

Utjecaj dsRNA i cisplatine na povećanje osjetljivosti stanica tumora grkljana čovjeka na zračenje

Kobeščak, Antonio

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:030091>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Antonio Kobeščak

**UTJECAJ dsRNA I CISPLATINE NA POVEĆANJE
OSJETLJIVOSTI STANICA TUMORA GRKLJANA
ČOVJEKA NA ZRAČENJE**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Biokemija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskoga fakulteta i izrađen u Laboratoriju za molekularnu onkologiju Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković pod stručnim vodstvom mentorice dr. sc. Tanje Matijević Glavan, znanstvene suradnice, i komentorice prof. dr. sc. Karmele Barišić sa Zavoda za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem mentorici dr. sc. Tanji Matijević Glavan bez čijega velikog truda, pomoći i strpljenja ovaj rad ne bi tako uspješno bio priveden kraju te komentorici, prof. dr. sc. Karmeli Barišić, na svim savjetima. Također zahvaljujem zaposlenicima Laboratorija za molekularnu onkologiju IRB-a na ukazanoj susretljivosti, naročito dr. sc. Anđeli Horvat i tehničkoj suradnici Martini Pehar. Igoru Sajku i dr. sc. Branki Mihaljević iz Laboratorija za radijacijsku kemiju i dozimetriju Instituta Ruđer Bošković zahvaljujem na pomoći prilikom zračenja stanica.

POPIS KRATICA

cisPt	cisplatina, <i>cis</i> -diammindikloroplatina(II)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
dsRNA	dvolančana RNA
Gy	grej, jedinica za apsorbiranu dozu zračenja (engl. <i>Gray</i>)
HNSCC	karcinom pločastog epitela glave i vrata
LRR	regije bogate leucinom (engl. <i>Leucine-Rich Regions</i>)
PI3-K	fosfatidilinozitol-3-kinaza
poli(I:C)	poliinozilna:policitidilna kiselina
RNA	ribonukleinska kiselina
shRNA	kratka RNA u obliku ukosnice (engl. <i>short hairpin RNA</i>)
ssRNA	jednolančana RNA
TLR	Toll-like receptor

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Tumori	1
1.2. Toll-like receptori	2
1.3. Toll-like receptor 3	4
1.4. TLR u tumorskim stanicama	7
1.5. Liječenje zračenjem	8
1.6. Stanični ciklus	9
1.7. RNA interferencija (RNAi)	10
2. OBRAZLOŽENJE TEME	12
3. MATERIJALI I METODE	13
3.1. Stanična linija	13
3.2. Uzgoj stanica u kulturi i kemijski reagensi	14
3.3. Nasađivanje stanica za test formiranja kolonija (engl. <i>colony forming assay</i>)	15
3.4. Zračenje stanica gama-zrakama	15
3.5. Test formiranja kolonija (engl. <i>colony forming assay</i>)	16
3.6. Nasađivanje stanica za analizu staničnog ciklusa	17
3.7. Analiza staničnog ciklusa pomoću protočnog citometra	19
4. REZULTATI	21
4.1. Test formiranja kolonija (engl. <i>colony forming assay</i>) nakon tretmana stanica otopinom poli(I:C), cisplatinom i gama-zračenjem	21
4.2. Analiza staničnog ciklusa protočnim citometrom nakon tretmana stanica SQ20B otopinom poli(I:C), cisplatinom i γ -zračenjem	23
4.2.1 SQ20B/TLR3 ⁺	23
4.2.2 SQ20B/TLR3 ⁻	24
5. RASPRAVA	30
6. ZAKLJUČCI	35
7. LITERATURA	36
8. SAŽETAK	40
9. SUMMARY	41

1. UVOD

1.1. Tumori

Tumor ili neoplazma nastaje kao posljedica nenormalne proliferacije stanica koje izbjegnu obrambene mehanizme organizma. Uglavnom nastaje od jedne promijenjene stanice koja nekontrolirano izrasta u monoklonsku populaciju stanica. Iz nastale se populacije dalje klonskom selekcijom i pojavom novih mutacija izdvajaju stanice izraženijih svojstava preživljenja i invazivnosti. Tumori mogu biti dobroćudni i zloćudni (maligni). Zloćudni tumori nazivaju se još i rak. Ovisno o vrsti stanica, odnosno tkiva iz kojih nastaje, zloćudni se tumori dalje mogu podijeliti na karcinome (tumori epitelnog tkiva), sarkome (tumori vezivnog i potpornoga tkiva), leukemije (tumori krvnih stanica), limfome i mijelome (tumori koji potječu od raznih stanica imunološkoga sustava), melanome (tumori koji potječu od melanocita) i dr.

Zloćudni tumor epitelnoga tkiva (karcinom) najprije se pojavljuje kao adenom. Daljnjom proliferacijom stanica pretvara se u karcinom koji, u nekim slučajevima, prolazi bazalnu laminu te se širi u udaljena tkiva krvožilnim i limfnim, stvarajući sekundarne tumore, odnosno metastaze.

Karcinomi pločastoga epitela glave i vrata (HNSCC, engl. *head and neck squamous cell carcinoma*) s preko pola milijuna novih dijagnosticiranih slučajeva godišnje, predstavljaju šesti najčešći tumor u svijetu. HNSCC uključuju rak usana, usne šupljine, žlijezda slinovnica, nosne šupljine, sinusa, grla i ždrijela. Čimbenici rizika oboljenja od ovih karcinoma uključuju pušenje ili žvakanje duhana, uživanje alkohola te infekciju humanim papiloma virusom (HPV) i Epstein Barrovim virusom (EBV). Unatoč napretku u tehnikama vizualizacije tumora, kirurškim tehnikama i liječenju kemoterapijom i radioterapijom, stopa preživljenja bolesnika koji boluju od ovih karcinoma nije se značajnije mijenjala u posljednja tri desetljeća te iznosi oko 50% preživljenja u razdoblju od 5 godina nakon dijagnoze bolesti. Prognostički pokazatelji, kao i biomarkeri, u ovom tipu karcinoma za sada nisu pronađeni (Loyo i sur., 2013).

Dodatne poteškoće u liječenju svih vrsta tumora, pa tako i HNSCC, predstavlja česta pojava otpornosti tumorskih stanica na primijenjene citostatike, kao i otpornost na zračenje (radiorezistencija) te ponovna pojava tumora nakon prvotnoga izliječenja (recidiviranje tumora).

1.2. Toll-like receptori

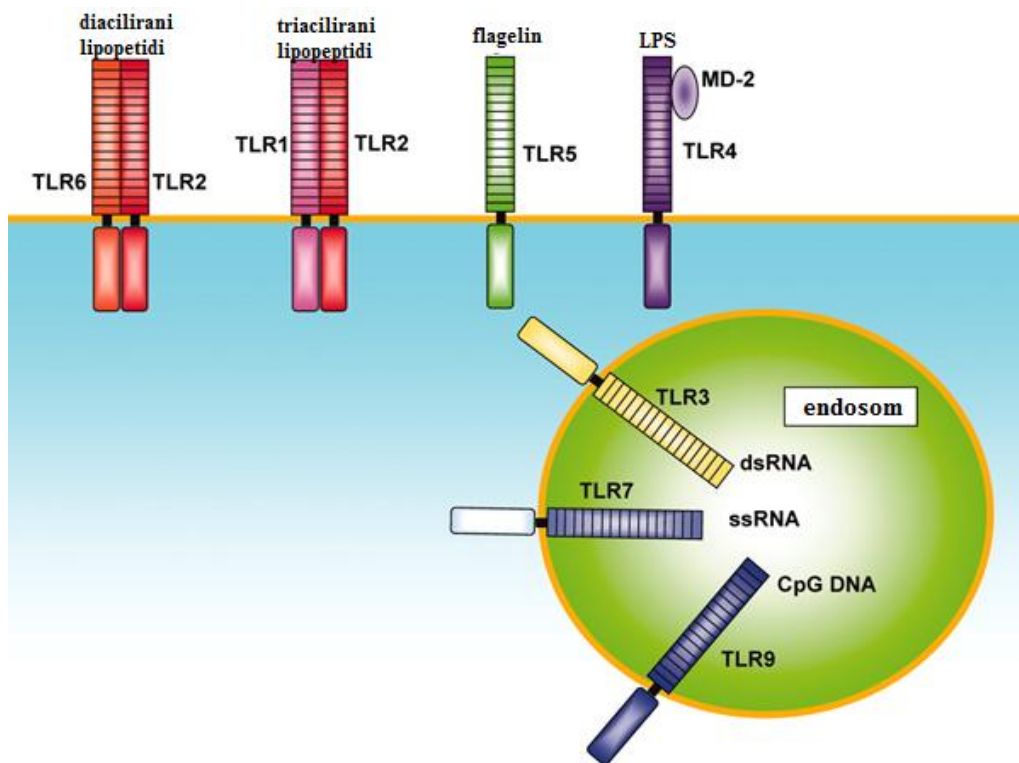
Toll-like receptori (TLR) pripadaju skupini evolucijski očuvanih receptorskih proteina PRR (od engl. *Pattern Recognition Receptors*) koji domaćinu omogućuju prepoznavanje patogenima pridruženih molekularnih sljedova, PAMP-a (od engl. *Pathogen Associated Molecular Patterns*). Najvažnija skupina unutar te porodice su TLR koji specifično prepoznaju i vežu brojne ligande podrijetlom od patogena (bakterijski flagelin, polipeptide, glikoproteine te virusnu RNA i DNA) aktivirajući prirodni i stečeni imunski odgovor.

TLR su dobili naziv prema genu *Toll* (od njem. izvanredno, odlično), najprije otkrivenom u vinskoj mušici (*Drosophila melanogaster*) 1984. godine, čiji proteinski produkt sudjeluje u razvoju dorzo-ventralne osi tijekom embriogeneze, a kasnije u obrani od gljivičnih infekcija. U sisavaca je prvo otkriven TLR4, receptor analogan Toll proteinu vinske mušice, a zatim još 12 različitih TLR-a, nazvanih TLR1 do TLR13. TLR su uglavnom izraženi na stanicama imunskog sustava te na endotelnim i epitelnim stanicama. Nedavno je dokazana prisutnost TLR-a u živčanom sustavu gdje igraju ulogu u obrani organizma od infekcija neurotrofnim virusima (Carty i sur., 2014), zatim u okusnim pupoljcima (Wang i sur., 2009) te tubulima i intersticijskom tkivu bubrega (Papadimitraki i sur., 2009). Osim molekularnih sljedova povezanih s patogenima, prepoznaju i endogene ligande koji se oslobađaju tijekom nekroze stanica domaćina uzrokovane upalom. Upravo su smještaj u stanici, ekspresija u različitim tkivima, specifičnost prema ligandima te način prijenosa signala svojstva prema kojima se TLR međusobno razlikuju (slika 1).

TLR 3, 7, 8 i 9 pretežno su smješteni unutarstanično, na membrani endosoma i prepoznaju unutarstanične ligande, poput nukleinskih kiselina. Ostali TLR smješteni su na površini stanica i prepoznaju vanstanične ligande podrijetlom od patogena.

TLR2 prepoznaje velik broj molekula podrijetlom iz mikroorganizama, poglavito lipopeptide i lipoproteine, zatim lipotehoidnu kiselinu, peptidoglikane Gram-pozitivnih bakterija, lipoarabinomana, zimosan iz gljivica, glikozil-fosfatidil-inozitolne glikolipide parazita *Trypanosoma cruzi* itd. Zbog mogućnosti funkcionalnog udruživanja s TLR1 i TLR6, može prepoznavati i male razlike između diaciliranih i triaciliranih lipopeptida. TLR4 prepoznaje lipopolisaharide (LPS) Gram-negativnih bakterija, dok TLR5 prepoznaje flagelin.

Unutarstanični TLR7 i TLR8 vežu jednolančanu virusnu RNA (ssRNA), TLR9 je receptor za bakterijsku DNA koja sadrži nemetilirane CpG motive, a TLR3 prepoznaje i veže dvolančanu RNA (dsRNA) (Takeda i Akira, 2005; Matijević i Pavelić, 2010).

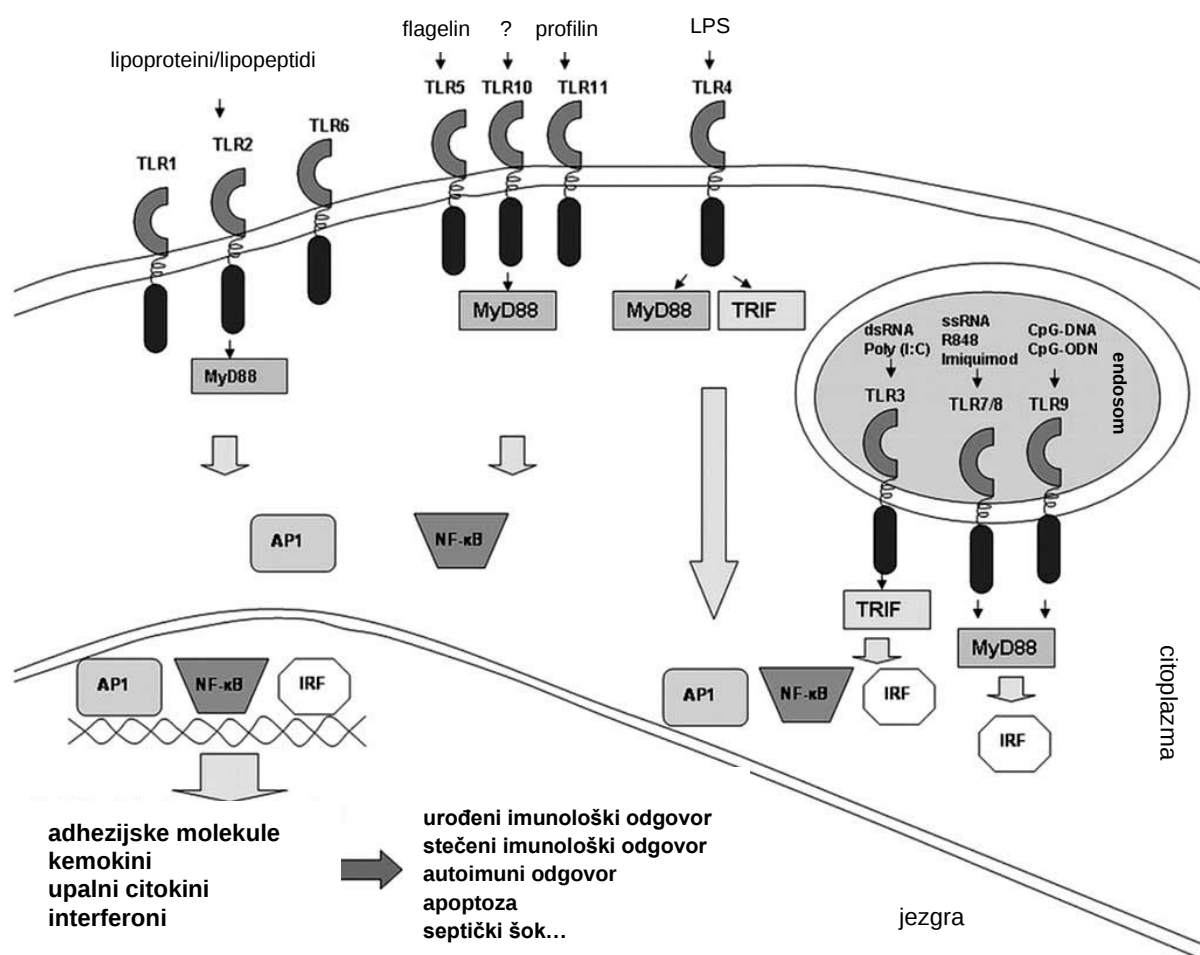


Slika 1. Toll-like receptori i njihovi ligandi. TLR 3, 7, 8 i 9 smješteni su unutar stanice, a ostali TLR nalaze se na površini stanice (preuzeto iz Takeda i Akira, 2005).

TLR i obitelj receptora za interleukin-1 (IL-1R) imaju homolognu citoplazmatsku domenu nazvanu TIR (od engl. *Toll/IL-1 Receptor*), građenu od 200 aminokiselinskih ostataka koji čine 5 omči, 5 β -nabranih ploča i 5 α -uzvojnica. Domena TIR može se podijeliti u 3 podjedinice: Box1, Box2 i Box3 koje su ključne u prijenosu signala. Izvanstanične domene ovih dviju porodica receptora značajno se razlikuju; TLR imaju domenu bogatu ponavljajućim sljedovima leucina (engl. *Leucine-Rich Repeats* – LRR), dok je domena IL-1 receptora nalik imunoglobulinu (engl. *Ig-Like*).

