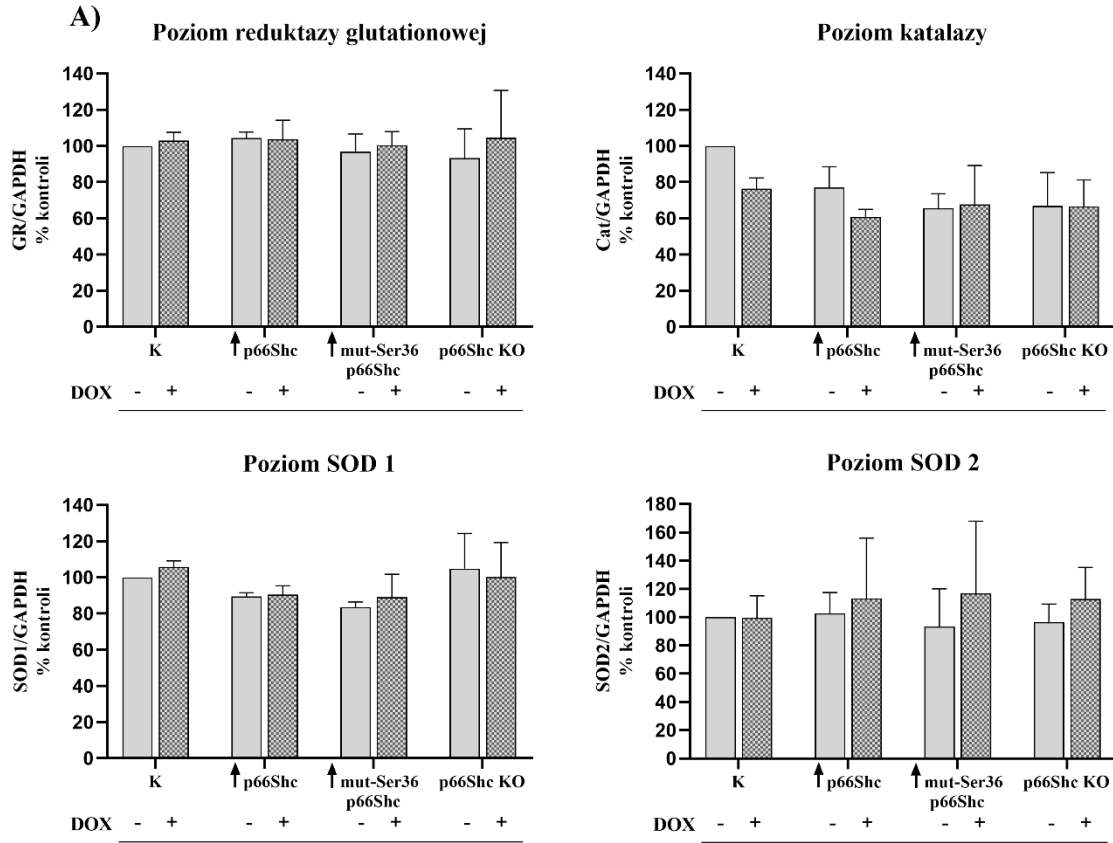
Dla uwidocznienia skali problemu poniżej na rycinie 58 zamieszczono przykładowy obraz uzyskany z pomiaru mitochondrialnego anionorodnika ponadtlenkowego, który ilustruje najlepszy z uzyskanych pomiarów.



Ryc. 58 Reprezentatywny obraz skanowanej płytki 24-dolkowej podczas pomiaru  $mt.O_2^{\cdot-}$  przy użyciu laserowego cytometru skaningowego iCys

- Analiza poziomu wybranych enzymów antyoksydacyjnych

Biorąc pod uwagę fakt, że białko adaptorowe p66Shc bierze udział w odpowiedzi komórki na stres oksydacyjny oprócz powyżej przedstawionej analizy poziomu względnych ilości RFT, postanowiłam sprawdzić ściśle z tym związany poziom enzymów antyoksydacyjnych. Wiadomo, że poziom RFT jest w bezpośredniej równowadze z działaniem systemu ochrony antyoksydacyjnej. W związku z tym, sprawdziłam poziom następujących enzymów antyoksydacyjnych: SOD1, SOD2, GR oraz Cat. Ryciny 59A i 59B przedstawiają analizę poziomu wspomnianych enzymów antyoksydacyjnych uzyskanych dzięki technice Western Blot, z której niestety nie udało się określić wspólnej dla wszystkich analizowanych enzymów tendencji. Nie zaobserwowałam istotnych statystycznie różnic w poziomie enzymów antyoksydacyjnych pomiędzy danymi klonami traktowanymi i nietraktowanymi doksorubicyną.



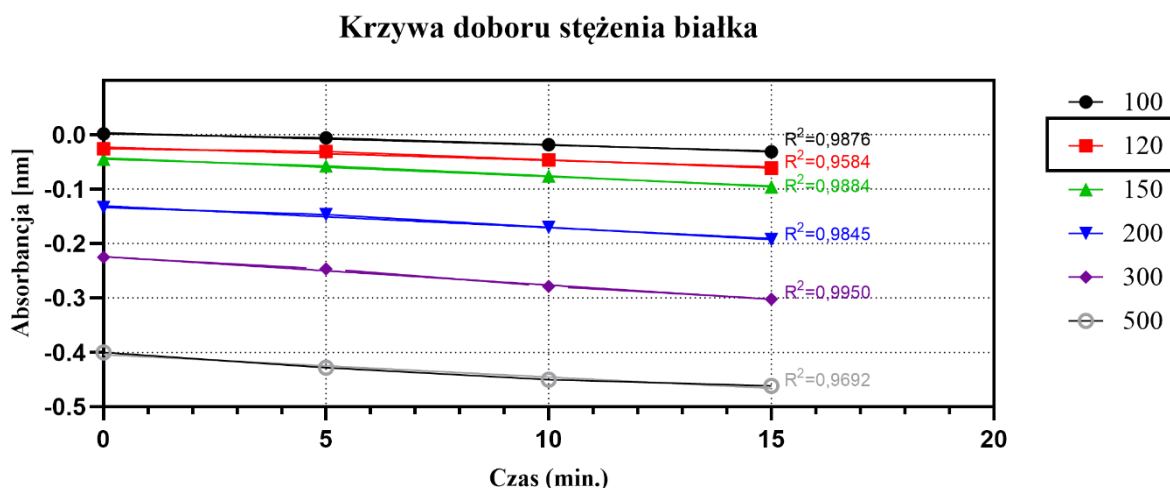
**Legenda:** 1 – K 2 – ↑ p66Shc 3 – ↑ mut-Ser36-p66Shc 4 – p66Shc KO

**Ryc. 59 Poziom enzymów antyoksydacyjnych.** Poziom białek wystandaryzowano w odniesieniu do białka referencyjnego GAPDH (A); przykładowy wynik analizy Western Blot (B)

- Aktywność antyoksydacyjna

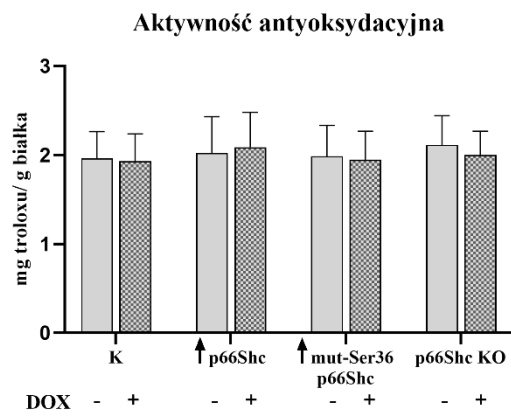
Analiza poziomu enzymów tzw. „pierwszej linii obrony” nie wykazała znaczących różnic w odpowiedzi na traktowanie doksorubicyną. Dlatego też, dla uzyskania pełniejszego obrazu systemu obrony antyoksydacyjnej zbadalam również „zdolności antyoksydacyjne” w poszczególnych klonach linii MDA-MB-231 przy użyciu techniki ABTS. Metoda ta

umożliwia wykrycie przeciwutleniaczy zarówno lipofilowych jak i hydrofilowych, w tym np. flawonoidów, hydroksycynamonianów, karotenoidów czy przeciwutleniaczy osocza. W tym celu, na samym początku wykonano krzywą doboru stężenia, na podstawie której wybrano odpowiednią ilość lizatu komórkowego użytego do właściwej analizy (10µg, 20µg, 40µg, 50µg, 80µg, 100µg, 120µg, 150µg, 200µg, 300µg, 500µg). Na podstawie współczynnika regresji  $R^2$  wybrano ilość lizatu komórkowego odpowiadającą 120µg białka użytą do dalszych doświadczeń (ryc. 60). Wartość  $R^2$  dla wybranej ilości lizatu komórkowego (120µg) nie jest najbliższa 1 (w porównaniu z innymi badanymi stężeniami), niemniej jednak ten wybór podyktowany był również dostępnością materiału badawczego, stąd ilość 120µg wydawała się być optymalna pod kątem obu kryteriów. Ponadto, ilości: 10µg, 20µg, 40µg, 50µg, 80µg nie zostały pokazane na rycinie 60 ze względu na zachowanie bardziej przejrzystej prezentacji (wykazywały one dalekie od 1 wartości współczynnika regresji  $R^2$ ).



Ryc. 60 Krzywa doboru optymalnej ilości lizatu komórkowego na podstawie współczynnika regresji  $R^2$

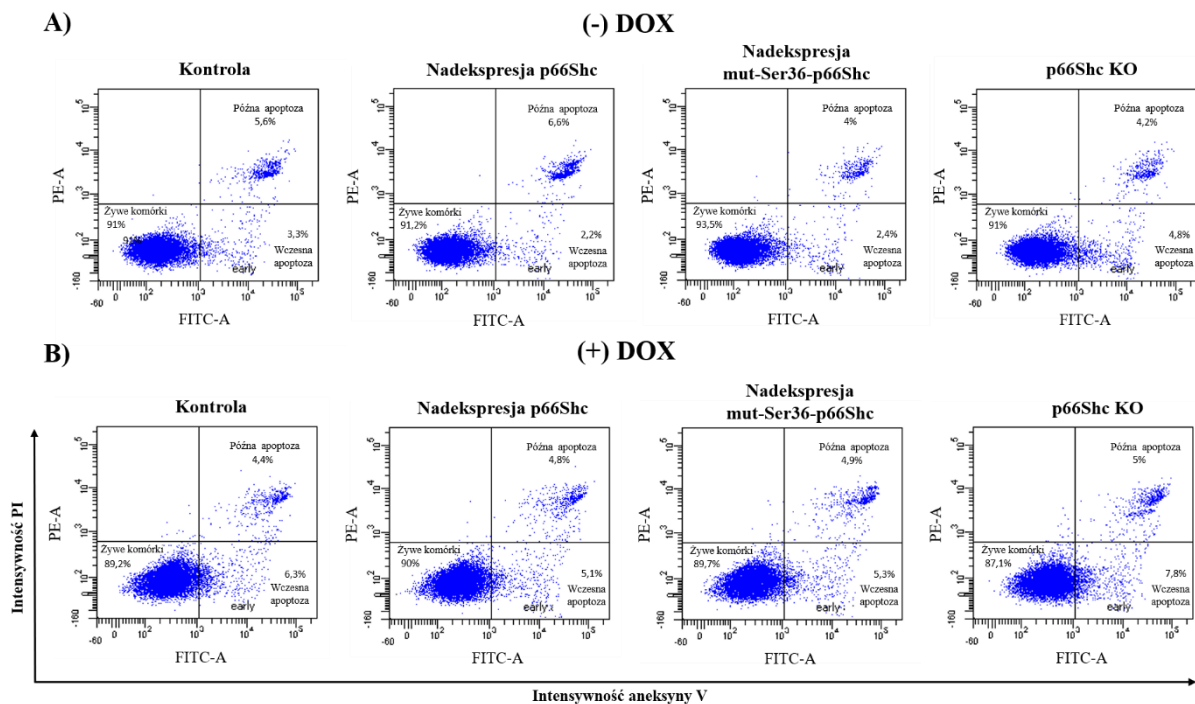
Uzyskane wyniki wskazują na brak istotnych różnic w „zdolności antyoksydacyjnej” pomiędzy poszczególnymi klonami różniącymi się poziomem białka p66Shc (nieotraktowanymi doksorubicyną), co pokazuje rycina 61. Tak więc, sama zmiana poziomu białka p66Shc nie wpłynęła w sposób znaczący na „zdolności antyoksydacyjnej” badanych klonów. Ponadto, nie zauważyłam także różnic w odpowiedzi komórek charakteryzujących się odmiennym poziomem p66Shc na traktowanie doksorubicyną. Oznacza to, że nie zaobserwowałam różnic w obrębie danego klonu nietraktowanego i traktowanego doksorubicyną.



Ryc. 61 Wykres przedstawiający aktywność antyoksydacyjną w badanych klonach linii MDA-MB-231

#### 4.3.7. Wpływ traktowania doksorubicyną na przeżywalność (apoptozę) komórek poszczególnych klonów linii MDA-MB-231

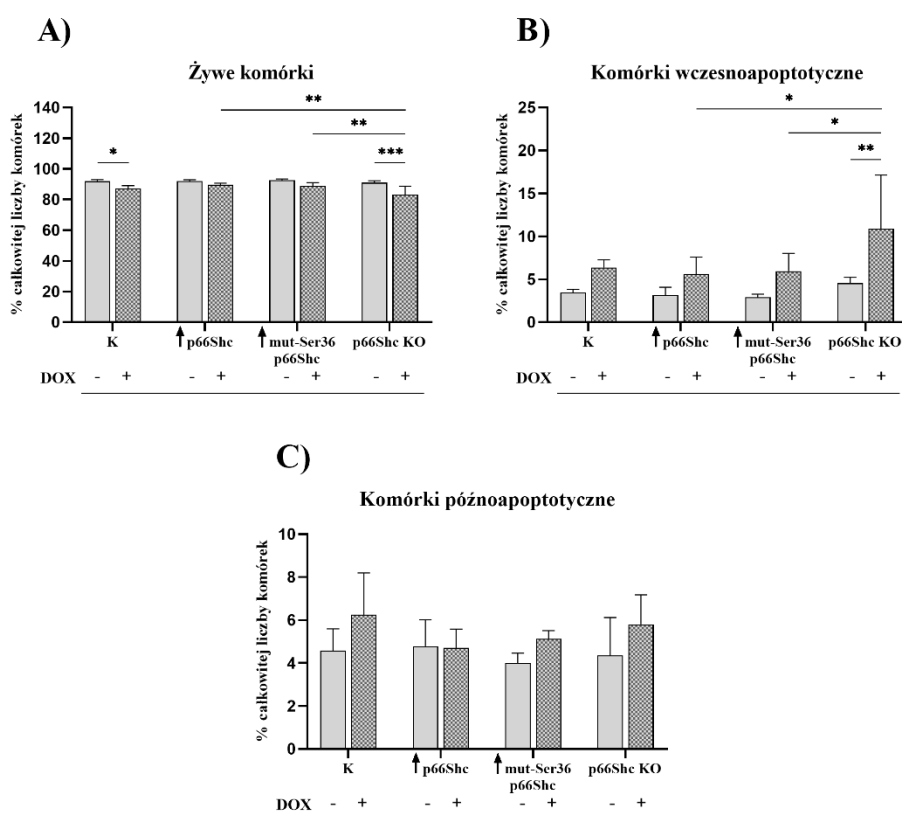
Związek białka p66Shc z proliferacją komórek jak również procesem apoptozy, z punktu widzenia komórek nowotworowych wydaje się być niezwykle obiecującym celem w kontekście stosowanych terapii antynowotworowych. Dlatego też, w niniejszej pracy postanowiłam sprawdzić jak zmiana poziomu białka p66Shc jak również odpowiedź komórek poszczególnych klonów linii MDA-MB-231 na traktowanie doksorubicyną, może wpłynąć na proces apoptozy w badanych komórkach, a tym samym na ich przeżywalność. W tym celu, wykorzystując komercyjnie dostępny test aneksyna V FITC/PI, sprawdziłam odsetek komórek żywych, wczesno- i późnoapoptotycznych we wspomnianych klonach linii MDA-MB-231 z wykorzystaniem cytometru przepływowego. Rozmieszczenie „chmur” wspomnianych grup komórek, uwidacznia różnice wynikające zarówno ze zmiany poziomu białka p66Shc (ryc. 62A) jak i odpowiedzi na zastosowany chemioterapeutyk (ryc. 63A, B).



**Ryc. 62** Przykładowe wykresy rozrzutu przedstawiające zmiany intensywności świecenia aneksyny V oraz PI. Określenie odsetka komórek żywych (aneksyna V-/PI-; lewy dolny kwadrat przeżywalności), wczesnoapoptotycznych (aneksyna V+/PI-; prawy dolny kwadrat wykresów przeżywalności) i późnoapoptotycznych (aneksyna V+/PI+; prawy górny kwadrat wykresów przeżywalności) w poszczególnych klonach (-) DOX (**A**) oraz (+) DOX (**B**) linii MDA-MB-231

Z przeprowadzonej analizy można wnioskować, że sama zmiana poziomu białka p66Shc nie wpłynęła znacząco na przeżywalność komórek. Niemniej jednak, interesującym wydaje się jednak fakt, że zmiana poziomu białka p66Shc ma istotny wpływ na przeżywalność komórek, w momencie kiedy traktowane są one doksorubicyną (ryc. 63A). Mianowicie, znaczące różnice w poziomie żywych komórek zauważyłam głównie pomiędzy traktowanym doksorubicyną klonem z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (p66Shc KO), a następującymi klonami: z podwyższonym poziomem białka p66Shc ( $\uparrow$  p66Shc) oraz z podwyższonym poziomem zmutowanej w reszcie Ser36 formy białka p66Shc ( $\uparrow$  mut-Ser36-p66Shc), co jest widoczne na rycinie 63A. Co więcej, istotne statystycznie różnice zaobserwowałam również w kontekście odpowiedzi komórek na traktowanie chemioterapeutykiem (dany klon nietraktowany i traktowany doksorubicyną), co jest widoczne w poziomie zarówno żywych komórek (ryc. 63A) jak i komórek wczesnoapoptotycznych (ryc. 63B). W przypadku poziomu komórek żywych istotne różnice dotyczą następujących klonów nietraktowanych i traktowanych doksorubicyną: klon stanowiący kontrolę (K), (\*  $p < 0,05$ ) oraz z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (p66Shc KO), (\*\*\*)  $p < 0,001$ ). W obu przypadkach traktowanie komórek

doksorubicyną spowodowało znaczący spadek ilości żywych komórek w stosunku do komórek nietraktowanych chemioterapeutykiem (ryc. 63A). Jeśli chodzi o różnice w poziomie komórek wczesnoapoptotycznych to zauważyłam podobną tendencję co w przypadku poziomu komórek żywych. Podobnie, klon z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (p66Shc KO), traktowany doksorubicyną różni się również od traktowanych klonów: z podwyższonym poziomem białka p66Shc ( $\uparrow$  p66Shc) oraz z podwyższonym poziomem zmutowanej w reszcie Ser36 formy białka p66Shc ( $\uparrow$  mut-Ser36-p66Shc), (ryc. 63B). Ponadto, klon p66Shc KO traktowany doksorubicyną wykazuje istotne statystycznie podwyższenie ilości komórek wczesnoapoptotycznych w stosunku do tych samych komórek ale nietraktowanych chemioterapeutykiem. Co ciekawe, nie zauważyłam różnic w ilości komórek późnoapoptotycznych zarówno w kontekście wpływu zmian poziomu białka p66Shc jak i odpowiedzi komórek na traktowanie chemioterapeutykiem (ryc. 63C).



**Ryc. 63 Ocena poziomu śmierci komórkowej (apoptozy) w poszczególnych klonach (-/+ DOX) linii MDA-MB-231.** Wykres słupkowy przedstawiający procentowy udział poszczególnych grup komórek: żywych (A), wczesno- (B) i późnoapoptotycznych (C); \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

Należy zaznaczyć, iż w celu uzyskania prawidłowego pomiaru fluorescencji badanych komórek, zastosowano hierarchiczną strategię bramkowania komórek. W pierwszej



kolejności określiłam populację komórek, jednocześnie dokonując eliminacji resztek komórkowych (ang. *debris*), bazując na parametrach fizycznych: ziarnistości i wielkości komórek (odpowiednio SSC-A/FSC-A). Następnie usunęłam z analizy komórki zlepione (ang. *doublets*) na podstawie parametrów FSC-H/FSC-W oraz SSC-H/SSC-W.

#### **4.4. Rodzina białek ShcA – izoforma p66Shc jako potencjalny marker prognostyczny**

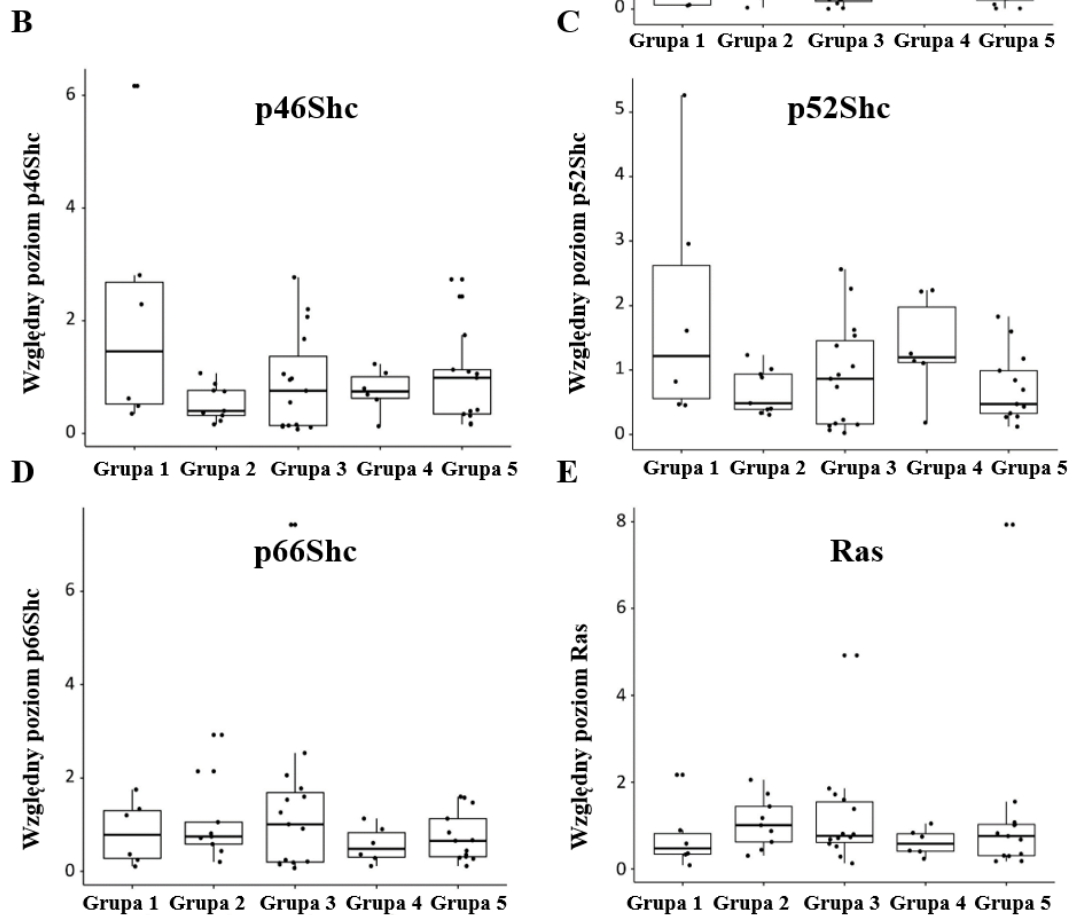
Rola białek ShcA w procesach onkogennych była intensywnie badana w wielu modelach, w tym w nowotworach układu nerwowego. Szereg danych literaturowych wskazuje na możliwość wykorzystania białka p66Shc (jak również pozostałych izoform rodziny ShcA) jako potencjalnego markera prognostycznego w diagnostyce nowotworowej (JACKSON I WSP. 2000; DAVOL I WSP. 2003; GROSSMAN I WSP. 2007). W swojej pracy doktorskiej postawiłam zatem sprawdzić czy poziom białka p66Shc może korelować ze stopniem złośliwości bądź typem nowotworów mózgu. W tym celu jako materiał badawczy wykorzystywałam próbki guzów nowotworowych mózgu pacjentów pediatrycznych sklasyfikowane według czterostopniowej skali określającej stopień złośliwości guza (I – IV) oraz przynależne do różnych typów nowotworów ośrodkowego układu nerwowego (ich dokładny opis znajduje się w rozdziale 3.1 na ryc. 10). Liczne prace donoszą także o zmienionych wzorcach ekspresji nie tylko białek ShcA lecz również białka Ras (którego aktywność może zależeć od rekrutacji ShcA) w różnych typach nowotworów (PELICCI I WSP. 1996). Białka Ras (H-, K-, N-) to małe GTPazy, które regulują liczne szlaki sygnałowe w błonach zaangażowane między innymi w adhezję komórek, wzrost, migrację i przeżycie (COX & DER 2010). Analiza immunohistochemiczna białka TrkB wykazała jego silną nadekspresję w wielu guzach nowotworowych (m.in. żołądka, jelita grubego, jajnika, nie drobnokomórkowego nowotworu płuc itd.) co było ściśle związane z dużo gorszym rokowaniem dla pacjenta (ZHANG I WSP. 2017).

