



**UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**

Collegium Medicum
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Bydgoszcz 2024



UNIwersytet
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Lekarski
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Karolina Buchholz

**Ekspresja wybranych czynników związanych z niestabilnością
genomową w gruczolakoraku przewodowym trzustki:
ocena wartości prognostycznej oraz wpływu na chemiooporność
komórek nowotworowych**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu

Promotor:

Prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Dariusz Grzanka

Promotor pomocniczy:

Dr n. med. Anna Klimaszewska - Wiśniewska

Bydgoszcz 2024

Składam serdeczne podziękowania

Panu prof. dr. hab. n. med. i n. o zdr. Dariuszowi Grzance za cenne wskazówki, opiekę merytoryczną oraz stworzenie dogodnych warunków do realizacji niniejszej pracy doktorskiej.

Dr n. med. Annie Klimaszewskiej - Wiśniewskiej za współpracę, poświęcony czas, stymulowanie do ciągłego rozwoju naukowego oraz nieocenioną pomoc merytoryczną w przygotowaniu niniejszej pracy doktorskiej.

Pracownikom Katedry Histologii i Embriologii oraz Katedry Patomorfologii Klinicznej CM UMK, w szczególności dr n. med. Justynie Durślewicz za pomoc w realizacji pracy doktorskiej.

Mężowi, Rodzinie i Przyjaciołom za wsparcie.

SPIS TREŚCI

1. NOTA INFORMACYJNA	6
2. LISTA PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	6
3. WYKAZ SKRÓTÓW	8
4. WSTĘP	10
4.1. Rak trzustki	10
4.2. Niestabilność genomowa w raku trzustki	11
4.3. Wybrane białka zaangażowane w utrzymanie stabilności genomu	12
4.3.1. Cyklina F	12
4.3.2. RRM2	13
4.3.3. SPDL1	14
4.3.4. SKA3	15
5. CEL PRACY	17
6. OMÓWIENIE PUBLIKACJI WŁĄCZONYCH DO CYKLU	18
6.1. Artykuł oryginalny 1: „Expression of genomic instability-related molecules: Cyclin F, RRM2 and SPDL1 and their prognostic significance in pancreatic adenocarcinoma”	18
6.2. Artykuł oryginalny 2: „SKA3 expression as a prognostic factor for patients with pancreatic adenocarcinoma”	20
7. NIEPUBLIKOWANE DANE WŁĄCZONE DO ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	23
7.1. Materiały i metody	23
7.1.1. Hodowla komórkowa	23
7.1.2. Wyciszenie ekspresji genu <i>SPDL1</i>	23
7.1.3. Analiza tempa proliferacji	24
7.1.4. Ocena potencjału klonogennego	24
7.1.5. Analiza aktywności migracyjnej	24
7.1.6. Fluorescencyjna analiza organizacji mikrotubul oraz ekspresji γ H2AX	25
7.1.7. Traktowanie komórek lekami przeciwnowotworowymi	26
7.1.8. Spektrofotometryczny test MTT	27
7.1.9. Cytometryczna analiza apoptozy	27
7.1.10. Ilościowy PCR w czasie rzeczywistym	28
7.1.11. Western Blot	29
7.1.12. Analiza statystyczna	30
7.2. Wyniki	31

7.2.1.	Ocena efektywności wyciszenia ekspresji <i>SPDL1</i> w komórkach linii PANC-1	31
7.2.2.	Analiza skutków wyciszenia genu <i>SPDL1</i> w linii komórkowej PANC-1 – wpływ na wybrane cechy biologiczne komórek.....	31
7.2.2.1.	Ocena morfologii komórek.....	31
7.2.2.2.	Ocena tempa proliferacji.....	32
7.2.2.3.	Ocena potencjału klonogenego.....	33
7.2.2.4.	Ocena aktywności migracyjnej	34
7.2.2.5.	Fluorescencyjna ocena morfologii wrzecion podziałowych oraz obecności ufosforylowanego histonu H2AX.....	34
7.2.2.6.	Ocena ekspresji mRNA wybranych markerów związanych z inwazją i przerzutowaniem komórek nowotworowych.....	35
7.2.3.	Analiza skutków wyciszenia genu <i>SPDL1</i> w linii komórkowej PANC-1 – wpływ na działanie wybranych chemioterapeutyków	38
7.2.3.1.	Ocena przeżycia komórek.....	38
7.2.3.2.	Ocena występowania apoptozy	39
8.	OMÓWIENIE WYNIKÓW	41
9.	WNIOSKI.....	48
10.	PIŚMIENNICTWO.....	49
11.	STRESZCZENIE	57
12.	SUMMARY	59
13.	PUBLIKACJE BĘDĄCE PRZEDMIOTEM ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.....	61
14.	OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW PUBLIKACJI	97
15.	ZGODY KOMISJI BIOETYCZNEJ NA PRZEPROWADZENIE DOŚWIADCZEŃ.....	105

1. NOTA INFORMACYJNA

Niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana w formie hybrydowej (Komunikat nr 19/2020 Rady Doskonałości Naukowej odnośnie art. 187 ust. 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.)). W jej skład wchodzi dwa powiązane tematycznie oryginalne artykuły naukowe opublikowane w czasopiśmie, które w dniu publikacji znajdowały się w wykazie czasopism naukowych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, a także niepublikowane dotąd wyniki badań stanowiące kontynuację rozwiązania problemu naukowego. Udział autorki w realizacji drugiej części rozprawy doktorskiej (rozdział 7) obejmował przeprowadzenie większości eksperymentów *in vitro* oraz analizę, interpretację i przedstawienie w formie opisowej i graficznej uzyskanych wyników.

2. LISTA PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

2.1. Expression of genomic instability-related molecules: Cyclin F, RRM2 and SPDL1 and their prognostic significance in pancreatic adenocarcinoma.

Anna Klimaszewska-Wiśniewska*, Karolina Buchholz*, Izabela Neska-Długosz, Justyna Durślewicz, Dariusz Grzanka, Jan Zabrzyński, Paulina Sopońska, Alina Grzanka, Maciej Gagat. *Cancers (Basel)*. 2021; 13(4):859.

Impact Factor: 6.575, Punktacja MNiSW: 140

* równorzędne pierwsze autorstwo

Charakter udziału: zebranie danych klinicznych pacjentów, analiza i interpretacja uzyskanych wyników, przygotowanie manuskryptu.

2.2. SKA3 expression as a prognostic factor for patients with pancreatic adenocarcinoma.

Karolina Buchholz, Justyna Durślewicz, Anna Klimaszewska-Wiśniewska, Magdalena Wiśniewska, Maciej Słupski, Dariusz Grzanka. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25(10):5134.

Impact Factor: 5.600, Punktacja MNiSW: 140

Charakter udziału: stworzenie koncepcji badania i pozyskanie środków finansowych na jego realizację, wykonanie i ocena barwienia immunohistochemicznego, analiza i interpretacja uzyskanych wyników, przygotowanie manuskryptu.

Tabela 1. Podsumowanie osiągnięć naukowych.

Rodzaj publikacji	Liczba	Impact Factor	Punktacja MNiSW
Artykuły oryginalne włączone do rozprawy doktorskiej	2	12,175	280
Artykuły oryginalne nie włączone do rozprawy doktorskiej	12	48,660	920
Artykuły przeglądowe nie włączone do rozprawy doktorskiej	3	2,827	90
Streszczenia zjazdowe	38	-	-
Razem		63,662	1290

3. WYKAZ SKRÓTÓW

ABB	(ang. annexin-binding buffer) – bufor wiążący aneksynę
AUC	(ang. area under the curve) – pole powierzchni pod krzywą
BSA	(ang. bovine serum albumin) – albumina surowicy bydlęcej
CCDC99	(ang. Coiled-Coil Domain-Containing Protein 99)
CCK-8	(ang. cell counting kit 8)
CDKs	(ang. cyclin-dependent kinases) – kinazy zależne od cyklin
CIN	(ang. chromosome instability) – niestabilność chromosomowa
CRC	(ang. colorectal cancer) – rak jelita grubego i odbytu
CSCs	(ang. cancer stem cells) – nowotworowe komórki macierzyste
DFS	(ang. disease-free survival) – przeżycie wolne od choroby
DMEM	(ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMSO	(ang. dimethyl sulfoxide) – dimetylosulfotlenek
dNTPs	(ang. deoxynucleotide triphosphates) – trifosforany deoksyrybonukleotydów
EMT	(ang. epithelial to mesenchymal transition) – przejście epithelialno-mezenchymalne
FBS	(ang. fetal bovine serum) – płodowa surowica bydlęca
GAPDH	(ang. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
GIN	(ang. genomic instability) – niestabilność genomowa
GLOBOCAN	(ang. Global Cancer Observatory)
GTE _x	(ang. The Genotype-Tissue Expression)
MC	(ang. mitotic catastrophe) - katastrofa mitotyczna
MNGCs	(ang. multinucleated giant cells) – olbrzymie komórki wielojądrowe
MOI	(ang. multiplicity of infection) – liczba cząstek wirusa przypadająca na jedną komórkę w hodowli
MTT	bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-difenylotetrazolowy
OS	(ang. overall survival) – przeżycie całkowite
PAAD	(ang. pancreatic adenocarcinoma) – gruczolakorak trzustki
PanIN	(ang. pancreatic intraepithelial neoplasia) – śródnabłonkowa neoplazja trzustkowa
PBS	(ang. phosphate buffered saline) – sól fizjologiczna buforowana fosforanami
PDAC	(ang. pancreatic ductal adenocarcinoma) – gruczolakorak przewodowy trzustki

PFA	paraformaldehyd
PI	(ang. propidium iodide) – jodek propidyny
PPI	(ang. protein-protein interaction) – oddziaływanie białko-białko
real-time PCR	(ang. real-time polymerase chain reaction) – reakcja łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym
RNR	(ang. ribonucleotide reductase) – reduktaza rybonukleotydowa
RRM1	(ang. ribonucleotide reductase catalytic subunit M1) – podjednostka regulacyjna M1 reduktazy rybonukleotydowej
RRM2	(ang. ribonucleotide reductase regulatory subunit M2) – podjednostka katalityczna M2 reduktazy rybonukleotydowej
SAC	(ang. spindle assembly checkpoint) – punkt kontrolny wrzeciona podziałowego
SD	(ang. standard deviation) – odchylenie standardowe
SKA	(ang. spindle and kinetochore associated complex) – kompleks związany z wrzecionem i kinetochorem
SPDL1	(ang. spindle apparatus coiled-coil protein 1)
TCGA	(ang. The Cancer Genome Atlas)
TMA	(ang. tissue macroarrays) – makromacierze tkankowe

4. WSTĘP

4.1. Rak trzustki

Rak trzustki jest jednym z najbardziej śmiertelnych nowotworów złośliwych na świecie. Według danych GLOBOCAN (ang. Global Cancer Observatory) w 2022 roku odnotowano 467 005 zgonów i 510 566 nowych przypadków raka trzustki, co czyni go dwunastym najczęściej diagnozowanym nowotworem i jednocześnie szóstą co do częstości przyczyną zgonów z powodu raka na świecie [1]. Długotrwałe asymptotyczny lub niespecyficznie objawiający się początkowy przebieg oraz wysoka inwazyjność choroby powodują, że w ponad 80% przypadków nowotwór diagnozowany jest w zaawansowanym stadium rozwoju. Powyższe czynniki w połączeniu ze stosunkowo niską skutecznością dostępnych schematów leczenia sprawiają, że wskaźnik pięcioletniego przeżycia pacjentów wynosi zaledwie 13% [2]. Obecnie jedyną skuteczną metodą pozwalającą na pełne wyleczenie raka trzustki jest przeprowadzenie radykalnego zabiegu chirurgicznego. W zależności od umiejscowienia zmiany nowotworowej, wykonuje się operację Whipple’a, zabieg totalnej pankreatektomii lub częściową pankreatektomię obejmującą trzon i ogon trzustki. Leczenie to może zostać poprzedzone chemioterapią neoadjuwantową w celu zmniejszenia masy guza oraz zminimalizowania ryzyka rozsiewu związanego z postępowaniem operacyjnym [3]. Należy jednak podkreślić, iż guzy resekcyjne stanowią zaledwie 15-20% wszystkich przypadków, a nawrót choroby w ciągu dwóch lat po operacji stwierdza się u trzech na czterech pacjentów [4]. W leczeniu raka trzustki stosuje się również chemioterapię adjuwantową, której celem jest wydłużenie całkowitego czasu przeżycia chorych oraz czasu wolnego od wznowy. Jeśli guz nie spełnia kryteriów resekcyjności, pacjenci poddawani są leczeniu paliatywnemu [3]. Głównymi chemioterapeutykami stosowanymi w leczeniu raka trzustki są: gemcitabina w monoterapii oraz w skojarzeniu z nab-paklitakselem lub kapecytabiną, 5-fluorouracyl, a także schemat znany pod nazwą FOLFIRINOX (5-fluorouracyl, leukoworyna, irynotekan i oksaliplatyna) [5].

W ciągu ostatnich dwóch dekad liczba przypadków raka trzustki diagnozowanych każdego roku wzrosła ponad dwukrotnie. Wynika to przede wszystkim ze zmieniającej się struktury wiekowej populacji oraz znaczącego rozwoju metod diagnostycznych, szczególnie w krajach wysoko rozwiniętych. Rak trzustki jest częściej wykrywany u mężczyzn niż kobiet, a średni wiek pacjentów w momencie diagnozy wynosi 70 lat. Czynnikiem, który w największym stopniu zwiększa ryzyko zachorowania na raka trzustki jest palenie papierosów. Mniejszy, choć nadal

istotny wpływ mają także: częste spożywanie alkoholu, przewlekłe zapalenie trzustki, otyłość (w tym związane z nią insulinooporność i cukrzyca typu 2) oraz czynniki genetyczne [6].

4.2. Niestabilność genomowa w raku trzustki

W ostatnich latach przeprowadzono liczne badania mające na celu identyfikację nowych biomarkerów i potencjalnych celów terapeutycznych zaangażowanych w patogenezę i progresję raka trzustki. Odkrycia w tej dziedzinie uwidoczniły istotny związek między niestabilnością genomową (ang. genomic instability, GIN) a progresją choroby, co skierowało uwagę naukowców na GIN jako jeden z kluczowych czynników przyczyniających się do rozwoju nowotworów trzustki [7,8].

Patogenezę raka trzustki najdokładniej zbadano w gruczolakoraku przewodowym trzustki (ang. pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) - dominującym typie histologicznym tego nowotworu. Wykazano, że rozwój PDAC jest wieloetapowym procesem trwającym kilka lat lub nawet dekad, a czas potrzebny komórkom guza pierwotnego do nabrania zdolności inwazyjnych wynosi zwykle ponad 5 lat [9]. Najczęstszym stadium prekursorowym inwazyjnego PDAC jest śródnabłonkowa neoplazja trzustkowa (ang. pancreatic intraepithelial neoplasia, PanIN), a każdemu etapowi progresji PanIN do PDAC towarzyszy wiele istotnych zmian molekularnych w obrębie genów zaangażowanych w utrzymanie stabilności genetycznej komórki, w tym aktywacja protoonkogenów, m.in. *KRAS* i *EGFR*, a także utrata aktywności genów supresorowych, takich jak *TP53*, *CDKN2A*, *SMAD4* i *BRCA2* [10]. Chociaż do tej pory scharakteryzowano wiele zaburzeń genetycznych, które są wspólne dla rozwijającego się nowotworu, guzy trzustki cechuje wysoka heterogeniczność, a przez to zróżnicowany obraz kliniczny. Najlepiej dowodzą tego badania przeprowadzone przez Campbell i wsp., w których obserwowano dużą dynamikę zmian genetycznych towarzyszącą progresji raka trzustki, będącą konsekwencją niestabilności genomowej. Analiza licznych próbek guzów przerzutowych pobranych od tego samego pacjenta wykazała obecność zróżnicowanych zaburzeń genetycznych, co sugeruje, że niestabilny genom zapewnia dodatkowe cechy zmianom przerzutowym pochodzącym z tego samego guza pierwotnego [7]. Podobne wnioski przyniosły badania prowadzone na organoidach raka trzustki. Analiza transkryptomiczna pozwoliła zidentyfikować liczne populacje klonalne w obrębie organoidów, których proporcja zmieniała się w toku hodowli, sugerując przewagę wzrostu niektórych klonów. Dodatkowo w obrębie każdej populacji klonalnej zaobserwowano subklonalną heterogeniczność, wskazującą na niestabilność genomową samych komórek raka trzustki [11].

Podsumowując, badania potwierdzają istotny związek pomiędzy GIN a patogenezą raka trzustki oraz nabywaniem przez komórki tego nowotworu zdolności do inwazji. W związku z tym poznanie mechanizmów GIN w raku trzustki wydaje się być kluczowe dla scharakteryzowania nowych markerów diagnostycznych i prognostycznych, a także opracowania skutecznych terapii ukierunkowanych molekularnie.

4.3. Wybrane białka zaangażowane w utrzymanie stabilności genomu

Istotnym etapem poprzedzającym realizację niniejszej rozprawy doktorskiej było wytypowanie czterech białek (cyklina F, RRM2, SPDL1, SKA3) spełniających następujące kryteria: i) mają potwierdzony udział w procesach związanych z utrzymaniem stabilności i integralności ludzkiego genomu; ii) stanowią element sygnatur ekspresyjnych niestabilnych genomów nowotworowych człowieka; iii) ich ekspresja ulega deregulacji w przebiegu PDAC (analiza doniesień z piśmiennictwa oraz danych *in silico*); iv) brak danych lub pojedyncze doniesienia literaturowe czy też niejednoznaczne wyniki odnośnie ich znaczenia w prognozowaniu przebiegu klinicznego PDAC.

Analizę sygnatur ekspresji genów powiązanych z niestabilnymi genomami ludzkich nowotworów przeprowadzono na podstawie danych transkryptomicznych pochodzących z próbek nowotworów o ugruntowanym związku z niestabilnością genomową, takich jak rak piersi czy jelita grubego. Dane te stanowiły opublikowane materiały uzupełniające do publikacji naukowych oraz zdeponowane wyniki profilowania wielkoskalowego technikami macierzy DNA pochodzące z repozytorium Gene Expression Omnibus (GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Te ostatnie pobierano i analizowano za pomocą narzędzi bioinformatycznych GEO2R (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>), ShinyGEO (<https://gdancik.shinyapps.io/shinyGEO/>) oraz TidyGEO (<https://bioapps.byu.edu/TidyGEO/>).

4.3.1. Cyklina F

Cyklina F (kodowana przez gen *CCNF*) jest ważnym członkiem rodziny białek F-box. Podobnie jak inne białka tej grupy, pełni rolę podjednostki odpowiedzialnej za rozpoznawanie substratów w kompleksie ligazy ubikwityny E3 typu SCF (Skp1-Cul1-F-box). W ten sposób bierze udział w ubikwitynacji białek docelowych za pośrednictwem kaskady enzymów [12,13]. Ubikwitynowane cząsteczki kierowane są dalej do proteasomu, gdzie ulegają proteolizie. Powyższy mechanizm degradacji białek znany jest jako system ubikwityna-proteasom. Poziom cyklina F wzrasta w fazie S i osiąga szczyt w fazie G2 cyklu komórkowego. Jest ściśle regulowany w celu zapewnienia kontrolowanej degradacji białek [14]. Cyklina F należy również do rodziny

cyklin i bierze udział w regulacji różnych procesów cyklu komórkowego powiązanych z utrzymaniem stabilności genomu, w tym duplikacji centrosomów, funkcjonowaniem punktu kontrolnego G2/M oraz replikacji i naprawy DNA [14–16]. W przeciwieństwie do innych cyklin, które wykorzystują kinazy zależne od cyklin (ang. cyclin-dependent kinases, CDKs) do fosforylacji substratów białkowych i promowania zdarzeń cyklu komórkowego, cyklina F działa niezależnie od CDKs.

Zaburzona ekspresja cykliny F w wielu nowotworach wiąże się ze złym rokowaniem pacjentów [17–20], a także zwiększoną proliferacją komórek, przerzutami i lekoopornością w niektórych z nich [21–23]. Chociaż białko to jest istotne dla zapewnienia wierności mitotycznej, jego znaczenie prognostyczne oraz rola w progresji raka trzustki nie zostały jeszcze dokładnie zbadane. Wyniki przedstawione przez Zhang i wsp. pokazały, że poziom cykliny F jest znacząco podwyższony w guzach PDAC w porównaniu do prawidłowej tkanki. Podobne obserwacje opisano dla ekspresji *CCNF* w większości ludzkich linii komórkowych PDAC w odniesieniu do prawidłowych komórek nabłonka przewodów trzustkowych. Na podstawie analiz publicznie dostępnych baz danych, zmienioną ekspresję *CCNF* uznano także za istotnie powiązaną ze stopniem zróżnicowania histologicznego, stopniem zaawansowania klinicznego, metylacją promotora, mutacją TP53 i naciekiem immunologicznym [24]. Z uwagi na powyższe cyklinę F można uznać za potencjalny predyktor przeżycia i cel terapii przeciwnowotworowej w PDAC, który wymaga dalszych badań.

4.3.2. RRM2

Reduktaza rybonukleotydowa (ang. ribonucleotide reductase, RNR) to enzym, który katalizuje konwersję difosforanów rybonukleotydów do odpowiadających im trifosforanów deoksyrybonukleotydów (ang. deoxynucleotide triphosphates, dNTPs), a tym samym zapewnia podstawowe elementy budulcowe do replikacji i naprawy DNA w proliferujących komórkach. RNR składa się z podjednostki regulacyjnej M1 (ang. ribonucleotide reductase catalytic subunit M1, RRM1) i małej podjednostki katalitycznej M2 (ang. ribonucleotide reductase regulatory subunit M2, RRM2). Ta ostatnia ma dodatkowo dwie izoformy, RRM2 i RRM2B [25,26]. RNR jest enzymem cytoplazmatycznym, który w odpowiedzi na stres genotoksyczny przemieszcza się do jądra komórkowego, aby zapewnić lokalną dostępność dNTPs, co jest niezbędne do efektywnej naprawy DNA. Wykazano, że utrzymanie zrównoważonej puli dNTPs w komórce ściśle zależy od poziomu białka RRM2, a ponieważ jest ono jednym z substratów dla cykliny F, regulacja jego ekspresji przebiega w osi cyklina F-RRM2:

uszkodzenie DNA wywołuje zależną od kinazy ATR regulację w dół cykliny F, aby umożliwić akumulację RRM2, a przez to syntezę dNTPs w celu wydajnej naprawy DNA. Z kolei gdy procesy replikacji DNA i/lub jego naprawy dobiegają końca, poziom cykliny F wzrasta promując w ten sposób degradację RRM2 [14].

Zaburzoną ekspresję białka RRM2 powiązano z kancerogenezą, ponieważ powszechnie wiadomo, że niezrównoważone pule dNTPs mogą prowadzić do niestabilności genomowej i postępu cyklu komórkowego, ułatwiając tym samym proliferację komórek nowotworowych. Do tej pory opublikowano tylko kilka doniesień prezentujących wartość kliniczną białka RRM2 [27,28] lub mRNA [29–32] w kohortach raka trzustki, jednak badania te różniły się pod względem wpływu RRM2 na przeżycie pacjentów. Fisher i wsp. wykazali, że wysoka ekspresja RRM2 była niezależnym negatywnym czynnikiem prognostycznym dla nawrotu i czasu całkowitego przeżycia u pacjentów z wczesnym stadium PDAC [27]. Z kolei zespół Xie i wsp. uzyskał wyniki, zgodnie z którymi immunoekspresja RRM2 w grupie pacjentów z resekcyjnym gruczolakorakiem trzustki nie miała wartości rokowniczej ani predykcyjnej, odpowiednio w kontekście przeżycia całkowitego i oceny korzyści leczenia uzupełniającego gemcytabiną [28]. Podłoże przedstawionych rozbieżności pozostaje niejasne. Aby w pełni zrozumieć rolę białka RRM2 w patogenezie i/lub progresji raka trzustki oraz ocenić jego wartość prognostyczną, konieczne jest przeprowadzenie kolejnych doświadczeń.

4.3.3. SPDL1

Białko SPDL1 (ang. Spindle Apparatus Coiled-Coil Protein 1), znane również pod nazwą CCDC99 (ang. Coiled-Coil Domain-Containing Protein 99), jest stosunkowo niedawno zidentyfikowanym regulatorem mitozy. Jego lokalizacja ściśle zależy od fazy cyklu komórkowego. We wczesnej prometafazie obecne jest w kinetochorze, natomiast przed metafazą ulega relokacji do bieguna wrzeciona mitotycznego i pozostaje tam do momentu zakończenia kongresji chromosomów [33]. SPDL1 bierze udział w regulacji punktu kontrolnego wrzeciona podziałowego (ang. spindle assembly checkpoint, SAC) poprzez rekrutację dyneiny – białka motorycznego, które odpowiada za ustawienie chromosomów w płaszczyźnie równikowej komórki i które w kompleksie z dynaktyną usuwa białka SAC, promując tym samym rozpoczęcie kolejnej fazy cyklu komórkowego [34]. Białko SPDL1 jest zatem jednym z czynników zapewniających prawidłowy rozdział chromosomów do komórek potomnych.

Niekontrolowane zmiany ekspresji SPDL1 i towarzyszące im zaburzenia procesu mitozy, w tym szczególnie segregacji chromosomów, zostały powiązane z rozwojem i progresją wielu

nowotworów [35]. Uważa się, że z uwagi na pełnioną funkcję, jednym z czynników napędzających kancerogenezę związaną z zaburzeniami ekspresji *SPDL1* jest niestabilność chromosomowa (ang. chromosome instability, CIN) [36]. Jednak próby wyjaśnienia roli omawianego białka w rozwoju nowotworów nie przyniosły jednoznacznych wniosków. Część autorów stawia kodujący je gen *SPDL1* w roli onkogenu, którego podwyższona ekspresja przyspiesza proliferację, migrację i inwazję komórek nowotworowych [37–40], a także negatywnie wpływa na rokowanie pacjentów [41]. Badania *in silico* przeprowadzone przez Tian i wsp. wsparły powyższą teorię wykazując, iż podwyższona ekspresja *SPDL1* u pacjentów z PDAC była istotnie powiązana z zaawansowanym stadium nowotworu oraz krótszym czasem przeżycia całkowitego i przeżycia wolnego od choroby [42]. W przeciwieństwie do przedstawionych wyżej danych, Kodama i wsp. opublikowali wyniki badań sugerujące, że *SPDL1* w raku jelita grubego i odbytu (ang. colorectal cancer, CRC) pełni funkcję genu supresorowego. Wniosek ten oparto na obserwacji, iż wyciszenie ekspresji *SPDL1* w komórkach CRC znacząco zwiększało ich migrację i inwazję, a w testach prowadzonych na modelu mysim przyspieszało wzrost ksenograftu [43].

Przedstawione obserwacje wskazują, że rola *SPDL1* w rozwoju i progresji nowotworowej istotnie różni się pomiędzy nowotworami, co może wynikać z ich zróżnicowanej patofizjologii, a także heterogenicznej budowy. Nie ulega jednak wątpliwości, że znaczący udział *SPDL1* w procesie kancerogenezy czyni go potencjalnym biomarkerem i celem terapeutycznym w onkologii.

4.3.4. SKA3

Białkowy kompleks związany z wrzecionem i kinetochorem (ang. Spindle And Kinetochore Associated Complex, Ska) jest heterodimerem zbudowanym z trzech podjednostek: Ska1, Ska2 i Ska3, które we współpracy z innym kompleksem – Ndc80, stabilizują interakcję kinetochor-mikrotubule. Kompleks Ska ma symetryczną budowę. Jego centralną część w kształcie litery „W” tworzą N-końce trzech oddziałujących ze sobą domen o strukturze cewki. C-końce domen Ska1 i Ska3, które rozciągają się symetrycznie poza rdzeń kompleksu, wykazują zdolność wiązania mikrotubul [44]. Niektóre badania sugerują, że Ska może działać nie tylko poprzez przenoszenie sił generowanych przez mikrotubule, ale również odgrywać bardziej pośrednią, regulacyjną rolę w sprzężeniu kinetochoru i mikrotubul m.in. poprzez rekrutację fosfatazy białkowej 1 do kinetochoru [45]. Oprócz stabilizacji połączeń kinetochor-mikrotubule,

kompleks Ska bierze także udział w wyciszaniu punktu kontrolnego SAC, regulując w ten sposób wyjście z mitozy podczas podziału komórki [46].

Zdolność kinetochorów do utrzymywania stabilnych połączeń z dynamicznymi strukturami jakimi są mikrotubule jest kluczowa dla prawidłowego rozdziału chromosomów podczas mitozy, dlatego poziom białka SKA3 w komórkach jest ściśle regulowany. Zarówno zbyt słabe, jak i zbyt silne sprzężenie może generować błędy podczas segregacji, a przez to prowadzić do niestabilności chromosomowej [47]. Wykazano, że podwyższone poziomy białka SKA3 sprzyjają progresji nowotworowej poprzez promowanie proliferacji, migracji i inwazji komórek [48–51]. Niemniej jednak jego rola w patogenezie PDAC oraz znaczenie prognostyczne w tym nowotworze nie zostały dotąd zbadane. Dostępne dane ograniczają się jedynie do wyników oceny ekspresji mRNA *SKA3* w raku trzustki, które sugerują, że nadekspresja tego genu częściej obserwowana jest w guzach o wysokim stopniu złośliwości histologicznej [52] i koreluje z gorszym rokowaniem pacjentów (krótszym przeżyciem bez progresji, przeżyciem całkowitym, przeżyciem bez choroby oraz przeżyciem specyficznym dla choroby) [53]. Powyższe wyniki wskazują na potrzebę przeprowadzenia dodatkowych badań, które pokażą, czy SKA3 ocenione rutynową techniką immunohistochemiczną może mieć znaczenie rokownicze dla pacjentów z PDAC.

5. CEL PRACY

Cele niniejszej rozprawy doktorskiej obejmowały:

- A. Ocenę wartości prognostycznej immunoekspresji białek związanych z utrzymaniem stabilności genomu: cykliny F, RRM2, SPDL1 i SKA3 w kohorcie pacjentów z gruczolakorakiem przewodowym trzustki.
- B. Ocenę wartości prognostycznej ekspresji mRNA genów *CCNF*, *RRM2*, *SPDL1* i *SKA3* w oparciu o dane transkryptomiczne zgromadzone w ramach projektu The Cancer Genome Atlas dla pacjentów z gruczolakorakiem trzustki.
- C. Określenie zależności pomiędzy ekspresją ww. czynników związanych z utrzymaniem stabilności genomu a wybranymi cechami kliniczno-patologicznymi analizowanych grup pacjentów.
- D. Ocenę wpływu zmiany ekspresji genu *SPDL1* na morfologię, proliferację, potencjał klonogeny oraz zdolności migracyjne komórek raka trzustki (badania *in vitro*).
- E. Zbadanie roli SPDL1 w odpowiedzi komórek raka trzustki na działanie wybranych leków przeciwnowotworowych (badania *in vitro*).
- F. Analiza wzbogacenia funkcjonalnego białek pozytywnie skorelowanych z SKA3 w tkankach gruczolakoraka trzustki (badania *in silico*).

6. OMÓWIENIE PUBLIKACJI WŁĄCZONYCH DO CYKLU

6.1. Artykuł oryginalny 1: „Expression of genomic instability-related molecules: Cyclin F, RRM2 and SPDL1 and their prognostic significance in pancreatic adenocarcinoma”

Anna Klimaszewska-Wiśniewska*, Karolina Buchholz*, Izabela Neska-Długosz, Justyna Durślewicz, Dariusz Grzanka, Jan Zabrzyński, Paulina Sopońska, Alina Grzanka, Maciej Gagat. *Cancers* (Basel). 2021; 13(4):859.

Impact Factor: 6.575, Punktacja MNiSW: 140

Pierwsza praca naukowa cyklu to artykuł oryginalny prezentujący analizę związku pomiędzy poziomem ekspresji cykliny F, RRM2 i SPDL1 a wybranymi cechami kliniczno-patologicznymi i rokowaniem pacjentów z gruczolakorakiem trzustki. Oceny dokonano na dwóch poziomach informacji biologicznej – białka oraz mRNA. Obecność swoistych antygenów dla cykliny F, RRM2 oraz SPDL1 oznaczono immunohistochemicznie w archiwalnym materiale tkankowym pochodzącym od 68 pacjentów z PDAC, podczas gdy do analizy ekspresji genów wykorzystano publicznie dostępne dane transkryptomiczne zgromadzone w ramach projektów The Cancer Genome Atlas (TCGA) oraz The Genotype-Tissue Expression (GTEx).

Wykazano, że ekspresja wszystkich analizowanych czynników, zarówno na poziomie białka, jak i mRNA, była istotnie podwyższona w tkance nowotworowej w porównaniu do tkanek kontrolnych (odpowiednio tkanki okołonowotworowej oraz prawidłowej). Dodatkowo wysoki poziom białka cykliny F obserwowano częściej u pacjentów ze stwierdzoną neuroinwazją ($p = 0,02$). Z kolei nadekspresja mRNA *CCNF* była istotnie powiązana z cechami kliniczno-patologicznymi takimi jak stopień złośliwości histologicznej ($p = 0,01$) oraz wielkość guza pierwotnego ($p = 0,04$). Ponadto stwierdzono wyraźną pozytywną korelację pomiędzy ekspresją badanych genów a statusem markera proliferacji *MKI67* oraz molekularnymi wskaźnikami niestabilności genomowej, takimi jak częstość aneuploidii oraz frakcja genomu objęta mutacjami typu zmiany liczby kopii ($p < 0,01$).

Analizy przeżycia Kaplana - Meiera pokazały, że podwyższona ekspresja mRNA każdego z badanych czynników związana jest ze znacząco krótszym całkowitym czasem przeżycia pacjentów z gruczolakorakiem trzustki (ang. pancreatic adenocarcinoma, PAAD). Wieloczynnikowy model proporcjonalnego hazardu Coxa potwierdził te obserwacje wskazując, iż nadekspresja *CCNF* ($HR = 1,66$; $p = 0,03$), *RRM2* ($HR = 1,94$; $p = 0,002$), a także

SPDL1 (HR = 2,39; p = 0,0001) stanowi niezależny niekorzystny wskaźnik prognostyczny w badanym nowotworze. Analogiczne analizy przeprowadzono w kohorcie własnej. Istotny związek pomiędzy całkowitym czasem przeżycia pacjentów z PDAC a statusem ekspresji potwierdzono wyłącznie dla białka *SPDL1*. W przeciwieństwie do wyników uzyskanych dla mRNA – wysoka immunoekspresja białka stanowiła niezależny korzystny czynnik rokowniczy (HR = 0,36; p = 0,01).

W ostatniej fazie badania, uwzględniając funkcjonalne powiązania między analizowanymi genami, podjęto próbę oceny wpływu łączonej ekspresji mRNA *CCNF*, *RRM2* i *SPDL1* na przeżycie pacjentów z PAAD. Wykazano, że grupa z jednoczesną wysoką ekspresją tych czynników rokuje gorzej niż ta z niskimi poziomami transkryptów. Wysłano wniosek, iż kombinacja trzech potencjalnych biomarkerów może być wykorzystywana do dokładniejszego przewidywania wyników klinicznych pacjentów z PAAD, ponieważ jest silniejszym prognostykiem całkowitego czasu przeżycia niż analiza każdego z nich oddzielnie.

W dyskusji szczegółowo omówiono wyniki w kontekście aktualnych doniesień naukowych oraz ograniczeń prezentowanej pracy. W podsumowaniu stwierdzono, że wszystkie badane czynniki na poziomie mRNA, zwłaszcza analizowane w kombinacji, są niezależnymi wskaźnikami rokowniczymi w PAAD. Szczególną uwagę zwrócono na *SPDL1* i jego potencjalną przydatność w przewidywaniu całkowitego czasu przeżycia pacjentów, ponieważ jego wartość prognostyczna potwierdzona została zarówno na poziomie mRNA, jak i białka. W dyskusji podjęto także próbę wyjaśnienia rozbieżności w wynikach sugerujących przeciwne znaczenie rokownicze dla tych dwóch poziomów informacji biologicznej. Przedstawiona publikacja stworzyła podstawy do przeprowadzenia badań *in vitro*, mających na celu określenie wpływu ekspresji *SPDL1* na właściwości biologiczne komórek raka trzustki.

6.2. Artykuł oryginalny 2: „SKA3 expression as a prognostic factor for patients with pancreatic adenocarcinoma”

Karolina Buchholz, Justyna Durślewicz, Anna Klimaszewska-Wiśniewska, Magdalena Wiśniewska, Maciej Słupski, Dariusz Grzanka. International Journal of Molecular Sciences. 2024; 25(10):5134.

Impact Factor: 5.600, Punktacja MNiSW: 140

Celem drugiej pracy włączonej do cyklu była analiza powiązań kliniczno-patologicznych oraz ocena wartości prognostycznej SKA3 w PDAC. Pierwszą część badań polegającą na pomiarze poziomu białka SKA3 w badanym nowotworze przeprowadzono przy użyciu immunohistochemicznie znakowanych makromacierzy tkankowych (ang. tissue macroarrays, TMAs) przygotowanych dla 110 pacjentów ze zdiagnozowanym PDAC. W kolejnym kroku, korzystając z baz TCGA oraz GTEx, pozyskano dane dotyczące ekspresji mRNA SKA3. Zebrane informacje korelowano z parametrami kliniczno-patologicznymi oraz czasem przeżycia pacjentów. Ponadto podjęto próbę ustalenia biologicznego znaczenia SKA3 w gruczolakoraku trzustki. W tym celu przy pomocy narzędzi bioinformatycznych (Reactome, KEGG, DAVID, STRING) przeprowadzono analizę wzbogacenia funkcjonalnego oraz wygenerowano mapę interakcji białko-białko (ang. protein-protein interaction, PPI) dla SKA3 oraz pięćdziesięciu najsilniej skorelowanych z nim genów.

Immunoekspresję białka SKA3 w kohorcie TMA analizowano w obrębie utkania nowotworowego oraz normotypowych przewodów trzustkowych tkanki sąsiadującej z guzem. Dodatnią reakcję immunohistochemiczną obserwowano wyłącznie we frakcji cytoplazmatycznej, a ekspresja białka SKA3 była istotnie wyższa w tkance nowotworowej w porównaniu do prawidłowego nabłonka przewodowego trzustki. Dalej ocenie poddano powiązanie statusu ekspresji wyrażonej jako zmienna kategoryzowana z wybranymi cechami kliniczno-patologicznymi, nie wykazano jednak żadnych istotnych zależności ($p > 0,05$). Oceny związku pomiędzy poziomem białka SKA3 a całkowitym czasem przeżycia pacjentów (ang. overall survival, OS) oraz czasem wolnym od choroby (ang. disease-free survival, DFS) dokonano przy pomocy testu logarytmicznego rang. Wykazano, że wysoka immunoekspresja białka dla obu analizowanych punktów końcowych wiązała się ze znacząco dłuższym czasem przeżycia pacjentów. Wieloczynnikowy model regresji Coxa potwierdził istotność tych obserwacji (OS: HR = 0,4; $p < 0,001$; DFS: HR = 0,48; $p = 0,0004$). Podobnie pomiar pola

powierzchni (ang. area under the curve, AUC) pod prognostyczną krzywą ROC pozwolił oszacować prawdopodobieństwo dłuższego czasu przeżycia pacjentów w grupie z wysoką ekspresją SKA3 na odpowiednio 65% i 63%, kolejno dla punktów końcowych OS oraz DFS.

Pogłębiona analiza danych pozwoliła zaobserwować, iż największe różnice w medianie całkowitego czasu przeżycia dla grup z niską i wysoką ekspresją SKA3 występują u pacjentów w I i II stopniu zaawansowania klinicznego nowotworu. W tej grupie podwyższony poziom białka SKA3 w PDAC wiązał się z istotnie dłuższym czasem przeżycia pacjentów i pozostał niezależnym czynnikiem prognostycznym w analizie wieloczynnikowej ($HR = 0,28$, $p < 0,001$) skorygowanej o wiek, status regionalnych węzłów chłonnych oraz obecność angio- i neuroinwazji. Znaczący związek między nadekspresją SKA3 a dłuższą medianą czasu przeżycia całkowitego odnotowano także w kilku dodatkowo wyodrębnionych podgrupach pacjentów: z guzami wielkości do 4 cm (pT1-T2), bez przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych (pN0), bez przerzutów odległych (pM0), bez stwierdzonej angioinwazji oraz ujemnym marginesem chirurgicznym (test log-rank $p < 0,05$). Łącznie odkrycia te pokazują, że ekspresja białka SKA3 ma znaczenie prognostyczne w PDAC, zwłaszcza we wczesnym stadium choroby.

