

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Jelena Jurlin

**Protutumorski učinak apoptina na
različitim staničnim modelima**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2013

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za eksperimentalnu terapiju Zavoda za molekularnu medicinu na Institutu Ruđer Bošković, pod vodstvom dr.sc. Katje Ester, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

ZAHVALJUJEM SE

Dr. sc. Katji Ester, na strpljenju i trudu te što je bila divna mentorica i naučila me mnogim korisnim stvarima prilikom rada u laboratoriju, a istovremeno i ugodno društvo.

Dr. sc. Maji Matulić, na ljubaznosti i susretljivosti te korisnim savjetima koji su mi pomogli prilikom pisanja diplomskog rada.

Dr. sc. Marijeti Kralj, koja mi je omogućila da svoj diplomski rad izradim u Laboratoriju za eksperimentalnu terapiju te svim članovima laboratorija.

Svojoj obitelji i prijateljima, kao i svima ostalima koji su mi bili potpora tijekom studija i izrade diplomskog rada.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

PROTUTUMORSKI UČINAK APOPTINA NA RAZLIČITIM STANIČNIM MODELIMA

Jelena Jurlin

Roosveltov trg 6, Zagreb

Protein virusa zarazne anemije pilića VP3, apoptin, selektivno ubija tumorske stanice apoptozom. Apoptin ulazi u jezgru tumorskih stanica, gdje preusmjerava prijenos signala i uzrokuje smrt stanice. U sklopu ovog rada ispitao se i usporedio protutumorski učinak apoptina na različitim staničnim modelima. Stanice su transducirane rekombinantnim adenovirusnim vektorima sa sekvencom apoptina, te je praćen utjecaj apoptina na proliferaciju stanica. Apoptin je inhibirao rast humane tumorske stanične linije H1299, ali ne i rast stanica HMLE, imortaliziranih epitelnih stanica dojke. Na stanicama HMLE-shEcad koje ne eksprimiraju E-kadherin i pokazuju značajke matičnih stanica tumora, apoptin je pokazao blagi antiproliferativni učinak. Lokalizacija apoptina u stanici je praćena metodom imunofluorescencije. Pokazano je da je inhibicija rasta povezana s lokalizacijom: u stanicama osjetljivima na apoptin, H1299 i HMLE-shEcad, apoptin je lokaliziran u jezgri, dok je u kontrolnim stanicama HMLE lokaliziran u jezgri i u citoplazmi. Dobiveni rezultati ukazuju na nove smjernice u istraživanjima protutumorskog mehanizma apoptina.

(59 stranica, 26 slika, 2 tablice, 49 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: apoptin, stanična smrt, adenovirusni vektori, tumorske matične stanice, terapija tumora

Voditelj: dr. sc. Katja Ester, znanstveni suradnik

Suvoditelj: prof. dr. sc. Maja Matulić

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Maja Matulić

dr. sc. Katja Ester, znanstveni suradnik

doc. dr. sc. Martina Šeruga Musić

Rad prihvaćen: 06.09.2013.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation thesis

DIFFERENTIAL ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF APOPTIN *IN VITRO*

Jelena Jurlin

Roosvelt square 6

Viral protein VP3 from chicken anemia virus, apoptin, selectively kills cancer cells by causing apoptosis. In cancer cells it enters the nucleus, where it redirects cell signaling, therefore causing cell death. In this graduation thesis we tested and compared antitumor effect of apoptin using different cell lines. Cells were transfected with recombinant adenoviral vector bearing apoptin sequence and its effect on cell proliferation was tested. Apoptin inhibited growth of cancer cell line, H1299, but not growth of immortalised mammary epithelial cells, HMLE. In HMLE-shEcad cells that don't express E-cadherin and therefore act as cancer stem cells, apoptin had mild antiproliferative effect. Its cell localisation was detected using immunofluorescence. Inhibition of cell growth was in correspondance with its cell localisation: it was localised in nucleus of cells sensitive to its activity, such as H1299 and HMLE-shEcad, while it was localised both in nucleus and cytoplasm in control HMLE cells. Our results give new directions in research of its mechanism of action.

(59 pages, 26 figures, 2 tables, 49 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central Biological Library

Keywords: apoptin, cell death, adenoviral vectors, cancer stem cells, cancer therapy

Supervisor: Dr. Katja Ester, Res. Assoc.

Cosupervisor: Dr. Maja Matulić, Full Prof.

Reviewers: Dr. Maja Matulić, Full Prof.

Dr. Katja Ester, Res. Assoc.

Dr. Martina Šeruga Musić, Asst. Prof.

Thesis accepted: 06.09.2013.

POPIS KRATICA

CAV – virus zarazne anemije pilića

VP – virusni protein

NPC – kompleks jezgrinih pora

PML – protein promijeloidne leukemije

Nur77 – jezgrin receptor

Hip-1 – huntington-interakcijski protein 1

DEDAF – DED-asocirani faktor

Nmi – N-Myc interakcijski protein

APC/C – ciklosomni kompleks promocije anafaze

APC1 – kompleks promocije anafaze 1

Hsp70 – humani šaperonski protein

PP2A – protein fosfataza 2A

BCA3 – protein povezan s rakom dojke

hTERT – podjedinica telomeraze

pRB – retinoblastoma protein

CD24, CD44 – klaster diferencijacije 24, 44; antigeni na površini tumorskih matičnih stanica

CDH1 – gen za E-kadherin

Bcl-2 – protein limfoma B-stanica 2

DISC – signalni kompleks indukcije smrti

FADD – protein asociran s FAS koji sadrži domenu smrti

FLIP – inhibitorski protein sličan FLIC-u

ATP – adenzin trifosfat

BH3 – domena homologije s Bcl-2

TAp73 – izoforma proteina p73 s transaktivacijskom domenom

ΔNp73 – izoforma proteina p73 s delecijom N-kraja

RdAd5 – adenovirus tipa 5

CAR – adenovirusni receptor

DMSO – dimetil sulfoksid

BSA – goveđi serum s albuminom

MTT - 3-(4,5-dimetil-2-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol bromid

PBS – fosfatni pufer

EDTA – etilen-diamin tetraoctena kiselina

DMEM – Dulbeccov modificirani Eagleov medij

HUMEC – medij za uzgoj epitelnih stanica dojke

MEM – modificirani Eagleov medij

ATCC – američka zbirka tipova kultura

HEK293 – stanice bubrega ljudskog embrija

HMLE – imortalizirane epitelne stanice dojke

H1299 – stanice karcinoma pluća ne-malih stanica

HCT116 – stanice karcinoma debelog crijeva

shRNA – mala RNA s ukosnicom

GFP – zeleni fluorescentni protein

CVL – nepročišćeni virusni lizat

PFU – broj infektivnih čestica virusa koje formiraju plak

BFU – broj infektivnih čestica virusa koje eksprimiraju gen dojavljivač za β -galaktozidazu

MOI – multiplicitet infekcije

OD – optička gustoća

Ad-Ap – adenovirusni vektor s genom za apoptin

Ad-lac Z – adenovirusni vektor s genom za *lac Z*

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Apoptin.....	1
1.1.1. Virus zarazne anemije pilića.....	1
1.1.2. Mehanizam djelovanja apoptina.....	2
1.1.3. Potencijalna primjena apoptina u terapiji.....	6
1.2. Rak.....	8
1.2.1. Nastanak raka.....	8
1.2.2. Matične stanice raka.....	10
1.3. Stanična smrt.....	13
1.3.1. Mehanizmi programirane stanične smrti.....	13
1.3.2. Apoptin i stanična smrt.....	15
1.4. Adenovirusni vektori.....	17
1.5. Cilj rada.....	19
2. MATERIJALI I METODE.....	20
2.1. Popis korištenih materijala i priprema otopina.....	20
2.1.1. Sastav medija za uzgoj stanica.....	20
2.1.2. Sastav i priprema otopina.....	21
2.2. Rad sa stanicama u kulturi.....	24
2.2.1. Stanične linije.....	24
2.2.2. Presađivanje stanica.....	26
2.2.3. Brojanje stanica.....	27
2.3. Priprava rekombinantnog adenovirusnog vektora.....	28
2.3.1. Konstrukcija replikacijski defektnog adenovirusnog vektora.....	28
2.3.2. Zaražavanje stanica i umnažanje adnovirusnog vektora.....	28
2.3.3. Pročišćavanje adenovirusnog vektora.....	29
2.3.4. Određivanje koncentracije infektivnih adenovirusnih čestica.....	31
2.4. Određivanje djelotvornosti transdukcije.....	34
2.4.1. Određivanje β -galaktozidazne aktivnosti.....	34
2.4.2. Imunofluorescencija.....	35
2.5. Određivanje antiproliferativnog učinka apoptina.....	36
2.6. Imunofluorescencija.....	38
3. REZULTATI.....	40
3.1. Određivanje koncentracije infektivnih adenovirusnih čestica.....	40
3.2. Određivanje djelotvornosti transdukcije.....	41
3.2.1. Određivanje β -galaktozidazne aktivnosti.....	41
3.2.2. Imunoflorescencija.....	45
3.3. Određivanje antiproliferativnog učinka apoptina.....	47
3.4. Lokalizacija apoptina u stanici.....	52
4. RASPRAVA.....	53
5. ZAKLJUČAK.....	56
6. LITERATURA.....	57

1. UVOD

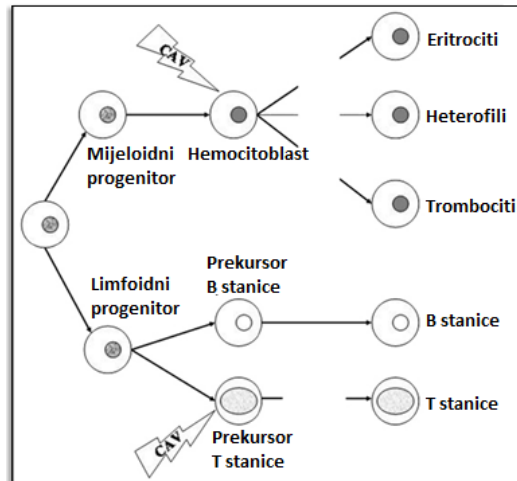
1.1. Apoptin

1.1.1. Virus zarazne anemije pilića

Virusi koriste različite strategije da bi preživjeli u domaćinu te pri tome mijenjaju stanične procese u organizmu. Interakcija virusnih proteina s ključnim staničnim proteinima može dovesti do deregulacije staničnog ciklusa, nakon čega može doći i do stanične transformacije. S druge strane, virusi mogu preusmjeriti signale u transformiranim stanicama ka nekom obliku stanične smrti. Stoga se danas sve više znanstvenog interesa usmjerava prema potencijalnom korištenju virusa i njihovih proteina u svrhu terapije tumora. Proučavanje interakcija virusa s domaćinom od velike je važnosti jer omogućuje bolje razumijevanje brojnih regulacijskih putova u stanicama.

Virus zarazne anemije pilića (engl. *Chicken anemia virus*, CAV) mali je virus bez ovojnice, iz porodice *Circoviridae*, roda *Gyrovirus*. Veličine je 23 do 25 nm, a njegov genom sastoji se od kružne, jednolančane, negativno usmjerene DNA. Genom mu se sastoji od netranskribirane 5' regije te tri otvorena okvira čitanja koja se djelomično preklapaju i prepisuju u jednu RNA iz koje nastaju tri virusna proteina - VP1, VP2 i VP3. VP1 je protein kapside, VP2 je fosfataza, dok je VP3 protein nužan za replikaciju virusa i odgovoran za indukciju apoptoze u T limfocitima i eritrocitima, zbog čega je glavni uzročnik anemije (Todd, 2000).

Virus je identificiran 1974. godine u Japanu kao uzročnik bolesti peradi koja pokazuje simptome kao što su anemija, zastoj u rastu, abnormalno perje, paraliza nogu, intramuskularna krvarenja i uništavanje koštane srži i limfatičnog tkiva (Adair i sur, 2000). Iznimno je otporan i prenosi se između peradi. Zaražava stanice koje se pojačano dijele - progenitore limfocita T i hemocitoblaste, u njima izaziva apoptozu, a samim time dolazi do smanjenja količine eritrocita i nastanka anemije (slika 1).



Slika1: Stanice koje zaražava virus zarazne anemije pilića (CAV), preuzeto i prilagođeno iz Maddika i sur, 2006.

1.1.2. Mehanizam djelovanja apoptina

Od tri virusna proteina CAV, dovoljna je ekspresija VP3 proteina da bi virus izazvao apoptozu u stanicama u kulturi (Noteborn i sur, 1994), pa je taj protein nazvan apoptin. Apoptin je mali protein, veličine 15 kDa, koji se sastoji od 121 aminokiseline i bogat je prolinom, serinom i treoninom te bazičnim aminokiselinama, koje mu omogućuju interakciju s nukleinskim kiselinama. Apoptin *in vitro* spontano formira topljive, nekovalentno povezane globularne komplekse od 30 do 40 podjedinica, koji su stabilni u stanici te dovoljni za njegovu aktivnost. Apoptin unutar tih kompleksa nema određenu sekundarnu strukturu, stoga je to prvi protein kod kojeg za aktivnost nije nužna točno određena sekundarna, tercijarna i kvartarna struktura proteina, već je dovoljna polunasumična agregacija u globularne multimerne (Leliveld i sur, 2003). Sposobnost apoptina da inducira apoptozu *in vitro* i *in vivo* potakla je brojna istraživanja njegove aktivnosti. Potiče apoptozu ne samo u transformiranim stanicama pilića, već i u ljudskim tumorskim stanicama iz različitih tkiva. Do danas su istraživanja pokazala da izaziva apoptozu u više od 70 staničnih linija (Zhuang i sur, 1995), a istovremeno ne izaziva apoptozu u normalnim, netransformiranim stanicama. Za normalne stanice nije toksičan, ne transformira ih i ne interferira s njihovim staničnim ciklusom. Zanimljiva činjenica je i da indukcija apoptoze kod apoptina nije ovisna o tumor supresoru p53 (Oorschot i sur, 1999). Ta činjenica bi se mogla iskoristiti pri liječenju brojnih tumora, budući da je upravo p53 mutiran kod većine tumora, koji su stoga rezistentniji na konvencionalne kemoterapeutske agense (Hussain i Harris, 1998). Također, ne djeluje inhibitory na limfocite niti bilo koje stanice imunog sustava, što je dokazano tijekom

prekliničkih ispitivanja na miševima (Backendorf, 2008). Ova svojstva učinila su ga zanimljivim i obećavajućim alatom u liječenju tumora, a istraživanja njegovog djelovanja doprinose i rasvjetljavanju ranih koraka u nastanku tumora.

Točan mehanizam djelovanja apoptina nije u potpunosti razjašnjen, no vjerojatno je za njegovu selektivnu toksičnost prema tumorskim stanicama zaslužna lokalizacija u stanici. U normalnim, netransformiranim stanicama on se nalazi u citoplazmi, dok u tumorskim stanicama odlazi u jezgru. Kao i druge makromolekule, on ne može proći kroz jezgrinu ovojnici, već u jezgru ulazi putem aktivnog transporta uz pomoć nosača karioferina kroz kompleks jezgrinih pora (engl. *nuclear pore complex*, NPC). Importin, protein iz skupine karioferina, prepoznaje signal za ulazak u jezgru, koji kod apoptina čine dva slijeda bazičnih aminokiselina na položaju 82 – 88 i 111 – 121 (Oorschot i sur, 2003). Osim signala za ulazak u jezgru, apoptin sadrži i dva slijeda aminokiselina za izlazak iz jezgre u citoplazmu, na položajima 33 do 46 i 97 do 105 aminokiselina, koje prepoznaje eksportin, također iz porodice karioferina (Poon i sur, 2005). Ostanak u jezgri nužan je za pokretanje apoptoze, pa se pretpostavlja da u tumorskim stanicama dolazi do maskiranja signala za izlazak iz jezgre. Moguće je da ključnu ulogu pri tome ima fosforilacija treonina na položaju 108, u blizini signala za izlazak iz jezgre. Do danas nije rasvijetljen mehanizam fosforilacije, no kinaza s tom ulogom je najvjerojatnije aktivna u tumorskim stanicama i u ranim koracima transformacije normalnih stanica, budući da kod normalnih stanica ne dolazi do fosforilacije apoptina (Rohn i sur, 2002). Također je pokazano da su fosforilacija i ulazak u jezgru međusobno povezani. Transformacija normalnih fibroblasta uvođenjem velikog, odnosno malog T antigena SV40, koji sadrže istu domenu, čini te stanice osjetljivima na apoptin i usmjerava ga u njihovu jezgru (Zimmerman i sur, 2012). Osim toga, stanice postaju osjetljive na apoptin prije nego uđu u stanje krize te prije nego su stabilno transformirane, što upućuje na činjenicu da apoptin prepoznaje rane korake tijekom složenog procesa onkogene transformacije (Zhang i sur, 2004). Moguće je da je ostanak u jezgri uvjetovan i interakcijom s proteinima u jezgri, kao što su PML, čijim vezanjem se blokira signal za izlazak iz jezgre na položaju 33 do 46 aminokiselina, a istovremeno se apoptin lokalizira na područje tih tjelešaca u jezgri. Kod normalnih stanica apoptin ne ostaje u jezgri, već se aktivnim transportom uz pomoć CRM1 izbacuje iz jezgre u citoplazmu, gdje ne može pokrenuti apoptozu. Osim toga, Zhang i suradnici (2003) pokazali su da u normalnim, netransformiranim stanicama dolazi do biokemijskih promjena apoptina. Akumulira se u čestice koje se nakupljaju blizu membrane, a njegov C-terminalni epitop prekriju antitijela. Pietersen i suradnici (2005) pokazali su njegovu

nestabilnost u normalnim stanicama, a novija istraživanja upućuju da se apoptin u normalnim stanicama razgrađuje putem proteasoma (Lanz, 2012), što zajedno s rezultatima prethodnog istraživanja upućuje na njegov netoksični efekt u normalnim stanicama i govori u prilog sigurnosti njegove upotrebe kao terapijskog agensa.

Ulazak i ostanak u jezgri je neophodan, ali ne i dovoljan događaj koji omogućuje protutumorski učinak apoptina, no do danas nije u potpunosti rasvijetljeno što je to unutar transformirane stanice što apoptin prepoznaje, te zatim preusmjerava signale u stanici i u konačnici dovodi do njenog uništenja. Apoptin se može vezati na DNA i stvara superstrukture promjera 200 nm, u kojima se do 20 multimera apoptina veže na otprilike 3 kb DNA. Osim toga, u jezgri kolokalizira s heterokromatinom, koji je transkripcijski neaktivan, što zajedno s prethodnom činjenicom ukazuje kako nema ulogu u regulaciji transkripcije gena (Oorschot i sur, 2003). Najvjerojatniji način na koji apoptin pokreće apoptozu je stupanjem u interakciju s nekim proteinom u jezgri. Do danas su provedena istraživanja kako bi se pronašao njegov interakcijski partner te postoji nekoliko kandidata koji bi mogli imati ulogu u indukciji apoptoze. Protein Nur77 je jezgrin receptor, koji igra ulogu u prijenosu signala u stanici, a aktivnost mu ovisi o lokalizaciji. Sastoji od transaktivacijske domene na N-terminusu, centralne DNA-vezujuće domene s motivom cinkovih prstiju te C-terminalne domene s homologijom hormon-vezujućih domena. Za aktivaciju ne zahtijeva vezanje liganda; njegova stabilna ekspresija rezultira apoptozom stanice, dok prolazna dovodi do progresije kroz stanični ciklus. Prilikom lokalizacije u jezgri djeluje kao transkripcijski faktor i regulira ekspresiju gena uključenih u apoptozu te djeluje kao onkogeni faktor preživljenja i potiče stanični rast. Uslijed interakcije s apoptinom dolazi do njegove translokacije u citoplazmu tumorske stanice i vezanja na Bcl-2 u mitohondrijima te stimuliranja apoptoze i otpuštanja citokroma c (Maddika i sur, 2005). Jedan od proteina s kojima apoptin stupa u interakciju je Nmi (N-Myc interakcijski protein), citoplazmatski protein čija funkcija nije u potpunosti razjašnjena. Ovaj protein može ući u jezgru vezanjem na skupinu transkripcijskih faktora visoke mobilnosti, Sox10 (Sun i sur, 2002). Apoptin također stupa u interakciju s proteinom DEDAF. Ovaj se protein veže s proteinima koji se vežu za DNA i sadrže proapoptotsku efektorsku domenu smrti. Proteini DEDAF nalaze se u jezgri, gdje kod tumorskih stanica kolokaliziraju s apoptinom te induciraju apoptozu, za razliku od normalnih stanica. Hipp1 je komedijator apoptoze huntington-interakcijskog proteina 1 (Hip-1), a njihova međusobna interakcija rezultira regrutacijom kaspaze 8 i pokretanjem apoptoze. Kako Hipp1 kolokalizira s apoptinom samo u citoplazmi normalnih stanica, budući da je kod tumorskih stanica apoptin

Apoptin registrira vrlo rane promjene u procesu maligne transformacije, kao što je inaktivacija protein-fosfataze 2A (PP2A) u fibroblastima djelovanjem malog antigena (ST) SV40. PP2A je fosfataza uključena u brojne signalne puteve u stanici te ima ulogu u stabilizaciji p53 i sprječavanju mitoze uslijed oštećenja DNA. Jedna od uloga je i stabilizacija interakcija kromosoma s diobenim vretenom tijekom stanične diobe. Poremećaji njezine aktivnosti dovode do maligne transformacije. Regulacijska podjedinica PP2A može se inaktivirati vezanjem malog antigena SV40, ST, kao i proteina BCA3. Ovaj rani, štoviše jedinstveni, korak prema malignoj transformaciji „koristi“ apoptin, te se uslijed inaktivacije PP2A fosforilira, ulazi u jezgu te izaziva apoptozu stanice (Zimmerman i sur, 2012).