Dlatego też, w swoich badaniach dokonałam oceny poziomu takich białek jak: TrkB, H-, K- i N-Ras (pan-Ras) oraz wszystkich trzech izoform białek ShcA (p66Shc, p52Shc i p46Shc) w próbkach guzów nowotworowych mózgu należących do kilku podgrup (*guzy splotu naczyniówkowego, rozlane gwiazdziaki i skąpodrzewiaki, guzy pochodzenia zarodkowego OUN, nowotwory gleju wyściółkowego, jak i inne guzy astroglejowe*) oraz zdefiniowanych pod kątem stopnia złośliwości (I, II, III i IV) na podstawie klasyfikacji WHO z 2016 r (podział wykorzystanych guzów litych mózgu przedstawia ryc. 10). Uzyskane wyniki zostały opisane w opublikowanej ostatnio pracy badawczej PRILL I WSP. 2021.

#### 4.4.1. Zależność między typem nowotworu mózgu a poziomem białek ShcA, Ras oraz TrkB

Przeprowadzona jako pierwsza analiza poziomu białek rodziny ShcA mająca na celu określenie korelacji pomiędzy typem nowotworu mózgu a poziomem białek ShcA nie ujawniła istotnych różnic. Jak pokazano na rycinie 64B i 64C, poziomy dwóch izoform rodziny ShcA (ocenione przy użyciu swoistych przeciwciał), które aktywują białko Ras, mianowicie p46Shc i p52Shc, są stosunkowo równe we wszystkich grupach nowotworów. Najniższy poziom p46Shc i p52Shc (przy braku istotności statystycznej) wykazałam w guzach: *rozlanych gwiaździakach* i *skąpodrzewiakach* (grupa 2) oraz w guzach scharakteryzowanych przez WHO jako *inne guzy astroglajowe* (grupa 5) w przypadku p52Shc. Podobnie, poziom najdłuższej izoformy ShcA – p66Shc, nie różnił się zbytnio w pięciu grupach badanych nowotworów mózgu u pacjentów pediatrycznych (ryc. 64D). Jedyne różnice jakie zaobserwowałam dotyczyły wyłącznie białka TrkB (ryc. 64A). Jednokierunkowe testy ANOVA i post-hoc t-testy z korekcją Bonferroniego wykazały istotną (na poziomie 5%) różnicę w poziomie TrkB między *guzami* pochodzenia *zarodkowego OUN* a *nowotworami gleju wyściółkowego* (grupa 4). Poziom białka Ras był porównywalny we wszystkich badanych typach guzów mózgu (ryc. 64E).

- Grupa 1** – Guzy splotu naczyniówkowego
- Grupa 2** – Rozlane gwiaździaki i skąpodrzewiaki
- Grupa 3** – Guzy pochodzenia zarodkowego OUN
- Grupa 4** – Nowotwory gleju wyściółkowego
- Grupa 5** – Inne guzy astroglejowe



**Ryc. 64** Poziom p46Shc, p52Shc, p66Shc, Ras i TrkB w różnych typach guzów nowotworowych mózgu. Przedstawione wykresy pudełkowe przedstawiają odpowiednio poziom białek TrkB (A), p46Shc (B), p52Shc (C), p66Shc (D) i Ras (E) w pięciu grupach próbek guzów podzielonych na podstawie analizy histochemicznej (PRILL I WSP. 2021).

#### **4.4.2. Zależność między stopniem złośliwości nowotworu mózgu a poziomem białek ShcA, Ras oraz TrkB**

Oprócz określenia zależności między typem nowotworu a poziomem badanych białek, zbadałam również czy istnieje korelacja pomiędzy stopniem złośliwości analizowanych guzów nowotworowych mózgu a poziomem analizowanych przeze mnie białek (ShcA, Ras oraz TrkB). Z przeprowadzonej analizy wynika, że w przypadku poziomu TrkB trudno jest określić jakąkolwiek liniową korelację między poziomem tego białka a stopniem złośliwości (ryc. 65A). Nie zanotowałam istotnych statystycznie różnic w poziomie tego białka przy podziale na grupy nowotworów o różnym stopniu złośliwości. W przypadku białek z rodziny ShcA można stwierdzić, że tylko poziom p46Shc jest istotnie podwyższony w guzach o I stopniu złośliwości w porównaniu z innymi guzami charakteryzującymi się II, III i IV stopniem złośliwości (ryc. 65B). Podobny trend zaobserwowałam dla białka p52Shc i stopnia złośliwości, niemniej jednak różnice nie są istotne statystycznie (ryc. 65C). Poziom białka p66Shc wydaje się być jednakowy we wszystkich grupach guzów nowotworowych mózgu u pacjentów pediatrycznych charakteryzujących się różnym stopniem złośliwości (ryc. 65D). Podobnie, poziom białka Ras wydaje się być niezmienny w analizowanych guzach nowotworowych mózgu o różnym stopniu złośliwości (I, II, III i IV) (ryc. 65E). Można jednak pokusić się o konkluzję, że w guzach nowotworowych o I stopniu złośliwości, poziom białka Ras jest najniższy, jednakże brak jest istotności statystycznej obserwowanej zmiany.

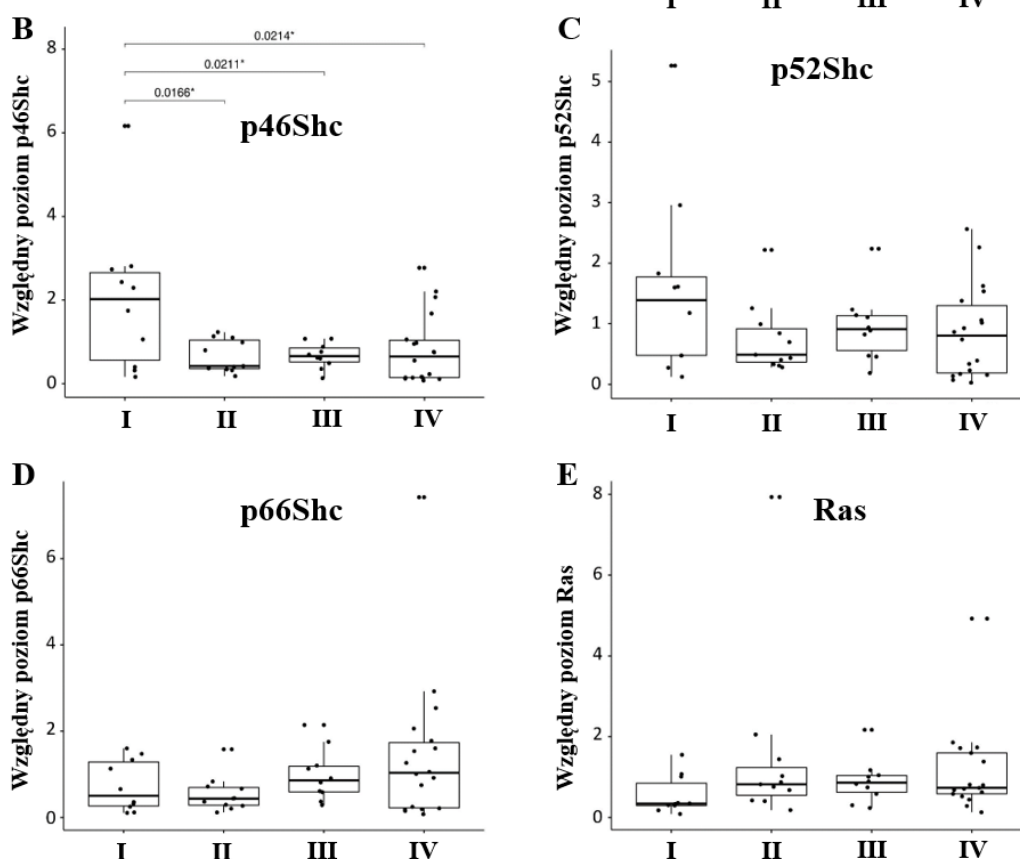
### STOPNIE ZŁOŚLIWOŚCI:

**I** – Gwiaździatek włosowatokomórkowy, gwiaździatek podwyściółkowy olbrzymiokomórkowy, brodawczak spłotu naczyńiówkowego

**II** – Skąpodrzewiak typu pediatrycznego, gwiaździatek pilomyksoidny, żółtakogwiaździatek pleomorficzny, wyściółczak

**III** – Skąpodrzewiak anaplastyczny typu pediatrycznego, wyściółczak anaplastyczny, rak spłotu naczyńiówkowego

**IV** – Glejak złośliwy, rdzeniak, atypowy nowotwór potworniakowo/palczkowaty, guzy zarodkowe NOS



**Ryc. 65** Poziom p46Shc, p52Shc, p66Shc, Ras i TrkB w guzach nowotworowych mózgu przedstawione w zależności od stopnia złośliwości. Przedstawione wykresy pudełkowe przedstawiają odpowiednio poziom białek TrkB (A), p46Shc (B), p52Shc (C), p66Shc (D) i Ras (E) w guzach o różnym stopniu złośliwości (PRILL I WSP. 2021).

## 5. DYSKUSJA

W ciągu ostatnich lat pojawia się coraz więcej doniesień świadczących o zaangażowaniu mitochondriów w patogenezę rozlicznych schorzeń w tym m.in. chorób nowotworowych, neurodegeneracyjnych czy zaburzeń metabolicznych. Zmiana podstawowych parametrów mitochondrialnych takich jak: produkcja ATP, zdolność buforowania jonów wapnia, czy podwyższona produkcja reaktywnych form tlenu może potencjalnie prowadzić do powstawania wyżej wymienionych dysfunkcji. Ponadto, zaangażowanie mitochondriów w procesy apoptozy czyni je niezwykle atrakcyjnym „celem” służącym do eliminacji komórek nowotworowych. Najczęściej komórki nowotworowe charakteryzują się zmniejszeniem oddychania mitochondrialnego, a co za tym idzie nasileniem glikolizy. Spadek aktywności metabolicznej mitochondriów w komórkach nowotworowych może mieć wiele przyczyn, m.in. może być spowodowany bezpośrednimi zmianami w mitochondrialnych kompleksach łańcucha oddechowego. W niektórych przypadkach zahamowanie fosforylacji oksydacyjnej może być konsekwencją mutacji w mtDNA, prowadząc tym samym do zwiększonej produkcji RFT, które działając zarówno jak mutageny oraz mitogeny komórkowe przyczyniają się do progresji nowotworowej i niestabilności genetycznej. Co więcej, zmiany biochemiczne i molekularne wywołane przez RFT mogą przyczyniać się do rozwoju heterogenicznej populacji komórek nowotworowych. Dodatkowo, istotny z punktu widzenia mojej pracy doktorskiej jest wpływ jaki może mieć jedna z izoform rodziny ShcA – białko p66Shc na metabolizm energetyczny komórek nowotworowych.

Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej badania miały głównie na celu określenie wpływu białka adaptorowego p66Shc na wybrane parametry bioenergetyczne komórek nowotworowych. Dodatkowo, chciałam ustalić, czy zmiana poziomu białka p66Shc wpłynie na odpowiedź komórek nowotworowych na traktowanie chemioterapeutykiem – doksorubicyną. W pierwszej kolejności skupiłam się na ustaleniu czy różny poziom białka p66Shc w komórkach nowotworowych będzie miał wpływ na poziom RFT oraz ewentualną manifestację stresu oksydacyjnego. W tym celu wykorzystałam dwie linie nowotworowe raka sutka charakteryzujące się różnym poziomem białka p66Shc: względnie „wyższym” (MDA-MB-231) i „niższym” (MCF-7) poziomem jak również nienowotworowy odpowiednik tych linii komórkowych w postaci linii kontrolnej – MCF-10A. Umożliwiło mi to charakterystykę linii komórkowych różniących się poziomem endogennego białka p66Shc ale

reprezentujących ten sam rodzaj nowotworu (rak sutka) pod kątem poziomu RFT jak i funkcjonowania mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Następnie, postanowiłam sprawdzić jak zmiana poziomu białka p66Shc w obrębie tej samej linii komórkowej może wpłynąć na fizjologię komórek nowotworowych oraz ich parametry bioenergetyczne. Jako materiał badawczy wykorzystałam te same linie nowotworowe (MDA-MB-231 oraz MCF-7), w których dokonałam modyfikacji genetycznych skutkujących zmianą poziomu białka p66Shc. Chciałam w bezpośredni sposób wykazać jak zmieniają się parametry bioenergetyczne, produkcja RFT oraz parametry opisujące status uszkodzeń oksydacyjnych w komórkach nowotworowych (w obrębie danej linii), różniących się wyłącznie poziomem białka p66Shc. Ponadto, dokonałam oceny odpowiedzi komórek nowotworowych analizowanych klonów linii MDA-MB-231 na traktowanie doksorubicyną. Sprawdziłam jak zmiana poziomu p66Shc może wpłynąć na odpowiedź komórek na stres oksydacyjny oraz wybrane parametry bioenergetyczne w przypadku traktowania komórek doksorubicyną. Na koniec, biorąc pod uwagę liczne doniesienia wskazujące na potencjalne wykorzystanie białka p66Shc jako markera prognostycznego, zdecydowałam się na określenie korelacji między poziomem białka p66Shc, a typem nowotworów neuroepitelialnych mózgu oraz stopniem ich złośliwości. W tym celu przeanalizowałam 49 próbek różnego typu nowotworów neuroepitelialnych pobranych od pacjentów pediatrycznych.

### **5.1. Rola białka p66Shc w komórkach nowotworowych raka sutka oraz komórkach kontrolnych**

Białka z rodziny ShcA po raz pierwszy zostały odkryte w wyniku przeszukiwania biblioteki ludzkiego cDNA przy pomocy reprezentatywnych sond DNA pod kątem sekwencji komplementarnych do domeny SH2. Początkowo zostały zidentyfikowane jako protoonkogen zawierający domenę SH2 zaangażowany w sygnalizację czynnika wzrostu (PELICCI I WSP. 1992). Do tej pory potwierdzono istnienie czterech ssaczych genów SHC: *SHCA*, *SHCB* (sck), *SHCC* (N-Shc/rai) oraz *SHCD* (NAKAMURA I WSP. 1996; PELICCI I WSP. 1996; O'BRYAN I WSP. 1996; AHMED & PRIGENT 2017). Wszystkie cztery geny kodują białka, które są wysoce spokrewnione pod względem domen i struktur. Białko p66Shc (jak zostało szczegółowo opisane w rozdziale 1.5) przynależy do rodziny ShcA podobnie jak dwie inne izoformy (p52Shc oraz p46Shc) kodowane przez ten sam gen. Od samego początku, główną funkcją (pełnioną w warunkach fizjologicznych) przypisywaną wszystkim trzem izoformom rodziny ShcA był ich udział w szlakach sygnałowych aktywowanych przez kinazy tyrozynowe,

prowadzące do aktywacji białka Ras oraz kaskady kinaz MAP (PELICCI I WSP. 1992; LOTTI I WSP. 1996; RAVICHANDRAN 2001). Co ciekawe, spośród trzech białek reprezentujących rodzinę ShcA (p66Shc, p52Shc oraz p46Shc), białko p66Shc cechuje się odmiennym charakterem pełnionych funkcji w przypadku powyżej wspomnianych szlaków sygnałowych. Może ono pełnić rolę negatywnego regulatora proliferacji (MIGLIACCIO I WSP. 1997; OKADA I WSP. 1997), co w przypadku konstruowania potencjalnych terapii wydaje się być niezwykle obiecujące.

W związku z tym, w swej pracy doktorskiej jako pierwsza postanowiłam sprawdzić poziom wszystkich izoform rodziny ShcA w dwóch niezależnych liniach raka sutka (MDA-MB-231 oraz MCF-7), jak również odpowiadającej im linii komórek kontrolnych (MCF-10A). Miało to na celu po pierwsze, sprawdzenie jak poziom białka p66Shc różni się pomiędzy komórkami kontrolnymi a nowotworowymi. Po drugie, jak odmienny poziom endogennego białka p66Shc (reprezentowany przez dwie linie nowotworowe) w obrębie tego samego rodzaju nowotworu (rak sutka) może wpłynąć na badane linie nowotworowe. Uzyskane wyniki pokazały, że obie linie raka sutka różnią się między sobą nie tylko poziomem białka p66Shc, ale również i poziomem innej izoformy p52Shc (ryc. 15A). Linia nowotworowa MDA-MB-231 zaliczana jest do podtypu bazalno-podobnego (tzw. *basal-like*), zaś MCF-7 – podtypu luminalnego jeśli chodzi o molekularny podtyp raka sutka (RYŚ-BEDNARSKA & ROMANOWICZ 2012). Linia MDA-MB-231 jest stosunkowo powszechnie wykorzystywana do modelowania nowotworu sutka w późnym stadium choroby. W przeciwieństwie do mało inwazyjnej linii nowotworowej MCF-7, linia MDA-MB-231 jest linią o wysokim potencjale przerzutowym, charakteryzującą się złym rokowaniem oraz niekorzystnym przebiegiem klinicznym. Jak można wnioskować z ryciny 15A to właśnie linia MDA-MB-231 (jako ta bardziej „agresywna”) charakteryzuje się znacząco wyższym poziomem białka p66Shc w porównaniu do linii MCF-7. Znajduje to potwierdzenie w dostępnej literaturze, ponieważ JACKSON I WSP. (2000) również wskazują na zdecydowanie wyższy poziom białka p66Shc w wysoce metastatycznym wariantcie (F-11) linii MDA-MB-231. Według JACKSON I WSP. (2000) rosnące poziomy białka p66Shc u pacjentek korelowały również ze zwiększoną liczbą węzłów chłonnych dotkniętych przerzutami nowotworowymi. Z kolei, FRACKELTON I WSP. (2006) zauważyli, iż pierwotne guzy pacjentek, u których nastąpił nawrót raka sutka charakteryzowały się wyższym poziomem puli ufosforylowanych w resztach tyrozyny białek ShcA oraz niższym poziomem białka p66Shc. Ponadto, podwyższony poziom izoformy p66Shc wiązano z tzw. przejściem nabłonkowo – mezenchymalnym przez komórki pierwotnych nowotworów sutka obejmujących praktycznie



wszystkie podtypy molekularne, w tym nawet guzy luminalne (cechujące się lepszym rokowaniem) (HUDSON I WSP. 2020). Może to mieć duże znaczenie kliniczne, ponieważ podtypy luminalny i HER2<sup>+</sup> (pozytywny pod kątem receptora ludzkiego czynnika wzrostu) łącznie stanowią 80% wszystkich nowo zdiagnozowanych raków sutka. Badania kliniczne sugerują również istotną rolę ścieżki sygnałowej białek ShcA aktywowanej przez kinazy tyrozynowe w rozwoju raka sutka. Dwie grupy badawcze DAVOL I WSP. (2003) oraz FRACKELTON I WSP. (2006) wykazały obniżony poziom białka p66Shc w połączeniu ze zwiększoną fosforylacją białek ShcA w reszcie tyrozyny Y317 u pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem sutka. W celu wykluczenia hipotezy, iż obserwowane zmiany w poziomie białka p66Shc pomiędzy analizowanymi liniami nowotworowymi mogą być np. spowodowane mutacją w genie kodującym białko p66Shc – zdecydowałam się na wykonanie zsekwencjonowania genu *SHC1* w badanych liniach komórkowych. Przeprowadzona analiza (ryc. 16) nie wykazała różnic w badanych eksonach. Jednocześnie, świadczy to o tym, że obserwowane zmiany poziomu p66Shc są wynikiem różnic pomiędzy różnymi podtypami badanych linii nowotworowych. Porównanie linii kontrolnej oraz obu linii nowotworowych pokazało, że komórki kontrolne linii MCF-10A mają najwyższy poziom wszystkich badanych białek: p66Shc, p52Shc oraz p46Shc w stosunku do komórek nowotworowych. Niemniej jednak, najbardziej widoczne zmiany zanotowałam w przypadku izoformy p66Shc, którą cechuje istotne obniżenie poziomu w obu liniach raka sutka, co może świadczyć o pewnym stopniu adaptacji komórek nowotworowych (ryc. 15A). Niski poziom białka p66Shc w komórkach potrójnie ujemnej linii raka sutka 4T1 zaobserwowała również grupa badawcza LEWIS I WSP. (2020).

### **5.1.1 Prooksydacyjne właściwości białka p66Shc a poziom stresu oksydacyjnego**

cDNA kodujące najdłuższą z izoform ShcA – p66Shc sklonowano 5 lat po tym jak zostały odkryte krótsze izoformy: p52Shc oraz p46Shc, które wspólnie biorą udział w przekazywaniu sygnałów mitogennych (MIGLIACCIO I WSP. 1997). W przeciwieństwie do pozostałych białek rodziny ShcA (kodowanych przez pojedynczy transkrypt), izoforma p66Shc powstaje w wyniku alternatywnego splicingu i jej ekspresja jest regulowana przez własny promotor (PELICCI I WSP. 1992). W konsekwencji tego poszczególne białka ShcA pełnią różnorodne funkcje biologiczne. I tak, MIGLIACCIO I WSP. (1999) w swej przełomowej pracy odkryli, że białko p66Shc może być także zaangażowane w odpowiedź komórki na stres oksydacyjny. Autorzy wykazali, że myszy pozbawione białka p66Shc (p66ShcA<sup>-/-</sup>)

charakteryzowały się 30% wzrostem długości życia i mniejszą podatnością na stres oksydacyjny, w porównaniu z ich odpowiednikami typu dzikiego. Powiązano w ten sposób białko p66Shc z odpowiedzią na stres oksydacyjny, a zarazem procesem starzenia się organizmu. W tej samej pracy, MIGLIACCIO I WSP. (1999) po raz pierwszy pokazali udział białka p66Shc w szlakach przekazywania sygnału zaangażowanych w odpowiedź na stres oksydacyjny. Jednocześnie, ich obserwacja ujawniła również kluczową rolę fosforylacji białka p66Shc w reszcie Ser36 (unikalnej wyłącznie dla tej izoformy) w odpowiedzi na stres oksydacyjny.

Należy podkreślić, że wyniki przedstawione przez grupę MIGLIACCIO I WSP. (1999) uzyskane zostały niejako w „warunkach fizjologicznych” (tzn. w komórkach nienowotworowych) z wykorzystaniem fibroblastów pobranych z mysich zarodków (MEFs, ang. *Mouse embryonic fibroblasts*). Mając to na uwadze, w swej pracy doktorskiej postanowiłam dokonać analizy właściwości prooksydacyjnych białka p66Shc w badanych liniach nowotworowych oraz komórkach kontrolnych, sprawdzając poziom wybranych białek uczestniczących w prooksydacyjnej ścieżce sygnalizacyjnej białka p66Shc. Chciałam w ten sposób sprawdzić, czy w komórkach nowotworowych raka sutka białko p66Shc może mieć podobny wpływ na status produkcji RFT i stresu oksydacyjnego, co mogłoby utorować nowe podejście w walce z nowotworami. Przeprowadzona przeze mnie analiza prooksydacyjnej ścieżki sygnalizacyjnej białka p66Shc (rozdział 4.1.3) uwidoczniała istotne różnice w poziomie badanych białek pomiędzy analizowanymi liniami nowotworowymi (MDA-MB-231 oraz MCF-7) (ryc. 17A). Może to wynikać z odmiennego poziomu samego białka p66Shc w tych liniach. Mianowicie, linia MDA-MB-231 określana jest przeze mnie jako linia „ze względnie wyższym” zaś linia MCF-7 „ze względnie niższym” poziomem białka p66Shc. Zdecydowanie wyższy poziom aktywowanej RFT kinazy białkowej C $\beta$  jak również jej formy ufosforylowanej w reszcie Ser660 zauważyłam odpowiednio w linii „ze względnie wyższym” poziomem p66Shc – MDA-MB-231. Podobną sytuację obserwuje się także w przypadku poziomu białek PIN1 oraz PP2A. Co więcej, poziom wszystkich tych białek jest istotnie wyższy w porównaniu z linią MCF-7. Świadczyć to może o „podwyższonej aktywności” szlaku prooksydacyjnego białka p66Shc w linii MDA-MB-231 w stosunku do linii MCF-7, co może być wynikiem wyższego poziomu białka p66Shc w tej linii (ryc. 15A). Wartym uwagi, jest również fakt, że w przypadku wszystkich czterech białek (PKC $\beta$ , Ser660-PKC $\beta$ , PIN1 oraz PP2A) linia MDA-MB-231 wykazuje ich wyższy poziom nie tylko w stosunku do linii MCF-7, lecz również linii kontrolnej MCF-10A. Niemniej jednak, jedynie w przypadku PKC $\beta$  ufosforylowanej w Ser660 i izomerazy PIN1 obserwowany podwyższony poziom był

istotny statystycznie (ryc. 17A). W związku z powyższym, na szczególną uwagę zasługuje wynik uzyskany dla formy białka p66Shc fosforylowanej w reszcie Ser36 jak i samego poziomu p66Shc (ryc. 17A). Można by się spodziewać, że wyższy poziom wszystkich białek uczestniczących w prooksydacyjnej ścieżce sygnalizacyjnej p66Shc w linii MDA-MB-231 będzie korelować z odpowiednio wyższym poziomem zarówno białka p66Shc jak i p66Shc ufosforylowanego w Ser36 (Ser36-p66Shc) w tej linii. Jednakże, linia MDA-MB-231 charakteryzuje się znaczącym obniżeniem poziomu zarówno p66Shc jak i Ser36-p66Shc w stosunku do linii kontrolnej. Wynik ten jest odmienny od tego uzyskanego przez grupę prof. Pintona z Ferrary (PINTON I WSP. 2007) na fibroblastach pobranych z mysich embrionów. Autorzy ci wykazali, że aktywowana stresem oksydacyjnym kinaza białkowa C $\beta$  indukuje fosforylację p66Shc w Ser36, a jednocześnie wywołuje mitochondrialną akumulację białka p66Shc po rozpoznaniu go przez izomerazę PIN1 (PINTON I WSP. 2007; PINTON I WSP. 2008). Co ciekawe, komórki MEF pozbawione izomerazy PIN1 charakteryzowały się znacznie niższym poziomem mitochondrialnego p66Shc (PINTON I WSP. 2007; PINTON I WSP. 2008). Biorąc pod uwagę obniżony poziom p66Shc z towarzyszącym mu podwyższonym poziomem białek uczestniczących w prooksydacyjnej ścieżce p66Shc, można przypuszczać, że w komórkach nowotworowych mamy do czynienia z innego typu regulacją bądź obecnością dodatkowych mechanizmów wpływających na poziom p66Shc niezależnych od kinazy PKC $\beta$  czy izomerazy PIN1.

