

Wydział Lekarski Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego



Tomasz Przybyła

Rozprawa doktorska

Ekspresja genów *TWIST1* i *IDI* w komórkach raka jelita grubego

Expression of *TWIST1* and *IDI* genes in colorectal cancer cells

Praca wykonana w Zakładzie Medycyny Molekularnej

Katedry Biochemii Klinicznej

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotor pracy:

dr hab. n. med. Monika Sakowicz-Burkiewicz

Kierownik Katedry i Zakładu:

prof. dr hab. n. med. Tadeusz Pawełczyk

Gdańsk, 2017

Pragnę złożyć serdeczne wyrazy podziękowania

promotorowi niniejszej pracy, Pani dr hab. n. med. Monice Sakowicz-Burkiewicz za pomoc i wszelkiego rodzaju wsparcie na każdym etapie powstawania tej pracy oraz za mobilizację do ciągłego rozwoju naukowego. Dziękuję również za dużą dozę wyrozumiałości i cierpliwości.

Serdeczne podziękowania składam również na ręce

kierownika Zakładu Medycyny Molekularnej, Pana prof. dr hab. n. med. Tadeusza Pawełczyka za umożliwienie mi wykonania badań w niniejszym zakładzie, jak i za okazane zainteresowanie przebiegiem pracy oraz udzielane wsparcie.

Dziękuję również gorąco

Pani prof. dr hab. n. med. Izabeli Maciejewskiej za rozbudzenie zainteresowania tematyką będącą przedmiotem niniejszej rozprawy oraz nieocenione wsparcie merytoryczne.

Ciepłe słowa podziękowania kieruję również

do wszystkich koleżanek z Zakładu Medycyny Molekularnej za życzliwą atmosferę pracy oraz ciągłą gotowość do pomocy.

Ponadto dziękuję

pracownikom Zakładu Medycyny Laboratoryjnej Katedry Biochemii Klinicznej.

Z całego serca dziękuję również

moim rodzicom, rodzeństwu, ukochanej babci i całej rodzinie za kibicowanie mi i wsparcie na każdym etapie mojej pracy.

Szczególne wyrazy podziękowania należą się

mojej narzeczonej Dominice, za nieustanną motywację, wsparcie oraz cierpliwość i wyrozumiałość.

Niniejsza rozprawa ma charakter spójnego tematycznie zbioru składającego się z trzech prac opublikowanych w recenzowanych czasopismach:

1. **Przybyła, T.**, Sakowicz-Burkiewicz, M., & Maciejewska, I. (2014). **TWIST1 is one of key factors in epithelial-mesenchymal transition in cancer**. *Postępy Biologii Komorki*, 41(4), 683-699.
2. Sakowicz-Burkiewicz, M., **Przybyła, T.**, Wesserling, M., Bielarczyk, H., Maciejewska, I., & Pawelczyk, T. (2016). **Suppression of TWIST1 enhances the sensitivity of colon cancer cells to 5-fluorouracil**. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 78, 268-278. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.07.024>. IF: 3,905
3. **Przybyła, T.**, Sakowicz-Burkiewicz, M., Maciejewska, I., Bielarczyk, H., & Pawelczyk, T. (2017). **Suppression of ID1 expression in colon cancer cells increases sensitivity to 5-fluorouracil**. *Acta Biochimica Polonica*. https://doi.org/10.18388/abp.2016_1421. IF: 1,456

Rak jelita grubego

Rak jelita grubego jest klasyfikowany w czołówce zgonów wśród chorób nowotworowych na całym świecie, pomimo znacznych postępów w diagnostyce oraz leczeniu pacjentów (Ferlay *i wsp.*, 2010). Roczna światowa zachorowalność na raka jelita grubego szacowana jest na poziomie 1,2 mln., natomiast liczba zgonów na poziomie 600 tys. (Brenner *i wsp.*, 2014). Rak jelita grubego zajmuje trzecie miejsce w Polsce na liście najczęściej występujących nowotworów złośliwych (Potemski *i wsp.*, 2010). Dotychczas zidentyfikowano wiele biomarkerów i szlaków molekularnych zaangażowanych w progresję raka jelita grubego. Można tutaj wymienić: mutacje w genach *APC*, *DCC*, *TP53*, *KRAS*, *BRAF* oraz niestabilności mikrosatelitarne (Markowitz *i wsp.*, 2009). Podstawową metodą leczenia raka jelita grubego pozostaje resekcja chirurgiczna, jednakże stanowi ona wystarczający środek jedynie w przypadku części pacjentów we wczesnym stadium zaawansowania choroby. Stopień I i II zaawansowania raka jelita grubego zgodnie z klasyfikacją TNM, wiąże się z korzystną prognozą dla chorego, a pięcioletni okres przeżycia wynosi odpowiednio 93% i 82%. W przypadku chorych z III i IV stopniem zaawansowania zgodnie z klasyfikacją TNM, rokowanie pozostaje mniej korzystne, a okres przeżycia pięcioletniego maleje odpowiednio do 60% i 8% (O'Connell *i wsp.*, 2004). W celu poprawienia rokowania pacjentów z wyższymi stopniami zaawansowania raka jelita grubego, stosuje się terapię adjuwantową (Wolpin *i wsp.*, 2007).

5-fluorouracyl (5-FU) jest jednym z najwcześniej wprowadzonych do użycia chemioterapeutyków i od ponad pięćdziesięciu lat jest z powodzeniem stosowany w chemioterapii raka jelita grubego (Hammond *i wsp.*, 2016). Mechanizm działania 5-FU wiąże się z zahamowaniem replikacji DNA i śmiercią komórki. Pierwotny metabolit 5-FU, monofosforan 5-fluorodeoksyurydyny (FdUMP) jest inhibitorem enzymu syntazy tymidylanowej (TYMS), która katalizuje syntezę monofosforanu deoksytymidyny (dTMP). Niewystarczająca biodostępność dTMP skutkuje zaburzeniem procesu syntezy DNA w dzielących się komórkach. Szlak metabolizmu 5-FU może również przebiegać z przekształceniem związku do analogów deoksynukleotydów, tj. trójfosforanu 5-fluorouracydyny (5-FUTP) oraz trójfosforanu 5-fluorodeoksyurydyny (5-FdUTP), które ulegają włączeniu do replikowanego DNA skutkując zaburzeniem procesu translacji i następczą śmiercią komórek (Janet *i wsp.*, 2010; Hammond *i wsp.*, 2016). Jednym z poważnych problemów związanych z adjuwantową terapią 5-FU jest nabywanie chemiooporności przez komórki raka jelita grubego (Hammond *i wsp.*, 2016). Uważa się, że za spadek wrażliwości komórek rakowych na 5-FU odpowiadają zmiany w poziomie

ekspresji genów kodujących enzymy metabolizujące ten związek oraz zmiany zachodzące w obrębie samych genów, takie jak: zmienne liczby powtórzeń tandemowych (ang. *variable numbers of tandem repeats*, VNTRs), polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (ang. *single nucleotide polymorphisms*, SNPs) oraz niestabilności mikrosatelitarne (ang. *microsatellite instabilities*, MSIs) (Hammond *i wsp.*, 2016).

W minionej dekadzie zidentyfikowano szereg czynników wzmagających oporność komórek raka na chemioterapeutyki, takich jak: zmiany w ekspresji białek transporterowych ABC, mutacje genów kodujących receptory czynników wzrostu, zaburzenie mechanizmów naprawy niesparowanych zasad oraz mechanizmów apoptozy (Holohan *i wsp.*, 2013). Transformacja nabłonkowo-mezenchymalna (ang. *epithelial to mesenchymal transition*, EMT), skutkująca nabyciem przez komórki rakowe cech mezenchymalnych, również uznawana jest za jeden z mechanizmów adaptacyjnych wzmagających oporność komórek nowotworowych na chemioterapię (Frederick *i wsp.*, 2007; Serova *i wsp.*, 2010; Wang *i wsp.*, 2010).

Transformacja nabłonkowo-mezenchymalna

EMT polega na zmianie fenotypu nabłonkowego w mezenchymalny w pojedynczej komórce lub grupie komórek. Komórki ulegające EMT wykazują reorganizację połączeń międzykomórkowych, utratę kształtu oraz polarności, przy jednoczesnym pozyskaniu zdolności migracyjnych (Baum *i wsp.*, 2008). Kluczowym etapem EMT jest degradacja połączeń międzykomórkowych na skutek zmian ekspresji transbłonowych białek – kadheryn. Zewnątrzkomórkowe domeny kadheryn sąsiadujących komórek oddziałują ze sobą, natomiast domeny cytoplazmatyczne łączą się z cytoszkieletem aktynowym poprzez kateniny (Wheelock *i wsp.*, 2008). W trakcie EMT dochodzi do spadku lub zaniku ekspresji E-kadheryny i jednoczesnego wzrostu ekspresji N-kadheryny (Baum *i wsp.*, 2008). E-kadheryna jest białkiem charakterystycznym dla tkanki nabłonkowej i zapewnia silną adhezję międzykomórkową, natomiast N-kadheryna będąca markerem tkanki mezenchymalnej w porównaniu do E-kadheryny generuje połączenia komórkowe o słabszym powinowactwie (Chu *i wsp.*, 2004). W przebiegu EMT kluczową rolę odgrywają czynniki transkrypcyjne związane z represją E-kadheryny takie jak SNAIL, ZEB, E47, KLF8, TWIST1, GSC, E2.2 i FOXC2 (Thierry *i wsp.*, 2009).