Nekoliko je adaptorskih proteina uključeno u signalni put pokrenut aktivacijom TLR-a: MyD88 (engl. *Myeloid Differentiation Factor 88*), Mal (engl. *MyD88 Adapter-Like*) ili TIRAP (engl. *TIR Domain-Containing Adapter Protein*), TRIF (engl. *TIR Domain-Containing Adapter Inducing Interferon- β*) i TRAM (engl. *TRIF-Related Adapter Molecule*). Adaptorski protein MyD88 prisutan je u signalnom putu svih TLR, osim TLR3, dok se signal TLR4 može kretati putom ovisnim o MyD88 i putom ovisnim o TRIF. Posljedica pokretanja puta prijenosa signala TLR-a aktivacija je transkripcijskih faktora NF- κ B (engl. *Nuclear Factor- κ B*), AP-1 (engl. *Activating Protein-1*) i IRF-3 (engl. *Interferon Regulatory Factor 3*), čime se pokreće transkripcija gena koji kodiraju za proteine uključene u imunosni odgovor:

adhezijske molekule, kemokine, upalne citokine, interferone, kostimulatorne molekule i dr. Na kraju dolazi do različitih učinaka na stanice: aktivacije urođenoga i stečenoga imunskog odgovora, autoimune reakcije, apoptoze, septičkog šoka itd. (slika 2).



Slika 2. Putovi prijenosa signala Toll-like receptora (preuzeto i prilagođeno iz Matijević i Pavelić, 2010).

1.3. Toll-like receptor 3

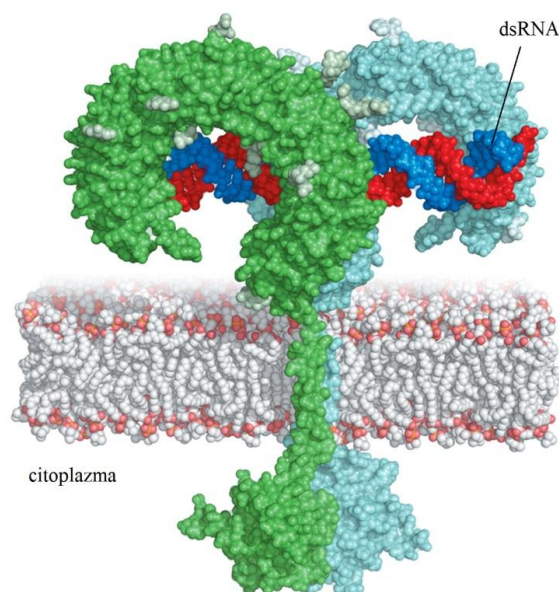
TLR3 je protein građen od 904 aminokiseline. U ljudi je kodiran genom *TLR3*, smještenim na dugom kraku četvrtog kromosoma na poziciji 35 (4q35) koji se sastoji od 15.942 parova baza i 5 eksona.

Izvanstanična domena TLR3 mjesto je vezanja liganda. Zavojnica je oblika potkove, načinjena od 23 regije LRR, pri čemu se najčešće ponavlja slijed od 24 lizina. Na domenu je vezano 15 *N*-vezanih glikana, osim na dijelu površine koja stupa u međudjelovanje s ligandom. Nedavno je utvrđeno da vezanjem dsRNA (dvolančana ribonukleinska kiselina)

dolazi do dimerizacije izvanstaničnih domena TLR3. Analizom kristalne strukture dimernog kompleksa receptora s dsRNA pronađeno je da postoje dva vezna mjesta za dsRNA i jedno vezno mjesto važno za stvaranje dimera na svakoj izvanstaničnoj domeni. Za vezanje liganda nužna je istovremena interakcija sva tri vezna mjesta (Wang i sur., 2010). Pri tome je svaka od interakcija na veznim mjestima slaba (Liu i sur., 2008), no zajedno povezuju ligand i receptor u kompleks visokog afiniteta (Wang i sur., 2010). Vezna mjesta za dsRNA na površini domene bez vezanih glikana značajno su udaljena; jedno je blizu *N*-kraja, a drugo blizu *C*-kraja. Zbog toga kratke dsRNA (poput onih prisutnih u nekim tRNA, miRNA i ribosomima) ne mogu aktivirati TLR3 jer je za stvaranje stabilnog kompleksa s receptorom nužno vezivanje na oba vezna mjesta zbog čega bi dsRNA trebala biti duljine od oko barem 45 parova baza (slika 3).

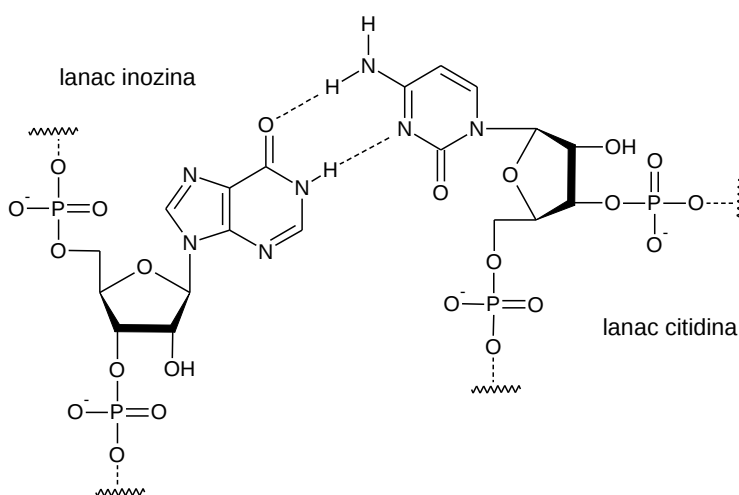
Transmembranska domena TLR3 sadrži 21 aminokiselinu i odgovorna je za smještaj receptora unutar stanice. Unutarstanična domena TIR ima glavnu ulogu u prijenosu signala.

Ligand TLR3 je dsRNA koja je genom dsRNA virusa ili produkt replikacije ssRNA (jednolančana ribonukleinska kiselina) virusa. Imunosna reakcija posredovana TLR3 smatra se prvom i glavnom linijom obrane organizma od virusnih infekcija. Pri tome je posebno značajan smještaj TLR3 u endosomima budući da se smatra kako virusna RNA ulazi u stanicu putem endosoma ili apoptotskih tijela koja potječu od stanica zaraženih virusom (Karikó i sur., 2008). Endogeni ligandi TLR3 mogu biti mRNA (engl. *messenger RNA*) te stanične endogene RNA koje stvaraju dvolančane sekundarne strukture poput ukosnice.



Slika 3. Prikaz kompleksa između dsRNA i Toll-like receptora 3 (preuzeto iz Liu i sur., 2008).

Ligandi za TLR3 su i sintetske dvolančane RNA te su stoga važne za istraživanje funkcije tih receptora. Najčešći sintetski ligand je poliinozilna:policitidilna kiselina, poli(I:C) (slika 4). Osim TLR3, može aktivirati i članove druge obitelji PRR-a, odnosno RLR-a (engl. *RIG-I-Like Receptors Family*). Njoj pripadaju proteini koji prepoznaju dsRNA, a smješteni su u citoplazmi: RIG-I (engl. *Retinoic Acid-Inducible Gene-1*) i MDA5 (engl. *Melanoma Differentiation Associated Gene-5*). Naime, receptori RIG-I i MDA5 su zbog svojega smještaja u citoplazmi vjerojatno uključeni u izravno prepoznavanje dsRNA koja nastaje tijekom replikacije virusa, dok TLR3 sudjeluje u kasnijoj fazi kada se dsRNA otpušta u izvanstanični prostor nekrozom ili lizom stanica te fagocitozom ulazi u stanicu i susreće se s TLR3 u endosomima. Smatra se da su se ovi različiti putovi prepoznavanja dsRNA razvili kako bi organizam što brže prepoznao i odgovorio na infekciju virusima.



Slika 4. Dio strukture poliinozilne:policitidilne kiseline [poli(I:C)].

Signalni put TLR3 započinje vezanjem liganda za receptor, što dovodi do pokretanja kaskade signala koja uključuje adaptorsku molekulu TRIF. TLR3 je jedini TLR čiji se signal prenosi putem neovisnim o MyD88, a putem adaptora TRIF. Signalni put TLR3 završava aktivacijom transkripcijskih čimbenika IRF-3, NF- κ B ili AP-1 koji aktiviraju stvaranje interferona tipa 1 (IFN), citokina i kemokina. Za prijenos signala putem TLR3 nužna je i fosforilacija njegove domene TIR koju provodi enzim fosfatidil-inozitol-kinaza (PI3-K) (Vercammen i sur., 2008).

1.4. TLR u tumorskim stanicama

Brojna su nedavna istraživanja pokazala da su TLR izraženi na stanicama raznih vrsta tumora i tumorskih staničnih linija. Prvi opisan slučaj povezanosti TLR-a i tumora bio je za rak želuca (Schmausser i sur., 2005). Potom je dokazana prisutnost TLR2, -3 i -4 na staničnim linijama HT29, CaCo2, DLD i LoVo (Furrie i sur., 2005), TLR2, -3, -4, -6 i -9 na stanicama hepatocelularnoga karcinoma Hep2 i PLC/PRF/5 (Nishimura i Naito, 2005), TLR4 u epitelnim stanicama raka jajnika i neuroblastomu (Hassan i sur., 2006), TLR3, -4 i -9 kod raka dojke (Merrell i sur., 2006; Salaun i sur., 2006), zatim TLR3 i 9 kod raka prostate (Ilvesaro i sur., 2007; Paone i sur., 2008), TLR2, 3, 4 i 9 kod raka pluća (Droemann i sur., 2005; He i sur., 2007) te TLR7 i 8 kod raka gušterače (Grimmig i sur., 2015).

Svakodnevno se otkriva prisutnost TLR-a i na raznim drugim tumorskim tkivima. Tako je, primjerice, pokazano da se TLR4 nalaze na stanicama tumora rektuma, ali ne i na normalnim stanicama epitela kolona (Tchórzewski i sur., 2014). Također, nađeno je da su TLR2, -3, -4 i -9 jače izraženi na stanicama tumora testisa nego u zdravom tkivu testisa (Shapouri i sur., 2013). Zbog proturječnih rezultata, uloga TLR u tumorima nije potpuno jasna. S jedne strane, pokazano je da TLR tumorskim stanicama mogu omogućiti izbjegavanje apoptoze i imunskog odgovora te povećati invazivnost i preživljenje stanica (Xie i sur., 2009; Grimmig i sur., 2015). S druge strane, Salaun i suradnici su pokazali da aktivacijom TLR3 dolazi do apoptoze u stanicama tumora dojke, i to signalnim putem ovisnim o adapteru TRIF. Slično, utvrđeno je da TLR3 pokreće apoptozu stanica tumora prostate, u ovom slučaju putem protein-kinaze C koja aktivira JNK (engl. *Jun N-Terminal Kinase*) i p38 te dovodi do apoptoze ovisne o kaspazi 8 (Paone i sur., 2008).

U još jednom istraživanju pokazano je da se aktivacijom TLR3 pomoću liganda poli(I:C) u stanicama melanoma u kombinaciji s cikloheksimidom ili IFN α (engl. *Interferon α*) inducira apoptoza i smanjuje proliferacija stanica tumora (Salaun i sur., 2007). Također, Matijević i suradnici pokazali su da je funkcionalan TLR3 eksprimiran u stanicama tumora metastaza karcinoma ždrijela te da njegova aktivacija uzrokuje apoptozu stanica tumora.

Slijedom navedenoga, dosadašnji rezultati daju naslutiti da bi se agonisti TLR3 možda mogli koristiti kao protutumorski lijekovi, naročito u onim slučajevima u kojima su TLR3 izraženi selektivno u stanicama tumora, ali ne i u zdravom tkivu. Također, kombiniranjem agonista TLR3 s uobičajenom protutumorskom terapijom moglo bi se pojačati uništavanje stanica tumora pri vrlo niskim koncentracijama citostatika, čime bi se smanjila neželjene nuspojave kemoterapije kod onkoloških bolesnika.

1.5. Liječenje zračenjem

Radioaktivnim raspadom dolazi do emisije tri tipa zraka: α (jezgre atoma helija, ${}^4_2\text{He}$), β (elektroni) i γ (fotoni vrlo malih valnih duljina). γ -zračenje je zračenje vrlo velike energije i prodornosti, a zaustavlja ga tek debeli olovni štit.

U liječenju bolesnika s tumorom koristi se ionizirajuće zračenje koje prolaskom kroz tkiva stvara ione ili oštećuje DNA i pri tome dovodi do smrti stanica. Ovisno o položaju izvora zračenja postoje teleradioterapija i brahiradioterapija. Teleradioterapija podrazumijeva oblik zračenja kod kojega je izvor zračenja izvan tijela, dok je brahiradioterapija oblik liječenja pri kojem se radioaktivni materijal unosi u organizam bolesnika. Time se omogućuje ciljano dostava visokih doza zračenja u tkivo tumora, dok su zdrave stanice manje pogođene zračenjem.

Najčešće primjenjivana vrsta ionizirajućeg zračenja u liječenju bolesnika s tumorom je fotonsko zračenje visoke energije i velike prodornosti (x-zrake i gama-zrake). Dobiva se iz radioaktivnih izotopa kobalta i cezija pomoću linearnih akceleratora. Upotrebljava se i čestično zračenje, poput elektrona, protona, neutrona te alfa i beta čestica, ovisno o lokalizaciji i tipu tumora te ciljanoj dubini prodora u tijelo.

Elektronske zrake niske su energije i ne prodiru duboko pa se koriste za liječenje tumora smještenih blizu površine kože. Protonsko zračenje ne uzrokuje velika oštećenja tkiva kroz koja prolazi, zbog čega ima manje nuspojava. Neutronsko zračenje koristi se za uništenje stanica nekih tumora glave, vrata i prostate. Može poslužiti kao alternativa ostalim vrstama radioterapije kod nekih radiorezistentnih i neoperabilnih tumora, ali uzrokuje teže nuspojave.

Zračenje se koristi u liječenju tumora i to često u kombinaciji s kemoterapijom zbog sinergističkog učinka. Zračenje uzrokuje lomove DNA što dovodi do apoptoze stanica. Međutim, stanice tumora često postaju otporne na ionizirajuće zračenje (radiorezistencija) zbog poremećaja u regulaciji apoptoze ili radiorezistencije koja se pojavljuje zbog hipoksičnih uvjeta u mikrokolišu tumora. Pri liječenju zračenjem to dovodi do potrebe za povećanjem doze zračenja što na kraju nepovoljno djeluje na normalne, zdrave stanice, a uključuje i brojne nuspojave poput mučnine i povraćanja, kožnih reakcija, gubitka kose i drugih tkivno-specifičnih nuspojava. Doza fotonskoga zračenja koja se koristi u liječenju ovisi o tipu i stadiju u kojem se nalazi tumor, a izražava se u grejima (*gray*, Gy). Tipične doze za liječenje solidnih tumora epitela iznose 60 – 80 Gy, dok su za limfome nešto niže, 20

– 40 Gy. Adjuvantne doze kreću se u rasponu od 4 do 60 Gy u frakcijama od po 1,8 – 2 Gy za tumor dojke te tumore glave i vrata.

Predtretmanom kemoterapeuticima može se povoljno utjecati na uništenje tumora zračenjem poticanjem radiosenzitivnosti stanica tumora. Time se smanjuje potrebna doza zračenja što rezultira ublažavanjem često vrlo teško podnošljivih nuspojava liječenja.