Z jednej strony cząsteczka tlenu jest niezbędna do istnienia życia tlenowego, zaś z drugiej może być toksyczna dla wszystkich form życia. W rzeczywistości metabolizm tlenu i wynikające z niego toksyczne produkty uboczne mogą powodować w konsekwencji m.in. choroby nowotworowe. Wysiłki mające na celu przeciwdziałanie uszkodzeniom powodowanym przez RFT zyskują coraz większą akceptację jako podstawa nowych podejść terapeutycznych w dziedzinie profilaktyki nowotworów (MATÉS I WSP. 2012). Jak już wspomniałam, badania przeprowadzone na myszach pozbawionych genu kodującego białko p66Shc ujawniły obniżony poziom wewnątrzkomórkowych RFT, a także obniżony poziom uszkodzeń oksydacyjnych DNA i białek (TRINEI I WSP. 2002; NAPOLI I WSP. 2003; GIORGIO I WSP. 2005). Znacząco obniżony poziom białka p66Shc jak i fosforylacji w Ser36 w obu liniach raka sutka skłonił mnie do określenia w nich poziomu RFT. Co ciekawe, względny poziom RFT mierzony głównie w postaci H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jest podobny w obu analizowanych liniach raka sutka jak również linii kontrolnej (ryc. 18). Można byłoby się spodziewać, że obniżony poziom białka p66Shc jak również związanej ze stresem oksydacyjnym fosforylacji w Ser36 powinien korelować również z niższym poziomem RFT w komórkach nowotworowych.

Różnice są natomiast widoczne w przypadku poziomu obu anionorodników ponadtlenkowych. Poziom zarówno mitochondrialnego jak i cytozolowego anionorodnika ponadtlenkowego jest najwyższy w linii MDA-MB-231 (ryc. 18). Istotne statystycznie różnice zauważyłam pomiędzy obiema liniami raka sutka (cyt.O<sub>2</sub><sup>•-</sup> oraz mt.O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) i dodatkowo między linią MCF-7 oraz komórkami kontrolnymi (mt.O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). Linia MCF-7 cechuje się najniższym poziomem obu analizowanych anionorodników ponadtlenkowych. W związku z powyższym, można zauważyć korelację pomiędzy podwyższonym poziomem mt.O<sub>2</sub><sup>•-</sup> i cyt.O<sub>2</sub><sup>•-</sup> jak i wyższym poziomem białka p66Shc obecnym w linii MDA-MB-231 (linia ze względnie wyższym poziomem p66Shc). Odwrotnie, linia MCF-7 charakteryzująca się względnie niższym poziomem p66Shc wykazuje odpowiednio zdecydowanie niższy poziom obu anionorodników w porównaniu do linii MDA-MB-231. Zgodnie z zaproponowanym mechanizmem, według którego białko p66Shc bierze udział w produkcji głównie nadtlenu wodoru uważa się, iż powstaje on w wyniku bezpośredniego przenoszenia elektronów z cytochromu c na tlen cząsteczkowy (GIORGIO I WSP. 2007). Niemniej jednak, obserwacje poczynione przez grupę badawczą NEMOTO & FINKIEL (2002) wskazują, że białko p66Shc może aktywować fosforylację/inaktywację czynnika transkrypcyjnego FOXO (odpowiedzialnego m.in. za detoksyfikację RFT), w komórkach szczególnie narażonych na stres oksydacyjny. Może to sugerować, że upośledzenie ochrony antyoksydacyjnej również może przyczyniać się do „nasilenia” aktywności prooksydacyjnej białka p66Shc. W związku z tym, zbadalam poziom wybranych enzymów antyoksydacyjnych w badanych liniach nowotworowych. Wykazałam istotne różnice w poziomie GR, katalazy czy SOD2. Katalaza, która jest enzymem w głównej mierze odpowiedzialnym za redukcję nadtlenu wodoru, charakteryzuje się znaczącym, podwyższonym poziomem w linii MDA-MB-231 (ze względnie wyższym poziomem p66Shc) w stosunku do linii kontrolnej (ryc. 19A). Co ciekawe, nie zauważyłam różnic w poziomie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pomiędzy badanymi liniami komórkowymi. Można by spekulować, że stosunkowo wyrównany poziom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w badanych liniach można tłumaczyć bądź podwyższonym poziomem GR (linia MCF-7) lub katalazy (linia MDA-MB-231).

Uważa się, że jednym z najważniejszych enzymów odpowiedzialnych za obronę komórek przed stresem oksydacyjnym jest dysmutaza ponadtlenkowa. Powstające w mitochondriach RFT mogą uszkadzać mtDNA, prowadząc do jego mutacji, a tym samym, deficytu energetycznego komórek jak również zmian nowotworowych. W przypadku komórek nowotworowych zaobserwowano znaczące różnice generalnie w aktywności SOD pomiędzy komórkami zdrowymi i nowotworowymi (STCLAIR & HOLLAND 1991). Podobną

zależność zaobserwowałam w przeprowadzonej przeze mnie analizie poziomu SOD2. Istotnie obniżony poziom tego enzymu antyoksydacyjnego występuje w komórkach obu linii nowotworowych (ryc. 19A). Wydaje się, że wspomniana przeze mnie wcześniej inaktywacja FOXO pośredniczy w regulacji ekspresji SOD2, co zostało np. pokazane w hepatocytach wystawionych na działanie etanolu, indukującego mitochondrialny stres oksydacyjny (KOCH I WSP. 2008). Chciałabym zwrócić uwagę, że najniższy poziom mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej w linii MDA-MB-231 koreluje z wyższym poziomem  $mt.O_2^{\cdot-}$  w tej linii i podobnie, wyższy (w porównaniu do linii MDA-MB-231) poziom SOD2 w linii MCF-7 wiąże się z niższym poziomem anionorodnika ponadtlenkowego. Nie zaobserwowałam natomiast żadnych różnic w poziomie SOD1.

### **5.1.2. Wpływ białka p66Shc na wybrane parametry funkcjonalne mitochondriów oraz poziom podjednostek OXPHOS w komórkach zdrowych i nowotworowych**

Od dawna uważano, że reaktywne formy tlenu powstają w wyniku funkcjonowania mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Powszechna zgodność co do tego, że RFT mogą działać nie tylko destrukcyjnie, lecz także jako dedykowane cząsteczki sygnalizacyjne, pobudziła badania nad mitochondrialnymi systemami sygnalizacyjnymi i regulacją mitochondrialnego metabolizmu RFT (GERTZ & STEEGBORN 2010). Niezwykle istotny z punktu widzenia mojej pracy doktorskiej jest fakt, że białko p66Shc jest w stanie funkcjonować jako enzym redoks, biorący udział w produkcji RFT współdziałając z mitochondrialnym łańcuchem oddechowym (GIORGIO I WSP. 2005). Mimo, iż lokalizację izoformy p46Shc potwierdzono również w mitochondriach (VENTURA I WSP. 2004), jedynie białko p66Shc przypisuje się aktywność oksydoreduktazy tworzącej RFT (NEMOTO & FINKIEL 2002). Generalnie, wysoce metastatyczna linia MDA-MB-231 charakteryzuje się niższym tempem oddychania mitochondrialnego oraz wyższym „przepływem” glikolitycznym w porównaniu do linii MCF-7 (AVAGLIANO I WSP. 2019). Komórki linii MCF-7 są bardziej zależne od oddychania mitochondrialnego. AVAGLIANO I WSP. (2019) podkreślają, że wyższa szybkość glikolizy i zmniejszenie metabolizmu OXPHOS obserwowane w komórkach MDA-MB-231 potwierdzają ich potencjał metastatyczny. Wspomniana przewaga glikolizy nad OXPHOS w linii MDA-MB-231 potwierdza uzyskane przeze mnie wyniki, w których linia ta cechuje się obniżeniem większości analizowanych podjednostek łańcucha oddechowego w porównaniu do linii MCF-7 (kompleks I, IV oraz syntaza ATP). Ponadto, badania OWENS I WSP. (2011) podobnie jak i uzyskane przeze mnie

wyniki, wskazują, że najbardziej widoczne zmiany są w poziomie podjednostki UQCRC2 kompleksu III. Mianowicie, obie badane przeze mnie linie raka sutka cechuje istotne obniżenie tej podjednostki. W swojej pracy oznaczyłam również potencjał na wewnętrznej błonie mitochondrialnej, którego stan w głównej mierze zależy od aktywności jak również wydajności kompleksów łańcucha oddechowego. Podobnie jak wykazano w pracy OWENS I WSP. (2011) linia MCF-7 cechuje się znacząco niższym poziomem mierzonego potencjału mitochondrialnego (ryc. 21). Należy jednak zwrócić uwagę, iż rak sutka cechuje się niezwykle wysokim stopniem „plastyczności metabolicznej”, którą często uznaje się jako „heterogeniczną chorobę metaboliczną”, w której komórki nowotworowe mogą wybrać najlepszy dla siebie program metaboliczny w celu podtrzymania progresji nowotworowej (AVAGLIANO I WSP. 2019). Aby lepiej zrozumieć wpływ białka p66Shc na parametry bioenergetyczne mitochondriów sprawdziłam poziom wybranych podjednostek kompleksów mitochondrialnego łańcucha oddechowego – OXPHOS (ryc. 20). Istotne różnice zaobserwowałam w kompleksach I i III oraz syntazie ATP. Najniższy spośród analizowanych linii komórkowych poziom podjednostki NDUF8 kompleksu I wykazuje linia MDA-MB-231 (ze względnie wyższym poziomem białka p66Shc). Dlatego, aby w bezpośredni sposób pokazać, że obserwowane różnice w badanych liniach nowotworowych są faktycznie wynikiem różnego poziomu białka p66Shc postanowiłam uzyskać w wyniku przeprowadzonych modyfikacji genetycznych klonów linii MDA-MB-231 oraz MCF-7: z podwyższonym poziomem białka p66Shc ( $\uparrow$  p66Shc), z podwyższonym poziomem zmutowanej w reszcie Ser36 formy białka p66Shc ( $\uparrow$  mut-Ser36-p66Shc) oraz z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (p66Shc KO). Miało to na celu uniknięcie błędnej interpretacji wynikającej z porównywania różnych linii raka sutka charakteryzujących się nie tylko odmiennym poziomem endogennego p66Shc, lecz również zaliczanych do odrębnych typów raka sutka (MDA-MB-231 typ bazalno-podobny, wysoce metastatyczny oraz MCF-7 typ luminalny, łagodny). Ponadto, wykorzystanie klonu  $\uparrow$  mut-Ser36-p66Shc umożliwiło mi określenie roli reszty seryny 36 (unikalnej wyłącznie dla białka p66Shc i odpowiedzialnej za prooksydacyjne właściwości tego białka) w komórkach nowotworowych raka sutka. Opis uzyskanych klonów znajduje się w rozdziale 4.2.1.

## **5.2. Wpływ zmiany poziomu białka p66Shc na wybrane parametry funkcjonalne komórek klonów linii MDA-MB-231 oraz MCF-7 raka sutka**

Spośród trzech izoform rodziny ShcA, białko p66Shc jest strukturalnie różne i zawiera dodatkową domenę CH2, za pośrednictwem której wywiera swój wpływ na takie procesy jak produkcja RFT, migracja komórek, starzenie się, reorganizacja cytoszkieletu czy adhezja komórek (MIR I WSP. 2020). Jednak to funkcja związana z działaniem czynników wzrostu i sygnalizacją mitogenną była „pierwotną” funkcją przypisywaną białku p66Shc. Było tak do czasu kiedy MIGLIACCIO I WSP. (1997) po raz pierwszy opisali przeciwstawną rolę p66Shc (jako izoformy ShcA) w sygnalizacji mitogennej określając białko p66Shc jako negatywny regulator proliferacji. Dlatego, zdecydowałam się określić czy białko p66Shc podobnie jak w przypadku komórek nienowotworowych również w komórkach raka sutka może pełnić funkcję negatywnego regulatora proliferacji. W jednym z przeprowadzonych badań nad guzami raka sutka podwyższony poziom p66Shc w połączeniu ze zmniejszoną fosforylacją w resztach tyrozyny izoform p46/p52Shc wiązał się z dobrym rokowaniem dla pacjenta (DAVOL I WSP. 2003). Z kolei, inne badanie wykazało, że p66Shc ulega nadekspresji w liniach komórkowych raka sutka jak również pierwotnych guzach cechujących się wysokimi właściwościami przerzutowymi (JACKSON I WSP. 2000; LEWIS I WSP. 2020). Biorąc pod uwagę, że w przypadku raka sutka niezależne badania naukowe wciąż dostarczają przeciwstawnych danych dotyczących zależności pomiędzy chociażby poziomem p66Shc a ogólnym rokowaniem dla pacjenta, funkcję negatywnego regulatora białka p66Shc postanowiłam sprawdzić w klonach analizowanych linii nowotworowych różniących się poziomem białka p66Shc.

W celu uzyskania modyfikowanych genetycznie klonów linii MDA-MB-231 oraz MCF-7 wykorzystałam metody molekularne, które można zaliczyć do standardowych technik stosowanych aktualnie w badaniach naukowych. Metoda uzyskania linii z podwyższonym poziomem białka p66Shc (wykorzystująca technikę transfekcji lentiwirusami), jest już stosowana od wielu lat. Wykorzystano ją w przypadku wpływu białka p66Shc na odporność linii komórkowej raka jelita grubego RKO na stres oksydacyjny (GALIMOV I WSP. 2012), czy badaniu apoptozy indukowanej D,L-sulforafanem w komórkach raka sutka regulowanej przez białko p66Shc (SAKAO & SINGH 2012). Z kolei, technika edycji genu CRISPR-Cas9 jest metodą stosunkowo nową i dopiero od niedawna stosowaną w badaniu roli białka p66Shc w komórkach nowotworowych (LEWIS I WSP. 2020). W większości doniesień naukowych, linie charakteryzujące się brakiem bądź wyciszeniem genu kodującego białko p66Shc w

komórkach nowotworowych uzyskano wykorzystując metodę shRNA, siRNA itp. (MA I WSP. 2010; DU I WSP. 2013; HAINES I WSP. 2014; MILLER I WSP. 2019).

Biorąc pod uwagę fakt niezwykle intensywnych podziałów komórkowych, a tym samym wysokiego tempa proliferacji zwykle obserwowanego w komórkach nowotworowych, sprawdziłam czy białko p66Shc może pełnić funkcję negatywnego regulatora proliferacji w analizowanych przeze mnie klonach linii MDA-MB-231 oraz MCF-7. Tym samym sprawdziłam czy sama zmiana poziomu białka p66Shc w jednej i tej samej linii nowotworowej (MDA-MB-231 lub MCF-7) będzie miała wpływ na proces proliferacji analizowanych klonów danej linii raka sutka. Co ciekawe, na podstawie otrzymanej krzywej przeżywalności prezentującej tempo wzrostu poszczególnych klonów można stwierdzić, iż w przypadku klonu z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (p66Shc KO) linii MCF-7 zaobserwowałam najniższe tempo wzrostu w porównaniu do pozostałych klonów (K, ↑ p66Shc oraz ↑ mut-Ser36-p66Shc) (ryc. 23B). W tym samym klonie p66Shc KO linii MDA-MB-231 zaobserwowałam podobną tendencję. Tak samo, obniżonym tempem wzrostu charakteryzuje się również klon z podwyższonym poziomem zmutowanej w Ser36 formy białka p66Shc (ryc. 23A). Uzyskane przeze mnie wyniki wykazały więc odwrotną zależność niż powinniśmy oczekiwać, biorąc pod uwagę, że białko p66Shc jest negatywnym regulatorem proliferacji. Oczekiwałam, że klon z podwyższonym poziomem białka p66Shc będzie cechować się najniższym tempem wzrostu komórek. Badania MA I WSP. (2010) przeprowadzone na komórkach nienowotworowych wskazują, że brak białka p66Shc w normalnych komórkach nabłonkowych płuc prowadzi do ciągłej aktywacji białka Ras, zapobiegając tzw. *anoikis* (indukowanej formie apoptozy) poprzez supresję białek RhoA (białka należące do nadrodziny małych białek G). Do podobnych konkluzji, świadczących o ścisłej zależności białka p66Shc z białkiem Ras doprowadziły badania przeprowadzone przez OKADA I WSP. (1997), którzy udowodnili, że w wyniku podwyższenia ekspresji genu kodującego p66Shc, szlak sygnałowy Ras jest hamowany, co potwierdza rolę p66Shc jako negatywnego regulatora proliferacji. Zestawiając uzyskane przeze mnie wyniki z danymi opublikowanymi przez grupę MIGLIACCIO I WSP. (1997), mogę stwierdzić, że w przypadku komórek raka sutka funkcja izoformy p66Shc jako negatywnego regulatora proliferacji nie została potwierdzona. Jednakże, wyniki uzyskane przez MILLER I WSP. (2019) dla komórek nowotworowych raka prostaty wydają się potwierdzać moje obserwacje. Stwierdzili oni 60% spadek w proliferacji komórek LNCaP-AI z obniżonym poziomem białka p66Shc (shRNA p66Shc) w stosunku do komórek kontrolnych (transfekowanych pustym wektorem). Ponadto, badania przeprowadzone z wykorzystaniem linii MDA-MB-231 zwracają uwagę, że po



stymulacji EGF komórek tej linii białko p66Shc wspólnie z Grb-2 nasilają nie tylko proliferację lecz także migracje komórek raka sutka poprzez aktywację małych GTPaz: ARF1 (Czynnik 1 ADP-rybozylacji, ang. *ADP-ribosylation factor 1*) oraz ARF-6 (Czynnik 6 ADP-rybozylacji, ang. *ADP-ribosylation factor 6*) (HAINES I WSP. 2014). Powyższe dane mogą świadczyć o występowaniu dodatkowych mechanizmów adaptacyjnych w komórkach nowotworowych takich jak mutacje w białku Ras czy w RTK, które uniemożliwiają białku p66Shc pełnienie funkcji negatywnego regulatora proliferacji, a tym samym podkreślają konieczność przeprowadzenia dodatkowych badań. MA I WSP. (2010) podkreślają, chociażby potrzebę zbadania bezpośredniego wpływu białka p66Shc na białko Ras.

### **5.2.1. Wpływ zmiany poziomu białka p66Shc na poziom RFT i status ochrony antyoksydacyjnej komórek klonów linii MDA-MB-231 oraz MCF-7**

W następnej kolejności, postanowiłam zbadać, jak różny poziom p66Shc wpłynie na prooksydacyjną ścieżkę białka p66Shc związaną z jego fosforylacją w komórkach raka sutka. Analiza prooksydacyjnej ścieżki sygnalizacyjnej białka p66Shc w klonach linii MDA-MB-231 nie wykazała znaczących różnic w poziomie analizowanych białek, które w niej uczestniczą. Poziom takich białek jak: PKC $\beta$ , jej formy ufosforylowanej w reszcie Ser660, PIN1 oraz PP2A jest zbliżony we wszystkich klonach linii MDA-MB-231 cechujących się odmiennym poziomem białka p66Shc (ryc. 24). Z kolei, różnice są widoczne w przypadku klonów linii MCF-7. Bowiem w przypadku fosforylowanej formy kinazy białkowej C $\beta$  (Ser660-PKC $\beta$ ) zaobserwowałam podwyższony poziom tego białka w klonie p66Shc KO linii MCF-7 (ryc. 25). Ponadto, w tym samym klonie zanotowałam obniżony poziom fosfatazy PP2A w stosunku do pozostałych klonów z wprowadzonymi modyfikacjami genetycznymi ( $\uparrow$  p66Shc oraz  $\uparrow$  mut-Ser36-p66Shc). W przypadku linii MCF-7 wyniki dla ufosforylowanej formy p66Shc nie zostały pokazane ze względu na i tak już bardzo niski poziom endogennego białka p66Shc. Wydawać by się mogło, że zwłaszcza w klonach z podwyższonym poziomem białka p66Shc ( $\uparrow$  p66Shc) obserwować będę zmiany w poziomie analizowanych białek prooksydacyjnej ścieżki sygnalizacyjnej p66Shc, gdzie obserwuje bardzo znaczące podwyższenie fosforylacji w reszcie Ser36 białka p66Shc, która jest kluczowa dla funkcji związanych z odpowiedzią komórki na stres oksydacyjny. Co więcej, w żadnym z klonów  $\uparrow$  p66Shc badanych linii MDA-MB-231 oraz MCF-7 nie zaobserwowałam wzrostu poziomu kinazy białkowej C $\beta$  (PKC $\beta$  bądź Ser660-PKC $\beta$ ). Wspominam o tym dlatego, że PINTON I

wsp. (2007) udowodnili wyraźną korelację między zależną od PKC $\beta$  fosforylacją białka p66Shc w Ser36 a wczesną odpowiedzią mitochondrialną na bodziec oksydacyjny.

W związku z tym, zbadalam w poszczególnych klonach obu linii nowotworowych względny poziom RFT (głównie w postaci H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) jak i obu anionorodników ponadtlennokowych. Biorąc pod uwagę wprowadzone zmiany poziomu p66Shc w analizowanych klonach spodziewalam się uzyskać najwyższy poziom RFT odpowiednio w klonach z podwyższonym poziomem p66Shc ( $\uparrow$  p66Shc). Wiadomo, że białko p66Shc może zwiększać poziom RFT na drodze trzech różnych mechanizmów, które zostały opisane w rozdziale 1.5.1. Niemniej jednak, w swej pracy doktorskiej obserwuje wynik dokładnie odwrotny, do tego którego się spodziewalam. Mianowicie, największe zmiany w przypadku klonów linii MDA-MB-231 (ze względnie wyższym poziomem p66Shc) obserwuje w klonie z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (p66Shc KO) zamiast w klonie z podwyższonym poziomem p66Shc ( $\uparrow$  p66Shc) (ryc. 26). Klon ten pomimo braku białka p66Shc wykazuje najwyższy poziom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w stosunku do pozostałych klonów. Z kolei, poziom cyt.O<sub>2</sub><sup>-</sup> w tym klonie jest najniższy. W miarę podobną zależność dla cyt.O<sub>2</sub><sup>-</sup> obserwuje dla klonu p66Shc KO linii MCF-7 (ryc. 27). Jest to wynik odmienny od zaprezentowanego w pracy MILLER I WSP. (2019) w badaniach prowadzonych nad rakiem prostaty. Bowiem w komórkach LNCaP-AI (AI- niezależnych od androgenów) wykazujących brak białka p66Shc (shRNA p66Shc) zaobserwowali 40% spadek poziomu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ponadto, zaobserwowali oni wzrost poziomu O<sub>2</sub><sup>-</sup> w mitochondriach komórek LNCaP-AI z podniesionym poziomem białka p66Shc, czyli tam gdzie białko p66Shc jest często odnajdowane w warunkach stresu oksydacyjnego. W analizowanych przeze mnie klonach MDA-MB-231 nie zauważyłam zmian w poziomie mt.O<sub>2</sub><sup>-</sup> (ryc. 26). Z kolei, zaobserwowałam spadek jego poziomu w klonie  $\uparrow$  p66Shc linii MCF-7 w stosunku do kontroli (ryc. 27). Rozbieżność w uzyskanych wynikach można tłumaczyć po pierwsze zastosowaniem odmiennnej techniki uzyskania nokautu białka p66Shc, po drugie odmiennym typem nowotworu czy po trzecie faktem, że obserwowany spadek w poziomie RFT stwierdzono w komórkach raka prostaty niezależnych od hormonów steroidowych – androgenów. Wiadomo natomiast, że białko p66Shc może wykazywać tzw. steroidozależność (HENDERSON & FEIGELSON 2000; ALAM I WSP. 2009), co może mieć znaczenie dla otrzymanych wyników. Należy zwrócić uwagę, że w swoich badaniach wykorzystywałam klon ze zmutowaną w reszcie Ser36 formą białka p66Shc, w którym oczekiwałam uzyskać stłumienie prooksydacyjnej funkcji p66Shc. Niestety nie udało mi się zaobserwować takiej zależności. LEWIS I WSP. (2020) również sugerują, że wykorzystanie białka p66Shc

pozbawionego możliwości fosforylacji w Ser36, spowodowało nasilenie migracji komórek raka sutka i powodowanie przerzutów niezależnie od jego zdolności do stymulowania mitochondrialnej produkcji RFT.