Postoji još istraživanja koja također povezuju djelovanje apoptina i odgovor stanica na oštećenje DNA. Autori su pokazali da apoptin ulazi u jezgu te izaziva smrt u primarnim stanicama u kojima je induciran odgovor uslijed oštećenja DNA. Činjenicu da apoptin prepoznaje i koristi odgovor uslijed oštećenja DNA može se objasniti time što se replikacija virusnog genoma od strane stanice prepoznaje kao strana DNA i pokreće se odgovor koji omogućuje translokaciju apoptina u jezgu. Nadalje se pokreće popravak oštećenja te apoptoza, što virusu odgovara jer se time omogućava njegovo daljnje širenje (Kucharski i sur, 2011).

1.1.3. Potencijalna primjena apoptina u terapiji

Sposobnost apoptina da selektivno inducira apoptozu samo u tumorskim, a ne i u normalnim stanicama, čini ga dobrim potencijalnim terapeutikom, što su potvrdila i dosadašnja istraživanja njegove aktivnosti *in vivo* na mišjim modelima. Budući da djeluje neovisno od p53, apoptin može djelovati i kod tumora gdje je ovaj protein mutiran i gdje stoga nisu učinkoviti ostali kemoterapeutici. Apoptin također pojačava citotoksični efekt drugih kemoterapeutika kad se primjenjuje zajedno s njima (Olijslagers i sur, 2007). Stoga bi se mogao koristiti i kao kombinirana antitumorska terapija. Proteini s kojima stupa u interakciju također su dobra potencijalna meta za razvoj nove antitumorske terapije. Primjerice, budući da apoptin potiče apoptozu inhibicijom APC1, inhibicija tog proteina nekim drugim načinom, primjerice korištenjem siRNA, može se potaknuti apoptoza u tumorskim stanicama (Backendorf i sur, 2008).

Jedna od poteškoća primjene apoptina u terapiji je činjenica da je nužna određena količina proteina za njegovu učinkovitost. Važno je zato izabrati adekvatan način za njegov

unos u stanicu. Do sad je dokazana učinkovitost apoptina *in vivo* na mišjim modelima, korištenjem različitih vektora za unos u stanicu, koji se baziraju na nereplikativnim virusima. Najčešće se koriste adenovirusni vektori, koje su razvili Pietersen i suradnici (2003). Nakon direktnog injektiranja adenovirusnog vektora s apoptinom u tumor miša, smanjila se proliferacija stanica i rast tumora. Neovisno o korištenom vektoru dobiva se jedan od tri karakteristična odgovora mišjeg modela na terapiju. Prvi je potpuno povlačenje tumora, drugi značajan zastoj rasta tumora, dok kod trećeg tumor raste i dalje kinetikom jednakom kao kod kontrolnih uzoraka. Moguće je da je različit odgovor na apoptin posljedica nedovoljnog unosa u stanicu. Ovaj nedostatak vektorskih sustava mogao bi se zaobići konstrukcijom vektora koji se selektivno repliciraju u tumorskim stanicama, tako da se viralni geni nužni za replikaciju stave pod kontrolu tumor-specifičnog promotora. Korištenje ovakvih vektora omogućilo bi širenje apoptina samo kroz tumorsko tkivo. Ovaj način također podrazumijeva direktan lokalni unos u tumorsko tkivo. Sistemska primjena adenovirusnog vektora s apoptinom također je moguća, korištenjem endocitoze posredovane receptorima koji imaju sposobnost vezati ligande i unijeti ih u stanicu. Za to su nužni receptori eksprimirani samo na određenim stanicama, primjerice asialoglikoproteinski receptori, koji su uglavnom eksprimirani na jetri. Vezanjem gena za apoptin s ligandom ovog receptora omogućio bi se efikasan unos apoptina u stanice jetre, a time i liječenje tumora jetre. Budući da su ovi receptori eksprimirani samo na jetri, liječenje drugih tumora baziralo bi se na principu vezanja apoptina ligandima receptora specifičnih za tip tumora (Backendorf i sur, 2008).

1.2. Rak

1.2.1. Nastanak raka

Rak, tumor ili neoplazija podrazumijeva abnormalni rast stanica uzrokovan različitim promjenama u ekspresiji gena, koji dovodi do poremećaja u regulaciji proliferacije i apoptoze stanica. Zbog toga one postaju sposobne napasti druga tkiva i organe, uzrokujući promjene i u konačnici smrt organizma. Složeni proces karcinogeneze, kojim normalne stanice u tijelu postaju stanice raka, s jedne je strane uvjetovan okolišnim čimbenicima, a s druge nasljednim faktorima, jer nastaje kao posljedica promjena u genima odgovornima za rast i diferencijaciju stanica, prvenstveno onkogenima i tumor supresor genima. Medicinski gledano, pojam „tumor“ obuhvaća složenu skupinu bolesti, sa znatnim razlikama u brzini rasta i širenja, stanju stanične diferencijacije, mogućnosti dijagnoze i odgovoru na liječenje. Gledano s područja molekularne biologije, rak obuhvaća relativno mali broj bolesti sa sličnim molekularnim poremećajima u stanici.

Danas se zna kako tumor može nastati od različitih tipova stanica koje međusobno reagiraju i stvaraju vlastiti mikrookoliš, koji doprinosi njihovoj sposobnosti da se šire i metastaziraju u druga tkiva. Tumorske stanice nastaju nakupljanjem promjena u normalnim stanicama, zbog kojih one dobivaju funkcionalne prednosti koje im omogućuju preživljenje, proliferaciju i širenje u druga tkiva i organe. Kod različitih vrsta tumora promjene nastaju na različite načine, no većinom su posljedica genomske nestabilnosti zbog nasumičnih mutacija i kromosomskih rearanžmana. Do promjena najčešće dolazi u dvije skupine gena – onkogenima i tumor supresorima. Onkogeni nastaju nakupljanjem mutacija u genima za proteine čija je uloga poticanje stanične diobe i izbjegavanja stanične smrti (Bishop, 1996). Uloga tumor supresora je također regulacija staničnog ciklusa: uslijed oštećenja u stanici zaustavljaju stanični ciklus i potiču mehanizme popravka, odnosno izazivaju staničnu smrt u slučaju nepopravljivog oštećenja. Do nastanka tumorske stanice dolazi ako mutacije pojačaju aktivnost onkogeni, odnosno smanje protektivnu ulogu tumor supresora u stanici (Hanahan i Weinberg, 2011).

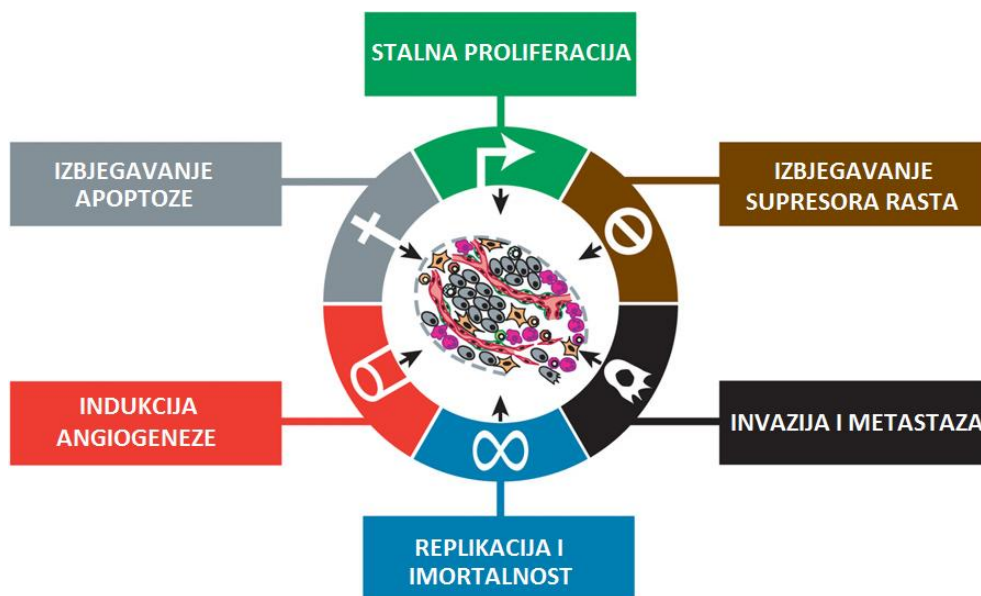
Tumorske stanice imaju nekoliko glavnih obilježja. Zbog poremećaja u regulaciji signala, tumorske stanice stalno primaju signale za rast i diobu te stoga imaju sposobnost neograničene proliferacije. Moguće je da dolazi do autokrine stimulacije proliferacije ili slanja signala normalnim stanicama u stromi tumorskog tkiva koje oslobađaju faktore rasta potrebne tumorskim stanicama (Bhowmick i sur, 2004). Osim toga, uspješno izbjegavaju

kontrolu proliferacije i zaustavljanje staničnog ciklusa, odnosno procese starenja i apoptoze. Česti su poremećaji dvaju osnovnih tumorskih supresora, pRB, koji regulira staničnu proliferaciju u ovisnosti o vanjskim signalima, i p53, koji zaustavlja ciklus ovisno o oštećenju DNA. Međustanični kontakti imaju funkciju supresije proliferacije stanica i održanja normalne homeostaze tkiva, a gubitak kontaktne inhibicije jedna je od karakteristika tumorskih stanica. Poznato je kako je programirana stanična smrt, apoptoza, prirodna barijera razvoju tumora te se pokreće tijekom promjena u stanici koje bi mogle dovesti do nastanka tumorske stanice. Tumorske stanice razvile su različite strategije za izbjegavanje apoptoze, od kojih je najpoznatiji gubitak funkcije proteina p53, senzora oštećenja u stanici. Alternativno, tumorske stanice mogu izbjeći apoptozu povećanjem ekspresije antiapoptotskih regulatora ili signala preživljenja, kao i smanjenjem ekspresije proapoptotskih faktora. Još jedna od karakteristika tumorskih stanica je neograničeni replikativni potencijal. Normalne stanice imaju ograničeni broj ciklusa diobe, nakon čega ulaze u senescenciju, stanje u kojem ne proliferiraju iako su i dalje vijabilne. Njihove telomere, tandemska heksanukleotidna ponavljanja na krajevima kromosoma, skraćuju se pri svakoj diobi te, kad postignu kritičnu duljinu, pokreću proces starenja kojim se ireverzibilno zaustavlja proliferacija. Tumorske stanice su imortalne, imaju neograničen proliferativni potencijal jer imaju aktivnu telomerazu - DNA polimerazu koja produljuje telomere. Tako se mogu neprestano dijeliti bez ulaska u senescenciju ili oštećenja telomera. Besmrtnost se može postići i alternativnim mehanizmom produljenja telomera, koji se bazira na rekombinaciji.

Rastom tumora javlja se potreba za dodatnim krvnim žilama jer su im, kao i normalnom tkivu, potrebni nutrijenti i kisik te uklanjanje proizvoda metabolizma i ugljikovog dioksida. Da bi tumor mogao rasti, mora potaknuti proces angiogeneze, odnosno urastanje novih krvnih žila - proces koji se u normalnom tkivu javlja samo u embrionalnom razvoju i kod zacjeljivanja rana.

Tumor postaje malignan kad počinje invazivno rasti i metastazirati u udaljene organe. Ovi su događaji povezani s promjenama u vezi tumorskih stanica s drugim stanicama i ekstracelularnim matriksom. Dio stanica karcinoma dobivaju sposobnost invazije, širenja i otpornosti na apoptozu procesom tzv. epitelno-mezenhimske tranzicije (EMT), kojima poprimaju fenotip mezenhimskih stanica. U normalnom tkivu se EMT događa tijekom embriogeneze i zacjeljivanja rana, te je pod kontrolom transkripcijskih faktora. Ekspresijom tih transkripcijskih faktora u različitim kombinacijama u tumorskom tkivu pokreće se EMT. Neka od staničnih svojstava koja kontroliraju ti transkripcijski faktori su gubitak adherentnih

veza između stanica i adhezije za bazalnu laminu, gubitak polarnosti stanica, promjena morfologije stanica iz poligonalne, karakteristične za epitelne stanice, u vretenastu, karakterističnu za fibroblaste te ekspresija enzima koji degradiraju stanični matriks. Smanjuje se ekspresija E-kadherina, ključnog za kontakte između stanica i glavnog supresora mobilnosti stanica. Rezultat ovih promjena je sposobnost tumorskih stanica da se šire lokalno i ulaze u krvotok i limfni sustav te metastaziraju (Hanahan i Weinberg, 2011). Osim toga, tumorske stanice reprogramiraju stanični metabolizam kako bi im omogućio kontinuirani rast i proliferaciju: za razliku od metabolizma normalnih stanica jer čak i u prisutstvu kisika glukozu razgrađuju procesom glikolize i pretvaraju u laktat (Warburg, 1930). Uz sva ova obilježja, tumorske stanice izbjegavaju imunološki odgovor domaćina koji bi ih eliminirao iz organizma. Na slici 3 prikana su glavna obilježja tumorskih stanica.



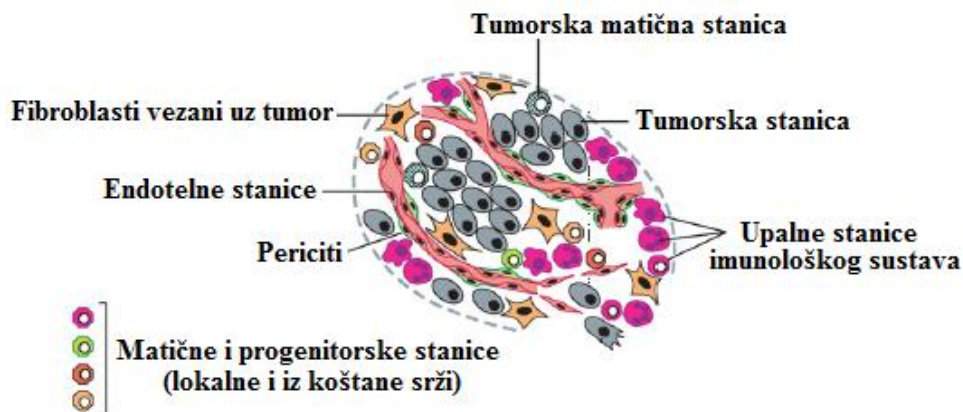
Slika 3: Osnovna obilježja tumorske stanice, preuzeto i prilagođeno iz Hanahan i Weinberg, 2011.

1.2.2. Matične stanice raka

Matične stanice su nespecializirane stanice iz kojih nastaju svi tipovi stanica tijekom razvoja i života organizma. Karakteriziraju ih svojstvo samoobnavljanja i neograničene diobe te sposobnost diferencijacije u različite stanične tipove u organizmu. Svakom diobom matične stanice nastaje jedna stanica s potencijalom matične stanice, te druga s potencijalom diferencijacije u druge tipove stanica. Kod embrija u stanju blastociste, matične stanice nalaze se u unutrašnjem sloju stanica i iz njih se razvijaju sva tkiva i organi. U odraslom tkivu služe

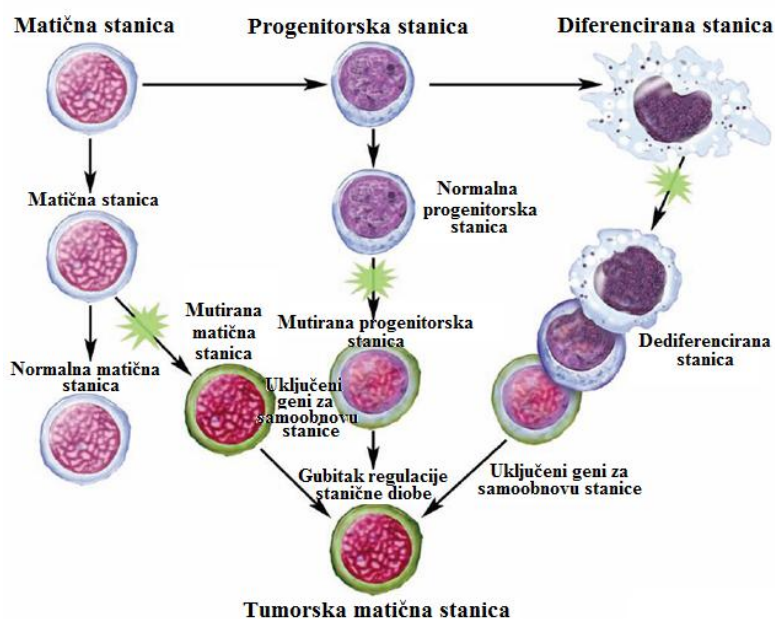
za obnovu oštećenih stanica; u koštanoj srži i crijevu se stalno dijele i zamjenjuju oštećeno i istrošeno tkivo i stanice, dok se u drugim organima dijele samo u posebnim uvjetima.

Novija istraživanja heterogenosti stanica unutar tumora ukazuju može postojati vrlo mala subpopulacija stanica koje se nazivaju tumorskim matičnim stanicama. Te su stanice zadržale karakteristike matičnih stanica, a odgovorne su za nastanak različitih tipova stanica unutar tumora (slika 4). U tumorskom su tkivu prisutne u maloj količini, na površini izražavaju markere karakteristične za matične stanice tkiva iz kojih su potekle, imaju sposobnost formiranja sfera te sposobnost formiranja novih tumora nakon transplantacije u imunodeficientnog miša (Gupta i sur, 2009). Ako su rezistentne na kemoterapeutike i radioterapiju, one su odgovorne za ponovni rast i širenje tumora nakon terapije.



Slika 4: Tumorske matične stanice unutar mikrokološa tumora, preuzeto i prilagođeno iz Hanahan i Weinberg, 2011.

Put diferencijacije iz nediferencirane matične u zrelu stanicu određenog tipa uključuje nekoliko posrednih staničnih tipova. Te stanice se nazivaju progenitorske ili prekursorske stanice. Djelomično su diferencirane i iz njih nastaju zrele stanice, no dijelom zadržavaju i svojstvo samoobnavljanja. Tumorske matične stanice mogu nastati iz sva tri tipa stanica na putu diferencijacije iz matičnih u zrele stanice – iz matičnih, progenitorskih i zrelih stanica (slika 5).



Slika 5: Nastanak tumorske matične stanice, preuzeto i prilagođeno sa http://stemcells.nih.gov/info/Regenerative_Medicine/pages/2006chapter9.aspx.

Nedavno je pokazano da se u laboratoriju mogu konstruirati stanice s obilježjima matičnih stanica raka dojke (Morel i sur, 2008), koristeći prethodno uspostavljen model progresije tumora dojke (Elenbaas i sur, 2001). Naime, u prvom koraku primarne stanice epitela dojke izolirane iz tkiva prolaze onkogenu transformaciju posredstvom retroviralne ekspresije velikog T antigena virusa SV40 čime se inaktiviraju p53 i pRb proteini, a nadalje se ekspresijom hTERT podjedinice telomeraze omogućuje produljivanje telomera, što dovodi do imortalizacije tih stanica i omogućuje uzgoj u kulturi (Elenbaas i sur, 2001). U drugom koraku je iskorištena nova spoznaja, a to je da indukcija epitelno-mezenhimske tranzicije doprinosi uspostavljanju svojstava matičnih stanica (Hanahan i Weinberg, 2000, Morel i sur, 2008, Gupta i sur, 2009). Jedinstveni događaj koji je u opisanom sustavu omogućio stanicama prolazak epitelno-mezenhimske tranzicije je utišavanje gena CDH1 koji kodira za E-kadherin, pomoću kratke RNA s ukosnicom (engl. *short hairpin RNA*, shRNA). Ove stanice na površini izražavaju veliku količinu markera CD44, a malu CD24, što je karakteristično za matične stanice raka dojke. Također je pokazano da su rezistentnije na kemoterapeutike od kontrolnih stanica HMLE-shGFP. Iako su rezistentne na većinu klasičnih kemoterapeutika, Gupta i suradnici (2009) pokazali su da salinomycin ubija matične stanice raka dojke i da nakon tretmana dolazi do promjene u razini ekspresije različitih gena. Ovo istraživanje sugerira da postoji terapija koja bi selektivno djelovala samo na matične stanice tumora, a drugim istraživačima omogućuje korištenje prikladnog sustava *in vitro* za traženje novih potencijalnih lijekova.

1.3. Stanična smrt

Stanična smrt uglavnom se klasificira na temelju morfoloških karakteristika, no u novije vrijeme sve su više dostupni biokemijski testovi koji su omogućili dodatne informacije i razjasnili razlike morfološki sličnih smrti na funkcionalnoj i biokemijskoj razini. Od nekoliko najvažnijih tipova smrti bitno je spomenuti nekrozu, koju karakterizira bubrenje pucanje stanice te otpuštanje staničnog sadržaja i proupalnih molekula u okolno tkivo; autofagiju, zaštitni odgovor stanice na stres i oštećenje kod koje dolazi do raspadanja staničnih organela i korištenja njihovih molekula u biosintezi drugih molekula te mitotsku katastrofu, onkoprotektivni mehanizam uslijed pogrešnog razdvajanja kromosoma (Galluzzi i sur, 2012). Ipak, najbolje proučen tip stanične smrti je programirana stanična smrt, koja je opisana u sljedećem poglavlju.