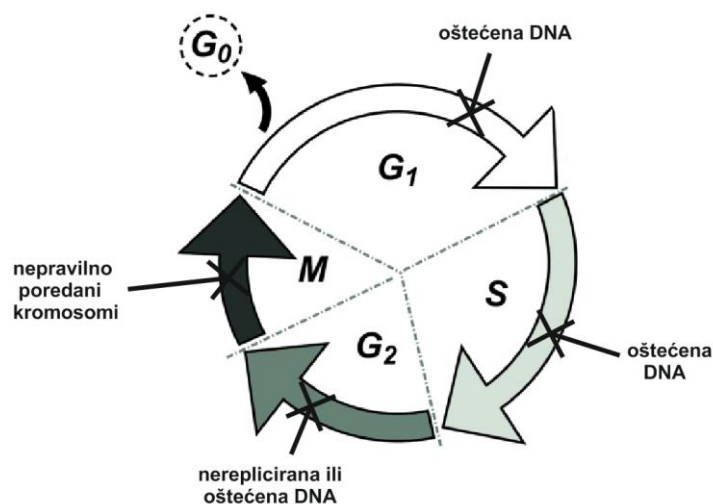
1.6. Stanični ciklus

Stanični ciklus u eukariota traje približno 24 sata i može se podijeliti u dva osnovna dijela, mitozu i interfazu. Nadalje, interfaza se dijeli u tri faze: G_1 (engl. *Gap 1*), S (engl. *Synthesis*) i G_2 (engl. *Gap 2*). Tijekom faze G_1 stanica je metabolički aktivna i priprema se za udvostručenje DNA koje se događa u fazi S. Nakon sinteze DNA, stanica ulazi u fazu G_2 u kojoj se nastavlja stanični rast i sinteza proteina potrebnih za mitozu. U fazi M (mitoza) dolazi do razdvajanja kromosoma i citokineze pri čemu nastaju stanice kćeri koje ponovo započinju svoj stanični ciklus ulaskom u fazu G_1 . Osim u fazu G_1 , stanica može ući i u fazu mirovanja (G_0) u kojoj je metabolički aktivna, ali se ne dijeli.

Stanice se u različitim fazama staničnoga ciklusa mogu raspoznati prema sadržaju DNA. U fazi G_0 i G_1 su diploidne ($2n$), tijekom S-faze za vrijeme replikacije udvostručuje se količina DNA (od $2n$ na $4n$) i takvom ostaje i tijekom faza G_2 i M. Tek nakon citokineze, kada nastanu dvije nove stanice, svaka ponovo ima $2n$ broja kromosoma (molekula DNA). Navedene je promjene moguće analizirati protočnim citometrom i odrediti udjele stanica u pojedinim fazama staničnoga ciklusa.

U staničnome ciklusu postoje kontrolne točke koje osiguravaju da se samo ispravno replicirani i neoštećeni genomi prenose u stanice-kćeri. Kontrolne točke u fazi G_1 i S zaustavljaju stanični ciklus uslijed oštećenja DNA, a u fazi G_2 ciklus se zaustavlja ukoliko DNA nije u potpunosti replicirana ili je oštećena. Kontrolnu točku u fazi M stanice ne mogu proći ukoliko se kromosomi nisu pravilno poredali na diobenom vretenu (slika 5).

Budući da zračenje i tretman stanica interkalirajućim agensima poput cisplatine uzrokuje oštećenja stanične DNA, stanice se zaustavljaju u pojedinim fazama staničnoga ciklusa.



Slika 5. Stanični ciklus stanice i kontrolne točke.

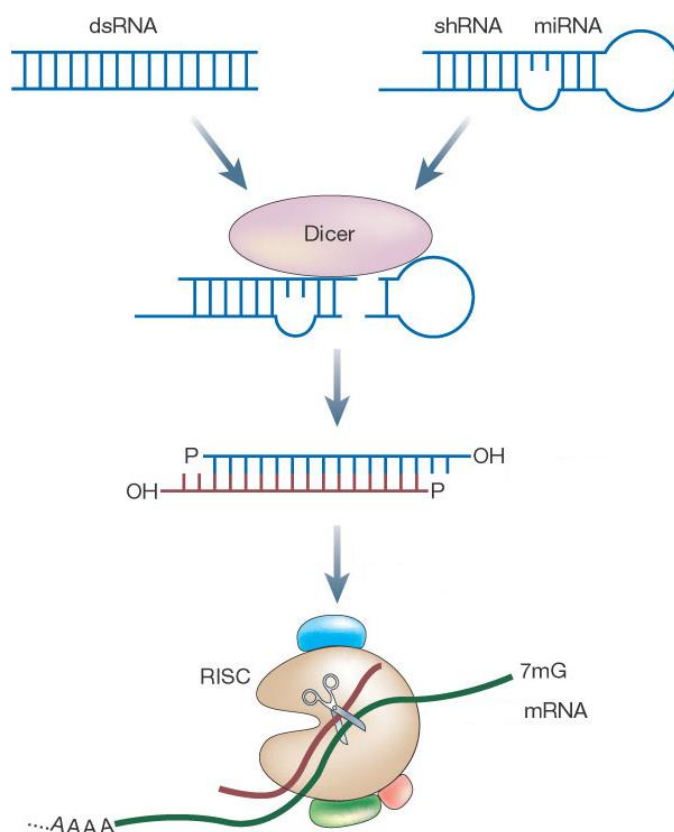
1.7. RNA interferencija (RNAi)

Najnovije spoznaje upućuju na postojanje još jednoga načina postranskripcijske regulacije ekspresije gena nekodirajućim molekulama RNA (ncRNA, od engl. *non-coding RNA*), nazvanog RNA interferencija (RNAi). RNAi uključuje upotrebu malih interferirajućih RNA (siRNA, od engl. *small interfering RNA*), mikroRNA (miRNA) i malih RNA ukosnica (shRNA od engl. *small hairpin RNA*). U stanicama sisavaca, posttranskripcijsko utišavanje gena većinom je posredovano miRNA, pri čemu se dvolančane miRNA prevode u kratke dsRNA nizom reakcija koje uključuju enzim sličan citoplazmatskoj ribonukleazi III, nazvan protein rezač (engl. *Dicer*) i kompleks utišavanja induciran ribonukleinskom kiselinom (RISC) (engl. *RNA-induced silencing complex*). Nastale kratke dsRNA (19 – 25 parova baza) sastoje se od protusmislenog (glavnog) lanca, komplementarnog ciljnog genu, i smislenog (putničkog) lanca. RISC prepoznaje glavni lanac i veže dsRNA preko proteina Argonauta 2 (Ago2). Komponenta RISC-a je i helikaza ovisna o ATP-u koja razdvaja dvostruku uzvojniju i omogućuje razgradnju putničkog lanca proteinom Ago2. Preostali glavni lanac, odnosno ssRNA, sada može hibridizirati s komplementarnom glasničkom RNA (mRNA, od engl. *messenger RNA*) i ponovno dovesti do kidanja nastale dsRNA proteinom Ago2. Razgrađena mRNA može se dalje kidati raznim egzonukleazama, pri čemu je u konačnici onemogućena njezina transkripcija (Matokanović i Barišić, 2009).

Specifično i učinkovito utišavanje gena metodom RNAi postiže se upotrebom siRNA ili shRNA. Molekule shRNA nastaju u jezgri i građene su od dva komplementarna RNA

lanca duljine 19 – 22 parova baza povezana kratkom petljom duljine 4 – 11 parova baza, zbog čega oblikom podsjećaju na ukosnicu. Nakon dostave u stanicu te transkripcije u jezgri RNA polimerazom II ili III, nastali primarni transkript obrađuje se enzimima unutar jezgre te prenosi u citoplazmu putem transportera eksportina 5. Nastala shRNA dalje se uključuje u kaskadu RNAi obradom proteinom rezačem koji uklanja petlju te stvara dsRNA sličnu miRNA. Ulaskom u kompleks RISC, analogno miRNA, dolazi do razgradnje ciljne mRNA (Rao i sur., 2009) (slika 6).

Postoji nekoliko metoda dostave siRNA i shRNA u stanice; mogu se koristiti vektori poput retrovirusa, adenovirusa i lentivirusa (Matokanovic i Barisic, 2009). U istraživanjima se koriste komercijalno dostupni plazmidi.



Slika 6. Kaskada reakcija RNAi koja dovodi do razgradnje ciljne mRNA.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Prethodnim istraživanjima pokazano je da su TLR3 izraženi na metastatskim linijama stanica ždrijela čovjeka te da se njihovom aktivacijom potiče apoptoza stanica tumora (Matijević i sur., 2011). Stoga je u istraživanju na liniji stanica SQ20B (pločaste stanice tumora grkljana) ispitivan učinak agonista TLR3 receptora poli(I:C), cisplatine i γ -zračenja na preživljenje stanica i stanični ciklus. Specifični ciljevi istraživanja su:

1. ispitati i usporediti učinak pojedinačne primjene te kombinacije poli(I:C), cisplatine i zračenja na preživljenje stanica tumora SQ20B s normalno eksprimiranim TLR3 (SQ20B/TLR3⁺) i stanica s utišanim genom za TLR3 (SQ20B/TLR3⁻).

2. istražiti postoji li sinergistički utjecaj kombinirane primjene agonista poli(I:C) i konvencionalnoga citostatika cisplatine na zaustavljanje proliferacije stanica tumora SQ20B u pojedinim fazama staničnoga ciklusa.

Naglasak je u ovom diplomskom radu stavljen na istraživanje razlike u odgovoru stanica s funkcionalnim TLR3 (SQ20B/TLR3⁺) i stanica s utišanim TLR3 (SQ20B/TLR3⁻) na tretman kemoterapijom i zračenjem. Rezultati ovoga rada mogli bi pomoći u rasvjetljavanju uloge TLR3 u biologiji stanica tumora, naročito zbog činjenice da TLR pomažu invazivnosti i rastu određenih tumora, dok njihova aktivacija kod nekih vrsta tumora uzrokuje programiranu staničnu smrt. Pretpostavka je da bi kombinirana primjena kemoterapeutika cisplatine, poli(I:C) kao liganda za TLR3 i gama-zračenja mogla poslužiti kao novi oblik liječenja tumora glave i vrata. Pokaže li se ova hipoteza točnom, liječenje oboljelih od tumora moglo bi se provoditi znatno učinkovitije i selektivnije i to nižim dozama kemoterapeutika i zračenja što bi kao pozitivnu posljedicu imalo smanjenje teških nuspojava koje se pojavljuju tijekom uobičajenoga liječenja citostaticima i zračenjem.

Nadalje, s obzirom na to da do sada nisu provedena istraživanja analize staničnoga ciklusa nakon tretmana stanica ovom kombinacijom kemoterapije i zračenja, dobiveni će rezultati također poslužiti daljnjem razumijevanju funkcije TLR3 u tumorima glave i vrata te kao podloga za buduća istraživanja u ovom području.

3. MATERIJALI I METODE

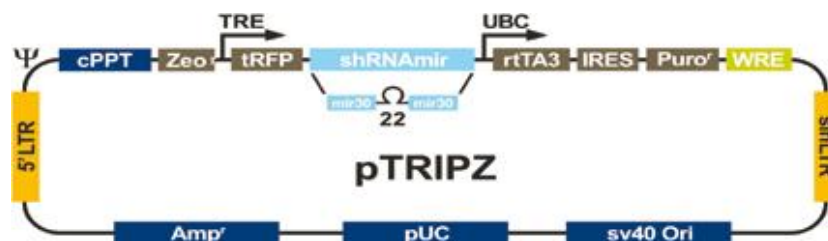
3.1. Stanična linija

Istraživanje je provedeno na liniji stanica SQ20B (pločaste stanice tumora grkljana) koja nam je ustupljena ljubaznošću prof. Pierrea Bussona (Institut Gustave Roussy, Villejuif, Francuska). U njegovom laboratoriju napravljena je stabilna transfekcija i izolacija klonova stanica SQ20B. Klonovi stanica SQ20B/TLR3⁺ sadrže transfeciran kontrolni (prazni) plazmid, dok klonovi stanica SQ20B/TLR3⁻ stabilno transfeciran plazmid pTRIPZ koji sadrži gen za shRNA koja specifično prepoznaje mRNA za TLR3. Dodatkom doksiciklina u hranjivu tekuću podlogu, potiče se ekspresija shRNA u stanicama SQ20B/TLR3⁻ koja aktivira putove RNAi, što u konačnici dovodi do razgradnje mRNA i utišavanja ekspresije TLR3.

Koristeći plazmid pTRIPZ može se postići inducirana ekspresija shRNA u prisutnosti doksiciklina (Tet-On konfiguracija) ili bez doksiciklina (Tet-Off konfiguracija). Plazmid s Tet-On konfiguracijom sadrži dvije glavne sastavnice koje omogućuju indukciju: modificirani element odgovora na tetraciklin (TRE, engl. *tetracycline response element*) i transaktivator. Modificirani TRE sastoji se od niza operatora fuzioniranih s minimalnim promotorom citomegalovirusa (CMV), posjeduje manju bazalnu ekspresiju u odnosu na prirodnu varijantu i jače vezanje s transaktivatorom. Transaktivator je reverzni tetraciklinski transaktivator 3 (rtTA3, engl. *reverse tetracycline transactivator 3*) koji se u prisutnosti doksiciklina veže na TRE i aktivira transkripciju na promotoru TRE.

Dodatna značajka plazmida pTRIPZ je prisutnost gena izvjestitelja, odnosno gena za crveni fluorescentni protein TurboRFP (tRFP, engl. *red fluorescent protein*) koji je smješten nizvodno od TRE, a prije gena za shRNA. Budući da se tRFP i shRNA prepisuju kao jedan transkript, ovime se omogućuje jednostavno vizualno praćenje inducirane ekspresije putem TRE promotora (bazalna ekspresija, viralni titar, učinkovitost/uspješnost transfekcije itd.).

Plazmid sadrži još i gen za rezistenciju na puromicin za probiranje stanica sa stabilno transfeciranim plazmidom, pri čemu stanice koje nisu primile plazmid umiru u mediju s puromicinom (slika 7).



Slika 7. Plazmid pTRIPZ.

3.2. Uzgoj stanica u kulturi i kemijski reagensi

Zamrznute stanice bile su pohranjene u hladnjaku s tekućim dušikom na temperaturi od $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Za potrebe pokusa, ampulica sa stanicama izvađena je iz tekućeg dušika i uronjena u vodenu kupelj pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ uz lagano miješanje. Nakon kratkog odmrzavanja u vodenoj kupelji, stanicama je promijenjena hranjiva podloga te su prenesene u sterilnu posudu za uzgoj s hranjivom tekućom podlogom zagrijanom na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ i smještene u inkubator.

Stanice su potom uzgajane u plastičnoj boci za stanične kulture T-25 u hranjivoj tekućoj podlozi DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; Sigma-Aldrich, Njemačka) obogaćenoj 10 %-tnim serumom fetusa telea (engl. *Fetal Bovine Serum* - FBS; Sigma-Aldrich, Njemačka) i uz dodatak 2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich, Njemačka) i puromicina (Sigma-Aldrich, Njemačka) koji služi za selekciju stanica s plazmidom. Za poticanje ekspresije shRNA u stanicama SQ20B korišten je doksiciklin (Sigma-Aldrich, Njemačka). Stanice su rasle u sterilnim plastičnim posudama u vlažnoj atmosferi u inkubatoru pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ uz 5 % CO_2 . Za potrebe pokusa presađivane su kada su dosegle 70 – 80 % konfluentnosti.

Za ispiranje stanica korišten je pufer PBS (engl. *Phosphate Buffered Saline*, fosfatni pufer, pH = 7,4) bez Ca^{2+} i Mg^{2+} (Sigma-Aldrich, Njemačka), a za odvajanje stanica od podloge otopina tripsin/EDTA (0,25 %, Sigma-Aldrich, Njemačka). Za tretman stanica korištene su sljedeće matične otopine: poli(I:C) (1 mg/mL, InvivoGen, SAD) i cisplatina (1700 $\mu\text{mol/L}$, Sigma-Aldrich, Njemačka). U pokusima su korišteni i formaldehid (Kemika, Hrvatska), boja kristal violet (1%, Sigma-Aldrich, Njemačka), 100%-tni etanol (Kemika, Hrvatska), propidijev jodid (50 $\mu\text{g/mL}$, Sigma-Aldrich, Njemačka) te RNaza (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Sigma-Aldrich, Njemačka).

3.3. Nasađivanje stanica za test formiranja kolonija (engl. *colony forming assay*)

Za test nastajanja kolonija iz sterilnih je posuda iznad stanica odstranjen medij i potom su stanice isprane PBS-om te tripsinom. Posude su zatim odložene u inkubator na 5 – 10 minuta. Nakon što su se stanice odvojile od podloge, što je potvrđeno promatranjem svjetlosnim mikroskopom, u bocu je dodano 3 mL tekuće hranjive podloge koja zaustavlja djelovanje tripsina, sadržaj boce resuspendiran višestrukim uvlačenjem i ispuštanjem iz pipete i premješten u sterilnu epruvetu.

Potom je određen broj živih stanica bojanjem tripanskim modrilom u omjeru 1:5 (20 μ L suspenzije stanica + 80 μ L tripanskoga modrila) i promatranjem pod svjetlosnim mikroskopom u Neubauerovoj komorici. Broj živih stanica u 1 mL određen je prema jednadžbi:

$$\text{broj stanica u 1 mL} = \frac{\text{broj živih stanica}}{0,4} \times \text{razrjeđenje} \times 10^3.$$

Nakon što je izračunata koncentracija stanica, na po dvije pločice sa 6 bunarića za svaku podpopulaciju stanica SQ20B nasađeno je 3×10^3 stanica u prva četiri bunarića. Svaki je bunarić sa stanicama potom nadopunjen s po 2 mL tekuće hranjive podloge i 4 μ L doksiciklina (radna koncentracija iznosi 2 μ L na 1 mL medija).