Analiza danych transkryptomicznych wykazała, że ekspresja genu *SKA3* jest znacząco wyższa w PDAC w porównaniu do tkanki prawidłowej. Nie stwierdzono natomiast żadnych zależności pomiędzy poziomem mRNA *SKA3* a wybranymi cechami kliniczno-patologicznymi pacjentów ($p > 0,05$). Jednocześnie ocena molekularnych wskaźników niestabilności genomowej potwierdziła, że takie parametry jak frakcja genomu objęta mutacjami typu zmiany liczby kopii, częstość aneuploidii, liczba mutacji oraz wskaźnik niestabilności mikrosatelitarnej (MSIsensor score) są istotnie skorelowane ze zmianą ekspresji badanego transkryptu. Analiza przeżycia przeprowadzona z wykorzystaniem krzywych Kaplana-Meiera oraz logarytmicznego testu rang wykazała, że podwyższona ekspresja *SKA3* wiązała się z istotnie krótszym czasem przeżycia całkowitego pacjentów, a w wieloczynnikowym modelu proporcjonalnego hazardu Coxa *SKA3* pozostawał niezależnym czynnikiem rokowniczym ($HR = 2,1$; $p < 0,001$). Dodatkowo pomiar AUC dla prognostycznej krzywej ROC wykazał, że prawdopodobieństwo szybszego wystąpienia zgonu u pacjentów z podwyższoną ekspresją *SKA3* w porównaniu do grupy z niską ekspresją tego genu wynosi 64%. Przeprowadzona w ostatnim kroku analiza wzbogacenia funkcjonalnego pokazała, że *SKA3* jest najsilniej skorelowany z genami promującymi podziały komórkowe oraz tymi, które odpowiadają za prawidłową segregację chromosomów.

W dyskusji pracy wnikliwie omówiono przedstawione wyniki. W podsumowaniu podkreślono, że nadekspresja mRNA *SKA3* stanowi niezależny niekorzystny czynnik prognostyczny dla całkowitego czasu przeżycia pacjentów z PDAC, podczas gdy podwyższony poziom białka jest istotnie powiązany ze znacznie lepszymi wynikami klinicznymi. Podkreślono, iż ostatnia obserwacja była szczególnie wyraźna w przypadku pacjentów z nowotworem we wczesnym stadium zaawansowania. Ponadto, w oparciu o wyniki analizy funkcjonalnej, wysunięto wniosek, iż zmieniona ekspresja *SKA3* w gruczolaku trzustki może prowadzić do niekontrolowanej proliferacji komórek i rozwoju aneuploidii na skutek zaburzonej segregacji chromosomów, co ostatecznie wpływa na rokowanie pacjentów. Dane uzyskane w ramach niniejszej pracy sugerują, że *SKA3* może mieć potencjalną przydatność kliniczną w określaniu rokowania pacjentów z PDAC.

7. NIEPUBLIKOWANE DANE WŁĄCZONE DO ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

7.1. Materiały i metody

7.1.1. Hodowla komórkowa

Materiał do badań stanowiła linia PANC-1 ludzkiego gruczolaka przewodowego trzustki (American Type Culture Collection, Stany Zjednoczone). Komórki hodowano w pożywce DMEM (ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium, Corning, Stany Zjednoczone) z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej (ang. fetal bovine serum, FBS; Corning, Stany Zjednoczone) oraz antybiotyków: penicyliny i streptomycyny odpowiednio w stężeniu 100 U/ml i 100 µg/ml (Corning, Stany Zjednoczone). Hodowlę prowadzono w temperaturze 37°C oraz atmosferze wzbogaconej 5% CO₂ i nasyconej parą wodną. Komórki w fazie wzrostu logarytmicznego odklejało się od podłoża przy pomocy 0,25% roztworu trypsyny-EDTA (Corning, Stany Zjednoczone), a następnie wysiewało się na płytki wielodołkowe oraz butelki hodowlane (Corning, Stany Zjednoczone) celem przeprowadzenia dalszych doświadczeń. Obserwację mikroskopową komórek prowadzono przy pomocy mikroskopu odwróconego Olympus CKX53 (Olympus, Japonia).

7.1.2. Wyciszenie ekspresji genu *SPDL1*

Do wyciszenia ekspresji genu *SPDL1* w komórkach linii PANC-1 wykorzystano komercyjnie dostępne plazmidy lentiwirusowe kodujące shRNA docelowe dla analizowanego genu (Santa Cruz Biotechnology, Stany Zjednoczone). W pierwszym kroku komórki wysiano na 24-dołkową płytkę hodowlaną, a następnie inkubowano przez noc do osiągnięcia pożądanej konfluencji wynoszącej 50%. Kolejnego dnia rozpoczęto proces transdukcji. W tym celu medium hodowlane wymieniono na świeże z dodatkiem 8 µg/ml polibrenu (Polybrene®, Santa Cruz Biotechnology, Stany Zjednoczone). Następnie do pożywki dodano 10 MOI (ang. multiplicity of infection) wektorów lentiwirusowych i delikatnie wymieszano przez pipetowanie. Tak przygotowaną mieszaninę inkubowano przez 18 godzin. Po tym czasie medium hodowlane zawierające polibren oraz plazmidy lentiwirusowe wymieniono na świeżą standardową pożywkę i przez kolejne 24 godziny kontynuowano hodowlę. W ostatnim etapie komórki poddano dziesięciodniowej selekcji antybiotykowej przy użyciu 2 µg/ml puromycyny (Santa Cruz Biotechnology, Stany Zjednoczone). Efektywność procesu transdukcji oceniono dwiema metodami: real-time PCR (ang. real-time polymerase chain reaction; zmiana na poziomie mRNA) oraz Western blot (zmiana na poziomie białka). Komórki kontrolne przygotowano według tego samego schematu, ale z wykorzystaniem wektorów lentiwirusowych

zawierających gen oporności na puromycynę oraz sekwencje shRNA, które nie prowadzą do zahamowania ekspresji żadnego znanego komórkowego mRNA.

7.1.3. Analiza tempa proliferacji

Komórki linii PANC-1 (kontrolne i SPDL1↓) wysiano na 96-dołkowe płytki hodowlane, a następnie inkubowano przez 96 godzin. Po 48 godzinach medium hodowlane wymieniano na świeże. Analizę tempa proliferacji komórek prowadzono przy użyciu komercyjnie dostępnego testu kolorymetrycznego, który opiera się na reakcji redukcji soli tetrazolowej CCK-8 (ang. Cell Counting Kit 8) do pomarańczowego barwnika formazanowego. Do każdego dołka zawierającego 100 µl medium hodowlanego dodawano 10 µl roztworu CCK-8, a następnie inkubowano przez 3 godziny. Ilość przekształconej soli, proporcjonalną do liczby aktywnych metabolicznie komórek, mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 450 nm w następujących punktach czasowych: 0, 24, 48, 72 i 96 godzin od wysiania komórek. Test wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach.

7.1.4. Ocena potencjału klonogenego

Komórki linii PANC-1 (kontrolne i SPDL1↓) wysiano na 6-dołkowe płytki hodowlane w gęstości 500 komórek na dołek, a następnie inkubowano przez 12 dni. W tym czasie medium hodowlane wymieniano na świeże co 3-4 dni. Powstałe kolonie najpierw utrwalono przy użyciu 4% paraformaldehydu (PFA, 2 min; Chempur, Polska) oraz schłodzonego czystego metanolu (20 min, -20°C; Chempur, Polska), a następnie barwiono 0,1% fioletem gencjanowym (20 min; Hasco, Polska). Wszystkie ww. etapy poprzedzono dwukrotnym płukaniem komórek roztworem soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (ang. phosphate buffered saline, PBS). Nadmiar barwnika odpłukano dużą objętością wody wodociągowej. Płytki pozostawiono do wyschnięcia, a następnie sfotografowano przy użyciu aparatu ChemiDoc™ Imaging Systems (Bio-Rad, Stany Zjednoczone). Liczbę kolonii mierzono przy pomocy oprogramowania ImageJ. Test wykonano w czterech niezależnych powtórzeniach.

7.1.5. Analiza aktywności migracyjnej

Komórki linii PANC-1 (kontrolne i SPDL1↓) w fazie wzrostu logarytmicznego odklejono od naczyń hodowlanych, a następnie zawieszono w pożywce zawierającej 1% FBS uzyskując gęstość 1×10^6 komórek/ml. Inserty z membraną o średnicy porów 8 µm (Corning, Stany Zjednoczone) umieszczono w dołkach płytki 24-dołkowej zawierających 800 µl medium hodowlanego z dodatkiem 20% FBS. Do każdego insertu przeniesiono 200 µl zawiesiny

komórkowej, a następnie inkubowano przez 18 godzin. Po tym czasie utrwalono i wybarwiono komórki, które migrowały w kierunku chemoatraktantu i pozostały przyłączone do dolnej części membrany. W tym celu z insertów usunięto medium hodowlane, a komórki dwukrotnie przepłukano roztworem PBS. Dalej prowadzono proces utrwalania: najpierw w 4% PFA (2 min; Chempur, Polska), a potem, po ponownym dwukrotnym przepłukaniu roztworem PBS, w schłodzonym czystym metanolu (20 min; Chempur, Polska). W kolejnym kroku komórki barwiono 0,1% fioletem gencjanowym (20 min; Hasco, Polska). Nadmiar barwnika odpłukano roztworem PBS, a komórki z górnej części membrany usunięto za pomocą patyczków zakończonych bawełną. Inserty pozostawiono do wyschnięcia, a następnie dla każdego z nich, przy użyciu mikroskopu Nikon Eclipse E800 (Nikon, Japonia), policzono komórki z pięciu pól widzenia. Test wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach.

7.1.6. Fluorescencyjna analiza organizacji mikrotubul oraz ekspresji γ H2AX

Do oceny organizacji mikrotubul oraz ekspresji γ H2AX wykorzystano metodę immunofluorescencji pośredniej. Komórki linii PANC-1 (kontrolne i SPDL1 $\downarrow$) wysiewano na szkiełka nakrywkowe umieszczone w płytce 12-dołkowej i hodowano przez 48 godzin. Po tym czasie wykonano kilkuetapowy proces utrwalania komórek. Najpierw przy pomocy czynnika sieciującego białko – 1mM DTSP w 100% DMSO (ang. dimethyl sulfoxide, Chempur, Polska), rozcieńczonego w stosunku 1:50 w soli Hanksa (10 minut; Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone), a następnie tego samego DTSP, tym razem rozcieńczonego w stosunku 1:50 w roztworze TSB (10 minut; TSB: 0,5% Triton X-100 w buforze stabilizującym mikrotubule MTSB; skład MTSB: 1 mM EGTA, 10 mM PIPES, 4% glikol polietylenowy; Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone). Dalej komórki inkubowano w TSB (5 minut), 4% PFA w MTSB (20 minut), a następnie trzykrotnie przemyto w roztworze PBS (3 $\times$ 5 minut). W kolejnym kroku, przy użyciu 1% BSA (ang. bovine serum albumin; 15 minut; Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone) zablokowano niespecyficzne miejsca wiązania przeciwciał. Do znakowania wykorzystano przeciwciała pierwszorzędowe specyficzne wobec β -tubuliny (60 minut, 1:500 w 1% BSA; nr kat. T5293, Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone) i γ H2AX (60 minut, 1:1000 w 1% BSA; nr kat. ab2893, Abcam, Wielka Brytania) oraz przeciwciała drugorzędowe, odpowiednio kozie antymysie skoniugowane z Alexa Fluor 594 oraz kozie anty-królicze skoniugowane z Alexa Fluor 488 (60 minut, 1:200 w PBS; Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone). Po każdej inkubacji z przeciwciałami, komórki trzykrotnie przemywano roztworem PBS (3 $\times$ 5 minut). Jądra komórkowe wybarwiono przy użyciu DAPI w stężeniu 100 ng/ml (10 minut; Sigma-Aldrich,

Stany Zjednoczone). Wyznakowane komórki ponownie przemyto roztworem PBS (3 × 5 minut) i zamknięto w medium Aqua-Poly/Mount (Polysciences, Stany Zjednoczone). Preparaty obserwowano przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego Nikon Eclipse E800 (Nikon, Japonia) oraz programu NIS-Elements (wersja 4.0; Nikon, Japonia). Ekspresję γ H2AX analizowano poprzez manualnie zliczenie ognisk ufosforylowanego histonu w 100 jądrach komórkowych. Wyznakowane komórki oceniono także pod kątem organizacji wrzecion podziałowych.

7.1.7. Traktowanie komórek lekami przeciwnowotworowymi

Komórki linii PANC-1 (kontrolne i SPDL1↓) wysiewano na płytce 96-dołkowe, a po upływie 24 godzin traktowano następującymi lekami przeciwnowotworowymi: paklitaksel (PTX, 6mg/ml; Kabi, Polska), gemcitabina (GEM; Abcam, Wielka Brytania), 5-fluorouracyl (5-FU; TargetMol, Stany Zjednoczone) oraz cisplatyna (CIS; Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone). PTX wykorzystywany w niniejszym badaniu otrzymano dzięki uprzejmości Prof. dr. hab. Marka Rusina i jego Zespołu z Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów im. Profesora Mieczysława Chorażego w Gliwicach. Z kolei roztwory wyjściowe pozostałych leków (50mM GEM, 100mM 5-FU, 2nM CIS) przygotowano poprzez rozpuszczenie liofilizatów w 100% DMSO lub dH₂O i przechowywano w -20°C. Przed dodaniem do komórek, leki rozcieńczano w medium hodowlanym uzyskując pożądane stężenia (Tabela 2). Inkubację z badanymi związkami prowadzono przez 48 godzin.

Tabela 2. Stężenia leków przeciwnowotworowych użyte w doświadczeniach.

Rodzaj analizy	Stężenia związków			
	PTX [nM]	GEM [μ M]	5-FU [μ M]	CIS [μ M]
MTT	2	5	5	1,25
	4	10	10	2,5
	10	50	50	5
	50	100	100	10
	100	250	500	20
	250	500	1000	40
	500	1000	-	-
	10	10	-	-
Analiza apoptozy	100	50	-	-

7.1.8. Spektrofotometryczny test MTT

Do analizy cytotoksyczności badanych leków przeciwnowotworowych wobec komórek linii PANC-1 wykorzystano test kolorymetryczny, który opiera się na redukcji żółtej soli tetrazolowej (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-difenylotetrazolowy, MTT) do fioletowych kryształów formazanu. Reakcja zachodzi tylko w żywych komórkach zawierających aktywny enzym – dehydrogenazę bursztynianową. Ilość powstającego produktu mierzona spektrofotometrycznie jest wprost proporcjonalna do liczby aktywnych metabolicznie komórek.

Roztwór wyjściowy soli o stężeniu 5 mg/ml przygotowano poprzez rozpuszczenie MTT (Abcam, Wielka Brytania) w PBS i przechowywano w 4°C do czasu analizy. Komórki traktowane przez 48 godzin badanymi lekami najpierw dwukrotnie przepłukano PBS, a następnie inkubowano w roztworze roboczym MTT (100 µl/ dołek; 3 godziny, 37°C, 5% CO₂) przygotowanym przez dziesięciokrotne rozcieńczenie roztworu wyjściowego w medium DMEM bez czerwieni fenolowej (Corning, Stany Zjednoczone). Powstałe w reakcji kryształy formazanu rozpuszczano w DMSO (200 µl/ dołek; 10 minut, 37°C). Pomiar absorbancji przy długości fali 570 nm wykonano za pomocą aparatu 800 TS Microplate Reader (BioTek, Stany Zjednoczone) oraz oprogramowania Gen5 (wersja 3.04, BioTek, Stany Zjednoczone). Otrzymane dane wykorzystano do obliczenia przeżywalności komórek. Przyjęto, że wartość absorbancji roztworu uzyskanego dla komórek kontrolnych (nietraktowanych chemioterapeutykami) wynosi 100%. Test wykonano w pięciu niezależnych powtórzeniach.

7.1.9. Cytometryczna analiza apoptozy

Komórki linii PANC-1 (kontrolne i SPDL1↓) wysiano na 12-dołkowe płytki hodowlane, a następnego dnia potraktowano PTX i GEM. Po 48 godzinach inkubacji ze związkami, komórki odklejono od naczyń hodowlanych, płukano roztworem PBS, a następnie zawieszono w buforze ABB (ang. annexin-binding buffer, rozcieńczony w stosunku 1:4 w dH₂O) tak, aby uzyskać stężenie 1x10⁶ komórek/ml. Do 100 µl zawiesiny komórkowej dodawano 5 µl aneksyny V i 1 µl jodku propidyny (ang. propidium iodide, PI; 100 µg/mL, rozcieńczony w ABB) korzystając z gotowego zestawu (Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V FITC and PI, Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone). Dalej komórki inkubowano przez 15 minut w ciemności, w temperaturze pokojowej. Analizę prowadzono przy pomocy cytometru przepływowego Guava® easyCyte 6HT-2L (Merck Millipore, Stany Zjednoczone). Dla każdej próby zebrano 10 000 komórek, a odsetek komórek ulegających śmierci apoptotycznej określono korzystając

z oprogramowania FlowJo (BD, Stany Zjednoczone). Test wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach.

7.1.10. Ilościowy PCR w czasie rzeczywistym

Izolację całkowitego RNA z komórek linii PANC-1 (kontrolnych i SPDL1↓) przeprowadzono przy użyciu gotowego zestawu High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Szwajcaria). Jakość i czystość wyizolowanego kwasu oceniono spektrofotometrycznie mierząc absorbancję przy długości fali 260 i 280 nm. Poziom ekspresji mRNA badanych genów oceniono metodą real-time PCR. W tym celu, zgodnie z instrukcją przygotowaną przez producenta zestawu LightCycler RNA Master SYBR Green I (Roche, Szwajcaria), do gotowej mieszaniny reakcyjnej dodano 100 ng RNA oraz 0,2 μM startery specyficzne dla analizowanych transkryptów. Do zaprojektowania, a następnie oceny wybranych parametrów starterów wykorzystano narzędzia Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) oraz IDT OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies, Stany Zjednoczone; <https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>). Dla każdej próbki dwie następujące po sobie reakcje tj. odwrotną transkrypcję oraz ilościowy PCR, prowadzono w pojedynczej kapilarze przy użyciu aparatu LightCycler® 2.0 (Roche, Szwajcaria). Warunki reakcji przedstawiono w Tabeli 3. Poziom ekspresji badanych genów oceniono w odniesieniu do genu referencyjnego GAPDH (ang. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) stosując metodę $\Delta\Delta C_t$. Krzywe topnienia oraz wyniki uzyskane dla badanych genów analizowano za pomocą programu LightCycler Software (wersja 4.1.1.21, Roche, Szwajcaria).

Tabela 3. Warunki reakcji real-time PCR.

Etap reakcji	Liczba cykli	Temperatura	Czas
Odwrotna transkrypcja	1	50°C	10 minut
Wstępna denaturacja	1	95°C	3 minuty
Amplifikacja:			
denaturacja	40-50*	95°C	5 sekund
hybrydyzacja		56-60°C**	20 sekund
elongacja		72°C	3 sekundy
Chłodzenie	1	40°C	30 sekund

* Liczba cykli uzależniona od badanego genu

** Temperatura hybrydyzacji uzależniona od sekwencji DNA oraz temperatury topnienia starterów

7.1.11. Western Blot

Komórki linii PANC-1 (kontrolne i SPDL1↓) wysiano na butelki hodowlane, a następnie inkubowano przez 48 godzin. Po upływie tego czasu, komórki w fazie logarytmicznego wzrostu odklejono, przepłukano zimnym roztworem PBS, a następnie zwirowano. Po dokładnym usunięciu supernatantu, osady komórkowe mrożono w suchym lodzie i w tej formie przechowywano w -80°C.

W celu izolacji całkowitego białka z komórek, zamrożone osady zawieszono w buforze lizującym (50 mM Tris, 120 mM NaCl, 0,5% NP40) z dodatkiem inhibitorów proteaz i fosfataz (Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone). Następnie inkubowano je na lodzie przez 15 minut, mieszając zawartość próbki co kilka minut przy użyciu wytrząsarki. W kolejnym kroku próbki zwirowano (20 min, 14 000 rpm, 4°C), a otrzymany supernatant przeniesiono do czystych probówek. Stężenie całkowitego białka w próbkach mierzono przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone) zgodnie z instrukcją podaną przez producenta. Po wykonaniu pomiaru, do lizatów dodano bufor obciążający (150 mM Tris, 6% SDS, 30% glicerol, 0,01% błękit bromofenolowy, 0,075% β-merkaptioetanol), inkubowano przez 5 minut w temperaturze 95°C, a następnie przechowywano w -80°C do czasu rozpoczęcia dalszych etapów analizy.

Rozmrożone próbki z wyizolowanym białkiem przenoszono do studzienek żelu poliakrylamidowego (10-20%; Novex™ Tris-Glycine Mini Protein Gels, Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone), a następnie prowadzono elektroforezę do momentu efektywnego rozdzielania cząsteczek o pożądanej masie (bufor Tris-glicyna, 120mA, 100V). Kontrola procesu możliwa była dzięki zastosowaniu markera wielkości (10-250 kDa; Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone). Białka rozdzielone w żelu przenoszono na membranę nitrocelulozową przy użyciu aparatu iBlot™ 2 Dry Blotting System (Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone). Aby zapobiec niespecyficzej adsorpcji przeciwciał, membrany blokowano w 5% odtłuszczonego mleka zawieszonym w PBST (PBST: PBS z dodatkiem 0,1% Tween-20; 60 minut, temperatura pokojowa). Dalej antygeny badanego białka znakowano przy użyciu przeciwciała pierwszorzędowego (I' anti-SPDL1: inkubacja całonocna, 4°C; 1:4000, nr kat. 24689-1-AP, Proteintech, Niemcy), a w kolejnym kroku drugorzędowego skoniugowanego z HRP (II' anti-królicze: 60 minut, temperatura pokojowa; 1:10 000, nr kat. 31460, Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone). Membrany po pierwszym i drugim etapie znakowania płukano w roztworze PBST (5x, 10 minut) celem usunięcia niezwiązanych przeciwciał. Aby porównać ilość białka załadowanego do każdej studzienki żelu (kontrola

obciążenia), równolegle do analizy badanego białka prowadzono reakcje znakowania przeciwciałem kontrolnym anty-GAPDH (1:2000, nr kat. sc-47724, Santa Cruz Biotechnology, Stany Zjednoczone). Białka uwidacziano chemiluminescencyjnie przy pomocy gotowego zestawu SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Stany Zjednoczone) oraz aparatu ChemiDoc™ Imaging Systems (Bio-Rad, Stany Zjednoczone). Do pomiaru wielkości i gęstości prążków wykorzystano oprogramowanie ImageJ.

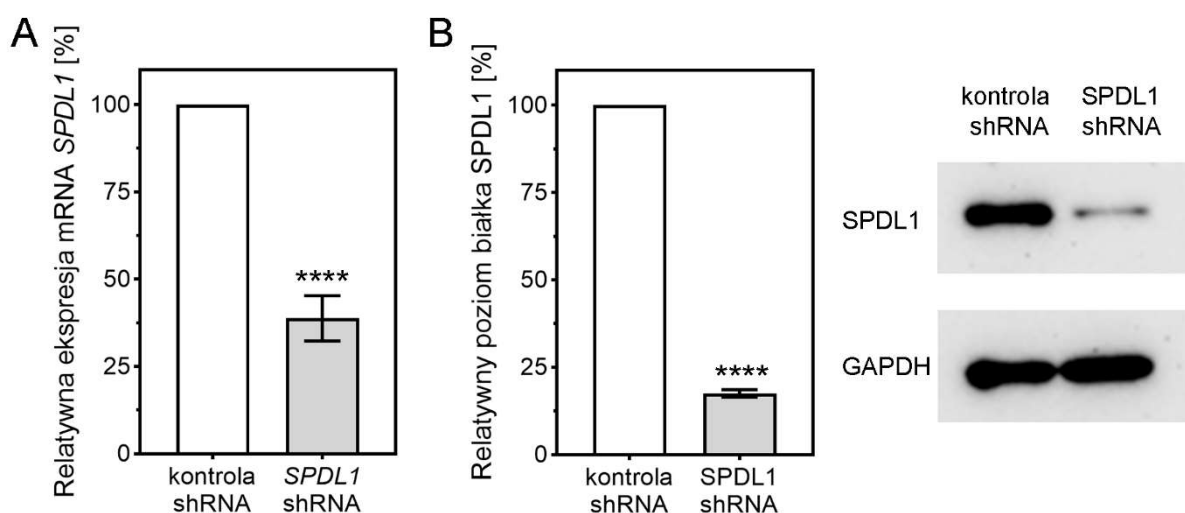
7.1.12. Analiza statystyczna

Analiza statystyczna została wykonana przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism (wersja 9.3.1, GraphPad Software, Stany Zjednoczone). Zgodność danych z rozkładem normalnym weryfikowano za pomocą testu Shapiro-Wilka. W kolejnym kroku do oceny istotności różnic pomiędzy analizowanymi grupami wykorzystano następujące testy parametryczne: test t-Studenta dla prób niezależnych (analiza potencjału klonogenego i migracyjnego) oraz dwuczynnikową analizę ANOVA z porównaniami post hoc Sidaka (analiza proliferacji, cytotoksyczności oraz apoptozy). Zmienne, które nie miały cech rozkładu normalnego analizowano przy pomocy nieparametrycznego testu Manna-Whitneya (analiza ekspresji γ H2AX). Do oceny czy ekspresja wybranych transkryptów (analiza real-time PCR) oraz poziom białka SPDL1 (analiza Western blot) w próbce badanej różni się od wartości ustalonej dla kontroli (100%) wykorzystano test t-Studenta lub test Wilcoxona dla jednej próby. Wyniki uznawano za istotne statystycznie przy wartości $p < 0,05$.

7.2. Wyniki

7.2.1. Ocena efektywności wyciszenia ekspresji SPDL1 w komórkach linii PANC-1

Do wyciszenia ekspresji SPDL1 w linii komórkowej PANC-1 wykorzystano plazmidy lentiwirusowe kodujące shRNA docelowe dla analizowanego genu. Kontrolę stanowiła ta sama linia komórkowa transdukowana wektorem zawierającym sekwencję shRNA, która nie hamuje ekspresji żadnego znanego komórkowego mRNA. Oceny dokonano na dwóch poziomach informacji biologicznej – mRNA oraz białka, wykorzystując w tym celu odpowiednio metody real-time PCR oraz Western blot. Jak pokazano na Rycinie 1, wyciszenie ekspresji genu na poziomie mRNA wyniosło $61,2 \pm 6,5\%$, natomiast poziom białka został obniżony o $82,5 \pm 1,1\%$. Obserwowane różnice były istotne statystycznie w porównaniu do kontroli ($p < 0,0001$; Rycina 1).



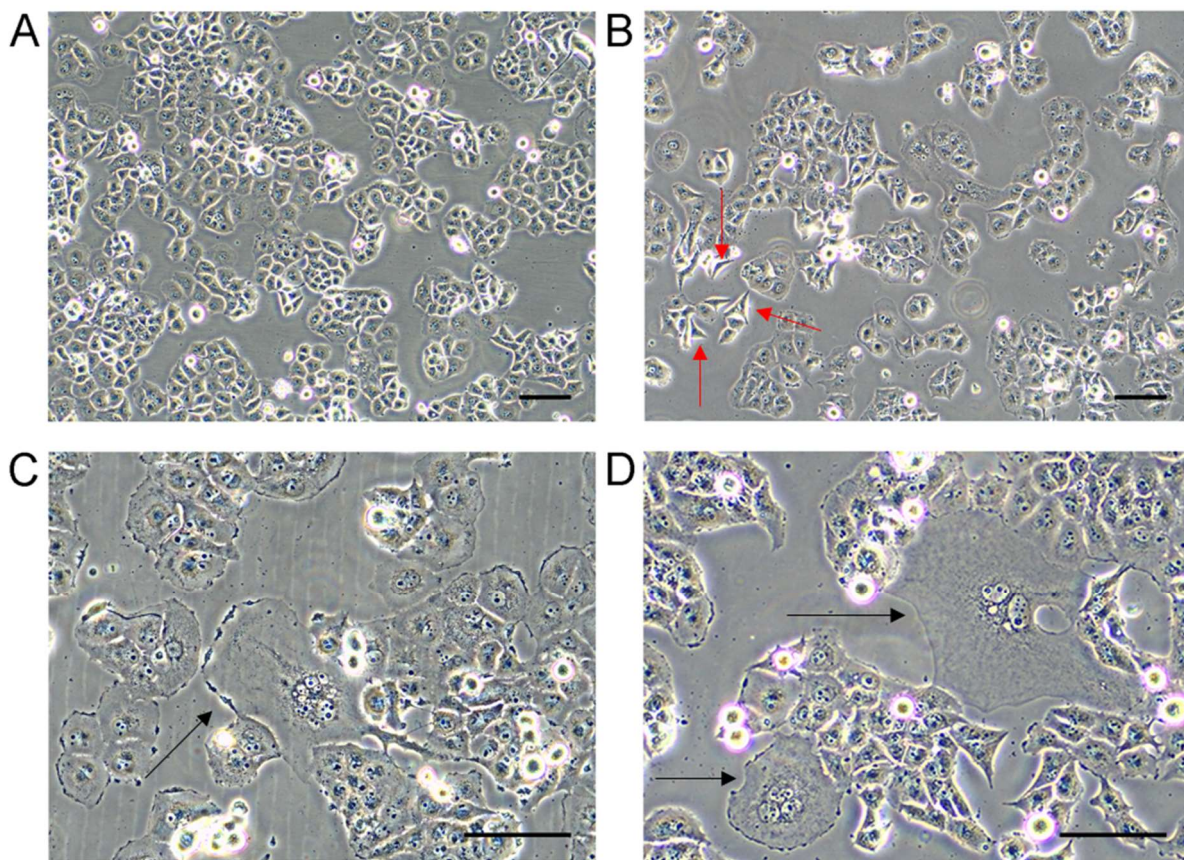
Rycina 1. Ocena efektywności wyciszenia ekspresji SPDL1 w linii komórkowej PANC-1. Relatywną ekspresję (A) mRNA oraz (B) białka SPDL1 oceniono przy pomocy technik real-time PCR oraz Western blot. Dane z trzech niezależnych doświadczeń przedstawiono jako średnie $\pm$ SD pomiary ekspresji w odniesieniu do kontroli. Różnice istotne statystycznie oznaczono symbolem **** ($p < 0,0001$).

7.2.2. Analiza skutków wyciszenia genu *SPDL1* w linii komórkowej PANC-1 – wpływ na wybrane cechy biologiczne komórek

7.2.2.1. Ocena morfologii komórek

Obniżenie ekspresji genu *SPDL1* w linii komórkowej PANC-1 spowodowało zmiany morfologiczne komórek. W badanej populacji można było wyróżnić subpopulacje komórek o różnych kształtach – część z nich zachowała epitelialną morfologię, podczas gdy inne przyjęły

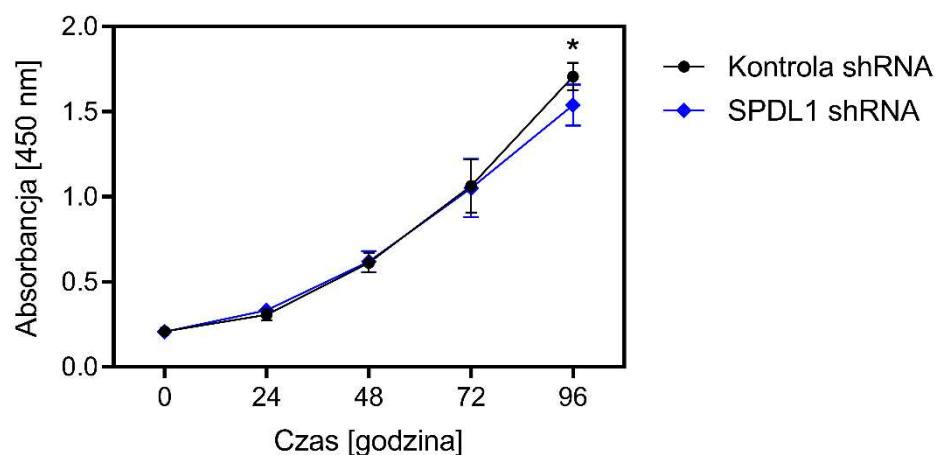
bardziej wrzecionowaty kształt. Dodatkowo w obrazie mikroskopowym odnotowano obecność licznych, powiększonych komórek wielojądrowych (Rycina 2).



Rycina 2. Wpływ wyciszenia ekspresji genu *SPDL1* na morfologię komórek linii PANC-1. Komórki linii PANC-1 (A) kontrolne oraz (B-D) badane z obniżoną ekspresją genu *SPDL1*. Strzałki wskazują przykładowe komórki o wrzecionowatym kształcie (kolor czerwony) i duże wielojądrowe komórki (kolor czarny). Bar = 100 μ M.

7.2.2.2. Ocena tempa proliferacji

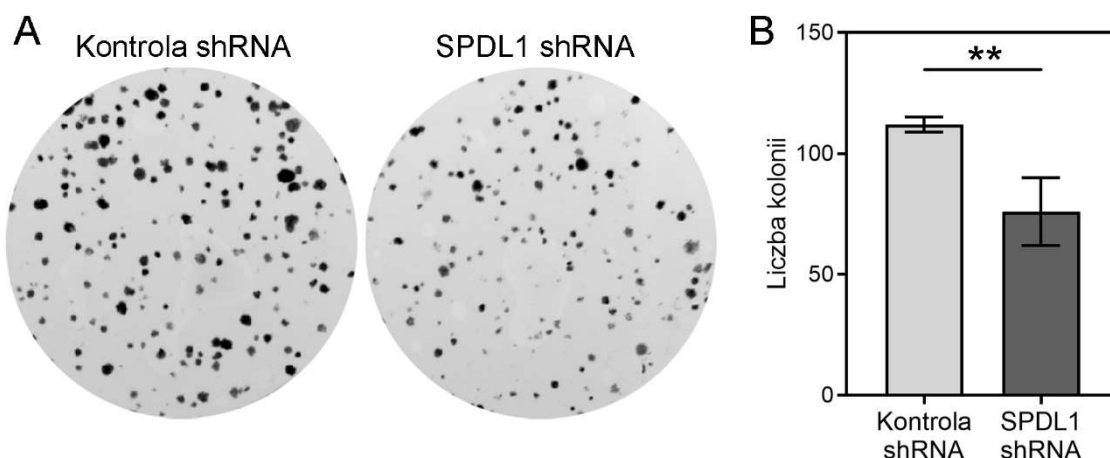
Tempo proliferacji komórek linii PANC-1 analizowano przy użyciu kolorymetrycznego testu CCK8. Oceny dokonano na podstawie pomiaru absorbancji roztworu medium z dodatkiem soli CCK8, w którym inkubowano komórki. Analizę przeprowadzono w pięciu punktach czasowych: bezpośrednio po wysianiu komórek oraz po 24, 48, 72 i 96 godzinach hodowli. Uzyskane wyniki pokazały, że komórki z obniżoną ekspresją genu *SPDL1* dzielą się wolniej niż komórki kontrolne. Warto jednak zaznaczyć, że różnice istotne statystycznie odnotowano dopiero po 96 godzinach hodowli, a obniżenie tempa proliferacji obserwowane w tym punkcie czasowym było niewielkie ($A_K = 1,706 \pm 0,08$ vs $A_{SPDL1\downarrow} = 1,538 \pm 0,12$; $p = 0,01$; Rycina 3).



Rycina 3. Wpływ wyciszenia ekspresji genu *SPDL1* na tempo proliferacji komórek linii PANC-1. Dane z trzech niezależnych doświadczeń przedstawiono jako średnie $\pm$ SD pomiary absorbancji przy długości fali 450 nm, wykonane dla roztworów medium z dodatkiem soli CCK8. Różnicę istotną statystycznie oznaczono symbolem * ($p < 0,05$).

7.2.2.3. Ocena potencjału klonogennego

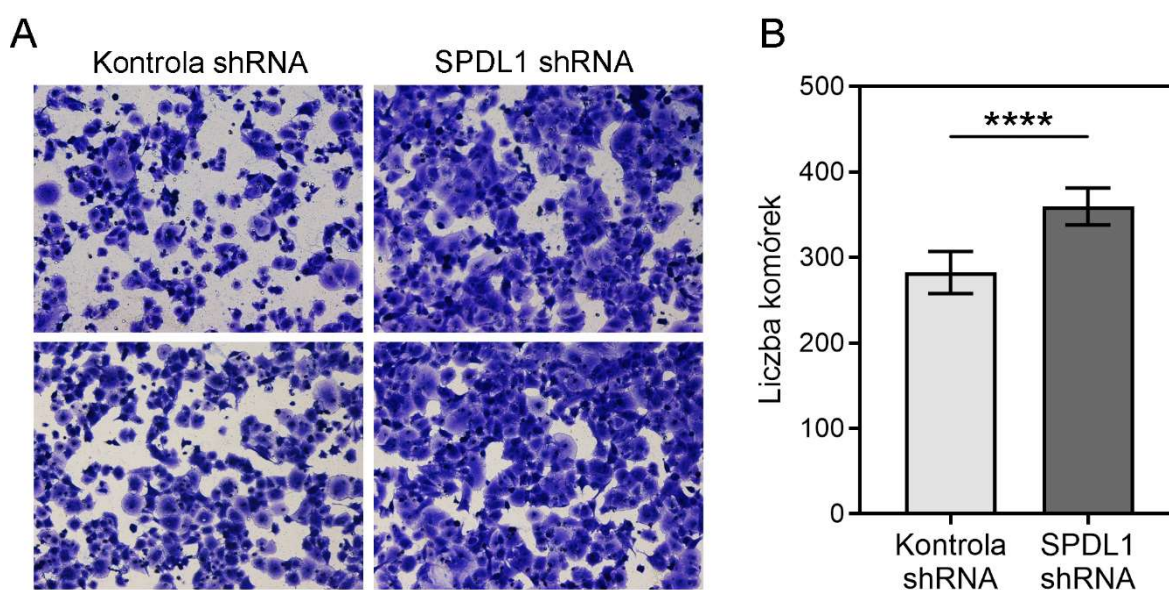
Zdolność pojedynczych komórek linii PANC-1 do tworzenia kolonii oceniono przy pomocy testu klonogenego. W tym celu komórki wysiano w niskiej gęstości na płytce 6-dołkowej (500 komórek/dołek), a następnie hodowano przez 12 dni. Po upływie wyznaczonego czasu kolonie zawierające co najmniej 50 komórek zliczano. Wykazano, że komórki, w których obniżono ekspresję genu *SPDL1* mają istotnie niższy potencjał klonogeny w porównaniu do komórek kontrolnych, co znalazło odzwierciedlenie w liczbie kolonii zanotowanej dla obu analizowanych prób (76 ± 14 vs 112 ± 3 ; $p = 0,003$; Rycina 4).



Rycina 4. Wpływ wyciszenia ekspresji genu *SPDL1* na potencjał klonogeny komórek linii PANC-1. (A) Przykładowe zdjęcia dołków płytki 6-dołkowej pokrytych koloniami po dwunastodniowej hodowli komórek linii PANC-1. (B) Porównanie liczby kolonii zliczonych dla komórek kontrolnych oraz komórek z obniżoną ekspresją genu *SPDL1*. Dane z czterech niezależnych doświadczeń przedstawiono jako średnie $\pm$ SD. Różnicę istotną statystycznie oznaczono symbolem ** ($p < 0,01$).

7.2.2.4. Ocena aktywności migracyjnej

W celu zbadania aktywności migracyjnej, komórki linii PANC-1 zawieszono w medium zawierającym 1% FBS, a następnie przeniesiono do insertów z porowatą membraną. Migrację komórek w kierunku chemoatraktantu tj. medium z 20% FBS, oceniano po 18 godzinach inkubacji licząc komórki z dolnej części membrany. Zaobserwowano, że obniżenie ekspresji genu *SPDL1* w komórkach linii PANC-1 istotnie zwiększało ich zdolność migracyjną ($359,7 \pm 21,5$ komórek w porównaniu do $282,5 \pm 24,6$ komórek w grupie kontrolnej; $p < 0,0001$; Rycina 5).



Rycina 5. Wpływ wyciszenia ekspresji genu *SPDL1* na aktywność migracyjną komórek linii PANC-1. (A) Przykładowe zdjęcia komórek migrujących przez porowatą membranę. (B) Porównanie liczby migrujących komórek w grupie kontrolnej oraz w grupie z obniżoną ekspresją genu *SPDL1*. Dane z trzech niezależnych doświadczeń przedstawiono jako średnie $\pm$ SD. Różnicę istotną statystycznie oznaczono symbolem **** ($p < 0,0001$).