Poziom reaktywnych form tlenu w dużej mierze zależy także od wydolności ochrony antyoksydacyjnej. Co ciekawe, w przypadku klonów linii MDA-MB-231 nie odnotowałam istotnych statystycznie różnic w poziomie żadnego z badanych enzymów antyoksydacyjnych (ryc. 28). Niezmieniony poziom SOD1 widoczny w klonie p66Shc KO linii MDA-MB-231 może częściowo tłumaczyć wzrost poziomu cyt.O<sub>2</sub><sup>•</sup>. Z kolei, niewielkie obniżenie poziomu reduktazy glutationowej oraz katalazy w klonie p66Shc KO może również częściowo wyjaśniać podwyższony w nim poziom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. W przypadku klonu p66Shc KO linii MCF-7, największe zmiany obserwuje się w poziomie reduktazy glutationowej oraz katalazy (ryc. 29). Poziom GR jest znacząco obniżony w klonie p66Shc KO zaś katalazy podwyższony. Dodatkowo, przeprowadzona analiza porównawcza spektrometrii mas enzymów antyoksydacyjnych pozwoliła dokładniej przyjrzeć się systemowi ochrony antyoksydacyjnej w badanych klonach linii MDA-MB-231 i MCF-7 oraz oznaczyć poziom większej liczby enzymów antyoksydacyjnych (ryc. 30A, B). Na szczególną uwagę zasługuje klon p66Shc KO linii MCF-7, gdzie widoczne jest podwyższenie poziomu licznych enzymów antyoksydacyjnych zawierających domenę wiążącą tioredoksyny (ryc. 30B). Tioredoksyna jest zaliczana do donorów elektronów, a tym samym przeciwutleniaczy – „strażników” wewnątrzkomórkowego stanu redoks. Ponadto, najbardziej podwyższony jest poziom enzymu katalazy w klonie p66Shc KO linii MCF-7 co potwierdza wynik uzyskany metodą Western Blot. Zaobserwowałam również podwyższony poziom takich enzymów jak: reduktazy tioredoksyny (TXNRD1) oraz peroksyredoksyny (PRDX1 oraz PRDX5). Z kolei, klony linii MDA-MB-231 cechuje raczej wyrównany poziom badanych enzymów antyoksydacyjnych, za wyjątkiem szczególnie obniżonego poziomu SOD1 w klonie ze zmutowaną resztą Ser36 białka p66Shc (↑ mut-Ser36-p66Shc) (ryc. 30A). Zaskakującym jest fakt, iż nie zaobserwowałam tego w analizie Western Blot, co może wynikać ze zdecydowanie mniejszej dokładności tej metody. Niezwykle ciekawe, a zarazem intrygujące są dane prezentowane przez grupę MIYAZAWA & TSUJI (2014), którzy dowodzą niejako nowej roli białka p66Shc jako przeciwutleniacza oraz białka szczególnie istotnego w różnicowaniu się ludzkich komórek erytroleukemicznych K562. Według nich transkrypcja białka p66Shc (jako jedynej izofory ShcA) jest aktywowana przez szlak odpowiedzi antyoksydacyjnej – ARE (sekwencje elementów odpowiedzi antyoksydacyjnej zlokalizowane na niektórych genach) związanej z czynnikiem transkrypcyjnym Nrf2 (ang. *Nuclear factor erythroid 2-related factor*

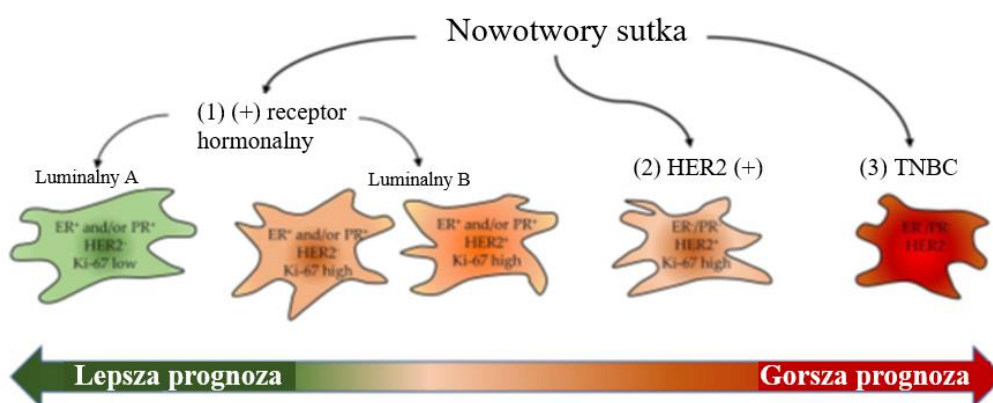
2). Hemina jest potencjalnym aktywatorem ścieżki Nrf2-ARE prowadzącym do aktywacji transkrypcyjnej ferrytyny i innych regulowanych przez ARE genów antyoksydacyjnych (MIYAZAWA & TSUJI 2014). Autorzy badań dowiedli, że komórki K562 pozbawione białka p66Shc traktowane heminą cechują się nie tylko zwiększoną produkcją RFT, lecz także podwyższonym poziomem karbonylowanych białek. Biorąc pod uwagę powyższe dane jak również różnice w poziomie niektórych RFT obserwowane w badanych klonach linii MDA-MB-231 oraz MCF-7, sprawdziłam poziom uszkodzeń oksydacyjnych białek. Jednakże, przeprowadzone przeze mnie badania karbonylacji białek nie ujawniły uszkodzeń oksydacyjnych w żadnym z badanych klonów, zarówno linii MDA-MB-231 jak i MCF-7 (ryc. 31).

### **5.2.2. Wpływ zmiany poziomu białka p66Shc na parametry bioenergetyczne komórek klonów linii MDA-MB-231 oraz MCF-7**

Mimo, że Otto Warburg zasugerował, iż komórki nowotworowe mają dysfunkcyjne mitochondria i że uszkodzenie mitochondriów może być jedną z przyczyn nowotworu, coraz to nowsze badania metabolizmu nowotworów wskazują, że to jednak funkcjonalne mitochondria są niezbędne dla przeżycia komórek nowotworowych. W rzeczywistości większość komórek nowotworowych nie tylko ma w pełni funkcjonalne mitochondria, ale także wykorzystuje oddychanie mitochondrialne do promowania wzrostu i progresji guza. Pod tym względem komórki nowotworowe nie dezaktywują mitochondrialnego metabolizmu energetycznego, ale raczej zmieniają mitochondrialny stan bioenergetyczny i biosyntetyczny (AVAGLIANO I WSP. 2019). Ponadto, mając na uwadze doniesienia literaturowe świadczące o zaangażowaniu białka p66Shc w regulację metabolizmu energetycznego mitochondriów (NEMOTO & FINKIEL 2002; GIORGIO I WSP. 2005; SOLIMAN I WSP. 2014), chciałam zweryfikować w jakim stopniu zmiana poziomu białka p66Shc będzie miała wpływ na parametry bioenergetyczne komórek klonów linii MDA-MB-231 oraz MCF-7. Potencjał na wewnętrznej błonie mitochondrialnej jest jednym z kluczowych wskaźników aktywności mitochondriów i fosforylacji oksydacyjnej. Przeprowadzona przeze mnie analiza mt.  $\Delta\Psi$  w komórkach klonów linii MDA-MB-231 oraz MCF-7 uwidoczniała dość ciekawą zależność. Otóż, w przypadku obu analizowanych linii nowotworowych najistotniejsze zmiany odnotowałam w klonie z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (p66Shc KO) (ryc. 32A, B). Zaskakującym jest jednak fakt, że w tym samym klonie (p66Shc KO), ale w różnych liniach raka sutka otrzymałam całkowicie przeciwny wynik. To znaczy, klon

p66Shc KO linii MDA-MB-231 charakteryzuje się znaczącym obniżeniem mt.  $\Delta\Psi$  (ryc. 32A). Z kolei, ten sam klon, ale linii MCF-7 cechuje istotne podwyższenie potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej (ryc. 32B). Odwrotny efekt, który uzyskałam może wskazywać na poruszane już wcześniej różnice w typie badanego raka sutka. Linia MDA-MB-231 jest linią o typie bazalno-podobnym, zaś MCF-7 zaliczana jest do typu luminalnego. Co więcej, jak już zostało wspomniane AVAGLIANO I WSP. (2019) podkreślają bardziej glikolityczny „charakter” linii MDA-MB-231 w porównaniu z MCF-7, co także może mieć wpływ na uzyskany przeze mnie wynik. Tym samym otrzymane dane bezwzględnie wskazują, iż zmiana poziomu białka p66Shc w klonach poszczególnych linii raka sutka nie pozostaje bez wpływu na bioenergetykę mitochondriów. Tak więc, postanowiłam głębiej przeanalizować możliwe zmiany w bioenergetyce mitochondriów w klonach obu linii raka sutka, dokonując pomiarów szybkości zużycia tlenu przez mitochondrialny łańcuch oddechowy. Na podstawie przeanalizowanych parametrów takich jak oddychanie w stanie podstawowym, „wyciek” protonów oraz maksymalnej szybkości zużycia tlenu mogę stwierdzić, że linia MDA-MB-231 charakteryzuje się większą ilością zmian w analizowanych parametrach mitochondrialnych w porównaniu do klonów linii MCF-7 (ryc. 33, 34). Na podkreślenie zasługuje fakt, że klon linii MDA-MB-231 z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (p66Shc KO) wykazuje obniżenie wszystkich badanych parametrów w porównaniu do pozostałych klonów tej linii. Świadczyć to może jednocześnie o znaczącym obniżeniu wydajności syntezy ATP na drodze fosforylacji oksydacyjnej, a tym samym zmniejszenia jej „udziału” w oddychaniu komórkowym w klonie wykazującym brak białka p66Shc. SOLIMAN I WSP. (2014), wykorzystując technikę spektrometrii mas, odkryli, że p66Shc hamuje metabolizm glukozy. Bowiem obniżenie poziomu p66Shc spowodowało zwiększenie udziału glikolizy co jest charakterystyczne dla przemiany metabolicznej zwanej efektem Warburga (SOLIMAN I WSP. 2014). Co ciekawe, w przeprowadzonej przeze mnie analizie poziomu poszczególnych enzymów biorących udział w procesie glikolizy, wykazałam że to właśnie klon z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (p66Shc KO) charakteryzuje się podwyższeniem poziomu zdecydowanej większości enzymów glikolitycznych w obu badanych liniach MDA-MB-231 oraz MCF-7 (ryc. 36A, B). Biorąc pod uwagę wyniki prezentowane przez SOLIMAN I WSP. (2014) jak również dane uzyskane w ramach niniejszej pracy doktorskiej można wnioskować, że „brak” białka p66Shc w komórkach nowotworowych może przyczyniać się do wykształcenia bardziej glikolitycznego fenotypu metabolicznego. Dodatkowo, czynnikiem za tym przemawiającym może być fakt, że w przypadku klonów linii MCF-7, to klon p66Shc KO także charakteryzuje

się znaczącym obniżeniem oddychania w stanie podstawowym (ryc. 34). Biorąc pod uwagę podwyższony potencjał na wewnętrznej błonie mitochondrialnej w stanie podstawowym przy obniżonej szybkości oddychania, można wskazać na duże sprzężenie mitochondriów w klonie p66Shc KO linii MCF-7. Wskazywać to może na to, iż zmiana poziomu (a dokładniej wyciszenie genu kodującego białko p66Shc), nie ma aż tak dużego wpływu na klony linii MCF-7 jak miało to miejsce w przypadku linii MDA-MB-231. Warto podkreślić, że podtyp potrójnie ujemnego raka sutka (TNBC, ang. *Triple negative breast cancer*) jest jednym z najbardziej agresywnych nowotworów sutka, z najgorszym rokowaniem i najmniejszą celowością terapeutyczną, a jednocześnie z większym prawdopodobieństwem rozprzestrzeniania się i nawrotów (LI I WSP. 2017; REDA I WSP. 2019) (ryc. 66). Transformacje nowotworowe głęboko zmieniają metabolizm komórkowy w wyniku zwiększenia zużycia glukozy poprzez glikolizę w celu wsparcia onkogenezy (REDA I WSP. 2019). Autorzy ci wskazują, że w porównaniu z komórkami ER-dodatnimi (MCF-7), komórki TNBC (MBA-MD-231) bardziej polegają na glikolizie, potwierdzając w ten sposób zasadność celowania w te komórki np. inhibitorami glikolitycznymi.



**Ryc. 66** Trzy główne typy raka sutka na podstawie ich właściwości immunohistochemicznych oraz względnych prognoz przeżycia (na podstawie AVAGLIANO I WSP. 2019)

ANDERSON I WSP. (2018) w swej pracy podkreślają również niezwykle istotną rolę zmian mających miejsce w cyklu Krebsa w komórkach nowotworowych. Mimo wcześniejszych przesłanek świadczących o tym, jakoby komórki nowotworowe miały omijać cykl TCA i wykorzystywać proces glikolizy tlenowej jako głównego źródła ATP, obecnie wiadomo, że metabolizm niektórych komórek nowotworowych może w dużym stopniu zależeć od cyklu Krebsa (ANDERSON I WSP. 2018). Dane literaturowe wskazują, że komórki nowotworowe bardzo często charakteryzują się zmianami w poziomie i aktywności enzymów

cyklu Krebsa, które prowadzą do charakterystycznych zmian metabolicznych i epigenetycznych, które są skorelowane z transformacją i progresją choroby nowotworowej (ANDERSON I WSP. 2018). Przeprowadzona przeze mnie analiza poziomu enzymów biorących udział w cyklu Krebsa pokazała, że klon z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc linii MDA-MB-231 (potrójnie ujemnego i bardziej agresywnego podtypu raka sutka) charakteryzuje się obniżeniem poziomu większości analizowanych enzymów cyklu Krebsa (ryc. 35A). Co ciekawe, ANDERSON I WSP. (2018) wskazują, że komórki nowotworowe z mutacjami w *IDH* stają się mniej wrażliwe (bądź niewrażliwe) na leczenie z zastosowaniem „zmodyfikowanych” inhibitorów IDH. W klonie p66Shc KO linii MDA-MB-231 obserwuje się obniżenie tego enzymu.

Metabolizm tlenowy w dużej mierze zależy od sprawności funkcjonowania mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Badania przedstawione przez OWENS I WSP. (2011) dostarczają bezpośrednich dowodów na udział dysfunkcyjnych kompleksów mitochondrialnego łańcucha oddechowego OXPHOS w powstawaniu nowotworów sutka. Przeprowadzona przeze mnie analiza profilu OXPHOS w poszczególnych klonach zarówno linii MDA-MB-231 jak i MCF-7 niejako potwierdza ten fakt. W przypadku klonu p66Shc KO linii MDA-MB-231, zarówno wyniki uzyskane metodą Western Blot jak i dużo bardziej precyzyjną techniką spektrometrii mas uwidocznily zmiany w postaci znaczącego spadku w poziomie podjednostek wchodzących w skład wszystkich kompleksów OXPHOS (I, II, III oraz IV) za wyjątkiem syntazy ATP (ryc. 37, 38). Stanowi to niejako wytłumaczenie tego co zaobserwowałam w przypadku parametrów mitochondrialnych w klonie p66Shc KO linii MDA-MB-231 (ryc. 33). Aby określić defekt fosforylacji oksydacyjnej w komórkach raka sutka, grupa badawcza OWENS I WSP. (2011) dokonała analizy zmian w ekspresji genów związanych z kompleksami OXPHOS. Zmierzyli oni również aktywność enzymatyczną różnych kompleksów. Do analizy wykorzystano linie komórkowe raka sutka charakteryzujące się odmiennym poziomem złośliwości w tym m.in. MCF-7 oraz MDA-MB-231 (OWENS I WSP. 2011). Według autorów, aktywność kompleksów III OXPHOS była znacząco obniżona w liniach komórek przerzutowego i agresywnego raka sutka (MDA-MB-231). Dane przedstawione w tym badaniu sugerują występowanie korelacji między defektami OXPHOS a nasileniem progresji raka sutka. Bowiern agresywna linia komórkowa przerzutowego raka sutka – MDA-MB-231 zawierała najwięcej aberracji w aktywności OXPHOS. Aktywność kompleksu III nie została praktycznie wykryta, a aktywność kompleksu V była zmniejszona do 10% w linii MDA-MB-231 (OWENS I WSP. 2011). Znajduje to odzwierciedlenie również w moich badaniach, w których klony linii MCF-7 (mniej agresywnego typu raka sutka)

cechowały się mniej znaczącymi zmianami w porównaniu z klonami linii MDA-MB-231 (ryc. 39, 40). Ponownie chciałabym podkreślić, że klon p66Shc KO linii MDA-MB-231 charakteryzuje się największym obniżeniem poziomu podjednostek wchodzących w skład głównie kompleksów I oraz III łańcucha oddechowego. Uzyskane wyniki wskazują, że pozbawienie komórek białka p66Shc w istotny sposób wpływa na parametry mitochondrialne komórek raka sutka linii MDA-MB-231. Dodatkowo, dane uzyskane przez OWENS I WSP. (2011) sugerują, że nieprawidłowo funkcjonujący kompleks III bierze udział w rozwoju raka sutka, a agresywność tego rodzaju nowotworu może być związana z rodzajem i naturą wad powstałych w profilu OXPHOS.

### **5.3. Ocena odpowiedzi komórek klonów linii MDA-MB-231 różniących się poziomem białka p66Shc na traktowanie dokсорubicyną**

Linia nowotworowa MDA-MB-231 jest jedną z najczęściej badanych linii raka sutka stosowaną w badaniach *in vitro*. Jest ona estrogenoniezależną linią komórkową, potrójnie ujemną (tzw. *triple negative*) pod względem receptorów dla estrogenów (ER-), progesteronu (PR-) oraz ludzkiego czynnika wzrostu (HER2-). Czyni to linię MDA-MB-231 idealnym modelem/narzędziem w badaniach doświadczalnych, mających na celu opracowanie skutecznych leków czy określenie wpływu danego chemioterapeutyka na badany parametr czy białko itp. W związku z tym, do oceny odpowiedzi komórek nowotworowych raka sutka na traktowanie chemioterapeutykiem dokсорubicyną wykorzystałam wyłącznie uzyskane klony różniące się poziomem białka p66Shc linii MDA-MB-231. Ponadto, dodatkowym czynnikiem decydującym o wyborze klonów linii MDA-MB-231 do dalszych badań jest fakt, że klony linii MDA-MB-231 (zwłaszcza klon p66Shc KO) wykazują zdecydowanie więcej zmian w przeanalizowanych parametrach bioenergetycznych w porównaniu do klonów linii MCF-7. Ponadto, znaczący potencjał metastatyczny linii MDA-MB-231 jak i jej wysoki stopień złośliwości również przyczyniły się do wyboru tej właśnie linii.

Strategie terapeutyczne najczęściej stosowane w przypadku potrójnie ujemnych nowotworów sutka oparte są w głównej mierze na chemioterapeutykach z grupy antracyklin (ALKARAKI I WSP. 2020). Do grupy tej zalicza się m.in. dokсорubicynę, która jest powszechnie uznawanym chemioterapeutykiem charakteryzującym się wysoką zdolnością eliminowania szybko dzielących się komórek i zapewniającym ogromny potencjał terapeutyczny. Jej głównym ograniczeniem jest toksyczność dla komórek nienowotworowych w organizmie człowieka. Powodem, dla którego dokonałam wyboru DOX jest jeden z mechanizmów jej



działania. Oprócz możliwości interkalowania pomiędzy zasady podwójnej helisy DNA, dokсорubicyna zwiększa produkcję wolnych rodników oraz powoduje powstawanie zaburzeń w bioenergetyce mitochondriów, wywołując mitochondrialny stres oksydacyjny (MUHAMMAD I WSP. 2021). Wykorzystanie techniki SRB do oceny cytotoksyczności badanego chemioterapeutyka było podyktowane niemożnością zastosowania czulszej i bardziej dokładnej metody z wykorzystaniem odczynnika XTT powszechnie stosowanej do tego celu (NOWAK I WSP. 2018). Technika ta wykorzystuje pomiar aktywności mitochondrialnych dehydrogenaz. Jednakże, ze względu na zmiany jakie zaobserwowałam chociażby w poziomie podjednostek kompleksu II w badanych klonach linii MDA-MB-231 uniemożliwiło mi zastosowanie tej techniki w moich badaniach. Znaczące podwyższenie podjednostek dehydrogenazy bursztynianowej obserwowane np. w klonie z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (p66Shc KO) w znaczący sposób zakłócałoby uzyskanie prawidłowych wyników z wykorzystaniem techniki opartej na odczynniku XTT.

### **5.3.1. Wpływ zmiany poziomu białka p66Shc na poziom RFT komórek klonów linii MDA-MB-231 traktowanych dokсорubicyną**

Badania przeprowadzone przez TRINEI I WSP. (2002) oraz ORSINI I WSP. (2004) wskazują, że komórki (MEF) pozbawione białka p66Shc charakteryzuje m.in. zmniejszona akumulacja endogennego markera stresu oksydacyjnego 8-okso-guanozyny. Podobną zależność zaobserwowano w przypadku myszy pozbawionych białka p66Shc. Z przeprowadzonych przeze mnie badań wynika z kolei, że klon z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (p66Shc KO) linii MDA-MB-231 cechuje się podwyższonym poziomem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ryc. 56). Biorąc pod uwagę jeden z mechanizmów działania dokсорubicyny (m.in. zwiększenie produkcji RFT) jak również wskazywane zaangażowanie białka p66Shc w prooksydacyjną ścieżkę sygnalizacyjną, sprawdziłam jak traktowanie komórek klonów linii MDA-MB-231 może wpłynąć na status fosforylacji białka p66Shc w unikalnej reszcie Ser36 oraz poziom pozostałych białek uczestniczących w tej ścieżce. Jak można zauważyć, z ryciny 43A, wynika, że traktowanie komórek raka sutka DOX skutkowało podwyższeniem poziomu fosforylacji białka p66Shc w Ser36 (w porównaniu z komórkami nietraktowanymi) w klonie z podwyższonym poziomem białka p66Shc (↑ p66Shc). Wyniki uzyskane przez SAKAO & SINGH (2012) świadczą o zwiększonym poziomie ufosforylowanego w Ser36 białka p66Shc w komórkach linii MDA-MB-231, co prawda traktowanych inną substancją – D,L-sulforaphane (SFN), która indukuje w komórkach proces apoptozy. Zaskakującym wydaje się

fakt, że nie zaobserwowałam żadnych istotnych zmian w poziomie pozostałych białek uczestniczących w prooksydacyjnej ścieżce p66Shc pomiędzy komórkami (-) i (+) DOX w badanych klonach (ryc. 43A). W przypadku badań SAKAO & SINGH (2012), zauważono spadek poziomu izomerazy PIN1 w komórkach raka sutka zarówno linii MDA-MB-231 jak i MCF-7 w odpowiedzi na traktowanie SFN. Ponadto, wykazano ścisłą zależność fosforylacji w Ser36 od kinazy białkowej C $\beta$ . Zastosowanie inhibitora PKC $\beta$  w znaczący sposób hamowało zależną od SFN fosforylację białka p66Shc w Ser36 (SAKAO & SINGH 2012). CONTE I WSP. (2015) również potwierdzili zwiększoną fosforylację Ser36 białka p66Shc zależną od czasu traktowania jak i dawki substancji, którą był resweratrol (RSV). Wykorzystali oni nienowotworowe komórki epitelialne prostaty (EPN) oraz komórki epitelialne (EPN-PKM3), które w wyniku wprowadzonych mutacji wykazywały cechy komórek nowotworu prostaty (m.in. zwiększona ruchliwość i migracja komórek, reorganizacja cytoszkieletu). Oprócz zwiększonej fosforylacji w Ser36, autorzy zaobserwowali również podwyższony poziom fosforylacji w resztach tyrozyny nie tylko białka p66Shc ale i p52Shc (CONTE I WSP. 2015). Uzyskany przeze mnie wynik podwyższenia fosforylacji w Ser36 w klonie z podwyższonym poziomem p66Shc może świadczyć o zwiększonej odpowiedzi tych komórek na stres oksydacyjny „zaindukowany” traktowaniem doksorubicyną.