Proces EMT wiąże się również ze zmianą ekspresji specyficznych markerów powierzchniowych, jądrowych, macierzy pozakomórkowej oraz błony podstawnej. Jednym

z kluczowych markerów EMT jest β -katenina, odpowiadająca za łączenie kadheryn z cytoszkieletem oraz tworzenie kompleksu β -katenina/TCF/LEF kontrolującego ekspresję genów związanych z EMT (Zeisberg *i wsp.*, 2009). Kolejnymi ważnymi markerami EMT są fibronektyna współtworząca szkielet macierzy pozakomórkowej oraz wimentyna wchodząca w skład cytoszkieletu komórek mezenchymalnych (Zeisberg *i wsp.*, 2009). EMT wiąże się również z uruchomieniem ekspresji genów umożliwiających ochronę zmienionych mezenchymalnie komórek przed apoptozą (Baum *i wsp.*, 2008). EMT może mieć charakter fizjologiczny lub patologiczny. EMT fizjologiczne zachodzi w okresie rozwoju embrionalnego oraz podczas procesu gojenia się ran. Jako zjawisko patologiczne EMT występuje podczas transformacji nowotworowej (Thierry *i wsp.*, 2009). Uważa się, że EMT jest istotnym czynnikiem promującym w komórkach guza inwazyjność i zdolność do tworzenia przerzutów (Baum *i wsp.*, 2008). Zmiana fenotypu komórki nowotworowej z nabłonkowego na mezenchymalny umożliwia jej odłączenie od guza pierwotnego, migrację, intrawazację, przemieszczanie się wzdłuż układu naczyniowego, ekstrawazację i zagnieżdzenie w tkance docelowej (Baum *i wsp.*, 2008). Tam z kolei dochodzi do procesu odwrotnego do EMT, czyli transformacji mezenchymalno-nabłonkowej (ang. *mesenchymal to epithelial transition*, MET) skutkującej przywróceniem fenotypu nabłonkowej komórki i stabilizacją nowego ogniska nowotworowego (Cheng *i wsp.*, 2008).

EMT jest również uznawana za jeden z mechanizmów nabywania przez komórki nowotworowe oporności na chemioterapię (Frederick *i wsp.*, 2007; Serova *i wsp.*, 2010; Wang *i wsp.*, 2010). Wykazano, że fenotyp mezenchymalny związany jest z obniżeniem wrażliwości na inhibitory EGFR (erlotinib, gefitinib, cetuximab) w raku płuca, kolczystokomórkowym raku szyi i głowy oraz raku wątrobowokomórkowym (Fuchs *i wsp.*, 2006; Frederick *i wsp.*, 2007; Byers *i wsp.*, 2013). Na skutek EMT w komórkach rakowych dojść może również do nabycia oporności na chemioterapeutyki konwencjonalne takie jak paklitaksel, oksaliplatyna i lapatynib (Konecny *i wsp.*, 2008; Sabbah *i wsp.*, 2008; Arumugan *i wsp.*, 2009). Z drugiej strony, wymuszona nadekspresja miR-200c będącego negatywnym regulatorem EMT, przywraca wrażliwość komórek raka piersi i jajników na paklitaksel oraz cisplatinę (Cochrane *i wsp.*, 2009). Wykazano, że nadekspresja czynnika transkrypcyjnego SNAIL1 w komórkach czerniaka oraz raka piersi i jajnika skutkuje wykształceniem oporności na paklitaksel, adriamycynę oraz radiację poprzez zaburzenie szlaku apoptozy zależnego od p53 (Kajita *i wsp.*, 2004; Kurrey *i wsp.*, 2009).

TWIST1 i ID1

Białka bHLH (ang. *basic helix-loop-helix*) dzielą się na 7 klas, a ich wspólną cechą charakterystyczną, jest obecność konserwatywnej zasadowej domeny oraz struktury pętli oskrzydłonej dwiema amfipatycznymi helisami α (Massari *i wsp.*, 2000). Helisy uczestniczą w dimeryzacji białka z drugim czynnikiem transkrypcyjnym z rodziny bHLH. Odrębną grupę stanowią białka klasy V, które wyróżniają się brakiem regionu zasadowego. Uniemożliwia to wiązanie do DNA, dlatego białka klasy V pełnią rolę negatywnych regulatorów transkrypcji dla czynników klasy I i II (Massari *i wsp.*, 2000). W organizmach wielokomórkowych, czynniki bHLH biorą udział w wielu procesach rozwojowych, jak neurogeneza, miogeneza, hematopoeza, rozwój trzustki (Massari *i wsp.*, 2000).

TWIST1 jest czynnikiem transkrypcyjnym należącym do klasy II rodziny bHLH pełniącym kluczową rolę w różnicowaniu mezenchymy oraz tkanek pochodzenia mezenchymalnego. Aktywny transkrypcyjnie dimer TWIST1 wiąże się z sekwencją CATATG, zwaną kasetą E (ang. *E-box*), obecną w sekwencjach promotorów wielu genów. Jego ekspresja u osobników dorosłych pozostaje na niskim poziomie w zdefiniowanych obszarach (Ota *i wsp.*, 2004). Jednocześnie wykazano, że białko TWIST1 ulegające nadekspresji w dojrzałej komórce bierze istotny udział w rozwoju nowotworu (Yang *i wsp.*, 2004). TWIST1, w odróżnieniu od większości białek bHLH, może tworzyć zarówno aktywne homodimery (T/T), jak i heterodimery z białkami E12/E46 (T/E). Homodimery oraz heterodimery modulują odmienne ścieżki sygnalizacyjne, a ilościowy stosunek *in situ* każdej postaci dimeru jest determinowany poziomami ekspresji genów *TWIST1* i *ID1* (ang. *inhibitor of DNA binding 1*) (Connerney *i wsp.*, 2006; Maciejewska *i wsp.*, 2014). Białka ID preferencyjnie dimeryzują z białkami E, uniemożliwiając im w ten sposób tworzenie heterodimerów z TWIST1. W takiej sytuacji TWIST1 tworzy aktywne homodimery, natomiast przy braku ekspresji ID, TWIST1 łączy się w heterodimery T/E (Connerney *i wsp.*, 2006; Maciejewska *i wsp.*, 2014). Badania *in vivo* tworzenia szwów czaszkowych wykazały, iż ko-ekspresja *TWIST1* i *ID1* na froncie mineralizacji skutkuje inicjacją ekspresji genu *FGFR2*, której stopień jest bezpośrednio regulowany poziomem syntezy homodimeru T/T. Z kolei, w środkowej, niezmineralizowanej części szwu, na skutek braku ekspresji *ID1*, dochodzi do tworzenia heterodimeru T/E, z następczą aktywacją odmiennej ścieżki sygnalizacyjnej (Connerney *i wsp.*, 2008).

Białko ID1 należy do klasy V bHLH i wywiera antagonistyczny wpływ na aktywność transkrypcyjną partnerów dimeryzacyjnych bHLH, co skutkuje hamowaniem procesów

różnicowania komórek (Skider *i wsp.*, 2003). Czynniki regulatorowe ID ulegają wzmożonej ekspresji w okresie rozwoju embrionalnego oraz w okresie postnatalnym w komórkach macierzystych i progenitorowych, natomiast wraz z różnicowaniem się komórek dochodzi do spadku ekspresji genów *ID* (Ling *i wsp.*, 2014). Wykazano, że ID1 ulega wzmożonej ekspresji w chematopoetycznych oraz neuralnych komórkach macierzystych i warunkuje utrzymanie ich zdolności do samoodnowy (Ling *i wsp.*, 2014). Z drugiej strony, patologiczna nadekspresja ID1 jest jednym z istotnych czynników nowotworzenia (Ling *i wsp.*, 2014).

Rola TWIST1 i ID1 w EMT

Nadekspresja genu *TWIST1* w komórkach nowotworowych stymuluje EMT, a tym samym nabywanie przez te komórki zdolności do tworzenia przerzutów (Cheng *i wsp.*, 2008). Obserwację tę potwierdziły badania *in vivo*, gdzie w nowotworach wątroby i przełyku poziom nadekspresji genu *TWIST1* bezpośrednio korelował z powstawaniem przerzutów i skróceniem okresu przeżycia (Xie *i wsp.*, 2009; Yang *i wsp.*, 2009). Podwyższoną ekspresję genu *TWIST1* wykazano ponadto w komórkach raka piersi (Martin *i wsp.*, 2005), wątroby (Yang *i wsp.*, 2009), prostaty (Yuen *i wsp.*, 2007), żołądka (Feng *i wsp.*, 2009), przełyku (Sasaki *i wsp.*, 2009), pęcherza moczowego (Zhang *i wsp.*, 2007), trzustki (Sato *i wsp.*, 2008), jajników (Wang *i wsp.*, 2013) oraz glejakach (Mikheeva *i wsp.*, 2010).

TWIST1 bierze bezpośredni udział w represji E-kadheryny na korzyść N-kadheryny (Cheng *i wsp.*, 2008; Sasaki *i wsp.*, 2009; Yang *i wsp.*, 2009; Wang *i wsp.*, 2013). W procesie tym uczestniczy heterodimer *TWIST1* z białkiem E12 (T/E), rekrutujący do promotora genu kodującego E-kadherynę białka Mi2 i NuRD tworzące kompleks odpowiedzialny za przebudowę chromatyny i deacetylację histonów (Fu *i wsp.*, 2011). Aktywność kompleksu Mi2/NuRD jako deacetylazy histonu skutkuje powstaniem gęsto upakowanych, hipocetylowanych nukleosomów, czego rezultatem jest wyciszenie ekspresji E-kadheryny (Fu *i wsp.*, 2011). W trakcie inicjacji EMT białko *TWIST1* kooperuje z czynnikiem SNAIL1. SNAIL1 jest konieczny do indukcji EMT, natomiast *TWIST1* podtrzymuje ten proces. Badania porównawcze *in vitro* komórek fizjologicznych i rakowych wykazały, że transkrypcja genu *TWIST1* jest hamowana przez SNAIL1 w początkowej fazie EMT, natomiast wzrasta po spadku poziomu transkrypcji genu *SNAIL1*, co sprzyja hamowaniu ekspresji E-kadheryny (Tran *i wsp.*, 2011). Ta czasowo-przestrzenna kooperacja *TWIST1* oraz SNAIL1 obserwowana jest również *in vivo* w komórkach nowotworowych raka piersi podczas powstawania przerzutów (Tran *i wsp.*, 2011). Jednocześnie z *TWIST1*–zależnym spadkiem ekspresji E-kadheryny, w komórkach rakowych dochodzi do kompensacyjnej

nadekspresji N-kadheryny. W badaniach nad rakiem prostaty, wykazano, że TWIST1 aktywuje ekspresję N-kadheryny oddziałując z kasetą E zlokalizowaną w pierwszym intronie genu N-kadheryny (Alexander *i wsp.*, 2006).