7.2.2.5. Fluorescencyjna ocena morfologii wrzecion podziałowych oraz obecności ufosforylowanego histonu H2AX

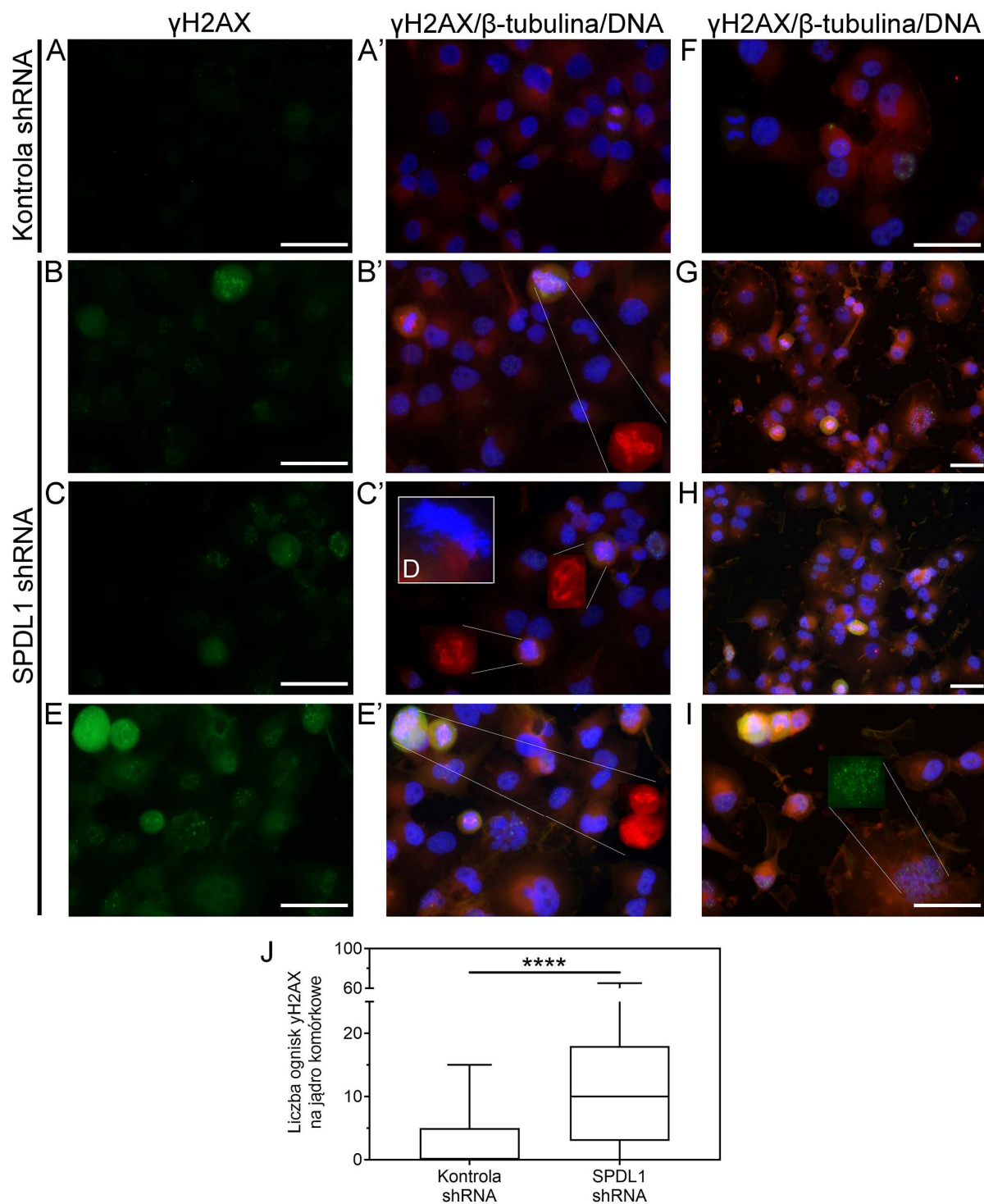
Mając na uwadze, że *SPDL1* bierze udział w formowaniu wrzeciona podziałowego i segregacji chromosomów poprzez rekrutację dyneiny, za zasadne uznano sprawdzenie, czy rozdział chromosomów przebiega prawidłowo w komórkach o obniżonym poziomie badanego białka. W tym celu przeprowadzono immunofluorescencyjne znakowanie β -tubuliny oraz jąder komórkowych. Obecność dużych komórek wielojądrowych zawierających liczne mikrojądra stwierdzono zarówno w grupie kontrolnej, jak i badanej, jednak w tej drugiej obserwowane zaburzenia występowały znacznie częściej. Jak pokazano

na Rycinie 6, wyciszenie ekspresji SPDL1 skutkowało także pojawieniem się komórek zawierających liczne wielobiegunowe oraz mniej liczne jednobiegunowe wrzeciona podziałowe. Ponadto w populacji badanej wykryto znaczną liczbę komórek zawierających opóźnione chromosomy, szczególnie w metafazie, gdzie obserwowano pojedyncze chromosomy poza płytką metafazową. Opóźnione chromosomy odnotowano także w anafazie. W grupie kontrolnej tego rodzaju zaburzenia występowały zdecydowanie rzadziej.

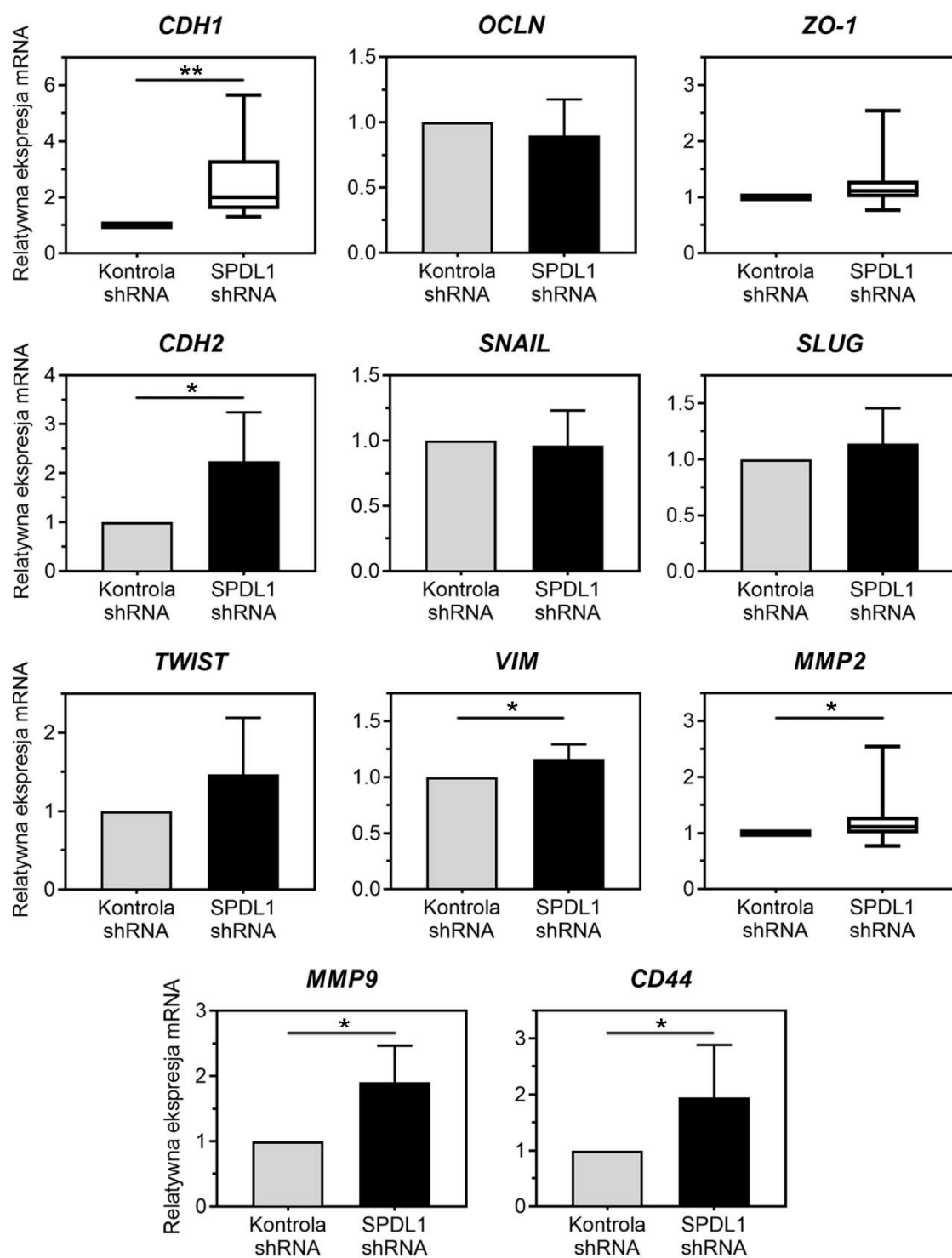
Akumulację dwuniciowych pęknięć DNA, pozwalającą na ilościową ocenę przynajmniej jednego z fenotypów niestabilności genomowej [54], zbadano wykonując znakowanie fluorescencyjne identyfikujące skupiska ufosforylowanego histonu H2AX (γ H2AX) w obrębie jąder komórkowych. Wykazano, że liczba skupisk γ H2AX była istotnie wyższa w komórkach o obniżonej ekspresji SPDL1 (mediana = 10) w porównaniu do kontroli (mediana = 0; $p < 0,0001$; Rycina 6J). Maksymalna liczba ognisk przypadająca na jądro komórkowe w analizowanych grupach wyniosła odpowiednio 65 i 15, a ich największą liczebność obserwowano w dużych, wielojądrowych komórkach, które częściej występowały w grupie badanej. Ponadto, w tej grupie intensywność fluorescencji była wyraźnie wyższa, a w wielu komórkach sygnał obejmował całe jądro. Całojądrowy wzór znakowania może być efektem silnego stresu replikacyjnego opisywanego m.in. jako siła napędowa niestabilności genomowej [54]. Obecność ognisk γ H2AX odnotowano także w mikrojądrach.

7.2.2.6. Ocena ekspresji mRNA wybranych markerów związanych z inwazją i przerzutowaniem komórek nowotworowych

Aby ocenić wpływ obniżenia ekspresji genu *SPDL1* na złośliwość biologiczną komórek raka trzustki PANC-1, przeprowadzono szereg reakcji real-time PCR, w których oceniono ekspresję następujących transkryptów: *CDH1*, *OCLN*, *ZO-1*, *CDH2*, *SNAIL*, *SLUG*, *TWIST*, *VIM*, *MMP2*, *MMP9* oraz *CD44*. Istotny w porównaniu do kontroli wzrost ekspresji odnotowano dla *CDH1*, *CDH2*, *VIM*, *MMP2*, *MMP9* oraz *CD44* kodujących kolejno białka: E-kadherynę, N-kadherynę, wimentynę, metaloproteinazę 2 i 9 oraz receptor CD44 ($p < 0,05$; Rycina 7).



Rycina 6. Wpływ wyciszenia ekspresji genu *SPDL1* na morfologię wrzecion podziałowych oraz obecność skupisk γ H2AX w komórkach linii PANC-1. Zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego prezentują (A, A', F) nieliczne ogniska γ H2AX i prawidłowe figury podziałowe w komórkach kontrolnych, (B, B', C, C', D, D', G, H, I) zaburzenia przebiegu mitozy oraz liczne skupiska i/lub całodrową lokalizację γ H2AX w komórkach z obniżoną ekspresją genu *SPDL1*. Bar = 50 μ m. (J) Liczba ognisk γ H2AX na jądro komórkowe. Dane dla 100 komórek kontrolnych oraz 100 komórek *SPDL1*↓ przedstawiono jako medianę z wartością minimalną i maksymalną. Różnicę istotną statystycznie oznaczono symbolem **** ($p < 0,0001$).

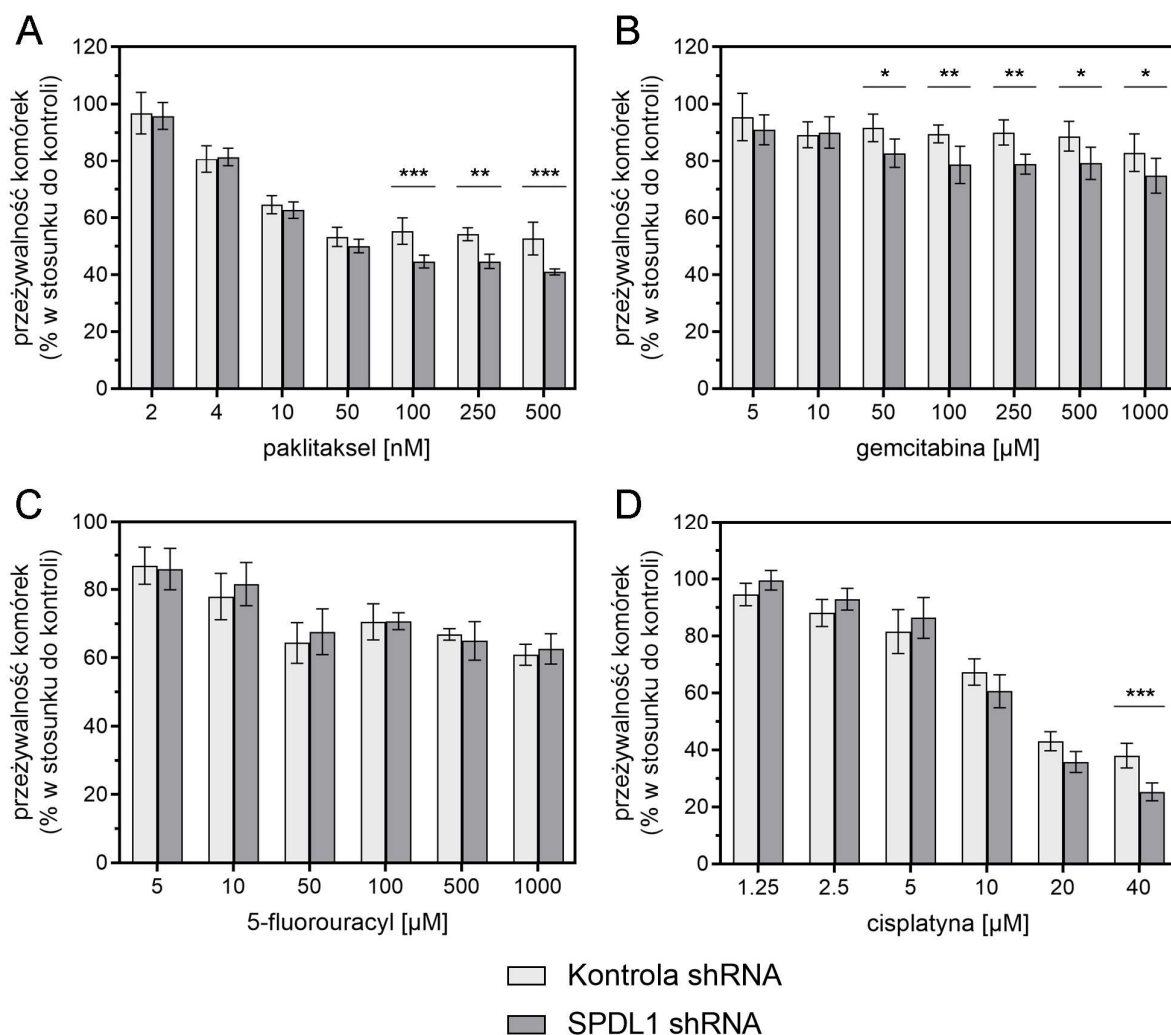


Rycina 7. Wpływ wyciszenia ekspresji genu *SPDL1* w komórkach linii PANC-1 na ekspresję mRNA wybranych markerów związanych z inwazją i przerzutowaniem komórek nowotworowych. Relatywny poziom ekspresji mRNA następujących genów: *CDH1*, *OCLN*, *ZO-1*, *CDH2*, *SNAIL*, *SLUG*, *TWIST*, *VIM*, *MMP2*, *MMP9* oraz *CD44*, oceniono przy użyciu techniki real-time PCR. W przeprowadzonych doświadczeniach, jako gen referencyjny wykorzystano *GAPDH*. Wyniki przedstawiono jako krotność zmiany w stosunku do kontroli. Wykresy prezentują średnie $\pm$ SD dla danych zgodnych z rozkładem normalnym lub medianę z wartością minimalną i maksymalną dla zmiennych, które nie miały cech rozkładu normalnego. Różnice istotne statystycznie oznaczono symbolami: * ($p < 0,05$) oraz ** ($p < 0,01$).

7.2.3. Analiza skutków wyciszenia genu *SPDL1* w linii komórkowej PANC-1 – wpływ na działanie wybranych chemioterapeutyków

7.2.3.1. Ocena przeżycia komórek

Cytotoksyczność czterech leków przeciwnowotworowych, tj. paklitakselu, gemcitabiny, 5-fluorouracylu oraz cisplatyny wobec komórek linii PANC-1 analizowano przy użyciu spektrofotometrycznego testu MTT. Celem doświadczenia było porównanie odpowiedzi komórek kontrolnych i komórek z obniżoną ekspresją genu *SPDL1* na działanie badanych cytostatyków. Jak pokazano na Rycinie 8A, paklitaksel w dawkach 100, 250 i 500 nM hamował przeżycie badanych komórek kolejno o $55,4 \pm 2,3\%$, $55,3 \pm 2,5\%$ i $59,0 \pm 1,1\%$. Te same stężenia leku w komórkach kontrolnych spowodowały spadek przeżywalności o $44,6 \pm 4,7\%$, $45,8 \pm 2,3\%$, i $47,3 \pm 5,8\%$. Obserwowane różnice były istotne statystycznie ($p < 0,01$; Rycina 8A). Podobny efekt uzyskano dla gemcitabiny, przy czym znaczące różnice w odsetkach żywych komórek pomiędzy grupą badaną i kontrolną zanotowano w szerokim zakresie stężeń od 50 do 1000 μM ($p < 0,05$; Rycina 8B). Pozostałe dwa leki tj. 5-fluorouracyl oraz cisplatyna, ograniczały wzrost komórek linii PANC-1 w stopniu zależnym od zastosowanej dawki. Niemniej jednak, populacje komórek różniące się pod względem ekspresji genu *SPDL1* prezentowały podobną wrażliwość na działanie wszystkich testowanych dawek 5-FU (5-1000 μM ; $p > 0,05$; Rycina 8C) i niemal wszystkich dawek CIS (1,25-20 μM ; $p > 0,05$; Rycina 8D). Istotną różnicę w odpowiedzi komórek badanych i kontrolnych zaobserwowano jedynie przy zastosowaniu najwyższej dawki CIS wynoszącej 40 μM . W tym przypadku przeżycie komórek w analizowanych grupach wyniosło odpowiednio $25,3 \pm 3,1\%$ i $38,0 \pm 4,3\%$ ($p = 0,0009$; Rycina 8D).

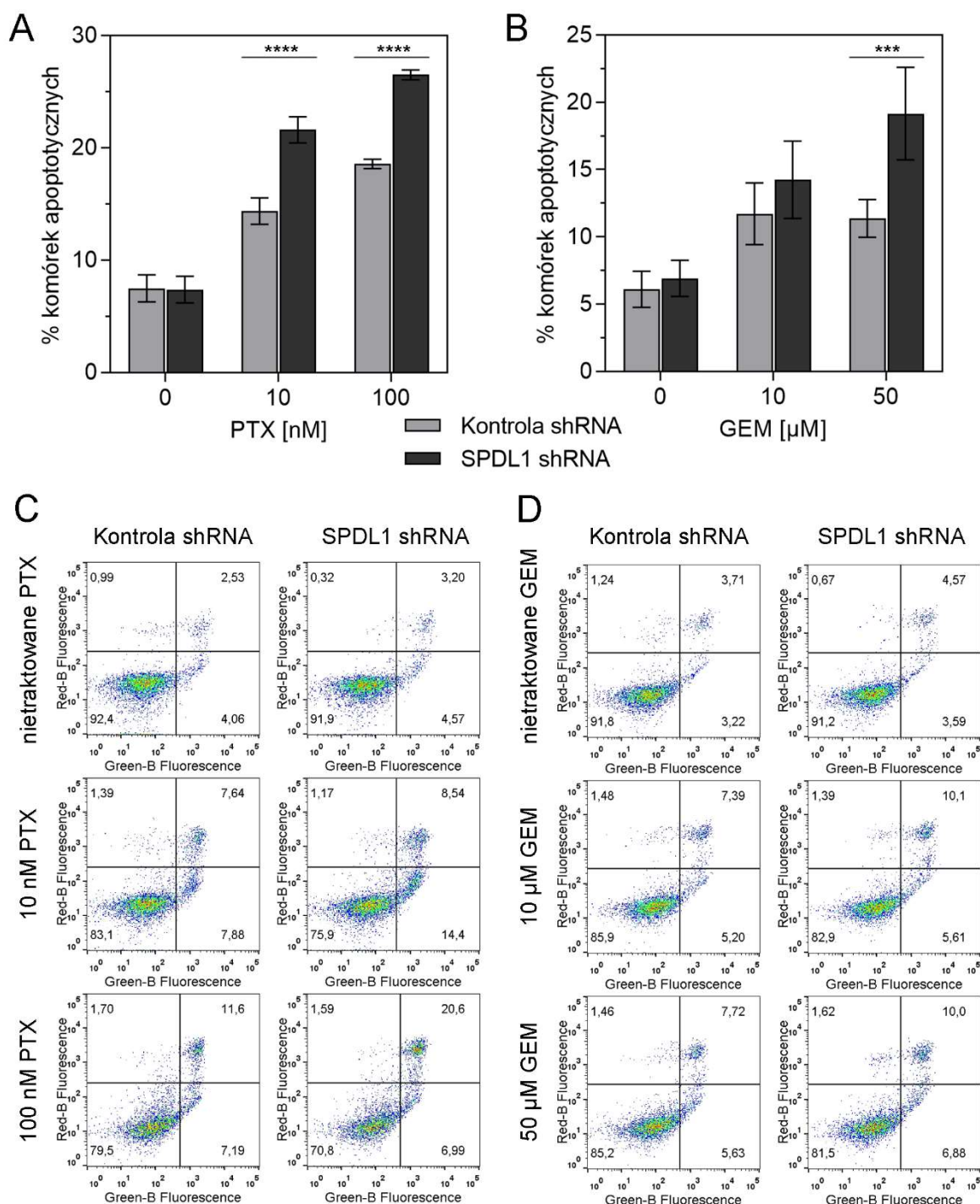


Rycina 8. Wpływ wyciszenia ekspresji genu *SPDL1* na cytotoksyczność wybranych chemioterapeutyków wobec komórek linii PANC-1. Przeżywalność komórek traktowanych (A) PTX (2-500 nM), (B) GEM (5-1000 μM), (C) 5-FU (5-1000 μM) i (D) CIS (1,25-40 μM). Dane z pięciu niezależnych doświadczeń przedstawiono jako średnie ± SD. Różnice istotne statystycznie oznaczono symbolami: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) oraz *** ($p < 0,001$).

7.2.3.2. Ocena występowania apoptozy

Występowanie śmierci apoptotycznej w komórkach traktowanych PTX i GEM oceniano cytometrycznie przy użyciu testu aneksyna V/PI. Test wykorzystuje zdolność aneksyny V do wiązania się z ujemnie naładowanymi fosfolipidami - w tym z fosfatydyloseryną, która w komórkach apoptotycznych przemieszcza się na zewnątrz błony komórkowej. Z kolei PI znakuje komórki z uszkodzoną błoną cytoplazmatyczną (nekrotyczne oraz będące w późnej fazie apoptozy) poprzez interkalację z kwasami nukleinowymi. Podczas analizy wyników odsetek komórek apoptotycznych obliczano sumując komórki wczesno- (aneksyna V⁺/PI⁻) i późnoapoptotyczne (aneksyna V⁺/PI⁺). Wykazano, że obniżenie ekspresji genu *SPDL1* istotnie

nasila występowanie apoptozy w komórkach linii PANC-1 traktowanych 10 nM i 100 nM PTX. Podobny rezultat uzyskano dla komórek traktowanych GEM w dawce 50 μ M (Rycina 9).



Rycina 9. Wpływ wyciszenia ekspresji genu *SPDL1* na indukcję apoptozy w komórkach linii PANC-1 traktowanych wybranymi dawkami PTX i GEM. Odsetek komórek apoptotycznych stanowiących sumę komórek wczesno- i późnoapoptotycznych po 48-godzinnej inkubacji z (A) PTX i (B) GEM. (C,D) Wyniki przykładowej analizy cytometrycznej. Reprezentatywne wykresy przygotowano przy użyciu oprogramowania FlowJo. Populacje komórek bramkowano w oparciu o intensywność fluorescencji dla PI oraz FITC związanego z aneksyną V. Dane z niezależnych doświadczeń, pięciu dla PTX i czterech dla GEM, przedstawiono jako średnie $\pm$ SD. Różnice istotne statystycznie oznaczono symbolami: *** ($p < 0,001$) oraz **** ($p < 0,0001$).

8. OMÓWIENIE WYNIKÓW

Badania nad nowymi markerami nowotworowymi prowadzone w ostatnich latach znacząco poszerzyły wiedzę na temat mechanizmów leżących u podstaw rozwoju chorób nowotworowych. Odkrycia w tej dziedzinie przyczyniły się do skuteczniejszego wykrywania nowotworów i prognozowania ich przebiegu oraz opracowania nowych strategii terapeutycznych. Jednak mimo znaczącego postępu, rozpoznanie i leczenie raka trzustki nadal stanowi poważne wyzwanie kliniczne. Wysoka heterogenność tego nowotworu nie tylko utrudnia identyfikację czułych i swoistych markerów, ale także znacząco ogranicza skuteczność dostępnych schematów leczenia. Dlatego aby poprawić rokowanie pacjentów, niezbędne jest prowadzenie dalszych badań koncentrujących się na poszukiwaniu markerów wczesnej diagnozy oraz nowych wskaźników rokowniczych i predykcyjnych.

Mając na uwadze możliwe powiązania między niestabilnością genomu a rozwojem i progresją raka trzustki, w niniejszej rozprawie doktorskiej oceniono ekspresję czterech czynników zaangażowanych w utrzymanie stabilności genetycznej komórki i będących elementami sygnatur ekspresyjnych niestabilnych genomów nowotworowych: *SPDL1*, cykliny F, *RRM2* oraz *SKA3* w kontekście ich wartości prognostycznej oraz związku z wybranymi cechami kliniczno-patologicznymi pacjentów. W ramach kontynuacji badań prowadzono eksperymenty *in vitro* analizujące wpływ zmiany ekspresji *SPDL1* na określone cechy biologiczne komórek raka trzustki, a także ich wrażliwość na działanie wybranych cytostatyków.

Do tej pory przeprowadzono zaledwie kilka badań mających na celu ocenę roli *SPDL1* w patogenezie nowotworów, a uzyskane wyniki nie przyniosły jednoznacznych wniosków. Wykazano, że podwyższona ekspresja genu *SPDL1* w wielu nowotworach, w tym w PAAD, negatywnie wpływa na rokowanie pacjentów [41]. Powyższą obserwację dla chorych z PDAC potwierdził zespół Tian i wsp. prezentując istotny związek pomiędzy nadekspresją genu *SPDL1* a krótszym czasem przeżycia całkowitego i przeżycia wolnego od choroby [42]. Przedstawione dane są zgodne z wynikami uzyskanymi dla oceny związku ekspresji genu *SPDL1* z rokowaniem pacjentów z PAAD, zawartymi w niniejszej rozprawie doktorskiej. Dodatkowa analiza przeprowadzona dla *SPDL1* oraz dwóch silnie skorelowanych z nim transkryptów *CCNF* i *RRM2* ujawniła, że jednoczesna ocena tych trzech potencjalnych markerów jest bardziej skuteczna w przewidywaniu całkowitego czasu przeżycia pacjentów, niż badanie każdego z nich oddzielnie. Niniejsza praca jest także jedynym dostępnym źródłem danych na temat wartości

prognostycznej poziomu białka SPDL1 w tkankach raka trzustki. Otrzymane wyniki pozwalają wnioskować, iż immunoekspresja SPDL1 umożliwia stratyfikację pacjentów z PDAC do grup ryzyka istotnie różniących się medianą czasu przeżycia całkowitego, przy czym w przeciwieństwie do obserwacji dotyczących ekspresji mRNA, wysoki poziom białka wiąże się z lepszym rokowaniem pacjentów. Różnice między tymi dwoma poziomami informacji biologicznej w odniesieniu do ich wartości prognostycznej w nowotworach są często obserwowane i mogą wynikać m.in. z modyfikacji potranskrypcyjnych i potranslacyjnych [55]. Chociaż białka są czynnikami odpowiedzialnymi za pełnienie funkcji w komórkach i tym samym wydają się mieć większy wpływ na rokowanie, to jednak rośnie liczba badań sugerujących, że ekspresja mRNA także ma istotne znaczenie biologiczne [56]. Należy zatem mieć na uwadze, że dla pełnego poznania wartości prognostycznej potencjalnego biomarkera, kluczowe jest prowadzenie równoległych analiz dla mRNA i białka.

Eksperymenty *in vitro* przeprowadzone w ramach niniejszego badania pokazały, że obniżenie poziomu białka SPDL1 w linii komórkowej raka trzustki PANC-1 spowalnia proliferację i zmniejsza potencjał klonogeny komórek. Wyniki te są częściowo zgodne z obserwacjami innych grup badawczych, które ujawniły podobny efekt modulacji ekspresji SPDL1 w raku wątrobowokomórkowym, jamy ustnej oraz przełyku [37–40]. Odnotowano jednak rozbieżność dotyczącą wyników analizy migracji. Podczas gdy większość autorów wykazała, że wyciszenie SPDL1 obniża potencjał migracyjny komórek [38–40], w niniejszym badaniu uzyskano efekt odwrotny i jednocześnie zgodny z danymi opublikowanymi przez zespół badawczy prowadzący eksperymenty na komórkach raka jelita grubego i odbytu [43]. Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej pokazują, że obniżona ekspresja SPDL1 w PDAC z jednej strony hamuje proliferację i potencjał klonogeny komórek, a z drugiej stymuluje je do migracji. Obserwacje te w pewnym stopniu wyjaśnia analiza morfologii komórek, która wykazała, że zmiana ich kształtu na wrzecionowaty, charakterystyczna dla przejścia epitelialno-mezenchymalnego (ang. epithelial to mesenchymal transition, EMT), nie dotyczyła w równym stopniu wszystkich komórek. Stwierdzono ją tylko w części badanej populacji, co sugeruje, że odpowiedź komórek na zmianę ekspresji badanego białka może różnić się w zależności od ich profilu genetycznego. PDAC jest bowiem wysoce heterogennym nowotworem obejmującym liczne subpopulacje komórek zróżnicowanych pod względem molekularnym [57]. Warto również podkreślić, że duża śmiertelność pacjentów chorujących na raka trzustki jest ściśle związana z wysoką inwazyjnością i skłonnością do szybkiego rozprzestrzeniania się komórek tego nowotworu, bardziej niż z ich wzmożoną proliferacją [58].

W tym kontekście uzyskane wyniki mogą tłumaczyć, dlaczego podwyższona ekspresja białka SPDL1 pozytywnie wpływa na rokowanie pacjentów. Należy także wspomnieć, że obniżenie potencjału proliferacyjnego komórek może towarzyszyć EMT. To zjawisko tłumaczy hipoteza „go or grow”, zgodnie z którą komórki nowotworowe w danym momencie albo migrują ("go") w celu kolonizacji nowych obszarów, albo intensywnie proliferują ("grow"), co skutkuje wzrostem masy guza, ale nie wykonują obu tych procesów jednocześnie. Opisany mechanizm ma istotne znaczenie dla zrozumienia dynamiki przerzutów i przyczyn chemiooporności [59].

Kolejną, znacznie liczniejszą subpopulację komórek PANC-1-SPDL1↓ stanowiły duże, wielojądrowe komórki (ang. multinucleated giant cells, MNGCs) wykazujące silne immunoznakowanie γH2AX. Powyższy fenotyp jest charakterystyczny dla procesów takich jak katastrofa mitotyczna (ang. mitotic catastrophe, MC) czy starzenie komórkowe, ale może także wskazywać na duży potencjał migracyjny i inwazyjny komórek nowotworowych [60,61]. MNGCs wykazują bowiem ekspresję markerów EMT oraz macierzystych komórek nowotworowych (ang. cancer stem cells, CSCs), co świadczy o ich wysokiej złośliwości biologicznej i zdolności do przerzutowania. To z kolei przekłada się na niekorzystne rokowanie pacjentów [62]. W niniejszej rozprawie wykazano, że obniżenie ekspresji SPDL1 powoduje wyraźny wzrost poziomu markerów *CDH2*, *VIM*, *MMP2*, *MMP9* oraz *CD44*, co świadczy o nasileniu agresywności biologicznej badanych komórek. Nie stwierdzono jednak istotnych zmian w ekspresji kluczowych czynników transkrypcyjnych biorących udział w EMT, tj. *SNAIL*, *SLUG* oraz *TWIST*. Jednocześnie odnotowano wyraźny wzrost ekspresji *CDH1*, podczas gdy poziom *ZO-1* i *OCLN* pozostał niezmienny. E-kadheryna (kodowana przez *CDH1*) odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu stabilnych połączeń międzykomórkowych. Hamuje migrację komórek oraz proces EMT w guzach pierwotnych, działa więc jako supresor nowotworowy. Niemniej jednak coraz więcej doniesień wskazuje na dualną naturę E-kadheryny zależną od kontekstu biologicznego [63]. Wykazano bowiem, że wiele inwazyjnych nowotworów przechodzi EMT tylko częściowo. Oznacza to, że komórki nowotworowe mogą nabywać cechy komórek mezenchymalnych i jednocześnie zachować ekspresję markerów nabłonkowych, w tym E-kadheryny. Dzięki tej plastyczności nabłonkowo-mezenchymalnej zyskują zdolność do migrowania w skupiskach [64]. Biorąc pod uwagę powyższe, nie należy wykluczać możliwości, iż podwyższona ekspresja E-kadheryny wspiera migrację komórek PDAC-SPDL1↓. Jednak aby zweryfikować tę hipotezę, należałoby przeprowadzić dodatkowe eksperymenty polegające na modyfikacji ekspresji E-kadheryny, co warto rozważyć w przyszłych badaniach.

Część doniesień naukowych sugeruje, iż obecność MNGCs w wielu typach nowotworów stanowi przejaw zdolności komórek guza do przetrwania szkodliwych warunków, ponieważ MNGCs mogą nie dzielić się przez długi czas przechodząc w „stan uśpienia”. Jednak gdy ponownie aktywują swój potencjał proliferacyjny, powstające z nich komórki potomne posiadają zwiększone zdolności migracyjne i inwazyjne w porównaniu do diploidalnych komórek nowotworowych [65,66]. To czasowe zatrzymanie podziałów MNGCs może tłumaczyć obniżenie tempa proliferacji komórek PANC-1-SPDL1↓. W środowisku naukowym nie ma jednak zgody co do roli MNGCs w nowotworach złośliwych, stąd potrzeba prowadzenia dalszych badań. Wydaje się, że przez wzgląd na dużą liczebność MNGCs odnotowaną w populacji PANC-1-SPDL1↓, wyjaśnienie znaczenia tych komórek w nowotworach pozwoli także lepiej zrozumieć udział SPDL1 w progresji raka trzustki.

Poza przedstawionymi zmianami morfologicznymi, w komórkach PDAC z wyciszoną ekspresją genu *SPDL1* obserwowano także liczne zaburzenia procesu mitozy, co wskazuje na istotny udział SPDL1 w formowaniu wrzeciona mitotycznego i prawidłowej segregacji chromosomów. W badanej populacji stwierdzono obecność licznych komórek przechodzących wielobiegunową mitozę będącą znaną przyczyną niestabilności chromosomowej i aneuploidii. Komórki PANC-1-SPDL1↓ zawierały także liczne mikrojądra uznawane za morfologiczne wyznaczniki stresu replikacyjnego oraz niestabilności genomowej [67]. Wymienionym zaburzeniom często towarzyszyła wysoka ekspresja γH2AX obserwowana w postaci ognisk i/lub jako rozproszone immunoznakowanie w obrębie jąder komórkowych. Drugi typ - całojadrowy wzór znakowania γH2AX uznawany jest za efekt silnego stresu replikacyjnego, który napędza niestabilność genomową [54].

Reasumując, otrzymane wyniki sugerują, że obniżenie poziomu białka SPDL1 w komórkach linii PANC-1 promuje ich niestabilność genetyczną poprzez zaburzenie procesu segregacji chromosomów i generowanie pęknięć nici DNA, co przynajmniej w części komórek może być następstwem indukcji stresu replikacyjnego. Ponadto wzrost tempa migracji komórek PANC-1-SPDL1↓ i uzyskany profil ekspresyjny genów *CDH2*, *VIM*, *MMP2/9* i *CD44* pozwalają przypuszczać, że korzystna wartość prognostyczna wysokiej ekspresji białka SPDL1 może przynajmniej częściowo wynikać z przeciwdziałania niestabilności genomowej oraz inwazji i migracji komórek raka trzustki. Wnioskowanie to poparte jest licznymi dowodami z piśmiennictwa pokazującymi związek pomiędzy postępującą niestabilnością genomową a progresją nowotworu i złym rokowaniem pacjentów. Korzystna wartość prognostyczna białka SPDL1 i przyjęta interpretacja wyników badań *in vitro* skłaniają do rozpatrywania SPDL1

w charakterze supresora transformacji nowotworowej. Jednak bez rozszerzenia panelu badań *in vitro* oraz z uwagi na niejasną na ten moment przeciwną wartość rokowniczą genu *SPDL1* należy stwierdzić, że przeprowadzone doświadczenia są niewystarczające, aby zakwalifikować *SPDL1* do onkogenów czy też genów supresorowych nowotworzenia. Kluczowe w tym aspekcie będą nie tylko dodatkowe testy *in vitro* na komórkach raka trzustki z wyciszoną ekspresją *SPDL1* czy *CDH1*, ale również te na prawidłowych i nowotworowych liniach komórkowych ze wzbudzoną nadekspresją badanego genu.

Kolejnym etapem badań *in vitro* była ocena odpowiedzi komórek PANC-1-SPDL1↓ na działanie wybranych cytostatyków stosowanych w leczeniu raka trzustki. Wykazano, że paklitaksel w dawkach 100-500 nM oraz gemcitabina w zakresie stężeń 50-1000 μM wywoływały istotnie silniejszy efekt cytotoksyczny w komórkach z obniżoną ekspresją *SPDL1* w porównaniu do komórek kontrolnych, co wskazuje, że do uwrażliwienia komórek dochodzi już w klinicznie osiągalnych dawkach. Chociaż zbadanie mechanizmów warunkujących większą chemiowrażliwość komórek PANC-1-SPDL1↓ wykracza poza cele badawcze niniejszej rozprawy, to na podstawie wcześniejszych analiz i testu z aneksyną V/PI można przypuszczać, że jej podłożem jest nasilenie stresu replikacyjnego, zaburzeń mitozy i uszkodzeń DNA, prowadzące do spotęgowania niestabilności genomowej i ostatecznie do śmierci komórek na drodze apoptozy. Podobny efekt zaobserwował zespół Silva i wsp. w komórkach gruczolakoraka płuc traktowanych PTX w stężeniu 10 nM [68]. Śmierć apoptotyczna w połączeniu z istotnym zatrzymaniem komórek w fazie G2/M cyklu oraz obecnością nieprawidłowych figur mitotycznych skłoniła autorów do wysunięcia teorii, że obniżenie ekspresji genu *SPDL1* w komórkach raka płuc, a następnie traktowanie ich niskimi dawkami PTX prowadzi do wydłużonego bloku mitotycznego, co sprzyja akumulacji sygnałów apoptotycznych [68]. Jeśli proponowany mechanizm znajdzie potwierdzenie w przyszłych badaniach na PDAC, to będzie stanowić dodatkowe poparcie stanowiska sugerującego istnienie limitu tolerancji na zmiany w genomie nowotworowym [69], który może mieć istotne implikacje terapeutyczne także dla pacjentów z rakiem trzustki.

Warto zauważyć, że w niniejszym badaniu cisplatyna działała skuteczniej na komórki PANC-1-SPDL1↓ w porównaniu do komórek kontrolnych tylko w wysokiej, nieosiągalnej klinicznie dawce 40 μM. Niejasne są na ten moment powody, dla których nie doszło do uwrażliwienia badanych komórek na działanie cisplatyny w stopniu porównywalnym do pozostałych testowanych leków. Szczególnie biorąc pod uwagę rezultat odnotowany przez zespół Silva i wsp. prowadzący badania na komórkach raka jamy ustnej, w których silny efekt

cytotoksyczny stymulowany zmianą ekspresji *SPDL1* obserwowany był już przy zastosowaniu stężenia 1 μ M CIS i nasilał się wraz ze wzrostem dawki leku [37]. Powyższe rozbieżności mogą przynajmniej częściowo wynikać ze zróżnicowanej patobiologii nowotworów, co podkreśla potrzebę indywidualizacji podejścia do opracowania nowych schematów terapeutycznych. Jednak dla pełnego zrozumienia niezgodności prezentowanych wyników konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań.

Celem drugiej pracy cyklu była ocena ekspresji SKA3 na poziomie mRNA i białka w PDAC z następczą analizą wartości prognostycznej oraz korelacji z wybranymi cechami kliniczno-patologicznymi pacjentów. Wykazano, że podwyższona ekspresja *SKA3*, istotnie częściej obserwowana w tkankach nowotworowych niż prawidłowych, stanowiła niezależny niekorzystny czynnik rokowniczy dla całkowitego czasu przeżycia w PDAC. Wynik ten jest zgodny z obserwacjami innych zespołów badawczych [52,70]. Ponadto wyniki analizy funkcjonalnej ujawniły, że *SKA3* jest najsilniej skorelowany z genami, które są zaangażowane w zapewnienie wierności procesu mitozy, w tym segregację chromosomów i funkcjonowanie SAC.