Aby to sprawdzić, dokonałam analizy poziomu RFT jak również oceniłam status ochrony antyoksydacyjnej w badanych klonach nietraktowanych oraz traktowanych DOX (odpowiednio (-) oraz (+) DOX). Generalnie, traktowanie komórek poszczególnych klonów linii MDA-MB-231 DOX nieznacznie zwiększyło produkcję H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w klonach traktowanych DOX (Ryc. 56). Jest to widoczne w postaci „tendencji wzrostowej”, gdyż jedynie w klonie z podwyższonym poziomem zmutowanej w Ser36 formy białka p66Shc ( $\uparrow$  mut-Ser36-p66Shc) podwyższenie poziomu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jest istotne statystycznie w komórkach traktowanych doksorubicyną. Biorąc pod uwagę podwyższony poziom fosforylacji w Ser36 białka p66Shc w klonie  $\uparrow$  p66Shc spodziewałam się uzyskać taki wynik także dla tego klonu, czyli z podwyższonym poziomem białka p66Shc. Najwyraźniej brak funkcjonalnej Ser36 w klonie  $\uparrow$  mut-Ser36-p66Shc spowodował uruchomienie innych mechanizmów, prowadzących do podwyższenia poziomu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w odpowiedzi na traktowanie DOX. Ciekawy wydaje się również wynik uzyskany dla klonu z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc, który jako jedyny praktycznie w ogóle nie odpowiada na traktowanie doksorubicyną komórek. FURLAN I WSP. (2018) wykazali związek białka p66Shc z protoonkogenem – kinazą BRAF (ang. *Type B rapid accelerated fibrosarcoma*) w komórkach czerniaka (A375 i M238)

oraz fibroblastach NIH 3T3 z mutacją w genie *BRAF* (NIH3T3-BRAFV600E0). Kinaza BRAF wchodzi w skład szlaku sygnałowego MAPK (z którym również powiązane jest białko p66Shc) i jest kodowana przez gen *BRAF*, która bardzo często ulega mutacji w nowotworach, dając gorsze rokowania pacjentów (FURLAN I WSP. 2018). Wykazali oni, że w wyniku traktowania wspomnianych komórek izotiocyjanianem fenylu (PEITC) (indukującym produkcję RFT), onkogenny BRAF sprawia, że nie dochodzi do fosforylacji Ser36 białka p66Shc w tych komórkach. W związku z tym, aktywacja kinazy JNK1/2, która może fosforylować Ser36 (KHALID I WSP. 2016) została stłumiona. Z kolei, hamowanie JNK1/2 skutecznie hamowało produkcję RFT (FURLAN I WSP. 2018). Idąc dalej, sprawdziłam również poziom innych RFT, w tym mitochondrialnego oraz cytozolowego anionorodnika ponadtlenkowego. Poziom zarówno cyt.O<sub>2</sub><sup>•-</sup> jak i mt.O<sub>2</sub><sup>•-</sup> nie zmienił się w żadnym z badanych klonów linii MDA-MB-231 w wyniku traktowania DOX (ryc. 57). Inne wnioski zaprezentowała grupa SAKAO & SINGH (2012), która wskazuje jednak na wzrost produkcji mt.O<sub>2</sub><sup>•-</sup> związanej z białkiem p66Shc w wyniku traktowania SFN. Produkcja mt.O<sub>2</sub><sup>•-</sup> była znacząco wyższa w komórkach MEF z obecnym białkiem p66Shc w porównaniu z tymi samymi komórkami ale pozbawionymi białka p66Shc (SAKAO & SINGH 2012). Brak obserwowanych zmian zwłaszcza w poziomie mt.O<sub>2</sub><sup>•-</sup> można tłumaczyć problemami jakie napotkałam podczas jego pomiaru (ryc. 58), a które zostały szczegółowo opisane w rozdziale 4.3.6 albo zastosowaniem innego modelu komórkowego.

Niewielkie zmiany jakie zaobserwowałam w poziomie analizowanych RFT w wyniku traktowania doksorubicyną poszczególnych klonów linii MDA-MB-231 znalazły odzwierciedlenie w poziomie enzymów antyoksydacyjnych. Traktowanie komórek klonów doksorubicyną różniących się poziomem białka p66Shc nie wpłynęło w istotny sposób na poziom żadnego z badanych enzymów antyoksydacyjnych: reduktazy glutationowej, katalazy, dysmutazy ponadtlenkowej (zarówno SOD1 jak i SOD2) (ryc. 59). Co ciekawe, badania aktywności enzymatycznej SOD, katalazy oraz peroksydazy glutationowej u pacjentek (badania *in vivo*) ze zdiagnozowanym rakiem sutka leczonych DOX przedstawione przez HADI I WSP. (2021) wykazały obniżenie poziomu dysmutazy ponadtlenkowej, podczas gdy poziom zarówno katalazy jak i peroksydazy glutationowej był istotnie podwyższony (HADI I WSP. 2021). W swojej pracy również podjęłam próbę zmierzenia „aktywności”, a raczej zdolności antyoksydacyjnej (ryc. 61) mierzonej metodą zaproponowaną przez MILLER I WSP. (1993). Niemniej jednak, nie zaobserwowałam znaczących zmian w zdolności antyoksydacyjnej komórek traktowanych doksorubicyną w żadnym z badanych klonów. Ponadto, również poszczególne klony linii MDA-MB-231 nietraktowane DOX nie

wykazywały istotnych zmian. Może zastosowanie większej ilości białka podczas pomiaru wpłynęłoby na uzyskany wynik, jednakże dostępność materiału badawczego była dla mnie czynnikiem limitującym i na tej podstawie zmuszona byłam do wyboru zastosowanego stężenia białka.

### **5.3.2. Wpływ traktowania komórek klonów linii MDA-MB-231 doksorubicyną na poziom podjednostek kompleksów OXPHOS**

Jak już wielokrotnie było poruszane w niniejszej pracy doktorskiej komórki nowotworowe wykazują niezwykłą „plastyczność” jeśli chodzi o dostosowanie swojego metabolizmu do warunków otaczającego je środowiska. Dlatego, w swoich badaniach oprócz analizy wybranych parametrów bioenergetycznych przeprowadziłam również badania mające na celu określenie profilu OXPHOS w odpowiedzi na traktowanie DOX. Niestety, w żadnym z badanych klonów nie zauważyłam wpływu traktowania DOX na poziom badanych podjednostek poszczególnych kompleksów łańcucha oddechowego (ryc. 46). Warto jednak nadmienić, iż wykazano, negatywny wpływ DOX na funkcjonowanie mitochondrialnego łańcucha oddechowego, wywołującej dysfunkcję mitochondriów, które mogą skutkować „stresem energetycznym” w wyniku zakłócenia funkcjonowania łańcucha transportu elektronów (WIGNER I WSP. 2021). Niemniej jednak, podczas interpretacji uzyskanych wyników należy wziąć pod uwagę również wrażliwość raka sutka na stosowany chemioterapeutyk. Na przykład, WIGNER I WSP. (2021) w swej pracy wskazują na bardziej skuteczną ochronę antyoksydacyjną w komórkach linii MCF-7 aniżeli w komórkach MDA-MB-231 (co również jest widoczne w przeprowadzonych przeze mnie badaniach – ryc. 59A). Może się to zatem przekładać się na ich większą wrażliwość na traktowanie doksorubicyną w porównaniu z linią MDA-MB-231. Ponadto, LOVITT I WSP. (2018) również podkreślają „czynnik” oporności nowotworu (zwłaszcza nowotworów sutka) na skuteczność działania zastosowanego chemioterapeutyka. Dokładne mechanizmy powodujące oporność są nadal słabo poznane w badaniach *in vitro* z wykorzystaniem modeli komórek raka sutka (LOVITT I WSP. 2018). Zaobserwowano, że oporność na doksorubicynę była zależna od linii komórkowej, co może wskazywać na wiele mechanizmów wpływających na zachowanie komórek raka sutka w złożonych mikrośrodkach. Innym niezwykle istotnym czynnikiem może być dawka DOX zastosowana w przeprowadzonych przeze mnie eksperymentach. Mianowicie, zastosowana bardzo niska dawka 20 nM doksorubicyny mogła okazać się zbyt niska do zaindukowania zmian w poziomie podjednostek OXPHOS w odpowiedzi na

traktowanie analizowanych klonów DOX. Dla przykładu, dawki doksorubicyny zastosowane w innych badaniach z wykorzystaniem linii MDA-MB-231 to: 100 – 200 nM DOX (MALAKOUTI I WSP. 2022) oraz 0,001 $\mu$ M – 100  $\mu$ M (LOVITT I WSP. 2018).

### **5.3.3. Ocena zmian parametrów bioenergetycznych w komórkach poszczególnych klonów linii MDA-MB-231 traktowanych doksorubicyną**

W związku z tym, że depolaryzacja wewnętrznej błony mitochondrialnej może być powiązana z zaburzeniami homeostazy redoks, zbadalam potencjał na wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Traktowanie komórek DOX spowodowało istotny spadek mierzonego  $\Delta\Psi$  w klonie z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (ryc. 45). Podobny wynik zauważyłam również w klonie z podwyższonym poziomem zmutowanej w reszcie Ser36 formy białka p66Shc. Wynik ten jest jednak na pograniczu istotności statystycznej, przez co można mówić jedynie o tendencji spadkowej. Dla przykładu, badania przeprowadzone przez SAKAO I SINGH (2012) wskazują na większą oporność komórek MEF cechujących się brakiem białka p66Shc na indukowany SFN spadek potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Trzeba pamiętać, że nowotwór sutka charakteryzuje się niezwykle wysokim stopniem zmienności, który bardzo często wynika z tzw. zmienności genomowej (CAÑEDO I WSP. 2021). Skutkuje to powstawaniem różnych fenotypów raka sutka, które mogą różnić się między sobą nie tylko profilem metabolicznym, lecz także prowadzić do zróżnicowanej odpowiedzi na stosowane terapie antynowotworowe (REDA I WSP. 2019). Wskazuje się, że metabolizm mitochondrialny jak również same mitochondria stają się być kluczowymi „graczami” nie tylko w biologii nowotworów lecz również ich rozwoju, progresji czy nabywaniu cech do metastazy oraz odpowiedzi na stosowane chemioterapeutyki (GASPARRE & SONVEAUX 2017). Aby zbadać różnice funkcjonalne pomiędzy badanymi klonami linii MDA-MB-231 wykazującymi odmienny poziom białka p66Shc, wykorzystałam analizator płynów zewnątrzkomórkowych Seahorse XFe96 w celu dokonania profilowania oddychania mitochondrialnego oraz glikolizy. Praca badawcza prezentowana przez REDA I WSP. (2019) dostarcza danych świadczących o bardziej glikolitycznym „charakterze” linii raka sutka MDA-MB-231 w porównaniu do linii MCF-7. Ponadto, sugeruje się, że obranie glikolizy jako jednego z celów dla stosowanych terapii zaczyna być w ostatnim czasie realną strategią zwalczania szerokiego zakresu nowotworów (LI I WSP. 2016). Zgodnie z tym, postanowiłam sprawdzić czy różnice w mechanizmach metabolicznych mogą rzucić nowe światło na różnice między badanymi klonami (z różnym poziomem białka p66Shc), zwłaszcza w odpowiedzi na

traktowanie DOX. Z przeprowadzonej analizy profilu zakwaszenia zewnątrzkomórkowego PER wynika, że w przypadku zmiany poziomu białka p66Shc, klon: p66Sh KO oraz  $\uparrow$  mut-Ser36-p66Shc charakteryzują się spadkiem w ogólnym przebiegu krzywej PER (ryc. 47A) w porównaniu do pozostałych klonów. Traktowanie komórek klonów doskorubicyną spowodowało wzrost zakwaszenia zewnątrzkomórkowego jedynie w klonie kontrolnym (ryc. 47B). Różnice w przebiegu krzywej PER pomiędzy komórkami klonów (-) DOX oraz (+) DOX lepiej prezentuje rycina 48. Ponadto, biorąc pod uwagę, że na parametr mierzonego zakwaszenia zewnątrzkomórkowego PER składają się również  $H^+$  powstające na drodze oddychania mitochondrialnego, na rycinie 49A i 49B przedstawiłam parametr *glycoPER*. Jest on ściśle skorelowany z tempem zewnątrzkomórkowej produkcji mleczanu (obejmującej wyłącznie proces glikolizy). Warto zauważyć, że klon z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc cechuje niemalże identyczny przebieg zarówno *glycoPER* jak i *całkowitego PER*. Może to świadczy o znikomym udziale fosforylacji oksydacyjnej w procesie produkcji ATP w komórkach tego klonu (co znajdowało także potwierdzenie w poziomie podjednostek kompleksów łańcucha oddechowego ryc. 46A). Potwierdzeniem powyższych obserwacji może być inny parametr: *basal PER*, w którym co prawda nie zauważyłam istotnych statycznie różnic, jednak widać wyraźną tendencję świadczącą o najwyższym poziomie tego parametru w klonie p66Shc KO (ryc. 50). Praca przeglądowa JIANG (2017) dostarcza licznych przykładów świadczących o tym, że jednym ze skutków przeprogramowania metabolizmu glukozy przez komórki nowotworowe jest właśnie produkcja mleczanu, który zmieniając pH mikrośrodowiska guza w kierunku kwasowości może wpływać na ruchliwość komórek danego nowotworu. Jak już było wspomniane linia MDA-MB-231 charakteryzuje się wysokim stopniem metastatyczności, a co za tym idzie ruchliwości komórek. Obserwowane wysokie zakwaszenie zewnątrzkomórkowe w klonie p66Shc KO może przyczynić się do zwiększenia ruchliwości badanych komórek. Zwłaszcza, że w trakcie hodowli komórkowej komórek tego klonu zauważyłam większą ich wrażliwość na odklejanie, co zresztą było jednym z głównych problemów jakie napotkałam podczas pomiarów mitochondrialnego anionorodnika. Z pewnością wymaga to jednak przeprowadzenia dodatkowych badań.

Następnie, skupiłam się na pomiarze kolejnych parametrów określających proces glikolizy w komórkach analizowanych klonów linii MDA-MB-231. W przypadku parametru *basal glycolysis* ponownie obserwuje się wyłącznie tendencję wzrostową w klonie p66Shc KO zarówno nietraktowanych jak i traktowanych DOX (ryc. 51A). Jeszcze bardziej utwierdza to fakt, że klon z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc wykazuje najbardziej

glikolityczny profil spośród wszystkich badanych klonów linii MDA-MB-231. Znajduje to swoje odbicie w parametrze *compensatory glycolysis* (czyli szybkości glikolizy po zahamowaniu mitochondrialnego łańcucha oddechowego), w którym wspomniany klon wykazuje najmniejszą zmianę szybkości glikolizy (również w klonach traktowanych DOX) (ryc. 51B). Wpływ na to może mieć również fakt, że wspomniany klon p66Shc KO charakteryzuje się najniższym poziomem oddychania w stanie podstawowym (*basal mitochondrial respiration* – Ryc. 54), co jednocześnie przekłada się na mniejszy wzrost aktywności glikolitycznej w przypadku braku syntezy ATP w mitochondriach (parametr *compensatory glycolysis*). Parametr *post 2-DG acidification* (parametr mierzony po dodaniu 2-DG) również pokazuje znaczący udział glikolizy w badanych klonach linii MDA-MB-231 (ryc. 52). Na szczególną uwagę zasługuje jednak parametr *% PER from glycolysis* (ryc. 53A). Pokazują on istotne statystycznie różnice świadczące o znacznym udziale glikolizy w klonie z wyciszoną ekspresją genu – p66Shc KO linii MDA-MB-231 w stosunku do wszystkich pozostałych klonów tej linii. Wykresy kołowe (ryc. 53B) pokazują niemalże bliski 100% udział glikolizy w oddychaniu komórek klonu p66Shc KO. Wystarczy spojrzeć na parametr oddychania mitochondrialnego (ryc. 54), z którego wynika, że klon p66Shc KO charakteryzuje się najniższym poziomem szybkości zużycia tlenu w stanie podstawowym. Co więcej, parametr ten w przypadku komórek pozbawionych białka p66Shc różni się znacząco od wszystkich innych analizowanych klonów linii MDA-MB-231: z podwyższonym poziomem białka p66Shc, podwyższonym poziomem zmutowanej w reszcie Ser36 formy oraz klonu kontrolnego. Świadczyć to może o znaczącym wpływie zmiany poziomu białka p66Shc na szybkość zużycia tlenu w stanie podstawowym. Istnieją doniesienia, które wiążą zwiększony udział procesu glikolizy ze zwiększonym poziomem RFT (YU I WSP. 2011; MOVAHED I WSP. 2019). Jest to bardzo dobrze widoczne również w przypadku przeprowadzonych przeze mnie badań. Mianowicie, zwiększony poziom parametrów związanych z procesem glikolizy (*basal PER*, *basal glycolysis* itp.) w klonie p66Shc KO koreluje ze zwiększonym poziomem RFT (ryc. 56). Pojawia się jednak pytanie dotyczące przyczyny podwyższonego poziomu RFT w klonie z wyciszoną ekspresją genu kodującego p66Shc, przy znacząco ograniczonej fosforylacji oksydacyjnej. Dowodzić to może występowaniu „nie-mitochondrialnych” źródeł powstawania RFT w tym klonie, co wymaga przeprowadzenia dodatkowych badań. Nie-mitochondrialne zużycie tlenu (zużycie tlenu na powierzchni komórki) za pośrednictwem transportu elektronów przez błonę transplazmatyczną (t-PMET, ang. *Trans-plasma membrane electron-transport*) zostało udokumentowane w glikolitycznym raku sutka, do którego zaliczyć można m.in. linię MDA-

MB-231 określaną jako potrójnie ujemną. Zasugerowano, że wspomaga to metabolizm glikolityczny poprzez ponowne utlenianie NADH do NAD<sup>+</sup> (HERST & BERRIDGE 2007). Ponadto, REDA I WSP. (2019) doszli do wniosku, że podstawowa aktywność oddechowa w komórkach MDA-MB-231 była znacznie niższa niż w linii MCF7. Jednakże, autorzy wskazują również na liczne rozbieżności mające miejsce w komórkach linii MDA-MB-231. Według REDA I WSP. (2019) mitochondria komórek MDA-MB-231 (pomimo bardziej glikolitycznego profilu) były bardziej sprzężone (charakteryzowały się mniejszym wyciekami protonów) i miały znacznie większą pojemność oddechową niż komórki linii MCF-7 reagujące na hormony. Należy zwrócić uwagę, iż w żadnym z badanych parametrów, określających aktywność glikolityczną jak również oddychanie tlenowe, nie zauważyłam zmian w obrębie danego klonu pomiędzy komórkami nietraktowanymi oraz traktowanymi DOX. Świadczy to najprawdopodobniej o zastosowaniu zbyt niskiej dawki doksorubicyny (20 nM), o którym wspomniałam nieco wyżej. W ocenie cytotoksyczności kierowałam się zasadą, doboru stężenia DOX, które powoduje 10% spadek w żywotności komórek. Niemniej jednak, ograniczenia zastosowanej techniki wykorzystującej barwnik sulforodaminę B mogły spowodować pojawienie się czynników zaburzających uzyskany wynik a tym samym błędne (zbyt niskie) dobranie stężenia DOX.

W ramach podsumowania przeanalizowanych parametrów bioenergetycznych klonów linii MDA-MB-231 dokonałam oceny fenotypu metabolicznego tzw. sygnatury metabolicznej badanych klonów będących wypadkową dwóch parametrów: „*basal ECAR*” oraz „*basal OCR*” (ryc. 55). Wynika z niego, że klon p66Shc KO jest najbardziej „odstającym” od pozostałych klonem linii MDA-MB-231. Wykazuje zdecydowanie niższe zużycie tlenu w stanie podstawowym (*basal OCR*), charakteryzując się tym samym najbardziej glikolitycznym profilem metabolizmu spośród badanych klonów. Co ważne, traktowanie komórek doksorubicyną poszczególnych klonów spowodowało pogłębienie przesunięcia w kierunku wzrostu udziału glikolizy w klonie p66Shc KO (ryc. 55B, C). Z kolei, w przypadku komórek pozostałych klonów: K, ↑ p66Shc oraz ↑ mut-Ser36-p66Shc traktowanie DOX poskutkowało obniżeniem udziału OXPHOS (klony: ↑ p66Shc oraz ↑ mut-Ser36-p66Shc) oraz tylko niewielkim wzrostem udziału glikolizy (klony: K, ↑ p66Shc).

Pomimo, iż „fenotypy metaboliczne” komórek nowotworowych wciąż wzbudzają wiele kontrowersji, wiadomo, że mitochondria w komórkach nowotworowych pozostają jednak funkcjonalne. W związku z tym, w pierwszej kolejności postanowiłam sprawdzić jak zmiana poziomu białka p66Shc jak również traktowanie komórek doksorubicyną może wpłynąć na morfologię sieci mitochondrialnej. Jak już zostało wspomniane powyżej, komórki



linii MDA-MB-231 cechuje niższe zużycie tlenu w porównaniu z komórkami linii MCF-7 (REDA I WSP. 2019). Badania przeprowadzone przez KOIT I WSP. (2020) wskazują dodatkowo na zdecydowanie mniejszą ilość mitochondriów w komórkach linii MDA-MB-231 w porównaniu z linią MCF-7. Ilość mitochondriów mierzona była zarówno na podstawie analizy z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej jak i techniki aktywności syntazy cytrynianowej opracowanej przez grupę KOIT I WSP. (2020). Przeprowadzona przeze mnie analiza morfologii sieci mitochondrialnej również wskazuje na stosunkowo słabo rozwiniętą sieć mitochondrialną w komórkach linii MDA-MB-231 (ryc. 44). Traktowanie komórek poszczególnych klonów doksorubicyną spowodowało znaczące zwiększenie jąder komórkowych jak również rozproszenie sieci mitochondrialnej wokół jądra komórkowego. Co ciekawe, nietraktowane DOX komórki klonu p66Shc KO (wykazującego najbardziej glikolityczny fenotyp spośród badanych klonów linii MDA-MB-231) wydają się mieć najslabiej rozwiniętą sieć mitochondrialną, co może być związane z obniżoną aktywnością łańcucha oddechowego w tym klonie. Wymaga to jednak potwierdzenia z wykorzystaniem innych zaawansowanych technik pomiaru parametrów morfologicznych mitochondriów.

#### **5.3.4. Wpływ zmiany poziomu białka p66Shc oraz traktowania doksorubicyną komórek klonów linii MDA-MB-231 na parametry apoptotyczne**

Związek białka p66Shc z procesem apoptozy skłonił mnie do sprawdzenia jak zmiana poziomu białka p66Shc w klonach linii MDA-MB-231, jak również odpowiedź komórek na traktowanie doksorubicyną, może wpłynąć na przeżywalność komórek badanych klonów. O ile, zmiana poziomu białka p66Shc nie wpłynęła znacząco na żaden z badanych parametrów „apoptotycznych”: poziom żywych komórek, komórek wczesno- oraz późnoapoptotycznych, o tyle traktowanie komórek DOX już tak (ryc. 63). Największe zmiany widoczne są w poziomie żywych komórek oraz komórek wczesnoapoptotycznych. Dotyczą one w obu przypadkach klonu z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (p66Shc KO) oraz komórek kontrolnych (poziom żywych komórek). Komórki klonu p66Shc KO traktowane doksorubicyną cechuje istotny spadek w żywotności komórek oraz zdecydowany wzrost poziomu komórek wczesnoapoptotycznych w porównaniu z komórkami nietraktowanymi. Świadczyć to może o słabszych mechanizmach ochrony komórek nowotworowych przed inicjacją procesu apoptozy w komórkach klonu p66Shc KO. Generalnie, pierwotne założenie roli białka p66Shc w procesie apoptozy zakładało, że pozbawienie komórek białka p66Shc zapewniało im „ochronę” przed indukowanym (np. promieniowaniem UV czy staurosporyną)

procesem apoptozy (MIGLIACCIO I WSP. 1999; ORSINI I WSP. 2004; PACINI I WSP. 2004). Wyniki uzyskane przez SAKAO & SINGH (2012) w uniesmiertelnionych komórkach MEF pozbawionych białka p66Shc wskazują na zwiększoną oporność na indukowany SFN proces apoptozy w tych komórek. Ponadto, wyciszenie genu kodującego białko p66Shc w komórkach MDA-MB-231 oraz MCF-7 również wpływa korzystnie na zwiększoną oporność komórek raka sutka na proces apoptozy indukowany SFN (SAKAO & SINGH 2012). Ci sami autorzy potwierdzili, że zwiększenie poziomu SOD2 w tych komórkach (transfekcja przy użyciu odpowiednich wektorów) zapewniło prawie całkowitą ich ochronę przed apoptozą indukowaną SFN. Inni badacze (CAÑEDO I WSP. 2021) potwierdzili, że stosowanie jednocześnie doksorybicyny z inhibitorami polimerazy poli (ADP-rybozy) (PARPi, ang. *Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor*) w tych samych stężeniach działa „aktywująco” na białko p66Shc. Przeprowadzona przez nich analiza procesu apoptozy (z wykorzystaniem aneksyny V) wykazała, że wysoki poziom białka p66Shc w komórkach raka sutka – Hs578T (zaliczanego do potrójnie ujemnych, TNBC) powodował około 60% wzrost wskaźnika apoptozy komórek raka sutka w odpowiedzi na „łączone” leczenie doksorubicyną/PARPi w porównaniu z komórkami pozbawionymi p66Shc i linią kontrolną (wykazującą niższy endogenny poziom p66Shc). Zwiększony wskaźnik apoptozy w wyniku leczenia doksorubicyną/PARPi doprowadził tym samym do 25% wzrostu uwalniania z mitochondriów cytochromu c w komórkach Hs578T o wysokim poziomie ekspresji p66Shc w porównaniu z komórkami pozbawionymi białka p66Shc i komórkami kontrolnymi. Podsumowując, dane uzyskane przez CAÑEDO I WSP. (2021) sugerują, że zmniejszenie żywotności analizowanych przez nich komórek raka sutka w wyniku traktowania doksorubicyną/PARPi jest zależna od białka p66Shc zarówno w modelu *in vitro* jak i *in vivo*.