1.3.1. Mehanizmi programirane stanične smrti

Apoptoza je aktivan i programiran stanični proces eliminacije suvišnih, promijenjenih i malignih stanica u organizmu. Igra važnu ulogu u fiziološkim procesima kao što su nastanak tkiva i organa tijekom embriogeneze, ali i tijekom odrasle dobi u obnovi tkiva, regulaciji imunološkog sustava i kontroli razvoja bolesti putem eliminacije tumorskih stanica. Karakterizira je skupljanje stanica, segmentacija jezgre, kondenzacija i fragmentacija DNA, koja u konačnici rezultira nastankom fragmentiranih tjelešaca okruženih membranom koje fagocitiraju susjedne stanice.

Mašinerija apoptoze sastoji se od uzvodnih regulatora i nizvodnih efektorskih komponenti (Adams i Cory, 2007). Regulatori se mogu podijeliti u dvije skupine, od kojih je prva skupina karakteristična za vanjski put apoptoze i prima i procesira ekstracelularne signale smrti, nastalih vezanjem različitih liganda na odgovarajući receptor smrti. Dolazi do konformacijske promjene i izlaganja tzv. domene smrti na citoplazmatskoj strani receptora koja stupa u interakciju s kinazom 1, proteinom FADD i c-FLIP i dr. Nastaje kompleks DISC (engl. *death inducing signaling complex*), koji regulira aktivaciju kaspaze 8. Druga skupina regulatora je karakteristična za unutarnji put apoptoze i integrira brojne signale koji dolaze iz stanice, kao što su oštećenje DNA, oksidativni stres, povećana količina Ca^{2+} u citosolu, nakupljanje nesmotanih proteina u endoplazmatskom retikulumu i drugi. Unutarnji put apoptoze rezultat je bioenergetske i metaboličke katastrofe u kojoj dolazi do rasipanja potencijala mitohondrijske membrane, smanjene sinteze ATP-a, inhibicije respiratornog

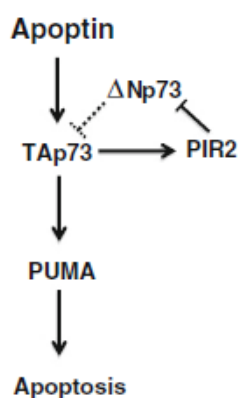
lanca, a time i povećane proizvodnje reaktivnih oblika kisika te otpuštanja toksičnih proteina iz međumembranskog prostora mitohondrija u citosol, kao što je citokrom c. Oba puta završavaju aktivacijom proteaza koje se inače nalaze u latentnom stanju, kaspaze 8, odnosno 9. One pak pokreću kaskadu proteolitičkog cijepanja efektorskih kaspaza i na kraju specifičnih proteaza i nukleaza, stanica se razgrađuje te je fagocitiraju je susjedne stanice i fagociti.

Pojavu apoptoze kontroliraju antiapoptotski proteini iz obitelji Bcl-2, koji su inhibitori apoptoze i djeluju na način da vežu i suprimiraju proapoptotske proteine koji potiču apoptozu, kao što su Bax i Bak. Proapoptotski proteini remete integritet vanjske membrane mitohondrija i omogućuju otpuštanje drugih proapoptotskih signalnih proteina u citosol, od kojih je najvažniji citokrom c. Otpušteni citokrom c aktivira kaskadu kaspaza i inducira promjene u stanici povezane s apoptozom. Inače, porodica proteina Bcl-2 sadrži i proapoptotske i antiapoptotske proteine, a zajednička im je domena s motivom BH3, pomoću kojeg međusobno ulaze u interakciju. Takvu domenu imaju npr. proteini Noxa i Puma (engl. *p53 upregulated modulator of apoptosis*), proteini porodice Bcl-2 koji su posrednici kod apoptoze posredovane aktivacijom tumorskog supresora p53 nakon oštećenja DNA. Osim toga, apoptozu može izazvati prevelika aktivnost onkoproteina, kao i nedovoljna količina signalnih faktora, i to putem proteina Bim koji također ima BH3 domenu (Juntilla i Evan, 2009).

Jedna od glavnih karakteristika tumorskih stanica je izbjegavanje apoptoze različitim mehanizmima. Ipak, apoptoza se može iskoristiti za eliminaciju tumorskih stanica ako im se pruži odgovarajući signal. Razni kemoterapeutici i zračenje induciraju apoptozu u stanicama uglavnom putem tumor supresorskog proteina p53. Međutim, kako u više od polovice tumora dolazi do mutacija u p53 proteinu, oni slabo odgovaraju na kemoterapiju i zračenje (Lowe i sur, 1994). Kod nekih je tumora povećana ekspresija antiapoptotskih proteina Bcl-2, Bcl-x te inhibitora kaspaza (Walensky i sur, 2006). Stoga bi bolji način liječenja ovih tumora pružile terapije kojima nisu nužni ovi proteini za indukciju apoptoze. Osim toga, razvoj novih učinkovitih terapija ovisi o otkriću agensa koji selektivno uništavaju tumorske stanice, dok normalne stanice ostavljaju intaktnima.

1.3.2. Apoptin i stanična smrt

Apoptin potiče apoptozu aktivacijom unutrašnjeg puta apoptoze inducirajući otpuštanje citokroma c iz mitohondrija i aktivaciju kaspaze 3 (Danen-van Oorscot i sur, 2000, Maddika i sur, 2005). Iako do danas nisu u potpunosti razjašnjeni putevi kojima dovodi do apoptoze, poznato je da stupa u interakciju s proteinom u jezgri, Nur77. Apoptin inducira apoptozu inhibicijom kompleksa APC/C i kod stanica u kojima je p53 nefunkcionalan, što znači da inducira apoptozu putem neovisnim o p53 (Teodoro i sur, 2004). Budući da je pokazano da apoptin reagira s proteinima iz porodice Hsp70, moguće je da aktivira apoptozu i tim procesima (Yuan i sur, 2013). Ne samo da je djelovanje apoptina neovisno o statusu tumor supresora p53, nego u različitim tumorskim stanicama s neaktivnim p53 aktivira drugi član obitelji p53, p73 (Taebunpakul i sur, 2012). Protein p73 pokazuje visoku razinu homologije s proteinom p53 u DNA vezujućoj domeni te također povećava ekspresiju gena uključenih u zaustavljanje staničnog ciklusa i apoptozu uslijed stresa stanice. Protein p73 može djelovati proapoptotski i antiapoptotski. Alternativnim prekrajanjem p73 nastaju izoforme, od kojih TAp73 sadrži transaktivacijsku domenu (TA) i djeluje proapoptotski, dok Δ Np73 nedostaje N-kraj i djeluje antiapoptotski. Taebunpakul i suradnici (2012) pokazali su da apoptin djeluje tako da stabilizira proapoptotsku TAp73 izoformu. Budući da TAp73 regulira ubikvitin ligazu PIR2, koja degradira Δ Np73 izoformu, dolazi do apoptotskog odgovora stanice. Osim toga, TAp73 može, kao i p53, aktivirati protein PUMA iz porodice proteina Bcl-2 te izazvati apoptozu (slika 6).



Slika 6: Jedan od modela djelovanja apoptina na apoptozu, preuzeto iz Taebunpakul i sur, 2012.

Lanz i suradnici (2013) pokazali su da apoptin prepoznaje poremećaj u diobenom vretenu kod tumorskih stanica koje se dijele. Naime, djelovanje apoptina može potaknuti

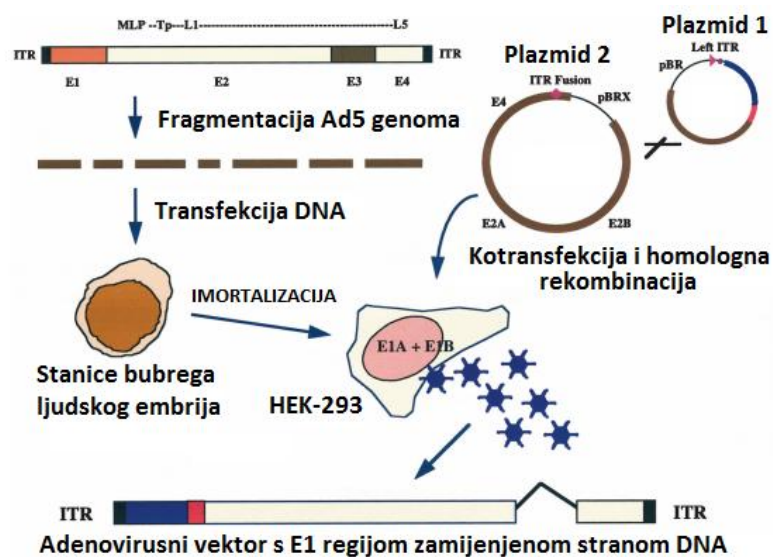
inaktivacija fosfataze PP2A, koja se nalazi na centromerama stanica u mitozu i osigurava vezu između kinetohora i mikrotubula te pravilnu segregaciju kromosoma. Direktnim vezanjem APC1 komponente APC/C kompleksa apoptin sprječava progresiju kroz stanični ciklus iz metafaze u anafazu te izaziva smrt stanice. Inhibicija APC/C dovodi do poremećaja diobenog vretena i smanjene degradacije ciklina B, pa osim apoptoze dolazi i do mitotske katastrofe. Budući da se smrt stanica događa uslijed poremećaja mitotskog aparata, one staju u metafazi i na kraju umiru, što su karakteristike mitotske katastrofe prema Nomenclature Committee on Cell death (2012). Autori sugeriraju da apoptin u većine stanica izaziva apoptozu, dok u stanica koje su u mitozu može izazvati i mitotsku katastrofu.

1.4. Adenovirusni vektori

Za uspješan unos gena u stanicu potreban je adekvatan vektor koji će biti visoko učinkovit, jednostavan za manipulaciju, dizajniranje i primjenu, ali i siguran za stanicu. Adenovirusi su dobri kandidati za tu namjenu jer su dobro proučeni i karakterizirani, imaju genom u koji se može ugraditi DNA do veličine 8 kb, relativno su stabilni, mogu se uzgajati do visokog titra (više od 10^{12} virusnih čestica po mililitru), imaju visoku infektivnost *in vitro* i *in vivo*. Budući da njihov životni ciklus ne zahtijeva ugradnju u genom domaćina, geni se eksprimiraju episomalno te stoga imaju nisku toksičnost za stanicu i ne postoji rizik od insercijske mutageneze. Mogu se unijeti u stanice na više načina i sigurni su za korištenje. Tijekom posljednjih nekoliko godina veća pažnja je posvećena korištenju adenovirusa kao vektora te se povećao kapacitet DNA koja se može ugraditi u njih, poboljšala kontrola njihove imunogeničnosti i njihove karakteristike. Koriste se kad je potrebna kratkotrajna ekspresija transgena, najčešće u liječenju tumora genskom terapijom te vakcinaciji. Unatoč ovim prednostima, adenovirusi imaju nedostatak što mogu zaraziti samo određeni spektar stanica zbog specifičnosti receptora na koje se vežu te što omogućuju samo prolaznu transfekciju (Zhang, 1999).

Adenovirusi (porodica *Adenoviridae*) spadaju u skupinu dsDNA virusa, s genomom veličine 36 kb. Na svakom kraju genoma nalaze se invertirane terminalne ponavljanja (engl. *inverted terminal repeats*, ITR) od 100-150 bp, a lijevi kraj sadrži signal za pakiranje virusne čestice. Genom sadrži rane (engl. *early*, E) i kasne (engl. *late*, L) gene. E1 kodira za proteine koji reguliraju transkripciju virusnog genoma i nekoliko staničnih gena, a E2 regija omogućuje sintezu proteina potrebnih za replikaciju DNA virusa. E3 proteini blokiraju citolizu stanice, dok su E4 geni uključeni u replikaciju DNA, ekspresiju i prekiranje kasnih gena te sprječavanje ekspresije staničnih gena. Adenovirusi mogu ući u široki spektar različitih stanica, no njihova efektivnost varira od tipa do tipa stanice, ovisno o receptorima na površini stanica na koje se oni vežu. Adenovirusi se vežu na transmembranski protein CAR, nakon čega slijedi internalizacija pomoću klatrinskih vezikula, degradacija proteina srži i proteina koji stabiliziraju kapsidu te transport gole viralne DNA u jezgru. Adenovirusi imaju litički ciklus, koji započinje ulaskom u stanicu, a završava liziranjem stanice i izlaskom infektivnih čestica. Pri tome za replikaciju virusa nije potrebna ugradnja virusnog genoma u genom domaćina (Zhang, 1999).

Adenovirusi se mogu koristiti kao vektori za prijenos gena ukoliko su replikacijski defektni, odnosno ako se ne mogu replicirati i pakirati u stanici. Takvi se virusi temelje na adenovirusu tipa 5 (RdAd5), kojem nedostaje E1 područje virusnog genoma odgovornog za glavne regulatore transkripcije, i sposobnost transaktivacije drugih virusnih gena, zbog čega se virus ne može replicirati. Rekombinantni adenovirusi konstruiraju se kotransformacijom *E. coli* BJ5183 *recBC sbcBC* s dvama lineariziranim plazmidima: jedan sadrži odabrani gen, u ovom slučaju za apoptin, s svojim regulacijskom regijom i sekvencama homolognim mjestu na koji se želi ugraditi odabrani gen (najčešće E1 ili E3), a drugi sadrži kompletnu virusnu DNA pocijepanu restrikcijom endonukleazom između sljedova komplementarnih prvom plazmidu. Homolognom rekombinacijom u *E. coli* između ovih sekvenci nastaje plazmid koji sadrži DNA rekombinantnog RdAd5, s ugrađenim genom od interesa. Virusne čestice rekombinantnog adenovirusa dobivaju se transfekcijom prethodno lineariziranog rekombinantnog RdAd5 plazmida u stanice bubrega ljudskog embrija (engl. *human embryonal kidney*, HEK 293) koje imaju stabilno ugrađeno E1 područje genoma u svoj genom, pa mogu komplementirati nedostatak tog dijela genoma u adenovirusnom vektoru (slika 7) (Ambriović Ristov, 2007).



Slika 7: Shematski prikaz nastanka adenovirusnog vektora s ugrađenom stranom DNA, na mjesto E1 regije, preuzeto i prilagođeno od Zhang, 1999.

1.5. Cilj rada

Cilj ovog rada je ispitati i usporediti protutumorske učinke apoptina na različitim staničnim modelima, kako bi se dobile dodatne informacije o mehanizmima djelovanja apoptina. U sklopu ovog diplomskog rada će se ispitati mogućnost zaražavanja stanične linije HMLE, odnosno imortaliziranih epitelnih stanica dojke, adenovirusnim vektorom. Nadalje, ispitat će se i usporediti antiproliferativni učinak apoptina na različitim tumorskim staničnim linijama, kao i na imortaliziranim epitelnim stanicama dojke s obilježjima tumorskih matičnih stanica. Na kraju će se pokušati utvrditi postoji li povezanost između antiproliferativnog učinka i lokalizacije apoptina u stanici.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Popis korištenih materijala i priprema otopina

Sve kemikalije i reagensi koji su korišteni u ovom radu nabavljeni su od proizvođača Sigma (SAD), ukoliko u tekstu nije drugačije navedeno.

2.1.1. Sastav medija za uzgoj stanica

Različite stanične linije zahtijevaju različiti medij da bi uspješno rasle u kulturi. Stanice linije HEK 293 rastu u mediju DMEM s visokom koncentracijom glukoze, H1299 i HCT116 rastu u mediju DMEM, dok je za uzgoj HMLE-shEcadherin i HMLE-shGFP potreban medij HUMEK.

DMEM (engl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium) je složeni hranjivi medij, proizvođača Lonza. Konačni volumen od 500 ml komplementiran je dodatkom sljedećih sastojaka:

- Fetalni teleći serum (engl. fetal bovine serum, FBS) – 10% v/v – dodano 50 ml
- L-glutamin – 2 mM – dodano 5 ml 200 mM izvorne otopine
- Penicilin streptomycin – 10,000 U/ml penicilina i 10 mg/ml streptomicina – dodano 5 ml

DMEM s visokom koncentracijom glukoze (engl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium, high glucose) dobiven je pripremom medija kao što je gore navedeno, te dodatkom 5 ml izvorne otopine (engl. *stock otopina*) glukoze koncentracije 45 g/100 ml, da bi konačna koncentracija u mediju bila 4,5 g/L.

HUMEK je složeni hranjivi medij, proizvođača GIBCO, Invitrogen, SAD, koji je priređen miješanjem komplementiranog DMEM hranjivog medija, priređenog kao što je gore navedeno, i HUMEK medija u omjeru 1:1 (dakle 250 ml svakoga), u koje je dodano:

- Inzulin – 125 µl otopine koncentracije 10 mg/ml
- Hidrokortizon – 5 ml izvorne otopine od 50 ug/ml, koji se priprema miješanjem 1 mg hidrokortizona s 1 ml etanola i dodavanjem 19 ml medija
- Ekstrakt hipofize (GIBCO, Invitrogen, SAD) – 1,25 ml
- GIBCO dodatak za HUMEK (GIBCO, Invitrogen, SAD) - 2,5 ml

Medij za zaražavanje (2% DMEM) priprema se miješanjem 1/5 kompletiranog DMEM-a (inače 10%-tni) i 4/5 nekompletiranog DMEM-a.

2x MEM (Lonza) komplementira se tako da u konačnici, nakon miješanja sa agarozom, u mediju bude 2 mM glutamin i 2% FBS.

2.1.2. Sastav i priprema otopina

Fosfatni pufer PBS (engl. *phosphate buffer saline*) priprema se miješanjem 80 mL otopine I, 100 mL otopine II i destilirane vode do konačnog volumena od 1 L. Vrijednost pH ovako pripremljenog PBS pufera iznosi između 7,1 i 7,3.

OTOPINA I:

- NaCl – 100 g
- KCl – 2,5 g
- Na₂HPO₄ – 14,35 g
- KH₂PO₄ – 2,5 g
- Nadopuniti dH₂O do 1 L

OTOPINA II:

- CaCl₂ – 100 g
- MgCl₂·6H₂O – 2,5 g
- Nadopuniti dH₂O do 1 L

Tripsin je pripremljen dodatkom 100 ml 2,5% (10x koncentriranog) tripsina, proizvođača GIBCO, Invitrogen, SAD u 900 ml PBS-a, pripremljenog kao što je gore opisano.

Tripsin s 1% EDTA pripremljen je dodatkom 1 ml 40 mM EDTA u 100 ml tripsina.

Tripansko modrilo pripremljeno je dodatkom 100 µl 40% izvorne otopine Trypan blue i 10 ml PBS-a, pripremljenog kako je gore navedeno da bi se dobila 0,4% otopina.

TD pufer pripremljen je od sljedećih komponenti. Vrijednost pH je između 7,4 i 7,5.

- 137 mM NaCl
- 5,1 mM KCl
- 7 mM Na₂HPO₄
- 25 mM Tris baza

Otopina CsCl w/w 1,25 pripravljena je otapanjem 36,16 g CsCl u 100 ml TD pufera, pripremljenog kao što je gore opisano.

Otopina CsCl w/w 1,34 pripravljena je otapanjem 51,20 g CsCl u 100 ml TD pufera, pripremljenog kao što je gore opisano.

Otopina CsCl w/w 1,40 pripravljena je otapanjem 62,00 g CsCl u 100 ml TD pufera, pripremljenog kao što je gore opisano.

Pufer za dijalizu je pripremljen od 400 ml otopine, koja je pripravljena miješanjem sljedećih komponenti na magnetskoj miješalici te joj je pomoću pH metra izmjeren pH 7,4:

- TRIS baza – 6,055 g
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ – 1,017 g
- dH_2O – 500 ml

Otopina je pomiješana sa 400 ml glicerola (da ga u konačnoj otopini bude 10%) te dopunjena destiliranom vodom do 4000 ml i promiješana na magnetskoj miješalici. Pufer je prebačen u staklene boce i autoklaviran.

0,5% otopina glutaraldehida pripravljena je dodatkom 160 μl 25% otopine glutaraldehida u 7840 μl PBS-a.

MTT reagens pripravljen je otapanjem 1 g Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide praška u 200 ml PBS-a, pripremljenog kao što je gore navedeno. Tako je dobivena izvorna otopina, koja je za eksperiment razrijeđena 10 puta.

Otopina X-gal pripravljena je dodatkom 320 μl 100 mM kalijevog ferocijanida (konačna koncentracija 4 mM), 320 μl 100 mM kalijevog ferocijanida (konačna koncentracija 4 mM), 64 μl X-gal (konačna koncentracija 40 mg/ml) i 16 μl 1 M MgCl_2 u 7280 μl PBS-a.

Agarozza za prelijevanje plakova napravljena je miješanjem 15 ml 2% agaroze otopljene u mirovalnoj pećnici sa 15 ml 2x MEM-a, pripremljenog kao što je gore opisano, pazeći da se ne ohladi i skruti.

0,1% otopina Triton X pripravljena je dodatkom 5 μl Tritona X u 5 ml PBS-a.

2% otopina BSA pripravljena je otapanjem u PBS-u, pripremljenom kao što je gore opisano.

Primarno antitijelo (mišji anti-Flag, Invitrogen, 1:500) je priređeno stavljanjem 1 μl antitijela u 500 μl BSA.

Sekundarno antitijelo (protu-mišje antitijelo pripremljeno u kozi, s fluorescentnom bojom alexa 594, Invitrogen, 1:400) pripremljeno je dodavanjem 1 μ l antitijela u 400 μ l BSA.

4% paraformaldehyd je pripremljen otapanjem Paraformaldehyde powder (Polysciences, Inc.) praška u PBS-u, pripremljenom kao što je gore opisano. Otopina je zagrijavana do ključanja u mikrovalnoj pećnici kako bi se prašak otopio.