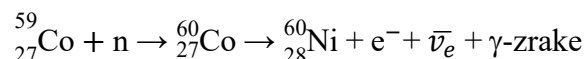
Sljedećega jutra iznad stanica je najprije pažljivo uklonjena hranjiva tekuća podloga. Zatim je proveden tretman otopinom poli(I:C), 10 μ g/mL, otopinom cisplatine, 0,1 μ mol/L, te kombinacijom 10 μ g/mL poli(I:C) + 0,1 μ mol/L cisplatine. Svaki je bunarić nadopunjen hranjivom tekućom podlogom do ukupnog volumena 2 mL te je dodano po 4 mL doksiciklina.

Nakon 45-minutnog tretmana stanica kemoterapeuticima, stanice na jednoj pločici zračene su dozom zračenja od 1 Gy. Druga je pločica poslužila kao kontrola za zračenje.

3.4. Zračenje stanica gama-zrakama

Stanice su zračene gama-zrakama, pri čemu je kao izvor zračenja korišten radioaktivni izotop kobalta-60 (^{60}Co , poluvremena raspada $t_{1/2} = 5.2714$ godina) na panoramskom uređaju u Institutu Ruđer Bošković. Izotop ^{60}Co nastaje reakcijom neutrona i izotopa ^{59}Co . Beta

radioaktivnim raspadom uzbuđene jezgre ^{60}Co do stabilnog izotopa nikla-60 (^{60}Ni) emitiraju se i dvije gama zrake (1,17 i 1,33 MeV) prosječne energije od 1,25 MeV:



Za tretman gama-zračenjem, pločice s nasađenim stanicama postavljene su na udaljenosti od 240 cm od centra plašta u kojima se nalazi izvor zračenja i na visini 72 cm od poda. Brzina doze izračunata je dozimetrijskim mjerenjem ionizacijskom komorom i vremenom poluraspada ^{60}Co , a iznosila je oko 10 mGy/s. Za dozu zračenja od 1 Gy stanice je bilo je potrebno zračiti oko 100 s, a za dozu od 2,5 Gy oko 4 minute.

3.5. Test formiranja kolonija (engl. *colony forming assay*)

Test formiranja kolonija ili klonogeni test je *in vitro* metoda određivanja preživljenja stanica koja se temelji na mogućnosti pojedinačne stanice da izraste u koloniju. Kolonija je pritom definirana kao skup od barem 50 stanica. Pri tome se prati sposobnost svake stanice u populaciji i testira se svojstvo neograničenoga rasta, tj. formiranja klonova, što je i posebno obilježje tumorskih stanica. Ovaj test metoda je izbora prilikom određivanja preživljenja stanica nakon tretmana ionizirajućim zračenjem ili za određivanje učinkovitosti citotoksičnih agensa, budući da samo mali dio izloženih stanica zadrži sposobnost stvaranja kolonija. Nakon tretmana preživjelim je stanicama potrebno je oko 1 – 3 tjedna za formiranje kolonija (Franken i sur., 2006).

Bojenju kristal violetom pristupilo se nakon približno 15 dana, odnosno nakon što kolonije zauzmu približno trećinu vidnoga polja okulara svjetlosnog mikroskopa.

Iznad stanica se odstrani medij i bunarići isperu PBS-om, nakon čega se u svaki doda 2 mL otopine 4%-tnog formaldehida koja služi za fiksiranje kolonija stanica. Nakon 10 minuta, bunarići se ponovno isperu PBS-om i potom u svaki nanese boja, 1%-tna otopina kristal violeta. Pločice se prekriju aluminijskom folijom kako bi se zaštitile od svjetlosti i ostave 1 sat na sobnoj temperaturi. Nakon toga se iz svakog bunarića ispiranjem vodovodnom vodom ukloni suvišak kristal violeta koji se nije vezao na stanice i pločice pohrane na 4 °C, zaštićene od svjetlosti.

U takvim uvjetima stanice se pohranjuju do trenutka fotografiranja bunarića s kolonijama.

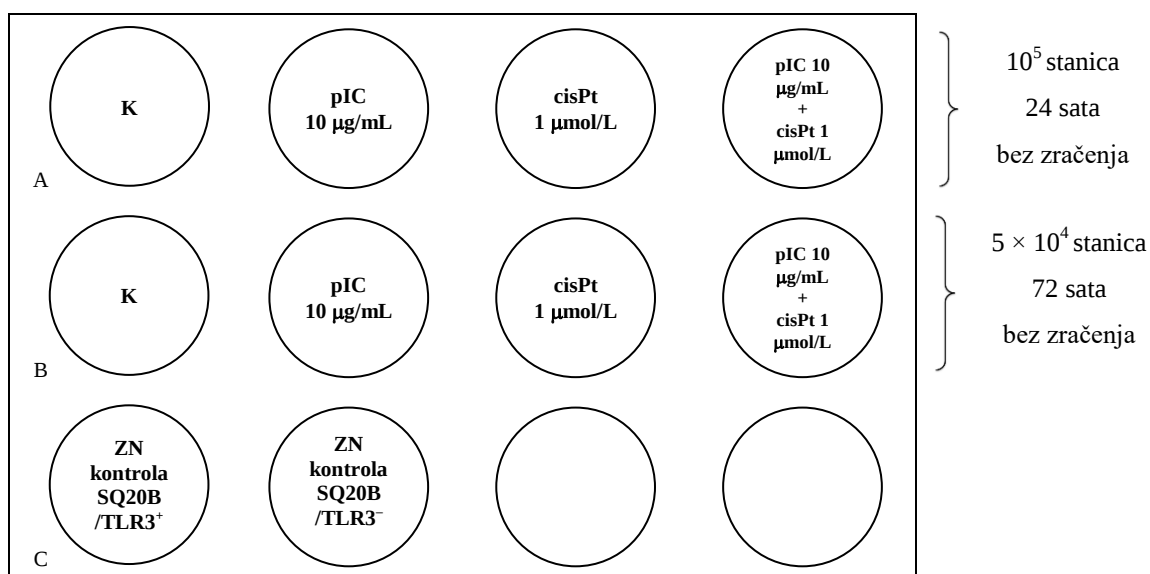
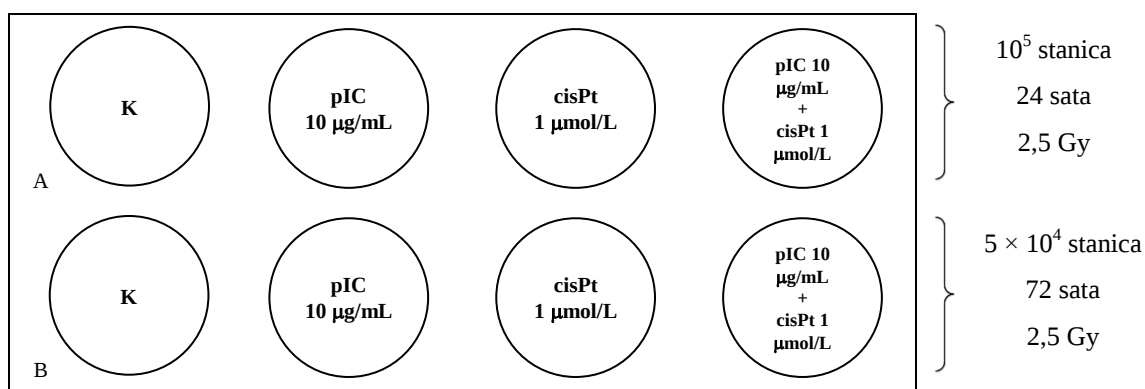
3.6. Nasađivanje stanica za analizu staničnoga ciklusa

Nakon brojanja, svaka je podpopulacija stanica SQ20B nasađena na dvije sterilne pločice za uzgoj stanica s 12 bunarića. Na obje je pločice u četiri bunarića nasađeno po 10^5 stanica u svaki bunarić, a u sljedeća četiri bunarića dvostruko manje, po 5×10^4 stanica u svaki bunarić. Razlika u broju stanica načinjena je zbog toga što će stanice u potonjem slučaju rasti u bunariću 48 h duže prije mjerenja na protočnom citometru. Na jednoj je od pločica nasađeno još po 10^5 stanica svake podpopulacije u zasebne bunariće, za namještanje parametara pri analizi protočnim citometrom.

Stanični ciklus analiziran je na sljedeći način:

- a) 24 sata nakon tretmana otopinom poli(I:C)/cisplatina, bez zračenja,
- b) 72 sata nakon tretmana otopinom poli(I:C)/cisplatina, bez zračenja,
- c) 24 sata nakon tretmana otopinom poli(I:C)/cisplatina i γ -zračenjem doze 2,5 Gy,
- d) 72 sata nakon tretmana otopinom poli(I:C)/cisplatina i γ -zračenjem doze 2,5 Gy.

Dan nakon nasađivanja obje podpopulacije stanica tretirane su prema shemi (slika 8). Stanice su potom inkubirane tijekom 45 minuta i potom su stanice jedne pločice zračene dozom zračenja od 2,5 Gy, dok stanice s druge pločice nisu zračene, te su poslužile kao kontrola za zračenje.

A**B**

Slika 8. (A) Shema tretmana stanica na mikrotitarskoj pločici s 12 bunarića. Stanice su tretirane kombinacijama pIC i cisPt u naznačenim koncentracijama. Stanični ciklus analiziran je 24 h, odnosno 72 h nakon tretmana.

(B) Shema tretmana stanica na mikrotitarskoj pločici s 12 bunarića (prikazano 8 bunarića). Nakon tretmana s pIC i cisPt u naznačenim koncentracijama, stanice su podvrgnute gama-zračenju doze 2,5 Gy (K = kontrola, netretirane stanice; pIC = poli(I:C); cisPt = cisplatina; ZN = stanice za namještanje parametara protočnog citometra).

3.7. Analiza staničnoga ciklusa pomoću protočnoga citometra

Analiza staničnoga ciklusa protočnim citometrom temelji se na činjenici da se stanice u različitim fazama staničnoga ciklusa razlikuju u sadržaju DNA. Upotrebom fluorescentne boje propidijeva jodida, koji se veže na jezgrinu DNA, te mjerenjem fluorescencije svake stanice u populaciji moguće je odrediti udio stanica u pojedinoj fazi ciklusa pri čemu je fluorescencija propidijeva jodida u stanicama u fazi G_2/M dvostruko veća od fluorescencije propidijeva jodida u stanicama koje se nalaze u fazi G_0/G_1 . Za stanice u fazi S, izmjerena vrijednost fluorescencije nalazi se u rasponu između te dvije vrijednosti.

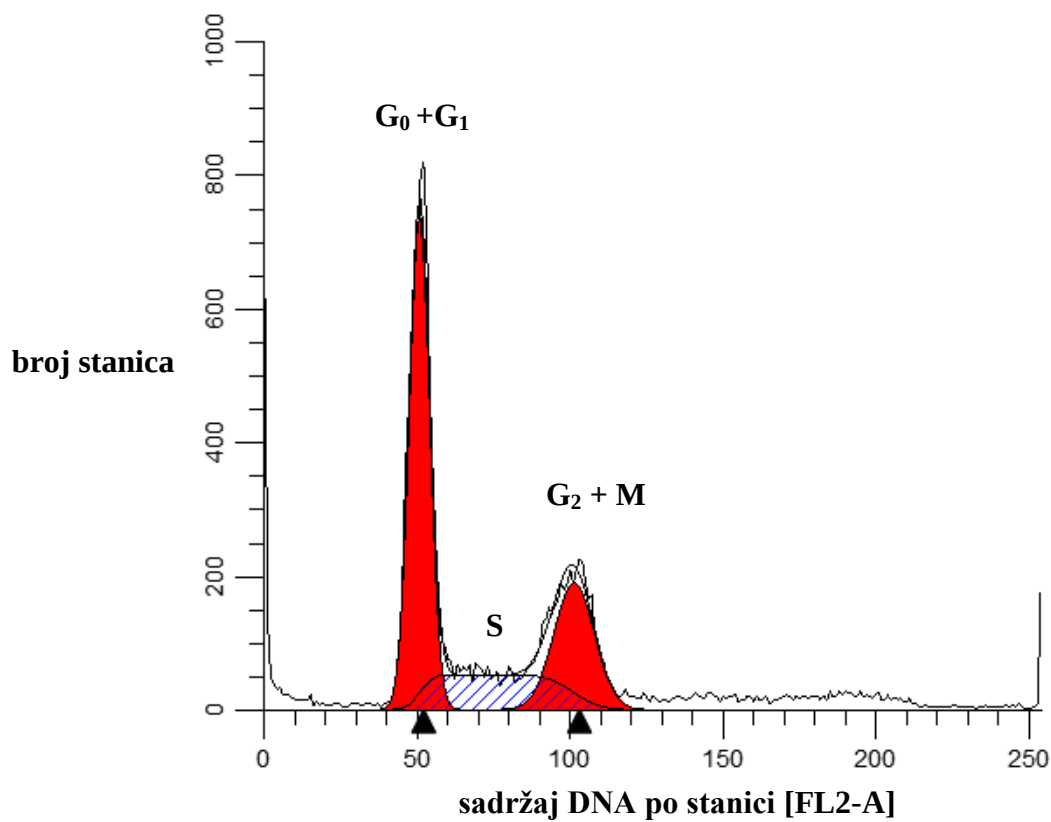
Pokus je izveden u dvije serije tako što je promatran stanični ciklus 24 h i 72 h nakon tretmana stanica SQ20B/TLR3⁺ i SQ20B/TLR3⁻ kemoterapijom (poli(I:C) i cisplatina), odnosno kemoterapijom i zračenjem.

Sa stanica se najprije ukloni medij i premjesti u epruvete od 2 mL (Eppendorf, Njemačka). Zatim se stanice isperu otopinom PBS-a, 300 μ L, a potom se doda 200 μ L tripsina. Nakon kratke (5 – 10 minuta) inkubacije, stanice se resuspendiraju u bunariću medijem u kojem su rasle, prebace u epruvete od 2 mL i centrifugiraju 5 minuta pri 3000 rpm. Nakon toga stanice se isperu dva puta u 500 μ L PBS-a i centrifugiraju tijekom 5 minuta pri 3000 rpm. Epruvete sa stanicama prebace se na led i resuspendiraju u 500 μ L PBS-a i 1 mL apsolutnog etanola (čuvanog pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), dodavanoga kap po kap uz blago miješanje. Stanice se potom pohrane na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do analize.

Prije analize protočnim citometrom stanice se ponovno ispiru dva puta u PBS-u te centrifugiraju 5 minuta pri 3000 rpm. Potom slijedi tretman otopinom RNaze (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; 150 μL) uz inkubaciju u vodenoj kupelji temperature $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom 15 minuta. Nakon toga stanice se rasprše u 150 μL propidijeva jodida (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) te se sav sadržaj prebaci u epruvete za mjerenje na protočnom citometru i inkubira na ledu 30 minuta zaštićen od svjetlosti. Analiza uzoraka provedena je pomoću protočnoga citometra FACSCaliburTM (Becton Dickinson, SAD) i programa CellQuest Pro. Protok stanica namješten je na brzinu od 150 do 200 stanica u sekundi, a za svaki pojedini uzorak prikupljeni su podaci o 15.000 stanica i obrađeni u programu ModFit.

Prilikom analize rezultata u programu ModFit odabrane su koordinatne osi tako da je na ordinati prikazan broj stanica, a na apscisi parametar FL2-A koji pokazuje količinu stanične DNA. Ukoliko program nije automatski prepoznao parametre odabirom funkcije *Fit*, intervali D1 i D2 podešeni su na krivulje koji odgovaraju diploidnoj, odnosno tetraploidnoj

količini DNA. Potom je odabrana funkcija *Analysis* i *Fit With Current Model* kako bi se mogli očitati postotci stanica zaustavljenih u pojedinim fazama staničnoga ciklusa (slika 9).



Slika 9. Tipična krivulja s dva vrha od kojih jedan odgovara broju stanica u fazama G_0 i G_1 , a drugi broju stanica u fazama G_2 i M . Stanice u fazi S raspoređene su na grafikonu između dva vrha.