Następstwem EMT jest brak podatności komórki nowotworowej na sygnały apoptotyczne. W procesie tym uczestniczy *TWIST1* hamując zależną od p53 śmierć komórkową (Ansieau *i wsp.*, 2008). *TWIST1* może oddziaływać na p53 pośrednio poprzez inhibicję ekspresji genu supresorowego *ARF*, co moduluje ścieżkę sygnalizacyjną *ARF/MDM2/p53* (Maestro *i wsp.*, 1999). *TWIST1* zapobiega ponadto fizjologicznemu procesowi starzenia się komórek poprzez inhibicję ścieżek zależnych od p53 oraz Rb (Ansieau *i wsp.*, 2008).

TWIST1 jest również zaangażowany w modulację chemiooporności komórek nowotworowych. Wykazano, że wyciszenie ekspresji genu *TWIST1* w komórkach raka prostaty skutkowało zwiększeniem ich wrażliwości na cisplatynę (Shiota *i wsp.*, 2008). Również w komórkach raka prostaty, a także raka jamy nosowo-gardłowej, pęcherza moczowego i jajników wzmożona ekspresja genu *TWIST1* związana jest ze zwiększeniem oporności na taxol i winkrystynę (Wang *i wsp.*, 2004). Wyciszenie ekspresji genu *TWIST1* przy użyciu siRNA w liniach komórkowych raka prostaty (DU145 i PC3), podnosi ich wrażliwość na paklitaksel, powodując zahamowanie zdolności migracyjnych komórek przy równoległym wzroście ekspresji E-kadheryny oraz pozostałych molekularnych markerów MET (Kwok *i wsp.*, 2005). Natomiast wyciszenie ekspresji genu *TWIST1* w liniach komórkowych gruczolakoraka nabłonka pęcherzyków płucnych (A549) skutkowało uwrażliwieniem komórek na działanie cisplatyny (Zhuo *i wsp.*, 2008).

W odróżnieniu od *TWIST1* rola *ID1* w EMT pozostaje wciąż niejasna, a doniesienia naukowe bywają sprzeczne. Badania poświęcone roli *ID1* w raku piersi, żołądka oraz glejaku wykazały, że bierze ono udział w procesie EMT (Tobin *i wsp.*, 2011; Peng *i wsp.*, 2014; Sánchez-Tilló *i wsp.*, 2014). Z drugiej strony istnieją doniesienia wykazujące, że supresja genu *ID1* w komórkach rakowych korelowała z obniżeniem poziomu ekspresji markerów EMT (Zeisberg *i wsp.*, 2009; Tobin *i wsp.*, 2011; Liu *i wsp.*, 2015). W przypadku mysiego modelu raka piersi wykazano wręcz, że *ID1* promuje przeciwstawne efekty (Stankic *i wsp.*, 2013). Zwiększona ekspresja genu *ID1* skutkuje nabyciem przez komórki raka piersi cech nowotworowych komórek macierzystych o zwiększonym potencjale inwazyjnym (Stankic *i wsp.*, 2013). Przyjmuje się obecnie, iż fenotyp mezenchymalny oraz fenotyp nowotworowych komórek macierzystych wykazuje wiele podobieństw (Thierry *i wsp.*, 2009;

Stankic *i wsp.*, 2013). Z drugiej strony, ID1 promuje proces MET w przerzutowych komórkach raka piersi, które wcześniej uległy transformacji nabłonkowo-mezenchymalnej (Stankic *i wsp.*, 2013). Wydaje się, że dwa przeciwstawne efekty wyzwalane przez ID1 zależą od lokalnego poziomu ekspresji genów *TWIST1* i *SNAIL1*, które w odmienny sposób modulują funkcję ID1 (Stankic *i wsp.*, 2013). Wykazano, że ID1 jest czynnikiem wzmagającym chemiooporność komórek raka przełyku i trzustki (Li *i wsp.*, 2014). Z drugiej jednak strony u pacjentów z usuniętym chirurgicznie niedrobnokomórkowym rakiem płuc, wysoki poziom ekspresji genu *ID1* w guzie pierwotnym stanowił korzystny marker prognostyczny (Cheng *et al.*, 2014).

Uzasadnienie i cel badań

Białka *TWIST1* i *ID1* mogą ulegać bezpośredniej interakcji, ponadto stosunek poziomów ich ekspresji determinuje aktywację odmiennych szlaków sygnalizacyjnych. Stwierdzono również istotny udział obydwu czynników w procesie transformacji nowotworowej ze szczególnie dobrze udokumentowaną rolą w raku piersi i prostaty (Martin *i wsp.*, 2005; Yuen *i wsp.*, 2007; Zhang *i wsp.*, 2007; Tran *i wsp.*, 2011; Sharma *i wsp.*, 2012; Stankic *i wsp.*, 2013). Rola *TWIST1* i *ID1* w raku jelita grubego nie została jednak do tej pory szerzej przebadana. Identyfikacja czynników warunkujących oporność komórek nowotworowych jelita grubego na chemioterapię stanowi istotny kierunek badań nad biologią tego nowotworu. Poszerzenie spektrum znanych biomarkerów chemiooporności pozwoli na dokładniejszą prognozę przebiegu choroby oraz na bardziej precyzyjne przyporządkowanie pacjentów do grupy o korzystnej odpowiedzi na leczenie adjuwantowe lub do grupy niewykazującej odpowiedzi na to leczenie. Ponadto identyfikacja białek odgrywających istotną rolę w obniżaniu wrażliwości komórek raka jelita grubego na chemioterapię może posłużyć do opracowania kombinowanych strategii leczniczych łączących stosowanie 5-FU oraz selektywnej inhibicji kluczowych szlaków sygnalizacyjnych komórki nowotworowej. Dotychczas wykazano, że nadekspresja *TWIST1* i *ID1* w wielu przypadkach nowotworów związana jest ze zmniejszeniem wrażliwości komórek guza na chemioterapeutyki. Powyższe przesłanki stanowiły uzasadnienie do podjęcia pracy badawczej w celu zbadania wpływu poziomu ekspresji genów *TWIST1* i *ID1* na proliferację komórek raka okrężnicy oraz ich chemiowrażliwość.

Prace eksperymentalne

Pierwszym etapem badań było określenie poziomu mRNA *TWIST1* w tkankach pochodzących od pacjentów z rakiem jelita grubego (n=80) oraz fragmentów kontrolnych

(n=30). Średni poziom ekspresji genu *TWIST1* w tkankach nowotworowych był istotnie wyższy niż ten obserwowany w tkankach kontrolnych. Ponadto poziom ekspresji genu *TWIST1* korelował dodatnio ze stopniem zaawansowania choroby (TNM) oraz stopniem zróżnicowania guza (G), zgodnie z wynikami opublikowanymi przez Valdés-Mora i wsp. (Valdés-Mora i wsp., 2009). Dalsze prace prowadzono na liniach komórkowych HT-29 oraz HCT-116 wywodzących się z raków okrężnicy o różnym stopniu zaawansowania, charakteryzujących się odmiennymi profilami mutacji genetycznych. W związku z faktem obserwowanej wzmożonej ekspresji genu *TWIST1* w komórkach raka jelita grubego, pierwszym etapem eksperymentów na liniach komórkowych było wyciszenie ekspresji *TWIST1*. W przypadku genu *ID1* przeprowadzono analogiczną procedurę eksperymentalną. Supresji *TWIST1* i *ID1* dokonano za pomocą wektorów lentiwirusowych kodujących shRNA komplementarne względem mRNA docelowych genów. Komórki kontrolne zostały transdukowane wektorami zawierającymi niekodujące inserty. Po przeprowadzeniu transdukcji uzyskano linie kontrolne (HT-29 c.v., HCT-116 c.v.) oraz linie z wyciszonymi genami *TWIST1* lub *ID1*, oznaczone odpowiednio jako: HT-29 sh*TWIST1* i HCT-116 sh*TWIST1* lub HT-29 sh*ID1* oraz HCT-116 sh*ID1*. Za pomocą technik RT-qPCR, Western Blot oraz ELISA wykazano znaczny spadek poziomu transkryptów oraz białek *TWIST1* i *ID1* w komórkach eksperymentalnych w porównaniu do komórek kontrolnych.

W następnej kolejności przebadano, czy supresja *TWIST1* i *ID1* wpływa na tempo wzrostu komórek nowotworowych. Testy żywotności zostały wykonane na komórkach hodowanych w warunkach standardowych oraz hodowanych w medium pozbawionym surowicy. Za pomocą testu MTT dokonano pomiaru aktywności metabolicznej komórek, która w określonych warunkach może być stosowana jako wyznacznik proliferacji. Linie komórkowe HT-29 sh*TWIST1* i HCT-116 sh*TWIST1* wykazywały spowolnienie wzrostu względem komórek kontrolnych, niezależnie od dostępności surowicy. Wyciszenie *ID1* natomiast skutkowało zwiększeniem szybkości namnażania komórek w jednej i w drugiej linii w stosunku do komórek kontrolnych, jednak tylko w linii komórkowej HT-29 sh*ID1* obserwowany efekt był niezależny od zawartości surowicy w medium hodowlanym.