2.2. Rad sa stanicama u kulturi

Prilikom rada sa stanicama u kulturi potrebno je veliku pažnju posvetiti sterilnosti. Sve manipulacije sa stanicama izvođene su u sterilnom okruženju, u laminaru s okomitim strujanjem zraka. U radu sa stanicama korištene su sterilne staklene pipete i sterilni plastični nastavci za mikropipete te sterilne epruvete, a uvijek su korištene rukavice prethodno sterilizirane 96%-tnim etanolom. Stanice su rasle u plastičnim bocama različitih dimenzija, s filtrom na čepu, u vlažnoj atmosferi, u inkubatoru pri 5% ugljikovog dioksida i temperaturi od 37°C. Za presađivanje i rad sa stanicama korišteni su odgovarajući sterilni mediji, ovisno o staničnoj liniji. Za neutralizaciju ostataka stanica i medija korišten je 1% otopina Asepsola (Pliva), a za stanice koje su tretirane virusom 5% otopina Asepsola (Pliva).

2.2.1. Stanične linije

Kako bi se ispitao protutumorski učinak apoptina *in vitro*, korištene su različite tumorske stanične linije. U ovom radu korištene su stanice HEK 293 za zaražavanje, umnožavanje i izolaciju adenovirusnog vektora koji sadrži apoptin, dok su za ispitivanje učinka apoptina korištene tumorske stanične linije HCT116 i H1299 te imortalizirane epitelne stanice dojke HMLE-shEcad i HMLE-shGFP (tablica 1).

Tablica 1: Popis korištenih staničnih linija

Ime stanične linije	ATCC broj	Porijeklo	Status p53	Napomena
HEK 293	CRL-1573	Imortalizirane stanice embrionalnog bubrega	Divlji tip	Stanice su imortalizirane ugradnjom adenovirusnog ranog gena E1
H1299	CRL-5803	Stanice karcinoma pluća ne-malih stanica	Deletiran	-
HCT 116	CCL-247	Stanice karcinoma debelog crijeva	Divlji tip	-
HMLE-shEcad	*	Imortalizirane epitelne stanice dojke s utišanim genom za E kadherin	Inaktiviran velikim T antigenom SV40	Stanična linija posjeduje obilježja tumorskih matičnih stanica
HMLE-shGFP	*	Imortalizirane epitelne stanice dojke	Inaktiviran velikim T antigenom SV40	-

*dobivene iz laboratorija prof. Weinberga sa Instituta Whitehead, MIT, SAD

2.2.1.1. HEK 293

HEK 293 je stanična linija bubrega ljudskog embrija. Nastala je uzgojem normalnih stanica bubrega ljudskog embrija u kulturi te njihovom imortalizacijom pomoću DNA adenovirusa 5 (RdAd5), ugradnjom 4,5 kb područja E1 viralnog genoma u kromosom 19. Zbog toga te stanice mogu komplementirati E1 regiju koja nedostaje adenovirusnom vektoru, te su pogodne za njegovo umnožavanje. Prvi je stanice uzgojio Alex Van der Eb u ranim 1970.-im godinama u Nizozemskoj, a transformirao ih je Frank Graham te su ime dobile jer je to bio 293. eksperiment po redu. HEK 293 su adherentne epitelne stanice, koje mogu rasti u kulturi.

2.2.1.2. H1299

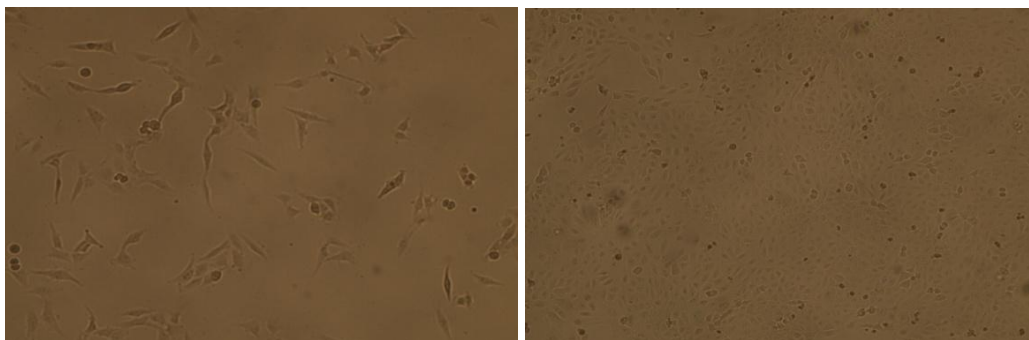
H1299 su stanice ljudskog karcinoma pluća ne-malih stanica, dobivene iz limfnih čvorova tumora koji je metastazirao, iz 43-godišnjeg muškarca koji je prethodno bio podvrgnut terapiji zračenjem. To su adherentne, epitelne stanice koje mogu rasti u kulturi. Imaju djelomičnu homozigotnu deleciju p53 proteina te se taj protein u njima ne eksprimira.

2.2.1.3. HCT 116

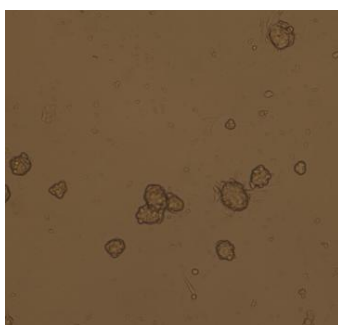
HCT 116 je stanična linija karcinoma debelog crijeva, dobivenih iz odraslog muškarca. To je epitelna adherentna linija koja se može uzgojiti u kulturi. Sadrži mutaciju u kodonu 13 ras proto-onkogeni.

2.2.1.4. HMLE-shEcad i HMLE-shGFP

HMLE stanice (slika 8) su ljudske epitelne stanice dojke izolirane iz tkiva, te imortalizirane ekspresijom velikog T antigena virusa SV40 i hTERT podjedinice telomeraze. HMLE-shEcad stanice su inducirane da prođu epitelno-mezenhimsku tranziciju utišavanjem gena za E-kadherin pomoću kratke RNA s ukosnicom. HMLE-shGFP su stanice koje su služile kao kontrola prilikom utišavanja, prilikom čega im je ubačena shRNA za nepostojeći protein, tj. GFP (Elenbaas i sur, 2001). Obje linije su konstruirane u laboratoriju prof. Weinberga sa sveučilišta MIT i dobivene zahvaljujući njegovoj ljubaznosti. Stanice HMLE-shEcad posjeduju obilježja tumorskih matičnih stanica: fenotip $CD44^+CD24^-$, mogu stvarati mamosfere (slika 9), te pokazuju rezistenciju na kemoterapeutike, što se rutinski provjerava u Laboratoriju za eksperimentalnu terapiju.



Slika 8: Stanice HMLE-shEcad (lijevo) i HMLE-shGFP (desno), pri povećanju 100x.



Slika 9: Stanice HMLE-shEcad stvaraju mamosfere uslijed nepovoljnih uvjeta, kao što je nedostatak hranjivih tvari u mediju, pri povećanju 100x.

2.2.2. Presađivanje stanica

Stanice su presađivane kada bi dosegle oko 80% konfluentnosti, otprilike svaka tri dana. Nakon što je pod mikroskopom provjerena konfluentnost stanica, u laminaru je sterilnom staklenom pipetom uklonjen medij iz boce i bačen u staklenku s Asepsolom (Pliva). U bocu je oprezno dodano 4-5 ml 10% v/v tripsina, laganim okretanjem boce stanice su prelivene te je tripsin odmah uklonjen. Ovaj korak ponovljen je još jednom, pri tome je na kraju ostavljeno otprilike pola mililitra tripsina te su stanice inkubirane 5 minuta na 37°C. Tripsin omogućuje odvajanje stanica od podloge jer cijepa peptidne lance iza aminokiselina s pozitivno nabijenim bočnim ogrankom. Za stanične linije koje se teže odvajaju od podloge korišten je tripsin s 1% EDTA. EDTA djeluje kao kelator, vezujući metalne ione, kao što su kalcijevi ioni koji su potrebni kadherinima za povezivanje stanica, pa tako omogućuje lakše odvajanje stanica. Tripsin je inaktiviran dodatkom 10 ml medija stanicama, na način da se stanice isperu sa stjenke boce. Stanice su resuspendirane u mediju kako bi se razbile stanične nakupine te je u boci ostavljeno oko pola mililitra stanične suspenzije, a ostatak prebačen u sterilnu epruvetu za eksperiment ili bačen u staklenku s Asepsolom (Pliva), ukoliko se radi o

presađivanju stanične kulture. U bocu je dodano 15 ml odgovarajućeg medija, gustoća stanica provjerena pod mikroskopom te je boca stavljena u inkubator.

2.2.3. Brojanje stanica

Budući da se u eksperimentima koristi određeni broj stanica kako bi rezultati bili kvalitetni i reproducibilni, stanice je prije eksperimenta potrebno prebrojati kako bi se znao broj stanica s kojima se raspolaže, odnosno kako bi se mogao od ukupnog broja stanica preračunati i uzeti broj stanica koji je potreban u eksperimentu. Za brojanje stanica koristi se otopina tripanskog modrila, koje boji mrtve stanice u plavo zbog oštećenja njihove membrane, dok žive stanice ostaju nebojene. Nakon što su stanice odvojene od podloge prema gore opisanom postupku, stanice su dobro resuspendirane te je za brojanje stanica uzeto 20 μ l stanične suspenzije i pomiješano sa 80 μ l otopine tripanskog modrila u jažici mikrotitarske pločice te mikropipetom prebačeno pod pokrovno stakalce Burker-Turk komorice za brojanje. Pod svjetlosnim mikroskopom u četiri kvadratića komorice prebrojane su žive stanice koje padaju na L stranice kvadratića, te je njihov broj preračunat u broj stanica u mililitru, uzevši u obzir volumen komorice i razrjeđenje stanične suspenzije tripanskim modrilom prema sljedećoj formuli:

$$\text{br.st./ml} = (N/4) \cdot 5 \cdot 10^4$$

pri čemu je N broj stanica u 4 kvadratića komorice, broj 5 predstavlja razrjeđenje (20 μ l stanične suspenzije u 80 μ l tripanskog modrila), a 10^4 volumen komorice.

2.3. Priprava rekombinantnog adenovirusnog vektora

2.3.1. Konstrukcija replikacijski defektnog adenovirusnog vektora

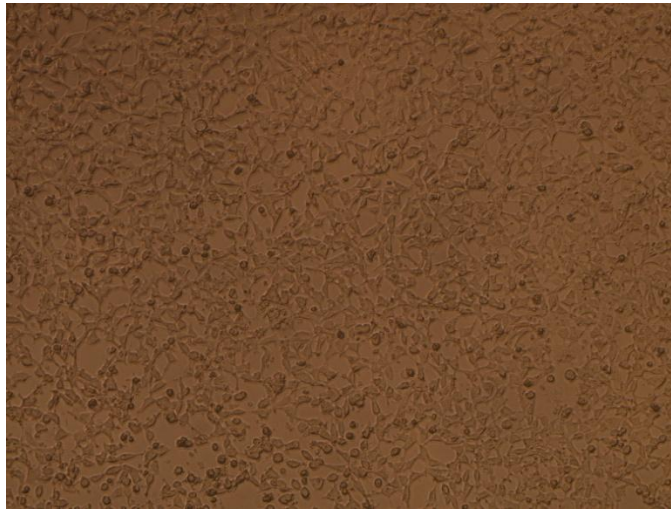
Konstrukt adenovirus-apoptin (Ad-Ap) te adenovirus-lac Z (Ad-lac Z) dobiveni su iz laboratorija prof. Teodora, sa sveučilišta McGill, zahvaljujući njegovoj ljubaznosti (Teodoro i sur, 2004). Konstrukt Ad-Ap, koji sadrži gen za apoptin i Flag epitop na 5' kraju, napravljen je korištenjem sustava AdEasy XL Adenoviral Vector System (Stratagene) prema uputama proizvođača. Konstrukt Ad-lac Z sadrži gen za za enzim β -galaktozidazu, a napravljen je kako su opisali Bacchetti i Graham (1993).

2.3.2. Zaražavanje stanica i umnažanje adnovirusnog vektora

HEK 293 stanice uzgojene su u plastičnim bocama u mediju DMEM s visokom koncentracijom glukoze te presađivane u nove plastične boce te je u konačnici bilo minimalno 14 boca sa stanicama. Stanice su rasle dok potpunost staničnog sloja nije bila 80-90%. Nepročišćeni virusni lizat, pohranjen na -80°C , odmrznut je i sakupljen iz četiri ampulice te mu je volumen bio ukupno 8 ml. U svaku od dvije sterilne plastične epruvete stavljeno je po 31 ml DMEM medija s visokom koncentracijom glukoze i dodano po 4 ml nepročišćenog virusnog lizata i promiješano (ukupan volumen je 70 ml za svih 14 boca). Plastičnim bocama sa stanicama staklenom pipetom uklonjen je medij te je u svaku pažljivo dodano 5 ml nepročišćenog virusnog lizata pomiješanog s medijem, pazeći da prekrije dno te da se stanice ne odlijepe od podloge. Stanice su inkubirane pri 37°C 1,5 h te im je nakon toga dodano po 10 ml DMEM medija s visokom koncentracijom glukoze. Stanice su rasle 2 dana u inkubatoru na 37°C .

Nakon dva dana pod svjetlosnim mikroskopom uočeno je da su stanice poprimile morfološke promjene koje ukazuju na citopatski učinak virusa, tj. stanice su povećane, imaju okrugli oblik i odvajaju se od podloge (slika 10). Laganim lupkanjem boce stanice su odvojene od podloge te su iz jedne boce stanice prebačene staklenom pipetom u dvije ampulice i označene, što predstavlja nepročišćeni virusni lizat za buduća umnažanja. Iz ostalih boca stanice su staklenom pipetom prebačene u sterilnu plastičnu epruvetu. Stanice u epruveti centrifugirane su 7 minuta na 2000 rpm, supernatant je odliven te su na talog stanica u istu plastičnu epruvetu dodane stanice iz ostalih boca. Kad je dodan sadržaj svih boca, stanice su centrifugirane 7 minuta na 2000 rpm, supernatant im je odliven te su stjenke epruvete isprane sa 10 ml sterilnog PBS-a u jednom i 10 ml u drugom smjeru. Stanice su

ponovno centrifugirane 7 minuta na 2000 rpm, supernatant im je odliven na način da ga ostane otprilike 10 ml iznad staničnog taloga. Plastična epruveta je označena i spremljena na -80°C do izolacije i pročišćavanja.



Slika 10: Morfologija stanica HEK293 nakon zaražavanja adenovirusom, pri povećanju 100x.

Izolacija virusa iz stanica provedena je odmrzavanjem epruvete sa staničnim lizatom u vodenoj kupelji, miješanjem na vorteksu te ponovnim zamrzavanjem na -80°C tijekom 15 minuta. Postupak je ponovljen pet puta kako bi se iz stanica oslobodio virus, centrifugiran je 7 minuta na 5000 rpm, a supernatant je staklenom pipetom prebačen u novu epruvetu. Postupak je ponovljen još jednom kako bi se sav supernatant prebacio u novu epruvetu te je tako dobiven lizat CVL (engl. *crude virus lysat*) i pohranjen na -80°C.

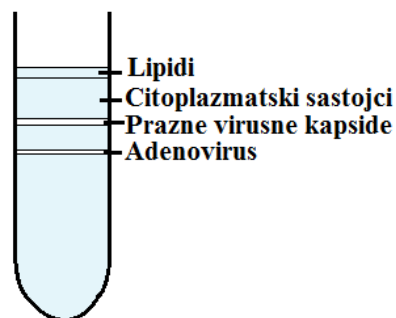
2.3.3. Pročišćavanje adenovirusnog vektora

Pročišćavanje adenovirusnog vektora provedeno je u dva koraka. U prvom koraku korišteno je ultracentrifugiranje u gradijentu gustoće cezijeveg klorida, kako bi se uklonili ostaci stanica i prazne virusne kapside, dok je u drugom koraku pomoću dijalize adenovirusni vektor pročišćen od ostataka cezijeveg klorida.

2.3.3.1. Ultracentrifugiranje u gradijentu gustoće cezijeveg klorida

Za pročišćavanje virusa pripremljene su tri otopine CsCl-a u TD puferu, gustoća 1,26 g/ml, 1,35 g/ml i 1,40 g/ml. Pročišćavanje virusa provedeno je u dva koraka. Svi navedeni postupci rađeni su u laminaru. U prvom koraku, kivete (Beckman) isprane su 96%-tnim etanolom i posušene. U svaku od njih je stavljeno 3 ml CsCl gustoće 1,40 g/ml i oprezno

nadsloženo s 3 ml CsCl gustoće 1,26 g/ml laganim ispuštanjem tekućine pipetom niz stjenke kivete. Na to je dodano 5 ml virusa. Postupak je ponovljen u drugoj kiveti. Kivete su tarirane u maloj čaši s vatom na dnu na vagi dodavanjem sterilnog PBS-a dok im se masa nije izjednačila na dvije decimale te su stavljene u stalke za ultracentrifugu koji su pričvršćeni na nosač tako na budu jedan nasuprot drugome. Uzorci su centrifugirani 1,40 sati pri 35000 okreta/min. Po završetku su izvađeni iz nosača i stalaka i preneseni u laminar gdje su pričvršćeni na nosač na metalnom stalku. Čestice virusa su se nalazile u prstenu između dviju otopina CsCl različitih gustoća (slike 11 i 12). Virus je iz otopine CsCl izdvojen ubadanjem sterilne igle (21G) kroz staklo kivete malo iznad linije virusa, uvučen je naginganjem igle te prebačen u čistu epruvetu. U drugom koraku u čistu kivetu stavljeno je 8 ml CsCl gustoće 1,35 g/ml i na to je dodan virus pročišćen u prvom koraku. Postupak je ponovljen za drugu kivetu te su istarirane na vagi do preciznosti na dvije decimale dodavanjem CsCl-a. Uzorci su pričvršćeni u stalak i nosač te stavljeni na ultracentrifugiranje 20 sati pri 35 000 okreta/min. Centrifugiranjem nastaje gradijent CsCl-a, a virus se zaustavlja na mjestu u kojem je gustoća CsCl-a jednaka gustoći virusnih čestica. Virus iz CsCl-a izvađen je iglom prema gore opisanom postupku i prebačen u čistu epruvetu.



Slika 11: Shema kivete nakon prvog koraka pročišćavanja.



Slika 12: Kiveta nakon prvog koraka pročišćavanja.

2.3.3.2. Dijaliza

Virus je pročišćen od CsCl-a dijalizom u puferu za dijalizu, koji je pripremljen kako je navedeno. Membrana za dijalizu (Aldrich, Sigma) namočena je u čaši s prokuhanom destiliranom vodom te zatim isprana destiliranom vodom da bi se sterilizirala i rehidrirala, u laminaru. Na jednoj strani membrane napravljen je čvor i iznad čvora pričvršćena plastična klema za membranu. U membranu je pipetom stavljen virus, iznad virusa je membrana zatvorena klemom te je iznad nje napravljen čvor. Membrana je stavljena u veliku plastičnu čašu u kojoj je 4000 ml pufera za dijalizu, čaša je pokrivena aluminijskom folijom te ostavljena na magnetskoj miješalici pri 4°C preko noći. Sljedeći dan maknute su kleme te je virus pipetom prebačen u ampulice, označen i pohranjen na -80°C.

2.3.4. Određivanje koncentracije infektivnih adenovirusnih čestica

Koncentracija infektivnih adenovirusnih čestica određena je mjerenjem sposobnosti stvaranja plakova i mjerenjem ekspresije gena dojavljivača.

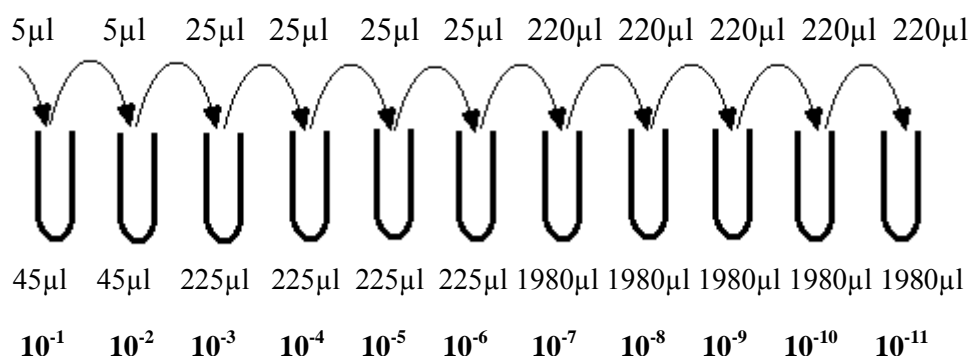
2.3.4.1. Mjerenje sposobnosti stvaranja plakova

Koncentracija infektivnih virusnih čestica u suspenziji virusa može se odrediti sposobnošću stvaranja plakova. Plak je područje u sloju kulture stanica u kojem se primjećuje citopatogeni učinak, odnosno pojava zaokruženih ili razorenih stanica kao posljedica umnažanja virusa. Mjera infektivnosti suspenzije virusa definira se kao količina virusa koja će stanicama dati plak, PFU (engl. *plaque forming unit*) (Ambriović Ristov, 2007).

Za određivanje PFU koriste se stanice HEK 293 jer komplementiraju nedostatak E1 područja u replikacijski deficijentnom adenovirusu. Stanice su odvojene od podloge i prebrojane prema gore navedenom načinu te je izračunato koliko stanične suspenzije treba uzeti da bi se stanice nasadile u dvije pločice sa 6 jažica, pri čemu u svaku jažicu ide 2 mililitra stanične suspenzije, tako da bude $1 \cdot 10^6$ stanica po jažici. Staklenom pipetom dobro je promiješana stanična suspenzija te je u svaku jažicu stavljeno po 2 ml. Stanice su promiješane pomicanjem pločica kružnim pokretima te stavljene da rastu u inkubatoru na 37°C.