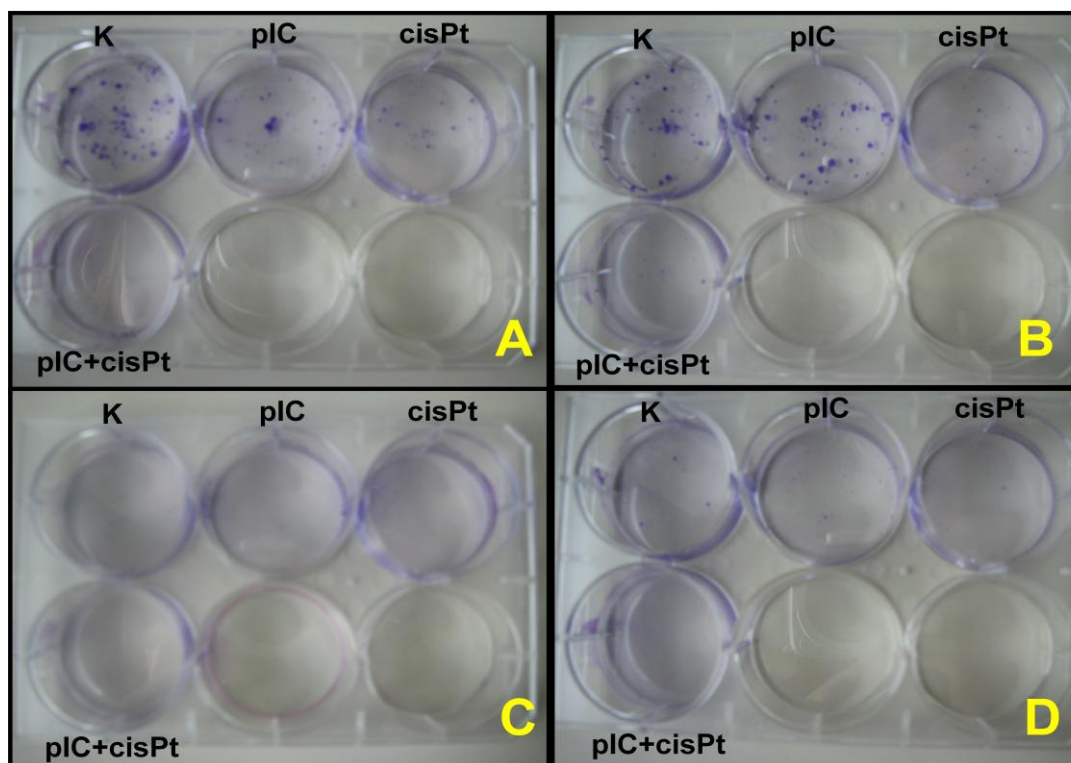
4. REZULTATI

4.1. Test formiranja kolonija (engl. *colony forming assay*) nakon tretmana stanica otopinom poli(I:C), cisplatinom i gama-zračenjem

Nakon tretmana kemoterapijom uz poli(I:C) i cisplatinu te gama-zračenjem doze 1 Gy, neke od preživjelih stanica počele su stvarati kolonije tijekom dva tjedna rasta u kulturi. Kolonije su potom obojene i fotografirane fotoaparatom (slika 10).

U podpopulaciji nezračenih stanica SQ20B/TLR3⁺, s funkcionalnim TLR3, nakon tretmana otopinom poli(I:C) broj stvorenih kolonija gotovo je dvostruko manji (A) od broja kolonija u stanicama s utišanim TLR3 (B). U bunarićima tretiranim samo cisplatinom obje podpopulacije stanica su podjednako rasle, ali je broj i veličina kolonija manja no u kontrolnom bunariću i onom tretiranom otopinom poli(I:C). Stanice tretirane kombinacijom kemoterapeutika nisu preživjele (nema kolonija).

Stanice SQ20B/TLR3⁻ koje su primile dozu zračenja od 1 Gy stvorile su tek nekoliko kolonija u kontrolnoj skupini, što je ponovno podjednako kao i u skupini stanica tretiranih s poli(I:C). U odnosu na nezračene stanice, ovaj je broj kolonija višestruko manji. Veći je citotoksičan učinak na stanice primijećen kod stanica tretiranih cisplatinom i kombinacijom cisplatine i poli(I:C), gdje nije narasla gotovo niti jedna kolonija.



Slika 10. Fotografija kolonija stanica SQ20B/TLR3⁺ (A i C) i SQ20B/TLR3⁻ (B i D) nakon tretmana naznačenim spojevima i zračenjem. Kolonije su obojene kristal violetom. (A i B = kontrola, nezračene stanice; C i D = stanice zračene dozom zračenja 1 Gy) (pIC = poli(I:C), cisPt = cisplatina, K = kontrola, netretirane stanice).

4.2. Analiza staničnoga ciklusa protočnim citometrom nakon tretmana stanica SQ20B otopinom poli(I:C), cisplatinom i γ -zračenjem

Stanični ciklus analiziran je protočnim citometrom uz uporabu programa ModFit nakon 24- i 72-satnog tretmana kemijskim agensima (poli(I:C) i cisplatinom) i gama-zračenjem.

Budući da su za namještanje parametara protočnoga citometra u programu CellQuest Pro korištene stanice SQ20B/TLR3⁺, kod mjerenja sadržaja DNA u stanicama SQ20B/TLR3⁻ zamijećen je približno dvostruk pomak u fazi po skali FL2-A. Vrhovi krivulje karakteristični za faze G₀/G₁ odnosno G₂/M u stanicama SQ20B/TLR3⁺ nalazili su se na približno 45, odnosno 90 jedinica osi FL2-A, dok su isti vrhovi za stanice SQ20B/TLR3⁻ bili smješteni na oko 90, odnosno oko 180 jedinica osi FL2-A. Jednak pomak u fazi imale su i stanice SQ20B/TLR3⁺ nakon 72 sata i nakon obrade cisplatinom ili kombinacijom cisplatine i poli(I:C) (slike 12 – 15).

Također, prilikom mjerenja u programu CellQuest Pro praćene su granuliranost (SSC) i veličina stanica (FSC) (SSC na osi y i FSC na osi x). Pri tome su stanice SQ20B/TLR3⁻ bile veće i više granulirane od SQ20B/TLR3⁺. Također, kod svih stanica tretiranih cisplatinom, zamijećena je veća granuliranost u odnosu na kontrolu (podaci nisu prikazani).

4.2.1 SQ20B/TLR3⁺

Nakon 24 sata najviše stanica SQ20B/TLR3⁺ nalazi se u fazama G₁ i G₀ (41,2 %), zatim G₂ i M (34,39 %) te naposljetku u fazi S (24,41 %). Nakon zračenja, stanice se nešto više nakupljaju u fazama G₂ i M (43,11 %).

Tretman otopinom poli(I:C) nakon 24 sata uzrokuje nešto veće nakupljanje stanica u fazama G₂/M i S (38,49 % i 37,7%), odnosno 40,09 % i 27,23 % za zraćene stanice, u odnosu na netretirane stanice. Cisplatinom je uzrokovala zaustavljanje većine nezraćenih stanica (64,71 %) i zraćenih stanica (67,26 %) u fazama G₀ i G₁, dok je najmanje stanica zaustavljeno u fazi S (16,8 %, odnosno 9,96 % za zraćene stanice) nakon 24 sata. Kombinacijom poli(I:C) i cisplatine nezraćene stanice najviše su zaustavljene u fazama G₀/G₁ (64,7%) te najmanje u fazi S (7,84%), dok je u fazama G₂/M zaostalo oko 27,45 %. Sličan je rezultat za zraćene stanice, gdje je tretman potonjom kombinacijom uzrokovao zaustavljanje najviše stanica u fazama G₀ i G₁ (66,37 %), a najmanje stanica u fazi S (9 %).

Nakon 72 sata najviše je stanica u fazama G₀/G₁ (72,34 % za nezraćene i 64,29 % za zraćene). Zraćenje nije imalo značajan učinak nakon tretmana cisplatinom i kombinacijom

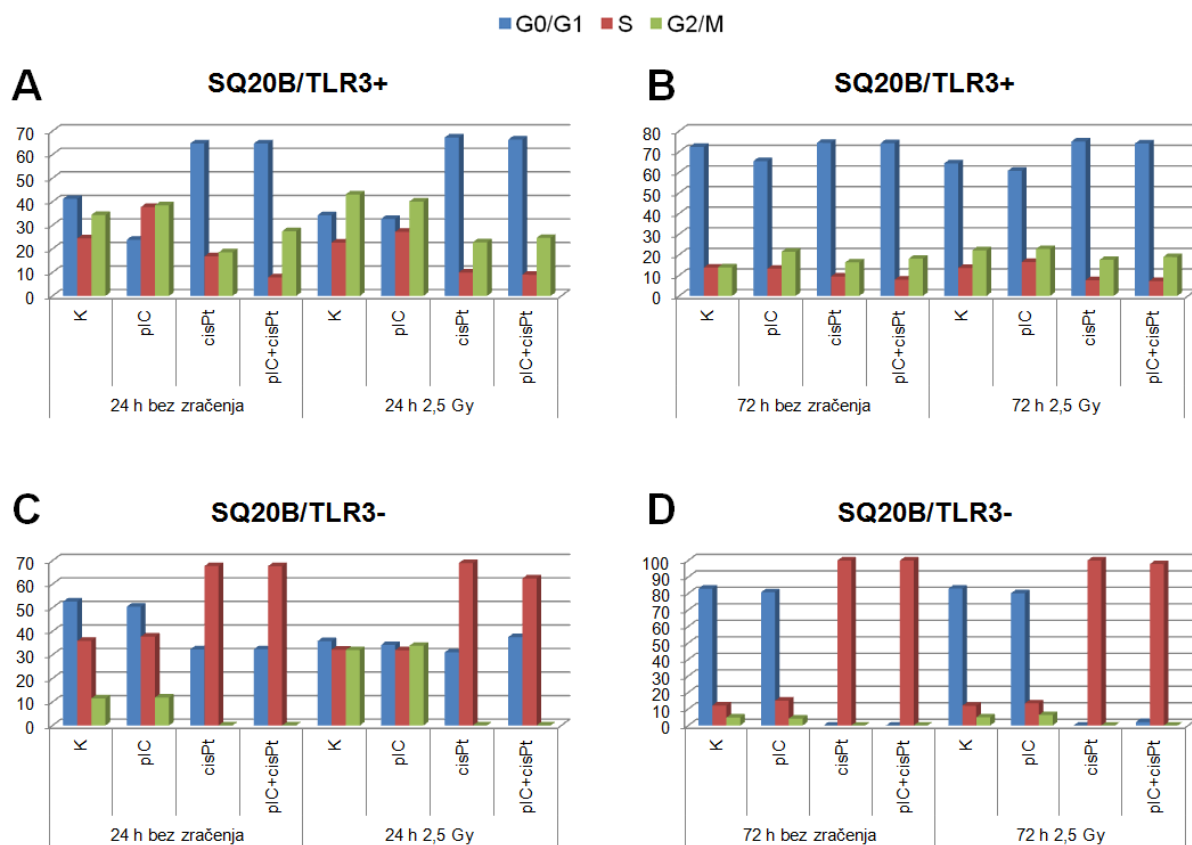
kemoterapije te su u sva četiri slučaja dobiveni podjednaki rezultati s oko 74 % stanica zaustavljenih u fazama G_1 i G_0 , zatim oko 7 % u fazi S te u fazama G_2 i M oko 17 %. Tretman samom otopinom poli(I:C) imao je blagi učinak na povećanje udjela nezračenih stanica u G_2/M fazi u odnosu na kontrolu (21,41 %), na račun udjela stanica u fazama G_0/G_1 (5,38 %). Poli(I:C) koji je prethodio zračenju stanica imao je sličan učinak kao i tretman samim zračenjem, sa 60,73 % stanica u fazi G_0/G_1 , 16,51 % u fazi S te 22,76 % u fazama G_2 i M (slika 11 A i B).

4.2.2 SQ20B/TLR3⁻

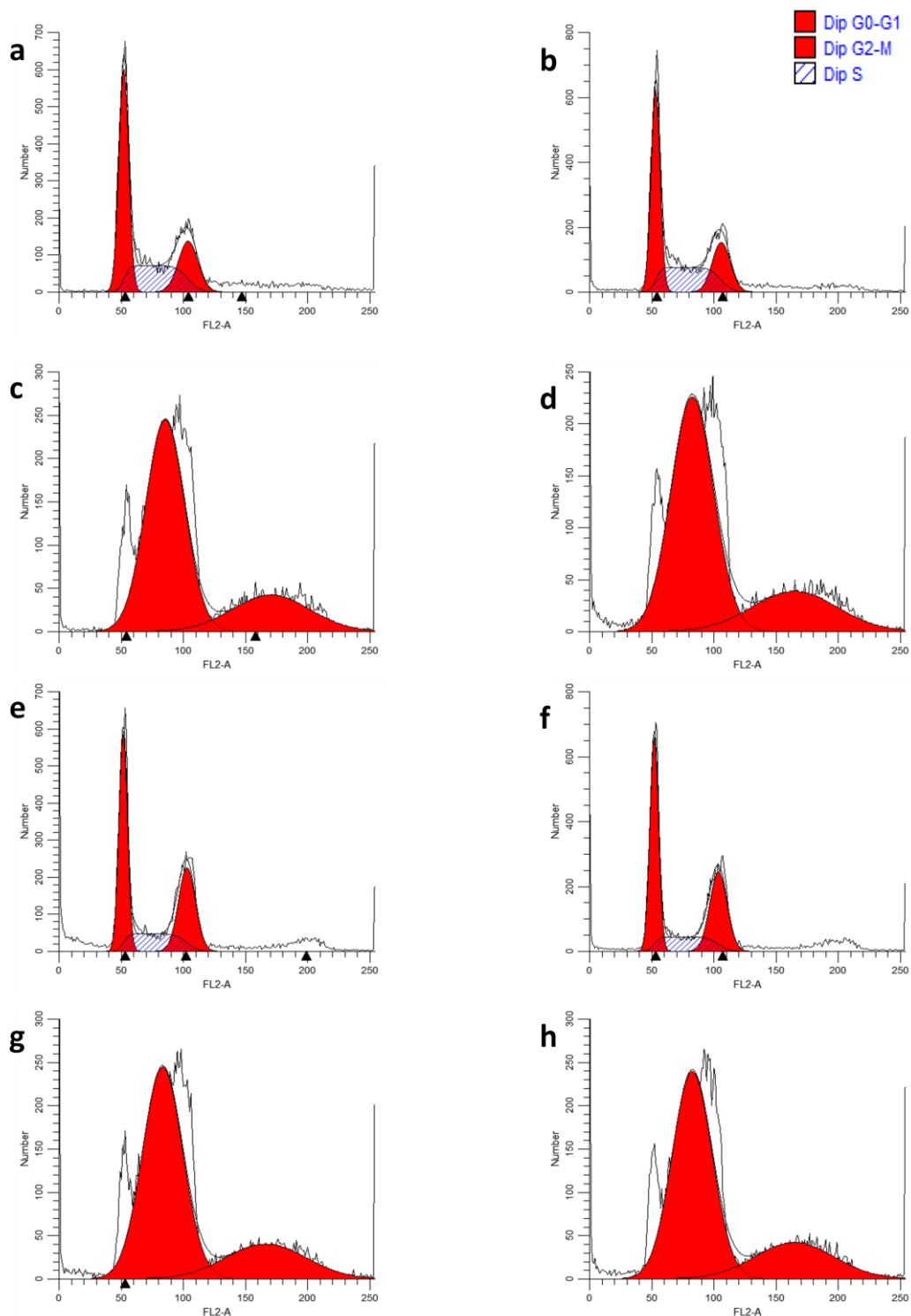
Kod klona SQ20B/TLR3⁻ najviše stanica nalazi se u fazama G_1 i G_0 (52,58 %), dok je veći broj stanica zaustavljenih u fazi S (35,91 %), a manje u G_2 i M (11,51 %) nakon 24 sata. Tretman otopinom poli(I:C) nije uzrokovao značajnije drugačiju raspodjelu stanica po fazama staničnog ciklusa. Tretman cisplatinom i kombinacijom cisplatine imao je podjednak učinak, pri čemu je najviše stanica stalo u fazi S (oko 67 %) te ostatak u fazama G_0 i G_1 (oko 32 %), dok stanice u fazama G_2 i M nisu zabilježene (0 %).