#### **5.4. Korelacja poziomu białek rodziny ShcA, Ras oraz TrkB z typem guzów litych mózgu oraz ich stopniem złośliwości**

W celu określenia potencjalnej korelacji między typem nowotworu mózgu, stopniem złośliwości a poziomem białek rodziny ShcA, Ras oraz TrkB przeanalizowano 49 próbek guzów neuroepitelialnych pobranych od pacjentów pediatrycznych. Wykorzystane w pracy doktorskiej próbki zalicza się do 5 głównych grup reprezentujących określone typy nowotworów mózgu (ryc. 10). Warto podkreślić, że przyporządkowanie analizowanych próbek do poszczególnych grup potwierdzono na podstawie badań histopatologicznych oraz immunohistochemicznych (PRILL I WSP. 2021).

Grupa 1 – *Guzy splotu naczyniówkowego* reprezentowana jest przez dwa typy guzów: *brodawczak splotu naczyniówkowego* (I stopień złośliwości) oraz *rak splotu naczyniówkowego* (III stopień złośliwości).

Grupa 2 – *Rozlane gwiaździaki i skąpodrzewiaki*, do której zalicza się 3 typy rozległych guzów: *glejak złośliwy* (IV stopień złośliwości), *skąpodrzewiak typu pediatrycznego* (II stopień złośliwości) oraz *skąpodrzewiak anaplastyczny typu pediatrycznego* (III stopień złośliwości).

Grupa 3 – *Guzy pochodzenia zarodkowego OUN* wśród której wyróżnia się następujące trzy typy guzów: *rdzeniak* (IV stopień złośliwości), *guzy zarodkowe NOS* (IV stopień złośliwości) oraz *atypowy nowotwór potworniakowo/paleczkowaty* (IV stopień złośliwości).

Grupa 4 – *Nowotwory gleju wyściółkowego* reprezentowana przez dwa typy guzów: *wyściółczak* (II stopień złośliwości) oraz *wyściółczak anaplastyczny* (III stopień złośliwości).

Grupa 5 – *Inne guzy astroglejowe* rozróżniająca cztery typy guzów: *gwiaździak włosowatokomórkowy* (I stopień złośliwości), *gwiaździak pilomyksoidny* (II stopień złośliwości), *żółtakogwiaździak pleomorficzny* (II stopień złośliwości) oraz *gwiaździak podwyściółkowy olbrzymiokomórkowy* (I stopień złośliwości).

Szereg danych literaturowych wskazuje, że aktywność białka Ras zależy od rekrutacji białek ShcA, która ma miejsce po aktywacji Trk przez np. neurotrofiny (LOTTI I WSP. 1996; ZAMPIERI & CHAO 2006). Zaburzone funkcjonowanie białek tego szlaku może być ściśle związane z procesami onkogennymi, zwłaszcza że białko Ras niejednokrotnie zostało opisane jako onkogen, zaś jego aktywacja może wpływać na aktywność dalszych kinaz biorących udział w proliferacji komórek. Co więcej, poziom receptorów Trk, korelowano z nowotworem złośliwym i sugerowano, że mogą być czynnikiem prognostycznym w guzach mózgu (NAKAGAWARA I WSP. 1993; TERUI I WSP. 2005). Ponadto, NAKAGAWARA I WSP. (1993) oraz JABOIN I WSP. (2002) wskazują TrkB jako negatywny marker prognostyczny w *nerwiaku zarodkowym*. Przeprowadzone badania mające na celu określenie zależności między poziomem analizowanych białek, a typem nowotworu nie wykazały istotnych różnic świadczących o istnieniu takiej korelacji za wyjątkiem poziomu TrkB. Różnica w poziomie TrkB widoczna jest pomiędzy grupą 3 (*guzy pochodzenia zarodkowego OUN*) a grupą 4 (*nowotwory gleju wyściółkowego*) badanych typów nowotworów. Brak jest natomiast obserwowanych różnic w poziomie zarówno wszystkich badanych izoform rodziny ShcA, jak i białka Ras (pomiędzy analizowanymi rodzajami nowotworów), co wydaje się być zgodne z aktualną wiedzą o białku Ras, w której genotyp (status mutacji) jest głównym winowajcą

różnic w genie kodującym białko Ras (MUÑOZ-MALDONADO I WSP. 2019) i agresywności nowotworu.

Klasyfikacja guzów nowotworowych OUN zgodna z założeniami WHO (2016) tradycyjnie obejmuje stopniowanie histologiczne zaczynając od I stopnia (łagodne) do stopnia IV (złośliwe). Guzy nowotworowe mózgu u dzieci są najczęściej nowotworami litymi i obejmują kilka podtypów histologicznych (POLLACK I WSP. 2019). *Gwiaździatek włosowatokomórkowy* to wolno rosnący, dobrze odgraniczony, często torbielowaty typ nowotworu u małych i nieco starszych dzieci, odpowiadający I stopniu złośliwości wg WHO. Jest najczęstszym nowotworem OUN u dzieci (SALLES I WSP. 2020). Z kolei, najczęstszym złośliwym guzem nowotworowym mózgu u dzieci jest *rdzeniak* (stopień IV wg WHO), który stanowi około 70% przypadków (KLINE I WSP. 2017). Inny wariant *rdzeniaka*, a dokładniej *desmoplastyczny/guzowaty rdzeniak zarodkowy* obejmuje 10–20% przypadków (LOUIS I WSP. 2016; KLINE I WSP. 2017). Guzy nowotworowe mózgu odpowiadające zmianom I stopnia złośliwości są nowotworami o niskim potencjale proliferacyjnym. Zmiany charakterystyczne dla II stopnia złośliwości są zwykle naciekające i często nawracają z tendencją progresji do wyższego stopnia złośliwości. Guzy nowotworowe mózgu III stopnia ujawniają histologiczne „cechy złośliwości” przede wszystkim w postaci wzmożonej aktywności mitotycznej. Oznaczenie stopnia IV stosuje się do „mitotycznie czynnych”, prowadzących najczęściej do martwicy nowotworów o szybkiej progresji, skutkujących zgonem. *Glejak złośliwy* i generalnie *guzy pochodzenia zarodkowego OUN* są przykładami nowotworów o IV stopniu złośliwości (LOUIS I WSP. 2016). Wykonana przeze mnie analiza pokazała, że spośród analizowanych białek z rodziny ShcA, jedynie izoforma p46Shc jest znacząco podwyższona w nowotworach z I stopniem złośliwości w porównaniu do innych guzów nowotworowych mózgu z II, III oraz IV stopniem złośliwości. W przypadku izoformy p52Shc można mówić jedynie o tendencji podobnej do tej obserwowanej dla białka p46Shc. Poziom białka p66Shc nie wykazuje istotnych różnic w związku z tym w przypadku badanych guzów litych mózgu brak jest zależności między poziomem białka p66Shc a ich stopniem złośliwości. Przeciwnie niż ma to miejsce w przypadku nowotworów sutka, gdzie podwyższony poziom p66Shc korelował z wysoce przerzutowymi wariantami ludzkiej linii komórkowej raka sutka MDA-MB-231 (URSINI-SIEGEL & MULLER 2008). Oznaczony przeze mnie poziom białka Ras również jest zbliżony w guzach o różnym stopniu złośliwości (I, II, III i IV). Aczkolwiek, w guzach o I stopniu złośliwości można zauważyć, że poziom białka Ras był najniższy. Wyniki te są niejako sprzeczne z badaniami dotyczącymi poziomu Ras w guzach ośrodkowego układu nerwowego dorosłego człowieka, opublikowanymi przez GUTIERREZ-ERLANDSSON I

wsp. (2013). Wykazali, oni że ekspresja R-RAS2 jest silniejsza w guzach ośrodkowego układu nerwowego dorosłego człowieka o niskim stopniu złośliwości (stopień I-II) aniżeli o wyższym stopniu złośliwości (stopień III-IV). Może to sugerować, że R-RAS2 ulega nadekspresji we wczesnych stadiach złośliwości. W przypadku TrkB nie znalazłam korelacji między poziomem tego białka a stopniem złośliwości. Przeciwny wniosek wysunęła grupa badawcza ZHANG I WSP. (2017), gdzie w wyniku przeprowadzonej przez nich metaanalizy poziom ekspresji TrkB był silnie (dodatnio) skorelowany ze stadium klinicznym (I–II vs III–IV). Ponadto, stwierdzono, że TrkB może być potencjalnym biomarkerem „niekorzystnego” rokowania. Należy podkreślić jednak, że taki wniosek został wysunięty na podstawie analizy kohorty nowotworów obejmujących m.in. nowotwory żołądka (ZHANG I WSP. 2008; TANAKA I WSP. 2014), jelita grubego (FAN I WSP. 2014; DAWSON I WSP. 2015), niedrobnokomórkowego płuc (OKAMURA I WSP. 2012) czy nowotwory jajnika (AU I WSP. 2009).

Podsumowując, zaprezentowane w niniejszej pracy doktorskie wyniki świadczą o wpływie białka p66Shc na metabolizm komórkowy badanych linii raka sutka. Wykorzystanie dwóch różnych linii nowotworowych sutka różniących się poziomem endogennego białka p66Shc potwierdziło wysoką zmienność „fenotypową” w obrębie tego samego typu nowotworu. W przypadku przeprowadzonych przeze mnie badań wyrażona jest ona w odmiennej odpowiedzi komórek linii MDA-MB-231 oraz MCF-7. Zmiana poziomu białka p66Shc w uzyskanych klonach analizowanych linii nowotworowych pokazała, że białko p66Shc może pełnić ważną rolę zwłaszcza w bioenergetyce mitochondriów. Wykorzystanie klonów linii MDA-MB-231 w celu zbadania odpowiedzi komórek różniących się poziomem białka p66Shc na traktowanie doksorubicyną pokazało jedynie „trend” zmian, a zarazem potencjalny kierunek dalszych badań, z uwagi na zastosowanie przeze mnie stosunkowo niskiej dawki DOX. Spośród wszystkich białek rodziny ShcA, jedynie izoforma p46Shc wydawać się może potencjalnym kandydatem do zastosowania jako biomarker w diagnostyce oraz prognozowaniu guzów litych mózgu pacjentów pediatrycznych.

## 6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było określenie roli białka adaptorowego p66Shc w fizjologii mitochondriów komórek nowotworowych raka sutka. Szczególną uwagę poświęcono wpływowi zmiany poziomu białka p66Shc na odpowiedź komórek nowotworowych na stres oksydacyjny oraz związany z nim status ochrony antyoksydacyjnej jak również wybrane mitochondrialne parametry bioenergetyczne.

Na podstawie uzyskanych wyników możliwe jest wyciągnięcie następujących wniosków:

- 1) Wykorzystanie dwóch linii nowotworowych raka sutka ze względnie wyższym (MDA-MB-231) oraz niższym (MCF-7) poziomem białka p66Shc potwierdziło wysoką zmienność „fenotypową” w obrębie tego samego typu nowotworu, która w przypadku przeprowadzonych przeze mnie badań wyrażona jest w różnicach obserwowanych w badanych parametrach funkcjonalnych komórki.
- 2) Linia MDA-MB-231 ze względnie wyższym poziomem białka p66Shc charakteryzuje się jednocześnie wyższym poziomem poszczególnych białek biorących udział w prooksydacyjnej ścieżce sygnalizacyjnej białka p66Shc w porównaniu z linią MCF-7 (ze względnie niższym poziomem p66Shc).
- 3) Wyższy poziom analizowanych białek zaangażowanych w prooksydacyjną ścieżkę białka p66Shc w linii MDA-MB-231 koreluje z istotnie wyższym poziomem zarówno cytozolowego jak i mitochondrialnego anionorodnika ponadtlenkowego.
- 4) Zmiana poziomu białka p66Shc w liniach MDA-MB-231 oraz MCF-7 nie wywołała „jednego wspólnego trendu” zmian w badanych parametrach związanych z odpowiedzią na stres oksydacyjny.
- 5) Nie wykazałam związku pomiędzy podwyższonym poziomem fosforylacji w Ser36, uzyskanym w klonie ↑ p66Shc (co opisano w przypadku komórek nienowotworowych np. fibroblastów). Świadczyć to może o występowaniu w komórkach nowotworowych innego typu regulacji bądź obecności dodatkowych mechanizmów uruchamianych w odpowiedzi na zmianę poziomu p66Shc jak i jego fosforylacji w Ser36.
- 6) Klon z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc (p66Shc KO) linii MDA-MB-231 (potrójnie ujemny podtyp raka sutka) charakteryzuje się znaczącym obniżeniem wszystkich parametrów funkcjonalnych mitochondrialnego łańcucha oddechowego (obniżone parametry szybkości zużycia tlenu w stanie podstawowym,

poziomu „wycieku” protonów oraz maksymalnej szybkości zużycia tlenu). Obecność tego samego „trendu” zmian stwierdziłam również w tym samym klonie (p66Shc KO) linii MCF-7.

- 7) Obniżenie wszystkich badanych parametrów funkcjonalnych mitochondrialnego łańcucha oddechowego w klonie z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc linii MDA-MB-231 koreluje z istotnym obniżeniem większości analizowanych podjednostek wszystkich kompleksów łańcucha oddechowego (kompleks I – IV) za wyjątkiem syntazy ATP.
- 8) Wykazałam, że klon z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc linii MDA-MB-231 charakteryzuje się najbardziej glikolitycznym „fenotypem” metabolicznym spośród wszystkich badanych klonów. Świadczą o tym podwyższone parametry glikolityczne (m.in. poziom enzymów zaangażowanych w proces glikolizy oraz cykl Krebsa, udział zakwaszenia zewnątrzkomórkowego PER pochodzącego z glikolizy, *basal PER* czy *basal glycolysis*) przy jednocześnie obniżonych podstawowych parametrach związanych z oddychaniem mitochondrialnym.
- 9) Traktowanie komórek klonów linii MDA-MB-231 dokсорubicyną spowodowało istotne powiększenie jąder komórkowych jak również zmianę lokalizacji sieci mitochondrialnej, która jest równomiernie rozmieszczona po całej komórce.
- 10) Udowodniłam, że komórki klonu z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc charakteryzują się największą wrażliwością na traktowanie chemioterapeutyką DOX (nawet przy zastosowaniu bardzo niskiej dawki DOX – 20 nM).
- 11) Wykazałam, że jedynie izoforma p46Shc wydawać się może potencjalnym kandydatem do zastosowania jako biomarker w diagnostyce oraz prognozowaniu guzów mózgu pacjentów pediatrycznych.

Podsumowując, zaprezentowane w niniejszej pracy doktorskiej badania jednoznacznie wskazują na wpływ białka p66Shc na fizjologię mitochondriów komórek nowotworowych raka sutka. Niemniej jednak, otrzymane wyniki potwierdzają występowanie stosunkowo wysokiego stopnia heterogeniczności w obrębie tego samego typu nowotworu jakim jest rak sutka. Rolę białka p66Shc w komórkach analizowanych linii nowotworowych MDA-MB-231 oraz MCF-7 należy wiązać z jego wpływem na metabolizm mitochondrialny badanych komórek nowotworowych aniżeli z odpowiedzią komórki na stres oksydacyjny (związaną z obecnością unikalnej reszty Ser36 w białku p66Shc) jak to zostało zaproponowane dla

komórek nienowotworowych (np. fibroblastów). Uzyskane przeze mnie wyniki pozwoliły na wskazanie nieopisanej dotąd zależności pomiędzy poziomem białka p66Shc a glikolitycznym profilem metabolicznym komórek nowotworu sutka. Klon z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc linii MDA-MB-231 (stanowiącej bardziej metastatyczny, potrójnie ujemny podtyp raka sutka) cechuje się zwiększonym poziomem wielu badanych parametrów glikolitycznych przy jednoczesnym, znaczącym spadku parametrów opisujących mitochondrialny metabolizm tlenowy. Ponadto, komórki klonu z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko p66Shc linii MDA-MB-231 cechują się zdecydowanie większą wrażliwością na traktowanie doksorubicyną (powszechnie stosowaną w terapii antynowotworowej). W związku z powyższym, uzyskane przeze mnie dane poszerzyły podstawową wiedzę dotyczącą funkcji białka p66Shc w komórkach nowotworowych, która może w istotny sposób przyczynić się do udoskonalenia najnowszych strategii terapeutycznych stosowanych w przypadku nowotworów sutka.



## 7. BIBLIOGRAFIA

1. AHMED S. B. M & PRIGENT S. A. 2017. Insights into the Shc Family of Adaptor Proteins. *J Mol Signal.*, 12: 2.
2. AHN C. S & METALLO C. M. 2015. Mitochondria as biosynthetic factories for cancer proliferation. *Cancer Metab*, 3: 1.
3. ALAM S. M, RAJENDRAN M, OUYANG S, VEERAMANI S, ZHANG L, LIN M-F. 2009. A novel role of Shc adaptor proteins in steroid hormone-regulated cancers. *Endocr Relat Cancer.*, 16 (1): 1.
4. ALFEREZ D. G, SIMÕES B. M, HOWELL S. J, CLARKE R. B. 2018. The Role of Steroid Hormones in Breast and Effects on Cancer Stem Cells. *Curr Stem Cell Rep.*, 2018; 4 (1): 81–94.
5. ALKARAKI A, ALSHAER W, WEHAIBI S, GHARAIBEH L, ABUARQOUB D, ALQUDAH D. A, AL-AZZAWI H, ZUREIGAT H, SOULEIMAN M, AWIDI A. 2020. Enhancing chemosensitivity of wild-type and drug-resistant MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cell line to doxorubicin by silencing of STAT 3, Notch-1, and  $\beta$ -catenin genes. *Breast Cancer*, 27 (5): 989-998.
6. ANDERSON N. M, MUCKA P, KERN J. G, FENG H. 2018. The emerging role and targetability of the TCA cycle in cancer metabolism. *Protein Cell*, 9 (2): 216–237.
7. ARANY I, FAISAL A, NAGAMINE Y, SAFIRSTEIN R. L. 2008. p66shc inhibits pro-survival epidermal growth factor receptor/ERK signaling during severe oxidative stress in mouse renal proximal tubule cells. *J. Biol. Chem.*, 283: 6110-6117.
8. AU C. W, SIU M. K, LIAO X, WONG E. S, NGAN H. Y, TAM K. F, CHAN D. C. W, CHAN Q. K. Y, CHEUNG A. N. Y. 2009. Tyrosine kinase B receptor and BDNF expression in ovarian cancers—Effect on cell migration, angiogenesis and clinical outcome. *Cancer Lett.*, 281: 151–161.
9. AVAGLIANO A, RUOCCO M. R, ALIOTTA F, BELVISO I, ACCURSO A, MASONE S, MONTAGNANI S, ARCUCCI A. 2019. Mitochondrial Flexibility of Breast Cancers: A Growth Advantage and a Therapeutic Opportunity. *Cells*, 8 (5): 401.
10. BADRINATH N & YOO S. Y. 2018. Mitochondria in cancer: in the aspects of tumorigenesis and targeted therapy. *Carcinogenesis*, 39 (12): 1419–1430.
11. BASHIR M, KIRMANI D, BHAT H. F, BABA R. A, HAMZA R, NAQASH S, WANI N. A, ANDRABI K. I, ZARGAR M. A, KHANDAY F.A. 2010. P66shc and its downstream Eps8 and Rac1 proteins are upregulated in esophageal cancers. *Cell Commun Signal.*, 8: 13.
12. BELTRAMI E, VALTORTA S, MORESCO R, MARCU R, BELLOLI S, FASSINA A, FAZIO F, PELICCI P. G, GIORGIO M. 2013. The p53-p66Shc apoptotic pathway is dispensable for tumor suppression whereas the p66Shc-generated oxidative stress initiates tumorigenesis. *Curr Pharm Des.*, 19: 2708–14.
13. BENOVA L., SZTEJNBERGL., FRIDOVICH I. 1998. Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. *Free Radic. Biol. Med.*, 25: 826-831.

14. BERNIAKOVICH I, TRINEI M, STENDARDO M, MIGLIACCIO E, MINUCCI S, BERNARDI P, PELICCI P. G, GIORGIO M. 2008. p66Shc-generated oxidative signal promotes fat accumulation. *J. Biol. Chem.*, 283: 34283–34293.
15. BEROUKHIM R, MERMEL C. H, PORTER D, WEI G, RAYCHAUDHURI S, DO-NOVAN J, BARRETINA J, BOEHM J. S, DOBSON J, URASHIMA M, MC HENRY K. T, PINCHBACK R. M, LIGON A. H, CHO Y. J, HAERY L, GREULICH H, REICH M, WINCK-LER W, LAWRENCE M. S, WEIR B. A, TANAKA K. E, CHIANG D. Y, BASS A. J, LOO A, HOFFMAN C, PRENSNER J, LIEFELD T, GAO Q, YECIES D, SIGNORETTI S, I WSP. 2010. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 463 (7283): 899-905.
16. BHAT S. S, ANAND D, KHANDAY F. A. 2015. p66Shc as a switch in bringing about contrasting responses in cell growth: implications on cell proliferation and apoptosis. *Mol Cancer*, 14: 76.
17. BONFINI L, MIGLIACCIO E, PELICCI G, LANFRANCONE L, PELICCI PG. 1996. Not all Shc's roads lead to Ras. *Trends Biochem Sci.*, 21: 257–261.
18. BRADFORD M.M. 1976. „A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”, *Anal. Biochem.*, 72 (1–2): 248–254.
19. CAIRNS R. A, HARRIS I. S, MAK T. W. 2011. Regulation of Cancer Cell Metabolism, *Nat. Rev. Cancer.*, 11 (2): 85–95.
20. CAÑEDO E. C, TOTTEN S, AHN R, SAVAGE P, MACNEIL D, HUDSON J, AUTEXIER C, DEBLOIS G, PARK M, WITCHER M, URSINI-SIEGEL J. 2021. p66ShcA potentiates the cytotoxic response of triple-negative breast cancers to PARP inhibitors. *JCI Insight*, 6 (4): e138382.
21. CAPITANI N, LUCHERINI O. M, SOZZI E, FERRO M, GIOMMONI N, FINETTI F, DE FALCO G, CENCINI E, RASPADORI D, PELICCI P. G, LAURIA F, FORCONI F, BALDARI C. T. 2010. Impaired expression of p66Shc, a novel regulator of B-cell survival, in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 115: 3726–36.
22. CHAHDI A & SOROKIN A. 2008. Endothelin-1 couples {beta}Pix to p66Shc: role of {beta}Pix in cell proliferation through FOXO3a phosphorylation and p27kip1 downregulation independently of Akt. *Mol Biol Cell.*, 19: 2609-2619.
23. CHANDEL N.S. 2014. Mitochondria as signaling organelles. *BMC Biology*, 12: 34.
24. CHANDRA D & SINGH K. K. 2011. Genetic insights into OXPHOS defect and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta.*, 1807 (6): 620–625.
25. CHINNERY P. F, HUDSON G. 2013. Mitochondrial genetics. *Br Med Bull.*, 106 (1): 135–59.
26. CONTE A, PROCACCINI C, IANNELLI P, KISSLINGER A, DE AMICIS F, PIERANTONI G. M, MANCINI F. P, MATARESE G, TRAMONTANO D. 2015. Effects of Resveratrol on p66Shc phosphorylation in cultured prostate cells. *Transl Med UniSa.*, 13: 47–58.
27. CONTI L, DE FRAJA C, GULISANO M, MIGLIACCIO E, GOVONI S, CATTANEO E. 1997. Expression and activation of SH2/PTB-containing ShcA adaptor protein reflects the pattern of neurogenesis in the mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94: 8185–8190.