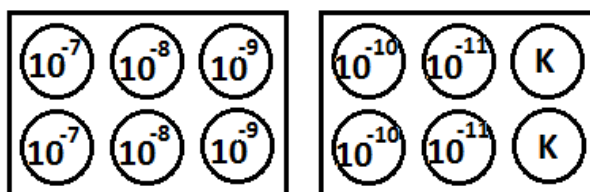
Kad su stanice postigle konfluentnost 80-90% tretirane su virusom. Napravljena su dekadaska razrjeđenja pročišćene virusne suspenzije u rasponu od 10^{-7} do 10^{-11} u DMEM s 2% seruma (medij za zaražavanje). Svako razrjeđenje virusa stavljeno je u dvije jažice da se

dobiju duplikati. Budući da je potreban 1 ml virusa po jažici, napravljena su 2 ml svakog virusnog razrjeđenja koji su stavljeni na pločice, dok su razrjeđenja koja su prethodila njima (dakle od 10^{-1} do 10^{-6}) napravljena u manjem volumenu kako bi se izbjegla prevelika potrošnja virusne suspenzije (slika 13). Prilikom pripreme razrjeđenja korišteni su čisti sterilni tipsevi za svako razrjeđenje te su razrjeđenja dodavana iz zraka kako bi se izbjeglo prenošenje virusnih čestica s vanjske strane nastavka za mikropipetu.



Slika 13: Shematski prikaz pripreme dekadskih virusnih razrjeđenja, gornji broj predstavlja volumen virusne suspenzije, a donji volumen medija za zaražavanje.

Sa stanica je pomoću vakuum sisaljke uklonjen medij i dodan 1 ml virusnog razrjeđenja u odgovarajuću jažicu prema shemi na slici 14, dok je u kontrolu dodano 1 ml medija za zaražavanje. Stanice su stavljene u inkubator na 37°C 1 h.



Slika 14: Shema za stavljanje duplikata virusnih razrjeđenja za HEK 293 stanice.

Nakon 1 sat staklenom pipetom uklonjena je otopina virusa, a su stanicama dodana 2 ml hranjive podloge agaroze i MEM medija u omjeru 1:1. Pločice su kratko ostavljene u laminaru da se podloga stvrdne. Stanice su stavljene u inkubator na 37°C te svakih 2-3 dana prelivene hranjivom podlogom kao prvi put. Plakovi virusa su kroz tri do četiri dana postali vidljivi pod mikroskopom. Pod svjetlosnim mikroskopom prebrojavaju se plakovi, pa se u trenutku kad su plakovi postali vidljivi golim okom, a broj plakova po jažici se ustabilio, izračuna PFU/ml kao broj izbrojenih plakova pomnožen sa razrjeđenjem virusa.

$$\text{PFU/ml} = \text{broj izbrojenih plakova} \cdot \text{razrjeđenje virusa}$$

2.3.4.2. Mjerenje ekspresije gena dojavljivača

Koncentracija infektivnih virusnih čestica u suspenziji može se mjeriti i sposobnošću ekspresije gena dojavljivača za enzim β -galaktozidazu, koji je ugrađen u adenovirusni vektor. Gen za β -galaktozidazu (gen *lac Z*) iz *E. coli* često se koristi kao gen dojavljivač pri infekciji rekombinantnim virusnim vektorom te omogućuje određivanje učinkovitosti infekcije virusnim vektorima. Beta galaktozidaznu aktivnost u stanici može se detektirati specifičnim bojanjem, te se pod svjetlosnim mikroskopom mogu izbrojati plave stanice. Relativni broj plavih stanica mjera je infektivnosti i izražava se kao BFU (engl. *blue forming unit*).

Stanice HEK 293 nasadene su u dvije pločice sa 6 jažica kao i za PFU prema gore opisanom postupku i tretirane adenovirusom koji nosi gen *lac Z* prema istom protokolu i shemi koji su gore opisani. Nakon 1 sat virus je uklonjen, stanicama je dodano 2 ml medija te su stavljene u inkubator na 37°C. Sljedeći dan stanicama je pomoću vakuum sisaljke uklonjen medij. Isprane su dva puta sa po 1 ml PBS-a po jažici, pazeći da se ne odvoje od podloge. Fiksirane su tijekom 5 minuta dodatkom 600 μ l 0,5% otopine glutaraldehida te ponovo isprane dva puta sa po 1 ml PBS-a. Na fiksirane stanice dodano je 600 μ l svježe pripremljene otopine X-gal i stanice su nježno resuspendirane. Pločice su umotane aluminijskom folijom i ostavljene u inkubatoru na 37°C preko noći. BFU se izražava kao broj plavih stanica pomnožen sa razrjeđenjem virusa.

$$\text{BFU/ml} = \text{broj izbrojenih plavih stanica} \cdot \text{razrjeđenje virusa}$$

2.4. Određivanje djelotvornosti transdukcije

Djelotvornost transdukcije, odnosno ulaska adenovirusnog vektora u stanicu i ekspresije ugrađenih proteina određena je korištenjem metode određivanja β -galaktozidaznu aktivnost te metodom imunofluorescencije.

2.4.1. Određivanje β -galaktozidazne aktivnosti

Stanične linije HCT 116, H1299, HMLE-shEcad i HMLE-shGFP odvojene su od podloge i izbrojane prema gore navedenom protokolu. HCT 116 nasadene su u mikrotitarske pločice s 96 jažica u gustoći od 5000 stanica po jažici, a HMLE stanice nasadene su u gustoći 3500 stanica po jažici.

Sljedeći dan stanice su zaražene adenovirusnim vektorom s genom *lac Z* tako da su na stanice stavljena razrjeđenja od 10 do 160 MOI (engl. *multiplicity of infection*). Multiplicitet infekcije je mjera jačine infekcije i računa se kao broj infektivnih virusnih čestica po stanici. Može biti izražen brojem čestica virusa po stanici (engl. *physical particles/cell*, PP/cell) ili brojem infektivnih virusnih čestica po stanici, mjereno u stanicama koje podržavaju replikaciju virusa (engl. *plaque forming units/cell*, PFU/cell) ili brojem infektivnih čestica virusa koji eksprimira gen dojavljivač za enzim β -galaktozidazu i boji stanice u plavo, mjereno na stanicama koji podržavaju replikaciju virusa (engl. *blue forming units/cell*, BFU/cell). Potreban volumen virusa izračunat je tako što je izabran najveći MOI za pokus, uz korištenje podatka o titru virusa i broju nasadenih stanica na sljedeći način (za nasadenih 5000 stanica po jažici):

$$\text{PFU (Ad-lac Z)} = 1,3 \cdot 10^{10} / \text{ml}$$

$$\text{MOI} = 160$$

$$\text{Br.stanica} = 5000 \text{ st.po jažici} \cdot 8 \text{ jažica}$$

$$V = 50 \mu\text{l} \cdot 8 \text{ jažica} = 400 \mu\text{l}$$

$$\text{MOI} = \text{PFU/broj stanica} \rightarrow \text{PFU} = \text{MOI} \cdot \text{broj stanica}$$

$$\text{PFU} = 160 \cdot 8 \cdot 5000 = 6,4 \cdot 10^6 \text{ u } 400 \mu\text{l}$$

$$\text{u dvostrukom volumenu PFU} = 1,28 \cdot 10^7 \text{ u } 800 \mu\text{l}$$

$$1,28 \cdot 10^7 / 1,3 \cdot 10^{10} / \text{ml} \cdot 1000 \mu\text{l} = 1 \mu\text{l}$$

što znači da je 1 μl virusa stavljen u 800 μl medija za zaražavanje te su od te suspenzije napravljena serijska dvostruka razrjeđenja virusa na način da je po 400 μl prvog razrjeđenja prebačeno u epruvetu u kojoj je bilo 400 μl medija za zaražavanje. Postupak je ponovljen dok se nisu dobila sva razrjeđenja, od 160 do 10 MOI. Pri tome su razrjeđenja dodavana sterilnom mikropipetom iz zraka, te promiješana korištenjem čistog nastavka za mikropipetu. Za HMLE stanice napravljena su razrjeđenja virusa u rasponu od 5 do 640 MOI na isti način kao što je opisano gore.

Stanicama je pomoću vakuum sisaljke uklonjen medij te je u svaku jažicu dodano po 50 μl određenog virusnog razrjeđenja, a u kontrolu je dodan samo medij. Stanice su stavljene u inkubator na 37°C na 1,5 sat. Nakon 1,5 sat stanicama je dodano 150 μl medija.

Sve stanične linije tretirane su prema gore opisanom protokolu za detekciju β -galaktozidazne aktivnosti te su prebrojane plave stanice i izračunat je postotak infekcije.

2.4.2. Imunofluorescencija

Za određivanje djelotvornosti transdukcije također je korištena i metoda imunofluorescencije, koja je detaljno opisana u poglavlju 2.6. Bojanje jezgara stanica plavom bojom DAPI dalo je broj ukupnih stanica. Detekciju stanica u kojima se eksprimira apoptin omogućilo je primarno antitijelo za epitop Flag, kojim je obilježen rekombinantni apoptin, te sekundarno konjugirano sa fluorescencijskom bojom alexa 594 koje daje crveno obojenje. Postotak transduciranih stanica izračunat je kao broj stanica koje su se obojile crveno na uzorku od ukupno 200 stanica, obojenih plavo.

2.5. Određivanje antiproliferativnog učinka apoptina

Za određivanje antiproliferativnog učinka apoptina korišten je MTT test. MTT test proliferacije stanica je kolorimetrijski test koji detektira aktivnost mitohondrijske dehidrogenaze u živim stanicama. Mjeri redukciju tetrazolium boje (MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol bromid)) u netopljivi formazan ljubičaste boje u mitohondrijima živih stanica. Redukcija MTT-a povećava se s metaboličkom aktivnosti stanice, stoga odražava broj živih stanica. Test se koristi za određivanje citotoksičnosti spojeva.

Stanične linije H1299, HCT116, HMLE-Ecad i HMLE-GFP odvojene su od podloge i prebrojane prema gore opisanom protokolu. Broj stanica preračunat je u broj stanica po mililitru. Izračunat je ukupni volumen za nasađivanje i volumen stanične suspenzije iz epruvete potreban da bi se dobila potrebna koncentracija stanica po jažici, pa se te dvije komponente pomiješaju u autoklaviranoj kadici. Stanice su pomoću višekanalne pipete nasađene u mikrotitarske pločice s 96 jažica, u volumenu od 150 μ l po jažici, tako da je bilo 1500 stanica po jažici, pri tome ostavljajući predzadnji stupac u mikrotitarskoj pločici prazan za slijepu probu, tj. samo MTT reagens. Od svake stanične linije nasađene su minimalno 3 pločice kako bi se rezultati mogli očitavati nakon tri, četiri i pet dana te je na jednu pločicu nasađen po jedan stupac svake stanične linije, za mjerenje preživljenja netretiranih stanica na početku pokusa, tzv. nulti dan.

Sljedeći dan izračunata je količina virusa koju je potrebno dodati kako bi se stanice inficirale virusom u rasponu od 20 MOI do 320 MOI. Potreban volumen virusa izračunat je uz korištenje podatka o titru virusa i broju nasađenih stanica na način kao što je prethodno opisano. Napravljena su serijska dvostruka razrjeđenja virusa, dodavana sterilnom mikropipetom iz zraka, te promješana korištenjem čistog nastavka za mikropipetu. Stanicama je pomoću vakuum sisaljke uklonjen medij te je u svaku jažicu dodano po 50 μ l određenog virusnog razrjeđenja, a u kontrolu je dodan samo medij. Stanice su stavljene u inkubator na 37°C na 1,5 sat. Nakon 1,5 sat stanicama je dodano 150 μ l medija.

Sljedeći dan očitana je nulti dan MTT-testa. Sa stanica je uklonjen medij naglim okretanjem pločica nad sudoperom te su pločice posušene na papirnatom ručniku. U laminaru u tami je pomoću višekanalne pipete na stanice i u slijepu probu dodano 40 μ l MTT reagensa po jažici, budući da je reagens osjetljiv na svjetlo. Pločice su omotane aluminijskom folijom i ostavljene 4 sata u inkubatoru pri 37°C. Nakon 4 sata na pločice je multipipetom dodano 160

μl dimetil-sulfoksida (DMSO), organskog otapala koji je netopljivi formazan učinio topljivim, promiješane su nastavcima višekanalne pipete te stavljene na tresilicu 5 minuta. Zatim su ponovo promiješane nastavcima višekanalne pipete, pazeći da ne nastanu mjehurići te im je apsorbancija mjerena pri valnoj duljini od 570 nm na čitaču mikrotitarskih pločica (Multiskan EX, Thermo Scientific, SAD). Na isti način izmjerena je apsorbancija nakon tri, četiri i pet dana. Apsorbancija je direktno proporcionalna vijabilnosti stanica.

Nakon očitavanja vrijednosti apsorbancije na spektrofotometru, postotak rasta (engl. *percentage of growth*, PG) izračunat je prema sljedećoj formuli:

$$PG = 100 \cdot (OD_{\text{test}} - OD_{\text{tzero}}) / (OD_{\text{ctrl}} - OD_{\text{tzero}}),$$

pri čemu je:

OD_{tzero} - srednja vrijednost optičke gustoće stanica prije izlaganja apoptinu, tzv. nulti dan

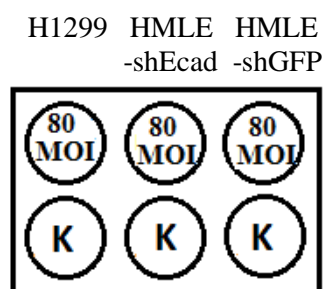
OD_{test} - prosjek mjerenja optičke gustoće nakon željenog perioda vremena

OD_{ctrl} - prosjek mjerenja optičke gustoće nakon željenog perioda vremena bez izlaganja stanica apoptinu, tzv. kontrola.

2.6. Imunofluorescencija

Metoda imunofluorescencije korištena je za ispitivanje lokalizacije apoptina i morfoloških promjena u stanicama. Budući da adenovirusni konstrukt na 5' kraju ima epitop Flag korištenje primarnog antitijela na Flag epitop, te sekundarnog koje ima vezanu fluorescentnu boju alexa 594 omogućuje praćenje lokalizacije apoptina metodom imunofluorescencije. Za imunofluorescenciju su nasađene stanice u pločice sa 6 jažica, u koje je na dno svake jažice stavljeno sterilno pokrovno stakalce. Korištene su stanične linije H1299 i HMLE-shEcad i HMLE-shGFP.

Stanice H1299, HMLE-shEcad i HMLE-GFP odvojene su od podloge i prebrojane prema gore navedenom protokolu, te im je broj preračunat u broj stanica po mililitru. Stanice su nasađene u pločicu sa 6 jažica u gustoći $0,5 \cdot 10^5$ / ml tako da je u svaku jažicu stavljen volumen 2 ml (slika 15) te su stavljene u inkubator na 37°C.



Slika 15: Shema stanica nasađenih za imunofluorescenciju i njihovih kontrola.

Sljedeći dan stanice su tretirane adenovirusnim konstruktom Ad-Ap 80 MOI. Stanicama je pomoću vakuum sisaljke blizu ruba jažice uklonjen medij, pazeći da se stakalce sa stanicama ne odlijepi. U svaku jažicu dodan je po 1 ml virusnog razrjeđenja, a u kontrolu je dodan samo medij. Stanice su stavljene u inkubator na 37°C na 1,5 sat. Nakon 1,5 sat stanicama je dodan 1 ml odgovarajućeg medija.

Nakon 48 sati stanicama je uklonjen medij pomoću vakuum sisaljke. Isprane su sa 2 ml PBS-a po jažici. Fiksirane su dodatkom 1 ml 4% paraformaldehida (Polysciences) i ostavljene na sobnoj temperaturi 15 minuta. Zatim su isprane dva puta sa po 2 ml PBS-a. Stanicama je dodano 500 µl 0,1% otopine Triton X u PBS-u te ostavljeno 5-10 minuta za permeabilizaciju membrane. Potom su stanice isprane dva puta sa po 2 ml PBS-a po jažici te blokirane dodatkom 1 ml 2% BSA u PBS-u i ostavljene 30 minuta. Pripremljene su veće petrijeve zdjelice u koje je stavljen filter papir i navlažen PBS-om te je na njega stavljen parafilm. Na parafilm je stavljena kapljica od 80 µl primarnog antitijela (mišji anti-Flag,

Invitrogen, 1:500), na dva mjesta u svaku petrijevku gdje će doći pokrovna stakalca sa stanicama. Iz jažica su pomoću pincete izvađena stakalca sa stanicama na gornjoj strani te su oprezno postavljena na kapljicu primarnog antitijela u petrijevoj zdjelici tako da stanice na stakalcu budu okrenute prema dolje. Petrijeve zdjelice su pokrivene, zamotane u foliju kako bi se održali vlažni uvjeti te ostavljene da se inkubiraju u mraku tijekom 2 sata. Zatim su stakalca pomoću pincete prenesena nazad u odgovarajuće jažice u pločici tako da stanice budu okrenute prema gore, te su ispirane sa po 2 ml PBS-a i stavljene da se ljujaju na treskalici. Ispiranje je ponovljeno 4 puta. U petrijevke je stavljen novi parafilm na koji su stavljene kapljice od 80 μ l sekundarnog antitijela (protu-mišje antitijelo pripremljeno u kozi, s fluorescentnom bojom alexa 594, Invitrogen, 1:400). Pomoću pincete stakalca sa stanicama su iz jažica premještena na kapljice u petrijevim zdjelicama pazeći da stanice budu okrenute prema dolje te su ponovno inkubirane u mraku tijekom 1 sata. Zatim su stakalca sa stanicama ponovo pomoću pincete vraćena u jažice tako da stanice budu okrenute prema gore, isprane u PBS-u 4 \times 5 minuta, te isprane destiliranom vodom i posušene. Na predmetno stakalce stavljeno je 50 μ l medija za uklapanje (Mounting medij, Dako) u kojeg je dodana boja DAPI (Sigma) tako da koncentracija bude 100 ng/ml u mediju (izvorna otopina 10 mg/ml). Na to je stavljeno pokrovno stakalce sa stanicama okrenutim prema dolje te su stanice mikroskopirane na epiflorescencijskom mikroskopu (Olympus BX51 sa Olympus DP51 kamerom). Za vizualizaciju i snimanje je korišten program AnalySIS.

3. REZULTATI

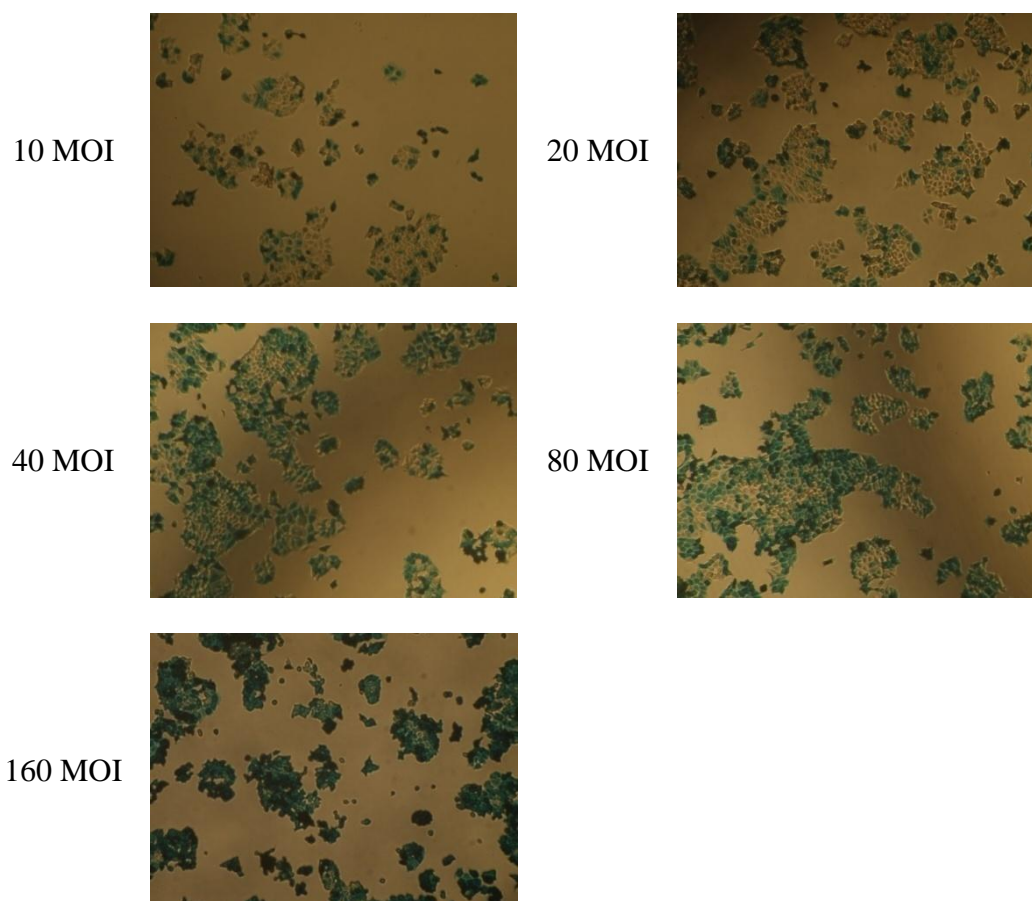
3.1. Određivanje koncentracije infektivnih adenovirusnih čestica

Koncentracija infektivnih čestica adenovirusnog vektora s genom za apoptin (Ad-Ap) i adenovirusnog vektora s genom *lac Z* (Ad-*lac Z*), izoliranih metodom centrifugiranja u gradijentu gustoće CsCl, određena je pomoću infekcije stanica HEK 293 te brojanjem plakova koji su nastali. Dobivene su vrijednosti preračunate uzimajući u obzir razrjeđenje virusa te je titar virusa izražen kao PFU po mililitru i iznosi $1,9 \cdot 10^{10}$ /ml za adenovirusni vektor s genom za apoptin, odnosno $1,3 \cdot 10^{10}$ /ml za adenovirusni vektor s genom *lac Z*. Koncentracija infektivnih čestica adenovirusnog vektora s genom *lac Z* određena je i mjerenjem ekspresije beta galaktozidaze specifičnim plavim bojanjem. Brojanjem plavih stanica te, uzimajući u obzir razrjeđenja virusa, izražena kao BFU po mililitru suspenzije i iznosi $0,8 \cdot 10^{10}$ /ml.