Następnie za pomocą metod RT-qPCR oraz Western Blot oceniono, czy po supresji *TWIST1* i *ID1* obserwuje się zmiany w ekspresji markerów EMT (*CDH1*, *CDH2*, *CTNBI*, *VIM*, *FNI*). Supresji genu *TWIST1* w komórkach HT-29 w znacznym stopniu towarzyszyły zmiany ekspresji markerów EMT, włącznie ze spadkiem ekspresji E-kadheryny oraz równoległym wzrostem poziomu ekspresji N-kadheryny. W przypadku linii HCT-116

sh*TWIST1* oraz HT-29 sh*ID1* i HCT-116 sh*ID1* zaobserwowane zmiany ekspresji markerów EMT sugerowały nabycie fenotypu hybrydowego nabłonkowo-mezenchymalnego, zamiast wyraźnego przesunięcia pomiędzy jednym, a drugim rodzajem fenotypu.

W następnym etapie za pomocą testu MTT przebadano wrażliwość komórek nowotworowych na 5-FU w zakresie stężeń od 10^{-12} do 10^{-4} M. Wyciszeniu ekspresji *TWIST1* towarzyszył znaczny wzrost wrażliwości komórek na 5-FU. Dla kontrolnej linii HT-29, stężenie 5-FU, przy którym następował 50% spadek żywotności (IC_{50}) wyniosło $8,4 \pm 1,2$ μ M, natomiast wraz ze spadkiem poziomu *TWIST1* wartość IC_{50} zmalała do $0,3 \pm 0,1$ μ M. Dla komórek HCT-116 sh*TWIST1* natomiast, IC_{50} wyniosło $3,2 \pm 0,6$ μ M w porównaniu do stężenia $13,2 \pm 2,5$ μ M wyznaczonego dla linii HCT-116 c.v. Supresja *ID1* skutkowała zwiększeniem chemiowrażliwości względem 5-FU jedynie w przypadku komórek HCT-116, natomiast w linii HT-29 zarówno kontrolnej, jak i poddanej supresji *ID1* uśredniona wartość IC_{50} wynosiła $6,2 \pm 1,0$ μ M. Komórki HCT-116 c.v. charakteryzowały się wartością IC_{50} na poziomie $12,4 \pm 2,3$ μ M, natomiast dla linii HCT-116 sh*ID1* wysokość parametru spadła do $1,5 \pm 0,3$ μ M. Hamowanie wzrostu komórek nowotworowych przez 5-FU może odbywać się poprzez zatrzymanie proliferacji, jak i poprzez indukcję apoptozy. W celu wyjaśnienia, czy zaobserwowane zależne od spadku ilości *TWIST1* i *ID1* zmiany wrażliwości komórek raka jelita grubego na 5-FU związane są z efektem cytostatycznym, bądź cytotoksycznym, przeprowadzono analizę stopnia apoptozy z zastosowaniem cytometru przepływowego. Komórki HT-29 oraz, w mniejszym stopniu, HCT-116 na skutek supresji *TWIST1* wykazywały znaczne zwiększenie apoptozy po zastosowaniu 5-FU o stężeniu 1 μ M, względem komórek kontrolnych. Cechą charakterystyczną towarzyszącą supresji *ID1* był istotny przyrost frakcji komórek apoptotycznych w warunkach hodowli bez dodatku 5-FU, zarówno w linii HT-29, jak i HCT-116, jednak w przypadku tej ostatniej linii obserwowano wyższy odsetek komórek apoptotycznych. W komórkach z wyciszoną ekspresją *ID1* 5-FU indukował apoptozę w większym stopniu w przypadku linii HCT-116, niż w linii HT-29. Powyższe obserwacje sugerują, że supresja *TWIST1* i *ID1* w komórkach raka jelita grubego HT-29 i HCT-116 wzmacnia ich wrażliwość na 5-FU na skutek wzmocnienia cytotoksycznego działania chemioterapeutyku.

Nabycie przez komórki nowotworowe oporności na 5-FU może wiązać się ze zmianą ekspresji genów, kodujących enzymy uczestniczące w metabolizmie tego związku. Oznaczono w związku z tym poziom ekspresji genów kodujących: fosforylaze tymidynową (*TYMP*), kinazę urydyno-cytydynową 2 (*UCK2*), dehydrogenazę dihydropirymidynową

(*DPYD*), kinazę tymidynową 1 (*TK*), syntazę tymidylanową (*TYMS*), syntetazę monofosforanu urydyny (*UMPS*) oraz fosforylazę urydyny 1 (*UPP1*). Supresja *TWIST1*, w zależności od typu komórki nowotworowej, skutkowała zmianami w ekspresji badanych genów. W komórkach HT-29 *shTWIST1* obserwowano znaczny spadek ekspresji *DPYD* oraz *TYMS* w porównaniu do komórek kontrolnych. W obydwu liniach z wyciszoną ekspresją *TWIST1* odnotowano znaczny wzrost ekspresji *TYMP* oraz *UPP1*, a obserwowane zmiany na poziomie mRNA korelowały ze zmianami aktywności enzymatycznych. *DPYD* bierze udział w szlaku degradacji 5-FU do dihydrofluorouracylu i fluoro- β -alaniny (Naguib *i wsp.*, 1985). Można przypuszczać, że różnice we wrażliwości na 5-FU obserwowane u linii komórkowych poddanych wyciszeniu genu *TWIST1* mogą po części wynikać z odmiennej ekspresji *DPYD*. Z drugiej strony istotny wzrost ekspresji *UPP1* zarówno w linii HT-29 *shTWIST1*, jak również HCT-116 *shTWIST1* sugeruje, że obserwowany w stosunku do kontroli wzrost wrażliwości na 5-FU w obydwu liniach może wynikać ze zwiększonej aktywacji metabolicznej 5-FU do 5-fluorourydyny i monofosforanu 5-fluorourydyny (Peters *et al.*, 1986; Peters *et al.*, 1991). Supresja *ID1* w linii HT-29 skutkowała istotną redukcją ekspresji *TYMP*, *UCK2* oraz *DPYD*. Komórki HCT-116 *shID1* wykazywały spadek poziomu transkryptów dla genu *DPYD* i *TYMS*, przy jednoczesnym wzroście mRNA dla genu *TYMP*, *TK* oraz *UCK2*. Obserwowaną po supresji *ID1* zwiększoną wrażliwość linii HCT-116 na 5-FU można po części tłumaczyć wzrostem ekspresji *TYMP* i *TK*, kodujących enzymy szlaku aktywacji metabolicznej 5-FU do 5-fluorodeoksyurydyny i monofosforanu 5-fluorodeoksyurydyny. Aktywacja 5-FU przebiega również poprzez syntezę fluorourydyny i monofosforanu fluorourydyny. Supresja *ID1* w linii HCT-116 skutkowała wzrostem ekspresji genu *UCK2*, kodującego enzym biorący udział w powyższym szlaku, natomiast komórki HT-29 *shID1* wykazywały spadek poziomu mRNA genu *UCK2*. Tak odmienny profil ekspresji sugeruje również zwiększoną rolę tego szlaku w komórkach HCT-116 po supresji *ID1*, natomiast nie w przypadku komórek HT-29.

Podsumowanie

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że spadek ekspresji genu *TWIST1* w komórkach raka jelita grubego może być wystarczającym czynnikiem do promocji fenotypu nabłonkowego, natomiast supresja *ID1* skutkuje nabyciem fenotypu o cechach mieszanych nabłonkowo-mezenchymalnych. Spadek poziomu ekspresji *TWIST1* w komórkach raka jelita grubego spowalnia ich proliferację, natomiast spadek ekspresji *ID1*, przeciwnie, wzmacnia wzrost komórek. Supresja *TWIST1* w badanych komórkach raka jelita grubego

zwiększyła ich wrażliwość na cytotoksyczne działanie 5-fluorouracylu, natomiast wyciszenie ekspresji *IDI* skutkowało istotnym zwiększeniem wrażliwości tylko w przypadku linii komórkowej HCT-116, natomiast nie w przypadku linii HT-29. Różnice w modulacji chemiowrażliwości komórek raka jelita grubego wywołane supresją *TWIST1* i *IDI* tłumaczyć można odmiennym profilem ekspresji genów kodujących enzymy biorące udział w metabolizmie 5-FU.

W związku z powyższym można sądzić, że ocena poziomu ekspresji genów *TWIST1* oraz *IDI* może stanowić potencjalny marker predykcyjny skuteczności zastosowania terapii 5-fluorouracylem u danego pacjenta z rakiem jelita grubego. Ponadto, w przyszłości geny *TWIST1* i *IDI* lub ich produkty białkowe, mogą stanowić potencjalne cele terapeutyczne w spersonalizowanym leczeniu raka jelita grubego.

Colorectal cancer

Colorectal cancer remains one of the deadliest diseases worldwide despite the significant advances in diagnostics and management of the patients (Ferlay *et al.*, 2010). Colorectal carcinoma (CRC) is diagnosed in about 1,2 million people every year and annual mortality rate is estimated about 600 thousand. CRC is the third most frequent cancer type in Poland (Potemski *et al.*, 2010). To this date several biomarkers and molecular pathways responsible for CRC progression were identified. Among the most important factors are mutations in *APC*, *DCC*, *TP53*, *KRAS* and *BRAF* genes and microsatellite instabilities (MSI) (Markowitz *et al.*, 2009). The surgical resection remains a basic treatment of CRC however it is sufficient for some group of patients with early stage colorectal cancer. Generally the overall prognosis for patients with stages I and II (according to TNM staging) is good and 93%, and 82% survive the postoperative 5-year period. However, patients with stage III and IV disease are at increased risk of unfavorable outcome and 5-year disease-free survival is estimated 60% and 8%, respectively (O'Connell *et al.*, 2004). Adjuvant chemotherapy is applied in order to improve the overall survival of patients with stage III and IV disease (Wolpin *et al.*, 2007).