Analogiczne analizy przeprowadzone dla białka pokazały, że w przeciwieństwie do mRNA, wysoka immunoekspresja SKA3 w tkankach PDAC wiązała się u pacjentów z dłuższym czasem przeżycia całkowitego oraz czasem wolnym od choroby. Co więcej, w kontekście badanych punktów końcowych stanowiła niezależny korzystny czynnik prognostyczny. Efekt ten był szczególnie widoczny w nowotworach we wczesnym stadium zaawansowania. Istotny związek między podwyższonym poziomem białka SKA3 a dłuższą medianą czasu przeżycia całkowitego odnotowano także w kilku dodatkowo wyodrębnionych podgrupach pacjentów, u których nowotwór zdiagnozowano na wczesnym etapie rozwoju. Powyższe obserwacje stawiają SKA3 w roli potencjalnego wskaźnika prognostycznego w raku trzustki. Omawiany artykuł jest obecnie jedynym źródłem prezentującym analizę wartości rokowniczej białka SKA3 w tkankach PDAC. Dlatego konieczne jest przeprowadzenie kolejnych badań na większych kohortach pacjentów, które pozwolą potwierdzić otrzymane wyniki, a także eksperymentów *in vitro* mających na celu wyjaśnienie roli SKA3 w patogenezie i progresji raka trzustki.

Jednym z ograniczeń niniejszej pracy jest przeprowadzenie analiz dla mRNA oraz białka dla dwóch różnych populacji pacjentów – odpowiednio TCGA oraz kohorty własnej. W kontekście omawianej wcześniej komplementarności danych, badania dla obu poziomów informacji biologicznej prowadzone na tkankach pochodzących od tych samych pacjentów, pozwoliłyby na wyciągnięcie pewniejszych wniosków. Innym ważnym aspektem jest niewielka

liczebność grupy badanej, opisanej w pierwszym z dwóch prezentowanych artykułów naukowych. Należy jednak podkreślić, iż była ona wystarczająca do wykazania istotnych zależności pomiędzy poziomem ekspresji analizowanych czynników a rokowaniem pacjentów. Mając na uwadze powyższe, autorzy dołożyli wszelkich starań, by zwiększyć liczebność badanej próby, czego efekt widoczny jest w drugiej pracy z cyklu. Kolejną modyfikacją było uzupełnienie danych klinicznych o informacje na temat zgonu pacjentów z powodu powikłań pooperacyjnych. Wykluczenie tych przypadków z analiz przeżycia pozwoliło zwiększyć wiarygodność uzyskanych wyników. Warto również zaznaczyć, że ze względu na wysoką efektywność procesu wyciszenia ekspresji genu *SPDL1* w komórkach linii PANC-1, do analiz wykorzystano całą populację komórek poddanych transdukcji. Rak trzustki jest heterogennym nowotworem, dlatego analiza pełnej populacji z jednej strony pozwoliła lepiej odtworzyć warunki *in vivo*, z drugiej jednak uniemożliwiła obserwację zróżnicowanej odpowiedzi komórek o różnym profilu genetycznym. Przedstawione wyniki wymagają weryfikacji w badaniach wieloośrodkowych prowadzonych na większych grupach pacjentów, a także uzupełnienia danych o profilowanie wielkoskalowe komórek raka trzustki w kontekście ich odpowiedzi na zmienioną ekspresję *SPDL1*.

9. WNIOSKI

1. Ocena immunoekspresji *SPDL1*, ale nie cykliny F i *RRM2*, pozwala na stratyfikację pacjentów z PDAC do grup ryzyka różniących się medianą czasu przeżycia całkowitego, przy czym korzystna wartość prognostyczna białka *SPDL1* może przynajmniej częściowo wynikać z przeciwdziałania niestabilności genomowej oraz inwazji i migracji komórek raka trzustki.
2. Obniżenie ekspresji *SPDL1* w linii komórkowej raka trzustki PANC-1 powoduje istotny spadek tempa proliferacji, obniżenie potencjału klonogennego i jednocześnie znaczący wzrost potencjału migracyjnego komórek. Stwierdzone zmiany wraz z uzyskanym profilem ekspresyjnym oraz przeciwną wartością rokowniczą genu *SPDL1* nie pozwalają na jednoznaczne postawienie *SPDL1* w roli onkogenu czy supresora transformacji nowotworowej.
3. Obniżenie ekspresji *SPDL1* w linii komórkowej raka trzustki PANC-1 uwrażliwia komórki na działanie paklitakselu i gemcitabiny w dawkach osiągalnych klinicznie, czego efektem jest nasilenie procesu apoptozy. Pod względem mechanistycznym wydaje się być to przynajmniej częściowo związane ze spotęgowaniem niestabilności genomowej na skutek stresu replikacyjnego, zaburzeń mitozy i uszkodzeń DNA.
4. Ocena immunoekspresji *SKA3* pozwala na stratyfikację pacjentów z PDAC do grup ryzyka różniących się medianą czasu przeżycia całkowitego oraz medianą czasu wolnego od choroby, co w aspekcie funkcjonalnym (*in silico*) wynika prawdopodobnie z istotnej roli *SKA3* i skorelowanych z nim białek w zapewnianiu wierności procesu mitozy, a tym samym stabilności genetycznej komórki.
5. Ocena ekspresji mRNA *SPDL1*, *CCNF*, *RRM2* i *SKA3* pozwala na stratyfikację pacjentów do grup ryzyka różniących się medianą czasu przeżycia całkowitego w grupie pacjentów z gruczolakorakiem trzustki. Jednak wartość rokownicza badanych genów wymaga potwierdzenia w tej samej grupie badawczej, w której dokonano oceny kodowanych przez nie białek.
6. Stratyfikacja pacjentów na podstawie łączonej ekspresji mRNA *SPDL1*, *CCNF* i *RRM2* pozwala lepiej przewidywać przeżycie pacjentów z gruczolakorakiem trzustki w porównaniu do oceny każdego z nich osobno.

10. PIŚMIENNICTWO

1. Bray, F.; Laversanne, M.; Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Soerjomataram, I.; Jemal, A. Global Cancer Statistics 2022: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* **2024**, *74*, 229–263, doi:10.3322/caac.21834.
2. Siegel, R.L.; Giaquinto, A.N.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2024. *CA Cancer J Clin* **2024**, *74*, 12–49, doi:10.3322/caac.21820.
3. Nießen, A.; Hackert, T. State-of-the-Art Surgery for Pancreatic Cancer. *Langenbecks Arch Surg* **2022**, *407*, 443–450, doi:10.1007/s00423-021-02362-y.
4. Groot, V.P.; Rezaee, N.; Wu, W.; Cameron, J.L.; Fishman, E.K.; Hruban, R.H.; Weiss, M.J.; Zheng, L.; Wolfgang, C.L.; He, J. Patterns, Timing, and Predictors of Recurrence Following Pancreatectomy for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Ann Surg* **2018**, *267*, 936–945, doi:10.1097/SLA.0000000000002234.
5. Dallavalle, S.; Campagnoli, G.; Pastena, P.; Martinino, A.; Schiliró, D.; Giovinazzo, F. New Frontiers in Pancreatic Cancer Management: Current Treatment Options and the Emerging Role of Neoadjuvant Therapy. *Medicina (Kaunas)* **2024**, *60*, 1070, doi:10.3390/medicina60071070.
6. Hu, J.-X.; Zhao, C.-F.; Chen, W.-B.; Liu, Q.-C.; Li, Q.-W.; Lin, Y.-Y.; Gao, F. Pancreatic Cancer: A Review of Epidemiology, Trend, and Risk Factors. *World J Gastroenterol* **2021**, *27*, 4298–4321, doi:10.3748/wjg.v27.i27.4298.
7. Campbell, P.J.; Yachida, S.; Mudie, L.J.; Stephens, P.J.; Pleasance, E.D.; Stebbings, L.A.; Morsberger, L.A.; Latimer, C.; McLaren, S.; Lin, M.-L.; et al. The Patterns and Dynamics of Genomic Instability in Metastatic Pancreatic Cancer. *Nature* **2010**, *467*, 1109–1113, doi:10.1038/nature09460.
8. Emelyanova, M.; Ikonnikova, A.; Pushkov, A.; Pudova, E.; Krasnov, G.; Popova, A.; Zhanin, I.; Khomich, D.; Abramov, I.; Tjulandin, S.; et al. Mutations in Mismatch Repair Genes and Microsatellite Instability Status in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)* **2024**, *16*, 2111, doi:10.3390/cancers16112111.
9. Yachida, S.; Jones, S.; Bozic, I.; Antal, T.; Leary, R.; Fu, B.; Kamiyama, M.; Hruban, R.H.; Eshleman, J.R.; Nowak, M.A.; et al. Distant Metastasis Occurs Late during the Genetic Evolution of Pancreatic Cancer. *Nature* **2010**, *467*, 1114–1117, doi:10.1038/nature09515.

10. Hayashi, A.; Hong, J.; Iacobuzio-Donahue, C.A. The Pancreatic Cancer Genome Revisited. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2021**, *18*, 469–481, doi:10.1038/s41575-021-00463-z.
11. Usman, O.H.; Zhang, L.; Xie, G.; Kocher, H.M.; Hwang, C.-I.; Wang, Y.J.; Mallory, X.; Irianto, J. Genomic Heterogeneity in Pancreatic Cancer Organoids and Its Stability with Culture. *NPJ Genom Med* **2022**, *7*, 71, doi:10.1038/s41525-022-00342-9.
12. Bai, C.; Richman, R.; Elledge, S.J. Human Cyclin F. *EMBO J* **1994**, *13*, 6087–6098, doi:10.1002/j.1460-2075.1994.tb06955.x.
13. Skowyra, D.; Craig, K.L.; Tyers, M.; Elledge, S.J.; Harper, J.W. F-Box Proteins Are Receptors That Recruit Phosphorylated Substrates to the SCF Ubiquitin-Ligase Complex. *Cell* **1997**, *91*, 209–219, doi:10.1016/s0092-8674(00)80403-1.
14. D'Angiolella, V.; Donato, V.; Forrester, F.M.; Jeong, Y.-T.; Pellacani, C.; Kudo, Y.; Saraf, A.; Florens, L.; Washburn, M.P.; Pagano, M. Cyclin F-Mediated Degradation of Ribonucleotide Reductase M2 Controls Genome Integrity and DNA Repair. *Cell* **2012**, *149*, 1023–1034, doi:10.1016/j.cell.2012.03.043.
15. Klein, D.K.; Hoffmann, S.; Ahlskog, J.K.; O'Hanlon, K.; Quaas, M.; Larsen, B.D.; Rolland, B.; Rösner, H.I.; Walter, D.; Kousholt, A.N.; et al. Cyclin F Suppresses B-Myb Activity to Promote Cell Cycle Checkpoint Control. *Nat Commun* **2015**, *6*, 5800, doi:10.1038/ncomms6800.
16. D'Angiolella, V.; Donato, V.; Vijayakumar, S.; Saraf, A.; Florens, L.; Washburn, M.P.; Dynlacht, B.; Pagano, M. SCF(Cyclin F) Controls Centrosome Homeostasis and Mitotic Fidelity through CP110 Degradation. *Nature* **2010**, *466*, 138–142, doi:10.1038/nature09140.
17. Fu, J.; Qiu, H.; Cai, M.; Pan, Y.; Cao, Y.; Liu, L.; Yun, J.; Zhang, C.Z. Low Cyclin F Expression in Hepatocellular Carcinoma Associates with Poor Differentiation and Unfavorable Prognosis. *Cancer Sci* **2013**, *104*, 508–515, doi:10.1111/cas.12100.
18. Gagat, M.; Krajewski, A.; Grzanka, D.; Grzanka, A. Potential Role of Cyclin F mRNA Expression in the Survival of Skin Melanoma Patients: Comprehensive Analysis of the Pathways Altered Due to Cyclin F Upregulation. *Oncol Rep* **2018**, *40*, 123–144, doi:10.3892/or.2018.6435.
19. Wang, X.; Zhang, T.; Zhang, S.; Shan, J. Prognostic Values of F-Box Members in Breast Cancer: An Online Database Analysis and Literature Review. *Biosci Rep* **2019**, *39*, BSR20180949, doi:10.1042/BSR20180949.

20. Zelong, Y.; Han, Y.; Ting, G.; Yifei, W.; Kun, H.; Haoran, H.; Yong, C. Increased Expression of Cyclin F in Liver Cancer Predicts Poor Prognosis: A Study Based on TCGA Database. *Medicine (Baltimore)* **2021**, *100*, e26623, doi:10.1097/MD.00000000000026623.
21. Krajewski, A.; Gagat, M.; Żuryń, A.; Hałas-Wiśniewska, M.; Grzanka, D.; Grzanka, A. Cyclin F Is Involved in Response to Cisplatin Treatment in Melanoma Cell Lines. *Oncol Rep* **2020**, *43*, 765–772, doi:10.3892/or.2020.7465.
22. Krajewski, A.; Gagat, M.; Mikołajczyk, K.; Izdebska, M.; Żuryń, A.; Grzanka, A. Cyclin F Downregulation Affects Epithelial-Mesenchymal Transition Increasing Proliferation and Migration of the A-375 Melanoma Cell Line. *Cancer Manag Res* **2020**, *12*, 13085–13097, doi:10.2147/CMAR.S279169.
23. Gao, D.; Li, S.; Guo, H.; Liu, X.; Liu, Z.; Li, L.; Bao, L.; Dang, X. A Predictive Model Based on the FBXO Family Reveals the Significance of Cyclin F in Hepatocellular Carcinoma. *Front Biosci (Landmark Ed)* **2024**, *29*, 202, doi:10.31083/j.fbl2905202.
24. Zhang, Y.; Liu, Q.; Cui, M.; Wang, M.; Hua, S.; Gao, J.; Liao, Q. Comprehensive Analysis of Expression, Prognostic Value, and Immune Infiltration for Ubiquitination-Related FBXOs in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Front Immunol* **2021**, *12*, 774435, doi:10.3389/fimmu.2021.774435.
25. Nordlund, P.; Reichard, P. Ribonucleotide Reductases. *Annu Rev Biochem* **2006**, *75*, 681–706, doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142443.
26. Zhou, B.; Yen, Y. Characterization of the Human Ribonucleotide Reductase M2 Subunit Gene; Genomic Structure and Promoter Analyses. *Cytogenet Cell Genet* **2001**, *95*, 52–59, doi:10.1159/000057017.
27. Fisher, S.B.; Patel, S.H.; Bagci, P.; Kooby, D.A.; El-Rayes, B.F.; Staley, C.A.; Adsay, N.V.; Maithel, S.K. An Analysis of Human Equilibrative Nucleoside Transporter-1, Ribonucleoside Reductase Subunit M1, Ribonucleoside Reductase Subunit M2, and Excision Repair Cross-Complementing Gene-1 Expression in Patients with Resected Pancreas Adenocarcinoma: Implications for Adjuvant Treatment. *Cancer* **2013**, *119*, 445–453, doi:10.1002/cncr.27619.
28. Xie, H.; Lin, J.; Thomas, D.G.; Jiang, W.; Liu, X. Ribonucleotide Reductase M2 Does Not Predict Survival in Patients with Resectable Pancreatic Adenocarcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* **2012**, *5*, 347–355.
29. Itoi, T.; Sofuni, A.; Fukushima, N.; Itokawa, F.; Tsuchiya, T.; Kurihara, T.; Moriyasu, F.; Tsuchida, A.; Kasuya, K. Ribonucleotide Reductase Subunit M2 mRNA Expression in

- Pretreatment Biopsies Obtained from Unresectable Pancreatic Carcinomas. *J Gastroenterol* **2007**, *42*, 389–394, doi:10.1007/s00535-007-2017-0.
30. Giovannetti, E.; Del Tacca, M.; Mey, V.; Funel, N.; Nannizzi, S.; Ricci, S.; Orlandini, C.; Boggi, U.; Campani, D.; Del Chiaro, M.; et al. Transcription Analysis of Human Equilibrative Nucleoside Transporter-1 Predicts Survival in Pancreas Cancer Patients Treated with Gemcitabine. *Cancer Res* **2006**, *66*, 3928–3935, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4203.
 31. Fujita, H.; Ohuchida, K.; Mizumoto, K.; Itaba, S.; Ito, T.; Nakata, K.; Yu, J.; Kayashima, T.; Souzaki, R.; Tajiri, T.; et al. Gene Expression Levels as Predictive Markers of Outcome in Pancreatic Cancer after Gemcitabine-Based Adjuvant Chemotherapy. *Neoplasia* **2010**, *12*, 807–817, doi:10.1593/neo.10458.
 32. Sierzega, M.; Pach, R.; Kulig, P.; Legutko, J.; Kulig, J. Prognostic Implications of Expression Profiling for Gemcitabine-Related Genes (hENT1, dCK, RRM1, RRM2) in Patients With Resectable Pancreatic Adenocarcinoma Receiving Adjuvant Chemotherapy. *Pancreas* **2017**, *46*, 684–689, doi:10.1097/MPA.0000000000000807.
 33. UniProt Consortium UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Res* **2023**, *51*, D523–D531, doi:10.1093/nar/gkac1052.
 34. Griffis, E.R.; Stuurman, N.; Vale, R.D. Spindly, a Novel Protein Essential for Silencing the Spindle Assembly Checkpoint, Recruits Dynein to the Kinetochore. *J Cell Biol* **2007**, *177*, 1005–1015, doi:10.1083/jcb.200702062.
 35. Feng, Y.; Tang, D.; Wang, J. Emerging Role and Function of SPDL1 in Human Health and Diseases. *Open Med (Wars)* **2024**, *19*, 20240922, doi:10.1515/med-2024-0922.
 36. Klimaszewska-Wiśniewska, A.; Buchholz, K.; Durślewicz, J.; Villodre, E.S.; Gagat, M.; Grzanka, D. SPDL1 Is an Independent Predictor of Patient Outcome in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*, 1819, doi:10.3390/ijms23031819.
 37. Silva, P.M.A.; Delgado, M.L.; Ribeiro, N.; Florindo, C.; Tavares, Á.A.; Ribeiro, D.; Lopes, C.; do Amaral, B.; Bousbaa, H.; Monteiro, L.S. Spindly and Bub3 Expression in Oral Cancer: Prognostic and Therapeutic Implications. *Oral Dis* **2019**, *25*, 1291–1301, doi:10.1111/odi.13089.
 38. Liu, H.-S.; Guo, Q.; Yang, H.; Zeng, M.; Xu, L.-Q.; Zhang, Q.-X.; Liu, H.; Guo, J.-L.; Zhang, J. SPDL1 Overexpression Is Associated With the 18F-FDG PET/CT Metabolic Parameters, Prognosis, and Progression of Esophageal Cancer. *Front Genet* **2022**, *13*, 798020, doi:10.3389/fgene.2022.798020.

39. Liu, T.; Xu, J.; Zhang, Q.-X.; Huang, Y.-J.; Wang, W.; Fu, Z. Inhibiting the Expression of Spindle Appendix Coiled-Coil Protein 1 Can Suppress Tumor Cell Growth and Metastasis and Is Associated with Cancer Immune Cells in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *PLoS One* **2024**, *19*, e0302312, doi:10.1371/journal.pone.0302312.
40. Zhai, Y.; Wu, F.; Xu, X.; Zhao, P.; Xin, L.; Li, M.; Zong, Y.; Yang, Z.; Li, Z.; Wang, L.; et al. Silencing of Spindle Apparatus Coiled-Coil Protein 1 Suppressed the Progression of Hepatocellular Carcinoma through Farnesyltransferase-Beta and Increased Drug Sensitivity. *Heliyon* **2024**, *10*, e34484, doi:10.1016/j.heliyon.2024.e34484.
41. Song, P.; Wusiman, D.; Li, F.; Wu, X.; Guo, L.; Li, W.; Gao, S.; He, J. Pan-Cancer Analysis Combined with Experiments Explores the Oncogenic Role of Spindle Apparatus Coiled-Coil Protein 1 (SPDL1). *Cancer Cell Int* **2022**, *22*, 49, doi:10.1186/s12935-022-02461-w.
42. Tian, X.; Wang, N. Upregulation of ASPM, BUB1B and SPDL1 in Tumor Tissues Predicts Poor Survival in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Oncol Lett* **2020**, *19*, 3307–3315, doi:10.3892/ol.2020.11414.
43. Kodama, T.; Marian, T.A.; Lee, H.; Kodama, M.; Li, J.; Parmacek, M.S.; Jenkins, N.A.; Copeland, N.G.; Wei, Z. MRTFB Suppresses Colorectal Cancer Development through Regulating SPDL1 and MCAM. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2019**, *116*, 23625–23635, doi:10.1073/pnas.1910413116.
44. Jeyaprakash, A.A.; Santamaria, A.; Jayachandran, U.; Chan, Y.W.; Benda, C.; Nigg, E.A.; Conti, E. Structural and Functional Organization of the Ska Complex, a Key Component of the Kinetochore-Microtubule Interface. *Mol Cell* **2012**, *46*, 274–286, doi:10.1016/j.molcel.2012.03.005.
45. Sivakumar, S.; Janczyk, P.Ł.; Qu, Q.; Brautigam, C.A.; Stukenberg, P.T.; Yu, H.; Gorbsky, G.J. The Human SKA Complex Drives the Metaphase-Anaphase Cell Cycle Transition by Recruiting Protein Phosphatase 1 to Kinetochores. *Elife* **2016**, *5*, e12902, doi:10.7554/eLife.12902.
46. Daum, J.R.; Wren, J.D.; Daniel, J.J.; Sivakumar, S.; McAvoy, J.N.; Potapova, T.A.; Gorbsky, G.J. Ska3 Is Required for Spindle Checkpoint Silencing and the Maintenance of Chromosome Cohesion in Mitosis. *Curr Biol* **2009**, *19*, 1467–1472, doi:10.1016/j.cub.2009.07.017.
47. Potapova, T.; Gorbsky, G.J. The Consequences of Chromosome Segregation Errors in Mitosis and Meiosis. *Biology (Basel)* **2017**, *6*, 12, doi:10.3390/biology6010012.

48. Hu, D.-D.; Chen, H.-L.; Lou, L.-M.; Zhang, H.; Yang, G.-L. SKA3 Promotes Lung Adenocarcinoma Metastasis through the EGFR-PI3K-Akt Axis. *Biosci Rep* **2020**, *40*, BSR20194335, doi:10.1042/BSR20194335.
49. Hou, Y.; Wang, Z.; Huang, S.; Sun, C.; Zhao, J.; Shi, J.; Li, Z.; Wang, Z.; He, X.; Tam, N.L.; et al. SKA3 Promotes Tumor Growth by Regulating CDK2/P53 Phosphorylation in Hepatocellular Carcinoma. *Cell Death Dis* **2019**, *10*, 929, doi:10.1038/s41419-019-2163-3.
50. Hu, R.; Wang, M.-Q.; Niu, W.-B.; Wang, Y.-J.; Liu, Y.-Y.; Liu, L.-Y.; Wang, M.; Zhong, J.; You, H.-Y.; Wu, X.-H.; et al. SKA3 Promotes Cell Proliferation and Migration in Cervical Cancer by Activating the PI3K/Akt Signaling Pathway. *Cancer Cell Int* **2018**, *18*, 183, doi:10.1186/s12935-018-0670-4.
51. Zhang, C.; Zhao, S.; Tan, Y.; Pan, S.; An, W.; Chen, Q.; Wang, X.; Xu, H. The SKA3-DUSP2 Axis Promotes Gastric Cancer Tumorigenesis and Epithelial-Mesenchymal Transition by Activating the MAPK/ERK Pathway. *Front Pharmacol* **2022**, *13*, 777612, doi:10.3389/fphar.2022.777612.
52. Liu, Y.; Jin, Z.-R.; Huang, X.; Che, Y.-C.; Liu, Q. Identification of Spindle and Kinetochore-Associated Family Genes as Therapeutic Targets and Prognostic Biomarkers in Pancreas Ductal Adenocarcinoma Microenvironment. *Front Oncol* **2020**, *10*, 553536, doi:10.3389/fonc.2020.553536.
53. Feng, D.; Wang, J.; Xiao, Y.; Wu, R.; Li, D.; Tuo, Z.; Yu, Q.; Ye, L.; Miyamoto, A.; Yoo, K.H.; et al. SKA3 Targeted Therapies in Cancer Precision Surgery: Bridging Bench Discoveries to Clinical Applications - Review Article. *Int J Surg* **2024**, *110*, 2323–2337, doi:10.1097/JS9.0000000000001123.
54. Botrugno, O.A.; Tonon, G. Genomic Instability and Replicative Stress in Multiple Myeloma: The Final Curtain? *Cancers (Basel)* **2021**, *14*, 25, doi:10.3390/cancers14010025.
55. Ginestier, C.; Charafe-Jauffret, E.; Bertucci, F.; Eisinger, F.; Geneix, J.; Bechlian, D.; Conte, N.; Adélaïde, J.; Toiron, Y.; Nguyen, C.; et al. Distinct and Complementary Information Provided by Use of Tissue and DNA Microarrays in the Study of Breast Tumor Markers. *Am J Pathol* **2002**, *161*, 1223–1233, doi:10.1016/S0002-9440(10)64399-4.
56. Koussounadis, A.; Langdon, S.P.; Um, I.H.; Harrison, D.J.; Smith, V.A. Relationship between Differentially Expressed mRNA and mRNA-Protein Correlations in a Xenograft Model System. *Sci Rep* **2015**, *5*, 10775, doi:10.1038/srep10775.

57. Palma, A.M.; Vudatha, V.; Peixoto, M.L.; Madan, E. Tumor Heterogeneity: An Oncogenic Driver of PDAC Progression and Therapy Resistance under Stress Conditions. *Adv Cancer Res* **2023**, *159*, 203–249, doi:10.1016/bs.acr.2023.02.005.
58. Rhim, A.D.; Mirek, E.T.; Aiello, N.M.; Maitra, A.; Bailey, J.M.; McAllister, F.; Reichert, M.; Beatty, G.L.; Rustgi, A.K.; Vonderheide, R.H.; et al. EMT and Dissemination Precede Pancreatic Tumor Formation. *Cell* **2012**, *148*, 349–361, doi:10.1016/j.cell.2011.11.025.
59. Akhmetkaliyev, A.; Alibrahim, N.; Shafiee, D.; Tulchinsky, E. EMT/MET Plasticity in Cancer and Go-or-Grow Decisions in Quiescence: The Two Sides of the Same Coin? *Mol Cancer* **2023**, *22*, 90, doi:10.1186/s12943-023-01793-z.
60. Zhao, Q.; Zhang, K.; Li, Z.; Zhang, H.; Fu, F.; Fu, J.; Zheng, M.; Zhang, S. High Migration and Invasion Ability of PGCCs and Their Daughter Cells Associated With the Nuclear Localization of S100A10 Modified by SUMOylation. *Front Cell Dev Biol* **2021**, *9*, 696871, doi:10.3389/fcell.2021.696871.
61. Fei, F.; Zhang, D.; Yang, Z.; Wang, S.; Wang, X.; Wu, Z.; Wu, Q.; Zhang, S. The Number of Polyploid Giant Cancer Cells and Epithelial-Mesenchymal Transition-Related Proteins Are Associated with Invasion and Metastasis in Human Breast Cancer. *J Exp Clin Cancer Res* **2015**, *34*, 158, doi:10.1186/s13046-015-0277-8.
62. Liu, P.; Wang, L.; Yu, H. Polyploid Giant Cancer Cells: Origin, Possible Pathways of Formation, Characteristics, and Mechanisms of Regulation. *Front Cell Dev Biol* **2024**, *12*, 1410637, doi:10.3389/fcell.2024.1410637.
63. Rubtsova, S.N.; Zhitnyak, I.Y.; Gloushankova, N.A. Dual Role of E-Cadherin in Cancer Cells. *Tissue Barriers* **2022**, *10*, 2005420, doi:10.1080/21688370.2021.2005420.
64. Aiello, N.M.; Maddipati, R.; Norgard, R.J.; Balli, D.; Li, J.; Yuan, S.; Yamazoe, T.; Black, T.; Sahmoud, A.; Furth, E.E.; et al. EMT Subtype Influences Epithelial Plasticity and Mode of Cell Migration. *Dev Cell* **2018**, *45*, 681-695.e4, doi:10.1016/j.devcel.2018.05.027.
65. Was, H.; Borkowska, A.; Olszewska, A.; Klemba, A.; Marciniak, M.; Synowiec, A.; Kieda, C. Polyploidy Formation in Cancer Cells: How a Trojan Horse Is Born. *Semin Cancer Biol* **2022**, *81*, 24–36, doi:10.1016/j.semcancer.2021.03.003.
66. Zhang, S.; Mercado-Uribe, I.; Hanash, S.; Liu, J. iTRAQ-Based Proteomic Analysis of Polyploid Giant Cancer Cells and Budding Progeny Cells Reveals Several Distinct Pathways for Ovarian Cancer Development. *PLoS One* **2013**, *8*, e80120, doi:10.1371/journal.pone.0080120.

67. Saxena, S.; Zou, L. Hallmarks of DNA Replication Stress. *Mol Cell* **2022**, *82*, 2298–2314, doi:10.1016/j.molcel.2022.05.004.
68. Silva, P.M.A.; Ribeiro, N.; Lima, R.T.; Andrade, C.; Diogo, V.; Teixeira, J.; Florindo, C.; Tavares, Á.; Vasconcelos, M.H.; Bousbaa, H. Suppression of Spindly Delays Mitotic Exit and Exacerbates Cell Death Response of Cancer Cells Treated with Low Doses of Paclitaxel. *Cancer Lett* **2017**, *394*, 33–42, doi:10.1016/j.canlet.2017.02.024.
69. Andor, N.; Maley, C.C.; Ji, H.P. Genomic Instability in Cancer: Teetering on the Limit of Tolerance. *Cancer Res* **2017**, *77*, 2179–2185, doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-1553.
70. Li, Z.; Huang, L.; Li, J.; Yang, W.; Li, W.; Long, Q.; Dai, X.; Wang, H.; Du, G. Immunological Role and Prognostic Value of the SKA Family in Pan-Cancer Analysis. *Front Immunol* **2023**, *14*, 1012999, doi:10.3389/fimmu.2023.1012999.

11. STRESZCZENIE

Badania prowadzone w ostatnich latach wykazały, że kluczową rolę w patogenezie i progresji raka trzustki odgrywa niestabilność genomowa (ang. genomic instability, GIN). W obliczu tych doniesień oraz braku czynników pozwalających na skuteczne przewidywanie przebiegu choroby, w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej podjęto próbę zidentyfikowania nowych markerów prognostycznych raka trzustki. Do analiz wytypowano cztery białka związane z GIN, których ekspresja ulega deregulacji w gruczolakoraku przewodowych trzustki (ang. pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC): cyklinę F, RRM2, SPDL1 i SKA3. Badanie podzielono na dwa etapy. Pierwszy z nich przeprowadzono w oparciu o dane transkryptomiczne zgromadzone w ramach projektu TCGA oraz z wykorzystaniem materiału tkankowego pobranego od pacjentów z PDAC. Celem tej części badania była ocena ekspresji cykliny F, RRM2, SPDL1 i SKA3 (na poziomie mRNA oraz białka) w kontekście jej wartości rokowniczej w raku trzustki oraz związku z wybranymi cechami kliniczno-patologicznymi pacjentów. Drugi etap obejmował testy *in vitro* przeprowadzone na ludzkiej linii komórkowej raka trzustki PANC-1 w celu oceny wpływu zmiany ekspresji genu *SPDL1* na właściwości biologiczne komórek oraz ich odpowiedź na działanie wybranych leków przeciwnowotworowych.

Wykazano, że podwyższona ekspresja mRNA każdego z analizowanych czynników stanowi niezależny niekorzystny wskaźnik rokowniczy w gruczolakoraku trzustki. Dodatkowo stwierdzono, iż analiza łączonej ekspresji mRNA *SPDL1*, *CCNF* i *RRM2* pozwala lepiej przewidywać przeżycie pacjentów niż ocena każdego z tych genów oddzielnie. Ocena związku pomiędzy poziomem białek: cykliny F, RRM2, SPDL1 i SKA3 a czasem przeżycia pacjentów z PDAC wykazała, że wysoka immunoekspresja dwóch z nich, tj. SPDL1 i SKA3 stanowi niezależny predyktor korzystnego rokowania pacjentów z PDAC w kontekście czasu przeżycia całkowitego, a w przypadku SKA3 także czasu przeżycia wolnego od choroby.

Eksperymenty *in vitro* pokazały, że wyciszenie ekspresji genu *SPDL1* w linii komórkowej PANC-1 obniża tempo proliferacji, osłabia potencjał klonogeny i stymuluje aktywność migracyjną komórek. Ponadto istotnie wpływa na ich morfologię. W badanej populacji odnotowano m.in. obecność dużych komórek wielojądrowych oraz mikrojąder, a także zaburzenia procesu mitozy. Zmianom tym często towarzyszyła podwyższona ekspresja γ H2AX w obrębie jąder komórkowych. W badanych komórkach stwierdzono także podwyższoną ekspresję czynników utożsamianych z agresywnością biologiczną komórek nowotworowych

(m.in. *CDH2*, *VIM*, *MMP9*, *CD44*). Powyższe obserwacje pozwalają wnioskować, iż obniżona ekspresja *SPDL1* zaburza segregację chromosomów oraz prowadzi do powstania uszkodzeń nici DNA, co napędza GIN komórek raka trzustki. Ponadto, w odniesieniu do pierwszego etapu badań sugerują, że korzystna wartość prognostyczna białka *SPDL1* jest prawdopodobnie związana z przeciwdziałaniem GIN oraz inwazji i migracji komórek raka trzustki.

W dalszych etapach badań *in vitro* oceniono wpływ zmiany ekspresji genu *SPDL1* na cytotoksyczność wybranych leków przeciwnowotworowych wobec komórek linii PANC-1. Wykazano, że paklitaksel i gemcitabina stosowane w osiągalnych klinicznie dawkach istotnie obniżają przeżycie komórek PANC-1-*SPDL1*↓ kierując część z nich na drogę apoptozy. Wysłunięto wniosek, że zwiększona chemiowrażliwość na działanie testowanych leków może wynikać ze spotęgowanej GIN badanych komórek.

Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej pozwalają wnioskować, iż ekspresję wszystkich analizowanych w badaniu transkryptów, a także białek *SPDL1* i *SKA3*, należy rozpatrywać jako potencjalne czynniki prognostyczne w raku trzustki, które wymagają walidacji w badaniach wieloośrodkowych prowadzonych na większych grupach pacjentów. Ponadto przeprowadzone badania *in vitro* pokazują, że obniżenie ekspresji *SPDL1* potęguje niestabilność genetyczną komórek PDAC, co może stanowić wytłumaczenie dla ich zwiększonej chemiowrażliwości wobec niektórych cytostatyków.

12. SUMMARY

Research conducted in recent years has demonstrated that genomic instability (GIN) plays a key role in the pathogenesis and progression of pancreatic cancer. In light of these findings and the lack of factors enabling effective prediction of disease course, the present doctoral dissertation aimed to identify new prognostic markers for pancreatic cancer. Four proteins associated with GIN that exhibit deregulated expression in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) were selected for analysis: cyclin F, RRM2, SPDL1, and SKA3. The study was divided into two main stages. The first stage utilized transcriptomic data collected as part of the TCGA project, as well as tissue samples obtained from PDAC patients. This phase aimed to assess the expression of cyclin F, RRM2, SPDL1 and SKA3 (at mRNA and protein levels) in the context of their prognostic value in pancreatic cancer and their association with selected clinicopathological features of patients. The second stage involved *in vitro* experiments conducted on the human pancreatic cancer cell line PANC-1. This phase aimed to evaluate the impact of altered *SPDL1* gene expression on the biological properties of the cells and their response to selected anticancer drugs.

It has been shown that elevated mRNA expression of all analyzed factors constitutes an independent negative prognostic indicator in pancreatic adenocarcinoma. Additionally, the combined analysis of *SPDL1*, *CCNF*, and *RRM2* mRNA expression was found to be more effective at predicting patient survival than assessing each gene individually. The analysis of the relationship between the protein levels of Cyclin F, RRM2, SPDL1, and SKA3 and patient survival in PDAC revealed that high immunoexpression of SPDL1 and SKA3 is an independent predictor of favorable prognosis for patients with PDAC in terms of overall survival, and in the case of SKA3, also disease-free survival.

In vitro analyses revealed that silencing *SPDL1* gene expression in the PANC-1 cell line reduces cell proliferation and colony-forming capacity while stimulating their migration ability. This genetic modification also significantly affected cell morphology, resulting in a population of large multinucleated cells and micronuclei, along with numerous mitotic abnormalities. These changes were often accompanied by elevated γ H2AX expression within the nuclei. In analyzed cells, increased expression of factors associated with the biological aggressiveness of cancer cells (including *CDH2*, *VIM*, *MMP9*, *CD44*) was also detected. These observations suggest that reduced *SPDL1* expression disrupts chromosome segregation and leads to DNA breaks, contributing to GIN in pancreatic cancer cells. Moreover, with regard

to the first stage of the research, these abnormalities suggest that the positive prognostic value of the SPDL1 protein is likely linked to counteracting GIN, as well as the invasion and migration of pancreatic cancer cells.

In the subsequent stages of the *in vitro* research, the effect of altered *SPDL1* gene expression on the cytotoxicity of selected anticancer drugs against PANC-1 cells was evaluated. The results showed that paclitaxel and gemcitabine administered at clinically achievable doses significantly reduced the survival of PANC-1-SPDL1↓ cells by inducing apoptosis. It was concluded that the increased chemosensitivity to these drugs may result from the increased GIN of the analyzed cells.

The results presented in the doctoral dissertation suggest that the expression of all analyzed transcripts, as well as the SPDL1 and SKA3 proteins, should be considered potential prognostic factors in pancreatic cancer that require validation in multicenter studies involving larger patient cohorts. Additionally, the *in vitro* studies demonstrated that reducing SPDL1 expression enhances the genetic instability of PDAC cells, which may explain their increased chemosensitivity to certain anticancer drugs.



Article

Expression of Genomic Instability-Related Molecules: Cyclin F, RRM2 and SPDL1 and Their Prognostic Significance in Pancreatic Adenocarcinoma

Anna Klimaszewska-Wiśniewska ^{1,*†}, Karolina Buchholz ^{1,2,†}, Izabela Neska-Długosz ¹, Justyna Dursiewicz ¹, Dariusz Grzanka ¹, Jan Zabrzyński ^{1,3}, Paulina Sopońska ⁴, Alina Grzanka ² and Maciej Gagat ²



Citation: Klimaszewska-Wiśniewska, A.; Buchholz, K.; Neska-Długosz, I.; Dursiewicz, J.; Grzanka, D.; Zabrzyński, J.; Sopońska, P.; Grzanka, A.; Gagat, M. Expression of Genomic Instability-Related Molecules: Cyclin F, RRM2 and SPDL1 and Their Prognostic Significance in Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancers* **2021**, *13*, 859. <https://doi.org/10.3390/cancers13040859>

Academic Editor: Noel F.C.C. De Miranda
Received: 14 January 2021
Accepted: 15 February 2021
Published: 18 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Department of Clinical Pathomorphology, Faculty of Medicine, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, 85-094 Bydgoszcz, Poland; karolina.buchholz@cm.umk.pl (K.B.); iznes@cm.umk.pl (I.N.-D.); justyna.dursiewicz@cm.umk.pl (J.D.); d.grzanka@cm.umk.pl (D.G.); jan.zabrzynski@cm.umk.pl (J.Z.)
 - ² Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, 85-092 Bydgoszcz, Poland; agrzanka@cm.umk.pl (A.G.); mgagat@cm.umk.pl (M.G.)
 - ³ Department of General Orthopaedics, Musculoskeletal Oncology and Trauma Surgery, Poznan University of Medical Sciences, 60-572 Poznań, Poland
 - ⁴ Department of Obstetrics, Gynaecology and Oncology, Faculty of Medicine, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, 85-094 Bydgoszcz, Poland; paulina.soponska@cm.umk.pl
- * Correspondence: anna.klimaszewska@cm.umk.pl; Tel.: +48-52-585-42-00; Fax: +48-52-585-40-49
† These authors contributed equally to this paper.

Simple Summary: Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the worst prognostic cancers, for which clinically valuable prognostic factors and individualized biomarker-driven cancer therapies are still lacking. Recent studies have shed some light on the crucial relationship between genomic instability and PDAC progression, which can be harnessed for the cancer diagnosis, prognosis, and personalized treatment. We therefore tested the hypothesis that differences in the expression of cyclin F, RRM2, and SPDL1, i.e., proteins being implicated in maintaining genomic stability, could account for differences in clinical outcome among PDAC patients. Here, we have shown for the first time that overexpression of SPDL1 protein is a potent independent prognostic factor associated with a better survival of PDAC patients. In turn, CCNE, RRM2, and SPDL1 mRNAs are independent prognostic markers for a poor survival, both by themselves and even more in combination with each other. These biomarkers may have a potential clinical utility in the management of this deadly disease.