28. COSSARIZZA A., BACCARANI-CONTRI A., KALASHNIKOVA G., FRANCESCHI C. 1993. „A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the aggregate forming lipophilic cationic 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1)”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 197 (1): 40–5.
29. COSTA A., SCHOLER-DAHIREL A., MECHTA-GRIGORIOU F. 2014. The role of reactive oxygen species and metabolism on cancer cells and their microenvironment. *Semin Cancer Biol.* 25:23-32.
30. COX A. D & DER C. J. 2010. Ras history: The saga continues. *Small GTPases*, 1: 2–27.
31. DASGUPTA S, HOQUE M. O, UPADHYAY S, SIDRANSKY D. 2008. Mitochondrial cytochrome B gene mutation promotes tumor growth in bladder cancer. *Cancer Res.*,68: 700–706.
32. DAVOL P. A, BAGDASARYAN R, ELFENBEIN G. J, MAIZEL A. L, FRACKELTON JR. A. R. 2003. Shc proteins are strong, independent prognostic markers for both node-negative and node-positive primary breast cancer. *Cancer Res.*, 63 (20): 6772-83.
33. DAWSON H, GRUNDMANN S, KOELZER V. H, GALVÁN J. A, KIRSCH R, KARAMITOPOULOU E, LUGLI A, INDERBITZIN D, ZLOBEC I. 2015. Tyrosine kinase receptor B (TrkB) expression in colorectal cancers highlights anoikis resistance as a survival mechanism of tumour budding cells. *Histopathology*, 66: 715–725.
34. DERUNGS R, CAMICI G, SPESCHA R, WELT T, TACKENBERG C, SPÄNI C, WIRTH F, GRIMM A, ECKERT A, NITSCH R. 2017. Genetic ablation of the p66 Shc adaptor protein reverses cognitive deficits and improves mitochondrial function in an APP transgenic mouse model of Alzheimer’s disease. *Mol. Psychiatry* 22, 605–614.
35. DESLER C, RASMUSSEN L.J. 2014. Mitochondria in biology and medicine-2012. *Mitochondrion*, 16: 2-6.
36. DU W, JIANG Y, ZHENG Z, ZHANG Z, CHEN N, MA Z, YAO Z, TERADA L, LIU Z. 2013. Feedback loop between p66(Shc) and Nrf2 promotes lung cancer progression. *Cancer Lett.*, 337: 58–65.
37. DUPONT H & BLANCQ M. 1999. Formation of complexes involving RasGAP and p190 RhoGAP during morphogenetic events of the gastrulation in xenopus. *Eur J Biochem.*, 265: 530-538.
38. ELMORE S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.*, 35 (4): 495–516.
39. ERTEL A, VERGHESE A, BYERS S. W, OCHS M, TOZEREN A. 2006. Pathway specific differences between tumor cell lines and normal and tumor tissue cells. *Mol Cancer.*, 5: 55.
40. EVAN G. I & VOUSDEN K. H. 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411: 342–8.
41. FADINI G. P, ALBIERO M, BONORA B. M, PONCINA N, DE KREUTZENBERG S. V, AVOGARO A. 2018. p66Shc gene expression in peripheral blood mononuclear cells and progression of diabetic complications. *Cardiovasc. Diabetol.*, 17: 16.
42. FAN M, SUN J, WANG W, FAN J, WANG L, ZHANG X, YANG A, WANG W, ZHANG R, LI J. 2014. Tropomyosin-related kinase B promotes distant metastasis of colorectal

- cancer through protein kinase B-mediated anoikis suppression and correlates with poor prognosis. *Apoptosis*, 19: 860–870.
43. FOGG V. C, LANNING N. J, MACKEIGAN J. P. 2011. Mitochondria in cancer: at the crossroads of life and death. *Chin J Cancer* 30 (8): 526-39.
  44. FRACKELTON A. R JR, LU L, DAVOL P. A, BAGDASARYAN R, HAFFER L. J, SGROI D. C. 2006. p66 Shc and tyrosine-phosphorylated Shc in primary breast tumors identify patients likely to relapse despite tamoxifen therapy. *Breast Cancer Res.*, 8: R73.
  45. FURLAN T, KHALID S, NGUYEN A-V, GÜNTHER J, TROPPEMAIR J. 2018. The oxidoreductase p66Shc acts as tumor suppressor in BRAFV600E-transformed cells. *Mol Oncol.*, 12(6): 869-882.
  46. GALIMOV E. R, SIDORENKO A. S, TERESHKOVA A. V, PLETIUSHKINA O, CHERNIAK B. V, CHUMAKOV P. M. 2012. P66shc action on resistance of colon carcinoma RKO cells to oxidative stress. *Mol Biol.*, 46: 139–46.
  47. GALIMOV E. R. 2010. The role of p66shc in oxidative stress and apoptosis. *Acta Naturae* 2: 44-51.
  48. GASPARRE G & SONVEAUX R. R. P. 2017. Mitochondria in Cancer. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.*, 1858 (8): 553-555.
  49. GERTZ M & STEGBORN C. 2010. The Lifespan-regulator p66Shc in mitochondria: redox enzyme or redox sensor? *Antioxid Redox Signal.*, 13 (9): 1417-28.
  50. GIORGIO M, MIGLIACCIO E, ORSINI F, PAOLUCCI D, MORONI M, CONTURSI C, PELLICCIA G, LUZI L, MINUCCI S, MARCACCIO M, PINTON P, RIZZUTO R, BERNARDI P, PAOLUCCI F, PELICCI PG. 2005. Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell*, 122 (2): 221-33.
  51. GIORGIO M, STENDARDO M, MIGLIACCIO E, PELICCI P. G. 2016. p66SHC deletion improves fertility and progeric phenotype of late-generation TERC-deficient mice but not their short lifespan. *Aging Cell*, 15: 446–454.
  52. GIORGIO M, TRINEI M, MIGLIACCIO E, PELICCI P. G. 2007. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 8: 722–8.
  53. GOGVADZE V. 2011. Targeting mitochondria in fighting cancer. *Curr Pharm Des.*, 17 (36): 4034-46.
  54. GRASSO D, ZAMPIERI L.X, CAPELÔA T, VAN DE VELDE J.A, SONVEAUX P. 2020. Mitochondria in cancer. *Cell Press*, 4 (6): 114-146.
  55. GRISHAM M.B. 2013. Methods to detect hydrogen peroxide in living cells: possibilities and pitfalls, *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 165: 429–438.
  56. GROSSMAN S. R, LYLE S, RESNICK M. B, SABO E, LIS R. T, ROSINHA E, LIU Q, HSIEH C. C, BHAT G, FRACKELTON JR A. R, HAFFER L. J. 2007. p66Shc tumor levels show a strong prognostic correlation with disease outcome in stage IIA colon cancer. *Clin Cancer Res.*, 13: 5798–804.
  57. GUARENTE L & KENYON C. 2000. Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature* 408: 255-262.
  58. GUO L. 2021. Mitochondria and the permeability transition pore in cancer metabolic reprogramming. *Biochemical Pharmacology*, 188: 114537.

59. GUTIERREZ-ERLANDSSON S, HERRERO-VIDAL P, FERNANDEZ-ALFARA M, HERNANDEZ-GARCIA S, GONZALO-FLORES S, MUDARRA-RUBIO A, FRESNO M, CUBELOS B. 2013. R-RAS2 overexpression in tumors of the human central nervous system. *Mol. Cancer*, 12: 127.
60. HADI N. A, MAHMOOD R. I, AL-SAFFAR A. Z. 2021. Evaluation of antioxidant enzyme activity in doxorubicin treated breast cancer patients in Iraq: A molecular and cytotoxic study. *Gene Reports*, 24: 101285.
61. HAINES E, SAUCIER C, CLAING A. 2014. The adaptor proteins p66Shc and Grb2 regulate the activation of the GTPases ARF1 and ARF6 in invasive breast cancer cells. *J Biol Chem.*, 289: 5687–703.
62. HENDERSON B. E & FEIGELSON H. S. 2000. Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21: 427–433.
63. HERST P. M & BERRIDGE M. V. 2007. Cell surface oxygen consumption: a major contributor to cellular oxygen consumption in glycolytic cancer cell lines. *Biochimica et biophysica acta*, 1767: 170–177.
64. HUANG P, FENG X, ZHAO Z, YANG B, FANG T, GUO M, XIA J. 2019. p66Shc promotes HCC progression in the tumor microenvironment via STAT3 signaling. *Exp. Cell Res.*, 383: 111550.
65. HUDSON J, HA J. R, SABOURIN V, AHN R, LA SELVA R, LIVINGSTONE J, PODMORE L, KNIGHT J, FORREST L, BEAUCHEMIN N, HALLETT M, PARK M, URSINI-SIEGEL J. 2014. p66ShcA promotes breast cancer plasticity by inducing an epithelial-to-mesenchymal transition. *Mol Cell Biol.*, 34 (19): 3689-701.
66. HUEBNER K, KASTURY K, DRUCK T, SALCINI A. E, LANFRANCONE L, PELICCI G, LOWENSTEIN E, LI W, PARK S. H, CANNIZZARO L I WSP. 1994. Chromosome locations of genes encoding human signal transduction adaptor proteins, Nck (NCK), Shc (SHC1), and Grb2 (GRB2). *Genomics*, 22: 281-287.
67. JABOIN J, KIM C. J, KAPLAN D. R, THIELE C. J. 2002. Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB protects neuroblastoma cells from chemotherapy-induced apoptosis via phosphatidylinositol 3'-kinase pathway. *Cancer Res.*, 62: 6756–6763.
68. JACKSON J. G, YONEDA T, CLARK G. M, YEE D. 2000. Elevated levels of p66 Shc are found in breast cancer cell lines and primary tumors with high metastatic potential. *Clin Cancer Res.*, 6: 1135–9.
69. JIANG B. 2017. Aerobic glycolysis and high level of lactate in cancer metabolism and microenvironment. *Genes & Diseases*, 4: 25-27.
70. KABACK H. R (1980). Electrochemical ion gradients and active transport. *Ann N Y Acad Sci.*, 339: 53-60.
71. KASSAUEI K, HABBE N, MULLENDORE M. E, KARIKARI C. A, MAITRA A, FELDMANN G. 2006. Mitochondrial DNA mutations in pancreatic cancer. *Int. J. Gastrointest. Cancer*, 37: 57–64.
72. KASUNO K, NAQVI A, DERICCO J, YAMAMORI T, SANTHANAM L, MATTAGAJASINGH I, YANG S, MEYSKENS F. L, BOSSERHOFF A-K, IRANI K. 2007. Antagonism of p66shc by melanoma inhibitory activity. *Cell Death Differ.*, 14: 1414–21.
73. KHALID S, DRASCHE A, THURNER M, HERMANN M, ASHRAF M. I, FRESSER F, BAIER G, KREMSER L, LINDNER H, TROPFMAIR J. 2016. cJun N-terminal kinase (JNK)

- phosphorylation of serine 36 is critical for p66Shc activation. *Scientific reports*, 6: 20930.
74. KIM Y.-R, KIM C-S, NAQVI A, KUMAR A, KUMAR S, HOFFMAN T. A, IRANI K. 2012. Epigenetic upregulation of p66shc mediates low-density lipoprotein cholesterol-induced endothelial cell dysfunction. *Am. J. Physiol.*, 303: H189–H196.
  75. KLEINER S. 2015. Isoform-specific roles of the adaptor protein ShcA in cell signaling. *Rozprawa doktorska. Wydział Filozofii i Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu w Bazylei*. URL: [http://edoc.unibas.ch/diss/DissB\\_7331](http://edoc.unibas.ch/diss/DissB_7331).
  76. KLINE C. N, PACKER R. J, HWANG E. I, RALEIGH D. R, BRAUNSTEIN S, RAFFEL C, BANDOPADHAYAY P, SOLOMON D. A, ABOIAN M, CHA S, MUELLER S. 2017. Case-based review: Pediatric medulloblastoma. *Neurooncol. Pract.*, 4: 138–150.
  77. KLOTZ L. O, SÁNCHEZ-RAMOS C, PRIETO-ARROYO I, URBÁNEK P, STEINBRENNER H, MONSALVE M. 2015. Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox Biol.*, 6: 51–72.
  78. KOCH O. R, FUSCO S, RANIERI S. C, MAULUCCI G, PALOZZA P, LAROCCA L. M, CRAVERO A. A. M, FARRE' S. M, DE SPIRITO M, GALEOTTI T, PANI G. 2008. Role of the life span determinant P66(shcA) in ethanol-induced liver damage. *Lab Invest.*, 88: 750–60.
  79. KOIT A, TIMOHHINA N, TRUU L, CHEKULAYEV V, GUDLAWAR S, SHEVCHUK I, LEPIK K, MALLO L, KUTNER R, VALVERE V, KAAMBRE T. 2020. Metabolic and OXPHOS Activities Quantified by Temporal ex vivo Analysis Display Patient-Specific Metabolic Vulnerabilities in Human Breast Cancers. *Front Oncol.*, 10: 1053.
  80. KOOPMAN W. J. H, VERKAART S, VISCH H. J, VAN EMST-DE VRIES S, NIJTMANS L. G. J, SMEITINK J. A. M, WILLEMS P. H. G. M. 2007. „Human NADH: ubiquinone oxidoreductase deficiency: radical changes in mitochondrial morphology?”, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 293 (1): C22–9.
  81. KOPINSKI P. K, SINGH L. N, ZHANG S, LOTT M. T, WALLACE D. C. 2021. Mitochondrial DNA variation and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 21: 431–445.
  82. KUMAR S, KUMAR S, RAJENDRAN M, ALAM S. M, LIN F. F, CHENG P. W, LIN M. F. 2011. Steroids up-regulate p66Shc longevity protein in growth regulation by inhibiting its ubiquitination. *PLoS One.*, 6 (1): e15942.
  83. KUMAR S. 2019. P66Shc and vascular endothelial function. *Biosci Rep.*, 39 (4): BSR20182134.
  84. KUMAR S. 2019. p66Shc and vascular endothelial function. *Biosci. Rep.*, 39 (4): BSR20182134.
  85. LEBIEDZINSKA M, DUSZYNSKI J, RIZZUTO R, PINTON P, WIECKOWSKI M. R. 2009. Age-related changes in levels of p66Shc and serine 36-phosphorylated p66Shc in organs and mouse tissues. *Arch. Biochem. Biophys.*, 486: 73–80.
  86. LEBIEDZINSKA-ARCISZEWSKA M, OPARKA M, VEGA-NAREDO I, KARKUCINSKA-WIECKOWSKA A, PINTON P, DUSZYNSKI J, WIECKOWSKI M. R. 2015. The interplay between p66Shc, reactive oxygen species and cancer cell metabolism. *Eur J Clin Invest.*, 45 (1): 25-31.
  87. LEE M. S, IGAWA T, CHEN S. J, VAN BEMMEL D, LIN J. S, LIN F. F, JOHANSSON S. L, CHRISTMAN J. K, LIN M. F. 2004. p66Shc protein is upregulated by steroid hormones

- in hormone-sensitive cancer cells and in primary prostate carcinomas. *Int J Cancer*, 108 (5): 672-8.
88. LEE R, MARGARITIS M, CHANNON K, ANTONIADES C. 2012. Evaluating oxidative stress in human cardiovascular disease: methodological aspects and considerations. *Curr. Med. Chem.*, 19: 2504–2520.
  89. LEONE G, ABLA H, GASPARRE G, PORCELLI A. M, IOMMARINI L. 2018. The Oncojanus Paradigm of Respiratory Complex I. *Genes*, 9: 243.
  90. LEWIS K, KIEPAS A, HUDSON J, SENEAL J, HA J. R, VOORAND E, ANNIS M. G, SABOURIN V, AHN R, LA SELVA R. 2020. p66ShcA functions as a contextual promoter of breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res.*, 22: 1–19.
  91. LI W, MA X, LI N, LIU H, DONG Q, ZHANG J, YANG C, LIU Y, LIANG Q, ZHANG S, XU C, SONG W, TAN S, RONG P, WANG W. 2016. Resveratrol inhibits Hexokinases II mediated glycolysis in non-small cell lung cancer via targeting Akt signaling pathway. *Exp Cell Res.*, 349 (2): 320-327.
  92. LI X, XU Z, DU W, ZHANG Z, WEI Y, WANG H, ZHU Z, QIN L, WANG L, NIU Q, ZHAO X, GIRARD L, GONG Y, MA Z, SUN B, YAO Z, MINNA J. D, TERADA L. S, LIU Z. 2014. Aiolos promotes anchorage independence by silencing p66Shc transcription in cancer cells. *Cancer Cell.*, 25: 575–89.
  93. LI X, YANG J, PENG L, SAHIN A. A, HUO L, WARD K. C, O'REGAN R, TORRES M. A, MEISEL J. L. 2017. Triple-negative breast cancer has worse overall survival and cause-specific survival than non-triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.*, 161 (2): 279–287.
  94. LIBERTI M. V, LOCASALE J. W. 2016. The Warburg Effect : How Does It Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem. Sci.*, 41 (3): 211–218.
  95. LIEVRE A, CHAPUSOT C, BOUVIER A. M, ZINZINDOHOUE F, PIARD F, ROIGNOT P, ARNOULD L, BEAUNE P, FAIVRE J, LAURENT-PUIG P. 2005. Clinical value of mitochondrial mutations in colorectal cancer. *J Clin Oncol.*, 23: 3517–25.
  96. LIU G, XIE B, GONG L, ZHOU J, SHU G. 2014. The expression of p66Shc protein in benign, premalignant, and malignant gastrointestinal lesions. *Pathol. Oncol. Res.*, 20: 733–739.
  97. LIU V. W, SHI H. H, CHEUNG A. N, CHIU P. M, LEUNG T. W, NAGLEY P, WONG L. C, NGAN H. Y. 2001. High incidence of somatic mitochondrial DNA mutations in human ovarian carcinomas. *Cancer Res.*, 61: 5998–6001.
  98. LOTTI L. V, LANFRANCONE L, MIGLIACCIO E, ZOMPETTA C, PELICCI G, SALCINI A. E, FALINI B, PELICCI P. G, TORRISI M. R. 1996. Shc proteins are localized on endoplasmic reticulum membranes and are redistributed after tyrosine kinase receptor activation. *Mol. Cell. Biol.*, 16: 1946–1954.
  99. LOUIS D. N, PERRY A, REIFENBERGER G, VON DEIMLING A, FIGARELLA-BRANGER D, CAVENEE W. K, OHGAKI H, WIESTLER O. D, KLEIHUES P, ELLISON D. W. 2016. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Acta Neuropathol.*, 131: 803–820.
  100. LOVITT C. J, SHELPER T. B, AVERY V. M. 2018. Doxorubicin resistance in breast cancer cells is mediated by extracellular matrix proteins. *BMC Cancer*, 18 (1): 41.

101. LUO Y, MA J, LU W. 2020. The Significance of Mitochondrial Dysfunction in Cancer. *Int J Mol Sci.*, 21 (16): 5598.
102. MA Z, LIU Z, WU R-F, TERADA L. S. 2010. p66(Shc) restrains Ras hyperactivation and suppresses metastatic behavior. *Oncogene*, 29 (41): 5559-67.
103. MAJ M. C, TKACHYOVA I, PATEL P, ADDIS J. B, MACKAY N, LEVANDOVSKIY V, LEE J, LANG A. E, CAMERON J. M, ROBINSON B. H. 2010. Oxidative stress alters the regulatory control of p66Shc and Akt in PINK1 deficient cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 399: 331–335.
104. MALAKOUTI P, MOHAMMADI M, BOSHAGH M. A, AMINI A, REZAAE M. A, RAHMANI M. R. 2022. Combined effects of pioglitazone and doxorubicin on migration and invasion of MDA-MB-231 breast cancer cells. *J Egypt Natl Canc Inst.*, ;34 (1): 13.
105. MARCO-BRUALLA J, AL-WASABY S, SOLER R, ROMANOS E, CONDE B, JUSTO-MENDEZ R, ENRIQUEZ J.A, FERNANDEZ-SILVA P, MARTINEZ-LOSTAO L, VILLALBA M, MORENO-LOSHUERTOS R, ANEL A. 2019. Mutations in the ND2 Subunit of Mitochondrial Complex I Are Sufficient to Confer Increased Tumorigenic and Metastatic Potential to Cancer Cells. *Cancers*, 11: 1027.
106. MARTINEZ-OUTSCHOORN U. E, PESTELL R. G, SOTGIA F, LISANTI M. P. 2017. Cancer Metabolism: A Therapeutic Perspective, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 14 (1): 11–31.
107. MATÉS J. M, SEGURA J. A, ALONSO F. J, MÁRQUEZ J. 2012. Oxidative stress in apoptosis and cancer: an update. *Arch Toxicol.*, 86 (11): 1649-65.
108. MAYR J. A, MEIERHOFER D, ZIMMERMANN F, FEICHTINGER R, KOGLER C, RATSCHKE M, SCHMELLER N, SPERL W, KOFLER B. 2008. Loss of complex I due to mitochondrial DNA mutations in renal oncocytoma. *Clin Cancer Res.*, 14 (8): 2270-2275.
109. MEIERHOFER D, MAYR J. A, FOETSCHL U, BERGER A, FINK K, SCHMELLER N, HACKER G. W, HAUSER-KRONBERGER C, KOFLER B, SPERL W. 2004. Decrease of mitochondrial DNA content and energy metabolism in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 25 (6): 1005-1010.
110. MIGLIACCIO E, GIORGIO M, MELE S, PELICCI G, REBOLDI P, PANDOLFI PP, LANFRANCONE L, PELICCI PG. 1999. The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature*, 402: 309–13
111. MIGLIACCIO E, GIORGIO M, PELICCI P. G. 2006. Apoptosis and aging: role of p66Shc redox protein. *Antioxid Redox Signal.*, 8: 600–8.
112. MIGLIACCIO E, MELE S, SALCINI AE, PELICCI G, LAI KM, SUPERTI-FURGA G, PAWSON T, DI FIORE PP, LANFRANCONE L, PELICCI PG. 1997. Opposite effects of the p52shc/p46shc and p66shc splicing isoforms on the EGF receptor-MAP kinase-fos signalling pathway. *EMBO J.*, 16: 706–16
113. MILLER B, PALYGIN O, RUFANOVA V. A, CHONG A, LAZAR J, JACOB H. J, MATTSON D, ROMAN R. J, WILLIAMS J. M, COWLEY A. W. 2016. p66Shc regulates renal vascular tone in hypertension-induced nephropathy. *J. Clin. Invest.*, 126: 2533–2546.
114. MILLER D. R, INGERSOLL M. A, CHATTERJEE A, BAKER B, SHRISHRIMAL S, KOSMACEK E. A, ZHU Y, CHENG P-W, OBERLEY-DEEGAN R. E, LIN M-F. 2019.



- p66Shc protein through a redox mechanism enhances the progression of prostate cancer cells towards castration-resistance. *Free Radic. Biol. Med.*, 139: 24–34.
115. MILLER N. J., RICE-EVANS C., DAVIES M. J., GOPINATHAN V., MILNER A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond)*., 84 (4): 407-12.
  116. MIR H. A, ALI R, MUSHTAQ U, KHANDAY F. A. 2020. Structure-functional implications of longevity protein p66Shc in health and disease. *Ageing Res Rev.*, 63: 101139.
  117. MISSIROLI S, PERRONE M, GENOVESE I, PINTON P, GIORGI C. 2020. Cancer metabolism and mitochondria: Finding novel mechanisms to fight tumours. *EBioMedicine*, 59: 102943.
  118. MIYAZAWA M & TSUJI Y. 2014. Evidence for a novel antioxidant function and isoform-specific regulation of the human p66Shc gene. *Mol Biol Cell.*, 25 (13): 2116-27.
  119. MODICA-NAPOLITANO J. S, KULAWIEC M, SINGH K. K. 2007. Mitochondria and human cancer. *Current Molecular Medicine*, 7: 121-131.
  120. MORENO-SÁNCHEZ R, RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ S, MARÍN-HERNÁNDEZ A, SAAVEDRA E. 2007. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.*, 274 (6): 1393-418.
  121. MOVAHED Z. G, RASTEGARI-POUYANI M, MOHAMMADI M. H, MANSOURI K. 2019. Cancer cells change their glucose metabolism to overcome increased ROS: One step from cancer cell to cancer stem cell? *Biomed Pharmacother.*, 112: 108690.
  122. MUHAMMAD N, CAI-PING T, NASREEN S, MAO Z-W. 2021. Redirecting Cisplatin and Doxorubicin to Mitochondria Affords Highly Effective Platinum IV Prodrug Against Triple Negative Breast Cancer. *Chem Asian J.*, 16 (16): 2276-2279.
  123. MUNIYAN S, CHOU Y. W, TSAI T. J, THOMES P, VEERAMANI S, BENIGNO B. B, WALKER L. D, MCDONALD J. F, KHAN S. A, LIN F. F, LELE S. M, LIN M. F. 2015. p66Shc longevity protein regulates the proliferation of human ovarian cancer cells. *Mol Carcinog.*, 54 (8): 618-31.
  124. MUÑOZ-MALDONADO C, ZIMMER Y, MEDOVÁ M. 2019. A Comparative Analysis of Individual RAS Mutations in Cancer Biology. *Front. Oncol.*, 9: 1088.
  125. MURPHY M. P & HARTLEY R. C. 2018. Mitochondria as a therapeutic target for common pathologies. *Nat Rev Drug Discov.*, 17 (12): 865-886.
  126. NAKAGAWARA A, ARIMA-NAKAGAWARA M, SCAVARDA N. J, AZAR C. G, CANTOR A. B, BRODEUR G. M. 1993. Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.*, 328: 847–854.
  127. NAKAMURA T, MURAOKA S, SANOKAWA R, MORI N. 1998. N-Shc and Sck, two neuronally expressed Shc adapter homologs. Their differential regional expression in the brain and roles in neurotrophin and Src signaling. *J Biol Chem.*, 273: 6960–7.
  128. NAKAMURA T, SANOKAWA R, SASAKI Y, AYUSAWA D, OISHI M, MORI N. 1996. N-Shc: a neural-specific adapter molecule that mediates signaling from neurotrophin/Trk to Ras/MAPK pathway. *Oncogene*, 13: 1111-1121.
  129. NAPOLI C, MARTIN-PADURA I, DE NIGRIS F, GIORGIO M, MANSUETO G, SOMMA P, CONDORELLI M, SICA G, DE ROSA G, PELICCI P. 2003. Deletion of the p66Shc

- longevity gene reduces systemic and tissue oxidative stress, vascular cell apoptosis, and early atherogenesis in mice fed a high-fat diet. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100 (4): 2112–2116.
130. NATALICCHIO A, TORTOSA F, PERRINI S, LAVIOLA L, GIORGINO F. 2011. p66Shc, a multifaceted protein linking Erk signalling, glucose metabolism, and oxidative stress. *Arch Physiol Biochem.*, 117: 116–24.
  131. NEMOTO S & FINKEL T. 2002. Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. *Science* 295 (5564): 2450-2.
  132. NEMOTO S, COMBS C. A, FRENCH S, AHN B. H, FERGUSSON M. M, BALABAN R. S, FINKEL T. 2006 BERNIAKOVICH. The mammalian longevity-associated gene product p66shc regulates mitochondrial metabolism. *J. Biol. Chem.*, 281: 10555–10560.
  133. NEUPERT W, HERRMANN J.M. 2007. Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem.*, 76: 723-49.
  134. NOUWS J, NIJTMANS L. G, SMEITINK J. A, VOGEL R. O. 2012. Assembly factors as a new class of disease genes for mitochondrial complex I deficiency: Cause, pathology and treatment options. *Brain*, 135: 12–22.
  135. NOWAK E, KAMMERER S, KÜPPER J-H. 2018. ATP-based cell viability assay is superior to trypan blue exclusion and XTT assay in measuring cytotoxicity of anticancer drugs Taxol and Imatinib, and proteasome inhibitor MG-132 on human hepatoma cell line HepG2. *Clin Hemorheol Microcirc.*, 69 (1-2): 327-336.
  136. NUNNARI J & SUOMALAINEN A. 2012. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*, 16; 148 (6): 1145-59.
  137. O'BRYAN J. P, SONGYANG Z, CANTLEY L, DER C. J, PAWSON T. 1996. A mammalian adaptor protein with conserved Src homology 2 and phosphotyrosine-binding domains is related to Shc and is specifically expressed in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 93: 2729-2734.
  138. OKADA S, KAO A. W, CERESA B. P, BLAIKIE P, MARGOLIS B, PESSIN J. E. 1997. The 66- kDa Shc isoform is a negative regulator of the epidermal growth factor-stimulated mitogen activated protein kinase pathway. *J Biol Chem.*, 272: 28042-28049.
  139. OKAMURA K, HARADA T, WANG S, IJICHI K, FURUYAMA K, KOGA T, OKAMOTO T, TAKAYAMA K, YANO T, NAKANISHI Y. 2012. Expression of TrkB and BDNF is associated with poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 78: 100–106.
  140. OPARKA M., WALCZAK J., MALINSKA D., VAN OPPEN L.M.P.E., SZCZEPANOWSKA J., KOOPMAN W.J.H., WIECKOWSKI M.R. 2016. Quantifying ROS levels using CM-H2DCFDA and HyPer. *Methods*, 109: 3-11.
  141. ORSINI F, MIGLIACCIO E, MORONI M, CONTURSI C, RAKER V. A, PICCINI D, MARTIN-PADURA I, PELLICCIA G, TRINEI M, BONO M, PURI C, TACCHETTI C, FERRINI M, MANNUCCI R, NICOLETTI I, LANFRANCONE L, GIORGIO M, PELICCI P. G. 2004. The life span determinant p66Shc localizes to mitochondria where it associates with mitochondrial heat shock protein 70 and regulates trans-membrane potential. *J Biol Chem.*, 279 (24): 25689-95.