5-fluorouracil (5-FU) is one of the earliest chemotherapeutic agents and it has been used successively in CRC treatment for over 50 years (Hammond *et al.*, 2016). The drug operates through mechanisms involving inhibition of DNA replication and cell death. The primary 5-FU metabolite 5-fluorodeoxyuridine monophosphate (FdUMP) inhibits thymidylate synthase (TYMS), an enzyme producing deoxythymidine monophosphate (dTMP). Insufficient dTMP bioavailability disrupts DNA synthesis in the dividing cells. An alternative 5-FU metabolites, namely 5-fluorouridine triphosphate (5-FUTP) and 5-fluorodeoxyuridine triphosphate (5-FdUTP) are analogs of deoxynucleotides and undergo inclusion into replicated DNA, which results in impaired translation and subsequent cell death (Janet *et al.*, 2010; Hammond *et al.*, 2016). One of the major obstacles in successful treatment with 5-FU based adjuvant chemotherapy is an ability of CRC cells to acquire resistance. Several mechanisms have been proposed to be responsible for the decrease in cancer cells sensitivity to 5-FU including variable number of tandem repeats, single nucleotide polymorphisms and microsatellite instabilities, occurring within genes encoding enzymes metabolizing 5-FU, and altered expression of 5-FU metabolizing enzymes (Hammond *et al.*, 2016).

In the recent decade several factors that determine the sensitivity to chemotherapeutics were identified including: the altered expression ABC transporters proteins, mutations of

genes encoding growth factors receptors, inactivation of mismatch repair system, and deregulated apoptosis (Holohan *et al.*, 2013). Epithelial to mesenchymal transition (EMT), conferring cells with mesenchymal characteristics is another adaptive mechanism that render the tumor cells resistant to chemotherapy (Frederick *et al.*, 2007; Serova *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010).

Epithelial to mesenchymal transition

EMT occurring in single cell or group of cells results in shift from epithelial to mesenchymal phenotype. Cells undergoing EMT display reorganization of cell-cell adhesion, loss of defined shape and cellular polarity with concomitant gain migratory properties (Baum *et al.*, 2008). Degradation of cell-cell junctions is a key step of EMT and occurs as a result of altered expression of transmembrane proteins – cadherins. Extracellular cadherin domains of neighbouring cells interact with each other whereas intracellular domains connect with actin cytoskeleton via catenins (Wheelock *et al.*, 2008). During EMT reduction or loss of E-cadherin expression accompanied by simultaneous increase in expression of N-cadherin is observed (Baum *et al.*, 2008). E-cadherin is epithelial-specific protein which provides strong cellular adhesion, while N-cadherin is mesenchymal marker and establishes weaker cell-cell junctions compared to E-cadherin (Chu *et al.*, 2004). Several transcription factors involved in E-cadherin repression play a key role in EMT including: SNAIL, ZEB, E47, KLF8, TWIST1, GSC, E2.2 and FOXC2 (Thierry *et al.*, 2009).

EMT is related with change in expression of surface-, nucleus-, extracellular matrix- and basement membrane-specific markers. One of the key EMT markers is β -catenin responsible for connecting cadherins with cytoskeleton and being a member of β -catenin/TCF/LEF complex which controls expression of EMT-related genes (Zeisberg *et al.*, 2009). Fibronectin and vimentin which are components of extracellular matrix and cytoskeleton, respectively, are other important EMT markers (Zeisberg *et al.*, 2009). During EMT expression of genes involved in antiapoptotic protection of mesenchymal cells is also triggered (Baum *et al.*, 2008). Cells may undergo EMT in the course of physiological and pathological processes. Physiological EMT occurs during embryonic development and wound healing. Pathological EMT is observed at the time of tumorigenesis (Thierry *et al.*, 2009). It is acknowledged that EMT is important factor promoting invasiveness and metastatic potential in cancer cells (Baum *et al.*, 2008). Shift from epithelial into mesenchymal phenotype in cancer cell allows it to detach from primary tumor, migration, intravascular, vascular circulation, extravasation and implantation in target tissues (Baum *et al.*, 2008). At the site of

metastatic colonization cancer cells undergo a mesenchymal to epithelial transition (MET) which is an opposite event to EMT and results in restoration of epithelial phenotype in metastatic cells and stabilization of secondary tumor (Cheng *et al.*, 2008).

EMT is also considered one of the mechanisms by which tumor cells acquire resistance to chemotherapy (Frederick *et al.*, 2007; Serova *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010). It has been shown that mesenchymal phenotype is associated with decreased sensitivity to inhibitors of EGFR (erlotinib, gefitinib, cetuximab) in lung cancer, squamous cell carcinoma of the head and neck and in hepatocellular carcinoma (Fuchs *et al.*, 2006; Frederick *et al.*, 2007; Byers *et al.*, 2013). As a result of EMT cancer cells may also acquire resistance to conventional chemotherapeutics such as paclitaxel, oxaliplatin and lapatinib (Konecny *et al.*, 2008; Sabbah *et al.*, 2008; Arumugan *et al.*, 2009). On the other hand, forced overexpression of a negative EMT regulator miR-200c has been shown to restore sensitivity of breast and ovarian cancer cells to paclitaxel and cisplatin (Cochrane *et al.*, 2009). Overexpression of transcription factor SNAIL1 in melanoma cells and breast and ovarian cancer resulted in the development of resistance to paclitaxel, adriamycin and radiation by interference p53-dependent apoptosis pathway (Kajita *et al.*, 2004; Kurrey *et al.*, 2009).

TWIST1 and ID1

The basic helix-loop-helix (bHLH) bHLH proteins are subdivided into 7 classes, and their common characteristic is the presence of a conservative alkaline domain and loop flanked by two amphipathic α helices (Massari *et al.*, 2000). Helices are involved in the dimerization of the protein with the second bHLH transcription factor. V-class proteins lacking a basic region comprise a separate class. Absence of basic domain prevents DNA binding thus the class V proteins play the role of negative transcription regulators for class I and II agents (Massari *et al.*, 2000). In multicellular organisms bHLH factors are involved in many developmental processes, such as neurogenesis, myogenesis, hematopoiesis and pancreas development (Massari *et al.*, 2000).

TWIST1 is a transcription factor belonging to the class II of bHLH family and plays a key role in the differentiation of mesenchyme and mesenchymal tissues. The transcriptionally active TWIST1 dimer binds to the CATATG sequence called the E-box and present in the sequence of multiple gene promoters. In adults expression of *TWIST1* gene remains low in defined areas (Ota *et al.*, 2004). At the same time the TWIST1 protein overexpressed in mature cells has been shown to play an important role in the development of

the cancer (Yang *et al.*, 2004). TWIST1 unlike most bHLH proteins, can produce active homodimers (T/T) as well as heterodimers together with E12/E46 (T/E) proteins. Homodimers and heterodimers modulate different signaling pathways and the *in situ* ratio of each dimer form is determined by the levels of *TWIST1* and *ID1* (*inhibitor of DNA binding 1*) genes expression (Connerney *et al.*, 2006; Maciejewska *et al.*, 2014). ID proteins preferentially dimerize with E proteins, thus preventing them from forming T/E heterodimers. Under such conditions TWIST1 forms active homodimers, whereas in the absence of ID expression, TWIST1 composes T/E heterodimers (Connerney *et al.*, 2006; Maciejewska *et al.*, 2014). *In vivo* studies on cranial sutures revealed that the co-expression of *TWIST1* and *ID1* genes on the mineralization front results in the expression of the *FGFR2* gene and level of its expression is directly regulated by the extent of T/T homodimer synthesis. In turn, in the midst unmineralized part of the suture due to lack of *ID1* expression, a T/E heterodimer is formed and triggers activation of a different signaling pathway (Connerney *et al.*, 2008).

ID1 belongs to class V bHLH and exerts an antagonistic effect on the transcriptional activity of bHLH dimerization partners, resulting in inhibition of cell differentiation (Skider *et al.*, 2003). ID regulators are expressed more intensively during fetal and postnatal development in stem and progenitor cells, but with proceeding cell differentiation, there is a decrease in *ID* gene expression (Ling *et al.*, 2014). It has been shown that ID1 is overexpressed in haematopoietic and neural stem cells and is crucial in maintaining their ability to self-renewal (Ling *et al.*, 2014). On the other hand, pathological overexpression of ID1 is one of the important factors in carcinogenesis (Ling *et al.*, 2014).

The role of TWIST1 and ID1 in EMT

Overexpression of the *TWIST1* gene in tumor cells stimulates EMT and results in ability of these cells to form metastases (Cheng *et al.*, 2008). This observation was confirmed by *in vivo* studies showing that in liver and esophageal cancer *TWIST1* gene overexpression levels directly correlated with metastasis and shortened survival (Xie *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009). The elevated expression of *TWIST1* gene has also been shown in breast (Martin *et al.*, 2005), liver (Yang *et al.*, 2009), prostate (Yuen *et al.*, 2007), stomach (Feng *et al.*, 2009), esophagus (Sasaki *et al.*, 2009), pancreas (Sato *et al.*, 2008), ovary (Wang *et al.*, 2013) cancer cells and gliomas (Mikheeva *et al.*, 2010).

TWIST1 is directly involved in the repression of E-cadherin in favor of N-cadherin (Cheng *et al.*, 2008; Sasaki *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013). In this process the TWIST1/E12 heterodimer (T/E) recruits to the promoter of the E-cadherin gene *Mi2* and

NuRD proteins forming the chromatin remodeling and histone deacetylation (Fu *et al.*, 2011). Mi2/NuRD shows histone deacetylase activity and results in densely packed hypoacetylated nucleosomes leading to the silencing of E-cadherin expression (Fu *et al.*, 2011). During EMT initiation TWIST1 protein co-operates with SNAIL1. SNAIL1 is necessary for EMT induction, while TWIST1 supports this process. *In vitro* comparative studies of physiological epithelial cells and cancer cells showed that the transcription of the *TWIST1* gene is inhibited by SNAIL1 in the early EMT phase, but increases after decline in expression level of the *SNAIL1* gene, which promotes inhibition of E-cadherin expression (Tran *et al.*, 2011) This spatial-temporal co-operation of TWIST1 and SNAIL1 is also observed *in vivo* in breast cancer tumors during metastasis (Tran *et al.*, 2011). Simultaneously with TWIST1-dependent decrease in E-cadherin expression compensatory N-cadherin overexpression is observed in cancer cells. In prostate cancer studies, TWIST1 has been shown to activate N-cadherin expression by interacting with the E-cassette located at the first intron of the N-cadherin gene (Alexander *et al.*, 2006).