Abstract: In the present study, we aimed to assess the selected components of cell cycle machinery, checkpoint, DNA repair, and synthesis, namely RRM2, cyclin F, and SPDL1 in pancreatic adenocarcinomas (PAC) by in-house immunohistochemistry (IHC) and bioinformatic analysis of public datasets, in terms of expression, correlation with clinicopathological parameters, and patient survival. Sixty eight patients with pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) were included in our cohort study, and IHC was performed on tissue macroarrays. RNA-Seq-based transcriptome data for 177 PACs were retrieved from the Cancer Genome Atlas (TCGA). We found cyclin F, RRM2, and SPDL1 to be overexpressed at both protein and mRNA levels in tumor tissues compared to respective controls. Based on TCGA dataset, we have demonstrated that CCNE, RRM2, and SPDL1 are potent independent prognostic markers for poor overall survival, both by themselves and even more in combination with each other. Furthermore, high CCNE mRNA expression was associated with features of cancer progression. By contrast, overexpression of cyclin F or SPDL1 proteins denoted a good prognosis in PDAC patients; however, in the case of the former protein, the results did not reach statistical significance. Specifically, high levels of SPDL1 protein emerged as the most powerful independent prognostic factor associated with a better outcome. If validated, the CCNE/RRM2/SPDL1 three-gene panel developed in this study, as well as SPDL1 protein, may provide significant clinical implications for the prognosis prediction of PAC patients.

Keywords: pancreatic ductal adenocarcinoma; cyclin F; RRM2; SPDL1; genomic instability; prognostic factor

1. Introduction

Defects in three tightly interconnected processes throughout the cell cycle: DNA replication, DNA damage repair, and chromosome segregation are the main sources of genomic instability (GIN), being a major driving force of tumorigenesis. The clinical relevance of genomic instability is supported by its association with outcomes across various cancer types and accumulating evidence linking, e.g., chromosomal chaos (i.e., chromosomal instability, CIN) with metastasis. Indeed, GIN has been directly linked to the acquisition of malignant tumor characteristics, aneuploidy tolerance, oncogenic clonal evolution, and chemoresistance, and therefore to tumor plasticity and heterogeneity, which in turn strongly constrain the clinical benefit of personalized cancer medicine [1]. This is evident, for example, in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), which represents one of the most lethal malignancies, with an incidence almost equivalent to mortality, but still orphan of individualized biomarker-driven cancer therapy, though various genomic classifications have been reported over the years. Although PDAC may seem like a quite homogeneous disease, with recurrent mutations in four genes only (KRAS, CDKN2A, TP53, and SMAD4), it actually presents as a spectrum of distinct cancer cell subclones with different molecular and biological features, potentially accounting for varied clinical behavior. It is currently postulated that disease heterogeneity arises from the same mutational path due to ongoing genomic instability during progression. Thus far, whole-genome-wide studies in PDAC have revealed many genes that might underscore genomic instability, such as BRCA1, BRCA2, PALB2, ATM, ATR, ARID1A, CHEK1/2, RPA1, and MMR genes, with additional candidates likely to be identified going forward [2,3]. Simultaneously, mutational phenomena, such as chromothripsis and polyploidization, have been linked to unstable tumors and aggressive tumor behavior, and since PDAC exhibits a high frequency of both, this raises the possibility that they play a role in its development and progression. However, the landscape of genetic aberrations is considered insufficient to explain pervasive gene/protein expression changes, as well as alterations to cellular function, and finally the clinical heterogeneity among PDAC patients. Therefore, the search of the origin of PDAC heterogeneity has recently been focused on other mechanisms regulated at a post-genetic level. In this context, epigenetic landscape and resulting transcriptome have been used to classify PDAC tumors into specific subtypes, which more accurately correlated with therapeutic response and clinical outcome [2,4,5]. Furthermore, as it is evident that mRNA levels do not necessarily correlate with protein levels, and that proteins carry out the vast majority of cellular functions, a direct search of protein biomarkers for PDAC has also been widely conducted, but still an urgent need for new ones remains. There is now a strong belief that uncovering the mechanisms at the root cause of GIN brings the possibility to identify potential biomarkers and new therapies with more specific targets based on PDAC phenotype [2].

Since GIN acts as a fuel for cell-to-cell variation, targeting the specific genome instability mechanisms may provide a means to arrest tumor evolution and limit disease progression, especially in the early disease. Indeed, tumors often exhibit deregulated expression of specific components of GIN-linked processes; thus, the approaches that prevent genomic instability or take advantage of the cellular defects underlying (or caused by) it may preferentially target tumor over normal cells and are a promising area of pancreatic cancer research—toward more personalized and effective therapies [2,5]. Thus, further searching for aberrantly expressed GIN-related proteins in PDAC tissues and their reciprocal interplays may lead to identifying novel candidate drug targets and/or markers that are informative for the diagnosis and/or prognosis.

Here, we assessed the immunohistochemical expression of the selected components of cell cycle machinery, checkpoint, and DNA repair pathways, namely the ribonucleotide reductase small subunit M2 (RRM2), cyclin F (also called FBXO1 or FBX1), and spindle apparatus coiled-coil protein 1 (Spindly; also referred to as SPDL1, CCDC99) in PDACs and normal peritumoral pancreatic tissues. We also evaluated whether the expression of candidate biomarker proteins may influence the clinicopathological factors and disease outcome. Moreover, the correlation of the combined expression of the studied proteins was also analyzed. The same was also assessed based on the gene expression data for the Cancer Genome Atlas (TCGA) cohort of pancreatic adenocarcinoma (PAC) patients, which were obtained from public sources. To the best of our knowledge, no studies have been reported on the joint expression of these proteins in PDAC samples. Of note, this is also the first study to evaluate cyclin F and SPDL1 immunoexpression in clinical samples of PDAC. Furthermore, only scarce data have been reported on the association of RRM2 protein expression with clinical outcome of pancreatic cancer patients.

2. Materials and Methods

2.1. Patients and Tissue Material

Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) specimens of 68 patients with pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) who underwent a pancreatic resection at the Department of General, Hepatobiliary, and Transplant Surgery, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Torun (Poland), between 2009 and 2019, were retrieved from the archival collections of the Department of Clinical Pathology, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Torun (Poland). Data on patient clinical and pathological parameters were extracted from the electronic medical records, and the histopathological diagnoses were confirmed by the experienced pathologists. The following patient clinical and pathological data were registered if available: gender, age, pathologic T stage (pT), pathologic N stage (pN), distant metastasis (cM), grading, staging, tumor location, vascular invasion (VI), and perineural invasion (PNI). All tumors were reclassified in accordance with the standardized TNM eighth edition classification of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) criteria. Fifty four of the 68 PDAC patients with the adjacent normal pancreatic tissue, together with another 11 specimens from normal peritumoral tissue of other PDAC patients, were obtained to be the control group ($n = 65$). The cohort includes equal number of males and females (34:34). The overall median age was 65 years, with ages ranging from 43 to 81 years. The median age at diagnosis for males was 65 (range: 43–79) and for females 64.5 (range: 44–81). The tumor was located in the head of the pancreas in 60 cases, while it was found in the pancreatic body and tail in five and three patients, respectively. Six patients were stage IA, 18 patients were stage IB, four patients were stage IIA, 20 patients were stage IIB, 12 patients were stage III, and two patients were stage IV. Five patients had well-differentiated, 55 patients had moderately differentiated, and eight patients poorly differentiated PDACs. Postsurgical survival data were available for 62 patients. The final follow-up was ended in January 2020, and median follow-up time was 1139 days. At the time of the last follow-up, 12 patients (19.35%) were still alive, whereas 50 (80.65%) patients were dead. Overall survival (OS) was defined as the time from resection until death of any case or until the last follow-up. Median OS was 393 days. Patient information and tumor characteristics are summarized in Table S1.

2.2. Immunohistochemistry on Tissue Macroarrays

Immunohistochemical (IHC) staining was performed on tissue macroarrays constructed from the representative tumor areas (with at least 80% of tumor cells) and the regions of histologically normal tissue that were adjacent to tumor tissue. One recipient block included five different large tissue fragments from donor paraffin blocks. For each IHC stain, a 3–4 μ m paraffin section was cut from each tissue macroarray block using a manual rotary microtome (Accu-Cut, Sakura, Torrance, CA, USA). After deparaffinization in xylene and rehydration in graded ethanol, heat-induced epitope retrieval was carried

out in either Dako high pH buffer (Dako; Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) or Ventana high pH CC1 buffer (Roche Diagnostics/Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) in the automated PT Link system (Dako; Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). Staining with antibodies for each protein was done in the automated staining apparatus (either in the Dako Autostainer (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) or BenchMark® ULTRA (Roche Diagnostics/Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) using either the Envision Flex Kit (Dako, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA), ultraView Universal DAB Detection Kit (Roche Diagnostics/Ventana, Tucson, AZ, USA), or OptiView Universal DAB Detection Kit (Roche Diagnostics/Ventana, Tucson, AZ, USA). Blocking endogenous peroxidase activity, as well as nonspecific binding sites, was achieved by the incubation with 3% H₂O₂ for 10 min at room temperature (RT) and 3% bovine serum albumin (BSA) for 15 min at RT, respectively. Tissue sections were incubated with primary rabbit polyclonal anti-cyclin F antibody, rabbit polyclonal anti-RRM2 antibody, rabbit polyclonal anti-Spindly antibody, rabbit monoclonal anti-Ki-67 antibody, and mouse monoclonal anti-MSH6 antibody. Tissues sections were then counterstained with Mayer's hematoxylin, followed by bluing reagent (except for RRM2), dehydrated in ascending ethanol, and cleared in a series of xylenes. Finally, the slides were cover-slipped in a Dako mounting medium (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). Details of antibodies and staining conditions used for IHC are collected in Table S2. Known positive control sections were used for each antibody based on the antibody datasheet and the Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org> (accessed on 26 August 2020)), whereas negative controls were obtained by omitting the primary antibody.

2.3. Immunostaining Evaluation

The IHC evaluation of protein expression was performed in the tumor tissue and non-neoplastic tissue taken from the surgical margins adjacent to the tumor, in a blinded fashion, by two independent pathologists using the light ECLIPSE E400 microscope (Nikon Instruments Europe, Amsterdam, The Netherlands).

The immunoexpression of studied proteins was analyzed at 20× original objective magnification and based on the modified Index Remmele–Stegner (IRS) scale, which gives a range of 0–12 as a product of multiplication between the percentage of positively stained cells/areas (0–4) and staining intensity (0–3). The scores for the positive immunoreactivity (PS) for RRM2 and Spindly were categorized as follows: (0) less than 10% of stained cells/area, (1) 11–20% of stained cells/area, (2) 21–50% of stained cells/area, (3) 51–80% of stained cell/area, and (4) equal or more than 81% of stained cells/area. In turn, the intensity score (IS) was defined as (0) negative, (1) low staining, (2) moderate staining, and (3) strong staining. In the case of cyclin F, the positive cell proportion score was classified as follows: (0) <5% positive cells/areas, (1) 5–24% positive cells/areas, (2) 25–49% positive cells/areas, (3) 50–74% positive cells/areas, and (4) ≥75% positive cells/areas, whereas the staining intensity was measured using the same numerical scale as mentioned above. Ki-67 proliferation index was determined by assessing the percentage of positively stained cancer cell nuclei in 1000 neoplastic cells within a hotspot area. For IHC scoring of MSH6 expression, minimal to low staining was graded 0, moderate staining 1, and high staining 2. There were no cases with complete absence of nuclear MSH6 staining within tumor cells.

For a semiquantitative assessment of the level of protein expression, a total IRS score (immunoscore) was used. The protein immunoexpression data were dichotomized into negative (low expression) and positive (high expression) based on the optimal cut-point value defining with the cutp function of the Evaluate Cutpoints application, which is developed using the R language [6]. Cases defined as having high expression were those with scores equal and above the cutoff value, while low expression was associated with scores below the cutoff value. To determine the combined prognostic significance of cyclin F, RRM2, and SPDL1 proteins, the combined variables were examined by adding their respective immunoscores, and their sum was dichotomized (<10.33 or ≥10.33) for purposes of statistical analysis.

2.4. Database Analysis

Gene expression data for the Cancer Genome Atlas (TCGA) and Genotype-Tissue Expression (GTEx) cohorts of patients with pancreatic adenocarcinoma were downloaded through the UCSC Xena Browser (<http://xena.ucsc.edu/> (accessed on 26 August 2020)). The analyzed cohort included 177 pancreatic adenocarcinoma patients (146 of ductal histology) with median overall survival of 614 days and 165 cases of non-cancerous pancreatic tissues. The clinicopathological data were downloaded from the TCGA database using cBioPortal (<http://www.cbioportal.org/> (accessed on 26 August 2020)). Grade 1, 2, 3, and 4 comprised 17.71%, 53.71%, 27.43%, and 1.14%, respectively. Stage I, II, III, and IV comprised 12%, 83.43%, 2.29%, and 2.29%, respectively. RNA-sequencing (RNA-seq) transcriptome data were normalized via DESeq2 normalization. The gene expression data were dichotomized into high level and low level groups according to cutoff points determined with the Evaluate Cutpoints software [6].

2.5. Statistical Analysis

Statistical analysis was carried out with the GraphPad Prism (version 7.01, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) and SPSS software packages (version 26.0, IBM Corporation, Chicago, IL, USA). Data normality was assessed using the Shapiro Wilk test. Continuous variables were compared using the Mann–Whitney test. The association between continuous variables was assessed by the Spearman correlation coefficient (r). Chi-squared test or Fisher's exact test was used to compare the categorical variables. Survival outcomes were evaluated with the Kaplan–Meier method and compared via the log-rank test. Univariate and multivariate survival analyses were performed by Cox proportional hazards model to estimate the hazard ratios (HR) with 95% confidence intervals (CI). Multivariate survival analysis of our cohort of PDAC patients was done after the data were adjusted for the study (low vs. high) and established clinical parameters, including cell differentiation (well vs. moderate + poorly), age (≤ 60 years vs. > 60 years), gender (female vs. male), AJCC pathological stage (stage I + II vs. stage III + IV), vascular invasion (absent vs. present), and perineural invasion (absent vs. present). For multivariate survival analysis of in silico data, covariates were cell differentiation (well vs. moderate + poorly + undifferentiated), T classification (T1 + T2 vs. T3 + T4), and N classification (N0 vs. N1), gender (male vs. female vs. male), and age (≤ 60 years vs. > 60 years). Owing to the strong correlations between CCNE, RRM2, and SPDL1 mRNA expression, we did not include them in the same multivariate model. The level of significance was set at probabilities of $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Analysis of Immunohistochemical and In Silico Gene Expression Data—Association with Clinicopathological Features and Overall Survival

Expression and subcellular distribution of the examined proteins were assessed with IHC on tissue macroarrays containing 68 PDAC specimens and 65 non-tumor adjacent tissues. Of 68 PDACs, 62 cases with both expression level of studied proteins and survival data were available for analysis. The protein expression data of our own cohort were evaluated with regard to clinicopathological features, Ki-67 index, and overall survival of PDAC patients. The analyzed data also included gene expression (mRNA-seq) data of tumor and healthy samples from the TCGA and GTEx, respectively, which were downloaded through the UCSC Xena Browser. The mRNA expression data of TCGA cohort were assessed in relation to clinicopathologic variables, MKI67 mRNA expression (coding for the Ki-67 protein), and overall survival of PAC patients. A total of 177 samples with both expression level of studied markers and survival data were available for analysis. Given that cyclin F, RRM2, and SPDL1 are considered GIN-related proteins, we also analyzed their expression in relationship to tumor aneuploidy score and fraction genome altered (TCGA cohort) or MSH6 protein level (our cohort).

3.1.1. Cyclin F

Of 68 pancreatic ductal adenocarcinomas, 43 (63.24%) demonstrated cyclin F immunoreactivity, while normal pancreatic ductal epithelium was mostly non-reactive ($n = 59/65$; 90.77%). Cyclin F was focally expressed in 31 of PDAC cases, and ubiquitously expressed in 12 samples. The staining pattern was both membranous and cytoplasmic in tumor tissues and, if present, also the same in non-tumor tissues. Cyclin F labeling was granular in many PDAC cases, especially in those with strong staining intensity. Representative photomicrographs illustrating low and high IHC expression of cyclin F in PDAC and adjacent normal tissue are presented in Figure 1A–C.

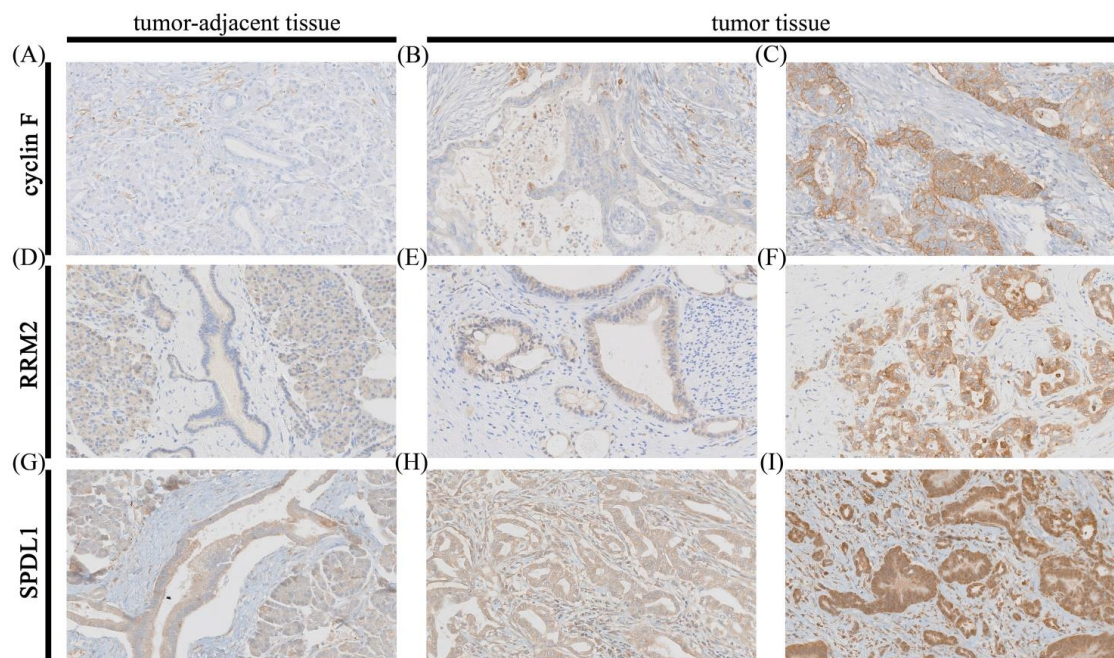


Figure 1. Representative images of immunohistochemical expression of cyclin F, RRM2, and SPDL1 in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and adjacent tissue (control). Cyclin F staining in control (A); weak staining; (B) and strong staining; (C) for cyclin F in PDAC; RRM2 staining in control; (D); weak staining; (E) and strong staining; (F) for RRM2 in PDAC; SPDL1 staining in control; (G); weak staining; (H) and strong staining; (I) for SPDL1 in PDAC. Original magnification 20 $\times$.

Cyclin F expression was obviously increased in PDAC tissues compared with non-malignant tissues adjacent to the tumor area ($p < 0.0001$; Figure 2A). Correspondingly, the TCGA dataset showed that the expression of CCNF mRNA in PAC tissues was significantly up-regulated as compared with normal pancreatic tissues ($p < 0.0001$; Figure 2B). By establishing a cut point at ≥ 6.67 and ≥ 9.17 , overexpression of cyclin F was found in six (8.82%) patients of our cohort and in 102 (57.63%) patients of TCGA cohort.

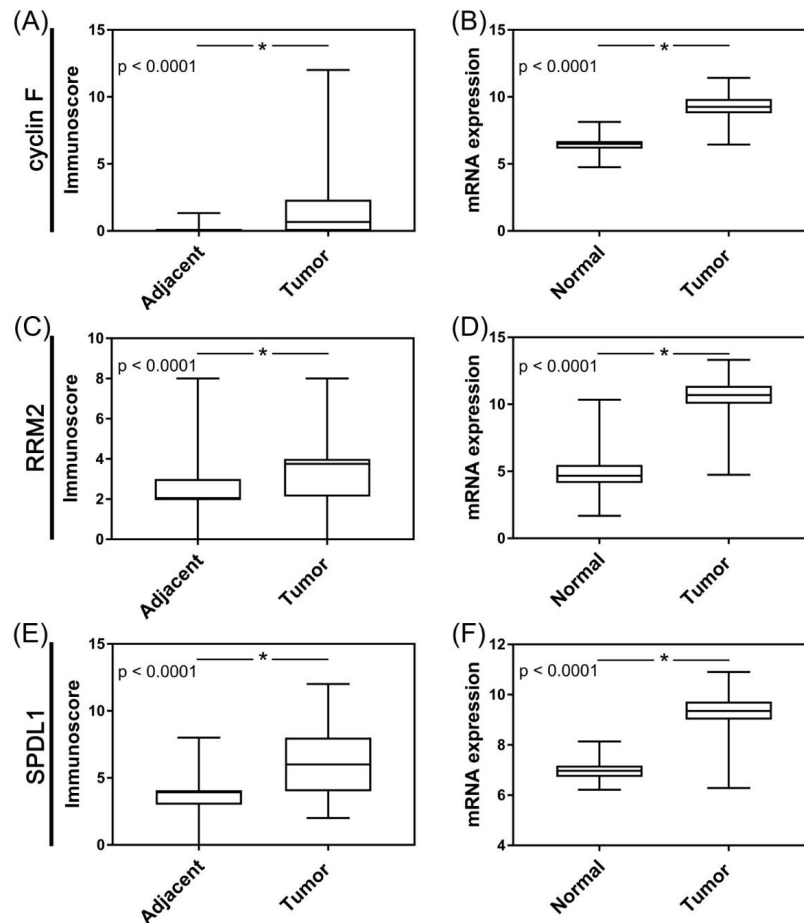


Figure 2. Protein and mRNA expression of cyclin F (CCNF), RRM2, and SPD1 in pancreatic adenocarcinoma. (A,C,E) protein expression data were obtained by in-house immunohistochemistry; X axis of the plot represents histologically normal tissue that was adjacent to tumor tissue vs. cancer tissue, Y axis represents immunoscores (IRS). (B,D,F) mRNA expression data were retrieved from the Cancer Genome Atlas (TCGA); X axis of the plot represents normal vs. cancer tissue; Y axis represents normalized expression of mRNAs. The top and bottom of the error bars represent the maximum and minimum values of data, respectively. Asterisk indicates statistical significance ($p < 0.05$, Mann–Whitney test).

Overexpression of cyclin F protein occurred significantly more frequently in PNI-negative tumors than PNI-positive tumors (22.73% vs. 2.38%; $p = 0.02$). No other relationships between cyclin F protein expression and clinicopathologic features were found (Table 1). There was also no significant correlation between cyclin F expression and Ki-67 index ($r = -0.08$; $p = 0.51$) or MSH6 expression ($r = -0.12$; $p = 0.34$). In turn, CCNF mRNA overexpression was markedly more frequent in intermediate (61.70%) and high grade (66.00%) tumors than low grade ones (32.26%; $p = 0.01$), in locally advanced (T3-T4) tumors (62.07%) than less invasive (T1-T2) tumors (40.00%; $p = 0.04$), and in stage II-IV tumors (61.04%) than stage I tumors (38.10%; $p = 0.06$). The details on this analysis are presented in Table 2. Furthermore, CCNF expression was significantly positively correlated with aneuploidy score ($r = 0.32$; $p < 0.0001$), fraction of genome altered ($r = 0.35$; $p < 0.0001$), as well as MKI67 expression ($r = 0.82$; $p < 0.0001$).

Table 1. Association of cyclin F, RRM2, SPDL1, and the clinicopathological features in our cohort of PDAC patients ($n = 68$).

Variables	<i>n</i> (%)	Cyclin F Expression		<i>p</i>	RRM2 Expression		<i>p</i>	SPDL1 Expression		<i>p</i>
		Low <i>n</i> = 62	High <i>n</i> = 6		Low <i>n</i> = 17	High <i>n</i> = 51		Low <i>n</i> = 40	High <i>n</i> = 28	
Age (years)										
≤60	29 (42.65)	28 (96.55)	1 (3.45)	0.23	7 (24.14)	22 (75.86)	>0.99	19 (65.52)	10 (34.48)	0.31
>60	39 (57.35)	34 (87.18)	5 (12.82)		10 (25.64)	29 (74.36)		18 (50.00)	18 (50.00)	
Gender										
Male	34 (50.00)	30 (88.24)	4 (11.76)	0.67	7 (20.59)	27 (79.41)	0.58	20 (55.82)	14 (44.18)	>0.99
Female	34 (50.00)	32 (94.12)	2 (5.88)		10 (29.41)	24 (70.59)		20 (55.82)	14 (44.18)	
Grading										
G1	5 (7.35)	4 (80.00)	1 (20.00)	0.80	1 (20.00)	4 (80.00)	0.67	2 (40.00)	3 (60.00)	0.45
G2	55 (80.88)	51 (92.73)	4 (7.27)		13 (23.64)	42 (76.36)		32 (58.18)	23 (41.82)	
G3	8 (11.77)	7 (87.50)	1 (12.50)		3 (37.50)	5 (62.50)		6 (75.00)	2 (25.00)	
pT status										
T1-T2	53 (84.13)	50 (94.34)	3 (5.66)	0.51	13 (24.53)	40 (75.47)	0.71	34 (64.15)	19 (35.85)	0.18
T3-T4	10 (15.87)	9 (90.00)	1 (10.00)		3 (30.00)	7 (70.00)		4 (40.00)	6 (60.00)	
pN status										
N0	30 (45.46)	28 (93.33)	2 (6.67)	0.68	8 (26.67)	22 (73.33)	>0.99	15 (50.00)	15 (50.00)	0.21
N1-N2	36 (54.54)	32 (88.89)	4 (11.11)		9 (25.00)	27 (75.00)		24 (66.67)	12 (33.33)	
TNM stage										
I	24 (38.71)	23 (95.83)	1 (4.17)	0.56	5 (20.83)	19 (79.17)	0.56	12 (50.00)	12 (50.00)	0.46
II	24 (38.71)	21 (87.50)	3 (12.50)		8 (33.33)	16 (66.67)		16 (66.67)	8 (33.33)	
III-IV	14 (22.58)	13 (92.86)	1 (7.14)		3 (21.43)	11 (78.57)		9 (64.29)	5 (35.71)	
Location										
head	60 (88.24)	55 (91.67)	5 (8.33)	0.54	15 (25.00)	45 (75.00)	>0.99	35 (58.33)	25 (41.67)	>0.99
Body-tail	8 (11.76)	7 (87.50)	1 (12.50)		2 (25.00)	6 (75.00)		5 (62.50)	3 (37.50)	
VI										
Absent	39 (72.22)	33 (84.62)	6 (15.38)	0.17	13 (33.33)	26 (66.67)	0.51	18 (46.15)	21 (53.85)	0.23
Present	15 (27.78)	15 (100.0)	0 (0.0)		3 (20.00)	12 (80.00)		10 (66.67)	5 (33.33)	
PNI	22 (34.38)	17 (77.27)	5 (22.73)	0.02	6 (27.27)	16 (72.73)	>0.99	10 (45.45)	12 (54.55)	0.11
Absent	42 (65.62)	41 (97.62)	1 (2.38)		11 (26.19)	31 (73.81)		28 (66.67)	14 (33.33)	
Present										
Abbreviation: PDAC—pancreatic ductal adenocarcinoma; VI—vascular invasion; PNI—perineural invasion. Significant <i>p</i> -values (<i>p</i> < 0.05) are indicated in bold.										

Abbreviation: PDAC—pancreatic ductal adenocarcinoma; VI—vascular invasion; PNI—perineural invasion. Significant p -values ($p < 0.05$) are indicated in bold.

Table 2. Association of CCNF, RRM2, and SPDL1 and the clinicopathological features in TCGA cohort of PAC patients ($n = 177$).

Variables	<i>n</i> (%)	CCNF Expression		<i>p</i>	RRM2 Expression		<i>p</i>	SPDL1 Expression		<i>p</i>
		Low <i>n</i> = 75	High <i>n</i> = 102		Low <i>n</i> = 115	High <i>n</i> = 62		Low <i>n</i> = 133	High <i>n</i> = 44	
Gender										
Male	97 (54.80)	44 (45.36)	53 (54.64)	0.45	67 (69.07)	30 (30.93)	0.27	73 (75.26)	24 (24.74)	>0.99
Female	80 (45.20)	31 (38.75)	49 (61.25)		48 (60.00)	32 (40.00)		60 (75.00)	20 (25.00)	
Age										
≤60	59 (33.33)	26 (44.07)	33 (55.93)	0.75	39 (66.10)	20 (33.90)	0.87	44 (74.58)	15 (25.42)	>0.99
>60	118 (66.67)	49 (41.53)	69 (58.47)		76 (64.41)	42 (35.59)		89 (75.42)	29 (24.58)	
Grading										
G1	31 (17.71)	21 (67.74)	10 (32.26)	0.01	24 (77.42)	7 (22.58)	0.26	27 (87.10)	4 (12.90)	0.25
G2	94 (53.71)	36 (38.30)	58 (61.70)		60 (63.83)	34 (36.17)		69 (73.40)	25 (26.60)	
G3-G4	50 (28.57)	17 (34.00)	33 (66.00)		30 (60.00)	20 (40.00)		36 (72.00)	14 (28.00)	

Table 2. Cont.

Variables	n (%)	CCNF Expression		p	RRM2 Expression		p	SPDL1 Expression		p
		Low n = 75	High n = 102		Low n = 115	High n = 62		Low n = 133	High n = 44	
pT status										
T1-T2	30 (17.14)	18 (60.00)	12 (40.00)	0.04	22 (73.33)	8 (26.67)	0.30	26 (86.67)	4 (13.33)	0.11
T3-T4	145 (82.86)	55 (37.93)	90 (62.07)		91 (62.76)	54 (37.24)		105 (72.41)	40 (27.59)	
pN status										
N0	49 (28.49)	24 (48.98)	25 (51.02)	0.24	34 (69.39)	15 (30.61)	0.48	39 (79.59)	10 (20.41)	0.44
N1	123 (71.51)	48 (39.02)	75 (60.98)		77 (62.60)	46 (37.40)		90 (73.17)	33 (26.83)	
TNM stage										
I	21 (12)	13 (61.90)	8 (38.10)	0.06	15 (71.43)	6 (28.57)	0.63	18 (85.71)	3 (14.29)	0.29
II-IV	154 (88)	60 (38.96)	94 (61.04)		98 (63.64)	56 (36.36)		113 (73.38)	41 (26.62)	

Abbreviation: PAC—pancreatic adenocarcinoma; TCGA—the Cancer Genome Atlas. Significant *p*-values (*p* < 0.05) are indicated in bold.

Kaplan–Meier survival curves revealed a significant association between high CCNF mRNA expression and a shorter survival of patients with PAC (518 days vs. 1332 days; *p* = 0.0001; Figure 3A). In contrast, patients whose PDACs expressed high protein level of cyclin F tended to survive longer than those expressing low level of this protein (606 days vs. 314 days; *p* = 0.14; Figure 3B).

In the univariate Cox proportional hazards model, CCNF mRNA expression was significantly associated with a poor prognosis (HR = 2.4, 95% CI 1.52–3.80; *p* = 0.0002; Table 3), while cyclin F protein expression with better prognosis, but without statistical significance (HR = 0.47, 95% CI 0.17–1.32; *p* = 0.15; Table 4). In the multivariate Cox proportional hazards model, mRNA (adjusted HR = 1.66, 95% CI 1.04–2.67; *p* = 0.03) but not protein (adjusted HR = 0.37, 95% CI 0.10–1.43; *p* = 0.15) expression of cyclin F was an independent prognostic factor for OS (Tables 3 and 4, respectively).

Table 3. Univariate and multivariate Cox proportional hazards models for OS of TCGA patients with PAC (*n* = 177).

Variable	Univariate Analysis				Multivariate Analysis: CCNF				Multivariate Analysis: RRM2				Multivariate Analysis: SPDL1			
	HR	95% CI		p	HR	95% CI		p	HR	95% CI		p	HR	95% CI		p
		Lower	Upper			Lower	Upper			Lower	Upper			Lower	Upper	
CCNF	2.40	1.52	3.80	0.0002	1.66	1.04	2.67	0.03	-	-	-	-	-	-	-	-
RRM2	2.39	1.58	3.63	<0.0001	-	-	-	-	1.94	1.27	2.97	0.002	-	-	-	-
SPDL1	2.80	1.81	4.31	<0.0001	-	-	-	-	-	-	-	-	2.39	1.53	3.75	0.0001
age	1.41	0.90	2.21	0.13	1.27	0.80	2.03	0.32	1.24	0.78	1.99	0.36	1.24	0.78	1.98	0.37
gender	0.81	0.54	1.23	0.33	0.86	0.56	1.32	0.48	0.86	0.56	1.32	0.50	0.79	0.52	1.21	0.28
grade	2.18	1.15	4.13	0.02	1.49	0.77	2.89	0.24	1.69	0.88	3.24	0.12	1.90	0.98	3.69	0.06
pN	2.10	1.25	3.52	0.005	1.90	1.09	3.30	0.02	1.86	1.07	3.25	0.03	1.93	1.11	3.38	0.02
pT	2.21	1.14	4.28	0.02	1.37	0.67	2.81	0.39	1.44	0.70	2.97	0.32	1.20	0.58	2.50	0.62
stage	0.74	0.23	2.34	0.60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: HR—hazard ratio; CI—confidence interval; OS—overall survival; PAC—pancreatic adenocarcinoma; TCGA—the Cancer Genome Atlas. *p*-values adjusted for age, gender, histologic grade, pN, pT, and each marker separately. “-” indicates variable was not included in multivariate analysis. Significant *p*-values (*p* < 0.05) are indicated in bold.

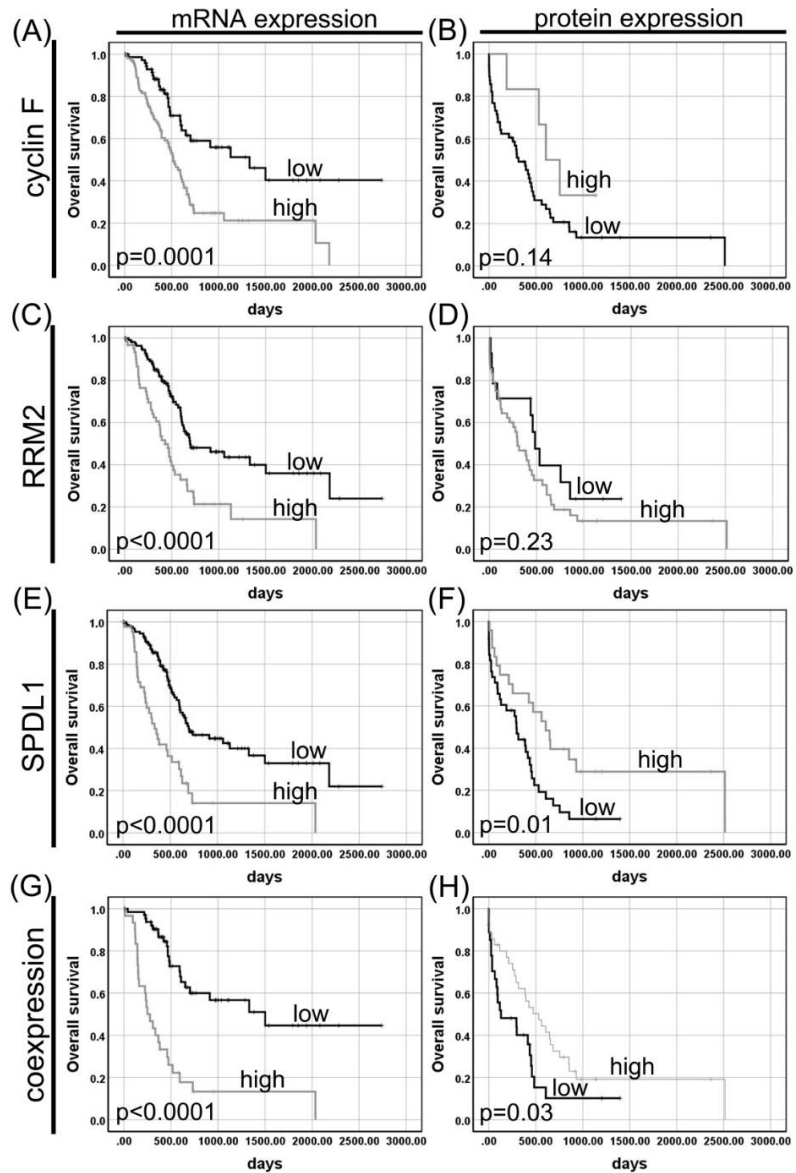


Figure 3. Kaplan–Meier curves for overall survival of pancreatic adenocarcinoma patients stratified by (A) cyclin F (CCNF) mRNA expression; (B) cyclin F protein expression; (C) RRM2 mRNA expression; (D) RRM2 protein expression; (E) SPDL1 mRNA expression; (F) SPDL1 protein expression; (G) combined CCNF/RRM2/SPDL1 mRNA expression; (H) combined cyclin F RRM2/SPDL1 protein expression. Protein and mRNA expression data were obtained by in-house immunohistochemistry and the Cancer Genome Atlas (TCGA) database, respectively. *p* values were calculated using the log-rank test.

Table 4. Univariate and multivariate Cox proportional hazards models for OS of PDAC patients ($n = 62$).

Variable	Univariate Analysis				Multivariate Analysis			
	HR	95% CI		<i>p</i>	HR	95% CI		<i>p</i>
		Lower	Upper			Lower	Upper	
Cyclin F	0.47	0.17	1.32	0.15	0.37	0.10	1.43	0.15
RRM2	1.52	0.76	3.06	0.24	1.07	0.45	2.56	0.87
SPDL1	0.45	0.24	0.83	0.01	0.36	0.16	0.80	0.01
age	1.38	0.76	2.48	0.29	2.30	1.06	5.02	0.04
gender	1.06	0.60	1.85	0.85	1.12	0.52	2.40	0.78
grade	1.43	0.44	4.61	0.55	1.11	0.20	6.07	0.91
pN	1.07	0.60	1.91	0.81	-	-	-	-
pT	0.91	0.41	2.03	0.81	-	-	-	-
stage	1.87	0.96	3.65	0.07	2.44	1.06	5.62	0.04
PNI	1.80	0.96	3.35	0.07	1.40	0.61	3.20	0.43
VI	2.44	1.24	4.81	0.01	2.32	0.97	5.54	0.06

Abbreviations: HR—hazard ratio; CI—confidence interval; OS—overall survival; PDAC—pancreatic ductal adenocarcinoma; PNI—perineural invasion; VI—vascular invasion *p*-values adjusted for age, gender, histologic grade, tumor stage, PNI, VI, and study. “-” indicates variable was not included in multivariate analysis. Significant *p*-values ($p < 0.05$) are indicated in bold.

3.1.2. RRM2

RRM2 immunostaining was detected on 65/68 (95.59%) and 58/65 (89.23%) of the PDACs and adjacent non-neoplastic pancreatic tissues, respectively. RRM2 labeling was membranous–cytoplasmic in the vast majority of cancer cells, whereas it was mainly restricted to the cytoplasm of non-tumor cells. Cytoplasmic staining was accompanied by nuclear staining in several PDAC cases (6/68; 8.82%) and in few cells in the area of normal pancreatic tissue (2/65; 3.07%). This staining pattern had usually one degree higher intensity than the predominant pattern. Figure 1D–F presents sample IHC stains for patients with low- and high-expression profiles of RRM2 in PDAC and adjacent normal tissue.

As shown in Figure 2C, expression of RRM2 protein was significantly higher in PDAC tissues compared to normal peritumoral pancreatic tissues ($p < 0.0001$). Likewise, RRM2 mRNA was significantly elevated in pancreatic adenocarcinoma cells comparatively to their normal counterparts ($p < 0.0001$; Figure 2D). Cutoff values of 2.5 and 11.09 were used for tumor classification and patient dichotomizing into two groups according to RRM2 protein and mRNA levels, respectively. Based on these, the protein and mRNA levels of RRM2 were found to be upregulated (high expression groups) in 51 (75%) and 62 (35.03%) tumor cases of our cohort and TCGA cohort, respectively.

RRM2 protein and mRNA did not cosegregate with any clinicopathologic variables assessed ($p > 0.05$; Tables 1 and 2, respectively). Moreover, there was no correlation between RRM2 protein level and Ki-67 index ($r = 0.014$; $p = 0.91$) or MSH6 expression ($r = 0.09$; $p = 0.45$), but the RRM2 mRNA level was significantly positively correlated with aneuploidy score ($r = 0.31$; $p < 0.0001$), fraction genome altered ($r = 0.33$; $p < 0.0001$), as well as MKI67 expression ($r = 0.79$; $p < 0.0001$).