Uvođenjem gama-zračenja u dozi od 2,5 Gy nakon 24 h u istom klonu, kontrolne su stanice raspodijeljene približno podjednako u sve tri faze staničnog ciklusa, s 35,77 % u fazama G_0/G_1 , 32,22 % u fazi S te 32,01 % u fazama G_2/M . Nadalje, poli(I:C) nije imao značajni učinak na preraspodjelu u odnosu na kontrolu. Cisplatina je uzrokovala zaustavljanje većine stanica u fazi S (68,97 %) i G_0/G_1 (31,03 %), dok nisu zabilježene stanice u fazama G_2 i M. Kombinirani je tretman donio sličan rezultat kao tretman samom cisplatinom (37,55 % u G_0/G_1 i 62,45 % u S).

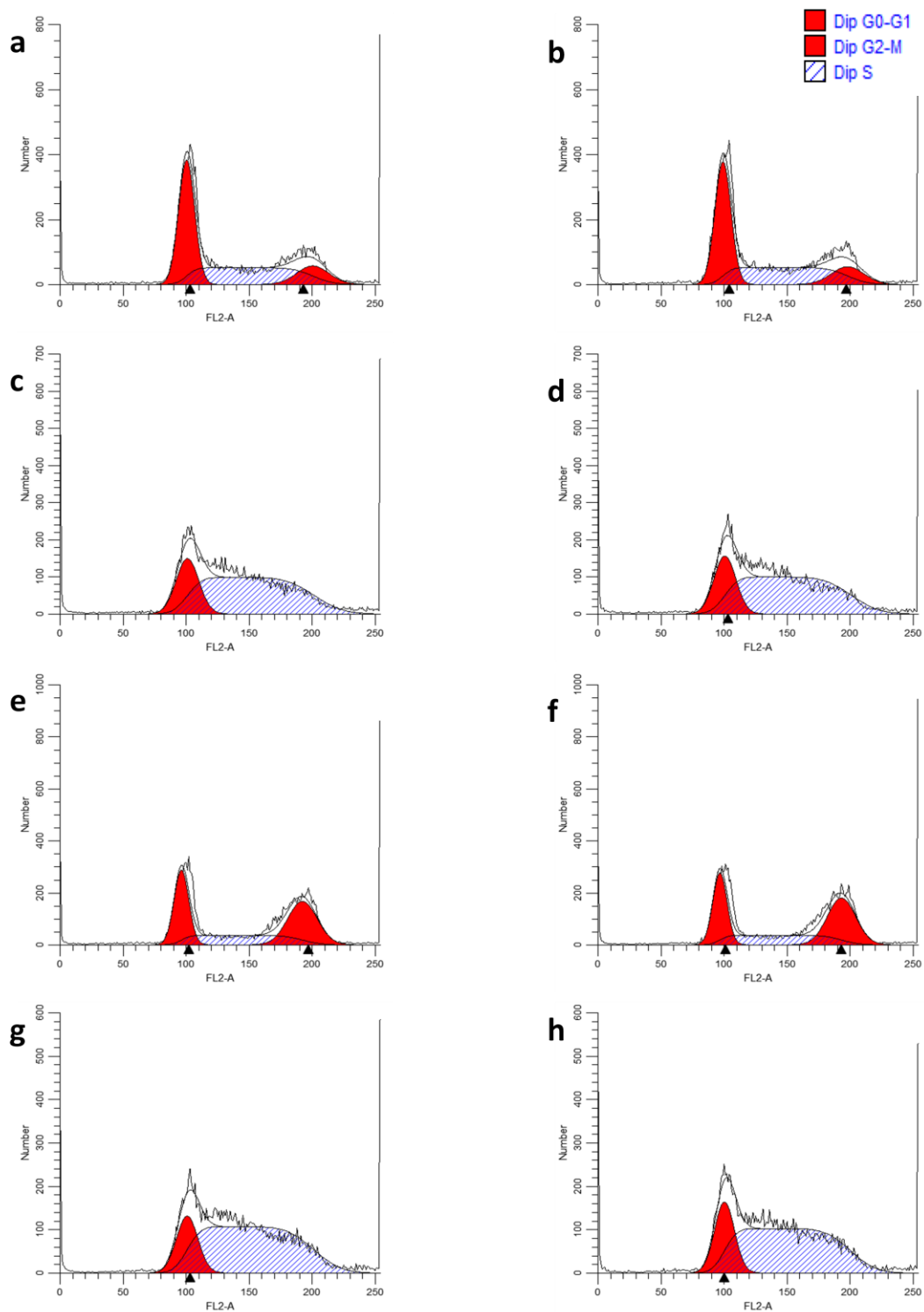
Rezultati dobiveni nakon 72 sata podjednaki su u kontroli i zračenim stanicama. Netretirane stanice u oba su pokusa zaustavljene većinom u fazama G_1 i G_0 (oko 82 %), zatim G_2 i M (oko 4 %) te u fazi S oko 12 %. Uz poli(I:C) blago je povećan udio stanica u fazi S u odnosu na kontrolu za nezračene stanice (15,05 %), odnosno u fazi G_2/M za zračene stanice (6,36 %). Nakon tretmana cisplatinom i kombinacijom cisplatina/poli(I:C) gotovo sve zračene i nezračene stanice zaustavljene su u fazi S (slika 11 C i D).



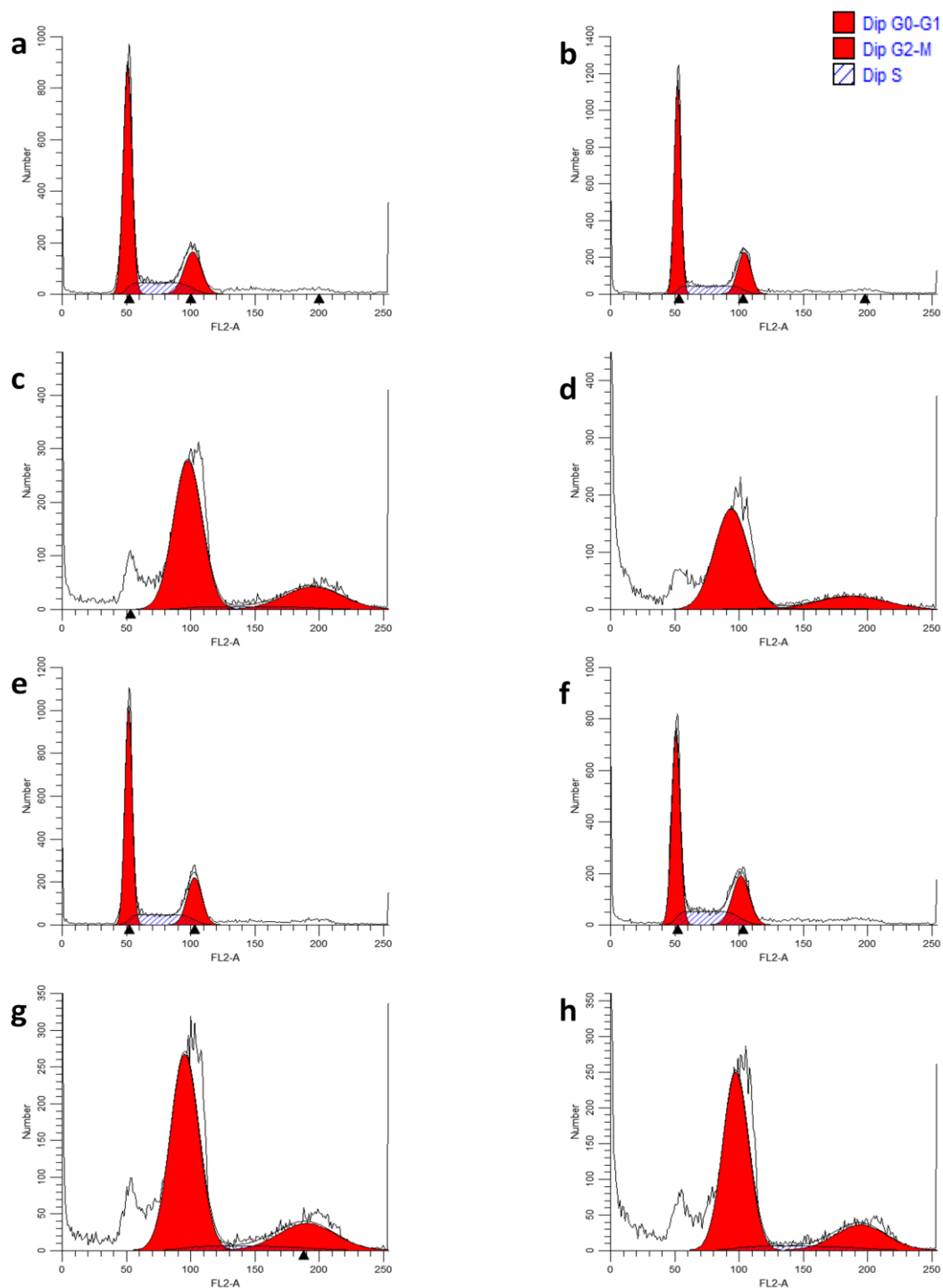
Slika 11. Prikaz udjela stanica u pojedinoj fazi staničnoga ciklusa nakon 24- i 72-satnoga tretmana naznačenim agensima i dozom γ -zračenja od 2,5 Gy. A i B: Klon stanica SQ20B/TLR3⁺. C i D: Klon stanica SQ20B/TLR3⁻ (pIC = poli(I:C), cisPt = cisplatina, K = kontrola, netretirane stanice).



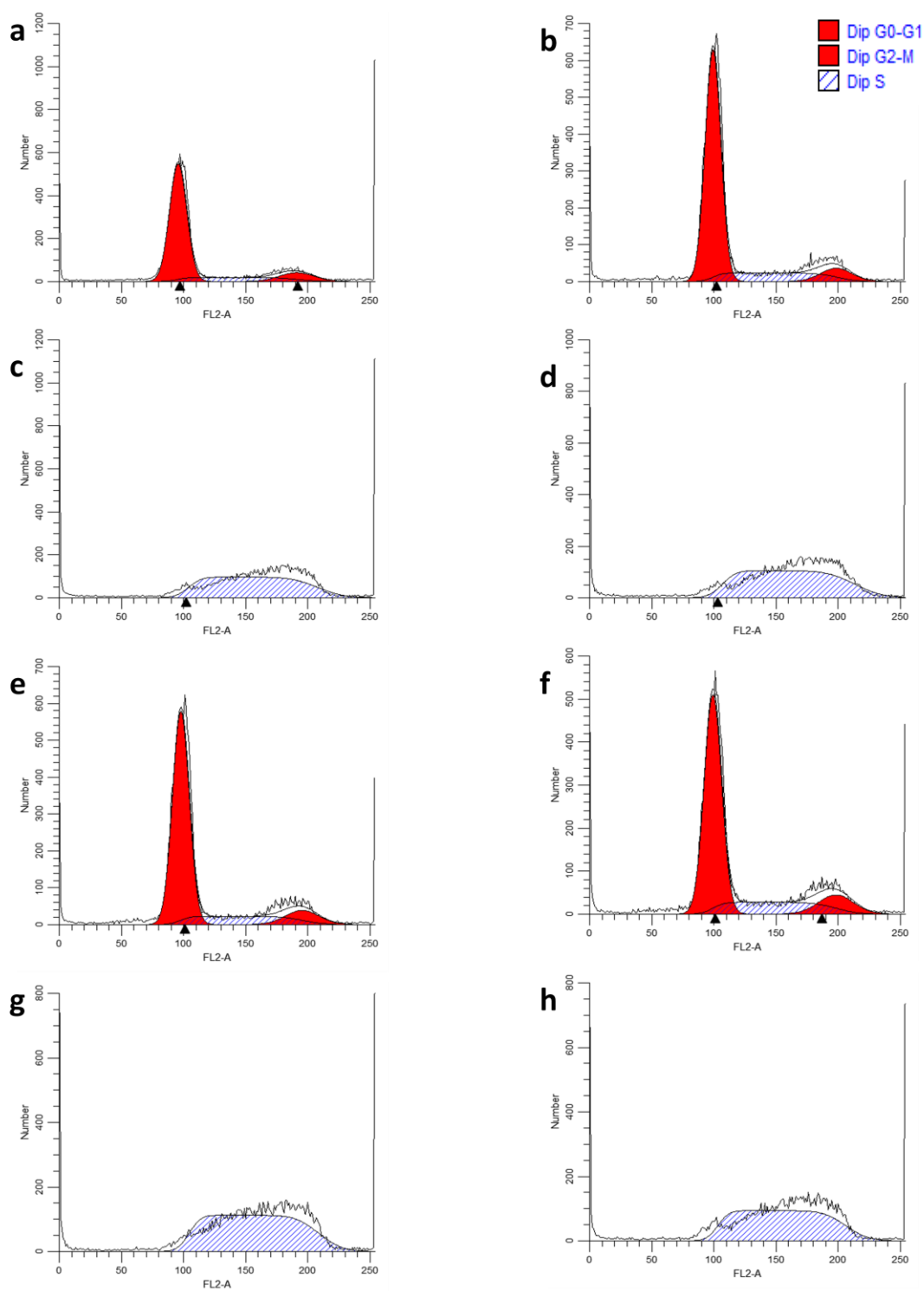
Slika 12. Analiza staničnoga ciklusa klona SQ20B/TLR3⁺ 24 sata nakon tretmana kemoterapijom, odnosno kemoterapijom u kombinaciji sa zračenjem. (a) – (d): 0 Gy (a = netretirane stanice, b = pIC, c = cisPt, d = pIC + cisPt); (e) – (h): 2,5 Gy (e = netretirane stanice, f = pIC, g = cisPt, h = pIC + cisPt). Na apscisi je ukupna stanična fluorescencija (FL2-A), a na ordinati broj stanica. Slika prikazuje reprezentativni rezultat dva pokusa koji su dali sličan rezultat. (pIC = poli(I:C), 10 µg/mL; cisPt = cisplatina, 1 µmol/L)



Slika 13. Analiza staničnoga ciklusa klona SQ20B/TLR3⁻ 24 sata nakon tretmana kemoterapijom, odnosno kemoterapijom u kombinaciji sa zračenjem. (a) – (d): 0 Gy (a = netretirane stanice, b = pIC, c = cisPt, d = pIC + cisPt); (e) – (h): 2,5 Gy (e = netretirane stanice, f = pIC, g = cisPt, h = pIC + cisPt). Na apscisi je ukupna stanična fluorescencija (FL2-A), a na ordinati broj stanica. Slika prikazuje reprezentativni rezultat dva pokusa koji su dali sličan rezultat. (pIC = poli(I:C), 10 µg/mL; cisPt = cisplatina, 1 µmol/L)



Slika 14. Analiza staničnoga ciklusa klona SQ20B/TLR3⁺ 72 sata nakon tretmana kemoterapijom, odnosno kemoterapijom u kombinaciji sa zračenjem. (a) – (d): 0 Gy (a = netretirane stanice, b = pIC, c = cisPt, d = pIC + cisPt); (e) – (h): 2,5 Gy (e = netretirane stanice, f = pIC, g = cisPt, h = pIC + cisPt). Na apscisi je ukupna stanična fluorescencija (FL2-A), a na ordinati broj stanica. Slika prikazuje reprezentativni rezultat dva pokusa koji su dali sličan rezultat. (pIC = poli(I:C), 10 µg/mL; cisPt = cisplatina, 1 µmol/L)



Slika 15. Analiza staničnoga ciklusa klona SQ20B/TLR3⁻ 72 sata nakon tretmana kemoterapijom, odnosno kemoterapijom u kombinaciji sa zračenjem. (a) – (d): 0 Gy (a = netretirane stanice, b = pIC, c = cisPt, d = pIC + cisPt); (e) – (h): 2,5 Gy (e = netretirane stanice, f = pIC, g = cisPt, h = pIC + cisPt). Na apscisi je ukupna stanična fluorescencija (FL2-A), a na ordinati broj stanica. Slika prikazuje reprezentativni rezultat dva pokusa koji su dali sličan rezultat. (pIC = poli(I:C), 10 µg/mL; cisPt = cisplatina, 1 µmol/L)

5. RASPRAVA

Tumori su jedan od vodećih uzroka smrti u modernom društvu. Uz produženje životnoga vijeka, sve više ljudi obolijeva od ove bolesti. Stoga je pronalaženje odgovarajućih, specifičnih i neškodljivih načina liječenja bolesnika s tumorom jedan od glavnih izazova moderne medicine. Šesti je najučestaliji tip malignoga tumora u svijetu karcinom pločastih stanica glave i vrata (HNSCC), koji najčešće nastaje nakon dugotrajnoga izlaganja karcinogenima poput duhana i alkohola. Zbog složene anatomije organa pogođenih ovim tipom tumora i njihove važne uloge u održavanju životnih funkcija, cilj terapije nije samo preživljenje, već i očuvanje funkcije oboljelih organa i poboljšanje kvalitete života bolesnika. Kombinirana primjena kemoterapije i radioterapije pokazala je pritom najbolji učinak na preživljenje bolesnika nakon operativnoga zahvata na tumoru (Matzinger i sur., 2009). Širenju terapijskih mogućnosti pridonio je i razvoj lijekova koji specifično inhibiraju receptor za epidermalni faktor rasta (EGFR, engl. *epidermal growth factor receptor*), koji su u mnogim slučajevima uspješno uključeni u kombiniranu terapiju. Međutim, ishodi liječenja za velik broj bolesnika i dalje su nezadovoljavajući, a samo liječenje često je teško podnošljivo zbog nedovoljno specifičnog djelovanja na tumorske stanice. Stoga se traže se nove molekularne mete lijekova sa što više poželjnih svojstava poput selektivne i velike ekspresije na stanicama tumora. Jedan od mogućih putova istraživanja svakako su TLR, čija se uloga u stanici i organizmu intenzivno istražuje od njihova otkrića u *D. melanogaster* do njihova pronalaska na stanicama brojnih tumora.