3.2. Određivanje djelotvornosti transdukcije

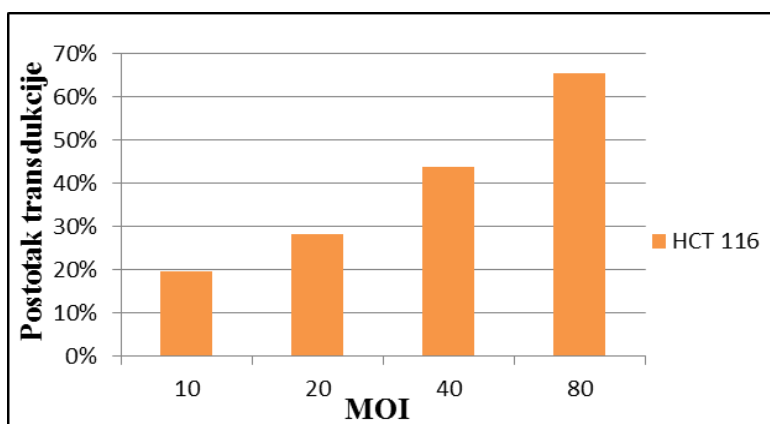
3.2.1. Određivanje β -galaktozidazne aktivnosti

Nakon određivanja virusnog titra, stanice HCT116 su inficirane adenovirusnim vektorom koji nosi gen *lac Z* (Ad-*lac Z*). Pod svjetlosnim mikroskopom je detektirana β -galaktozidazna aktivnost (slika 16).



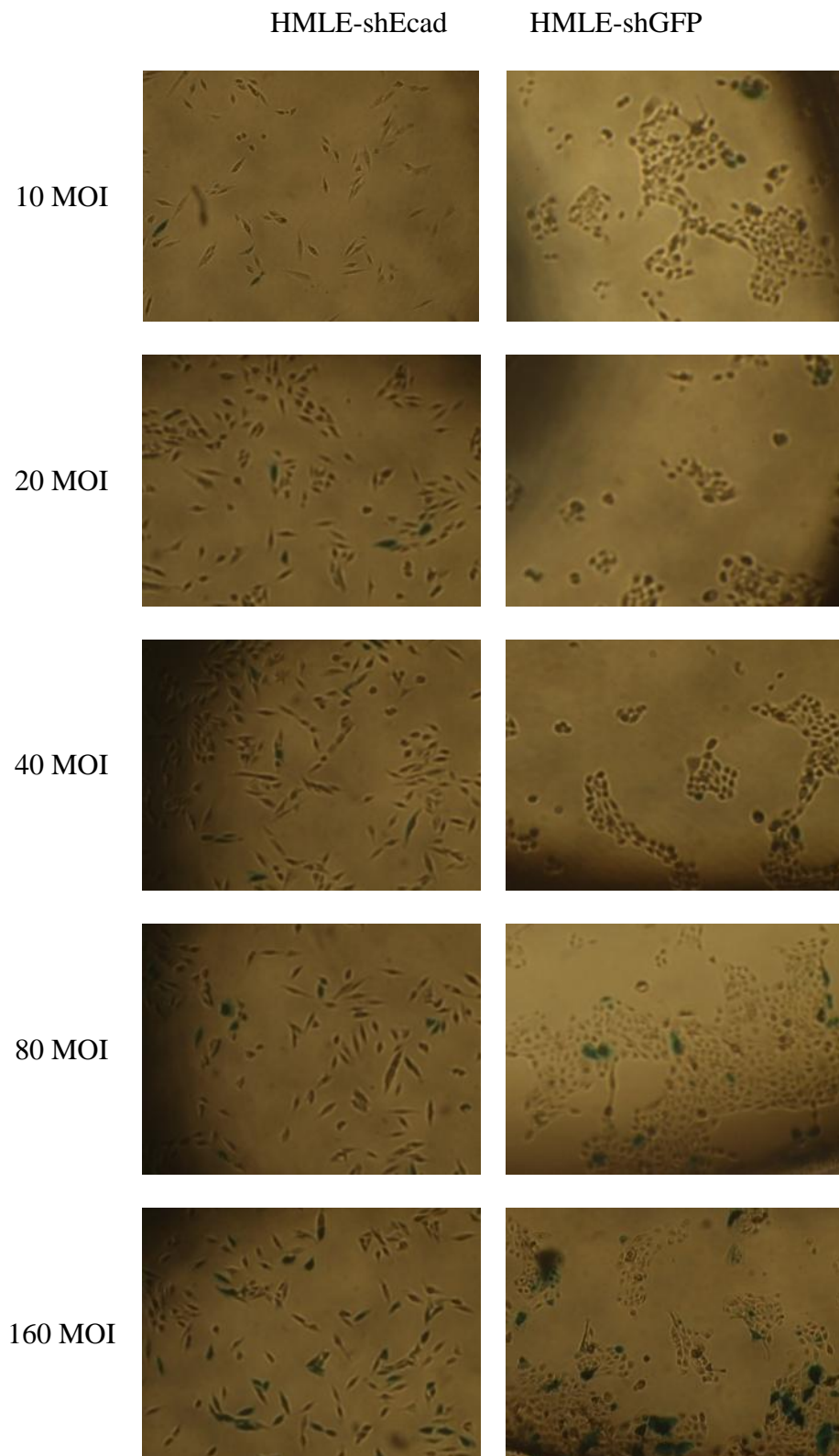
Slika 16: Stanice linije HCT116 transducirane adenovirusnim vektorom. Stanice su nasadene u pločice sa 96 jažica u gustoći od 5000 stanica po jažici i zaražene adenovirusnim vektorom koji nosi gen *lac Z* u razrjeđenjima od 10 do 160 MOI. MOI je multiplicitet infekcije, odnosno mjera jačine infekcije stanica i odražava broj infektivnih virusnih čestica po stanici. Stanice su bojene na β -galaktozidaznu aktivnost te je plavo obojenje odraz broja infektivnih čestica virusa koje eksprimiraju gen dojavljivač za enzim β -galaktozidazu. Slike su snimljene na svjetlosnom mikroskopu, pri povećanju 100x.

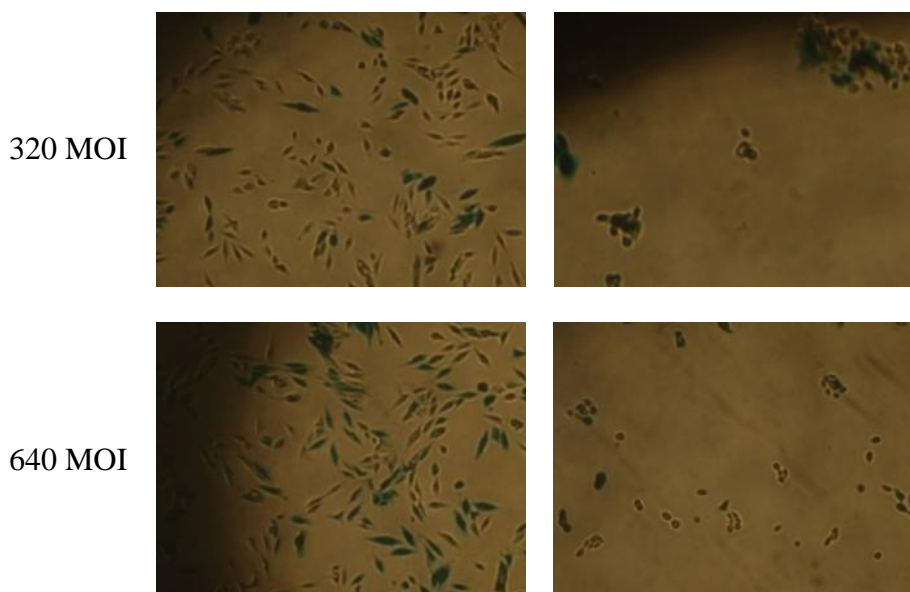
Na ukupno 200 stanica za svaki multiplicitet infekcije prebrojane su stanice u kojima se eksprimira gen za β -galaktozidazu pa se stoga boje plavo, a njihov broj izražen je kao postotak ukupnog broja stanica i prikazan u obliku histograma (slika 17). Iz rezultata prikazanih na slikama 16 i 17 vidljivo je da je s povećanjem multipliciteta infekcije veći broj stanica koje ekspimiraju gen za β -galaktozidazu. Osim toga, na slici 16 vidljivo je i da su s porastom multipliciteta infekcije stanice obojene jačim intenzitetom. U kontrolnim stanicama nije zamijećeno plavo obojenje. Rezultati ukazuju na mogućnost ulaska adenovirusnog vektora u stanice. Pri MOI većem od 80, sve stanice ekspimiraju gen za β -galaktozidazu te je postotak transdukcije 100%.



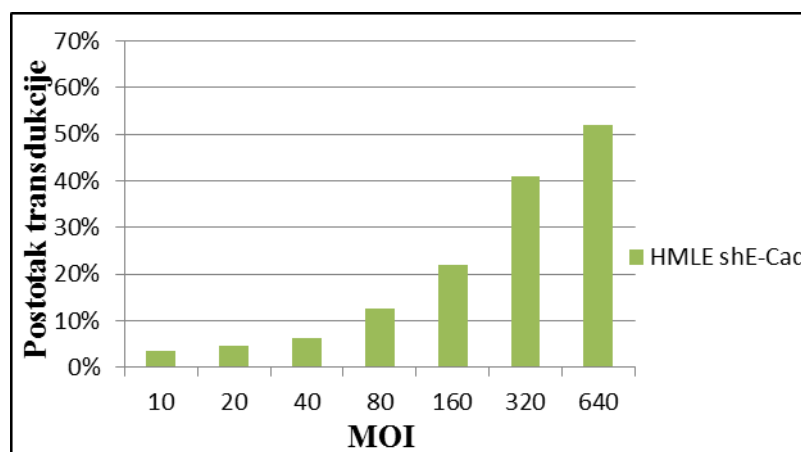
Slika 17: Stanice linije HCT116 transducirane adenovirusnim vektorom u ovisnosti o MOI. Stanice su nasadene u pločice sa 96 jažica u gustoći od 5000 stanica po jažici i zaražene adenovirusnim vektorom koji nosi gen *lac Z* u razrjeđenjima od 10 do 160 MOI. Nakon bojenja na β -galaktozidaznu aktivnost, prebrojane su plavo obojene stanice koje ekspimiraju gen dojavljivač za β -galaktozidazu na ukupnom broju od 200 stanica i izražene u obliku postotka. MOI je multiplicitet infekcije, tj. mjera jačine infekcije stanica i odražava broj infektivnih virusnih čestica po stanici.

Nakon određivanja β -galaktozidazne aktivnosti pod svjetlosnim mikroskopom prebrojane su plavo obojene stanice linije HMLE na isti način kao i za liniju HCT116 (slika 18). Rezultati su prikazani na histogramima na slikama 19 i 20. S povećanjem MOI povećava se i postotak plavo obojenih stanica. Iz podataka u tablici 4 i histogramskih prikaza transfekcije (slike 19 i 20), vidljivo je da je manji postotak plavo obojenih stanica s povećanjem MOI za liniju HMLE, u usporedbi s rezultatima za liniju HCT116. Na slici 18 vide se plavo obojene stanice, što potvrđuje mogućnost ulaska adenovirusnog konstrukta u ovu staničnu liniju. Kontrolne stanice, transducirane virusom Ad-*lac Z* nisu se bojile u plavo.

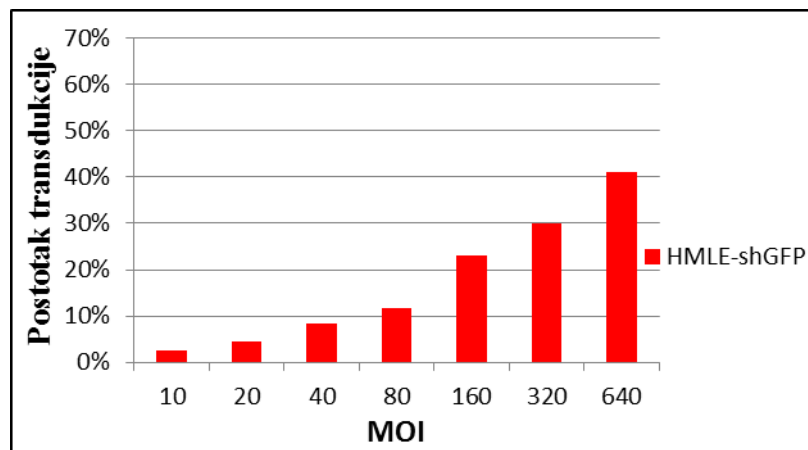




Slika 18: Stanice linije HMLE-shEcad (lijevo) i HMLE-shGFP (desno) koje su transducirane adenovirusnim vektorom. Stanice su nasadene u pločice sa 96 jažica u gustoći od 3500 stanica po jažici i zaražene adenovirusnim vektorom koji nosi gen *lac Z* u razrjeđenjima od 10 do 640 MOI. Stanice su bojene na β -galaktozidaznu aktivnost te je plavo obojenje odraz broja infektivnih čestica virusa koje eksprimiraju gen dojavljivač za enzim β -galaktozidazu. Slike su snimljene na svjetlosnom mikroskopu, pri povećanju 100x. MOI je multiplicitet infekcije, tj. mjera jačine infekcije stanica i odražava broj infektivnih virusnih čestica po stanici.



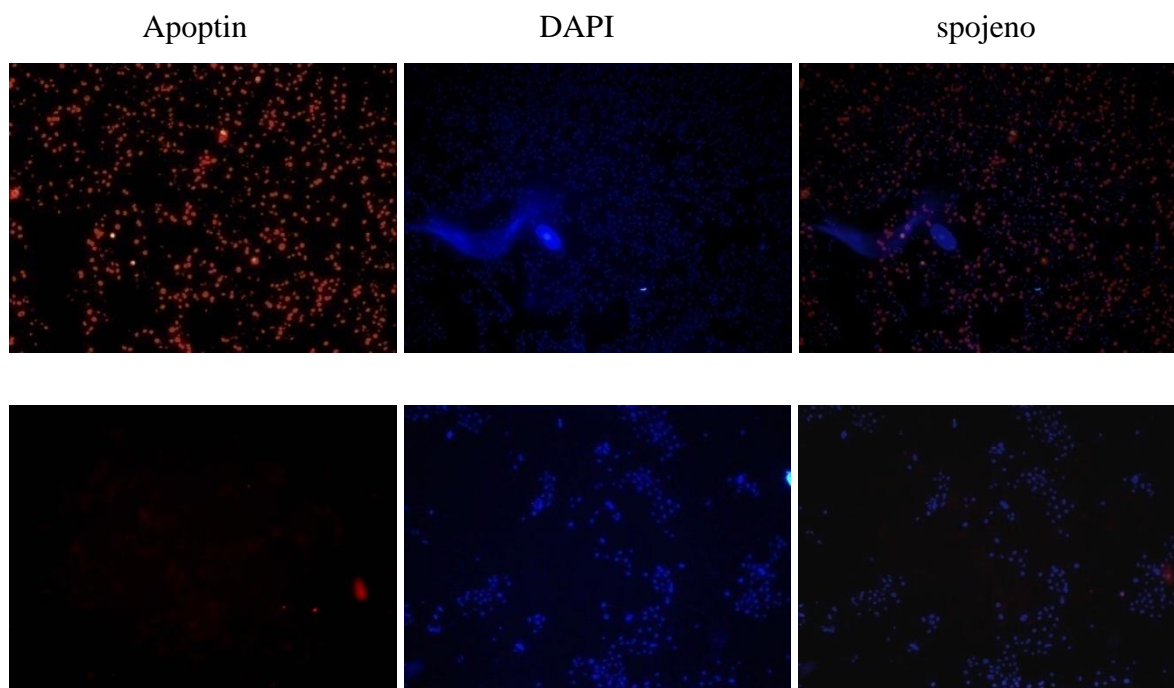
Slika 19: Stanice linije HMLE-shEcad transducirane adenovirusnim vektorom u ovisnosti o MOI. Stanice su nasadene u pločice sa 96 jažica u gustoći od 5000 stanica po jažici i zaražene adenovirusnim vektorom koji nosi gen *lac Z* u razrjeđenjima od 10 do 640 MOI. Nakon bojenja na β -galaktozidaznu aktivnost, prebrojane su plavo obojene stanice koje eksprimiraju gen dojavljivač za β -galaktoidazu na ukupnom broju od 200 stanica i izražene u obliku postotka. MOI je multiplicitet infekcije, tj. mjera jačine infekcije stanica.



Slika 20: Stanice linije HMLE-shGFP transducirane adenovirusnim vektorom u ovisnosti o MOI. Stanice su nasadene u pločice sa 96 jažica u gustoći od 5000 stanica po jažici i zaražene adenovirusnim vektorom koji nosi gen *lac Z* u razrjeđenjima od 10 do 640 MOI. Nakon bojenja na β -galaktozidaznu aktivnost, prebrojane su plavo obojene stanice koje eksprimiraju gen dojavljivač za β -galaktoidazu na ukupnom broju od 200 stanica i izražene u obliku postotka. MOI je multiplicitet infekcije, tj. mjera jačine infekcije stanica.

3.2.2. Imunoflorescencija

Djelotvornost transdukcije adenovirusnim vektorom s apoptinom kod stanične linije H1299 i kod stanica HMLE određena je metodom imunoflorescencije. Prilikom mikroskopiranja na epiflorescencijskom mikroskopu za vizualizaciju i snimanje je korišten računalni softver AnalySIS. Plava boja DAPI boji jezgre svih stanica pa daje ukupan broj stanica. Fluorescentna boja Alexa boji crveno stanice transducirane adenovirusnim vektorom s apoptinom. Pri 80 MOI, na ukupnom broju od 200 stanica prebrojane su stanice s apoptinom te je njihov broj izražen kao postotak u odnosu na sve stanice (slika 21). Rezultati su dani u tablici 2. Vidljiv je visok postotak transdukcije kod linije H1299, a mnogo niži postotak za stanične linije HMLE-shEcad i HMLE-shGFP. Kontrolne stanice transducirane virusom Ad-lac Z obojile su se plavo bojom DAPI, ali nisu crveno (slika 21). Vrlo rijetka pojava crvenog signala vidljiva kod kontrolnih stanica rezultat je nespecifičnog bojenja.



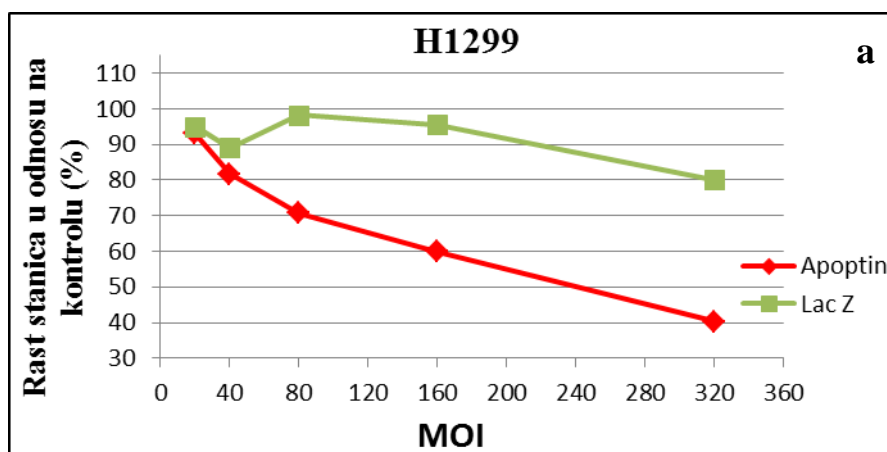
Slika 21: Stanice linije H1299 s apoptinom. Stanice su nasadene na pokrovna stakalca u pločici sa 6 jažica u gustoći $0,5 \cdot 10^5$ / ml i tretirane adenovirusnim vektorom koji nosi gen za apoptin pri MOI 80. Fiksirane su paraformaldehidom i vizualizirane pomoću sekundarnog antitijela koje ima na sebi vezanu fluorescencijsku boju. Obojene su bojom DAPI i snimljene na epifluorescencijskom mikroskopu, pri povećanju 100x. Prikazane su stanice u kojima se eksprimira apoptin (lijevo), ukupan broj stanica (sredina) te preklopljene slike (desno). U prvom redu su stanice s apoptinom, a u drugom netretirana kontrola. MOI je multiplicitet infekcije, tj. mjera jačine infekcije stanica i odražava broj infektivnih virusnih čestica po stanici.