Kaplan–Meier survival analysis of data from TCGA showed that PAC patients with increased RRM2 mRNA had a shorter OS. The median survival times were 430 and 695 days for high and low expression groups, respectively ($p < 0.0001$; Figure 3C). At univariate Cox analysis, poorer OS was prominently correlated with high RRM2 expression (HR = 2.39, 95% CI 1.58–3.63; $p < 0.0001$; Table 3). When examined in a multivariate analysis, high RRM2 mRNA persisted as a negative prognostic factor for OS (HR = 1.94, 95% CI 1.27–2.97; $p = 0.002$; Table 3). Conversely, high or low expression of RRM2 protein made no significant differences in predicting the overall survival of PDAC patients ($p > 0.05$; Table 4). The

median survival time for the patients with high or low RRM2 expression was 297 days and 483 days, respectively ($p = 0.23$; Figure 3D).

3.1.3. SPDL1 (Spindly)

A total of 68 PDAC cases were labeled immunohistochemically with the SPDL1 antibody. In tumor tissues, SPDL1 was mainly detected in the cytoplasm, but sporadic membranous–cytoplasmic staining pattern occurred, while the adjacent non-cancerous tissues showed solely cytoplasmic immunoreactivity. Representative images presenting low and high IHC expression of SPDL1 protein in PDAC and adjacent normal tissue are depicted in Figure 1G–I.

Both SPDL1 protein and mRNA levels were markedly up-regulated in tumor tissues relative to non-cancer normal tissues ($p < 0.0001$; Figure 2E,F, respectively). Overexpression of SPDL1 protein (cut point at ≥ 8) was detected in 28 (41.18%) PDAC cases; the remainder (40/68; 58.82%) expressed low levels of this protein. High SPDL1 mRNA levels (cut point at ≥ 9.72) were found in 44 (24.86%) PDAC cases, whereas low expression in the remaining 133 cases (75.14%).

The expression of SPDL1 protein tended to be elevated in PNI-negative cases compared to positive ones ($p = 0.11$). There was no other association between Spindly protein and any of the other clinicopathological traits (Table 1), or Ki-67 index ($r = 0.06$; $p = 0.64$). However, SPDL1 protein correlated positively with MSH6 expression ($r = 0.26$; $p = 0.04$). In the TCGA cohort, high mRNA level of SPDL1 was more frequently seen in T3–T4 patients than T1–T2 ones, but without reaching statistical significance ($p = 0.11$; Table 2). In addition, the expression of SPDL1 mRNA was positively correlated with aneuploidy score ($r = 0.29$; $p = 0.0003$), fraction genome altered ($r = 0.15$; $p = 0.04$), and *MKI67* expression ($r = 0.59$; $p < 0.0001$), but not with other features of PAC patients, such as gender, histological grade, pT, pN, or TNM stage ($p > 0.05$; Table 2).

A Kaplan–Meier survival analysis of the TCGA cohort revealed that the high SPDL1 expression group showed a significantly shorter median OS than the low expression group (695 days vs. 334 days; $p < 0.0001$; Figure 3E). In the univariate Cox proportional hazards model, *SPDL1* mRNA expression was significantly associated with a poor prognosis (HR = 2.80, 95% CI 1.81–4.31; $p < 0.0001$; Table 3). In the multivariate Cox analysis, after adjusting for clinical factors, SPDL1 remained an independent poor prognostic factor for OS (HR = 2.39, 95% CI 1.53–3.75; $p = 0.0001$; Table 3).

Contradictory to mRNA expression, a Kaplan–Meier analysis of our cohort showed that high expression of SPDL1 protein was significantly associated with better OS (294 days vs. 606 days; $p = 0.01$; Figure 3F). The favorable prognostic effect of SPDL1 expression was also observed in the univariate Cox analysis (HR = 0.45, 95% CI 0.24–0.83; $p = 0.01$; Table 4). In the multivariate analysis, the Cox proportional hazards model was applied to evaluate whether the SPDL1 protein showed an independent prognostic significance. According to this analysis, overexpression of SPDL1 protein was found to be an independent predictor of improved OS after adjustment for age at diagnosis, gender, histologic grade, tumor stage, VI and PNI, and study (HR = 0.36, 95% CI 0.16–0.80; $p = 0.01$; Table 4).

3.2. Coexpression of Cyclin F, RRM2, and SPDL1 in Pancreatic Adenocarcinoma and Its Impact on Patient Survival

There were highly significant correlations between mRNA levels of all examined markers in PAC tissues of the TCGA cohort. In more detail, Spearman correlation coefficient statistics revealed strong positive correlations between *CCNF* and *RRM2* ($r = 0.76$; $p < 0.0001$), *CCNF* and *SPDL1* ($r = 0.60$; $p < 0.0001$), as well as between *SPDL1* and *RRM2* ($r = 0.64$; $p < 0.0001$). Importantly, patients whose PAC simultaneously expressed *CCNF*, *RRM2*, and *SPDL1* at high level had dramatically shorter survival time compared to those patients whose tumor tissue expressed all these markers at low level (250 days vs. 1502 days; $p < 0.0001$; Figure 3G; HR = 4.64, 95% CI 2.61–8.27; Table 5), or those patients whose PACs expressed only one of these markers at high level ($p = 0.04$). Furthermore, overexpression of the combined variable of *CCNF*, *RRM2*, and *SPDL1* was the most significant independent

prognostic marker for a worse OS after adjustment for age at diagnosis, gender, histologic grade, pT, and pN (HR = 3.51, 95% CI 1.93–6.36; $p < 0.0001$; Table 5).

Table 5. Univariate and multivariate Cox proportional hazards models for OS of TCGA patients with PAC ($n = 99$).

Variable	Univariate Analysis				Multivariate Analysis			
	HR	95% CI		p	HR	95% CI		p
		Lower	Upper			Lower	Upper	
CCNF + RRM2 + SPDL1	4.64	2.61	8.27	<0.0001	3.51	1.93	6.36	<0.0001
age	1.62	0.87	3.03	0.13	1.34	0.70	2.55	0.37
gender	0.94	0.53	1.66	0.83	1.22	0.67	2.23	0.51
grade	3.66	1.51	8.86	0.004	2.89	1.14	7.34	0.03
pN	2.74	1.28	5.91	0.01	2.69	1.05	6.91	0.04
pT	3.20	1.25	8.18	0.02	1.26	0.38	4.16	0.70

Abbreviations: HR, hazard ratio; CI, confidence interval; OS—overall survival; PAC—pancreatic adenocarcinoma; TCGA—the Cancer Genome Atlas p-values adjusted for age, gender, histologic grade, pN, pT, and coexpression of studied markers. Significant p -values ($p < 0.05$) are indicated in bold.

We also compared the IRS scores between the three markers in our cohort, and none of the proteins were found to significantly correlate with one another. The Spearman correlation coefficient (r) was -0.10 , -0.20 , and 0.08 between cyclin F and RRM2 ($p = 0.43$), cyclin F and SPDL1 ($p = 0.11$), and SPDL1 and RRM2 ($p = 0.54$), respectively. We next examined the prognostic significance of the combined cyclin F, RRM2, and SPDL1 protein profile. Although there was a statistically significant survival difference between the two groups (129 days vs. 531 days; $p = 0.03$; Figure 3H), these three proteins in combination were not able to better predict patient survival than each of the proteins individually ($p = 0.21$).

4. Discussion

Although the field of oncology has recently experienced considerable changes with the cancer biomarkers and personalized cancer therapy, their clinical use in the management of PDAC patients lags behind other solid tumors. A diverse array of PDAC markers in terms of their diagnostic, predictive, and prognostic potential has been proposed, but to date, no clinical benefit of these has been realized, therefore further studies are needed. Defective cell cycle machinery, mitotic checkpoints, and DNA repair are features of genomic instability, and represent opportunities for finding novel biomarkers, as well as therapeutic targets, since many of the elements of GIN-related processes correlate with cancer cell growth, survival, and metastasis in both in vitro and in vivo preclinical models, while they are differentially expressed and/or have prognostic value for patients with various cancer types [3,7]. With the aim of a joint global effort to find novel biomarkers and therapeutic targets for this deadly tumor, in the present study, we evaluated the immunohistochemical expression of three GIN-related proteins: cyclin F, RRM2, and SPDL1 with regard to clinicopathological characteristics and survival outcomes of PDAC patients. We also compared the protein expression detected in our cohort with mRNA-seq data of PAC cases obtained from public sources.

Cyclin F is the founding member of the F-box family of proteins, which constitute the substrate recognition subunits of SCF (Skp1–Cul1–F-box protein) ubiquitin ligase complexes. This is an orphan cyclin that oscillates during the cell cycle, peaking in G2, but it does not bind or activate any cyclin-dependent kinases (CDKs). Cyclin F has been implicated in the control of centrosome replication, mitotic spindle organization, and cellular dNTP pools through targeting CP110, NuSAP1, and RRM2, respectively, for proteasome-

mediated degradation. Based on these findings, its role in controlling genome integrity through ubiquitin-mediated proteolysis has been proposed [8–12]. Despite its crucial nature and role in mitotic fidelity, the expression of this protein with respect to its prognostic significance in human cancers has hardly been studied, and most available articles, including our recent one [13], are based on *in silico* transcriptome data, but to our knowledge, none of the previous ones concerned the pancreatic cancer. Here, the analysis of TCGA dataset of 177 pancreatic adenocarcinoma patients showed that mRNA expression levels of CCNF were significantly elevated in 57.63% of PDACs and associated with more advanced and aggressive tumors and poor patient survival. Specifically, multivariate Cox analysis revealed that CCNF mRNA expression was an independent predictor of worse OS after adjustment for histologic grade, tumor status, nodal status, age, and gender (HR = 1.66, 95% CI 1.04–2.67; $p = 0.03$). In agreement with our studies, CCNF has been recently identified as an upregulated gene in primary pancreatic tumors from *Ela-c-myc* transgenic mice, compared to both normal pancreas and liver metastatic lesions [14]. In terms of clinical significance, the results obtained here are in line with our recent non-pancreas cancer *in silico* study, in which overexpression of CCNF mRNA was associated with a worse survival of melanoma patients [13]. Based on publicly available datasets, Liu et al. have also shown that CCNF was positively correlated with the types of highly malignant and poor-prognostic breast cancer (BC), which had the features of low differentiation, high invasiveness, easy to metastasize, and relapse. Furthermore, they found that increased expression of CCNF mRNA was associated with worse OS, relapse free survival (RFS), distant metastasis free survival (DMFS), and post progression survival (PPS), and further demonstrated the elevated levels of cyclin F protein in BC tissues using IHC [15]. Similar studies of Wang et al. [16] have also revealed that high mRNA expression levels of CCNF denote a poor prognosis in BC patients, whereas Li et al. [17] have reported corresponding findings for hepatocellular carcinoma (HCC). Conversely, CCNF mRNA levels correlated with better survival outcome in colorectal cancer (CRC), as it has been presented by Chen et al. [18] based on the *in silico* analysis. In contrast to the study by Li et al. [17], Fu et al. [19] have provided evidence for high expression of cyclin F mRNA and protein being correlated with better survival of HCC patients. Here, we also observed that patients with tumors that express more cyclin F protein survived longer than those with its low expression, though our results were not statistically significant (606 days vs. 314 days; $p = 0.14$). A similar controversy as to the functional portrait of this atypical cyclin has been presented in the experimental studies. Given the characteristics of the substrates of SCF-cyclin F, the latter might be expected to act as a tumor suppressor, and most experimental studies have recently supported this thesis; however, those supporting its pro-tumorigenic activity also exist [12,20–22]. Although overexpression correlating with a poor prognosis fits better to the best known role of cyclins in human malignancies, it is also well documented that these and virtually all cancer regulatory proteins may manifest oncogenic features in one situation but tumor-suppressive features in another [23]. Therefore, we cannot rule out that the discordance between studies may be simply attributed to disparities in tumor types/subtypes, genetic and biological heterogeneity, and sample sets (e.g., ethnic background, sample size, uneven distribution of the clinicopathological data), whereby some of these traits may be also the reason of discordance between our *in silico* and IHC studies. There is also possibility that cyclin F protein and mRNA may differentially modulate the clinical outcomes of PDAC patients, as it has been previously seen for other markers and tumors [24,25]. However, we have to bear in mind that cyclin F protein expression was not significantly associated with survival in our cohort, thus limiting our hypothesis of the opposite role of cyclin F protein vs. mRNA in pancreatic adenocarcinoma. This could be because the study population may have been underpowered, as a trend towards better survival was seen in high-expressing cyclin F tumors. To further verify our assumption, cyclin F expression should be evaluated in independent, larger PDAC cohort, with protein and mRNA measurement performed simultaneously on the same cases.

RRM2 is essential for DNA synthesis and repair, as it insures the activity of ribonucleotide reductase (RR). This is the only known enzyme that catalyzes the reduction of NDPs to their corresponding deoxyribonucleoside diphosphates (dNDPs) and then to deoxynucleoside triphosphates (dNTPs)—the building blocks of DNA. Apart from RRM2, another small subunit (P53R2/RRM2B) and one large subunit (RRM1) have been identified as the components of human RR. Altered expression levels of the functional enzyme have been implicated in carcinogenesis, as it is highly acknowledged that imbalanced dNTP pools can result in genomic instability and cell-cycle progression, thereby facilitating cancer cell proliferation. As far as we know, apart from the current report, only several other studies to date have assessed the clinical value of RRM2 protein [26,27] or mRNA [28–31] in pancreatic cancer cohorts, and these studies have varied with regard to the impact of RRM2 on patient survival. In terms of protein IHC staining, Fisher et al. [26] have shown that high tumor RRM2 expression was an independent negative prognostic factor for early recurrence and decreased survival in patients with early-stage PDAC, both when analyzing the entire cohort ($n = 95$) and the subset of patients receiving adjuvant therapy ($n = 74$). Our IHC results are more consistent with the conclusions of the Xie study [27], who have shown no prognostic value of RRM2 immunoexpression in 117 patients with resectable pancreatic adenocarcinoma. In the cited study, this conclusion stayed also true for a subpopulation of 44 patients subsequently treated with adjuvant gemcitabine after tumor resection [27]. Importantly, based on the analysis of the TCGA data, we identified RRM2 mRNA expression as an independent negative prognostic factor for OS in pancreatic adenocarcinoma patients. By in silico analysis of microarray-based gene expression data, Jin et al. [32] have reported similar poor prognostic effect of RRM2 for PDAC, but with regard to disease-free survival (DFS; univariate Kaplan–Meier analysis). Correspondingly, in the cohort study by Itoi et al. [28], high transcript expression of RRM2 in 31 fine-needle aspiration biopsy specimens of advanced stage pancreatic cancer significantly correlated with a poor patient survival and resistance to gemcitabine. This was further supported by the Fujita and coworkers study [30], where 70 patients with early stage pancreatic adenocarcinoma were included, whereby 40 of them were treated with gemcitabine. In both studied groups, decreased RRM2 mRNA expression was significantly associated with increased OS and progression-free survival (PSF). On the other hand, Giovannetti et al. [29], as well as Sierzega et al. [31], failed to show any significant correlation of RRM2 mRNA with the survival times of PDAC patients. Of note, a direct comparison of mRNA expression data between our study, the Jin study, and other above cited reports is limited by the fact that they originate from different quantification methods, i.e., RNA-seq, microarray, and qPCR, respectively, the results of which are not necessarily concordant. Furthermore, these studies included cases with different stages of pancreatic adenocarcinoma. Indeed, as one of the possible explanations for the apparent disagreements, it has recently been proposed that the prognostic implications of the expression profile of RRM2 could depend on the stage of pancreatic cancer [27]. Although it still cannot be ruled out, it is worth noting that Fisher et al. [26] and Xie et al. [27] exclusively evaluated patients with early-stage disease, both using immunohistochemistry, and they received inconsistent results. The majority of the patients studied in our cohort study had stage I and II disease (77.42%), although patients with stage III and IV disease were also included (22.55%). In a subset analysis limited to patients with early-stage PDAC, we were still unable to find a significant relation between RRM2 protein expression and patient survival (Figure S1). Unfortunately, our numbers were too small for reliable statistical calculation to find evidence of the marker being prognostic in late-stage disease. In addition, the technical issues related to IHC assay with a possible impact on RRM2 assessment include antibody clones, staining patterns, scoring systems, and cutoff points, as these varied substantially between our studies and those of Xie et al. and Fisher et al. Standardization of staining and scoring protocols for RRM2 IHC along with its further testing in large cohorts that are evenly distributed in terms of tumor pathological features seem crucial to establish the clinical significance of RRM2 protein in pancreatic adenocarcinoma and other tumors as well.

Spindly is a relatively recently identified regulator of mitosis [33], which has no confirmed role in cancer. It is a kinetochore-specific adaptor for cytoplasmic dynein and plays a role in chromosome alignment and spindle assembly checkpoint (SAC) signaling. Recent studies have shown that depletion of Spindly by RNAi resulted in an extensive chromosome missegregation [34,35]. In turn, Silva and co-workers [36] have hypothesized the link between high levels of this protein, CIN, and pathogenesis of oral squamous cell carcinoma (OSCC). In the recent *in silico* study, SPDL1 has been identified as one of the key candidate genes differentially expressed in PDAC, whereby the upregulation of its mRNA was significantly associated with a worse OS and DFS, as well as the advanced tumor stage. In the cited article of Tian et al. [37], the bioinformatics data was further confirmed in a small cohort of six PDAC patients using qRT-PCR. This study is in partial agreement with our *in silico* analysis, in which overexpression of SPDL1 mRNA was independently associated with a poor OS of PAC patients (adjusted HR = 2.40, 95% CI 1.53–3.75; $p < 0.0001$); however, it was not significantly correlated with any of the established clinicopathological features ($p > 0.05$), albeit there was a trend towards its higher prevalence of in pT3–pT4 tumors than pT2 and pT3 tumors ($p = 0.11$). In contrast to our results and those of Tian et al., Kodama and coworkers have shown that reduced SPDL1 mRNA expression levels are significantly associated with shorter OS in CRC patients (*in silico* analysis) [38].

In the present study, contradictory to mRNA expression, it was low SPDL1 protein level that was significantly associated with a worse OS of PDAC patients. To our knowledge, the present study is the first to investigate SPDL1 protein in pancreatic cancer tissues. In more detail, we found SPDL1 to be overexpressed in 41.18% of PDAC cases, and SPDL1 levels did not significantly cosegregate with the examined clinical and pathological features, though SPDL1 overexpression tended to occur more frequently in PNI-negative cases compared to positive ones ($p = 0.11$). Most importantly, however, SPDL1 protein levels allowed to stratify PDAC patients into two different survival groups. Patients with high SPDL1 expression had a better median OS than did patients with SPDL1 underexpression (606 days vs. 294 days; $p = 0.01$), with HR calculation indicating a reduced relative risk of death from any cause of 55% (95%CI 0.24–0.83, $p = 0.01$). Furthermore, SPDL1 protein sustained its significance in terms of OS after adjusting for covariates, being the most influential prognostic factor compared with clinicopathological features in patients who underwent surgical treatment (HR = 0.36, 95% CI 0.16–0.80, $p = 0.01$). These findings suggest a potentially important, but probably opposite role for SPDL1 protein and mRNA in the clinical behavior of pancreatic adenocarcinoma, but this conclusion is limited by the fact that our protein and mRNA results came from two different study population, i.e., own cohort and TCGA cohort, respectively. These differences between mRNA and protein expression with regard to prognostic relevance imply that expression measurements based on IHC, as well as RNA-seq, cDNA arrays, or qPCR, complement each other, and there is a need for a complex molecular analysis of tumors at both protein and mRNA levels. Indeed, although proteins carry out the vast majority of cellular functions and therefore are more eligible to influence prognosis, there are currently many studies providing support for the assumption that differential mRNA expression has also biological meaning [39], which should not be interpreted as a true functional relation, but rather as a process promoting mRNA transcription and/or mRNA stability of particular genes, and being itself associated with patient prognosis [40,41]. In the context of our results, it is also important to take into account that posttranscriptional and posttranslational mechanisms are likely to influence protein expression, and elevated levels of mRNA may produce only small amounts of detectable proteins [25]. Based on these, we may conclude that SPDL1 protein is probably functionally linked to superior prognosis in PDAC, whereas the opposite is true for SPDL1 mRNA. The latter suggests that any mechanisms that are responsible for induction of SPDL1 mRNA or for a negative correlation with its protein expression are potentially involved in PDAC progression and/or therapy resistance. The mechanistic support of our findings needs to be established in experimental systems. We regard this issue as important for future research.

The association of SPDL1 protein and patient survival is in contrast to previous findings of Silva et al. in OSCC [36], who have shown by IHC that SDPL1 SPDL1 is upregulated in OSCC tissues and correlated with tumor proliferation and a poor prognosis. As far as we know, there are no other reports on the impact of SPDL1 protein on disease outcome and clinical variables of cancer patients, and thus further studies are required to determine whether the role of Spindly in human cancers is tumor-type dependent.

Due to the functional relationship between the three proteins, we next compared their coexpression levels and their impact on patient overall survival. There were strong positive correlations between mRNA levels of CCNF, RRM2, and SPDL1 in PAC tissues of the TCGA cohort. Importantly, the combined variable of CCNF, RRM2, and SPDL1 was highly discriminant for OS ($p < 0.0001$, HR = 4.64, 95% CI 2.61–8.27) and was more valuable for predicting prognosis than each marker individually ($p = 0.04$). Coexpression level of studied biomarkers was the most significant independent prognostic factor associated with a shorter survival, compared to established clinicopathological features (adjusted HR = 3.51, 95% CI 1.93–6.36; $p < 0.0001$). Unexpectedly, in our cohort, cyclin F, RRM2, and SPDL1 proteins were not significantly correlated with each other ($p > 0.05$). In addition, Kaplan–Meier survival analysis failed to demonstrate that the combined expression of these proteins better predicted survival than looking at each protein individually ($p = 0.21$).

5. Conclusions

Collectively, the present study is the first to investigate cyclin F and SPDL1 proteins in pancreatic adenocarcinoma, and one of the few that assessed RRM2 in this group of cancer patients. Here, we identified a three-marker panel of genomic instability-related genes, whose mRNA expression levels were an independent prognostic factor for postoperative survival among PAC patients. Each of the markers alone were also highly discriminant for OS, both in the univariate and multivariate analyses. Importantly, high levels of SPDL1 protein emerged as the most powerful independent prognostic factor associated with a better outcome, compared to established clinicopathological parameters. In addition, overexpression of cyclin F protein was associated with a trend towards better survival of PDAC patients. Clinically, the two proteins would represent poor therapeutic targets, as it is the higher levels of these proteins that are correlated with better survival. However, if these data are validated in independent, larger cohorts, evaluation of SPDL1 protein as well as CCNF, RRM2, and SPDL1 mRNAs may add significant prognostic value to the currently established clinicopathologic variables and hence have potential clinical utility in the management of this deadly disease.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/4/859/s1>: Table S1: Clinicopathological properties of 68 patients with PDAC, Table S2: Antibodies and staining conditions used for immunohistochemistry, Figure S1: Kaplan–Meier curve for overall survival in patients with TNM stage I and II pancreatic ductal adenocarcinomas by RRM2 protein expression.

Author Contributions: Conceptualization: A.K.-W.; data curation: K.B., J.D.; formal analysis: A.K.-W., K.B., and I.N.-D.; visualization: A.K.-W., K.B.; staining evaluation: D.G., I.N.-D., and J.Z.; investigation: K.B., I.N.-D., J.D., D.G., and P.S.; methodology: J.D.; project administration: A.K.-W.; writing—original draft preparation: A.K.-W. and K.B.; writing—review and editing: A.G., D.G., M.G., and J.Z.; supervision: M.G. and D.G.; funding acquisition: A.K.-W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Nicolaus Copernicus University in Toruń, Faculty of Medicine, Collegium Medicum in Bydgoszcz; research task no. 142 within the framework of the basic research activity.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Ethics Committee of Nicolaus Copernicus University in Toruń, Collegium Medicum in Bydgoszcz (KB 342/2020; 23.06.2020).

Informed Consent Statement: Patient consent was waived due to the retrospective nature of the study. Requirement for informed consent was waived by the Institutional Ethics Committee of Nicolaus Copernicus University in Toruń, Collegium Medicum in Bydgoszcz.

Data Availability Statement: Publicly available datasets were analyzed in this study. This data can be found here: http://www.cbioportal.org/study/summary?id=paad_tcga_pan_can_atlas_2018 (accessed on 26 August 2020); <https://xenabrowser.net> (accessed on 26 August 2020). The own data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to ethical restrictions.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Yao, Y.; Dai, W. Genomic Instability and Cancer. *J. Carcinog. Mutagen.* **2014**, *5*, 1000165. [\[CrossRef\]](#)
2. Sahin, I.H.; Lowery, M.A.; Stadler, Z.K.; Salo-Mullen, E.; Iacobuzio-Donahue, C.A.; Kelsen, D.P.; O'Reilly, E.M. Genomic Instability in Pancreatic Adenocarcinoma: A New Step towards Precision Medicine and Novel Therapeutic Approaches. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2016**, *10*, 893–905. [\[CrossRef\]](#)
3. Grossberg, A.J.; Chu, L.C.; Deig, C.R.; Fishman, E.K.; Hwang, W.L.; Maitra, A.; Marks, D.L.; Mehta, A.; Nabavizadeh, N.; Simeone, D.M.; et al. Multidisciplinary Standards of Care and Recent Progress in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *CA Cancer J. Clin.* **2020**, *70*, 375–403. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Notta, F.; Chan-Seng-Yue, M.; Lemire, M.; Li, Y.; Wilson, G.W.; Connor, A.A.; Denroche, R.E.; Liang, S.-B.; Brown, A.M.K.; Kim, J.C.; et al. A Renewed Model of Pancreatic Cancer Evolution Based on Genomic Rearrangement Patterns. *Nature* **2016**, *538*, 378–382. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Juiz, N.A.; Iovanna, J.; Dusetti, N. Pancreatic Cancer Heterogeneity Can Be Explained Beyond the Genome. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 246. [\[CrossRef\]](#)
6. Ogłuszka, M.; Orzechowska, M.; Jędraszka, D.; Witas, P.; Bednarek, A.K. Evaluate Cutpoints: Adaptable Continuous Data Distribution System for Determining Survival in Kaplan-Meier Estimator. *Comput. Methods Programs Biomed.* **2019**, *177*, 133–139. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Soca-Chafre, G.; Montiel-Dávalos, A.; Rosa-Velázquez, I.A.D.L.; Caro-Sánchez, C.H.S.; Peña-Nieves, A.; Arrieta, O. Multiple Molecular Targets Associated with Genomic Instability in Lung Cancer. *Int. J. Genom.* **2019**, *2019*, 9584504. [\[CrossRef\]](#)
8. D'Angiolella, V.; Donato, V.; Vijayakumar, S.; Saraf, A.; Florens, L.; Washburn, M.P.; Dynlacht, B.; Pagano, M. SCF(Cyclin F) Controls Centrosome Homeostasis and Mitotic Fidelity through CP110 Degradation. *Nature* **2010**, *466*, 138–142. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. D'Angiolella, V.; Donato, V.; Forrester, F.M.; Jeong, Y.-T.; Pellacani, C.; Kudo, Y.; Saraf, A.; Florens, L.; Washburn, M.P.; Pagano, M. Cyclin F-Mediated Degradation of Ribonucleotide Reductase M2 Controls Genome Integrity and DNA Repair. *Cell* **2012**, *149*, 1023–1034. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. D'Angiolella, V.; Esencay, M.; Pagano, M. A Cyclin without Cyclin-Dependent Kinases: Cyclin F Controls Genome Stability through Ubiquitin-Mediated Proteolysis. *Trends Cell Biol.* **2013**, *23*, 135–140. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
11. Emanuele, M.J.; Elia, A.E.H.; Xu, Q.; Thoma, C.R.; Izhar, L.; Leng, Y.; Guo, A.; Chen, Y.-N.; Rush, J.; Hsu, P.W.-C.; et al. Global Identification of Modular Cullin-RING Ligase Substrates. *Cell* **2011**, *147*, 459–474. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Walter, D.; Hoffmann, S.; Komseli, E.-S.; Rappsilber, J.; Gorgoulis, V.; Sørensen, C.S. SCF(Cyclin F)-Dependent Degradation of CDC6 Suppresses DNA Re-Replication. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10530. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Gagat, M.; Krajewski, A.; Grzanka, D.; Grzanka, A. Potential Role of Cyclin F mRNA Expression in the Survival of Skin Melanoma Patients: Comprehensive Analysis of the Pathways Altered Due to Cyclin F Upregulation. *Oncol. Rep.* **2018**, *40*, 123–144. [\[CrossRef\]](#)
14. Thakur, A.; Bollig, A.; Wu, J.; Liao, D.J. Gene Expression Profiles in Primary Pancreatic Tumors and Metastatic Lesions of Ela-c-Myc Transgenic Mice. *Mol. Cancer* **2008**, *7*, 11. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Liu, Y.; Pan, B.; Qu, W.; Cao, Y.; Li, J.; Zhao, H. Systematic Analysis of the Expression and Prognosis Relevance of FBXO Family Reveals the Significance of FBXO1 in Human Breast Cancer; In Review; 2020. Available online: <https://www.researchsquare.com/article/rs-86575/v1> (accessed on 8 October 2020).
16. Wang, X.; Zhang, T.; Zhang, S.; Shan, J. Prognostic Values of F-Box Members in Breast Cancer: An Online Database Analysis and Literature Review. *Biosci. Rep.* **2019**, *39*, BSR20180949. [\[CrossRef\]](#)
17. Li, N.; Jiang, S.; Shi, J.; Fu, R.; Wu, H.; Lu, M. Construction of a Potential MicroRNA, Transcription Factor and mRNA Regulatory Network in Hepatocellular Carcinoma. *Transl. Cancer Res. TCR* **2020**, *9*, 5528–5543. [\[CrossRef\]](#)
18. Chen, J.; Wang, Z.; Shen, X.; Cui, X.; Guo, Y. Identification of Novel Biomarkers and Small Molecule Drugs in Human Colorectal Cancer by Microarray and Bioinformatics Analysis. *Mol. Genet. Genom. Med.* **2019**, *7*, e00713. [\[CrossRef\]](#)
19. Fu, J.; Qiu, H.; Cai, M.; Pan, Y.; Cao, Y.; Liu, L.; Yun, J.; Zhang, C.Z. Low Cyclin F Expression in Hepatocellular Carcinoma Associates with Poor Differentiation and Unfavorable Prognosis. *Cancer Sci.* **2013**, *104*, 508–515. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Choudhury, R.; Bonacci, T.; Wang, X.; Truong, A.; Arcaci, A.; Zhang, Y.; Mills, C.A.; Kernan, J.L.; Liu, P.; Emanuele, M.J. The E3 Ubiquitin Ligase SCF(Cyclin F) Transmits AKT Signaling to the Cell-Cycle Machinery. *Cell Rep.* **2017**, *20*, 3212–3222. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

21. Pan, D.; Chen, Y.; Du, Y.; Ren, Z.; Li, X.; Hu, B. Methylation of Promoter of RBL1 Enhances the Radioresistance of Three Dimensional Cultured Carcinoma Cells. *Oncotarget* **2017**, *8*, 4422–4435. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Comisso, E.; Scarola, M.; Rosso, M.; Piazza, S.; Marzinotto, S.; Ciani, Y.; Orsaria, M.; Mariuzzi, L.; Schneider, C.; Schoeffner, S.; et al. OCT4 Controls Mitotic Stability and Inactivates the RB Tumor Suppressor Pathway to Enhance Ovarian Cancer Aggressiveness. *Oncogene* **2017**, *36*, 4253–4266. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Lou, X.; Zhang, J.; Liu, S.; Lou, X.; Liao, D.J. The Other Side of the Coin: The Tumor-Suppressive Aspect of Oncogenes and the Oncogenic Aspect of Tumor-Suppressive Genes, Such as Those along the CCND-CDK4/6-RB Axis. *Cell Cycle* **2014**, *13*, 1677–1693. [\[CrossRef\]](#)
24. Lin, C.-Y.; Beattie, A.; Baradaran, B.; Dray, E.; Duijf, P.H.G. Contradictory mRNA and Protein Misexpression of EEF1A1 in Ductal Breast Carcinoma Due to Cell Cycle Regulation and Cellular Stress. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 13904. [\[CrossRef\]](#)
25. Ginestier, C.; Charafe-Jauffret, E.; Bertucci, F.; Eisinger, F.; Geneix, J.; Bechlian, D.; Conte, N.; Adélaïde, J.; Toiron, Y.; Nguyen, C.; et al. Distinct and Complementary Information Provided by Use of Tissue and DNA Microarrays in the Study of Breast Tumor Markers. *Am. J. Pathol.* **2002**, *161*, 1223–1233. [\[CrossRef\]](#)
26. Fisher, S.B.; Patel, S.H.; Bagci, P.; Kooby, D.A.; El-Rayes, B.F.; Staley, C.A.; Adsay, N.V.; Maithel, S.K. An Analysis of Human Equilibrative Nucleoside Transporter-1, Ribonucleoside Reductase Subunit M1, Ribonucleoside Reductase Subunit M2, and Excision Repair Cross-Complementing Gene-1 Expression in Patients with Resected Pancreas Adenocarcinoma: Implications for Adjuvant Treatment. *Cancer* **2013**, *119*, 445–453. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Xie, H.; Lin, J.; Thomas, D.G.; Jiang, W.; Liu, X. Ribonucleotide Reductase M2 Does Not Predict Survival in Patients with Resectable Pancreatic Adenocarcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2012**, *5*, 347–355.
28. Itoi, T.; Sofuni, A.; Fukushima, N.; Itokawa, F.; Tsuchiya, T.; Kurihara, T.; Moriyasu, F.; Tsuchida, A.; Kasuya, K. Ribonucleotide Reductase Subunit M2 mRNA Expression in Pretreatment Biopsies Obtained from Unresectable Pancreatic Carcinomas. *J. Gastroenterol.* **2007**, *42*, 389–394. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Giovannetti, E.; Del Tacca, M.; Mey, V.; Funel, N.; Nannizzi, S.; Ricci, S.; Orlandini, C.; Boggi, U.; Campani, D.; Del Chiaro, M.; et al. Transcription Analysis of Human Equilibrative Nucleoside Transporter-1 Predicts Survival in Pancreas Cancer Patients Treated with Gemcitabine. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 3928–3935. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Fujita, H.; Ohuchida, K.; Mizumoto, K.; Itaba, S.; Ito, T.; Nakata, K.; Yu, J.; Kayashima, T.; Souzaki, R.; Tajiri, T.; et al. Gene Expression Levels as Predictive Markers of Outcome in Pancreatic Cancer after Gemcitabine-Based Adjuvant Chemotherapy. *Neoplasia* **2010**, *12*, 807–817. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Sierzega, M.; Pach, R.; Kulig, P.; Legutko, J.; Kulig, J. Prognostic Implications of Expression Profiling for Gemcitabine-Related Genes (HENT1, DCK, RRM1, RRM2) in Patients With Resectable Pancreatic Adenocarcinoma Receiving Adjuvant Chemotherapy. *Pancreas* **2017**, *46*, 684–689. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Jin, D.; Jiao, Y.; Ji, J.; Jiang, W.; Ni, W.; Wu, Y.; Ni, R.; Lu, C.; Qu, L.; Ni, H.; et al. Identification of Prognostic Risk Factors for Pancreatic Cancer Using Bioinformatics Analysis. *PeerJ* **2020**, *8*, e9301. [\[CrossRef\]](#)
33. Griffiths, E.R.; Stuurman, N.; Vale, R.D. Spindly, a Novel Protein Essential for Silencing the Spindle Assembly Checkpoint, Recruits Dynein to the Kinetochore. *J. Cell Biol.* **2007**, *177*, 1005–1015. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Gassmann, R.; Essex, A.; Hu, J.-S.; Maddox, P.S.; Motegi, F.; Sugimoto, A.; O'Rourke, S.M.; Bowerman, B.; McLeod, I.; Yates, J.R.; et al. A New Mechanism Controlling Kinetochore-Microtubule Interactions Revealed by Comparison of Two Dynein-Targeting Components: SPDL-1 and the Rod/Zwilch/Zw10 Complex. *Genes Dev.* **2008**, *22*, 2385–2399. [\[CrossRef\]](#)
35. Barisic, M.; Sohm, B.; Mikolcevic, P.; Wandke, C.; Rauch, V.; Ringer, T.; Hess, M.; Bonn, G.; Geley, S. Spindly/CCDC99 Is Required for Efficient Chromosome Congression and Mitotic Checkpoint Regulation. *Mol. Biol. Cell* **2010**, *21*, 1968–1981. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Silva, P.M.A.; Delgado, M.L.; Ribeiro, N.; Florindo, C.; Tavares, Á.A.; Ribeiro, D.; Lopes, C.; do Amaral, B.; Bousbaa, H.; Monteiro, L.S. Spindly and Bub3 Expression in Oral Cancer: Prognostic and Therapeutic Implications. *Oral Dis.* **2019**, *25*, 1291–1301. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Tian, X.; Wang, N. Upregulation of ASPM, BUB1B and SPDL1 in Tumor Tissues Predicts Poor Survival in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Oncol. Lett.* **2020**, *19*, 3307–3315. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Kodama, T.; Marian, T.A.; Lee, H.; Kodama, M.; Li, J.; Parmacek, M.S.; Jenkins, N.A.; Copeland, N.G.; Wei, Z. MRTFB Suppresses Colorectal Cancer Development through Regulating SPDL1 and MCAM. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 23625–23635. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Koussounadis, A.; Langdon, S.P.; Um, I.H.; Harrison, D.J.; Smith, V.A. Relationship between Differentially Expressed mRNA and mRNA-Protein Correlations in a Xenograft Model System. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 10775. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Wennemers, M.; Bussink, J.; Grebenchtchikov, N.; Sweep, F.C.G.J.; Span, P.N. TRIB3 Protein Denotes a Good Prognosis in Breast Cancer Patients and Is Associated with Hypoxia Sensitivity. *Radiother. Oncol.* **2011**, *101*, 198–202. [\[CrossRef\]](#)
41. Wennemers, M.; Bussink, J.; van den Beucken, T.; Sweep, F.C.G.J.; Span, P.N. Regulation of TRIB3 mRNA and Protein in Breast Cancer. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e49439. [\[CrossRef\]](#)



Article

SKA3 Expression as a Prognostic Factor for Patients with Pancreatic Adenocarcinoma

Karolina Buchholz ^{1,2} , Justyna Dursiewicz ¹ , Anna Klimaszewska-Wiśniewska ^{1,*} , Magdalena Wiśniewska ^{3,4},
Maciej Słupski ⁵ and Dariusz Grzanka ¹

- ¹ Department of Clinical Pathomorphology, Faculty of Medicine, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, 85-094 Bydgoszcz, Poland; karolina.buchholz@cm.umk.pl (K.B.); justyna.dursiewicz@cm.umk.pl (J.D.); d_grzanka@cm.umk.pl (D.G.)
 - ² Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, 85-092 Bydgoszcz, Poland
 - ³ Department of Oncology and Brachytherapy, Faculty of Medicine, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, 85-796 Bydgoszcz, Poland; magdalena.wisniewska@cm.umk.pl
 - ⁴ Clinical Department of Oncology, Professor Franciszek Łukaszczyk Oncology Center in Bydgoszcz, 85-796 Bydgoszcz, Poland
 - ⁵ Department of General, Hepatobiliary and Transplant Surgery, Faculty of Medicine, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, 85-094 Bydgoszcz, Poland; maciej.slupski@cm.umk.pl
- * Correspondence: anna.klimaszewska@cm.umk.pl; Tel.: +48-52-585-4200; Fax: +48-52-585-4049

Abstract: The spindle and kinetochore-associated complex subunit 3 (SKA3) is a protein essential for proper chromosome segregation during mitosis and thus responsible for maintaining genome stability. Although its involvement in the pathogenesis of various cancer types has been reported, the potential clinicopathological significance of SKA3 in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) has not been fully elucidated. Therefore, this study aimed to assess clinicopathological associations and prognostic value of SKA3 in PDAC. For this purpose, in-house immunohistochemical analysis on tissue macroarrays (TMAs), as well as a bioinformatic examination using publicly available RNA-Seq dataset, were performed. It was demonstrated that SKA3 expression at both mRNA and protein levels was significantly elevated in PDAC compared to control tissues. Upregulated mRNA expression constituted an independent unfavorable prognostic factor for the overall survival of PDAC patients, whereas altered SKA3 protein levels were associated with significantly better clinical outcomes. The last observation was particularly clear in the early-stage tumors. These findings render SKA3 a promising prognostic biomarker for patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. However, further studies are needed to confirm this conclusion.