As the consequence of EMT tumor cells become insusceptible to apoptotic signals. TWIST1 participates in this process by inhibiting p53-dependent cell death (Ansieau *et al.*, 2008). TWIST1 can interact indirectly with p53 by inhibiting the expression of the *ARF* suppressor gene thus modulating the signaling pathway ARF/MDM2/p53 (Maestro *et al.*, 1999). TWIST1 prevents the senescence of cells by inhibiting pathways dependent on p53 and Rb (Ansieau *et al.*, 2008).

TWIST1 is also involved in the modulation of chemoresistance of tumor cells. It has been shown that the silencing of the *TWIST1* gene expression in prostate cancer cells increased their sensitivity to cisplatin (Shiota *et al.*, 2008). Also in prostate cancer cells as well as nasopharyngeal carcinoma, bladder and ovarian cancer, increased expression of the *TWIST1* gene is related with increased resistance to taxol and vincristine (Wang *et al.*, 2004). The silencing of *TWIST1* gene expression with siRNA in prostate cancer cell lines (DU145 and PC3) enhanced their sensitivity to paclitaxel, inhibited cell migration capacity with parallel increase in expression of E-cadherin and molecular markers of MET (Kwok *et al.*, 2005). Additionally the silencing of *TWIST1* gene expression in lung adenocarcinoma cell lines (A549) resulted in their sensitization to cisplatin (Zhuo *et al.*, 2008).

Oppositely to TWIST1, the role of ID1 in EMT remains unclear and scientific reports remain contradictory. Research on breast and stomach carcinoma as well as glioblastoma showed that ID1 is involved in the EMT process (Tobin *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2014; Sánchez-Tilló *et al.*, 2014). On the other hand it has been reported that suppression of the *ID1*

gene in cancer cells correlated with a decrease in EMT markers (Zeisberg *et al.*, 2009; Tobin *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2015). Moreover in the case of a mouse model of breast cancer it has been shown that ID1 promotes opposing effects (Stankic *et al.*, 2013). Increased expression of the *ID1* gene in breast cancer cells led to development of characteristics of tumor stem cells with increased invasive potential (Stankic *et al.*, 2013). It is now recognized that the mesenchymal phenotype and the cancer stem cell phenotype closely overlap with each other (Thierry *et al.*, 2009; Stankic *et al.*, 2013). On the other hand ID1 promoted the MET process in metastatic breast cancer cells which had undergone MET previously (Stankic *et al.*, 2013). Two opposing effects triggered by ID1 appear to depend on the local level of expression of the *TWIST1* and *SNAIL1* gene, which differently modulate the ID1 function (Stankic *et al.*, 2013). ID1 has been shown to enhance the chemoresistance of esophageal and pancreatic cancer cells (Li *et al.*, 2014). On the other hand in patients with non-small cell lung cancer high expression of the *ID1* gene in the primary tumor was a favorable prognostic marker (Cheng *et al.*, 2014).

Rationale and purpose of research

TWIST1 and ID1 proteins can interact directly and the ratio of their expression levels determines the activation of different signaling pathways. It has also been found that both factors contribute to the carcinogenesis with a particularly well-documented role in breast and prostate cancer (Martin *et al.*, 2005; Yuen *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Tran *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2012; Stankic *et al.*, 2013). The role of TWIST1 and ID1 in colorectal cancer has not been studied extensively. Identification of factors promoting the resistance of CRC cells to chemotherapy is an important aim of research on the biology of this tumor. Expanding the spectrum of known biomarkers of chemoresistance will allow a more accurate prediction of the outcome of the disease and more specific stratification of patients to a group with a good response to adjuvant chemotherapy or to a group with insufficient response to a treatment. In addition the identification of proteins that play an important role in lowering CRC cells susceptibility to chemotherapy may be used to develop combined therapeutic strategies combining 5-FU application together with selective inhibition of key signaling pathways in tumor cell. To date, it has been shown that the overexpression of TWIST1 and ID1 in many cases of cancers is associated with a decrease in the sensitivity of tumor cells to chemotherapeutics. The above circumstances were rationale for the investigation on the impact of *TWIST1* and *ID1* genes expression levels on the proliferation of CRC cells and their chemosensitivity.

Experimental procedures and results

The first step of the study was to determine the level of *TWIST1* mRNA in specimens derived from patients with CRC (n = 80) and control tissues (n = 30). The mean expression level of the *TWIST1* gene in tumor samples was significantly higher than that observed in the control tissues. Moreover, *TWIST1* gene expression levels correlated positively with the stage of disease (TNM) and tumor grade (G), which was in line with previous results of Valdés-Mora et al. (Valdés-Mora *et al.*, 2009). Further experiments were conducted on HT-29 and HCT-116 cell lines derived from different CRC cases with varied stages and different genetic mutation profiles. Due to the observed increased expression of *TWIST1* gene in CRC cells, the first step of cell lines experiments was the silencing of *TWIST1* expression. A corresponding procedure was conducted regarding to the *ID1* gene. *TWIST1* and *ID1* suppression was performed by lentiviral vectors encoding shRNA complementary to mRNA target genes. Control cells were transduced with vectors containing non-encoding inserts. Transduction resulted in obtaining control cell lines (HT-29 c.v., HCT-116 c.v.) as well as *TWIST1*- or *ID1*-suppressed cell lines with respective designations: HT-29 sh*TWIST1* and HCT-116 sh*TWIST1* and HT-29 sh*ID1* and HCT-116 sh*ID1*. By the means of RT-qPCR, Western Blot and ELISA techniques a significant decrease in the levels of *TWIST1* and *ID1* transcripts and proteins was demonstrated in experimental cells compared to control cells.

Next, we investigated whether suppression of *TWIST1* and *ID1* affects the growth rate of tumor cells. Viability tests were performed on cells cultured under standard conditions or in serum-free medium. The measurement of the metabolic activity of the cells was performed with the MTT test, which under specific conditions can be used as a determinant of cellular proliferation. HT-29 sh*TWIST1* and HCT-116 sh*TWIST1* cells showed decrease in growth rate relative to control cells, regardless of serum availability. Suppression of *ID1* resulted in an enhanced cell proliferation of both cell lines compared to the control cells however only in the HT-29 sh*ID1* cells the observed effect was independent of the serum content in the culture medium.

Afterwards RT-qPCR and Western Blot were applied to evaluate if the suppression of *TWIST1* and *ID1* is followed by changes in expression of EMT markers (*CDH1*, *CDH2*, *CTNB1*, *VIM*, *FNI*). The *TWIST1* gene silencing in HT-29 cells was significantly accompanied by altered expression of EMT markers including a drop in E-cadherin expression and a parallel rise in N-cadherin expression. In the case of HCT-116 sh*TWIST1*, HT-29 sh*ID1* and HCT-116 sh*ID1* observed changes in EMT markers expression levels

suggested the acquisition of the epithelial-mesenchymal (E/M) hybrid phenotype instead of a distinct shift between those two phenotype types.

In the next step the MTT test was applied to evaluate the sensitivity of tumor cells to 5-FU with a concentrations ranging between 10^{-12} and 10^{-4} M. The silencing of *TWIST1* expression was accompanied by a significant increase in 5-FU cell sensitivity. For the control line HT-29 the 5-FU concentration at which the 50% decrease in cell viability (IC_{50}) occurred was $8.4 \pm 1.2 \mu\text{M}$ but after the *TWIST1* silencing the IC_{50} decreased to $0.3 \pm 0.1 \mu\text{M}$. HCT-116 sh*TWIST1* cells IC_{50} was $3.2 \pm 0.6 \mu\text{M}$ compared to $13.2 \pm 2.5 \mu\text{M}$ calculated for HCT-116 c.v. *ID1* suppression resulted in increase of chemosensitivity towards 5-FU only in HCT-116 cells, while both control and *ID1* suppressed HT-29 cells shared an averaged IC_{50} of $6.2 \pm 1.0 \mu\text{M}$. HCT-116 c.v. cells were characterized by IC_{50} values of $12.4 \pm 2.3 \mu\text{M}$, while in the HCT-116 sh*ID1* cell line the IC_{50} value dropped to $1.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$. Inhibition of tumor cell growth by 5-FU can be achieved by stopping of cells division as well as by inducing apoptosis. In order to clarify whether the observed *TWIST1*- and *ID1*-dependant changes in the sensitivity of colorectal cancer cells to 5-FU result from a cytostatic or cytotoxic effect an flow cytometric analysis of the apoptosis was performed. Both HT-29 cells and, to a lesser extent, HCT-116 cells with suppressed *TWIST1* showed a significant increase in apoptosis after application of $1 \mu\text{M}$ 5-FU, compared to control cells. A specific phenomenon observed after *ID1* suppression was the significant increase in fraction of apoptotic cells under standard culture conditions, both in the HT-29 and HCT-116 lines however HCT-116 sh*ID1* cells line exhibited higher apoptotic cell percentage compared to HT-29 counterpart. Addition of 5-FU to culture medium induced stronger apoptotic effect in HCT-116 sh*ID1* cells compared to HT-29 sh*ID1* cells. These observations suggest that the suppression of *TWIST1* and *ID1* in HT-29 and HCT-116 colon cancer cells increases their sensitivity to 5-FU by enhancing the cytotoxic effect of the chemotherapeutic agent.