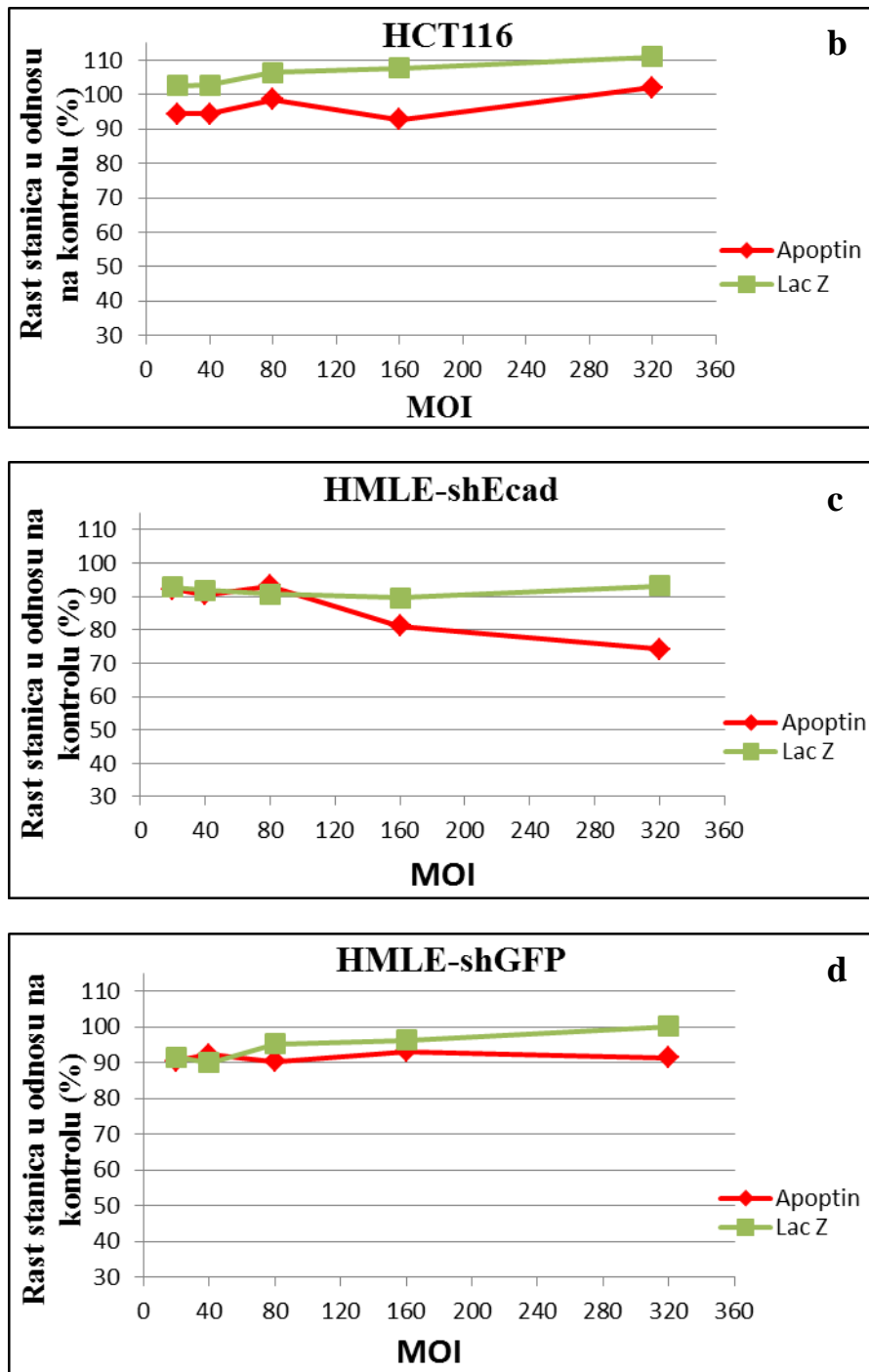
Tablica 2: Postotak stanica linija H1299, HMLE-shEcad i HMLE-shGFP transduciranih adenovirusnim vektorom s genom za apoptin, pri 80 MOI. MOI je multiplicitet infekcije, tj. mjera jačine infekcije stanica i odražava broj infektivnih virusnih čestica po stanici.

Stanična linija	Postotak stanica s apoptinom u odnosu na ukupni broj stanica tretiranih adenovirusnim vektorom
H1299	67,00%
HMLE E-cad	6,50%
HMLE GFP	7,50%

3.3. Određivanje antiproliferativnog učinka apoptina

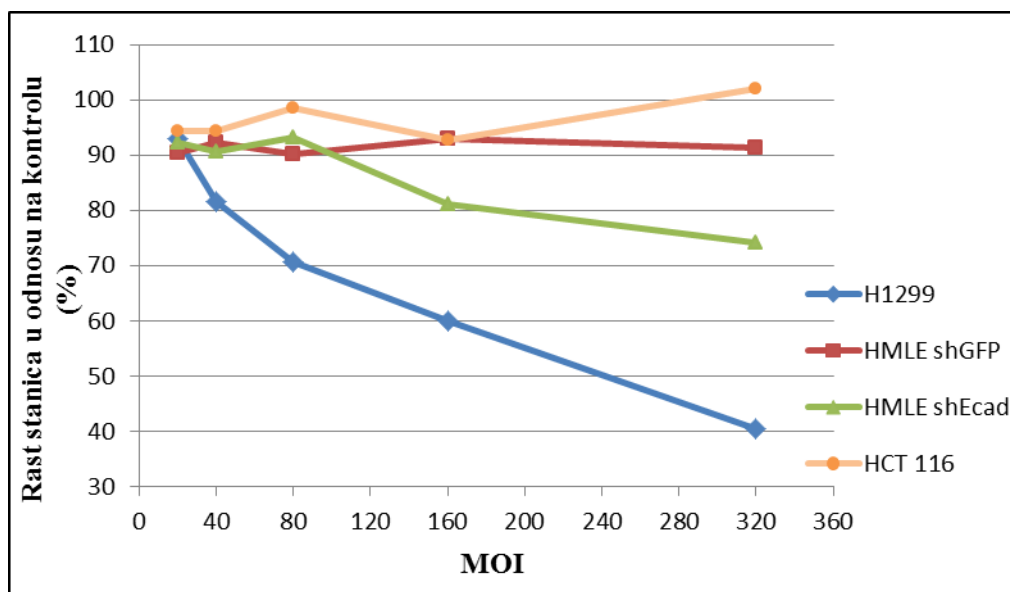
Ovisnost rasta stanica o multiplicitetu infekcije kod staničnih linija HMLE-shEcad tretiranih adenovirusnim vektorom s genom za apoptin, odnosno kontrolnim vektorom s genom *lac Z* određena je mjerenjem vijabilnosti stanica u odnosu na kontrolne stanice metodom MTT. Iz vrijednosti dobivenih metodom MTT iz najmanje dva pokusa uzete su srednje vrijednosti i napravljene krivulje ovisnosti postotka rasta stanica o multiplicitetu infekcije za stanične linije tretirane konstruktom Ad-Ap, odnosno tretirane konstruktom Ad-lac Z. Vijabilnost je određena nakon tretmana od pet dana. Rezultati su prikazani zasebno za svaku liniju, usporedno za obradu virusom s apoptinom i kontrolnim virusom (slika 22 a-d). Kod linije H1299 zamijećen je snažan antiproliferativni učinak apoptina. Tretman konstruktom Ad-lac Z nije djelovao antiproliferativno pri MOI manjem od 160, dok na većem MOI ima blagi antiproliferativni učinak (slika 22a). Apoptin ne pokazuje antiproliferativni učinak na liniju HCT116. Tretman vektorom Ad-lac Z također ne smanjuje proliferaciju stanica ove linije (slika 22b). Apoptin pokazuje umjereni antiproliferativni učinak na liniju HMLE-shEcad, no slabiji u usporedbi s linijom H1299 (slika 22c). Ad-lac Z ne smanjuje proliferaciju stanica ove linije. Usporedno s time, linija HMLE-shGFP ne pokazuje smanjenje rasta uslijed tretmana apoptinom, kao ni kontrolnim virusom (slika 22d).





Slika 22: Ovisnost rasta stanica o tretmanu apoptinom i kontrolnim vektorom. Stanice su nasađene na mikrotitarske pločice u gustoći od 1500 stanica po jažici. Transducirane su adenovirusnim vektorom s apoptinom i *lac Z* pri MOI od 20 do 320. Vijabilnost je određena MTT testom nakon 5 dana inkubacije te izražena u obliku postotka u odnosu na kontrolne stanice, peti dan nakon tretmana. MOI je multiplicitet infekcije, tj. mjera jačine infekcije stanica. Na slici a prikazana je stanična linija H1299 tretirana apoptinom i kontrolnim vektorom s genom *lac Z*, na slici b linija HCT116, na slici c linija HMLE-shEcad, na slici d linije HMLE-shGFP.

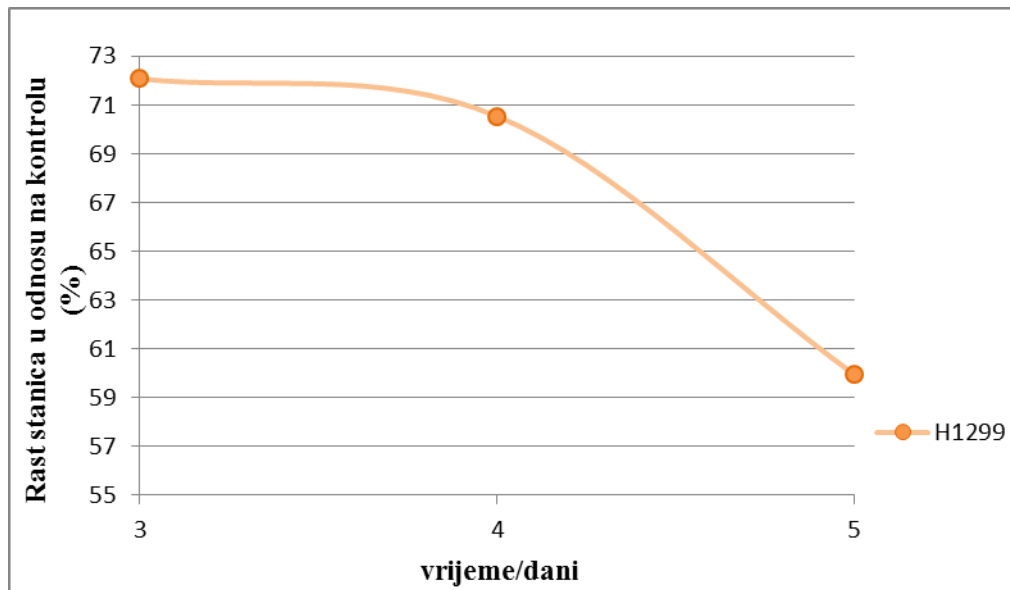
Ovisnost rasta stanica o multiplicitetu infekcije vektorom Ad-Ap prikazana je i za sve tretirane linije zajedno, kako bi se jasno mogao usporediti učinak (slika 23). Iz grafičkog prikaza jasno je vidljivo da tretman apoptinom ima najjači antiproliferativni učinak na liniju H1299. Linija HMLE-shEcad pokazuje umjereno smanjenje rasta stanica, dok kod linije HMLE-shGFP Ad-Ap ne pokazuje antiproliferativni učinak. Linija HCT116 pokazala se najmanje osjetljivom na apoptin te je postotak rasta stanica kod nje najveći.



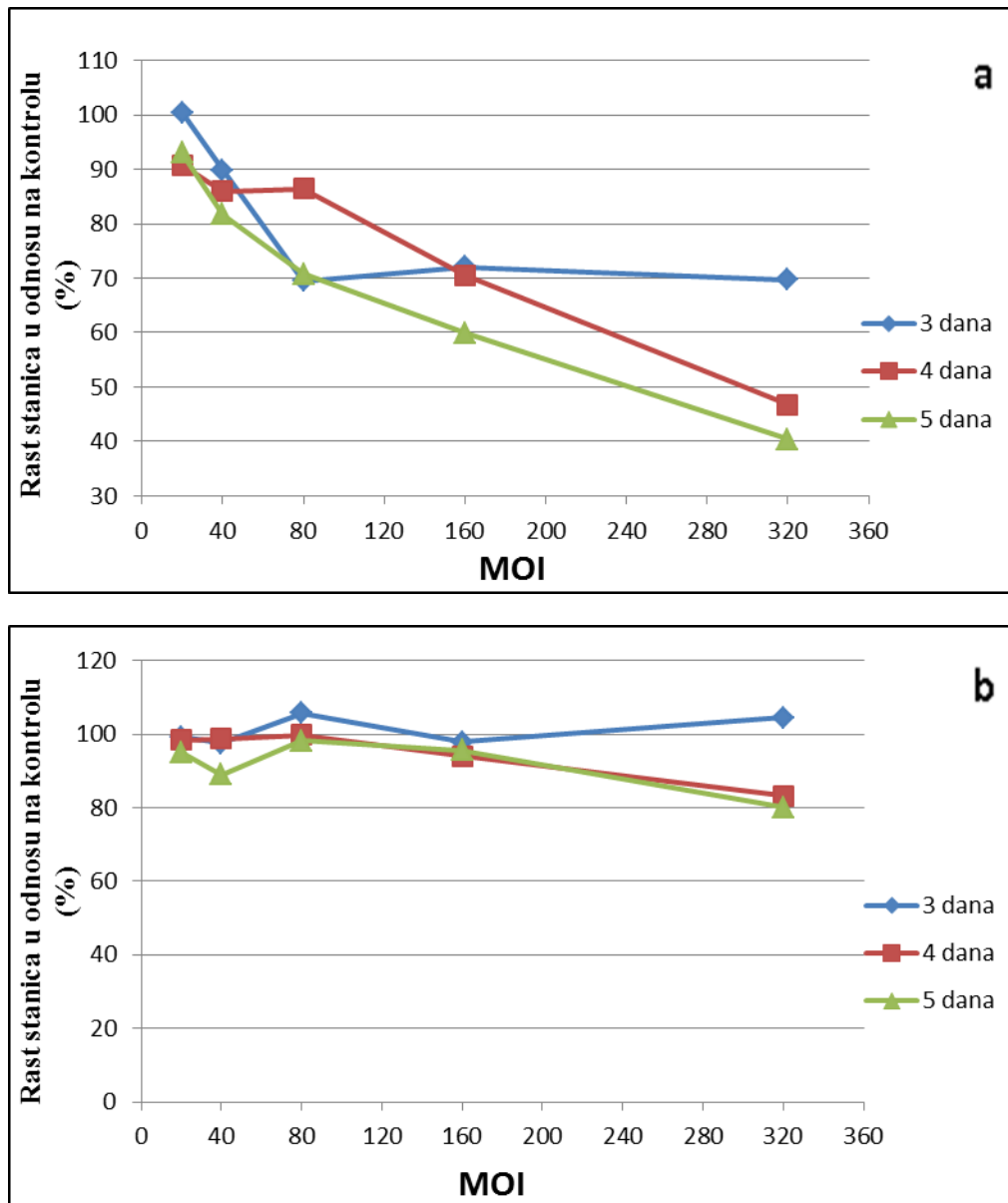
Slika 23: Ovisnost rasta stanica linija H1299, HCT 116, HMLE-shGFP i HMLE-shEcad o tretmanu apoptinom i kontrolnim vektorom. Stanice su nasađene na mikrotitarske pločice sa 96 jažica u gustoći od 1500 stanica po jažici. Transducirane su adenovirusnim vektorom s apoptinom i *lac Z* pri MOI od 20 do 320. Vijabilnost je određena MTT testom nakon 5 dana inkubacije te izražena u obliku postotka u odnosu na kontrolne stanice, peti dan nakon tretmana. MOI je multiplicitet infekcije, tj. mjera jačine infekcije stanica i odražava broj infektivnih virusnih čestica po stanici.

Budući da je u preliminarnim eksperimentima linija H1299 pokazala najizraženije smanjenje rasta uslijed tretmana Ad-Ap, određivana je vremenska ovisnost postotka rasta stanica za tu liniju, te je zasebno prikazana na slici 24. Pri tome su korišteni podaci dobiveni za 160 MOI, budući da je u tim uvjetima najveće smanjenje rasta stanica uslijed tretmana Ad-Ap, a istovremeno Ad-*lac Z* ne djeluje antiproliferativno. Iz grafičkog prikaza vidljivo je smanjenje postotka preživljenja stanica s povećanjem duljine tretmana, a najznačajnije smanjenje vidljivo je 5. dan tretmana. Zato smo tako koncipirali i ostale pokuse. Učinak

tretmana Ad-Ap na liniju H1299 po duljini tretmana (3, 4 i 5 dana) prikazan je grafički na slici 25a. Za usporedbu je na slici 25b prikazan učinak tretmana stanica Ad-lac Z. Iz grafičkog prikaza vidljivo je da se postotak preživljenja stanica smanjuje povećanjem multipliciteta infekcije i duljine tretmana, te je najjače 5. dan nakon tretmana. Istovremeno tretman stanica konstruktom Ad-lac Z ne pokazuje smanjenje u ovisnosti o duljini trajanja tretmana.



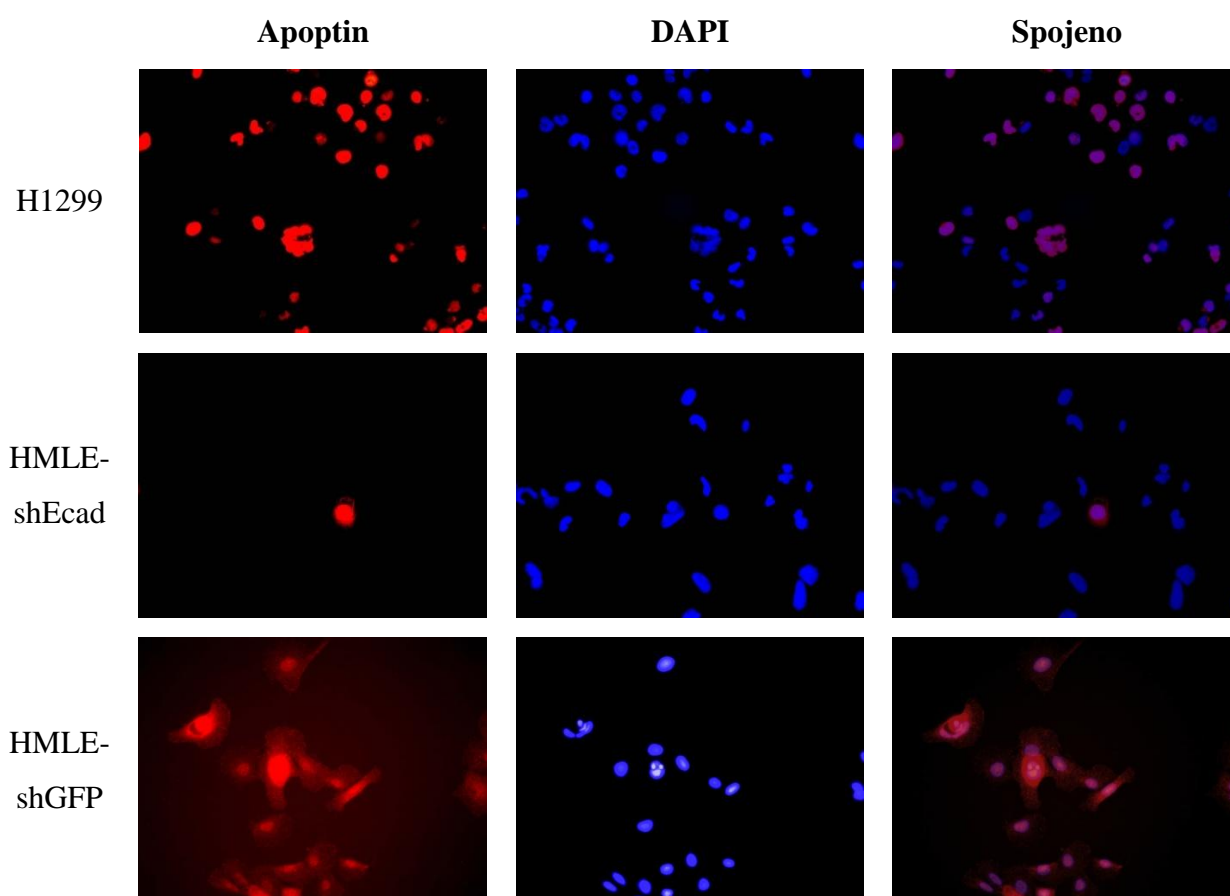
Slika 24: Ovisnost rasta stanica linije H1299 s apoptinom o duljini tretmana. Stanice su nasadene na mikrotitarske pločice sa 96 jažica u gustoći od 1500 stanica po jažici i transducirane adenovirusnim vektorom s apoptinom pri MOI od 20 do 320. Vijabilnost je određena MTT testom nakon 5 dana inkubacije te izražena u obliku postotka u odnosu na kontrolne stanice, peti dan nakon tretmana, za MOI 160. MOI je multiplicitet infekcije, tj. mjera jačine infekcije stanica i odražava broj infektivnih virusnih čestica po stanici.



Slika 25: Rast stanica H1299 s apoptinom i kontrolnim vektorom, u ovisnosti o multiplicitetu infekcije, kroz različit vremenski period. Stanice su nasađene na mikrotitarske pločice sa 96 jažica u gustoći od 1500 stanica po jažici. Transducirane su adenovirusnim vektorom s apoptinom i *lac Z* pri MOI od 20 do 320. Vijabilnost je određena MTT testom nakon 3, 4 i 5 dana inkubacije te izražena u obliku postotka u odnosu na kontrolne stanice. MOI je multiplicitet infekcije, tj. mjera jačine infekcije stanica i odražava broj infektivnih virusnih čestica po stanici. Slika a prikazuje stanice s apoptinom, a slika b stanice s kontrolnim vektorom s genom *lac Z*.