Keywords: pancreatic adenocarcinoma; SKA3; prognostic factor



Citation: Buchholz, K.; Dursiewicz, J.; Klimaszewska-Wiśniewska, A.; Wiśniewska, M.; Słupski, M.; Grzanka, D. SKA3 Expression as a Prognostic Factor for Patients with Pancreatic Adenocarcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 5134. <https://doi.org/10.3390/ijms25105134>

Academic Editor: Ssang-Goo Cho

Received: 4 April 2024

Revised: 29 April 2024

Accepted: 2 May 2024

Published: 9 May 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Pancreatic cancer is one of the most lethal malignant neoplasms worldwide. With almost as many deaths (466,003) as new cases (495,773) in 2020, it constitutes the seventh leading cause of cancer-related death globally [1]. Due to the asymptomatic initial course and rapid spread to surrounding organs, the disease is often diagnosed at the advanced stages. Difficulty in early detection, aggressive nature of pancreatic cancer, and relatively low effectiveness of treatment regimens result in a very dismal prognosis with a 5-year survival rate of approximately 6% (range 2–9%) [2].

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the most common type of pancreatic cancer accounting for more than 90% of cases [3]. Its development and progression is a multi-step process in which unstable genome and defective DNA repair pathways play a key role. It was observed that one of the earliest molecular changes in PDAC precursors is telomere shortening which, as a source of chromosomal instability, may lead to missegregation during mitosis and subsequent progressive accumulation of chromosomal

abnormalities. Furthermore, various genetic alterations involved in the progression from early-stage neoplasia to PDAC have been described, including *KRAS*, *CDKN2A*, *TP53*, and *SMAD4* mutations [4]. However, despite strenuous efforts made by scientists around the world, useful diagnostic and prognostic markers of PDAC as well as an effective treatment strategy have not been established so far. Therefore, considering early molecular events observed during PDAC development, we chose spindle and kinetochore-associated complex subunit 3 (SKA3) involved in chromosome segregation to determine its clinical value in examined cancer.

SKA3 is a member of the SKA complex located in the kinetochore outer layer [5]. This protein in cooperation with the NDC80 complex stabilizes the kinetochore-microtubule interaction and silences the spindle assembly checkpoint after proper metaphase chromosome alignment. In this manner, it regulates mitotic exit during cell division [6–8]. Previous studies showed that SKA3 is aberrantly expressed in numerous tumors and thereby associated with cancer progression and poor prognosis of patients [9–13]. However, the relationship between SKA3 and PDAC has not been elucidated.

Given the above, the present study was designed to analyze clinicopathological associations and prognostic value of SKA3 in PDAC. For this purpose, the expression of SKA3 protein was evaluated using immunohistochemically stained tissue macroarrays (TMAs), while SKA3 gene expression data were downloaded from publicly available databases. Furthermore, functional enrichment analysis and protein-protein interaction network were used to predict the biological significance of SKA3 in pancreatic adenocarcinoma (PAAD).

2. Results

2.1. SKA3 Protein Expression in PDAC and Non-Cancerous Adjacent Tissue: Association with Patients' Characteristics

Immunoreactivity assessed in TMAs was restricted to the cytoplasm both in cancer and non-tumor cells. Simultaneously, levels of SKA3 were significantly higher in PDAC in comparison to normal appearing adjacent pancreatic ductal epithelium ($p < 0.0001$; Figure 1A). As a result of the immunoreactive score (IRS) dichotomization (Figure 1B), a high level of SKA3 was found in 39 (35.5%) cases of PDACs, whereas a low level was observed in 71 (64.5%) PDAC tumors and all 71 (100%) applied control samples. Representative images of immunohistochemical staining are presented in Figure 1C. Furthermore, the expression status of SKA3 was not associated with any of the analyzed clinicopathological features ($p > 0.05$; Table S1).

2.2. Association between the SKA3 Protein Expression and PDAC Patients' Survival ($n = 96$)

Fourteen patients in the TMA cohort were confirmed to have died due to postoperative complications. These cases were excluded, and further survival analyses were performed on a study group consisting of 96 patients. Median overall survival (OS) time and disease-free survival (DFS) time in this group of patients were 15.1 (95% CI 12.9–17.3) and 10.6 (95% CI 8.1–13.1) months, respectively. To explore the association between SKA3 protein expression and PDAC patient survival, Kaplan-Meier curves and log-rank test were used. It was observed that patients whose PDAC tumors presented high levels of SKA3 had significantly better OS and DFS than those expressing low levels of the analyzed protein (OS: 21.1 months vs. 13.6 months, log-rank $p = 0.002$, Figure 1D; DFS: 16.3 months vs. 9.2 months, log-rank $p = 0.005$, Figure 1E).

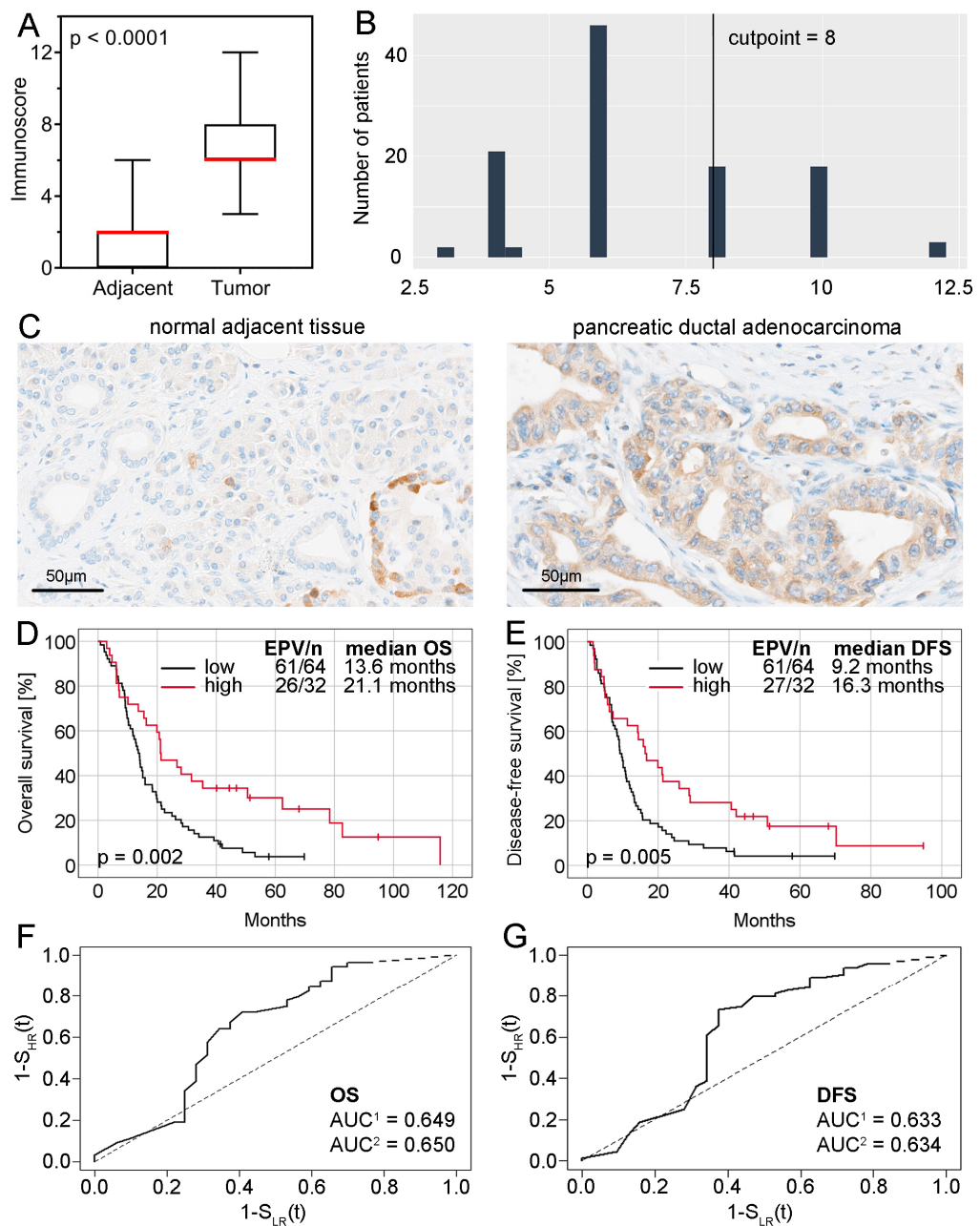


Figure 1. SKA3 protein expression and its correlation with PDAC patient survival. **(A)** Comparison of SKA3 protein levels in tumor and non-cancerous adjacent tissues of PDAC patients. The error bars present the range from minimum to maximum values of data. The medians for both sets of values have been marked in red. **(B)** SKA3 IRS distribution with a marked cut-off point established using

the cutp function of the Evaluate Cutpoints software ($C_p = 8$). (C) Representative images of immunohistochemical expression of SKA3 in pancreatic ductal adenocarcinoma and normal adjacent tissue (control). Original magnification $20\times$. (D) Kaplan-Meier curves assessing the relationship between SKA3 protein expression and OS of PDAC patients in the TMA cohort ($n = 96$); (E) Kaplan-Meier curves assessing the relationship between SKA3 protein expression and DFS of PDAC patients in the TMA cohort ($n = 96$); (F,G) corresponding prognostic ROC curves extrapolated with noninformative (AUC^1) and optimistic (AUC^2) assumptions. Abbreviations: AUC—area under the curve, DFS—disease-free survival, EPV—events per variable, OS—overall survival, ROC—receiver operating characteristic.

To further determine the prognostic importance of SKA3 protein expression, prognostic receiver operating characteristic (ROC) curves and Cox regression analyses were carried out. The first of these was performed to evaluate the area under the curve (AUC) and thus the probability of shorter OS and DFS time for PDAC patients in the high-risk (low expression) group compared to those in the low-risk (high expression) group. The AUC for OS was 0.649 (noninformative scenario) and 0.650 (an optimistic scenario), therefore risk was estimated as 65% (Figure 1F). In the case of DFS, the AUC was 0.633 (noninformative scenario) and 0.634 (an optimistic scenario) with a risk of 63% (Figure 1G). In unadjusted Cox proportional hazards regression, SKA3 expression level was significantly associated with OS and DFS (OS: HR = 0.47, 95% CI 0.29–0.77, $p = 0.003$; DFS: HR = 0.52, 95% CI 0.32–0.83, $p = 0.006$; Table 1). Multivariable regression analysis confirmed this factor as an independent predictor of both OS and DFS in PDAC patients (OS: adjusted HR = 0.40, 95% CI 0.24–0.67, $p < 0.001$; DFS: adjusted HR = 0.48, 95% CI 0.29–0.79, $p = 0.004$; Table 1). Further analysis revealed that the expression of SKA3 protein in stages I–II (adjusted HR = 0.28, 95% CI 0.14–0.59, $p < 0.001$) but not in stage III or stages III–IV ($p > 0.05$ in univariable Cox regression analyses, data not shown) constituted an independent favorable prognostic factor for OS (Table 2). A significant relationship between SKA3 overexpression and longer median OS time of PDAC patients was also noted in the following subgroups: T1–T2 tumors, N0, M0, stages I–II, VI-negative and resection margin-negative (log-rank test $p < 0.05$, Figure 2). Collectively, these findings show that SKA3 expression has prognostic significance in PDAC, especially in early-stage disease, for which the contribution of SKA3 is even greater.

2.3. SKA3 mRNA Expression in PDAC and Normal Pancreatic Tissue: Association with Patients Characteristics and Genome Instability Parameters

Analysis of RNA-sequencing-based data showed that the expression levels of SKA3 were significantly higher in PDACs compared to normal pancreatic tissues ($p < 0.0001$; Figure 3A). According to the optimal cutpoint established with the Evaluate cutpoint software (Figure 3B), upregulation of SKA3 was observed in 74 (51%) PDACs, while downregulation in the other 71 (49%). In the case of normal pancreatic tissue, all 153 (100%) samples demonstrated low expression of the analyzed gene. No significant associations were found between SKA3 expression and clinicopathological traits ($p > 0.05$; Table S2). In the context of genome instability parameters, SKA3 expression correlated with the fraction of genome altered ($r = 0.61$, $p < 0.0001$), aneuploidy score ($r = 0.49$, $p < 0.0001$), mutation count ($r = 0.39$, $p < 0.0001$) and MSIsensor score ($r = 0.19$, $p = 0.02$), but not with and MSI MANTIS score ($r = 0.11$, $p = 0.19$).

Table 1. Univariable and multivariable analyses of prognostic indicators by Cox regression model in the TMA cohort (n = 96).

Variable	EPV/n	Univariable Analysis				Multivariable Analysis [#]			
		HR	95% CI		<i>p</i>	HR	95% CI		<i>p</i>
			Lower	Upper			Lower	Upper	
Overall survival									
SKA3 (low vs. high)	61/64_26/32	0.47	0.29	0.77	0.003	0.40	0.24	0.67	<0.001
Age (≤70 vs. >70)	70/79_17/17	2.45	1.39	4.30	0.002	0.89	0.43	1.85	0.75
Sex (female vs. male)	48/53_39/43	0.89	0.58	1.37	0.61	-	-	-	-
Grade (G1 vs. G2–G3)	6/7_81/89	1.27	0.55	2.92	0.57	-	-	-	-
pT (T1 vs. T2–T4)	13/18_74/78	1.77	0.98	3.21	0.06	-	-	-	-
pN (absent vs. present)	37/45_50/51	2.32	1.47	3.65	<0.001	-	-	-	-
pM (absent vs. present)	78/87_9/9	1.81	0.90	3.66	0.10	-	-	-	-
TNM stage (I–II vs. III–IV)	58/67_29/29	2.46	1.53	3.96	<0.001	3.15	1.85	5.37	<0.001
VI (absent vs. present)	67/75_20/21	2.07	1.24	3.45	0.006	2.20	1.24	3.89	0.007
PNI (absent vs. present)	15/19_72/77	1.71	0.97	3.03	0.06	-	-	-	-
R (R0 vs. R1)	60/68_27/28	1.60	1.00	2.55	0.049	1.11	0.68	1.82	0.68
CTX (no vs. yes)	13/13_74/83	0.25	0.14	0.47	<0.001	0.16	0.07	0.37	<0.001
Disease-free survival									
Variable	EPV/n	Univariable analysis				Multivariable analysis [#]			
SKA3 (low vs. high)	61/64_27/32	0.52	0.32	0.83	0.006	0.48	0.29	0.79	0.004
Age (≤70 vs. >70)	71/79_17/17	1.90	1.10	3.28	0.02	0.80	0.37	1.72	0.56
Sex (female vs. male)	49/53_39/43	0.96	0.63	1.46	0.84	-	-	-	-
Grade (G1 vs. G2–G3)	7/7_81/89	0.99	0.45	2.15	0.98	-	-	-	-
pT (T1 vs. T2–T4)	13/18_75/78	2.01	1.11	3.64	0.02	-	-	-	-
pN (absent vs. present)	37/45_51/51	1.92	1.43	2.58	<0.001	-	-	-	-
pM (absent vs. present)	79/87_9/9								
pM		0.28 ^T	0.04	2.03	0.21	-	-	-	-
pM*T_COV_		1.29 ^T	1.04	1.61	0.02	-	-	-	-
TNM stage (I–II vs. III–IV)	59/67_29/29	3.02	1.83	4.97	<0.001	3.58	2.07	6.19	<0.001
VI (absent vs. present)	68/75_20/21	1.95	1.17	3.26	0.01	1.90	1.08	3.35	0.03
PNI (absent vs. present)	15/19_73/77	1.62	0.93	2.85	0.09	-	-	-	-
R (R0 vs. R1)	61/68_27/28	1.41	0.89	2.24	0.15	-	-	-	-
CTX (no vs. yes)	13/13_75/83	0.30	0.17	0.56	<0.001	0.18	0.08	0.44	<0.001

Abbreviations: CI—confidence interval, CTX—chemotherapy, EPV—events per variable, HR—hazard ratio, VI—vascular invasion, PNI—perineural invasion, R—resection margin, TMA—tissue macroarray. Significant *p*-values (*p* < 0.05) are indicated in bold. [#] Final result of a multivariable Cox regression model built of variables with *p*-value < 0.05 in univariable analysis. ^T HR for time-dependent variable.

Table 2. The univariable and multivariable Cox regression models in TNM stage I–II PDAC patients (TMA cohort, n = 67).

Variable	EPV/n	Univariable Analysis TNM Stage I–II				Multivariable Analysis [#] TNM Stage I–II			
		HR	95% CI		<i>p</i>	HR	95% CI		<i>p</i>
			Lower	Upper			Lower	Upper	
SKA3 (low vs. high)	43/46_15/21	0.31	0.16	0.61	<0.001	0.28	0.14	0.59	<0.001
Age (≤70 vs. >70)	46/55_12/12	3.16	1.58	6.35	0.001	1.19	0.45	3.10	0.73
Sex (female vs. male)	32/37_26/30	0.84	0.50	1.43	0.53	-	-	-	-
Grade (G1 vs. G2–G3)	4/5_54/62	1.27	0.46	3.53	0.65	-	-	-	-
pT (T1 vs. T2–T3)	10/15_48/52	1.71	0.86	3.39	0.13	-	-	-	-
pN (N0 vs. N1)	32/40_26/27	2.17	1.26	3.75	0.005	2.37	1.30	4.31	0.005
TNM stage (I vs. II)	25/32_33/35	1.63	0.96	2.76	0.07	-	-	-	-
VI (absent vs. present)	46/54_12/13	2.14	1.12	4.12	0.02	2.95	1.40	6.20	0.004
PNI (absent vs. present)	8/12_50/55	2.34	1.08	5.08	0.03	1.67	0.74	3.79	0.22

Table 2. Cont.

Variable	EPV/n	Univariable Analysis TNM Stage I–II				Multivariable Analysis [#] TNM Stage I–II			
		HR	95% CI		<i>p</i>	HR	95% CI		<i>p</i>
			Lower	Upper			Lower	Upper	
R (R0 vs. R1)	42/50_16/17	1.76	0.97	3.19	0.06	-	-	-	-
CTX (no vs. yes)	12/12_46/55	0.18	0.09	0.37	<0.001	0.15	0.06	0.42	<0.001

Abbreviations: CI—confidence interval, CTX—chemotherapy, EPV—events per variable, HR—hazard ratio, VI—vascular invasion, PNI—perineural invasion, R—resection margin, TMA—tissue macroarray. Significant *p*-values (*p* < 0.05) are indicated in bold. [#] Final result of a multivariable Cox regression model built of variables with *p*-value < 0.05 in univariable analysis.

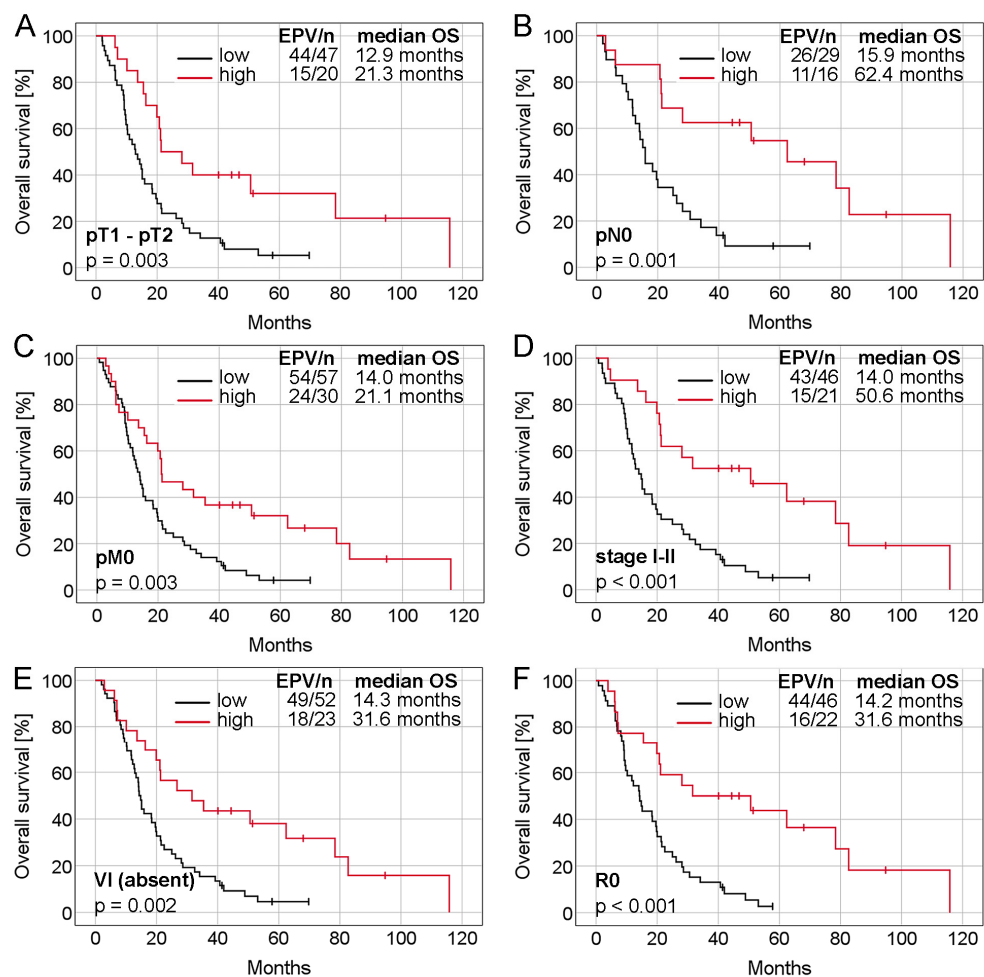


Figure 2. Kaplan-Meier curves presenting the overall survival depending on SKA3 protein expression in different subgroups of PDAC patients. Analyzed subgroups: (A) pT1-pT2, (B) pN0, (C) pM0, (D) TNM stage I-II, (E) absence of VI and (F) resection margin R0. Abbreviations: EPV—events per variable, OS—overall survival, VI—vascular invasion.

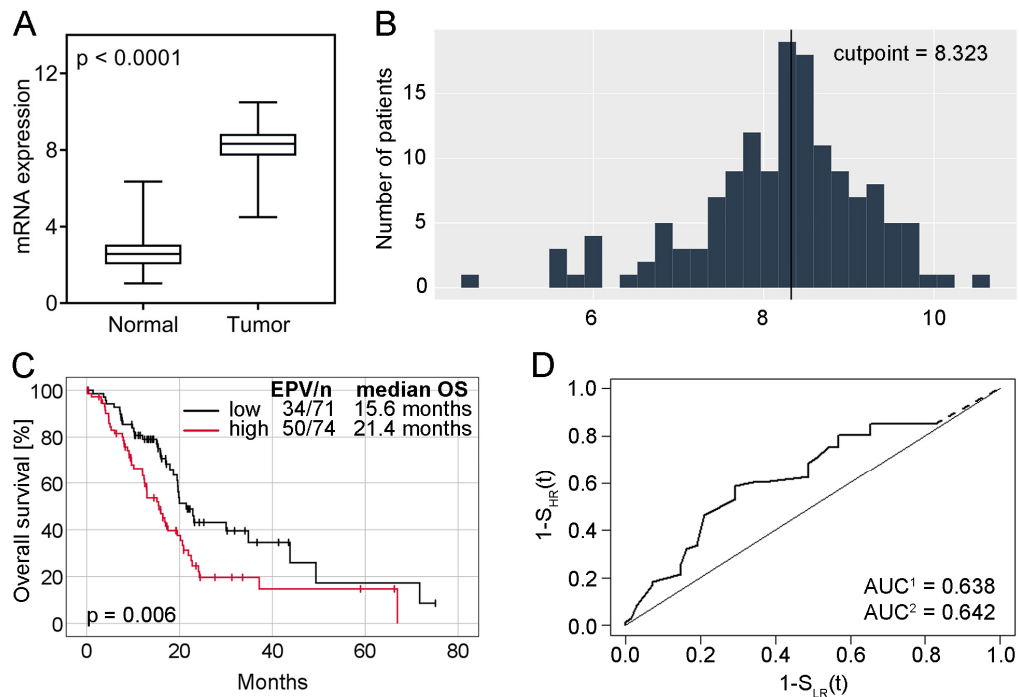


Figure 3. SKA3 mRNA expression and its correlation with PDAC patients survival. **(A)** Comparison of SKA3 mRNA expression levels in tumor and normal tissue samples of PDAC patients. The error bars present the range from minimum to maximum values of data. **(B)** SKA3 expression levels distribution with a marked optimal cut point established with the Evaluate Cutpoints software ($C_p = 8.323$). **(C)** Assessment of the relationship between SKA3 expression and OS of PDAC patients. Kaplan-Meier curve comparing cases of TCGA cohort with high and low SKA3 expression ($n = 145$); **(D)** corresponding prognostic ROC curve extrapolated with noninformative (AUC^1) and optimistic (AUC^2) assumptions. Abbreviations: AUC—area under the curve, EPV—events per variable, OS—overall survival, ROC—receiver operating characteristic, TCGA—The Cancer Genome Atlas.

2.4. Association between the SKA3 mRNA Expression and PDAC Patients' Survival

In Kaplan-Meier survival analysis, high expression of SKA3 correlated with significantly shorter median OS time of PDAC patients in comparison to those with SKA3 low expression (15.6 months vs. 21.4 months, log-rank test $p = 0.006$, Figure 3C). The area under the prognostic ROC curve was 0.638 (a noninformative scenario) and 0.642 (an optimistic scenario): the probability of earlier dying of SKA3 overexpressors was 64% (Figure 3D). Univariable Cox regression analysis demonstrated that SKA3 upregulation ($HR = 1.84$, 95% CI 1.18–2.86, $p = 0.007$, Table 3) was related to an unfavorable survival rate. Multivariable Cox proportional hazard model revealed SKA3 mRNA expression (adjusted $HR = 2.13$, 95% CI 1.36–3.34, $p < 0.001$; Table 3) as independent poor prognostic factor for OS.

Table 3. Univariable and multivariable analyses of prognostic indicators by Cox regression model in the TCGA cohort (n = 145).

Variable	EPV/n	Univariable Analysis				Multivariable Analysis [#]			
		HR	95% CI		<i>p</i>	HR	95% CI		<i>p</i>
			Lower	Upper			Lower	Upper	
SKA3 (low vs. high)	34/71_50/74	1.84	1.18	2.86	0.007	2.13	1.36	3.34	<0.001
Age (≤73 vs. >73)	59/107_25/38	1.63	1.01	2.63	0.04	1.73	1.07	2.79	0.03
Sex (female vs. grade)	43/68_41/77	0.82	0.53	1.26	0.36	-	-	-	-
Grade (G1–G2 vs. G3–G4)	56/103_28/42	1.38	0.87	2.17	0.17	-	-	-	-
pT (T1–T2 vs. T3–T4)	9/19_75/126	1.14	0.57	2.29	0.71	-	-	-	-
pN (absent vs. present)	17/37_67/108	1.51	0.88	2.57	0.13	-	-	-	-
TNM stage (I–II vs. III–IV)	81/138_3/7	0.57	0.18	1.80	0.34	-	-	-	-
Radiation Therapy (no vs. yes)	66/107_18/38								
Radiation Therapy		0.28 ^T	0.10	0.81	0.02	0.28	0.10	0.79	0.02
Radiation Therapy*T_COV_		1.05 ^T	0.99	1.11	0.10	1.04	0.98	1.10	0.17

Abbreviations: CI—confidence interval, EPV—events per variable, HR—hazard ratio, TCGA—The Cancer Genome Atlas. Significant *p*-values (*p* < 0.05) are indicated in bold. [#] Final result of a multivariable Cox regression model built of variables with *p*-value < 0.05 in univariable analysis. ^T HR for time-dependent variable.

2.5. Functional Enrichment Analysis

The Reactome Pathway hierarchy panel for SKA3 and its 50 interaction partners in PAAD is presented in Figure 4A. The analysis demonstrated that imputed genes were primarily associated with cell cycle, cell cycle mitotic, cell cycle checkpoints, mitotic prometaphase, and resolution of sister chromatid cohesion (Figure 4B, Table S3). KEGG pathway analysis revealed that the gene set was significantly enriched in five pathways: cell cycle, oocyte meiosis, progesterone-mediated oocyte maturation, p53 signaling pathway, and Fanconi anemia pathway (Figure 4C, Table S4). According to KEGG Brite studies, there was a preponderance of genes representing chromosome and associated proteins, enzymes, DNA replication proteins, and cytoskeleton proteins (Figure 4D).

Finally, GO functional enrichment analysis indicated that SKA3 and co-upregulated genes were significantly involved in 19 GO terms for biological process (BP), 25 GO terms for cellular components (CC), and 8 GO terms for molecular functions (MF; Table S5). As shown in Figure 5, the most enriched ontology terms were cell division (BP, GO:0051301; Figure 5A,B), kinetochore (CC, GO:0000776; Figure 5C,D), and microtubule binding (MF, GO:0008017; Figure 5E,F).

2.6. Protein-Protein Interaction (PPI)

The STRING database and Cytoscape software (version 3.9.1) were used to construct and visualize a PPI network of SKA3 and its 50 neighboring genes identified as most correlated in PAAD (Figure 6). It was noted 51 nodes and 1111 edges in the PPI network. PPI enrichment *p* value was lower than 1.0×10^{-16} , and the average local clustering coefficient was 0.948. Detailed information on PPI network parameters computed with NetworkAnalyzer Cytoscape plugin was depicted in Table S6. The top 10 hub genes determined using the CytoHubba Cytoscape plugin and based on the degree score were presented as colored nodes (Figure 6).

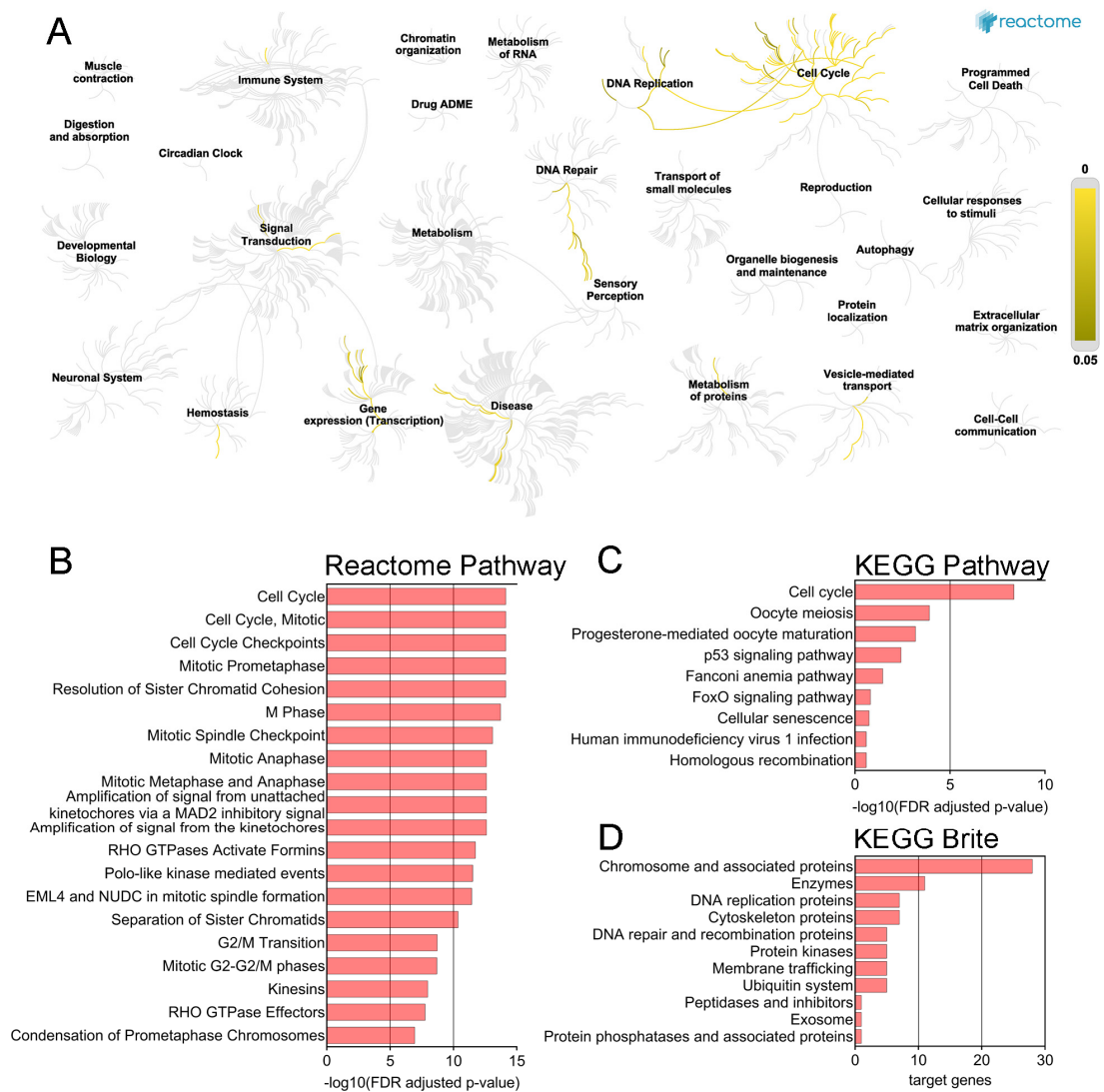


Figure 4. Functional enrichment analysis for SKA3 and its 50 interaction partners in PAAD. (A) The Reactome Pathway hierarchy panel. (B) Bar chart of the top 20 Reactome pathways based on the enrichment scores [$-\log_{10}(\text{FDR adjusted } p\text{-value})$]. (C) Bar chart for all KEGG Pathways based on the enrichment scores [$-\log_{10}(\text{FDR adjusted } p\text{-value})$]. (D) Bar chart for all terms in KEGG Brite functional hierarchies. The horizontal axis represents the number of genes enriched in KEGG Brite terms represented on the vertical axis.

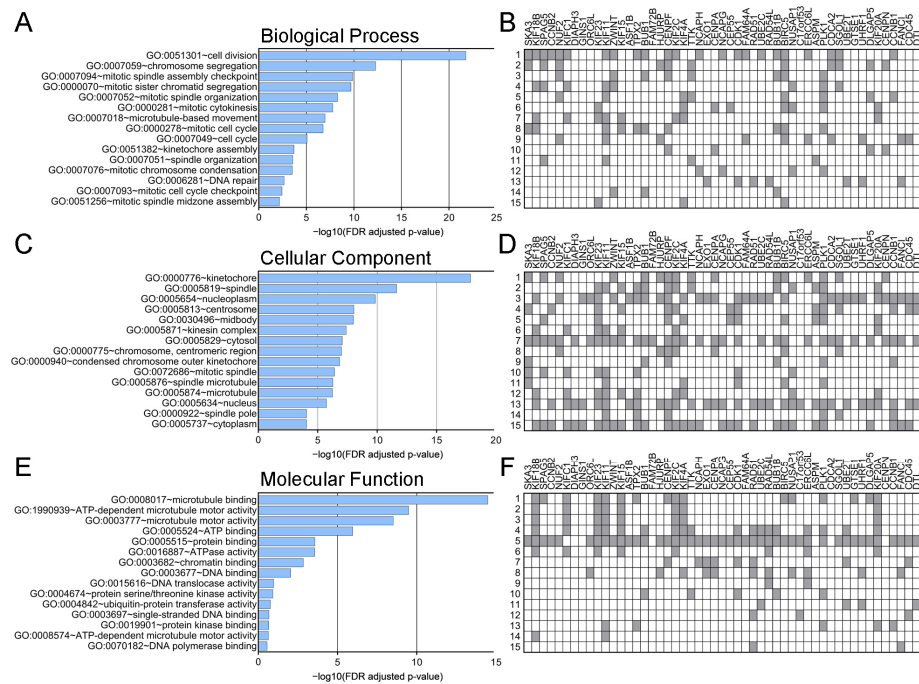


Figure 5. Gene Ontology enrichment analysis for SKA3 and its 50 interaction partners in PAAD. Bar charts showing the top enriched terms for (A) biological process, (C) cellular component, and (E) molecular function ranked by $[-\log_{10}(\text{FDR adjusted } p\text{-value})]$. (B,D,F) Heatmaps based on the target genes.

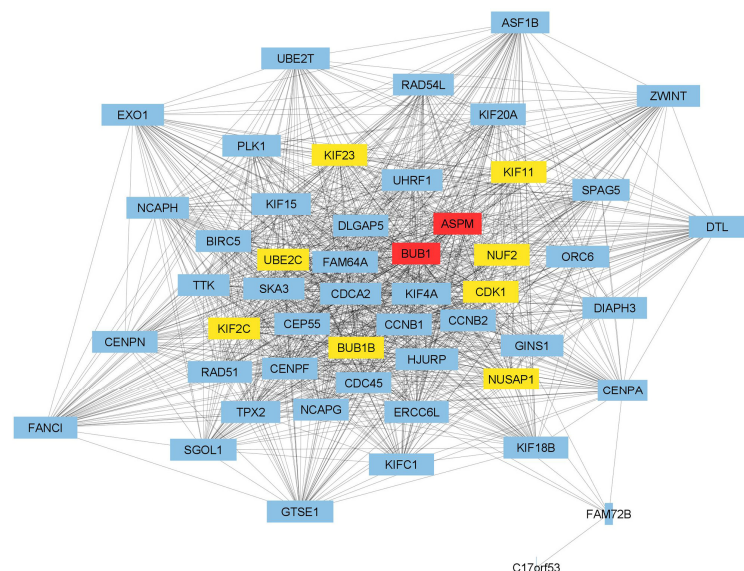


Figure 6. The PPI network of SKA3 and its top 50 neighboring genes in PAAD. The nodes represent analyzed genes, while the interactions between them are shown as edges. The clustering coefficient

of PPI network is visualized by the width of nodes. The top 10 hub genes established based on the degree score are distinguished in a yellow to red gradient with the highest values for red color. Other genes are marked in blue.

3. Discussion

In the present study, the evaluation of the SKA3 expression status concerning patients' characteristics and clinical outcomes was performed to investigate the potential prognostic value of this factor in PDAC. For this purpose, institutional TMAs and publicly available RNA-seq datasets were used. Finally, the PPI network for SKA3 and its 50 neighbors was constructed and functionally annotated.

Our research demonstrated that SKA3 expression was significantly upregulated in PDAC tumors compared to control samples. Several mechanisms might explain the observed differences. According to Li et al., one factor affecting SKA3 expression in PAAD is DNA methylation. Another possible cause could be gene alterations, including single nucleotide variants. It has been shown that the frequency of these deleterious mutations in PAAD can be as high as 1% [14]. Liu et al. also reported significant differences in SKA3 mRNA expression between PDAC tumors and control tissues, similar to our findings. To the best of our knowledge, this is the only study to date reporting the prognostic value of the analyzed gene in ductal type of pancreatic cancer [15]. Authors additionally demonstrated that SKA3 overexpression was more frequently detected in poorly differentiated and undifferentiated tumors (G3–G4) compared to well and moderately differentiated (G1–G2) ones. However, this observation was noted only for GSE62452 dataset. In the The Cancer Genome Atlas (TCGA) cohort, no significant relationships between mRNA expression and the examined clinical features were found [15], which is consistent with our results. Upregulation of SKA3 and associated cancer progression have also been reported in other tumors, including lung adenocarcinoma [16], prostate cancer [17], breast cancer [18], glioma [19], kidney renal papillary cell carcinoma [13], skin cutaneous melanoma [20] and bladder cancer [21].

The Kaplan-Meier estimation performed by Liu et al. to compare OS time in the high and low SKA3 expression groups showed significant and borderline significant differences for GEO and TCGA datasets, respectively [15]. Shorter OS time was noticeably associated with the upregulation of SKA3, which is aligned with our results obtained for the TCGA cohort. As the main goal of the present report was to assess the prognostic value of SKA3 in PDAC, we also performed Cox regression analyses. These demonstrated that increased expression of SKA3 was correlated with significantly shorter patient survival, and after adjusting for confounding variables, it remained an independent unfavorable prognostic factor for OS of PDAC patients. Our findings align with observations from other studies indicating that SKA3 overexpression predicts poor prognosis and is significantly associated with OS in PDAC [15] as well as with OS, disease-specific survival, and disease-free interval in PAAD [14].

To gain deeper insights into the mechanisms underlying the prognostic value of SKA3 in PAAD, we first identified genes that correlate with SKA3 expression and then constructed a PPI network to find genes with a high degree of interaction and thus potentially related to the development of PAAD. In our PPI network, the nodes with the highest degree centrality were ASPM and BUB1. It has been demonstrated that ASPM plays a role in regulating Wnt signaling and cancer stemness in PDAC. ASPM isoform I (ASPM-iI), which is localized in the cytoplasm, interacts with disheveled-2 and active β -catenin, key components of the Wnt pathway. This interaction drives Wnt signaling, contributing to cancer stemness and tumorigenicity. In turn, ASPM isoform II (ASPM-iII), primarily located in the nucleus, regulates the cell cycle by interacting with cyclin E [22]. The second hub gene, BUB1, encodes a serine/threonine protein kinase that is a crucial component of the spindle assembly checkpoint. The interaction between BUB1 and SKA3 observed in our results has also been confirmed in in vitro studies. Namely, it has been demonstrated that reducing SKA3 expression in HeLa cell line causes mitotic arrest, accompanied by a strong

accumulation of the checkpoint protein BUB1 at kinetochores, particularly in cells with misaligned chromosomes [23]. In studies conducted on pancreatic cancer cells, *BUB1* was identified as a promoter of cell proliferation, migration and gemcitabine resistance [24]. Both *ASPM* and *BUB1* interact with *UBE2C*, *KIF23*, *KIF2C*, *KIF11*, *NUF2*, *CDK1*, *BUB1B* and *NUSAP1*, each of which has previously been associated with the initiation and/or progression of PAAD [25–32]. The results of our functional enrichment analysis suggest that *SKA3* is correlated with genes that promote proliferation, as well as those responsible for ensuring the high fidelity of chromosome segregation. High expression of *SKA3* in PAAD may therefore lead to uncontrolled cell proliferation and the development of aneuploidy due to disrupted chromosome segregation, ultimately worsening patient prognosis.