Acquisition of 5-FU resistance by tumor cells may arise from a change in expression levels of genes encoding the enzymes involved in the metabolism of this compound. Therefore the gene expression level of thymidine phosphorylase (*TYMP*), uridine-cytidine kinase 2 (*UCK2*), dihydropyrimidine dehydrogenase (*DPYD*), thymidine kinase 1 (*TK*), thymidine synthase (*TYMS*), uridine monophosphate synthase (*UMPS*) and uridine phosphorylase 1 (*UPPI*) was examined. *TWIST1* suppression resulted in changes in gene expression depending on the type of tumor cell. A significant decrease in expression of *DPYD* and *TYMS* genes was observed in HT-29 sh*TWIST1* compared to control cells. Both cell lines

with silenced *TWIST1* expression showed a significant increase in expression of *TYMP* and *UPPI* genes, and observed changes in mRNA levels correlated with changes in enzymatic activity. *DPYD* is involved in the degradation pathway of 5-FU resulting in its transformation to dihydrofluorouracil and fluoro- β -alanine (Naguib *et al.*, 1985). It can be assumed that the observed differences in sensitivity of *TWIST1*-suppressed cell lines towards 5-FU may in part arise from the differential expression of *DPYD* gene. On the other hand, significant upregulation of *UPPI* gene expression in both HT-29 sh*TWIST1* and HCT-116 sh*TWIST1* cells suggests that their increased sensitivity to 5-FU compared to control cells may be result of increased metabolic activation of 5-FU to 5-fluorouridine and 5-fluorouridine monophosphate (Peters *et al.*, 1986; Peters *et al.*, 1991). *IDI* suppression in the HT-29 cell line resulted in significant reduction in expression levels of *TYMP*, *UCK2* and *DPDD*. The HCT-116 sh*IDI* cells showed a drop in transcript levels of the *DPYD* and *TYMS* genes, while the mRNA for the *TYMP*, *TK*, and *UCK2* genes was increased. Observed increased sensitivity of HCT-116 cells to 5-FU following *IDI* suppression can be partly attributed to an increase in the expression levels of *TYMP* and *TK* which encode enzymes of the 5-FU metabolic activation pathway with resulting 5-fluorodeoxyuridine and 5-fluorodeoxyuridine monophosphate. Activation of 5-FU may also proceed via the synthesis of 5-fluorouridine and 5-fluorouridine monophosphate. *IDI* suppression in the HCT-116 line led to increase in the expression of the *UCK2* gene encoding the enzyme involved in the above pathway, while HT-29 sh*IDI* cells showed a decrease in the mRNA level of the *UCK2* gene. Such varied gene expression profile suggests also an increased role of this pathway in HCT-116 cells after suppression of *IDI*, but not in HT-29 cells.

Summary

Based on the obtained results, the decrease in *TWIST1* expression in CRC cells may be a sufficient factor for the promotion of epithelial phenotype, whereas *IDI* suppression results in the acquisition of E/M hybrid phenotype. Reducing the level of *TWIST1* expression in CRC cells decreases the proliferation rate, while drop in the expression level of *IDI*, on the contrary, enhances cell growth. *TWIST1* suppression in the examined CRC increased their sensitivity to the cytotoxic effect of 5-FU, whereas in the case of depleted expression of *IDI* significant sensitization was observed only in the HCT-116 cell line, but not in HT-29 cells. The differences in the modulation of chemosensitivity of CRC cells induced by suppression of *TWIST1* and *IDI* genes can be explained by a different expression profile of genes encoding enzymes involved in 5-FU metabolism.

With respect to obtained results it can be suggested that the evaluation of *TWIST1* and *ID1* genes expression levels may be a potential predictor of the efficacy of therapy with 5-FU in a CRC patients. Moreover, in the future *TWIST1* and *ID1* genes or their protein products may be potential therapeutic targets in personalized CRC treatment.

Bibliografia

1. Alexander, N. R., Tran, N. L., Rekapally, H., Summers, C. E., Glackin, C., & Heimark, R. L. (2006). N-cadherin gene expression in prostate carcinoma is modulated by integrin-dependent nuclear translocation of Twist1. *Cancer research*, 66(7), 3365-3369.
2. Ansieau, S., Bastid, J., Doreau, A., Morel, A. P., Bouchet, B. P., Thomas, C., ... & Maestro, R. (2008). Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer cell*, 14(1), 79-89.
3. Arumugam, T., Ramachandran, V., Fournier, K. F., Wang, H., Marquis, L., Abbruzzese, J. L., ... & Choi, W. (2009). Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer. *Cancer research*, 69(14), 5820-5828.
4. Baum, B., Settleman, J., & Quinlan, M. P. (2008, June). Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 19, No. 3, pp. 294-308). Academic Press.
5. Brenner, H., Kloor, M., Pox, C. P. (2014). Colorectal cancer. *The Lancet*, 383(9927), 1490-1502.
6. Byers, L. A., Diao, L., Wang, J., Saintigny, P., Girard, L., Peyton, M., ... & Nilsson, M. B. (2013). An epithelial–mesenchymal transition gene signature predicts resistance to EGFR and PI3K inhibitors and identifies Axl as a therapeutic target for overcoming EGFR inhibitor resistance. *Clinical Cancer Research*, 19(1), 279-290.
7. Cheng, G. Z., Zhang, W., & Wang, L. H. (2008). Regulation of cancer cell survival, migration, and invasion by Twist: AKT2 comes to interplay. *Cancer research*, 68(4), 957-960.
8. Cheng, Y. J., Lee, Y. C., Chiu, W. C., Tsai, J. W., Su, Y. H., Hung, A. C., ... & Yuan, S. S. F. (2014). High Id1 expression, a generally negative prognostic factor, paradoxically predicts a favorable prognosis for adjuvant paclitaxel plus cisplatin therapy in surgically treated lung cancer patients. *Oncotarget*, 5(22), 11564-11575.
9. Chu, Y. S., Thomas, W. A., Eder, O., Pincet, F., Perez, E., Thiery, J. P., & Dufour, S. (2004). Force measurements in E-cadherin–mediated cell doublets reveal rapid adhesion strengthened by actin cytoskeleton remodeling through Rac and Cdc42. *J Cell Biol*, 167(6), 1183-1194.
10. Connerney, J., Andreeva, V., Leshem, Y., Mercado, M. A., Dowell, K., Yang, X., ... & Spicer, D. B. (2008). Twist1 homodimers enhance FGF responsiveness of the cranial sutures and promote suture closure. *Developmental biology*, 318(2), 323-334.
11. Connerney, J., Andreeva, V., Leshem, Y., Muentener, C., Mercado, M. A., & Spicer, D. B. (2006). Twist1 dimer selection regulates cranial suture patterning and fusion. *Developmental dynamics*, 235(5), 1334-1346.
12. Cochrane, D. R., Spoelstra, N. S., Howe, E. N., Nordeen, S. K., & Richer, J. K. (2009). MicroRNA-200c mitigates invasiveness and restores sensitivity to microtubule-targeting chemotherapeutic agents. *Molecular cancer therapeutics*, 8(5), 1055-1066.
13. Feng, M. Y., Wang, K., Shi, Q. T., YU, X. W., & Geng, J. S. (2009). Gene Expression Profiling in TWIST - Depleted Gastric Cancer Cells. *The Anatomical Record*, 292(2), 262-270.

14. Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer*, *127*(12), 2893-2917.
15. Frederick, B. A., Helfrich, B. A., Coldren, C. D., Zheng, D., Chan, D., Bunn, P. A., & Raben, D. (2007). Epithelial to mesenchymal transition predicts gefitinib resistance in cell lines of head and neck squamous cell carcinoma and non-small cell lung carcinoma. *Molecular cancer therapeutics*, *6*(6), 1683-1691.
16. Fu, J., Qin, L., He, T., Qin, J., Hong, J., Wong, J., ... & Xu, J. (2011). The TWIST/Mi2/NuRD protein complex and its essential role in cancer metastasis. *Cell research*, *21*(2), 275-289.
17. Fuchs, B. C., Fujii, T., Dorfman, J. D., Goodwin, J. M., Zhu, A. X., Lanuti, M., & Tanabe, K. K. (2008). Epithelial-to-mesenchymal transition and integrin-linked kinase mediate sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human hepatoma cells. *Cancer research*, *68*(7), 2391-2399.
18. Hammond, W. A., Swaika, A., & Mody, K. (2016). Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review. *Therapeutic advances in medical oncology*, *8*(1), 57-84.
19. Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D. B., & Johnston, P. G. (2013). Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature Reviews Cancer*, *13*(10), 714-726.
20. Graham, J. S., & Cassidy, J. (2012). Adjuvant therapy in colon cancer. *Expert review of anticancer therapy*, *12*(1), 99-109.
21. Konecny, G. E., Venkatesan, N., Yang, G., Dering, J., Ginther, C., Finn, R., ... & Slamon, D. J. (2008). Activity of lapatinib a novel HER2 and EGFR dual kinase inhibitor in human endometrial cancer cells. *British journal of cancer*, *98*(6), 1076-1084.
22. Kwok, W. K., Ling, M. T., Lee, T. W., Lau, T. C., Zhou, C., Zhang, X., ... & Wong, Y. C. (2005). Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target. *Cancer research*, *65*(12), 5153-5162.
23. Li, B., Tsao, S. W., Chan, K. W., Ludwig, D. L., Novosyadlyy, R., Li, Y. Y., ... & Cheung, A. L. (2014). Id1-Induced IGF-II and Its Autocrine/Endocrine Promotion of Esophageal Cancer Progression and Chemoresistance—Implications for IGF-II and IGF-IR-Targeted Therapy. *Clinical Cancer Research*, *20*(10), 2651-2662.
24. Ling, F., Kang, B., & Sun, X. H. (2014). Id proteins: small molecules, mighty regulators. *Curr Top Dev Biol*, *110*, 189-216.
25. Liu, C. Y., Lin, H. H., Tang, M. J., & Wang, Y. K. (2015). Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget*, *6*(18), 15966.
26. Kajita, M., McClinic, K. N., & Wade, P. A. (2004). Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress. *Molecular and cellular biology*, *24*(17), 7559-7566.
27. Maciejewska, I., Sakowicz-Burkiewicz, M., & Pawelczyk, T. (2014). Id1 Expression Level Determines the Differentiation of human Dental pulp stem cells. *Journal of dental research*, *93*(6), 576-581.
28. Maestro, R., Dei Tos, A. P., Hamamori, Y., Krasnokutsky, S., Sartorelli, V., Kedes, L., ... & Hannon, G. J. (1999). Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis. *Genes & development*, *13*(17), 2207-2217.
29. Markowitz, S. D., & Bertagnolli, M. M. (2009). Molecular basis of colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, *361*(25), 2449-2460.
30. Martin, T. A., Goyal, A., Watkins, G., & Jiang, W. G. (2005). Expression of the transcription factors snail, slug, and twist and their clinical significance in human breast cancer. *Annals of surgical oncology*, *12*(6), 488-496.