Budući da je brojnim istraživanjima pokazano da je ekspresija TLR povećana na stanicama raznih vrsta tumora, iznimno su važna daljnja istraživanja otkrivanja njihove funkcije na tim stanicama. Posebno su vrijedni nalazi prema kojima su određeni TLR selektivno izraženi na stanicama tumora, a ne i na zdravim stanicama. Neke studije pokazale su kako je TLR3 izražen u tkivu tumora glave i vrata, ali ne i na susjednom zdravom tkivu (Pries i sur., 2008), a otprije je poznato da se stimulacijom TLR3 pokreće i urođeni i stečeni imunosni odgovor. Stoga je aktivacija TLR3 dobra strategija u razvoju novih načina liječenja tumora. Budući da smo prethodnim istraživanjima pokazali da se aktivacijom TLR3 u kombinaciji s kemoterapeutcima smanjuje preživljenje stanica tumora, ovim istraživanjem ispitano je može li se uvođenjem zračenja kao konkomitantne terapije dodatno sniziti doze i kemoterapeutika i zračenja.

U istraživanju su korištene stanice HNSCC-a, SQ20B, koje posjeduju mutirani tumorski supresorski gen *p53* (mutacija c.376-1G>A). Ujedno, pokazano je da su ove stanice radiorezistentne te kako zračenje X-zrakama i ugljikovim ionom ne izaziva apoptozu (Hanot i sur., 2012). Matijević i suradnici pokazali su da se na stanice tumora glave i vrata s funkcionalnim TLR3 može djelovati poli(I:C) te uzrokovati apoptozu, pri čemu u tome uloga *p53* nije ključna. Potonje je otkriće iznimno važno budući da većina stanica tumora, pa tako i većina HNSCC, posjeduje mutirani, nefunkcionalan tumorski supresorski gen/protein *p53*, što često predstavlja problem u liječenju tumora zračenjem i kemoterapijom zbog pojave rezistencije na takvo liječenje izbjegavanjem apoptoze. Nadalje, SQ20B imaju i konstitutivno aktivan receptor za epidermalni faktor rasta (EGFR, engl. *epidermal growth factor receptor*) zbog čega je trajno aktiviran signalni put PI3-kinaza/Akt, što je dodatan čimbenik invazivnosti takvih tumora i razlog velikoga broja lokalnih recidiva (Gupta i sur., 2002).

Cisplatina je u upotrebi već nekoliko desetljeća kao citostatik s alkilirajućim djelovanjem koji tvori kovalentne veze s adeninom, gvaninom i citozinom u DNA i pri tome aktivira mehanizam popravka DNA, a ako je popravak nemoguć, aktivira se apoptoza stanica. Tretman približnim koncentracijama LD₂₀ za cisplatinu i LD₅₀ za ligand TLR3 poli(I:C) pokazao se dovoljnim za smanjenje preživljenja stanica tumora. Doza LD₂₀ za cisplatinu korištena je s obzirom na to da je u ovom slučaju cisplatina bila samo adjuvans, a osnovna meta bilo je ciljano uništavanje stanica tumora ždrijela aktivacijom TLR3.

Budući da je poli(I:C) neselektivan ligand TLR3 te se veže i na citoplazmatske RIG-I i MDA-5 receptora, čija bi aktivacija također mogla imati antiproliferativni učinak na tumorske stanice, u istraživanju je bilo važno utvrditi kakvu ulogu u tome ima TLR3. Zbog toga je korištena stanična linija SQ20B stabilno transfecirana plazmidima pri čemu su dobivene dvije populacije stanica: SQ20B/TLR3⁺, tj. kontrolne stanice s funkcionalnim TLR3 i SQ20B/TLR3⁻, stanice u kojima je pomoću odgovarajuće shRNA utišan gen za TLR3.

Test formiranja kolonija pokazao je veliku razliku u odgovoru ovih dviju populacija na tretman poli(I:C)-om što je u skladu s očekivanjem budući je jedino poli(I:C) selektivan za TLR3 od tri testirana čimbenika. U klonu SQ20B/TLR3⁺ pokazano je da tretman samim poli(I:C)-om, bez primjene zračenja, ima dovoljan učinak na zaustavljanje rasta stanica tumora i to za približno 50 % u odnosu na kontrolu, dok poli(I:C) gotovo da i ne utječe na stvaranje kolonija u stanicama SQ20B gdje je dokinuta ekspresija TLR3. Kombinirana primjena cisplatine i poli(I:C) uzrokovala je vrlo malo preživljenje u objema linijama stanica

što ukazuje da taj kombinirani učinak nije ovisan o TLR3 već nespecifični učinak kombinacije kemoterapeutika. Ujedno, s obzirom da gotovo niti jedna kolonija nije narasla od zračenih stanica, neovisno o dodatnom tretmanu, zaključujemo da je potrebno ponoviti pokus, ali sa sniženim dozama zračenja. Također je moguće ponoviti pokus, ali sa rijetkim nasađivanjem stanica nakon zračenja, budući da na rijetko nasađene stanice prije zračenja samo ozračivanje ima puno jači učinak.

Prema tome, ovime je pokazano da se aktivacijom funkcionalnoga TLR3 u stanicama SQ20B smanjuje preživljenje stanica tumora. U jednom je istraživanju pokazano da inhibitor proteasoma bortezomib povećava osjetljivost stanica SQ20B na zračenje. Pri tome bortezomib povećava ekspresiju gena *PTEN* te smanjuje prijenos signala signalim putem PI3/Akt (Weber i sur., 2007). Moguće je da i prethodno izlaganje stanica poli(I:C)-u uzrokuje da stanice postanu radiosenzitivnima, budući da je zračenje nakon predtretmana kemoterapeuticima uzrokovalo znatno smanjenje broja preživjelih stanica u ovoj radiorezistentnoj staničnoj liniji, što bi se trebalo potvrditi u daljnim ispitivanjima. Ujedno, ovim istraživanjem pokazano je kako u ovom slučaju poli(I:C) predstavlja dobar izbor za kemoterapiju zbog učinkovitosti usporedive s cisplatinom te zbog toga što selektivno djeluje samo na stanice koje imaju izražen TLR3, dok cisplatina djeluje neselektivno i izaziva oštećenja i zdravih stanica.

Iako je test formiranja kolonija pokazao da je tretman samim poli(I:C)-om dostatan za zaustavljanje proliferacije tumora, provedeno je dodatno istraživanje s ciljem utvrđivanja udjela stanica u pojedinim fazama staničnoga ciklusa. Budući da je uloga TLR3 u staničnom ciklusu još uvijek nepoznata te da postoji tek nekoliko literaturnih izvora o utjecaju poli(I:C) na stanični ciklus, ovo istraživanje ispituje djelovanje dsRNA u kombinaciji s cisplatinom i zračenjem na zaustavljanje stanica SQ20B u određenim fazama staničnoga ciklusa. Ranije istraživanje pokazalo je da tretman poli(I:C)-om uzrokuje zaustavljanje stanica fibroblasta u fazi G₁ (Hasan i sur., 2005). Isto tako, aktivacija TLR3 na β-stanicama gušterače uzrokovala je zaustavljanje tih stanica u G₁ fazi staničnoga ciklusa (Wang i sur., 2013). Međutim, studije utjecaja poli(I:C) na stanice tumora gotovo i ne postoje. U našem prethodnom istraživanju na stanicama tumora ždrijela Detroit 562 pokazali smo da poli(I:C) zaustavlja stanice u fazi G₂/M (neobjavljeni rezultati). U ovom smo istraživanju također pokazali kako je već poli(I:C) dovoljan da izazove smanjenje rasta stanica SQ20B u testu formiranja kolonija u procesu ovisnom o TLR3. Isto tako, tretman poli(I:C)-om povećao je udio stanica u fazama G₂/M, što je važno budući da su stanice u navedenim fazama staničnoga ciklusa najosjetljivije na

zračenje. Moguće je da se predtretmanom otopinom poli(I:C), inače radiorezistentne stanice kao što su SQ20B, mogu učiniti osjetljivijima na zračenje. Stoga je to vjerojatno bolji izbor od kombinirane terapije uz dodatak cisplatine, koja djeluje nespecifično. Međutim, prije konačnih zaključaka, potrebno je provesti dodatne pokuse u kojima bi se odredila ekspresija pro- i protuapoptotskih proteina (npr. Bax, Bad, Puma, Bcl-XL, survivin itd.) nakon tretmana otopinom poli(I:C) i zračenjem.

Cisplatina je uzrokovala zaustavljanje velike većine stanica SQ20B/TLR3⁺ u fazi S, dok je učinak u klonu SQ20B/TLR3⁻ bio zaustavljanje u fazama G₀ i G₁. U kombinaciji, učinak cisplatine maskirao je učinak poli(I:C) što pokazuju podjednaki rezultati ta dva pokusa u oba klona te oba vremena nakon tretmana, sa i bez zračenja. Pri tome izostaje sinergistički učinak ova dva kemoterapeutika na regulaciju staničnoga ciklusa SQ20B. Cisplatina uobičajeno izaziva zastoj staničnoga ciklusa u fazi G₂/M, međutim, poznato je da može izazvati i zastoj u fazama G₀/G₁ (Qin i Ng, 2002). S obzirom na to da smo mi koristili vrlo nisku koncentraciju cisplatine (0,1 μM, tj. LD₂₀), moguće je da se stanice zaustavljaju u fazi G₀/G₁ kako bi se spriječio ulazak stanica u fazu S i pokušao popravak oštećene DNA. Zanimljivo je da u stanicama s utišanim TLR3 dolazi do zastoja u fazi S nakon tretmana cisplatinom. To ukazuje da protein TLR3 možda ima ulogu i u odgovoru staničnoga ciklusa na cisplatinu. Međutim, potrebni su dodatni pokusi određivanja ekspresije proteina koji sudjeluju u staničnom ciklusu kako bismo utvrdili moguću ulogu.

Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazuju da aktivacija TLR3 na stanicama tumora ima protutumorsko djelovanje. Tome učinku mogla bi pridonijeti istodobna vezanje poli(I:C) na druge receptora koji vežu dsRNA u citoplazmi, MDA5 i RIG-I. Farmakološki prilagođeni agonisti TLR3 već se nalaze u kliničkim ispitivanjima liječenja bolesnika s različitim tumorima (rintatolimod, poli(I:C12U)). Pri tome se agonisti TLR3 uglavnom kombiniraju sa citostaticima kako bi se sinergističkim djelovanjem aktivirali različiti signalni putevi koji u konačnici dovode do jačega umiranja stanica tumora nego kod primjene monoterapije (Glavan i Pavelić, 2014). Dodatna prednost protutumorske terapije koja se temelji na aktivaciji TLR3 mogla bi biti u stimulaciji imunološkog sustava bolesnika, što je dodatan povoljan učinak koji treba uzeti u obzir i ispitati. Kako je ovo još jedno u nizu istraživanja koje potvrđuje protutumorsku aktivnost TLR3, ali i prvo koje pokazuje učinak kombinacije agonista TLR3 i kemoterapeutika na stanični ciklus, potrebno je u daljnjim istraživačkim postupcima utvrditi mehanizam njihova djelovanja. Ti bi rezultati mogli unaprijediti buduća ispitivanja na animalnim modelima, a potom i u kliničkim studijama.

Razvoj ovakvog novog pristupa liječenju tumorskih bolesti unaprijedio bi dosadašnje terapijske postupke, ne samo zbog izrazitoga protutumorskog učinka, već i zbog smanjenja nuspojava koje se pojavljuju uz uobičajeno liječenje citostaticima. Liječenje bolesnika s tumorom na klasičan način, kao što je liječenje cisplatinom, uzrokuje iznimno teške i neugodne nuspojave zbog citotoksičnih učinaka protutumorskih lijekova na zdrave stanice domaćina. Uporabom poli(I:C) mogle bi se smanjiti potrebne doze ostalih protutumorskih lijekova, kao i doze zračenja te time smanjiti štetni učinci i nuspojave kemoterapije i radioterapije. Međutim, kako aktivacija TLR3 uzrokovana dsRNA može ponekad imati i protumorsko djelovanje, potrebno je dodatno istražiti signalne putove i ulogu ovih receptora u proliferaciji tumora, kao i odrediti uvjete pod kojima se postiže željeni učinak na tumore prije njihove konačne upotrebe u kliničkoj praksi.

6. ZAKLJUČCI

1. Poli(I:C) uzrokuje smanjenje preživljenja stanica karcinoma grkljana SQ20B. Podpopulacija iste stanične linije s utišanim genom za TLR3 pokazala je veću otpornost i preživljenje nakon tretmana citostaticima, što je provjereno testom formiranja kolonija. Kombinirana terapija sa zračenjem povećava učinak, međutim slabo preživljenje kontrolnih stanica ukazuje na visoku dozu. To je moguće riješiti modificiranjem protokola pokusa.

2. Poli(I:C) povećava udio stanica SQ20B u fazi G₂/M staničnoga ciklusa u stanicama s funkcionalnim TLR3, dok je u onima s utišanim TLR3 taj broj podjednak u odnosu na kontrolu. Cisplatina je u većini slučajeva maskirala učinak poli(I:C) kada je primijenjena u kombinaciji.

3. Budući da je ovo preliminarno istraživanje, potrebno je provesti dodatna ispitivanja, kao i načiniti statističke analize koje će potvrditi dobivene rezultate. Dosadašnji rezultati podloga su za nastavak istraživanja i daju naslutiti da bi se kombinacija poli(I:C) i zračenja mogla koristiti u liječenju bolesnika s tumorima koji izražavaju funkcionalni TLR3.

7. LITERATURA

Carty M, Reinert L, Paludan SR, Bowie AG. Innate antiviral signalling in the central nervous system. *Trends Immunol*, 2014, 35(2), 79-87.

Droemann D, Albrecht D, Gerdes J, Ulmer AJ, Branscheid D, Vollmer E, *et al.* Human lung cancer cells express functionally active Toll-like receptor 9. *Respir Res*, 2005, 6, 1-10.

Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*, 2006, 1(5), 2315-9.

Furrie E, Macfarlane S, Thomson G, Macfarlane GT, Microbiology & Gut Biology Group, Tayside Tissue & Tumour Bank. Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology*, 2005, 115, 565-74.

Glavan TM, Pavelic J. The exploitation of Toll-like receptor 3 signaling in cancer therapy. *Curr Pharm Des*, 2014, 20(42), 6555-64.

Grimmig T, Matthes N, Hoeland K, Tripathi S, Chandraker A, Grimm M, Moench R, Moll EM, Friess H, Tsaur I, Blaheta RA, Germer CT, Waaga-Gasser AM, Gasser M. TLR7 and TLR8 expression increases tumor cell proliferation and promotes chemoresistance in human pancreatic cancer. *Int J Oncol*, 2015, 47(3), 857-66.

Gupta AK, McKenna WG, Weber CN, Feldman MD, Goldsmith JD, Mick R, Machtay M, Rosenthal DI, Bakanauskas VJ, Cerniglia GJ, Bernhard EJ, Weber RS, Muschel RJ. Local Recurrence in Head and Neck Cancer: Relationship to Radiation Resistance and Signal Transduction. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(3), 885-92.

Hanot M, Boivin A, Malésys C, *et al.* Glutathione Depletion and Carbon Ion Radiation Potentiate Clustered DNA Lesions, Cell Death and Prevent Chromosomal Changes in Cancer Cells Progeny. Santos J, ed. *PLoS ONE*, 2012, 7(11), e44367.