To the best of our knowledge, the present study is the first to demonstrate the prognostic value of *SKA3* protein in PDAC. We showed that a high expression of this factor was significantly more often in PDAC tumors than in non-tumor adjacent tissues, but simultaneously, no correlations between *SKA3* expression and analyzed clinicopathological traits were noted. Attempts to elucidate the role of the *SKA3* in cancers other than PDAC have yielded several conclusions. Hou et al. demonstrated that the knockdown of *SKA3* in hepatocellular carcinoma inhibits proliferation and tumor invasion both in vitro and in vivo by regulating CDK2/P53 phosphorylation [33]. In lung adenocarcinoma, *SKA3* was identified as an oncogene promoting cell growth and migration by PLK1-mediated *SKA3* phosphorylation [34] and stimulating metastasis through the activation of PI3K-AKT signaling [16]. Similarly in cervical cancer (CC), the PI3K-AKT pathway was revealed to be involved in promoting the proliferation and migration of CC cells overexpressing *SKA3* [35]. Additionally, Zhang et al. found that *SKA3* regulates *DUSP2* and thus activates the MAPK/ERK pathway in gastric cancer (GC). As a result, GC cells are stimulated to proliferation and EMT and this in turn leads to invasion and even peritoneal metastasis [36].

The next step of the present research was to assess the prognostic value of *SKA3* protein in PDAC. It is considered that pancreatic cancer resection remains one of the most challenging surgical procedures, still burdened with a high percentage of postoperative complications affecting the survival time of patients [37]. In this discipline, the key roles are played by appropriately qualifying the patient for surgical treatment, the surgical technique, and the ability to administrate postoperative complications [38]. Wegner et al. identified also preoperative treatment, increasing age, higher comorbidity score, lower case volume, lower income, and type of surgery as significant negative predictors of 30-day postoperative mortality [39]. Therefore, to eliminate the possible impact of postoperative deaths on the prognostic value assessment of *SKA3* protein, patients for whom postoperative complications were confirmed as the cause of death were excluded from survival analyses. The Kaplan-Meier estimation and log-rank test demonstrated that elevated levels of *SKA3* were associated with noticeably longer OS and DFS. A significant relationship between high *SKA3* expression and better OS time of PDAC patients was also noted in the following subgroups: T1–T2 tumors, M0, N0, TNM stage I–II, absence of V1, and resection margin R0. Cox regression analysis additionally confirmed *SKA3* protein to be an independent predictor of OS and DFS. For OS endpoint, the last observation was found both in the full TMA cohort and early-stage tumors (TNM stage I–II) analyzed separately.

The obtained results indicate high *SKA3* mRNA expression and low *SKA3* protein level as unfavorable prognostic factors in PDAC. The lack of correlation between these two levels of biological information is not surprising. Many examples of similar discrepancies which can be explained by posttranscriptional and posttranslational modifications have been presented in the literature so far [40,41]. However, the regulation of gene expression is not the only possible cause of the discussed discordances. They can also result from tumor heterogeneity or even the specificity of the dataset (e.g., distribution of clinical data, sample size). Inference based only on mRNA expression data or protein expression level is questionable and therefore parallel studying of both parameters is a best practice, crucial for a better understanding of gene and protein networks and thus the functional significance of a pathway. In this context, a significant limitation of the present study is that

the tumors examined for protein expression are not the same as those examined in mRNA analysis. Finally, especially due to the unique pathobiology of PDAC, performing in vitro experiments explaining the role of SKA3 in this cancer would be a valuable supplement to the obtained results.

4. Conclusions

To sum up, the present study is the second to assess the prognostic value of *SKA3* gene in PDAC and the first to investigate SKA3 protein in this deadly disease. Firstly, we demonstrated that the upregulation of mRNA constituted an independent unfavorable prognostic factor for the overall survival of PDAC patients. Thereafter, we found that high protein levels were associated with significantly better clinical outcomes, especially in the early stages of cancer. The above discrepancy highlights the need for further investigation, including larger cohorts and in vitro experiments, to clarify the role of SKA3 in PDAC pathogenesis.

5. Materials and Methods

5.1. Tissue Material and Clinicopathological Data

Tissue samples, including tumors ($n = 110$) and adjacent non-cancerous tissues ($n = 71$), were obtained from PDAC patients undergoing pancreatic resection between 2009 and 2020 at the Department of General, Hepatobiliary and Transplant Surgery of the A. Jurasz University Hospital No. 1 in Bydgoszcz (Poland). The TNM classification of all PDAC specimens was determined based on the eighth edition of the American Joint Committee on Cancer staging system. The study group consisted of the cohort of patients described in previous articles [42,43] supplemented with additional cases. Inclusion criteria were as follows: (I) pathological diagnosis of PDAC; (II) availability of complete clinical data on age, sex, grading, pT status, pN status, pM status, TNM stage, vascular invasion, perineural invasion, resection margin, and chemotherapy. Two different endpoints were used in the study: OS (defined as the time from surgery to death from any cause) and DFS (defined as the time from surgery to any recurrence or death). Follow-up data collection concluded in September 2023. The research protocol was approved by the Bioethics Committee at Collegium Medicum in Bydgoszcz of Nicolaus Copernicus University in Toruń (no. 342/2020) and performed according to the guidelines of the Declaration of Helsinki.

5.2. Immunohistochemistry

Immunohistochemical staining was performed on TMAs according to the previously described method [42]. Whole tissue sections at thickness of 4- μ m obtained by sectioning recipient paraffin blocks were labeled with primary rabbit polyclonal anti-SKA3 antibody (1:1500, 32 min; cat. no: PA558722, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) using BenchMark ULTRA system (Roche Diagnostics/Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA). Antigen-antibody complexes were visualized with ultraView Universal DAB Detection Kit (Roche Diagnostics/Ventana Medical System, Tucson, AZ, USA). Positive control was performed based on data available in The Human Protein Atlas and antibody datasheet provided by the manufacturer, while the negative control was obtained by omitting the primary antibody.

The immunohistochemical expression of SKA3 protein was evaluated by two investigators, including the senior pathologist (D.G.), under a multi-headed microscope (Olympus, Tokyo, Japan) at 20 $\times$ original objective magnification. Protein levels were assessed within PDAC and normal duct epithelium using the IRS which considers both the intensity of staining (IS; 0: negative, 1: weak, 2: moderate, 3: strong) and the percentage of positively stained cells (PS; 0: <5%; 1: 6–25%; 2: 26–50%; 3: 51–75%; 4: >75%). The final immunoscore ranging from 0 to 12 was calculated by multiplying IS and PS. Results obtained for all analyzed cases were dichotomized into low and high expression groups based on the optimal cutpoint determined using the cutp function of the Evaluate Cutpoints software (<8.0; $\geq$ 8.0, respectively) [44].

5.3. RNA-Sequencing Data

RNA-sequencing (RNA-seq) data normalized via DESeq2 method for 178 PAAD tumors and 153 normal tissue samples were retrieved from TCGA and Genotype-Tissue Expression databases, respectively. The University of California Santa Cruz Xena Browser was utilized for this purpose [45]. Clinicopathological data of patients with PAAD were obtained from the cBio Cancer Genomics Portal [46]. Only patients with a ductal type of tumor and those for whom clinical data were available in cBioPortal were included in the study. Additionally, one patient with a survival time of 0 months was excluded from the analyses, resulting in a final study group of 145 patients. To minimize the bias due to missing data (Table S7), all survival analyses for the TCGA cohort were performed on dataset subjected to multiple imputation (MI; $n = 10$). Due to a substantial amount of missing data on distant metastasis (pM), this variable was not included in the MI procedure and further survival analyses. SKA3 mRNA expression data were divided into low (<8.323) and high (≥ 8.323) expression groups based on the optimal cutpoint established with the cutp function of the Evaluate Cutpoints software [44]. The follow-up and median OS time of PDAC patients were 23.5 (95% CI 20.5–26.5) and 19.5 (95% CI 17.0–21.9) months, respectively.

5.4. Functional Enrichment Analysis

The University of Alabama at Birmingham Cancer data analysis Portal (UALCAN) [47] was searched to identify the top 50 genes positively correlated with SKA3 in PAAD tissue (Figure S1). These were used to perform FEA and to construct the PPI network afterward. Pathway analysis and visualization were conducted with the Reactome pathway database [48], while the functional hierarchies of imputed genes were explored using The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Biomolecular Relations in Information Transmission and Expression (BRITE) database [49]. Gene Ontology (GO) and KEGG pathway enrichment analyses were carried out using the Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) [50]. Enriched GO terms were classified into three categories: biological process (BP), cellular component (CC), and molecular function (MF). For all analyses, False Discovery Rate (FDR) adjusted p -value < 0.05 (q -value) was considered statistically significant.

5.5. Construction of the Protein-Protein Interaction Network

A PPI network involving SKA3 and its 50 most relevant neighboring genes was constructed based on data retrieved from Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING) database [51]. To visualize the PPI network, Cytoscape software (version 3.9.1) [52] along with NetworkAnalyzer and CytoHubba plugins were used.

5.6. Statistical Analysis

Statistical analyses were carried out with the GraphPad Prism (version 8.0, GraphPad Software, San Diego, CA, USA), SPSS software packages (version 28.0, IBM Corporation, Armonk, NY, USA) or survival and survminer R packages (version 1.3.1093 of RStudio, Vienna, Austria). The Shapiro-Wilk test was used to verify data normality. Differences between continuous variables were analyzed by the Mann-Whitney test, whereas the strength and direction of association between two ranked variables were measured using Spearman's correlation coefficient (r). The chi-square or Fisher's exact test was performed to assess the interrelation of categorized SKA3 expression data and patient clinicopathological characteristics. Differences in survival time between the high- and low-risk groups were estimated using the Kaplan–Meier curves and tested for significance by the log-rank test. Prognostic ROC curves (according to the method described by Combescure et al. [53]) and Cox proportional hazards regression models were used to predict the prognostic value of SKA3 levels in the analyzed cancer. To test for the proportional-hazards (PH) assumption, graphical diagnostics based on the scaled Schoenfeld residuals and plot $\log(-\log(S(t)))$ vs. t were performed. In cases where the PH assumption did not hold, Cox regression models

were built with time-dependent covariates. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms25105134/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, K.B.; patients data collection, M.W. and M.S.; methodology, K.B. and J.D.; investigation, K.B. and J.D.; staining evaluation, D.G. and K.B.; formal analysis, K.B. and A.K.-W.; visualization, K.B.; writing—original draft preparation, K.B.; writing—review and editing, A.K.-W. and D.G.; project administration, A.K.-W. and D.G.; supervision, D.G.; funding acquisition, K.B. and A.K.-W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Nicolaus Copernicus University in Toruń in the competition Grants4NCUStudents under the Initiative of Excellence—NCU Research University program.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee at Collegium Medicum in Bydgoszcz of Nicolaus Copernicus University in Toruń (no. 342/2020; 23 June 2020).

Informed Consent Statement: Patient consent was waived by the Ethics Committee of Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń due to the retrospective nature of the study.

Data Availability Statement: Publicly available datasets were analyzed in this study. These data can be found here: https://www.cbioportal.org/study/summary?id=paad_tcga_pan_atlas_2018 (accessed on 26 October 2023), <https://xenabrowser.net> (accessed on 26 October 2023), <http://ualcan.path.uab.edu/> (accessed on 27 July 2022), <https://reactome.org> (accessed on 27 July 2022), <https://www.genome.jp/kegg/brite.html> (accessed on 27 July 2022), <https://david.ncifcrf.gov> (accessed on 27 July 2022), <https://string-db.org> (accessed on 27 July 2022). Our data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to ethical restrictions.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [CrossRef] [PubMed]
2. McGuigan, A.; Kelly, P.; Turkington, R.C.; Jones, C.; Coleman, H.G.; McCain, R.S. Pancreatic Cancer: A Review of Clinical Diagnosis, Epidemiology, Treatment and Outcomes. *World J. Gastroenterol.* **2018**, *24*, 4846–4861. [CrossRef]
3. Grant, T.J.; Hua, K.; Singh, A. Molecular Pathogenesis of Pancreatic Cancer. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2016**, *144*, 241–275. [CrossRef]
4. Guo, J.; Xie, K.; Zheng, S. Molecular Biomarkers of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia and Their Implications in Early Diagnosis and Therapeutic Intervention of Pancreatic Cancer. *Int. J. Biol. Sci.* **2016**, *12*, 292–301. [CrossRef]
5. Gaitanos, T.N.; Santamaria, A.; Jeyaparakash, A.A.; Wang, B.; Conti, E.; Nigg, E.A. Stable Kinetochore-Microtubule Interactions Depend on the Ska Complex and Its New Component Ska3/C13Orf3. *EMBO J.* **2009**, *28*, 1442–1452. [CrossRef] [PubMed]
6. Helgeson, L.A.; Zelter, A.; Riffle, M.; MacCoss, M.J.; Asbury, C.L.; Davis, T.N. Human Ska Complex and Ndc80 Complex Interact to Form a Load-Bearing Assembly That Strengthens Kinetochore-Microtubule Attachments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 2740–2745. [CrossRef]
7. Sivakumar, S.; Daum, J.R.; Tipton, A.R.; Rankin, S.; Gorbsky, G.J. The Spindle and Kinetochore-Associated (Ska) Complex Enhances Binding of the Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome (APC/C) to Chromosomes and Promotes Mitotic Exit. *Mol. Biol. Cell* **2014**, *25*, 594–605. [CrossRef]
8. Janczyk, P.L.; Skorupka, K.A.; Tooley, J.G.; Matson, D.R.; Kestner, C.A.; West, T.; Pornillos, O.; Stukenberg, P.T. Mechanism of Ska Recruitment by Ndc80 Complexes to Kinetochores. *Dev. Cell* **2017**, *41*, 438–449.e4. [CrossRef]
9. Gao, W.; Zhang, Y.; Luo, H.; Niu, M.; Zheng, X.; Hu, W.; Cui, J.; Xue, X.; Bo, Y.; Dai, F.; et al. Targeting SKA3 Suppresses the Proliferation and Chemoresistance of Laryngeal Squamous Cell Carcinoma via Impairing PLK1-AKT Axis-Mediated Glycolysis. *Cell Death Dis.* **2020**, *11*, 919. [CrossRef]
10. You, C.; Piao, X.-M.; Kang, K.; Kim, Y.-J.; Kang, K. Integrative Transcriptome Profiling Reveals SKA3 as a Novel Prognostic Marker in Non-Muscle Invasive Bladder Cancer. *Cancers* **2021**, *13*, 4673. [CrossRef]
11. Zhong, Y.; Zhuang, Z.; Mo, P.; Lin, M.; Gong, J.; Huang, J.; Mo, H.; Lu, Y.; Huang, M. Overexpression of SKA3 Correlates with Poor Prognosis in Female Early Breast Cancer. *PeerJ* **2021**, *9*, e12506. [CrossRef] [PubMed]

12. Tang, J.; Liu, J.; Li, J.; Liang, Z.; Zeng, K.; Li, H.; Zhao, Z.; Zhou, L.; Jiang, N. Upregulation of SKA3 Enhances Cell Proliferation and Correlates with Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *Oncol. Rep.* **2021**, *45*, 48. [\[CrossRef\]](#)
13. Feng, D.; Zhang, F.; Liu, L.; Xiong, Q.; Xu, H.; Wei, W.; Liu, Z.; Yang, L. SKA3 Serves as a Biomarker for Poor Prognosis in Kidney Renal Papillary Cell Carcinoma. *Int. J. Gen. Med.* **2021**, *14*, 8591–8602. [\[CrossRef\]](#)
14. Li, Z.; Huang, L.; Li, J.; Yang, W.; Li, W.; Long, Q.; Dai, X.; Wang, H.; Du, G. Immunological Role and Prognostic Value of the SKA Family in Pan-Cancer Analysis. *Front. Immunol.* **2023**, *14*, 1012999. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Liu, Y.; Jin, Z.-R.; Huang, X.; Che, Y.-C.; Liu, Q. Identification of Spindle and Kinetochore-Associated Family Genes as Therapeutic Targets and Prognostic Biomarkers in Pancreas Ductal Adenocarcinoma Microenvironment. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 553536. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Hu, D.-D.; Chen, H.-L.; Lou, L.-M.; Zhang, H.; Yang, G.-L. SKA3 Promotes Lung Adenocarcinoma Metastasis through the EGFR-PI3K-Akt Axis. *Biosci. Rep.* **2020**, *40*, BSR20194335. [\[CrossRef\]](#)
17. Feng, D.; Zhu, W.; Shi, X.; Xiong, Q.; Li, D.; Wei, W.; Han, P.; Wei, Q.; Yang, L. Spindle and Kinetochore-Associated Complex Subunit 3 Could Serve as a Prognostic Biomarker for Prostate Cancer. *Exp. Hematol. Oncol.* **2022**, *11*, 76. [\[CrossRef\]](#)
18. Tang, D.; Zhao, X.; Zhang, L.; Wang, Z.; Wang, C. Identification of Hub Genes to Regulate Breast Cancer Metastasis to Brain by Bioinformatics Analyses. *J. Cell Biochem.* **2019**, *120*, 9522–9531. [\[CrossRef\]](#)
19. Yu, S. Overexpression of SKA Complex Is Associated With Poor Prognosis in Gliomas. *Front. Neurol.* **2021**, *12*, 755681. [\[CrossRef\]](#)
20. Pang, H.; Zhou, Y.; Wang, J.; Wu, H.; Cui, C.; Xiao, Z. SKA3 Overexpression Predicts Poor Outcomes in Skin Cutaneous Melanoma Patients. *Transl. Oncol.* **2022**, *15*, 101253. [\[CrossRef\]](#)
21. Wang, C.; Liu, S.; Zhang, X.; Wang, Y.; Guan, P.; Bu, F.; Wang, H.; Wang, D.; Fan, Y.; Hou, S.; et al. SKA3 Is a Prognostic Biomarker and Associated with Immune Infiltration in Bladder Cancer. *Hereditas* **2022**, *159*, 20. [\[CrossRef\]](#)
22. Hsu, C.-C.; Liao, W.-Y.; Chan, T.-S.; Chen, W.-Y.; Lee, C.-T.; Shan, Y.-S.; Huang, P.-J.; Hou, Y.-C.; Li, C.-R.; Tsai, K.K. The Differential Distributions of ASPM Isoforms and Their Roles in Wnt Signaling, Cell Cycle Progression, and Pancreatic Cancer Prognosis. *J. Pathol.* **2019**, *249*, 498–508. [\[CrossRef\]](#)
23. Daum, J.R.; Wren, J.D.; Daniel, J.J.; Sivakumar, S.; McAvoy, J.N.; Potapova, T.A.; Gorbsky, G.J. Skp3 Is Required for Spindle Checkpoint Silencing and the Maintenance of Chromosome Cohesion in Mitosis. *Curr. Biol.* **2009**, *19*, 1467–1472. [\[CrossRef\]](#)
24. Wang, W.; Zhou, X.; Kong, L.; Pan, Z.; Chen, G. BUB1 Promotes Gemcitabine Resistance in Pancreatic Cancer Cells by Inhibiting Ferroptosis. *Cancers* **2024**, *16*, 1540. [\[CrossRef\]](#)
25. Cao, J.-Z.; Nie, G.; Hu, H.; Zhang, X.; Ni, C.-M.; Huang, Z.-P.; Qiao, G.-L.; Ouyang, L. UBE2C Promotes the Progression of Pancreatic Cancer and Glycolytic Activity via EGFR Stabilization-Mediated PI3K-Akt Pathway Activation. *J. Gastrointest. Oncol.* **2022**, *13*, 1444–1453. [\[CrossRef\]](#)
26. Gao, C.-T.; Ren, J.; Yu, J.; Li, S.-N.; Guo, X.-F.; Zhou, Y.-Z. KIF23 Enhances Cell Proliferation in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Is a Potent Therapeutic Target. *Ann. Transl. Med.* **2020**, *8*, 1394. [\[CrossRef\]](#)
27. Huang, X.; Zhao, F.; Wu, Q.; Wang, Z.; Ren, H.; Zhang, Q.; Wang, Z.; Xu, J. KIF2C Facilitates Tumor Growth and Metastasis in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers* **2023**, *15*, 1502. [\[CrossRef\]](#)
28. Gu, X.; Zhu, Q.; Tian, G.; Song, W.; Wang, T.; Wang, A.; Chen, X.; Qin, S. KIF11 Manipulates SREBP2-Dependent Mevalonate Cross Talk to Promote Tumor Progression in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Med.* **2022**, *11*, 3282–3295. [\[CrossRef\]](#)
29. Hu, P.; Shangguan, J.; Zhang, L. Downregulation of NUF2 Inhibits Tumor Growth and Induces Apoptosis by Regulating lncRNA AF339813. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, *8*, 2638–2648.
30. Wijnen, R.; Pecoraro, C.; Carbone, D.; Fuji, H.; Avan, A.; Peters, G.J.; Giovannetti, E.; Diana, P. Cyclin Dependent Kinase-1 (CDK-1) Inhibition as a Novel Therapeutic Strategy against Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC). *Cancers* **2021**, *13*, 4389. [\[CrossRef\]](#)
31. Tian, X.; Wang, N. Upregulation of ASPM, BUB1B and SPDL1 in Tumor Tissues Predicts Poor Survival in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Oncol. Lett.* **2020**, *19*, 3307–3315. [\[CrossRef\]](#)
32. Liu, Y.; Tang, R.; Meng, Q.-C.; Shi, S.; Xu, J.; Yu, X.-J.; Zhang, B.; Wang, W. NUSAP1 Promotes Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Progression by Drives the Epithelial-Mesenchymal Transition and Reduces AMPK Phosphorylation. *BMC Cancer* **2024**, *24*, 87. [\[CrossRef\]](#)
33. Hou, Y.; Wang, Z.; Huang, S.; Sun, C.; Zhao, J.; Shi, J.; Li, Z.; Wang, Z.; He, X.; Tam, N.L.; et al. SKA3 Promotes Tumor Growth by Regulating CDK2/P53 Phosphorylation in Hepatocellular Carcinoma. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 929. [\[CrossRef\]](#)
34. Ning, G.; Lu, C.; Chen, Y.; Jiang, M.; Si, P.; Zhang, R. Transcription Factor ZEB1 Regulates PLK1-Mediated SKA3 Phosphorylation to Promote Lung Cancer Cell Proliferation, Migration and Cell Cycle. *Anticancer Drugs* **2023**, *34*, 866–876. [\[CrossRef\]](#)
35. Hu, R.; Wang, M.-Q.; Niu, W.-B.; Wang, Y.-J.; Liu, Y.-Y.; Liu, L.-Y.; Wang, M.; Zhong, J.; You, H.-Y.; Wu, X.-H.; et al. SKA3 Promotes Cell Proliferation and Migration in Cervical Cancer by Activating the PI3K/Akt Signaling Pathway. *Cancer Cell Int.* **2018**, *18*, 183. [\[CrossRef\]](#)
36. Zhang, C.; Zhao, S.; Tan, Y.; Pan, S.; An, W.; Chen, Q.; Wang, X.; Xu, H. The SKA3-DUSP2 Axis Promotes Gastric Cancer Tumorigenesis and Epithelial-Mesenchymal Transition by Activating the MAPK/ERK Pathway. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 777612. [\[CrossRef\]](#)
37. Mintziras, I.; Wächter, S.; Manoharan, J.; Kanngiesser, V.; Maurer, E.; Bartsch, D.K. Postoperative Morbidity Following Pancreatic Cancer Surgery Is Significantly Associated with Worse Overall Patient Survival; Systematic Review and Meta-Analysis. *Surg. Oncol.* **2021**, *38*, 101573. [\[CrossRef\]](#)

38. Bliss, L.A.; Witkowski, E.R.; Yang, C.J.; Tseng, J.F. Outcomes in Operative Management of Pancreatic Cancer. *J. Surg. Oncol.* **2014**, *110*, 592–598. [CrossRef]
39. Wegner, R.E.; Verma, V.; Hasan, S.; Schiffman, S.; Thakkar, S.; Horne, Z.D.; Kulkarni, A.; Williams, H.K.; Monga, D.; Finley, G.; et al. Incidence and Risk Factors for Post-Operative Mortality, Hospitalization, and Readmission Rates Following Pancreatic Cancer Resection. *J. Gastrointest. Oncol.* **2019**, *10*, 1080–1093. [CrossRef]
40. Ginestier, C.; Charafe-Jauffret, E.; Bertucci, F.; Eisinger, F.; Geneix, J.; Bechlian, D.; Conte, N.; Adélaïde, J.; Toiron, Y.; Nguyen, C.; et al. Distinct and Complementary Information Provided by Use of Tissue and DNA Microarrays in the Study of Breast Tumor Markers. *Am. J. Pathol.* **2002**, *161*, 1223–1233. [CrossRef]
41. Lin, C.-Y.; Beattie, A.; Baradaran, B.; Dray, E.; Duijff, P.H.G. Contradictory mRNA and Protein Misexpression of EEF1A1 in Ductal Breast Carcinoma Due to Cell Cycle Regulation and Cellular Stress. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 13904. [CrossRef] [PubMed]
42. Klimaszewska-Wiśniewska, A.; Buchholz, K.; Neska-Długosz, I.; Durślewicz, J.; Grzanka, D.; Zabrzyński, J.; Sopońska, P.; Grzanka, A.; Gagat, M. Expression of Genomic Instability-Related Molecules: Cyclin F, RRM2 and SPDL1 and Their Prognostic Significance in Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancers* **2021**, *13*, 859. [CrossRef]
43. Klimaszewska-Wiśniewska, A.; Neska-Długosz, I.; Buchholz, K.; Durślewicz, J.; Grzanka, D.; Kasperska, A.; Antosik, P.; Zabrzyński, J.; Grzanka, A.; Gagat, M. Prognostic Significance of KIF11 and KIF14 Expression in Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancers* **2021**, *13*, 3017. [CrossRef]
44. Ogłuszka, M.; Orzechowska, M.; Jędraszka, D.; Witas, P.; Bednarek, A.K. Evaluate Cutpoints: Adaptable Continuous Data Distribution System for Determining Survival in Kaplan-Meier Estimator. *Comput. Methods Programs Biomed.* **2019**, *177*, 133–139. [CrossRef]
45. The University of California Santa Cruz Xena Browser. Available online: <https://xenabrowser.net> (accessed on 26 October 2023).
46. The cBio Cancer Genomics Portal. Available online: <https://www.cbioportal.org> (accessed on 26 October 2023).
47. The University of Alabama at Birmingham Cancer Data Analysis Portal. Available online: <http://ualcan.path.uab.edu> (accessed on 27 July 2022).
48. The Reactome Pathway Database. Available online: <https://reactome.org> (accessed on 27 July 2022).
49. The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes: Biomolecular Relations in Information Transmission and Expression. Available online: <https://www.genome.jp/kegg/brite.html> (accessed on 27 July 2022).
50. Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. Available online: <https://david.ncifcrf.gov> (accessed on 27 July 2022).
51. Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins. Available online: <https://string-db.org> (accessed on 27 July 2022).
52. Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N.S.; Wang, J.T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res.* **2003**, *13*, 2498–2504. [CrossRef]
53. Combescure, C.; Perneger, T.V.; Weber, D.C.; Daurès, J.-P.; Foucher, Y. Prognostic ROC Curves: A Method for Representing the Overall Discriminative Capacity of Binary Markers with Right-Censored Time-to-Event Endpoints. *Epidemiology* **2014**, *25*, 103–109. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

14. OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW PUBLIKACJI

Załącznik nr 5 do uchwały Nr 38 Senatu UMK z dnia 26 września 2023 r.
w sprawie postępowania o nadanie stopnia doktora na
Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu

Bydgoszcz, dnia 18.09.2024 r.

Prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Dariusz Grzanka

Katedra Patomorfologii Klinicznej
Collegium Medicum um. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**Rada Dyscypliny Nauki Medyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

- 1) „Expression of genomic instability-related molecules: Cyclin F, RRM2 and SPDL1 and their prognostic significance in pancreatic adenocarcinoma”; Anna Klimaszewska-Wiśniewska, Karolina Buchholz, Izabela Neska-Długosz, Justyna Durślewicz, Dariusz Grzanka, Jan Zabrzyński, Paulina Sopońska, Alina Grzanka, Maciej Gagat; Cancers (Basel) 2021; 13(4):859 mój udział polegał na nadzorowaniu realizacji badania, ocenie barwienia immunohistochemicznego oraz wniesieniu uwag do manuskryptu.
- 2) „SKA3 expression as a prognostic factor for patients with pancreatic adenocarcinoma”, Karolina Buchholz, Justyna Durślewicz, Anna Klimaszewska-Wiśniewska, Magdalena Wiśniewska, Maciej Słupski, Dariusz Grzanka; International Journal of Molecular Sciences 2024; 25(10):5134 mój udział polegał na nadzorowaniu realizacji badania, ocenie barwienia immunohistochemicznego oraz wniesieniu uwag do manuskryptu.


Kierownik
Katedry Patomorfologii Klinicznej
prof. dr hab. Dariusz Grzanka

Bydgoszcz, dnia 18.09.2024 r.

Dr n. med. Anna Klimaszewska-Wiśniewska

Katedra Patomorfologii Klinicznej
Collegium Medicum um. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**Rada Dyscypliny Nauki Medyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że:

- 1) W pracy „Expression of genomic instability-related molecules: Cyclin F, RRM2 and SPDL1 and their prognostic significance in pancreatic adenocarcinoma”; Anna Klimaszewska-Wiśniewska, Karolina Buchholz, Izabela Neska-Długosz, Justyna Durślewicz, Dariusz Grzanka, Jan Zabrzyński, Paulina Sopońska, Alina Grzanka, Maciej Gagat; *Cancers (Basel)* 2021; 13(4):859 mój udział polegał na zaprojektowaniu badania i pozyskaniu środków finansowych na jego realizację, analizie i interpretacji uzyskanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptu.
- 2) W pracy „SKA3 expression as a prognostic factor for patients with pancreatic adenocarcinoma”; Karolina Buchholz, Justyna Durślewicz, Anna Klimaszewska-Wiśniewska, Magdalena Wiśniewska, Maciej Słupski, Dariusz Grzanka; *International Journal of Molecular Sciences* 2024; 25(10):5134 mój udział polegał na koordynowaniu działań badawczych oraz wniesieniu drobnych uwag do manuskryptu.
- 3) Mój udział w realizacji niepublikowanych danych włączonych do rozprawy doktorskiej polegał na przeprowadzeniu części eksperymentów *in vitro*, analizie i interpretacji uzyskanych wyników oraz wniesieniu uwag do ich opisu.



(podpis)

Bydgoszcz, dnia 18.09.2024 r.

Dr n. med. Justyna Durślewicz

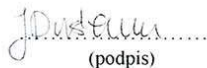
Katedra Patomorfologii Klinicznej
Collegium Medicum um. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Rada Dyscypliny Nauki Medyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

- 1) „Expression of genomic instability-related molecules: Cyclin F, RRM2 and SPDL1 and their prognostic significance in pancreatic adenocarcinoma”; Anna Klimaszewska-Wiśniewska, Karolina Buchholz, Izabela Neska-Długosz, Justyna Durślewicz, Dariusz Grzanka, Jan Zabrzyński, Paulina Sopońska, Alina Grzanka, Maciej Gagat; Cancers (Basel) 2021; 13(4):859 mój udział polegał na zebraniu danych klinicznych pacjentów oraz optymalizacji metody i wykonaniu barwienia immunohistochemicznego.
- 2) „SKA3 expression as a prognostic factor for patients with pancreatic adenocarcinoma”; Karolina Buchholz, Justyna Durślewicz, Anna Klimaszewska-Wiśniewska, Magdalena Wiśniewska, Maciej Słupski, Dariusz Grzanka; International Journal of Molecular Sciences 2024; 25(10):5134 mój udział polegał na optymalizacji metody i wykonaniu barwienia immunohistochemicznego oraz wniesieniu uwag do manuskryptu.


(podpis)

Bydgoszcz, dnia 18.09.2024 r.

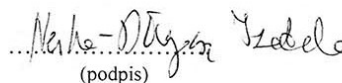
lek. Izabela Neska-Długosz

Katedra Patomorfologii Klinicznej
Collegium Medicum um. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Rada Dyscypliny Nauki Medyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy „Expression of genomic instability-related molecules: Cyclin F, RRM2 and SPDL1 and their prognostic significance in pancreatic adenocarcinoma”; Anna Klimaszewska-Wiśniewska, Karolina Buchholz, Izabela Neska-Długosz, Justyna Durślewicz, Dariusz Grzanka, Jan Zabrzyński, Paulina Sopońska, Alina Grzanka, Maciej Gagat; Cancers (Basel) 2021; 13(4):859 mój udział polegał na ocenie barwienia immunohistochemicznego oraz analizie i interpretacji danych dotyczących barwienia.


(podpis)

Bydgoszcz, dnia 18.09.2024 r.

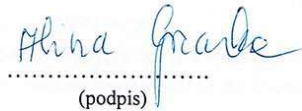
Prof. dr hab. n. med. Alina Grzanka

Katedra Histologii i Embriologii
Collegium Medicum um. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**Rada Dyscypliny Nauki Medyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy „Expression of genomic instability-related molecules: Cyclin F, RRM2 and SPDL1 and their prognostic significance in pancreatic adenocarcinoma”; Anna Klimaszewska-Wiśniewska, Karolina Buchholz, Izabela Neska-Długosz, Justyna Durślewicz, Dariusz Grzanka, Jan Zabrzyński, Paulina Sopońska, Alina Grzanka, Maciej Gagat; Cancers (Basel) 2021; 13(4):859 mój udział polegał na wniesieniu uwag do manuskryptu.


.....
(podpis)

Bydgoszcz, dnia 18.09.2024 r.

Dr hab. n med. Maciej Gagat, prof. UMK

Katedra Histologii i Embriologii
Collegium Medicum um. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**Rada Dyscypliny Nauki Medyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy „Expression of genomic instability-related molecules: Cyclin F, RRM2 and SPDL1 and their prognostic significance in pancreatic adenocarcinoma”; Anna Klimaszewska-Wiśniewska, Karolina Buchholz, Izabela Neska-Długosz, Justyna Durślewicz, Dariusz Grzanka, Jan Zabrzyński, Paulina Sopońska-Brzoszczyk, Alina Grzanka, Maciej Gagat; *Cancers (Basel)* 2021; 13(4):859 mój udział polegał na nadzorowaniu realizacji badania oraz wniesieniu uwag do manuskryptu.



(podpis)

*Załącznik nr 5 do uchwały Nr 38 Senatu UMK z dnia
26 września 2023 r. w sprawie postępowania o
nadanie stopnia doktora na Uniwersytecie
Mikołaja Kopernika w Toruniu*

Bydgoszcz, dnia 18.09.2024 r.

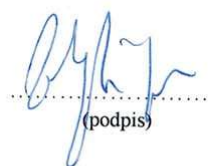
Dr hab. n. med. Jan Zabrzyński, prof. UMK

Katedra Ortopedii, Traumatologii i Chirurgii Plastycznej
Collegium Medicum um. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**Rada Dyscypliny Nauki Medyczne
Uniwersytetu Mikołaja
Kopernika w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy „Expression of genomic instability-related molecules: Cyclin F, RRM2 and SPDL1 and their prognostic significance in pancreatic adenocarcinoma”; Anna Klimaszewska-Wiśniewska, Karolina Buchholz, Izabela Neska-Długosz, Justyna Durślewicz, Dariusz Grzanka, Jan Zabrzyński, Paulina Sopońska-Brzoszczyk, Alina Grzanka, Maciej Gagat; Cancers (Basel) 2021; 13(4):859 mój udział polegał na ocenie barwienia immunohistochemicznego oraz wniesieniu uwag do manuskryptu.


(podpis)

Bydgoszcz, dnia 18.09.2024 r.

Dr n. med. Paulina Sopońska

Katedra Położnictwa, Chorób Kobietych i Ginekologii Onkologicznej
Collegium Medicum um. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Rada Dyscypliny Nauki Medyczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy „Expression of genomic instability-related molecules: Cyclin F, RRM2 and SPDL1 and their prognostic significance in pancreatic adenocarcinoma”; Anna Klimaszewska-Wiśniewska, Karolina Buchholz, Izabela Neska-Długosz, Justyna Durślewicz, Dariusz Grzanka, Jan Zabrzyński, Paulina Sopońska, Alina Grzanka, Maciej Gagat; Cancers (Basel) 2021; 13(4):859 mój udział polegał na wykonaniu barwienia immunohistochemicznego.

Dr n. med. Paulina Sopońska
Specjalista położnictwa i ginekologii
PWZ 3026366
(podpis)

15. ZGODY KOMISJI BIOETYCZNEJ NA PRZEPROWADZENIE DOŚWIADCZEŃ

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy

KOMISJA BIOETYCZNA

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

KB 342/2020

Bydgoszcz, 23.06.2020 r.

Działając na podstawie art.29 ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz.U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz.U. Nr 47 poz.480) oraz Zarządzenia Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

(skład podano w załączeniu), na posiedzeniu w dniu **23.06.2020 r.** przeanalizowała wniosek, który złożył kierownik badania:

dr hab. n. med. Dariusz Grzanka, prof. UMK
Katedra Patomorfologii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy

z zespołem w składzie

- dr hab. n. med. Maciej Słupski, dr hab. Łukasz Szyłberg, prof. UMK, dr n. med. Anna Klimaszewska-Wiśniewska, dr n. med. Ewa Domanowska, dr n. med. Natalia Skoczylas-Makowska, lek. Izabela Neska-Długosz, lek. Anna Kasperska, mgr Paulina Antosik, mgr Justyna Durślewicz, mgr Joanna Ligmanowska, mgr Joanna Gerc, Izabela Zarębska, Karolina Buchholtz, Arkadiusz Gzil, Damian Jaworski,

w sprawie badania:

„Ocena klinicznego znaczenia wybranych białek o potencjalnej roli w patogenezie nowotworu trzustki w grupie pacjentów onkologicznych leczonych operacyjnie.”

Po zapoznaniu się ze złożonym wnioskiem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania Komisja podjęła:

Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu wniosku

w sprawie przeprowadzenia badań w zakresie określonym we wniosku pod warunkiem uzyskania zgody osób badanych na wykorzystanie materiału biologicznego do celów naukowych, a w przypadku braku takiej zgody, analizowania jedynie materiału zanonimizowanego tj. pozbawionego danych personalnych (zgodnie z RODO).

Zgoda obowiązuje od daty podjęcia uchwały (23.06.2020 r.) do końca 2025 r.

Wydana opinia dotyczy tylko rozpatrywanego wniosku z uwzględnieniem przedstawionego projektu; każda zmiana i modyfikacja wymaga uzyskania odrębnej opinii

Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymuje:

dr hab. n. med. Dariusz Grzanka, prof. UMK
Katedra Patomorfologii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy
KOMISJA BIOETYCZNA
Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63

KB 300/2023

Bydgoszcz, 11.07.2023 r.

Działając na podstawie art.29 ustawy z dnia 5.12.1996 r. o zawodzie lekarza (Dz.U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152, wraz z późniejszymi zmianami), rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 26.01.2023r. w sprawie komisji bioetycznej oraz Odwoławczej Komisji Bioetycznej (Dz. U. 2023 poz. 218) oraz Zarządzenia nr 108 Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu z dnia 31 maja 2023r. w sprawie powołania komisji bioetycznej oraz zgodnie z zasadami zawartymi w DH i GCP.

Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

na posiedzeniu w dniu **11.07.2023 r.** przeanalizowała wniosek, który złożyła kierownik badania:

mgr Karolina Buchholz
Katedra Patomorfologii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy UMK w Toruniu

z zespołem w składzie:

prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Dariusz Grzanka, prof. dr hab. n. med. Alina Grzanka,
dr n. med. Anna Klimaszewska-Wiśniewska, mgr Karolina Buchholz

w sprawie badania:

„Ocena roli białka SPDL1 w modulacji chemiooporności komórek raka trzustki.”

Po zapoznaniu się ze złożonym wnioskiem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania Komisja podjęła

Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu wniosku

w sprawie przeprowadzenia badań w zakresie określonym we wniosku

Zgoda obowiązuje od daty podjęcia uchwały (11.07.2023 r.) do końca 2024 r.

Wydana opinia dotyczy tylko rozpatrywanego wniosku z uwzględnieniem przedstawionego projektu; każda zmiana i modyfikacja wymaga uzyskania odrębnej opinii.

Prof. dr hab. med. Mariusz Dubiel

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymuje:
mgr Karolina Buchholz
Katedra Patomorfologii Klinicznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy UMK w Toruniu