3.4. Lokalizacija apoptina u stanicama

U stanicama H1299, HMLE-shEcad i HMLE-shGFP inficiranim vektorom Ad-Ap koji omogućuje ekspresiju apoptina, ispitana je lokalizacija ovog proteina pomoću imunobojanja specifičnim sekundarnim fluorescentnim antitijelom. Stanice su pregledane pod epifluorescencijskim mikroskopom te su fotografirane pri povećanju 400x. Na slici 26 je vidljivo da je postotak transdukcije stanica H1299 mnogo viši u odnosu na HMLE-shEcad i HMLE-shGFP. Apoptin je u H1299 liniji prvenstveno lokaliziran u jezgri. Kod HMLE-shEcad također je vidljiva lokalizacija apoptina u jezgri. Kod HMLE-shGFP stanica apoptin pokazuje lokalizaciju i u jezgri i citoplazmi.



Slika 26: Lokalizacija apoptina u stanicama linija H1299, HMLE-shEcad i HMLE-shGFP. Stanice su nasadene u gustoći $0,5 \cdot 10^5$ / ml i tretirane adenovirusnim vektorom s genom za apoptin pri MOI 80. Fiksirane su paraformaldehidom te vizualizirane pomoću sekundarnog antitijela koje ima vezanu fluorescencijsku boju. Obojene su bojom DAPI i snimljene na epifluorescencijskom mikroskopu, pri povećanju 400x. Slike prikazuju stanice s apoptinom (lijevo), ukupan broj stanica (sredina), a desno su preklopljene slike. MOI je multiplicitet infekcije, tj. mjera jačine infekcije stanica.

4. RASPRAVA

Cilj ovog rada je ispitati i usporediti protutumorske učinke apoptina na različitim staničnim modelima.

Ispitana je mogućnost zaražavanja staničnih linija HCT116, H1299 te HMLE-shEcad i HMLE-shGFP adenovirusnim vektorom, korištenjem dviju metoda za određivanje djelotvornosti transdukcije. Analizom β -galaktozidazne aktivnosti ispitana je mogućnost transdukcije linija HCT116, HMLE-shEcad i HMLE-shGFP, a imunofluorescencijom linija H1299, HMLE-shEcad i HMLE-shGFP. Slabija podložnost linije HMLE zaražavanju adenovirusnim vektorom, u odnosu na stanične linije H1299 i HCT116, mogla bi se objasniti manjom količinom receptora za adenovirusni vektor na površini stanica HMLE u odnosu na stanice drugih dviju linija, iako je podatak o vrsti i količini receptora za te stanice nepoznat. Unatoč nižem postotku transdukcije, pokazana je mogućnost ulaska vektora u stanice linije HMLE-shEcad, koje predstavljaju staničnu liniju s obilježjima tumorskih matičnih stanica. Dobiveni rezultati postotka transdukcije za liniju H1299 niži su nego vrijednosti iz literature u kojima se koriste identični konstrukti (Teodoro i sur, 2004), pa je moguće da je došlo do pogreške prilikom titriranja virusa, gdje je određen previsoki titar.

Uspoređivanjem rezultata dviju metoda pri multiplicitetu infekcije 80 dobivena je veća vrijednost postotka transdukcije HMLE-shEcad i HMLE-shGFP metodom analize β -galaktozidazne aktivnosti (12,5%, odnosno 11,75%), u usporedbi s metodom imunofluorescencije (6,5%, odnosno 7,5%). Razlog ove razlike nije poznat, pa je moguće da je do različitih rezultata došlo zbog razlike u osjetljivosti i efikasnosti detekcije kod ove dvije metode. Za liniju H1299 nismo mogli usporediti rezultat na obje metode, budući da zbog eksperimentalne pogreške nismo mogli odrediti β -galaktozidaznu aktivnost. Iz sličnih razloga nemamo podatke dobivene imunofluorescencijom na liniji HCT116.

Iz literature je poznato da apoptin ubija stanice tako da izaziva apoptozu (Oorschot i sur, 1999) te mitotsku katastrofu (Lanz i sur, 2013). Do sada ni jedna grupa istraživača nije ispitivala učinak apoptina metodom MTT, što dodatno pridonosi vrijednosti rezultata. No, s druge strane, nismo ih mogli usporediti s literaturnim podacima. Rezultati MTT testa pokazali su antiproliferativni učinak apoptina na linijama H1299 i HMLE-shEcad, dok na linijama HMLE-shGFP i HCT116 nije bilo učinka. Činjenicu da apoptin nije djelovao citotoksično na staničnu liniju HCT116 ne možemo objasniti posjedovanjem funkcionalnog proteina p53, jer je u literaturi pokazano da apoptin djeluje citotoksično na veliki broj linija sa funkcionalnim

p53 (Zhuang i sur, 1995). Moguće je da je u pokusima sa stanicama HCT116 nasađivano previše stanica po jažici, pa je MTT test pokazao neosjetljivost. Učinak apoptina na liniju H1299 u skladu je s literaturom, iako su korištene druge metode, kao što je Annexin test (Teodoro i sur, 2004). Dodatak kontrolnog konstrukta s genom *lac Z* nije izazvao antiproliferativni učinak kod istih staničnih linija. Ipak, došlo je do blagog smanjenja rasta stanica pri visokom titru virusa. To nije neočekivano, budući da i sam tretman stanica adenovirusnim vektorom predstavlja stres za stanice te u maloj mjeri može dovesti do smanjenja rasta. Duljina tretmana stanica apoptinom pokazala se kao bitan faktor te je najveći citotoksični efekt vidljiv peti dan nakon tretmana.

Staničnu liniju HMLE čine stanice koje su prošle dva koraka imortalizacije - uneseni su im geni za veliki T antigen SV40 i hTERT (Elenbaas i sur, 2001). Rezultati dobiveni u sklopu ovog diplomskog rada pokazali su da stanice HMLE nisu osjetljive na apoptin, odnosno nije pokazan antiproliferativni učinak. To bi se moglo objasniti time da u ovom slučaju imortaliziranih stanica epitela dojke nema potrebnih staničnih uvjeta da bi apoptin djelovao citotoksično, kao što je slučaj sa fibroblastima sa unesenim genom za mali T antigen (Zimmerman i sur, 2012). Međutim, moglo bi se reći da HMLE predstavljaju „međufazu“ staničnog miljea koji apoptin prepoznaje, jer su rezultati imunofluorescencije pokazali da kod linije HMLE-shGFP, osim lokalizacije u citoplazmi, apoptin također ulazi i u jezgru. Stanice HMLE-shEcad imaju utišan gen za E-kadherin, što im je omogućilo epitelno-mezenhimsku tranziciju te se ponašaju kao tumorske matične stanice. Pokazano je da se u tim stanicama promijenio obrazac ekspresije velikog broja gena, čime im se mijenja odgovor na kemoterapiju (Gupta i sur, 2009), što bi moglo objasniti činjenicu da su postale i malo osjetljivije na apoptin. Efikasnost transdukcije sa 320 MOI manja je za HMLE-shGFP u odnosu na HMLE-shEcad, što bi moglo utjecati na smanjenje osjetljivosti pri istom MOI. Razlike u osjetljivosti pri drugim MOI prelaze razlike u efikasnosti transdukcije. Tumorske matične stanice imaju povećanu otpornost na konvencionalne kemoterapeutike, pa su ove stanice rezistentnije na apoptin u usporedbi s linijom H1299. Treba napomenuti i da je ulazak adenovirusa u stanice manji nego kod stanica H1299. Ipak, ovaj rezultat je značajan budući da je iz literature poznato kako su matične stanice tumora rezistentne na kemoterapeutike i terapiju zračenjem pa nakon terapije koja uništava stanice raka one ostaju u organizmu i imaju potencijal za ponovni razvoj tumora (Li i sur, 2008). Istraživanja apoptina u ovom kontekstu svakako treba nastaviti, a posebnu pažnju treba usmjeriti ka poboljšanju unosa apoptina u HMLE stanice.

Konstrukt adenovirusnog vektora s apoptinom, dobiven od prof. Teodora (Teodoro i sur, 2004), provjeren je korištenjem imunofluorescencije te je potvrđena njegova funkcionalnost. Dosadašnji radovi pokazali su lokalizaciju apoptina u jezgri transformiranih stanica te u citoplazmi primarnih, netransformiranih stanica (Danen-Van Oorschot i sur, 1997). Teodoro i suradnici (2004) pokazali su lokalizaciju apoptina u jezgri stanica H1299. Naši rezultati potvrdili su lokalizaciju apoptina u jezgri H1299 stanica te su u suglasnosti s njihovim rezultatima. Za liniju HMLE-shGFP naši rezultati, kao što je bilo navedeno, pokazuju lokalizaciju apoptina u jezgri i u citoplazmi. Za razliku od njih, u stanicama HMLE-shEcad koje nemaju E-kadherin apoptin je lokaliziran isključivo u jezgri, što predstavlja svojevrsno iznenađenje s obzirom na genetsku podlogu tih stanica. Međutim, i analiza vijabilnosti tih stanica pokazala je njihovu veću osjetljivost na apoptin u odnosu na kontrolne HMLE. Dobiveni rezultati pokazali su da je lokalizacija apoptina u jezgri povezana s antiproliferativnim učinkom, što je u skladu sa poznatim podacima o mehanizmu djelovanja apoptina. Posebice je zanimljivo da se ta činjenica može primijeniti i za matične stanice tumora.

Iako se metodom MTT, posebice kod stanica H1299, detektiralo smanjenje rasta i u određenoj mjeri smrt stanica, metodom imunofluorescencije nije bilo vidljivo da se u stanicama događa apoptoza. Najvjerojatniji razlog je taj što je eksperiment trajao dva dana, a rezultati MTT testa pokazali su da do najjačeg citotoksičnog učinka apoptina dolazi nakon pet dana, pa je taj period bio prekratak da bi apoptoza bila vidljiva. Stoga bi metodu imunofluorescencije trebalo ponoviti peti dan nakon tretmana stanica apoptinom.

Unatoč činjenici da klasična kemoterapija koja specifično ubija tumorske stanice postoji više od osamdeset godina, do sad se pokazala uspješnom na ograničenom broju tumora. Apoptin predstavlja novi pristup terapiji tumora, koji koristi jedinstvena obilježja tumorskih stanica, zbog čega selektivno ubija tumorske stanice, a normalnim, netransformiranim stanicama ne šteti. Kako bi terapija dugoročno bila efektivna, bilo bi idealno da osim tumorskih stanica uništi i tumorske matične stanice i time spriječi ponovan rast tumora. Rezultati dobiveni u sklopu ovog diplomskog rada ukazuju da bi apoptin mogao biti učinkovit i u terapiji tumorskih matičnih stanica, iako je antiproliferativni učinak na ove stanice blag i ograničen slabim unosom vektora u stanicu.

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu ispitan je protutumorski učinak i lokalizacija apoptina na različitim staničnim linijama. Iz rezultata dobivenih tokom ovog rada može se donijeti nekoliko bitnih zaključaka:

- Stanice linija HCT116, H1299, HMLE-shEcad i HMLE-shGFP moguće je transducirati adenovirusnim vektorom koji nosi gen za apoptin.
- Stanice HMLE teško se transduciraju adenovirusima.
- Uslijed tretmana stanica adenovirusnim vektorom s apoptinom smanjuje se rast stanica H1299 i HMLE-shEcad u odnosu na kontrolne stanice, dok kod stanica HCT116 i HMLE-shGFP nema smanjenja.
- Kontrolni virus AdLacZ vrlo blago utječe na rast stanica.
- U stanicama H1299 i HMLE-shEcad apoptin lokalizira u jezgri, a u stanicama HMLE-shGFP i u citoplazmi i u jezgri.
- Antiproliferativni učinak apoptina može se povezati s lokalizacijom u stanici: apoptin inhibira rast stanica u kojima je lokaliziran u jezgri, a kada je lokaliziran u citoplazmi nema takav učinak.

Dobiveni rezultati daju dobru podlogu budućim istraživanjima na putu za razvoj nove terapije liječenja tumora, koja svakako treba nastaviti.

6. LITERATURA

- Adair, BM (2000): Immunopathogenesis of chicken anemia virus infection. *Dev Comp Immunol*, **24**: 247-55.
- Adams, JM i Cory, S (2007): The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, **26**: 1324–1337.
- Ambriović Ristov, A (2007): Metode u molekularnoj biologiji. Institut Ruđer Bošković, Zagreb.
- Bacchetti, S i Graham, FL (1993): Inhibition of cell proliferation by an adenovirus vector expressing the human wild type p53 protein. *Int. J. Onc*, **3**: 781–788.
- Backendorf, C, Visser, AE, de Boer, AG, Zimmerman, R, Visser, M, Voskamp, P, Zhang, Y-H i Noteborn, M (2008): Apoptin: Therapeutic Potential of an Early Sensor of Carcinogenic Transformation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, **48**:143–69.
- Bhowmick, NA, Neilson, EG i Moses, HL (2004): Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, **432**: 332–337.
- Bishop, JM (1996): The discovery of proto-oncogenes. *FASEB Journal*, **10**: 362-364.
- Chen K, Luo Z, Zheng SJ. (2011): Gallus Heat shock cognate protein 70, a novel binding partner of Apoptin. *J. Virol*, **8**:324.
- Danen-Van Oorschot AA, Zhang Y-H, Leliveld SR i sur (2003): Importance of nuclear localization of apoptin for tumor-specific induction of apoptosis. *J Biol Chem*, **278**:27729–27736.
- Danen-van Oorscot, AA, Fischer, DF, Grimbergen, JM, Klein, B, Zhuang, SM, Falkenburg, JHF, Backendorf, C, Quax, PHA, van der Eb, AJ i Noteborn, MHM (1997): Apoptin induces apoptosis in human transformed and malignant cells but not in normal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci*, **94**: 5843–5847.
- Danen-van Oorscot, AA, van der Eb, AJ i Noteborn MHM (2000): The Chicken Anemia Virus-Derived Protein Apoptin Requires Activation of Caspases for Induction of Apoptosis in Human Tumor Cells. *J. virol*, 7072–7078.
- Elenbaas, B, Spirio, L, Koerner, F, Fleming, FD, Zimonjic, DB, Donaher, JL, Popescu, NC, Hahn, WC i Weinberg, RA (2001): Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev*, **15**:50–65.
- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Núñez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G i Kroemer G (2012): Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation*, **19**: 107–120.
- Gupta, PB, Onder, TT, Jiang, G, Tao, K, Kuperwasser, C, Weinberg, RA i Lander, ES (2009): Identification of Selective Inhibitors of Cancer Stem Cells by High-Throughput Screening. *Cell*, **138**: 645–659.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000): The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**: 57-70.
- Heilman, DW, Teodoro, JG i Green, MR (2006): Apoptin Nucleocytoplasmic Shuttling Is Required for Cell Type-Specific Localization, Apoptosis, and Recruitment of the Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome to PML Bodies. *J. Virol*, **80**:7535.
- <http://stemcells.nih.gov/info/basics/Pages/Default.aspx>
- http://stemcells.nih.gov/info/Regenerative_Medicine/pages/2006chapter9.aspx
- Hussain, SP i Harris, CC (1998): Molecular epidemiology of human cancer: Contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res*, **58**: 4023–4037.

Junttila MR, and Evan GI (2009). p53—a Jack of all trades but master of none. *Nat. Rev. Cancer*, **9**: 821–829.

Kucharski, TJ, Gamache, I, Gjoerup, O, Teodoro, JG (2011): DNA Damage Response Signaling Triggers Nuclear Localization of the Chicken Anemia Virus Protein Apoptin. *J. Virol*, **85**:12638-12651.

Lanz, HL, Zimmerman, RME, Brouwer, J, Noteborn, MHM, Backendorf, C (2013): Mitotic catastrophe triggered in human cancer cells by the viral protein apoptin. *Cell Death and Disease*, **4**:487-455.

Leliveld SR, Dame RT, Mommaas MA, Koerten HK, Wyman C i sur (2003): Apoptin protein multimers form distinct higher-order nucleoprotein complexes with DNA. *Nucleic Acids Res*, **31**: 4805–13.

Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, Remington L, Ruley HE, Fisher DE, Housman DE, Jacks T (1994): p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science*, **266**: 807-810.

Maddika S, Booy EP, Johar D, Gibson SB, Ghavami S, Los M (2005): Cancer-specific toxicity of apoptin is independent of death receptors but involves the loss of mitochondrial membrane potential and the release of mitochondrial cell death mediators by a Nur77-dependent pathway. *J Cell Sci*, **118**:4485-93.

Maddika S, Mendoza FJ, Hauff K, Zamzow CR, Paranjothy T, Los M (2006): Cancer-Selective Therapy of the Future Apoptin and Its Mechanism of Action. *Cancer Biology & Therapy*, **5**: 10-19.

Morel A-P, Lie`vre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, i sur. (2008): Generation of Breast Cancer Stem Cells through Epithelial-Mesenchymal Transition. *PloS ONE*, **3**:2888.

Noteborn MH, Todd D, Verschuere CA, de Gauw HW, Curran WL, Veldkamp S, Douglas AJ, McNulty MS, van der EA, Koch G (1994): A single chicken anemia virus protein induces apoptosis. *J. Virol*, **68**:346-51.

Olijslagers SJ, Zhang YH, Backendorf C, Noteborn MH (2007): Additive cytotoxic effect of apoptin and chemotherapeutic agents paclitaxel and etoposide on human tumour cells. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol*, **100**:127–31.

Peng C, Yang P, Cui Y, He M, Liang L, Di Y (2013): HSPA9 overexpression inhibits apoptin-induced apoptosis in the HepG2 cell line. *Oncol Rep*, **29**:2431-7.

Pietersen A, Erkeland SJ, Rutjes SA, Philipsen S, Medema JP, Noteborn MH (2005): Continuous apoptin expression in transgenic mice does not interfere with lymphocyte development and proliferation. *J. Med. Mol. Biol*, **2**:321–30.

Poon IK, Oro C, Dias MM, Zhang J, Jans DA (2005): Apoptin nuclear accumulation is modulated by a CRM1-recognized nuclear export signal that is active in normal but not in tumor cells. *Cancer Res*, **65**:7059–64.

Rohn JL, Zhang YH, Aalbers RI, Otto N, Den Hertog J i sur (2002): A tumor-specific kinase activity regulates the viral death protein Apoptin. *J. Biol. Chem*, **277**:50820–27.

Sun GJ, Tong X, Dong Y, Mei ZZ, Sun ZX (2002): Identification of a protein interacting with apoptin from human leucocyte cDNA library by using yeast two-hybrid screening. *ShengWu Hua Xue Yu ShengWu Li Xue Bao (Shanghai)*, **34**:369–72.

Taebunpakul P, Sayan BS, Flinterman M, Klanrit P, Ga`ken J, Odell EW, Melino G, Tavassoli M (2012): Apoptin induces apoptosis by changing the equilibrium between the stability of TAp73 and DNp73 isoforms through ubiquitin ligase PIR2. *Apoptosis*, **17**:762–776.

Tavassoli M, Guelen L, Luxon BA i Gäken J (2005): Apoptin: Specific killer of tumor cells? *Apoptosis*, **10**:717–724.

Teodoro JG, Heilman, DW, Parker AE i sur (2004): The viral protein Apoptin associates with the anaphase-promoting complex to induce G2/M arrest and apoptosis in the absence of p53. *Genes Dev*, **18**:1952-1957.

Todd D (2000): Circoviruses: Immunosuppressive threats to avian species: A review, *Avian Pathology*, **29**:373-394.

Wagstaff KM, Jans DA (2009) Nuclear drug delivery to target tumour cells. *Eur J Pharmacol*, **625**:174-80.

Walensky LD (2006): BCL-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death. *Cell Death Differ*, **13**:1339–50.

Warburg, OH (1930): *The Metabolism of Tumours: Investigations from the Kaiser Wilhelm Institute for Biology, Berlin-Dahlem* (London, UK: Arnold Constable).

Weli, SC i Tryland, M (2011): Avipoxviruses: infection biology and their use as vaccine vectors. *J. Virol*, **8**:49.

Yuan L, Zhang L, Dong X, Zhao H, Li S, Han D, Liu X (2013): Apoptin selectively induces the apoptosis of tumor cells by suppressing the transcription of HSP70. *Tumour Biol*, **34**:577-85.

Zhang DW, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu BJ, Lin SC i sur (2009): RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science*, **325**:332–336.

Zhang YH, Kooistra K, Pietersen A, Rohn JL, Noteborn MH (2004): Activation of the tumor-specific death effector apoptin and its kinase by an N-terminal determinant of simian virus 40 large T antigen. *J Virol*, **78**:9965–9976.

Zhang YH, Leliveld SR, Kooistra K, Molenaar C, Rohn JL i sur (2003): Recombinant Apoptin multimers kill tumor cells but are nontoxic and epitope-shielded in a normal-cell-specific fashion. *Exp. Cell Res*, **289**:36–46.

Zhang, WW (1999): Development and application of adenoviral vectors for gene therapy of cancer.. *Cancer Gene Therapy*, **6**:113–138.

Zhuang SM, Shvarts A, van Ormondt H, Jochemsen AG, van de Eb AJ i Noteborn MH (1995): Apoptin, a protein derived from chicken anemia virus, induces p53-independent apoptosis in human osteosarcoma cells. *Cancer Res*, **55**:486–489.

Zimmerman R, Peng DJ, Lanz H, Zhang YH, Danen-Van Oorschot A, Quz S, Backendorf C, Noteborn M (2012): PP2A inactivation is a crucial step in triggering apoptin-induced tumor-selective cell killing, *Cell Death and Disease*, **3**:291.