31. Massari, M. E., & Murre, C. (2000). Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Molecular and cellular biology*, 20(2), 429-440.
32. Mikheeva, S. A., Mikheev, A. M., Petit, A., Beyer, R., Oxford, R. G., Khorasani, L., ... & Sánchez-García, I. (2010). TWIST1 promotes invasion through mesenchymal change in human glioblastoma. *Molecular cancer*, 9(1), 194.
33. Kurrey, N. K., Jalgaonkar, S. P., Joglekar, A. V., Ghanate, A. D., Chaskar, P. D., Doiphode, R. Y., & Bapat, S. A. (2009). Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53 - mediated apoptosis and acquiring a stem - like phenotype in ovarian cancer cells. *Stem cells*, 27(9), 2059-2068.
34. Naguib, F. N., el Kouni, M. H., & Cha, S. (1985). Enzymes of uracil catabolism in normal and neoplastic human tissues. *Cancer research*, 45(11 Part 1), 5405-5412.
35. O'Connell, J. B., Maggard, M. A., & Ko, C. Y. (2004). Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(19), 1420-1425.
36. Ota, M. S., Loebel, D. A., O'Rourke, M. P., Wong, N., Tsoi, B., & Tam, P. P. (2004). Twist is required for patterning the cranial nerves and maintaining the viability of mesodermal cells. *Developmental dynamics*, 230(2), 216-228.
37. Peng, J. J., Wu, B., Xiao, X. B., Shao, Y. S., Feng, Y., & Yin, M. X. (2014). Reduced Krüppel-like factor 17 (KLF17) expression correlates with poor survival in patients with gastric cancer. *Archives of medical research*, 45(5), 394-399.
38. Peters, G. J., Laurensse, E., Leyva, A., Lankelma, J., & Pinedo, H. M. (1986). Sensitivity of human, murine, and rat cells to 5-fluorouracil and 5'-deoxy-5-fluorouridine in relation to drug-metabolizing enzymes. *Cancer Research*, 46(1), 20-28.
39. Peters, G. J., van Groeningen, C. J., Laurensse, E. J., & Pinedo, H. M. (1991). A comparison of 5 - fluorouracil metabolism in human colorectal cancer and colon mucosa. *Cancer*, 68(9), 1903-1909.
40. Potemski, P. (2010). Epidemiologia, badania przesiewowe i klasyfikacja zaawansowania klinicznego raka jelita grubego. *Onkologia w Praktyce Klinicznej*, 6(6), 283-289.
41. Sabbah, M., Emami, S., Redeuilh, G., Julien, S., Prévost, G., Zimmer, A., ... & Gespach, C. (2008). Molecular signature and therapeutic perspective of the epithelial-to-mesenchymal transitions in epithelial cancers. *Drug Resistance Updates*, 11(4), 123-151.
42. Guo, P., Lan, J., Ge, J., Mao, Q., & Qiu, Y. (2013). ID1 regulates U87 human cell proliferation and invasion. *Oncology letters*, 6(4), 921-926.
43. Sasaki, K., Natsugoe, S., Ishigami, S., Matsumoto, M., Okumura, H., Setoyama, T., ... & Owaki, T. (2009). Significance of Twist expression and its association with E-cadherin in esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 28(1), 158.
44. Satoh, K., Hamada, S., Kimura, K., Kanno, A., Hirota, M., Umino, J., ... & Egawa, S. (2008). Up-regulation of MSX2 enhances the malignant phenotype and is associated with twist 1 expression in human pancreatic cancer cells. *The American journal of pathology*, 172(4), 926-939.
45. Serova, M., Astorgues-Xerri, L., Bieche, I., Albert, S., Vidaud, M., Benhadji, K. A., ... & Gespach, C. (2010). Epithelial-to-mesenchymal transition and oncogenic ras expression in resistance to the protein kinase C β inhibitor enzastaurin in colon cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*, 9(5), 1308-1317.
46. Sharma, P., Patel, D., & Chaudhary, J. (2012). Id1 and Id3 expression is associated with increasing grade of prostate cancer: Id3 preferentially regulates CDKN1B. *Cancer medicine*, 1(2), 187-197.
47. Shiota, M., Izumi, H., Onitsuka, T., Miyamoto, N., Kashiwagi, E., Kidani, A., ... & Kohno, K. (2008). Twist promotes tumor cell growth through YB-1 expression. *Cancer research*, 68(1), 98-105.

48. Sikder, H. A., Devlin, M. K., Dunlap, S., Ryu, B., & Alani, R. M. (2003). Id proteins in cell growth and tumorigenesis. *Cancer cell*, 3(6), 525-530.
49. Stankic, M., Pavlovic, S., Chin, Y., Brogi, E., Padua, D., Norton, L., ... & Benezra, R. (2013). TGF- β -Id1 signaling opposes Twist1 and promotes metastatic colonization via a mesenchymal-to-epithelial transition. *Cell reports*,5(5), 1228-1242.
50. Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *cell*, 139(5), 871-890.
51. Tobin, N. P., Sims, A. H., Lundgren, K. L., Lehn, S., & Landberg, G. (2011). Cyclin D1, Id1 and EMT in breast cancer. *BMC cancer*, 11(1), 417.
52. Tran, D. D., Corsa, C. A. S., Biswas, H., Aft, R. L., & Longmore, G. D. (2011). Temporal and spatial cooperation of Snail1 and Twist1 during epithelial–mesenchymal transition predicts for human breast cancer recurrence. *Molecular Cancer Research*, 9(12), 1644-1657.
53. Valdés-Mora, F., Del Pulgar, T. G., Bandrés, E., Cejas, P., De Molina, A. R., Pérez-Palacios, R., ... & Nistal, M. (2009). TWIST1 overexpression is associated with nodal invasion and male sex in primary colorectal cancer. *Annals of surgical oncology*, 16(1), 78-87.
54. Wang, W. S., Yu, S. L., Yang, X. S., Chang, S. D., & Hou, J. Q. (2013). Expression and significance of twist and E-cadherin in ovarian cancer tissues. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(2), 669-672.
55. Wang, X., Ling, M. T., Guan, X. Y., Tsao, S. W., Cheung, H. W., Lee, D. T., & Wong, Y. C. (2004). Identification of a novel function of TWIST, a bHLH protein, in the development of acquired taxol resistance in human cancer cells. *Oncogene*, 23(2), 474-482.
56. Wang, Z., Li, Y., Ahmad, A., Azmi, A. S., Kong, D., Banerjee, S., & Sarkar, F. H. (2010). Targeting miRNAs involved in cancer stem cell and EMT regulation: An emerging concept in overcoming drug resistance. *Drug resistance updates*,13(4), 109-118.
57. Wheelock, M. J., Shintani, Y., Maeda, M., Fukumoto, Y., & Johnson, K. R. (2008). Cadherin switching. *J Cell Sci*, 121(6), 727-735.
58. Wolpin, B. M., Meyerhardt, J. A., Mamon, H. J., & Mayer, R. J. (2007). Adjuvant treatment of colorectal cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*,57(3), 168-185.
59. Xie, F., Li, K., & Ouyang, X. (2009). Twist, an independent prognostic marker for predicting distant metastasis and survival rates of esophageal squamous cell carcinoma patients. *Clinical & experimental metastasis*, 26(8), 1025-1032.
60. Yang, J., Mani, S. A., Donaher, J. L., Ramaswamy, S., Itzykson, R. A., Come, C., ... & Weinberg, R. A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *cell*, 117(7), 927-939.
61. Yang, M. H., Chen, C. L., Chau, G. Y., Chiou, S. H., Su, C. W., Chou, T. Y., ... & Wu, J. C. (2009). Comprehensive analysis of the independent effect of twist and snail in promoting metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*,50(5), 1464-1474.
62. Yuen, H. F., Chua, C. W., Chan, Y. P., Wong, Y. C., Wang, X., & Chan, K. W. (2007). Significance of TWIST and E-cadherin expression in the metastatic progression of prostatic cancer. *Histopathology*, 50(5), 648-658.
63. Zeisberg, M., & Neilson, E. G. (2009). Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *The Journal of clinical investigation*, 119(6), 1429-1437.
64. Zhang, Z., Xie, D., Li, X., Wong, Y. C., Xin, D., Guan, X. Y., ... & Wang, X. (2007). Significance of TWIST expression and its association with E-cadherin in bladder cancer. *Human pathology*, 38(4), 598-606.

65. Zhuo, W. L., Wang, Y., Zhuo, X. L., Zhang, Y. S., & Chen, Z. T. (2008). Short interfering RNA directed against TWIST, a novel zinc finger transcription factor, increases A549 cell sensitivity to cisplatin via MAPK/mitochondrial pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, 369(4), 1098-1102.