142. OSHIKAWA J, KIM S. J, FURUTA E, CALICETI C, CHEN G. F, MCKINNEY R. D, KUHR F, LEVITAN I, FUKAI T AND USHIO-FUKAI M. 2012. Novel role of p66Shc in ROS-dependent VEGF signaling and angiogenesis in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 302: H724-H732.
143. OWENS K. M, KULAWIEC M, DESOUKI M. M, VANNIARAJAN A, SINGH K. K. 2011. Impaired OXPHOS Complex III in Breast Cancer. *PLoS One*, 6 (8): e23846.
144. PACINI S, PELLEGRINI M, MIGLIACCIO E, PATRUSSI L, ULIVIERI C, VENTURA A, CARRARO F, NALDINI A, LANFRANCONE L, PELICCI P, BALDARI C. T. 2004. p66Shc promotes apoptosis and antagonizes mitogenic signaling in T cells. *Molecular and Cellular Biology*, 24: 1747–1757.
145. PANI G & GALEOTTI T. 2011. Role of MnSOD and p66shc in mitochondrial response to p53. *Antioxid Redox Signal.*, 15: 1715–27.
146. PANI G. 2010. p66SHC and ageing: ROS and TOR? *Aging*, 2 (8): 514–518. *Aging (Albany NY)*. 2010 Aug; 2(8): 514–518
147. PARK Y. J, KIM T. Y, LEE S. H, KIM H, KIM S. W, SHONG M, YOON Y. K, CHO B. Y, PARK D. J. 2005. p66Shc expression in proliferating thyroid cells is regulated by thyrotropin receptor signaling. *Endocrinology*, 146: 2473–80.
148. PEJOVIC T, LADNER D, INTENGAN M, ZHENG K, FAIRCHILD T, DILLON D, EASLEY S, MARCHETTI D, SCHWARTZ P, LELE S, COSTA J, ODUNSI K. 2004. Somatic D-loop mitochondrial DNA mutations are frequent in uterine serous carcinoma. *Eur. J. Cancer*, 40: 2519–2524.
149. PELICCI G, LANFRANCONE L, GRIGNANI F, MCGLADE J, CAVALLO F, FORNI G, NICOLETTI I, GRIGNANI F, PAWSON T, PELICCI PG. 1992. A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell*, 70 (1): 93 – 104.
150. PELICCI G, DENTE L, DE GIUSEPPE A, VERDUCCI-GALLETTI B, GIULI S, MELE S, VETRIANI C, GIORGIO M, PANDOLFI P.P, CESARENI G, PELICCI P. G. 1996. A family of Shc related proteins with conserved PTB, CH1 and SH2 regions. *Oncogene*, 13: 633–641.
151. PELLEGRINI M & BALDARI C. T. 2009. Apoptosis and oxidative stress-related diseases: the p66Shc connection. *Curr Mol Med.*, 9: 392-398.
152. PELLEGRINI M, PACINI S, BALDARI C. T. 2005. p66SHC: the apoptotic side of Shc proteins. *Apoptosis*, 10 (1): 13-8.
153. PÉREZ H, FINOCCHIETTO P. V, ALIPPE Y, REBAGLIATI I, ELGUERO M. E, VILLALBA N, PODEROSO J. J, CARRERAS M. C. 2018. p66Shc inactivation modifies RNS production, regulates Sirt3 activity, and improves mitochondrial homeostasis, delaying the aging process in mouse brain. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2018: 8561892.
154. PESARESI M. G, AMORI I, GIORGI C, FERRI A, FIORENZO P, GABANELLA F, SALVATORE A. M, GIORGIO M, PELICCI P. G, PINTON P. 2011. Mitochondrial redox signalling by p66Shc mediates ALS-like disease through Rac1 inactivation. *Hum. Mol. Genet.*, 20: 4196–4208.
155. PINTON P & RIZZUTO R. 2008. p66Shc, oxidative stress and aging: importing a lifespan determinant into mitochondria. *Cell Cycle*, 7: 304–308.

156. PINTON P, RIMESSI A, MARCHI S, ORSINI F, MIGLIACCIO E, GIORGIO M, CONTURSI C, MINUCCI S, MANTOVANI F, WIECKOWSKI M. R, DEL SAL G, PELICCI P. G, RIZZUTO R. 2007. Protein kinase C beta and prolyl isomerase 1 regulate mitochondrial effects of the life-span determinant p66Shc, *Science* 315: 659–663.
157. POLLACK I. F, AGNIHOTRI S, BRONISER A. 2019. Childhood brain tumors: Current management, biological insights, and future directions. *J. Neurosurg. Pediatr.*, 23: 261–273.
158. POYTON R. O & MCEWEN J. E. 1996. Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Annu Rev Biochem.*, 65: 563–607.
159. PRILL M, KARKUCINSKA-WIECKOWSKA A, LEBIEDZINSKA-ARCISZEWSKA M, MORCIANO G, CHARZYNSKA A, DABROWSKI M, PRONICKI M, PINTON P, GRAJKOWSKA W, WIECKOWSKI M. R. 2021. Ras, TrkB, and ShcA Protein Expression Patterns in Pediatric Brain Tumors. *J Clin Med.*, 10 (10): 2219.
160. PROTASONI M & ZEVIANI M. 2021. Mitochondrial Structure and Bioenergetics in Normal and Disease Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (2): 586.
161. RAFFAELLO A & RIZZUTO R. 2010. Mitochondrial longevity pathways. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813: 260-268.
162. RAJENDRAN M, THOMES P, ZHANG L, VEERAMANI S, LIN M. F. 2010. p66Shc-a longevity redox protein in human prostate cancer progression and metastasis : p66Shc in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*, 29 (1): 207-22.
163. RAN F.A., HSU P.D., WRIGHT J., AGARWALA V., SCOTT D.A., ZHANG F. 2013. Genome Engineering Using the CRISPR-Cas9 System. *Nat Protoc.*, 8 (11): 2281-2308.
164. RANIERI S. C, FUSCO S, PANIERI E, LABATE V, MELE M, TESORI V, FERRARA A. M, MAULUCCI G, DE SPIRITO M, MARTORANA G. E. 2010. Mammalian life-span determinant p66shcA mediates obesity-induced insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 107: 13420–13425.
165. RAVICHANDRAN K. S, LEE K. K, SONGYANG Z, CANTLEY L. C, BURN P, BURAKOFF S. J. 1993. Interaction of Shc with the zeta chain of the T cell receptor upon T cell activation. *Science* 262: 902-905.
166. RAVICHANDRAN K. S. 2001. Signaling via Shc family adapter proteins. *Oncogene*, 20: 6322–6330.
167. RAY P. D, HUANG B-W, TSUJI Y. 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.*, 24 (5): 981–990.
168. REDA A, REFAAT A, ABD-RABOU A. A, MAHMOUD A. M, ADEL M, SABET S, ALI S. S. 2019. Role of mitochondria in rescuing glycolytically inhibited subpopulation of triple negative but not hormone-responsive breast cancer cells. *Sci Rep.*, 9 (1): 13748.
169. REICHERT AS & NEUPERT W. 2004. Mitochondriomics or what makes us breathe. *Trends Genet.*, 20 (11): 555-562.
170. REYLAND M. E. 2009. Protein kinase C isoforms: Multi-functional regulators of cell life and death. *Front. Biosci.*, 14: 2386–2399.

171. ROZAKIS-ADCOCK M, MCGLADE J, MBAMALU G, PELICCI G, DALY R, LI W, BATZER A, THOMAS S, BRUGGE J, PELICCI P. G, SCHLESSINGER J, PAWSON T I WSP. 1992. Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature*, 360: 689–92.
172. RYŚ-BEDNARSKA M & ROMANOWICZ H. 2012. Potrójnie ujemny rak piersi – diagnostyka i leczenia. *Journal of Oncology*, 62 (6): 450 – 454.
173. SAKAO K & SINGH S. V. 2012. D,L-sulforaphane-induced apoptosis in human breast cancer cells is regulated by the adapter protein p66Shc. *J Cell Biochem.*, 113 (2): 599-610.
174. SALLES D, LAVIOLA G, MALINVERNI A. C. M, STAVALE J. N. 2020. Pilocytic Astrocytoma: A Review of General, Clinical, and Molecular Characteristics. *J. Child Neurol.*, 35: 852–858.
175. SANSONE P, STORCI G, GIOVANNINI C, PANDOLFI S, PIANETTI S, TAFFURELLI M, SANTINI D, CECCARELLI C, CHIECO P, BONAFÉ M. 2007. p66Shc/Notch-3 interplay controls self-renewal and hypoxia survival in human stem/progenitor cells of the mammary gland expanded in vitro as mammospheres. *Stem Cells*, 25: 807– 15.
176. SCHEID A. D, BEADNELL T. C, WELCH D. R. 2021. Roles of mitochondria in the hallmarks of metastasis. *British Journal of Cancer*, 124: 124–135.
177. SCHRINER S. E, LINFORD N. J, MARTIN G. M, TREUTING P, OGBURN C. E, EMOND M, COSKUN P. E, LADIGES W, WOLF N, VAN REMMEN H. 2005. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science*, 308: 1909–1911.
178. SEYFRIED T. N, ARISMENDI-MORILLO G, MUKHERJEE P, CHINOPOULOS C. 2020. On the Origin of ATP Synthesis in Cancer. *iScience*. 23 (11): 101761.
179. SIGNES A & FERNANDEZ-VIZARRA E. 2018. Assembly of mammalian oxidative phosphorylation complexes I-V and supercomplexes. *Essays Biochem.*, 62 (3): 255-270.
180. SKEHAN P., STORENG R., SCUDIERO D., MONKS A., MCMAHON J., VISTICA D., WARREN J.T., BOKESCH H., KENNEY S., BOYD M.R. 1990. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *J Natl Cancer Inst.*, 82 (13): 1107-12.
181. SOLIMAN M.A, RAHMAN A.M.A, LAMMING D.W, BIRSOY K, PAWLING J, FRIGOLET M.E, LU H, FANTUS I.G, PASCULESCU A, ZHENG Y, SABATINI D.M, DENNIS J.W, PAWSON T. 2014. The adaptor protein p66Shc inhibits mTOR-dependent anabolic metabolism. *Sci Signal.*, 7 (313): ra17.
182. STCLAIR D. K & HOLLAND J. C. 1991. Complementary DNA encoding human colon cancer manganese superoxide dismutase and the expression of its gene in human cells. *Cancer Res.*, 51 (3): 939-943.
183. STEVENSON L. E, FRACKELTON A. R. 1998. Constitutively tyrosine phosphorylated p52Shc in breast cancer cell: correlation with ErbB2 and p66Shc expression. *Breast Cancer Res Treat*, 49: 119-128.
184. STORZ P. 2005. Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci.*, 10: 1881-96.

185. SULLIVAN L. B, GUI D. Y, VANDER HEIDEN M. G. 2016. Altered metabolite levels in cancer: implications for tumour biology and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 16 (11): 680-693.
186. SZATROWSKI T. P & NATHAN C. F. 1991. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.*, 51: 794–8.
187. TAKEUCHI H, FUJIMOTO A, HOON D. S. 2004. Detection of mitochondrial DNA alterations in plasma of malignant melanoma patients. *Ann N Y Acad Sci.*, 1022: 50-54
188. TAMORI A, NISHIGUCHI S, NISHIKAWA M, KUBO S, KOH N, HIROHASHI K, SHIOMI S, INOUE M. 2004. Correlation between clinical characteristics and mitochondrial D-loop DNA mutations in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.*, 39 (11): 1063–1068.
189. TAN D. J, BAI R. K, WONG L. J. C. 2002. Comprehensive scanning of somatic mitochondrial DNA mutations in breast cancer. *Cancer Res.*, 62: 972-976.
190. TANAKA K, SHIMURA T, KITAJIMA T, KONDO S, IDE S, OKUGAWA Y, SAIGUSA S, TOIYAMA Y, INOUE Y, ARAKI K. T, UCHIDA K, MOHRI Y, KUSUNOKI M. 2014. Tropomyosin-related receptor kinase B at the invasive front and tumour cell dedifferentiation in gastric cancer. *Br. J. Cancer.*, 110: 2923–2934.
191. TERADA L. S. 2019. Shc and the mechanotransduction of cellular anchorage and metastasis. *Small GTPases*, 10 (1): 64-71.
192. TERUI E, MATSUNAGA T, YOSHIDA H, KOUCHI K, KURODA H, HISHIKI T, SAITO T, YAMADA S.-I, SHIRASAWA H, OHNUMA N. 2005. Shc family expression in neuroblastoma: High expression of shcC is associated with a poor prognosis in advanced neuroblastoma. *Clin. Cancer Res.*, 11: 3280–3287.
193. THORN CF, OSHIRO C, MARSH S, HERNANDEZ-BOUSSARD T, MCLEOD H, KLEIN TE, ALTMAN RB. 2012. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics*, 21 (7): 440–446.
194. TOMILOV A. A, BICOCCA V, SCHOENFELD R. A, GIORGIO M, MIGLIACCIO E, RAMSEY J. J, HAGOPIAN K, PELICCI P. G, CORTOPASSI G. A. 2010. Decreased superoxide production in macrophages of long-lived p66Shc knock-out mice. *J Biol Chem.*, 285: 1153-1165.
195. TOMILOV A. A, RAMSEY J. J, HAGOPIAN K, GIORGIO M, KIM K. M, LAM A, MIGLIACCIO E, LLOYD K. C, BERNIAKOVICH I, PROLLA T. A, PELICCI P, CORTOPASSI G. A. 2011. The Shc locus regulates insulin signaling and adiposity in mammals. *Aging Cell* 10: 55–65.
196. TOMITA K, TERATANI T, SUZUKI T, OSHIKAWA T, YOKOYAMA H, SHIMAMURA K, NISHIYAMA K, MATAKI N, IRIE R, MINAMINO T. 2012. p53/p66Shc-mediated signaling contributes to the progression of non-alcoholic steatohepatitis in humans and mice. *J. Hepatol.*, 57: 837–843.
197. TOMITA K, TERATANI T, SUZUKI T, OSHIKAWA T, YOKOYAMA H, SHIMAMURA K, NISHIYAMA K, MATAKI N, IRIE R, MINAMINO T. 2012. p53/p66Shc-mediated signaling contributes to the progression of non-alcoholic steatohepatitis in humans and mice. *J. Hepatol.*, 57: 837–843.

198. TRINEI M, BERNIAKOVICH I, BELTRAMI E, MIGLIACCIO E, FASSINA A, PELICCI P. G, GIORGIO M. 2009. p66Shc signals to age. *Aging (Albany NY)*, 1 (6): 503-10.
199. TRINEI M, GIORGIO M, CICALESE A, BAROZZI S, VENTURA A, MIGLIACCIO E, MILIA E, MARTIN PADURA I, RAKER V. A, MACCARANA M, PETRONILLI V, MINUCCI S, BERNARDI P, LANFRANCONE L, PELICCI P. G. 2002. A p53-p66Shc signalling pathway controls intracellular redox status, levels of oxidation-damaged DNA and oxidative stress induced apoptosis. *Oncogene*, 21: 3872-3878.
200. TRINEI M, STENDARDO M, MIGLIACCIO E, MINUCCI S, BERNARDI P, PELICCI P. G, GIORGIO M. 2008. p66Shc-generated oxidative signal promotes fat accumulation. *Journal of Biological Chemistry*, 283: 34283–34293.
201. UM S. H, D’ALESSIO D, THOMAS G. 2006. Nutrient overload, insulin resistance, and ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1. *Cell Metab.*, 3: 393–402.
202. URSINI-SIEGEL J & MULLER W. J. 2008. The ShcA adaptor protein is a critical regulator of breast cancer progression. *Cell Cycle*, 7: 1936–1943.
203. VANDER HEIDEN M. G, CANTLEY L. C, THOMPSON C. B. 2009. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*, 324 (5930): 1029–1033.
204. VEERAMANI S, CHOU Y. W, LIN F. C, MUNIYAN S, LIN F. F, KUMAR S, XIE Y, LELE S. M, TU Y, LIN M-F. 2012. Reactive oxygen species induced by p66Shc longevity protein mediate nongenomic androgen action via tyrosine phosphorylation signaling to enhance tumorigenicity of prostate cancer cells. *Free Radic Biol Med.*, 53: 95–108.
205. VEERAMANI S, IGAWA T, YUAN T. C, LIN F. F, LEE M. S, LIN J. S, JOHANSSON S. L, LIN M. F. 2005. Expression of p66(Shc) protein correlates with proliferation of human prostate cancer cells. *Oncogene*, 24: 7203–12.
206. VEERAMANI S, YUAN T. C, LIN F. F, LIN M. F. 2008. Mitochondrial redox signaling by p66Shc is involved in regulating androgenic growth stimulation of human prostate cancer cells. *Oncogene*, 27 (37): 5057-68.
207. VENTURA A, LUZI L, PACINI S, BALDARI C. T, PELICCI P. G. 2002. The p66Shc longevity gene is silenced through epigenetic modifications of an alternative promoter. *J Biol Chem.*, 277: 22370–76.
208. VENTURA A, MACCARANA M, RAKER V. A, PELICCI P. G. 2004. A cryptic targeting signal induces isoform-specific localization of p46Shc to mitochondria. *J Biol Chem.*, 279: 2299–306.
209. VICHAI V & KIRTIKARA K. 2006. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, 1: 1112–1116.
210. VIKRAM A, KIM Y-R, KUMAR S, NAQVI A, HOFFMAN T. A, KUMAR A, MILLER JR F. J, KIM C-S, IRANI K. 2014. Canonical Wnt signaling induces vascular endothelial dysfunction via p66Shc-regulated reactive oxygen species. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 34: 2301–2309.
211. VYAS S, ZAGANJOR E, HAIGIS M. C. 2016. Mitochondria and cancer. *Cell*, 166 (3): 555-566.
212. WALLACE D. C. 2012. Mitochondria and cancer. *Nature Review Cancer*, 12: 685 – 698.

213. WALLACE K. B, SARDÃO V. A, OLIVEIRA P. J. 2020. Mitochondrial Determinants of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy, *Circulation Research*, 126: 926–941.
214. WANG Y, LIU T, PAN W, CHI H, CHEN J, YU Z, CHEN C. 2016. Small molecule compounds alleviate anisomycin-induced oxidative stress injury in SH-SY5Y cells via downregulation of p66shc and A $\beta$ 1-42 expression. *Exp. Ther. Med.*, 11: 593–600.
215. WARBURG O, WIND F, NEGELEIN E. 1927. The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol.*, 8 (6): 519-530.
216. WARD P. S & THOMPSON C. B. 2012. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell*, 21: 297-308.
217. WEERTS M. J. A, SLEIJFER S, MARTENS J. W. M. 2019. The role of mitochondrial DNA in breast tumors. *Drug Discovery Today*, 24 (5): 1202-1208.
218. WIECKOWSKI M. R, GIORGI C, LEBIEDZINSKA M, DUSZYNSKI J, PINTON P. 2009. Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. *Nat Protoc.*, 4: 1582–90.
219. WIGNER P, ZIELINSKI K, LABIENIEC-WATALA M, MARCZAK A, SZWED M. 2021. Doxorubicin-transferrin conjugate alters mitochondrial homeostasis and energy metabolism in human breast cancer cells. *Scientific Reports*, 11 (1): 4544.
220. WOJTAŁA A., BONORA M., MALINSKA D., PINTON P., DUSZYNSKI J., I WIECKOWSKI M.R. 2014. Methods to monitor ROS production by fluorescence microscopy and fluorometry. *Methods Enzymol.*, 542: 243 – 262.
221. WRIGHT, K. D, STARUSCHENKO A, SOROKIN A. 2018. Role of adaptor protein p66Shc in renal pathologies. *Am. J. Physiol.*, 314: F143–F153.
222. WU C.W, YIN P.H, HUNG W.Y, LI A.F, LI S.H, CHI C.W, WEI Y.H, LEE H.C. 2005. Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial DNA depletion in gastric cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 44 (1): 19-28.
223. XIE Y & HUNG M. C. 1996. p66Shc isoform down-regulated and not required for HER- 2/neu signaling pathway in human breast cancer cell lines with HER-2/neu overexpression. *Biochem Biophys Res Commun.*, 221: 140–5.
224. XU X, ZHU X, MA M, HAN Y, HU C, YUAN S, YANG Y, XIAO L, LIU F, KANWAR Y. S. 2016. p66Shc: a novel biomarker of tubular oxidative injury in patients with diabetic nephropathy. *Sci. Rep.* 6, 1–11.
225. YANG S.K, XIAO L, LI J, LIU F, SUN L. 2014. Oxidative stress, a common molecular pathway for kidney disease: role of the redox enzyme p66Shc. *Ren. Fail.*, 36: 313–320.
226. YU T, JHUN B. S, YOON Y. 2011. High-glucose stimulation increases reactive oxygen species production through the calcium and mitogen-activated protein kinase-mediated activation of mitochondrial fission. *Antioxidants & redox signaling*, 14: 425-437.
227. YUAN H, SU L, CHEN W. Y. 2013. The emerging and diverse roles of sirtuins in cancer: a clinical perspective. *Onco Targets Ther.*, 6: 1399–416.
228. ZAMPIERI N & CHAO M. V. 2006. Mechanisms of neurotrophin receptor signalling. *Biochem. Soc. Trans.*, 34: 607–611.



229. ZHANG C, LI X, GAO D, RUAN H, LIN Z, LI X, LIU G, MA Z, LI X. 2017. The prognostic value of over-expressed TrkB in solid tumors: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, 8: 99394–99401.
230. ZHANG J, LI Y, WANG B, LUO Y, SHI J, ZHAO B. 2020. The p66shc-mediated regulation of hepatocyte senescence influences hepatic steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Med. Sci. Monitor*, 26: e921887–921881.
231. ZHANG Y, FUJIWARA Y, DOKI Y, TAKIGUCHI S, YASUDA T, MIYATA H, YAMAZAKI M, NGAN C. Y, YAMAMOTO H, MA Q, MONDEN M. 2008. Overexpression of tyrosine kinase B protein as a predictor for distant metastases and prognosis in gastric carcinoma. *Oncology*, 75: 17–26.
232. ZHAO M-H, HU J, LI S, WU Q, LU P. 2018. P66Shc expression in diabetic rat retina. *BMC Ophthalmol.*, 18: 58.
233. ZHAO, Y.B, YANG, H.Y, ZHANG, X.W, CHEN, G.Y. 2005. Mutation in D-loop region of mitochondrial DNA in gastric cancer and its significance. *World J. Gastroenterol.*, 11: 3304–3306.
234. ZHENG Z, YANG J, ZHAO D, GAO D, YAN X, YAO Z, LIU Z, MA Z. 2013. Downregulated adaptor protein p66(Shc) mitigates autophagy process by low nutrient and enhances apoptotic resistance in human lung adenocarcinoma A549 cells. *FEBS J.*, 280: 4522–30.
235. ZIMMERMANN F. A, MAYR J. A, NEUREITER D, FEICHTINGER R, ALINGER B, JONES N. D, EDER W, SPERL W, KOFLER B. 2009. Lack of complex I is associated with oncocytic thyroid tumours. *Br J Cancer*, 100 (9): 1434-1437.