Hasan UA, Trinchieri G, Vlach J. Toll-like receptor signaling stimulates cell cycle entry and progression in fibroblasts. *J Biol Chem*, 2005, 280(21), 20620-7.

Hassan F, Islam S, Tumurkhuu G, Naiki Y, Koide N, Mori I, *et al.* Intracellular expression of toll-like receptor 4 in neuroblastoma cells and their unresponsiveness to lipopolysaccharide. *BMC Cancer*, 2006, 6, 281-8.

He W, Liu Q, Wang L, Chen W, Li N, Cao X. TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance. *Mol Immunol*, 2007, 44, 2850-9.

Ilvesaro JM, Merrell MA, Swain TM, Davidson J, Zayzafoon M, Harris KW, *et al.* Toll-like receptor-9 agonists stimulate prostate cancer invasion *in vitro*. *Prostate*, 2007, 67, 774-81.

Karikó K, Ni H, Capodici J, Lamphier M, Weissman D. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem*, 2004, 279, 12542-12550.

Liu L, Botos I, Wang Y, Leonard JN, Shiloach J, Segal DM, Davies DR. Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science*, 2008, 320(5874), 379-81.

Loyo M, Li RJ, Bettgowda C, Pickering CR, Frederick MJ, Myers JN, Agrawal N. *et al.* Lessons learned from next-generation sequencing in head and neck cancer. *Head & neck*, 2013, 35(3), 454-463.

Matijevic T, Marjanovic M, Pavelic J. Functionally active toll-like receptor 3 on human primary and metastatic cancer cells. *Scand J Immunol*, 2009, 70, 18-24.

Matijevic T, Pavelic J. Toll-like receptors: cost or benefit for cancer? *Curr Pharm Des*, 2010, 16(9), 1081-90.

Matijević T, Kirinec G, Pavelić J. Antitumor activity from the combined application of poli(I:C) and chemotherapeutics in human metastatic pharyngeal cell lines. *Chemotherapy*, 2011, 57(6), 460-7.

Matokanović M, Barišić K. RNA Interference as a Tool in Therapeutics, *Food Technol Biotechnol*, 2009, 47(3), 229–235.

Matzinger O, Zouhair A, Mirimanoff RO, Ozsahin M. Radiochemotherapy in locally advanced squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2009, 21(7), 525-31.

Merrell MA, Ilvesaro JM, Lehtonen N, Sorsa T, Gehrs B, Rosenthal E, *et al.* Toll-like receptor 9 agonists promote cellular invasion by increasing matrix metalloproteinase activity. *Mol Cancer Res*, 2006, 4, 437-47.

Nishimura M, Naito S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human toll-like receptors and related genes. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28, 886-92.

Paone A, Starace D, Galli R, Padula F, De Cesaris P, Filippini A, Ziparo E, Riccioli A. Toll-like receptor 3 triggers apoptosis of human prostate cancer cells through a PKC- α -dependent mechanism. *Carcinogenesis*, 2009, 29, 1334-1342.

Papadimitraki ED, Tzardi M, Bertsias G, Sotsiou E, Boumpas DT. Glomerular expression of toll-like receptor-9 in lupus nephritis but not in normal kidneys: implications for the amplification of the inflammatory response. *Lupus*, 2009, 18(9), 831-5.

Pries R, Hogrefe L, Xie L, Frenzel H, Brocks C, Ditz C, Wollenberg B. Induction of c-Myc-dependent cell proliferation through toll-like receptor 3 in head and neck cancer. *Int J Mol Med*, 2008, 21(2), 209-15.

Qin LF, Ng IO. Induction of apoptosis by cisplatin and its effect on cell cycle-related proteins and cell cycle changes in hepatoma cells. *Cancer Lett*, 2002, 175(1), 27-38.

Rao DD, Vorhies JS, Senzer N, Nemunaitis J. siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(9), 746-59.

Salaun B, Coste I, Rissoan MC, Lebecque SJ, Renno T. TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. *J Immunol*, 2006, 176, 4894-901.

Salaun B, Lebecque S, Matikainen S, Rimoldi D, Romero P. Toll-like receptor 3 expressed by melanoma cells as a target for therapy? *Clin Cancer Res*, 2007, 13, 4565-4574.

Schmausser B, Andrulis M, Endrich S, Muller-Hermelink HK, Eck M. Toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on gastric carcinoma cells: an implication for interaction with *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol*, 2005, 295, 179-85.

Shapouri F, Saeidi S, Ashrafi Kakhki S, Pouyan O, Amirchaghmaghi E, Aflatoonian R. The expression of Toll-Like Receptors (TLRs) in testicular cancer: A case control study. *Iran J Reprod Med*, 2013, 11(11), 919-24.

Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*, 2005, 17, 1-14.

Tchórzewski M, Lewkowicz P, Dziki A, Tchórzewski H. Expression of Toll-Like Receptors on Human Rectal Adenocarcinoma Cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2014, 62(3), 247–251.

Vercammen E, Staal J, Beyaert R. Sensing of viral infection and activation of innate immunity by Toll-like receptor 3. *Clin Microbiol Rev*, 2008, 21, 13-25.

Wang H, Zhou M, Brand J, Huang L. Inflammation and taste disorders: mechanisms in taste buds. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1170, 596-603.

Wang Y, Liu L, Davies DR, Segal DM. Dimerization of Toll-like receptor 3 (TLR3) is required for ligand binding. *J Biol Chem*, 2010, 285(47), 36836-41.

Wang Y, Wu H, Gao L, Chen S, Gu L, Ding Z, Guo J. Elevated toll-like receptor 3 inhibits pancreatic β -cell proliferation through G1 phase cell cycle arrest. *Mol Cell Endocrinol*, 2013, 377(1-2), 112-22.

Weber CN, Cerniglia GJ, Maity A, Gupta AK. Bortezomib sensitizes human head and neck carcinoma cells SQ20B to radiation. *Cancer Biol Ther*, 2007, 6(2), 156-9.

Xie W, Wang Y, Huang Y, Yang H, Wang J, Hu Z. Toll-like receptor 2 mediates invasion via activating NF-kappaB in MDAMB-231 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 379, 1027-32.

8. SAŽETAK

Karcinomi pločastoga epitela glave i vrata predstavljaju šesti najčešći tumor u svijetu, a preživljenje bolesnika i ishodi terapije nisu zadovoljavajući. U nedavnim su istraživanjima na stanicama ovih te mnogih drugih tumora nađeni Toll-like receptori (TLR). TLR omogućuju domaćinu prepoznavanje niza molekularnih sljedova podrijetlom od patogena (PAMP) pri čemu aktiviraju prirođeni i stečeni imunosni odgovor. TLR3 je unutarstanični receptorski protein koji veže dvolančanu RNA (dsRNA). Nađeno je da je funkcionalan TLR3 izražen u stanicama tumora metastaza karcinoma ždrijela te da njegova aktivacija uzrokuje apoptozu stanica tumora. Stoga je u ovom istraživanju ispitan učinak pojedinačne i kombinirane primjene liganda TLR3, poli(I:C), s citostatikom cisplatinom i γ -zračenjem na preživljenje i regulaciju staničnoga ciklusa stanica tumora grkljana. U istraživanju je korištena stanična linija SQ20B razdvojena u dvije podpopulacije; klonove s normalno eksprimiranim TLR3 i klonove u kojima je korištenjem shRNA utišan gen za TLR3. Testom formiranja kolonija pokazano je da poli(I:C) uzrokuje smanjenje preživljenja stanica karcinoma grkljana za oko 50 %, dok stanice s utišanim genom za TLR3 pokazuju veću otpornost i preživljenje nakon tretmana. Kombinirana terapija imala je presnažan učinak, što se može riješiti smanjenjem doza. Analizom pomoću protočnog citometra, uz bojenje stanične DNA propidijevim jodidom, utvrđeno je da poli(I:C) povećava udio stanica SQ20B u fazi G₂/M staničnoga ciklusa u stanicama s funkcionalnim TLR3, dok je u onima s utišanim TLR3 taj broj podjednak u odnosu na kontrolu. Cisplatina je u većini slučajeva maskirala učinak poli(I:C) kada je primijenjena u kombinaciji. Rezultati ovoga istraživanja pokazuju kako bi se kombinacija poli(I:C), cisplatine i γ -zračenja mogla koristiti u liječenju bolesnika s tumorima koji izražavaju funkcionalni TLR3, uz korištenje relativno niskih doza lijekova i zračenja za postizanje zadovoljavajućega protutumorskog učinka. Međutim, prije konačnih zaključaka valja provesti dodatna istraživanja o molekularnim mehanizmima opaženih rezultata.

Ključne riječi: TLR3, tumori glave i vrata, poli(I:C), cisplatina, stanični ciklus

9. SUMMARY

Head and neck squamous cell carcinoma represents the sixth most common cancer in the world, while patients' survival and therapy outcome remain unsatisfying. In recent studies Toll-like receptors (TLRs) have been found in these and various other human tumor cells. TLRs enable their host to recognize a series of molecular motifs derived from pathogens (PAMPs) by activating innate and adaptive immune responses. TLR3 is an intracellular protein receptor that binds double-stranded RNA (dsRNA). It has been reported that the functional TLR3 is expressed in pharyngeal metastatic tumor cells and its activation drives them to apoptosis. Therefore, in this study we tested the effect of individual and combined application of TLR3 ligand, poly(I:C), with antitumor drug cisplatin and γ -irradiation on survival and cell cycle regulation of larynx carcinoma cells. In this study we used SQ20B cell line stably transfected with control shRNA and shRNA for TLR3. Thus we obtained cells with functional TLR3 and cells with silenced gene for TLR3. Results from colony forming assay show that poly(I:C) reduces survival of larynx carcinoma cells by approximately 50 %, while cells with TLR3 knock-down show greater resistance and survival after cytotoxic treatment. Combined therapy proved to be too strong, and requires dose reduction. Cell cycle distribution was analyzed after cell staining with propidium iodide using a flow cytometer. Poly(I:C) increased the arrest of SQ20B cells with functional TLR3 in phases G₂/M of the cell cycle, while cell cycle distribution of cells with TLR3 knock-down was similar to control. Cisplatin masks the effect of poly(I:C) in most cases when applied in combination. The results of this study demonstrate how the combination of poly(I:C), cisplatin and γ -radiation could be used in the treatment of patients with tumors that express functional TLR3. This allows the usage of lower doses of drugs and radiation for maximizing the antitumor effect while limiting their toxicities. However, further investigation on molecular mechanisms of the observed effects is required before final conclusions.

Keywords: TLR3, head and neck cancer, poly(I:C), cisplatin, cell cycle

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb

Diplomski rad

UTJECAJ dsRNA I CISPLATINE NA POVEĆANJE OSJETLJIVOSTI STANICA TUMORA GRKLJANA ČOVJEKA NA ZRAČENJE

Antonio Kobeščak

SAŽETAK

Karcinomi pločastog epitela glave i vrata predstavljaju šesti najčešći tumor u svijetu, a preživljenje bolesnika i ishodi terapije nisu zadovoljavajući. U nedavnim su istraživanjima na stanicama ovih te mnogih drugih tumora nađeni Toll-like receptori (TLR). TLR omogućuju domaćinu prepoznavanje niza molekularnih sljedova podrijetlom od patogena (PAMP) pri čemu aktiviraju prirodni i stečeni imunosni odgovor. TLR3 je unutarstanični receptorski protein koji veže dvolančanu RNA (dsRNA). Nađeno je da je funkcionalan TLR3 izražen u stanicama tumora metastaza karcinoma ždrijela te da njegova aktivacija uzrokuje apoptozu stanica tumora. Stoga je u ovom istraživanju ispitan učinak pojedinačne i kombinirane primjene liganda TLR3, poli(I:C), s citostatikom cisplatinom i γ -zračenjem na preživljenje i regulaciju staničnog ciklusa stanica tumora grkljana. U istraživanju je korištena stanična linija SQ20B razdvojena u dvije podpopulacije; klonove s normalno ekspimiranim TLR3 i klonove u kojima je korištenjem shRNA utišan gen za TLR3. Testom formiranja kolonija pokazano je da poli(I:C) uzrokuje smanjenje preživljenja stanica karcinoma grkljana za oko 50 %, dok stanice s utišanim genom za TLR3 pokazuju veću otpornost i preživljenje nakon tretmana citostaticima. Kombinirana terapija imala je presnažan učinak, što se može riješiti smanjenjem doza. Analizom pomoću protočnog citometra, uz bojenje stanične DNA propidijevim jodidom, utvrđeno je da poli(I:C) povećava udio stanica SQ20B u fazi G₂/M staničnog ciklusa u stanicama s funkcionalnim TLR3, dok je u onima s utišanim TLR3 taj broj podjednak u odnosu na kontrolu. Cisplatina je u većini slučajeva maskirala učinak poli(I:C) kada je primijenjena u kombinaciji. Rezultati ovoga istraživanja pokazuju kako bi se kombinacija poli(I:C), cisplatine i γ -zračenja mogla koristiti u liječenju bolesnika s tumorima koji izražavaju funkcionalni TLR3, uz korištenje relativno niskih doza lijekova i zračenja za postizanje zadovoljavajućeg protutumorskog učinka. Međutim, prije konačnih zaključaka valja provesti dodatna istraživanja o molekularnim mehanizmima opaženih rezultata.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 45 stranica, 15 grafičkih prikaza, 0 tablica i 39 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: TLR3, tumori glave i vrata, poli(I:C), cisplatina, stanični ciklus

Mentorice: **Dr. sc. Karmela Barišić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
Dr. sc. Tanja Matijević Glavan, znanstvena suradnica, Laboratorij za molekularnu onkologiju Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Boković

Ocjenjivači: **Dr. sc. Karmela Barišić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
Dr. sc. Tanja Matijević Glavan, znanstvena suradnica, Laboratorij za molekularnu onkologiju Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković
Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: rujan 2015.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Medical Biochemistry and Haematology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

EFFECTS OF dsRNA AND CISPLATIN ON SENSITIZATION OF HUMAN LARYNX CARCINOMA CELLS TO RADIATION

Antonio Kobeščak

SUMMARY

Head and neck squamous cell carcinoma represents the sixth most common cancer in the world, while patients' survival and therapy outcome remain unsatisfying. In recent studies Toll-like receptors (TLRs) have been found in these and various other human tumor cells. TLRs enable their host to recognize a series of molecular motifs derived from pathogens (PAMPs) by activating innate and adaptive immune responses. TLR3 is an intracellular protein receptor that binds double-stranded RNA (dsRNA). It has been reported that the functional TLR3 is expressed in pharyngeal metastatic tumor cells and its activation drives them to apoptosis. Therefore, in this study we tested the effect of individual and combined application of TLR3 ligand, poly(I:C), with antitumor drug cisplatin and γ -irradiation on survival and cell cycle regulation of larynx carcinoma cells. In this study we used SQ20B cell line stably transfected with control shRNA and shRNA for TLR3. Thus we obtained cells with functional TLR3 and cells with silenced gene for TLR3. Results from colony forming assay show that poly(I:C) reduces survival of larynx carcinoma cells by approximately 50 %, while cells with TLR3 knock-down show greater resistance and survival after cytotoxic treatment. Combined therapy proved to be too strong, and requires dose reduction. Cell cycle distribution was analyzed after cell staining with propidium iodide using a flow cytometer. Poly(I:C) increased the arrest of SQ20B cells with functional TLR3 in phases G₂/M of the cell cycle, while cell cycle distribution of cells with TLR3 knock-down was similar to control. Cisplatin masks the effect of poly(I:C) in most cases when applied in combination. The results of this study demonstrate how the combination of poly(I:C), cisplatin and γ -radiation could be used in the treatment of patients with tumors that express functional TLR3. This allows the usage of lower doses of drugs and radiation for maximizing the antitumor effect while limiting their toxicities. However, further investigation on molecular mechanisms of the observed effects is required before final conclusions.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 45 pages, 15 figures, 0 tables and 39 references. Original is in Croatian language.

Keywords: TLR3, head and neck cancer, poly(I:C), cisplatin, cell cycle

Mentors: **Karmela Barišić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Tanja Matijević Glavan, Ph.D. *Assistant Research Scientist*, Laboratory for molecular oncology, Division of molecular medicine, Ruđer Bošković Institute

Reviewers: **Karmela Barišić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Tanja Matijević Glavan, Ph.D. *Assistant Research Scientist*, Laboratory for molecular oncology, Division of molecular medicine, Ruđer Bošković Institute
Sandra Šupraha Goreta, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2015.